

Vergleichende Untersuchungen zur
Regulation der SNARE-Komplexbildung
durch Sec1/Munc18-Proteine

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
innerhalb der Göttinger Graduiertenschule für Neurowissenschaften
und Molekulare Biowissenschaften (GGNB)
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Pawel Burkhardt

aus Wroclaw

Göttingen 2009

Mitglied des Betreuungsausschusses:
Dr. Dirk Fasshauer (Referent)
Arbeitsgruppe Strukturelle Biochemie
Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie

Mitglied des Betreuungsausschusses:
Prof. Dr. Ralf Ficner (Korreferent)
Abteilung Molekulare Strukturbiologie
Georg-August-Universität Göttingen

Mitglied des Betreuungsausschusses:
Prof. Dr. Michael Thumm
Abteilung Biochemie II
Georg-August-Universität Göttingen

Danksagung

Dr. Dirk Fasshauer möchte ich an erster Stelle danken. Die exzellente Betreuung, die sehr gute Zusammenarbeit und die vielen wertvollen Tipps während meiner praktischen Arbeitszeit und beim Verfassen dieser Arbeit waren von unschätzbarem Wert für mich.

Prof. Ralf Ficner danke ich für die freundliche Übernahme der Begutachtung.

Prof. Reinhard Jahn danke ich für die Ermöglichung dieser Arbeit in seiner Abteilung, für die stetige Unterstützung und viele sehr hilfreiche Gespräche.

Ich danke dem Graduiertenkolleg 521 für die Unterstützung und die interessanten Seminare. Insbesondere danke ich *Prof. Detlef Dönecke* für die vielen inspirativen Gespräche und Einblicke in die erfolgreiche Organisation eines Graduiertenkollegs.

Prof. Ralf Ficner und *Prof. Michael Thumm* für die zahlreichen wertvollen Ratschläge in meinem Thesis Committee.

Dem „Team Future“ mit *Dr. Katrin Wiederhold, Nickias Kienle, Esra Demircioglu, Dr. Ulrike Winter, Dr. Tobias Klöpfer* und *Wolfgang Berning-Koch* danke ich für die sehr nette Arbeitsatmosphäre und die vielen Tipps und Tricks während meiner praktischen Arbeitszeit.

Dr. Gottfried Mieskes danke ich für seine außerordentliche Hilfsbereitschaft.

Dr. Alexander Stein danke ich für die vielen Diskussionen auf unserem Balkon.

Sina Barysch, Ioanna Bethani und *Michaela Hellwig* für ihre sehr wertvolle Hilfe bei der Immunfluoreszenzmikroskopie und in der Zellkultur.

Allen anderen Mitarbeitern der Abteilung Neurobiologie danke ich für anregende Diskussionen und für die angenehme und freundliche Atmosphäre im Labor.

Christian Stegmann danke ich besonders dafür, dass er als erstes die leere Elektronendichte in Munc18a entdeckt hat.

Dr. Douglas Hattendorf und *Dr. Bill Weis* danke ich für die sehr interessante und erfolgreiche Zusammenarbeit beim Verfeinern der Munc18a/Syntaxin1a-Struktur.

Uwe Pleßmann, Dr. Henning Urlaub und *Dr. Friedrich Lottspeich* für die N-terminale Sequenzierung von Syntaxin1.

Monika Abedin und *Dr. Nicole King* für die *Monosiga brevicollis* cDNA-Bank.

Maike Hartisch, Dr. Frederique Varoquaux und *Dr. Stefan Eimer* für die Hilfe bei der Hochdruckgefrierpräparation und Transmissions-Elektronenmikroskopie.

Meinen Eltern und *meiner Schwester* danke ich für ihre Unterstützung und ihr Verständnis und *Anita* für ihre Geduld und Liebe.

Abkürzungen

Abb. Abbildung
AS Aminosäure(n)
ATP Adenosin-5'-Triphosphat
ATPase Adenosin-5'-Triphosphatase
AU Absorptionseinheiten (absorption units)
BSA Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
DNA Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
DNase Desoxyribonuklease
DTT Dithiothreitol
EDTA Ethylendiamintetraessigsäure
h Stunde(n)
His₆ Hexa-Histidin-tag
IPTG Isopropyl-β-D-Thiogalaktosid
ITC Isotherme Titrationskalorimetrie (isothermal titration calorimetry)
kDa Kilodalton
min Minute(n)
Ni²⁺-NTA Nickel-Nitrilo-Triessigsäure
OD_x optische Dichte bei x nm
OG Oregon Green 488 iodoacetamide
PAGE Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS (phosphate buffered saline)
PCR Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
pH negativer dekadischer Logarithmus der H₃O⁺-Ionenkonzentration
PMSF Phenylmethylsulfonylfluorid
rpm Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT Raumtemperatur
s Sekunde(n)
S Svedberg
SDS Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyle sulfate)
SNAP (soluble NSF attachment protein)
SNAP-25 (synaptosome-associated protein of 25 kDa)
SNARE SNAP-Rezeptor
Syb Synaptobrevin
Syx Syntaxin
Tab. Tabelle
TR Texas Red C5 bromoacetamide
Tris Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
U Einheit der Enzymaktivität (units)
UV Ultraviolett
VAMP vesicle associated membrane protein
v/v Volumen/Volumen (volume/volume)
w/v Masse/Volumen (weight/volume)

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung

1.1	Membranfusion zwischen Kompartimenten eukaryotischer Zellen	10
1.2	Die Rolle der SNARE-Proteine bei der Membranfusion	11
1.3	Strukturelle Eigenschaften von SNARE-Proteinen	15
1.4	Modell der SNARE-Protein vermittelten Membranfusion	17
1.5	Die Funktion von Sec1/Munc18 (SM)-Proteinen bei der Membranfusion	20
1.6	SM-Proteine interagieren auf verschiedene Weise mit SNARE-Proteinen	24
1.7	Ziele dieser Arbeit	29

2 Material und Methoden

2.1	Material	31
2.1.1	Chemikalien	31
2.1.2	Enzyme, Kits, Vektoren, Bakterienstämme	31
2.1.3	DNA-Konstrukte	31
2.1.4	Peptide	33
2.2	Methoden	33
2.2.1	Proteinexpression und -reinigung	33
2.2.2	Biochemische Standardmethoden	35
2.2.3	Herstellung und Reinigung von SNARE-Komplexen	36
2.2.4	Fluoreszenzspektroskopie	37
2.2.5	Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC)	39
2.2.6	Circular Dichroismus (CD)-spektroskopie	39
2.2.7	Herstellung von polyklonalen Antikörpern gegen Synaptobrevin aus <i>Monosiga brevicollis</i>	40
2.2.8	Kultivierung des Choanoflagellaten <i>Monosiga brevicollis</i>	40
2.2.9	Immunfärbung und Fluoreszenzmikroskopie	41
2.2.10	Hochdruckgefrierpräparation („High-Pressure-Freezing“) und Kryo-Substitution	42
2.2.11	Transmissions-Elektronenmikroskopie	43

3	Ergebnisse	
3.1	Biophysikalische Untersuchungen der Munc18a/Syntaxin1a-Interaktion	44
3.1.1	Das N-terminale Peptid von Syntaxin1a nimmt an der Bindung zu Munc18a teil	44
3.1.2	Neue verfeinerte Munc18a/Syntaxin1a-Struktur - Das N-terminale Peptid von Syntaxin1a ist in der Kristallstruktur sichtbar	51
3.1.3	Für eine hochaffine Interaktion mit Vps45 sind das N-terminale Peptid und die „geschlossene“ Konformation von Syntaxin16 entscheidend	58
3.2	Die Rolle von Munc18a bei der SNARE-Komplexbildung	61
3.2.1	Munc18a hemmt die SNARE-Komplexbildung <i>in vitro</i>	61
3.2.2	Entfernt man das N-terminale Peptid des Syntaxins, ist Munc18 nicht mehr in der Lage die SNARE-Komplexbildung zu unterbinden	62
3.2.3	Munc18a bindet eine „offene“ Syntaxin1a-Mutante mit hoher Affinität, blockiert aber die SNARE-Komplexbildung nicht	68
3.3	Untersuchung der Munc18/Syntaxin-Interaktion in dem Choanoflagellat <i>Monosiga brevicollis</i>	71
3.3.1	Der Sekretionsapparat in einem Einzeller: SNAREs und Munc18 in dem Choanoflagellat <i>Monosiga brevicollis</i>	73
3.3.2	Ein konservierter Bindungsmechanismus zwischen Munc18 und Syntaxin1 in dem Choanoflagellat <i>Monosiga brevicollis</i>	77
3.3.3	Die SNARE-Komplexbildung in <i>Monosiga brevicollis</i> wird von Munc18 beeinflusst	78
3.3.4	Die Lokalisation des Sekretionsapparates von <i>Monosiga brevicollis</i>	81
4	Diskussion	
4.1	Ein konservierter Bindungsmechanismus von SM- und SNARE-Proteinen	85
4.2	Mögliche Funktion von Munc18a während der Neuroexozytose	89
4.3	Das Zusammenspiel von Munc18 und sekretorischen SNAREs in dem Choanoflagellat <i>Monosiga brevicollis</i>	94
4.4	Ein möglicher Sekretionsapparat in Choanoflagellaten	98

5 Zusammenfassung	102
6 Summary	104
Literaturverzeichnis	106
Publikationsliste	122

Abbildungsverzeichnis

1.1	SNARE-Proteine können ganz bestimmten Membrantransport-schritten zugeordnet werden	14
1.2	Strukturelle Eigenschaften des neuronalen SNARE-Komplexes	16
1.3	SNARE-Protein vermittelte Membranfusion	19
1.4	Die Folgen der Ausschaltung von SM-Genen in verschiedenen Organismen	21
1.5	Verschiedene Kristallstrukturen von SM-Proteinen	26
3.1	Das N-terminale Peptid von Syntaxin1a nimmt an der Bindung zu Munc18a teil	47
3.2	Charakterisierung der Munc18a/Syntaxin1a-Bindung mittels Tryptophanfluoreszenz	48
3.3	Charakterisierung der Munc18a/Syntaxin1a-Bindung mittels Fluoreszenz-Anisotropie	50
3.4	Das N-terminale Peptid von Syntaxin1a ist in der Munc18a/Syntaxin1a-Kristallstruktur zu sehen	52
3.5	Neue verfeinerte Munc18a/Syntaxin1a-Struktur	53
3.6	Vergleich der N-terminalen Syntaxin1a-Bindungsstellen bei Munc18a und Munc18c	54
3.7	Punktmutationen in Syntaxin1a oder in Munc18a verhindern eine Interaktion des N-terminalen Peptids mit Munc18a	55
3.8	Ein intaktes N-terminales Syntaxin1a-Peptid ist nötig für die Bindung an Munc18a	56
3.9	Das N-terminale Peptid und die geschlossene Konformation von Syntaxin16 sind an der Bindung zu Vps45 beteiligt	59
3.10	Munc18a inhibiert die SNARE-Komplexbildung	62
3.11	Die Rolle des N-terminalen Peptids bei der SNARE-Komplexbildung	63
3.12	Die Rolle des N-terminalen Peptids bei der binäre SNARE-Interaktion	64
3.13	Der Effekt von Punktmutationen in Syntaxin1a und Munc18a auf die SNARE-Komplexbildung	66
3.14	Munc18a bindet eine „offene“ Syntaxin1a-Mutante mit hoher Affinität	69

3.15	Munc18 kann, gebunden an eine offene Syntaxin1a-Mutante, die SNARE-Komplexbildung nicht verhindern	71
3.16	Choanoflagellaten als nächst verwandte Einzeller der Tiere	73
3.17	Vergleich der sekretorischen SNARE-Proteine aus der Wanderratte <i>Rattus norvegicus</i> und dem Choanoflagellat <i>Monosiga brevicollis</i>	74
3.18	Ein SDS-resistenter SNARE-Komplex in dem Choanoflagellat <i>Monosiga brevicollis</i>	75
3.19	Der SNARE-Komplex von <i>Monosiga brevicollis</i> ist alpha-helikol und weist eine hohe Schmelztemperatur auf	76
3.20	Die Munc18/Syntaxin1-Interaktion in dem Choanoflagellat <i>Monosiga brevicollis</i> gemessen mit Isothermaler Titrationskalorimetrie (ITC)	78
3.21	Der Einfluss von Munc18 auf die SNARE-Komplexbildung in dem Choanoflagellat <i>Monosiga brevicollis</i>	80
3.22	Lokalisation von Synaptobrevin in <i>Monosiga brevicollis</i>	82
3.23	Elektronenmikroskopische Aufnahmen von <i>Monosiga brevicollis</i>	83
4.1	Ein konservierter Bindungsmechanismus zwischen SM- und SNARE-Proteinen	86
4.2	Schematisches Modell wie sich Syntaxin1a aus der festen Umklammerung von Munc18a lösen könnte	90
4.3	Sequenzvergleich des N-terminalen Peptids von Syntaxin1	96

1. Einleitung

1.1 Membranfusion zwischen Kompartimenten eukaryotischer Zellen

Eukaryotische Zellen sind in zahlreiche funktionell unterscheidbare Kompartimente unterteilt, die durch Lipidmembranen vom Cytosol abgegrenzt sind. So können Prozesse, die unterschiedliche Bedingungen brauchen, gleichzeitig an verschiedenen Orten ablaufen. Jedes Kompartiment benötigt einen erforderlichen Satz an Enzymen und anderen Proteinen um spezifische Reaktionen ausführen zu können. Durch zielgerichtete intrazelluläre Transportvorgänge können diese Proteine zu ihrem Bestimmungsort gelangen. Für den Transport von Proteinen und Lipiden zwischen den einzelnen Kompartimenten sorgen Transportvesikel, welche von einer Lipiddoppelschicht umgeben sind und deren Durchmesser zwischen 50 bis 100 nm beträgt (Palade, 1975). In einem Prozess, welcher als vesikulärer Transport bezeichnet wird, werden zunächst Vesikel mit dem zum Transport bestimmten Stoff von einem Ausgangskompartiment abgeschnürt. Die Bildung von Transportvesikeln durch Abknospung wird auch als *budding* bezeichnet. Nach dem gerichteten Transport in der Zelle kommt es zur spezifischen Anheftung der Transportvesikel an die Membran des Zielkompartiments, ein Schritt der als *tethering/docking* bezeichnet wird. Danach verschmelzen die Vesikel (*fusion*) mit dem Zielkompartiment. Dabei müssen die Abstoßungskräfte der polaren Kopfgruppen der Phospholipide der sich gegenüberliegenden Lipiddoppelmembranen überwunden werden. Es kommt zur Freisetzung des Inhalts des Transportvesikels in das Lumen des Zielkompartiments. Ein wichtiger Fusionsschritt im vesikulären Transport in eukaryotischen Zellen ist die Fusion der Membranen sekretorischer Vesikel mit der Plasmamembran. Dieser Prozess wird als *Exozytose* bezeichnet. Bei der Exozytose werden die Inhaltsstoffe sekretorischer Vesikel in den extrazellulären Raum freigesetzt. Die Exozytose spielt in mehrzelligen Organismen eine besondere Rolle, da spezialisierte Zellen miteinander kommunizieren können und eventuell auch Material austauschen können. Einen Spezialfall der Exozytose stellt die kalziumabhängige, regulierte Exozytose zwischen Nervenzellen dar. So genannte synaptische Vesikel fusionieren dabei mit der präsynaptischen Plasmamembran. Dieser Prozess wird als Neuroexozytose bezeichnet. An hochspezialisierten Kontaktstellen der Nervenzellen, den chemischen Synapsen, sorgt ein ankommendes Aktionspotential für einen Kalziumeinstrom in die Zelle. Dadurch kommt es in Bruchteilen von Sekunden zur

Freisetzung von niedermolekularen Substanzen, den Neurotransmittern, in den synaptischen Spalt (Katz, 1971). Neurotransmitter diffundieren durch den synaptischen Spalt und binden an die Rezeptoren der postsynaptischen Membran, wodurch eine zellspezifische Antwort ausgelöst wird.

1.2 Die Rolle der SNARE-Proteine bei der Membranfusion

Bis in die Anfänge der 1980er Jahre war der Mechanismus, wie Vesikel mit Membranen verschmelzen können, nicht bekannt. Insbesondere die Frage, welche Proteine bei der Fusion von Vesikeln eine Rolle spielen, konnte nicht beantwortet werden. In verschiedenen Arbeitsgruppen wurde untersucht, wie sekretierte Proteine vom Ort ihrer Synthese, dem rauhen endoplasmatischen Retikulum über den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche transportiert werden. 1984 gelang es erstmals, den vesikulären Transport innerhalb des Golgi-Apparates *in vitro* zu rekonstituieren (Balch et al., 1984). Der Transport innerhalb des Golgi-Apparates erfolgt durch Vesikel. Diese schnüren sich von einer Golgi-Zisterne ab, um dann mit der nächsten Zisterne zu verschmelzen. Die Forscher stellten fest, dass dieser vesikuläre Transportschritt ATP-abhängig ist und durch die Substanz N-Ethylmaleimid (NEM) blockiert werden kann (Glick et al., 1987). Dies führte zur Isolierung des NEM-sensitiven Faktors (NSF), eines Proteins, welches essentiell für den vesikulären Transport ist (Block et al., 1988, Wilson et al., 1989). Es stellte sich heraus, dass NSF eine ATPase ist. Interessanterweise kann NSF bei Anwesenheit weiterer löslicher Proteine an Membranen binden. Diese löslichen Proteine konnten ebenfalls isoliert werden und wurden SNAP-Proteine (soluble NSF attachment proteins) genannt. SNAPs sind Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 35 und 39 kDa, die in den drei Isoformen α -, β - und γ -SNAP vorkommen (Clary et al., 1990; Clary und Rothman, 1990; Whiteheart et al., 1993). Damals nahm man an, dass NSF die Membranfusion katalysiert. Da NSF ein lösliches Protein ist und nur mit Hilfe der SNAP-Proteine an Membranen binden kann, suchte man für NSF und SNAP membranständige Rezeptoren. In Bindungsversuchen mit α -SNAP und NSF konnte ein Proteinkomplex isoliert werden, der neben NSF und α -SNAP die Membranproteine SNAP-25, Syntaxin1 und Synaptobrevin enthielt (Söllner et al., 1993). Diese Proteine werden als SNAP-Rezeptoren (SNAREs) bezeichnet. Die Proteine SNAP-25, Syntaxin1 und Synaptobrevin waren vorher schon als

Bestandteile von Synapsen bekannt. Es war aber nicht bekannt, dass sie einen stabilen Komplex bilden.

Die Rolle der SNARE-Proteine bei der Membranfusion wurde mittels zahlreicher genetischer und physiologischer Versuche in den letzten Jahren untersucht. Versuche mit Tieren, in denen spezifisch ein Gen ausgeschaltet wurde (*knock out*), zeigen, dass die SNAREs für die Exozytose bzw. Neurotransmission von zentraler Bedeutung sind. Studien im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* zeigen, dass in Abwesenheit von Synaptobrevin bzw. Syntaxin1 die Würmer nach abgeschlossener Embryonalentwicklung starke Defekte in ihrer Bewegungsfähigkeit aufweisen (Nonet et al., 1998, Saifee et al., 1998). Des Weiteren weisen die Würmer eine gestörte Neurotransmission auf (Nonet et al., 1998, Saifee et al., 1998). Ähnliche Studien in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* zeigen, dass die Abwesenheit von Syntaxin1 eine Blockierung der Embryonalentwicklung zur Folge hat. In den untersuchten embryonalen Zellen ist die Neurotransmitterausschüttung an der neuromuskulären Endplatte vollständig blockiert (Schulze et al., 1995; Broadie et al., 1995). Die Deletion von Synaptobrevin in der Fruchtfliege führt zu einem Verlust der Bewegungsfähigkeit und zum vollständigen Block der Ca^{2+} -abhängigen Neurotransmitterfreisetzung (Deitcher et al., 1998). Interessanterweise zeigen elektronenmikroskopische Aufnahmen, dass die Deletion von Synaptobrevin und Syntaxin1 in der Fruchtfliege die Morphologie und Größe von Synapsen nicht verändert (Broadie et al., 1995). Auch in Vertebraten wurde die Rolle der SNARE-Proteine bei der Neuroexozytose untersucht. Der Synaptobrevin2 *knock out* der Hausmaus *Mus musculus* ist letal, die Mäuse sterben bei der Geburt. Elektrophysiologische Untersuchungen an Neuronen des Synaptobrevin2 *knock outs* ergaben eine nahezu komplette Inhibierung der Ca^{2+} -induzierten Neuroexozytose (Schoch et al., 2001). Auch die Deletion von SNAP-25 in Mäusen zeigt drastische Effekte. Die Mäuse sterben bei der Geburt. Untersuchungen an Neuronen der SNAP-25 *knock out*-Mäuse ergaben, dass die Ca^{2+} -induzierte Neuroexozytose blockiert ist, allerdings die spontane Freisetzung von Neurotransmittern nicht verändert ist (Washbourne et al., 2002).

Ein weiterer Beleg dafür, dass die SNARE-Proteine SNAP-25, Syntaxin1 und Synaptobrevin2 tatsächlich an der Fusion synaptischer Vesikel mit der Plasmamembran beteiligt sind, zeigten Experimente mit den Nervengiften Tetanustoxin und Botulinustoxin. Es handelt sich hierbei um die giftigsten bekannten

Substanzen. Insgesamt wurden acht verschiedene clostridiale Neurotoxine identifiziert, das Tetanustoxin (TeNT) und sieben Botulinustoxine (BoNT/A, B, C1, D, E, F und G) (Übersicht in Schiavo et al., 2000). Die Botulinumtoxine werden von *Clostridium botulinum*, das Tetanustoxin wird von *Clostridium tetani* sezerniert. Über rezeptorvermittelte Endozytose gelangen die clostridialen Neurotoxine in endosomale Kompartimente von Motoneuronen. Die Neurotoxine bestehen aus einer ca. 50 kDa großen leichten Kette und aus einer ca. 100 kDa großen schweren Kette. Durch die Translokation der Neurotoxine von endosomalen Kompartimenten ins Cytoplasma kommt es zu einer Trennung der leichten Kette von der schweren Kette (Schiavo et al., 1990, Montecucco et al., 2004). Nur die leichte Kette ist proteolytisch aktiv und schneidet spezifisch, je nach Toxintyp, jeweils die verschiedenen SNARE-Proteine SNAP-25, Syntaxin1a und Synaptobrevin2. Dies führt zu einer starken Inhibition der Neuroexozytose (Link et al., 1992; Schiavo et al., 1992; Blasi et al., 1993a/b). Botulinumtoxine wirken direkt in peripheren Nervenzellen und sorgen für einen Block der Informationsweiterleitung an der neuromuskulären Endplatte (Botulismus). Das Tetanustoxin wird dagegen mittels Transzytose in inhibitorische Nervenzellen des Zentralnervensystems transportiert und blockiert hier die Ausschüttung von Neurotransmittern (Wundstarrkrampf) (Übersicht in Schiavo et al., 2000).

Die essentielle Rolle von SNARE-Proteinen bei der Membranfusion wird dadurch bestätigt, dass in allen untersuchten eukaryotischen Zellen Homologe bzw. Isoformen der SNARE-Proteine vorhanden sind (Jahn et al., 2006). Bis heute wurden 26 SNARE-Proteine in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*, 41 im Menschen *Homo sapiens* und 62 im Acker-Schmalwand *Arabidopsis thaliana* identifiziert (Klopper et al., 2007). Viele der SNARE-Proteine können ganz bestimmten Membrantransportschritten zugeordnet werden (Abb. 1.1). In *Saccharomyces cerevisiae* wurden z.B. die in der Plasmamembran vorkommenden Proteine Sso1/2p (Aalto et al., 1993) und Sec9p (Brennwald et al., 1994) identifiziert. Diese Proteine sind mit dem Syntaxin1 bzw. SNAP-25 verwandt. Das Hefeprotein Snc1/2p (Protopopov et al., 1993) ist auf sekretorischen Transportvesikeln lokalisiert und ist homolog zu dem neuronalen Synaptobrevin2.

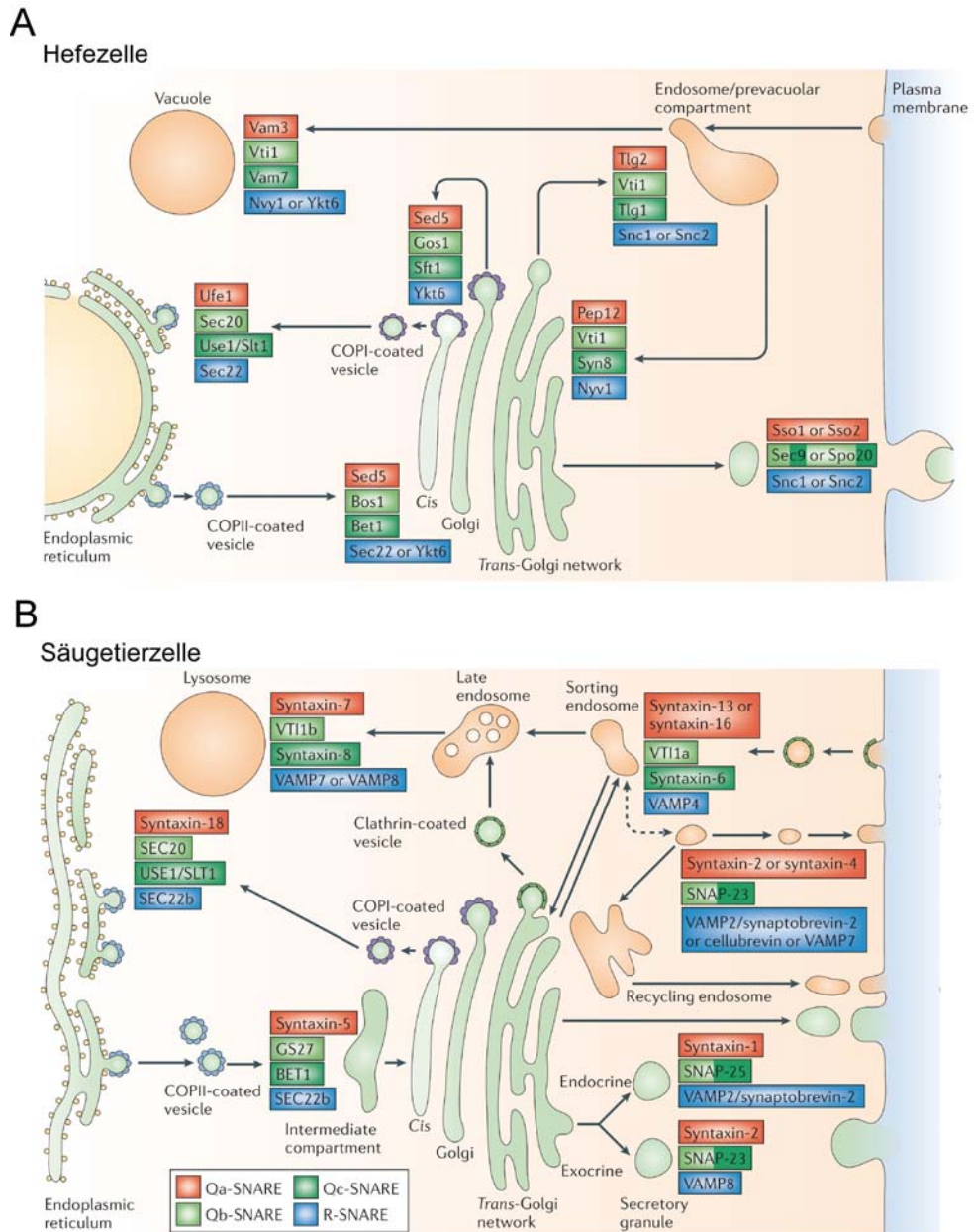


Abb. 1.1: SNARE-Proteine können ganz bestimmten Membrantransportschritten zugeordnet werden. Die unterschiedlichen Kompartimente der Hefe- und Säugetierzelle und verschiedene Transportvesikel sind vereinfacht dargestellt. (A) Bis heute konnten viele SNARE-Proteine ganz bestimmten Schritten des Membranverkehrs zugeordnet werden. So sind z.B. die Hefe-SNAREs Sso1p, Sec9p und Snc2p an der Fusion von sekretorischen Vesikeln mit der Plasmamembran und so an der Entstehung einer neuen Tochterzelle (Knospung) beteiligt. Diese Hefe-SNAREs sind eng verwandt mit den Säugetier-SNAREs SNAP-25, Syntaxin1 und Synaptobrevin2, welche bei der Neuroexozytose beteiligt sind. (B) In Säugetierzellen ähneln die Protein-Transportrouten denen in der Hefe, allerdings sind weitere Zwischenschritte vorhanden (z.B. frühe und späte Endosomen). Auch hier sind bereits für viele Transportschritte bestimmte SNARE-Proteine bekannt, allerdings noch nicht zweifelsfrei für alle Transportwege. Einige SNARE-Proteine können z.B. auch an mehr als einem Membrantransportschritt beteiligt sein (Abb. modifiziert nach Jahn und Scheller, 2006).

1.3 Strukturelle Eigenschaften von SNARE-Proteinen

SNARE-Proteine gehören zu einer Familie membranständiger Proteine, welche in ihrer Größe und Domänenstruktur verschieden sein können. Ein Charakteristikum aller bisher beschriebenen SNARE-Proteine ist ein C-terminal gelegener Bereich, welcher als SNARE-Motiv bezeichnet wird. Das SNARE-Motiv umfasst 60-70 Aminosäuren, es enthält acht so genannte Heptad-Wiederholungen, welche typisch für *coiled coil* Strukturen sind (Bock et al., 2001). Die an der Neuroexozytose beteiligten SNAREs Syntaxin1a, SNAP-25 und Synaptobrevin2 sind die biophysikalisch am besten charakterisierten SNARE-Proteine. Die drei SNARE-Proteine bilden einen SDS resistenten, ternären Komplex aus (Hayashi et al., 1994). Synaptobrevin, auch als VAMP (vesicle-associated membrane protein) bezeichnet, hat ein Molekulargewicht von 14 kDa, besitzt ein SNARE-Motiv und eine Transmembranregion am C-Terminus, über welche es in der Vesikelmembran verankert ist (Trimble et al., 1988 und Abb. 1.2A). Syntaxin1a hat ein Molekulargewicht von 35 kDa, besitzt ein SNARE-Motiv und ist über eine Transmembranregion am C-Terminus in der Plasmamembran verankert (Bennet et al., 1992 und Abb. 1.2A). Syntaxin1a besitzt zusätzlich eine N-terminale Domäne, welche als Habc-Domäne bezeichnet wird (Abb. 1.2A) (Fernandez et al., 1998). Syntaxin1a kann in zwei verschiedenen Konformationen vorliegen, in einer so genannten „geschlossenen“ und „offenen“ Konformation (Fernandez et al., 1998, Dulubova et al., 1999, Margittai et al., 2003a). In der geschlossenen Konformation bindet die Habc-Domäne auf das SNARE-Motiv und Syntaxin1a bildet dabei ein Vier-Helix-Bündel aus (Abb. 1.2C). Syntaxin1a kann nur in der „offenen“ Konformation einen SNARE-Komplex bilden. SNAP-25 (synaptosome-associated protein of 25 kDa) besitzt zwei SNARE-Motive, welche über eine Linkerregion miteinander verbunden sind. SNAP-25 besitzt keine Transmembranregion, sondern wird über palmitoylierte Cysteine in der Mitte des Proteins in der Plasmamembran verankert (Hess et al., 1992).

Der SDS-resistente SNARE-Komplex muss sehr stark erhitzt werden, bevor er in seine Einzelproteine zerfällt. Messungen mit Hilfe der Circular Dichroismus (CD)-Spektroskopie zeigen, dass der synaptische SNARE-Komplex äußerst stabil ist und erst bei ca. 90 °C zerfällt (Fasshauer *et al.*, 1997b). Experimente mit den löslichen Fragmenten der SNARE-Proteine mittels CD-Spektroskopie zeigen, dass die

einzelnen Motive der SNARE-Proteine Syntaxin1a, SNAP-25 und Synaptobrevin2 hauptsächlich ungefaltet vorliegen. Wenn die SNARE-Proteine Syntaxin1a, SNAP-25 und Synaptobrevin2 interagieren, kommt es zu einer deutlichen Zunahme des alpha-helikalen Anteils (Fasshauer et al., 1997b).

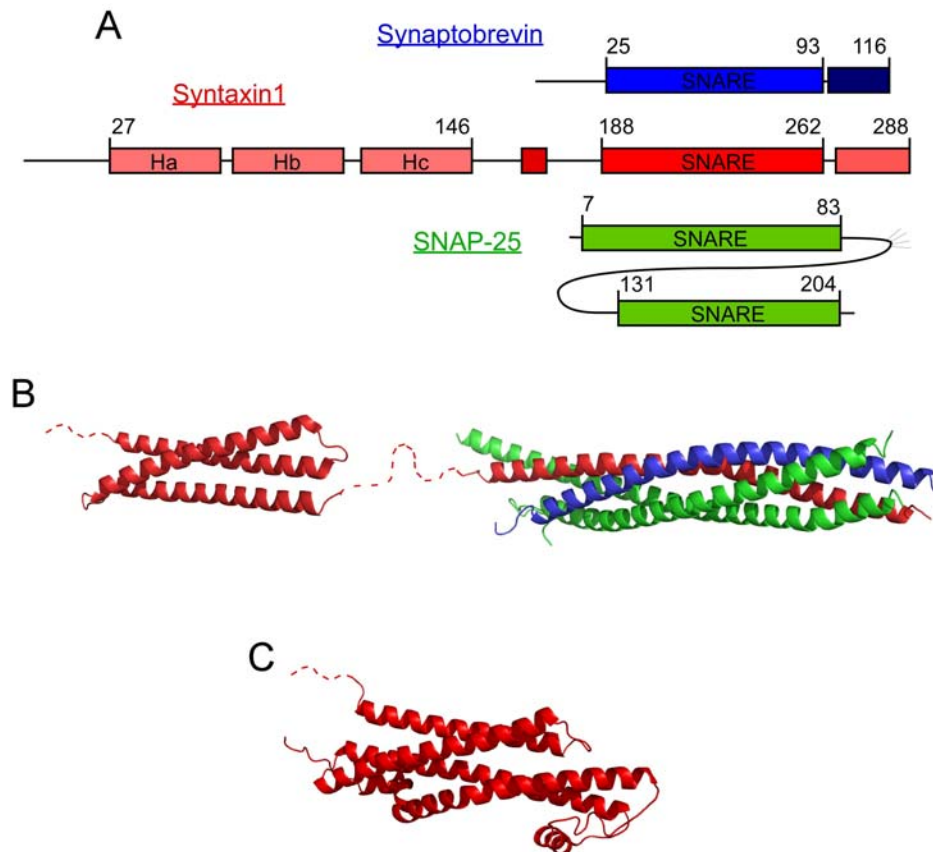


Abb. 1.2: Strukturelle Eigenschaften des neuronalen SNARE-Komplexes. (A) Domänenstruktur der neuronalen SNAREs. Synaptobrevin2 besitzt einen kurzen unstrukturierten Bereich am N-terminus, ein SNARE-Motiv und eine C-terminale Transmembranregion. Syntaxin1a besitzt eine N-terminale Habc-Domäne, eine Linkerregion, ein SNARE-Motiv und eine C-terminale Transmembrandomäne. SNAP-25 besitzt zwei SNARE-Motive und palmitoylierte Cysteine in der Mitte des Proteins. (B) Kristallstrukturen des neuronalen SNARE-Komplexes (PDB = 1SFC) und der Habc-Domäne von Syntaxin1a (PDB = 1EZ3). Der neuronale SNARE-Komplex besteht aus vier Helizes: einer Helix Synaptobrevin2 (blau), einer Helix Syntaxin1a (rot) und zwei Helizes SNAP-25 (grün). Unstrukturierte Abschnitte sind als gestrichelte Linien dargestellt. (C) Syntaxin1a in der so genannten „geschlossenen“ Konformation (PDB = 1DN1). Für die Darstellungen der Kristallstrukturen wurde das Programm PyMol verwendet (DeLano, 2002).

Durch limitierte Proteolyse-Experimente konnte nachgewiesen werden, dass der SNARE-Komplex aus zwei Domänen, der N-terminalen Domäne und dem Kern-Komplex besteht (Fasshauer et al., 1998a). Die anschließend gelöste Kristallstruktur

des Kernkomplexes zeigt, dass sich die SNARE-Proteine Syntaxin1, SNAP-25 und Synaptobrevin2 über die SNARE-Motive zu langgestreckten parallelen Vier-Helix-Bündeln zusammenlagern (Sutton et al., 1998) (Abb.1.2B). Synaptobrevin2 und Syntaxin1a steuern je eine Helix und SNAP-25 zwei Helizes zum Komplex bei. Unabhängig davon konnte auch die Struktur der N-terminalen Domäne von Syntaxin1a gelöst werden (Fernandez et al., 1998). Diese bildet ein Drei-Helix-Bündel (Abb. 1.2B).

Im Inneren des SNARE-Komplexes vermitteln in regelmäßiger Abfolge meist hydrophobe Aminosäurenketten die Kontakte zwischen den einzelnen Helizes. 16 planare Schichten sind senkrecht zur Längsachse des Vier-Helix-Bündels angeordnet und werden als *layer* bezeichnet. In der Mitte des Komplexes befindet sich eine Schicht (der so genannte *0-layer*), die durch drei Glutaminreste und einem Argininrest gebildet wird. Syntaxin1a steuert ein Glutamin bei (Qa), die beiden Helizes von SNAP-25 zwei weitere Glutamine (Qb und Qc) und Synaptobrevin2 ein Arginin (R). Es stellte sich heraus, dass die Aminosäurereste in diesem 0-layer in verschiedenen Organismen hoch konserviert sind (Weimbs et al., 1998). Dies führte zur Klassifizierung der SNAREs in Q (Glutamin)- und R (Arginin)-SNAREs (Fasshauer et al., 1998b). Es wird angenommen, dass jeder funktionale SNARE-Komplex aus vier verschiedenen SNARE-Motiven, den Qa-, Qb-, Qc- und R-Helizes zusammengesetzt ist (siehe auch Abb. 1.1 und Kloepper et al., 2007).

Bis heute sind neben der Kristallstruktur des synaptischen SNARE-Komplexes drei weitere Kristallstrukturen von SNARE-Komplexen gelöst worden. Die Strukturen von zwei endosomalen SNARE-Komplexen und dem an der Sekretion beteiligten SNARE-Komplex der Hefe zeigen ebenfalls parallele Vier-Helix-Bündel (Antonin et al., 2002, Zwilling et al., 2006, Strop et al., 2007). Es scheint, dass SNARE-Komplexe generell aus Helixbündeln mit fast deckungsgleicher Struktur bestehen. Es ist daher anzunehmen, dass allen vesikulären Membranfusionsvorgängen in der eukaryotischen Zelle ein einheitliches Grundprinzip zugrunde liegt.

1.4 Modell der SNARE-Protein vermittelten Membranfusion

Im folgenden Kapitel werden einzelne Schritte der SNARE-Komplexbildung während der Membranfusion genauer erklärt. Die Fragen, wie einzelne SNAREs sich zusammenlagern können und einen SNARE-Komplex ausbilden und wie dieser

SNARE-Komplex wieder in seine Einzelproteine zerfällt, sind für das Verständnis der Membranfusion von entscheidender Bedeutung. De- und Renaturierungsexperimente mittels CD-Spektroskopie zeigen, dass sich der neuronale SNARE-Komplex bei 90 °C entfaltet (siehe auch Kapitel 1.3), sich aber erst bei Absenkung der Temperatur auf etwa 63 °C zurückfaltet. Diese so genannte Hysterese deutet daraufhin, dass die SNARE-Komplexbildung über Zwischenschritte verläuft, die eine geringere thermische Stabilität aufweisen (Fasshauer et al., 2002). Untersuchungen mit den SNARE-Komplex-bildenden Regionen von Syntaxin1a und SNAP-25 zeigen, dass die ternäre SNARE-Komplexbildung tatsächlich über einen Zwischenschritt erfolgen könnte (Fasshauer et al., 2004). Die beiden SNARE-Proteine Syntaxin1a (Qa-SNARE) und SNAP-25 (Qbc-SNARE) interagieren über ihre N-Termini miteinander und bilden einen binären SNARE-Komplex, ein so genanntes Qabc-Intermediat aus (Fasshauer et al., 2004). Der binäre SNARE-Komplex aus Syntaxin1a und SNAP-25 stellt eine hochaffine Bindungsstelle für Synaptobrevin2 dar (Fasshauer et al., 2004, Pobbati et al., 2006). Diese Bindestelle wird auch als Akzeptorkomplex bezeichnet.

Die Membranfusion bei der Neuroexozytose könnte demnach folgendermaßen ablaufen: Zunächst muss Syntaxin1a in der „offenen“ Konformation vorliegen, d.h. die N-terminale Domäne muss vom C-terminalen SNARE-Motiv dissoziieren (Abb. 1.3). Durch die Bindung von SNAP-25 an Syntaxin1a bilden sich auf der Plasmamembran Akzeptorkomplexe. Die synaptischen Vesikel mit Synaptobrevin nähern sich der Plasmamembran an. Bei der Interaktion zwischen Synaptobrevin2 und Akzeptorkomplex beginnt ein reißverschlussartiges Aufwinden der SNARE-Proteine zwischen beiden Membranen (Hanson et al., 1997a, Lin et al., 1997, Sorensen et al., 2006). Dabei bildet sich ein stabiler ternärer Komplex, bei dem die Vesikelmembran über den SNARE-Komplex mit der Plasmamembran verbunden ist. In diesem Zustand befindet sich der SNARE-Komplex in *trans*-Konfiguration, da sich beide Transmembranregionen in verschiedenen Membranen befinden (Abb. 1.3). Man vermutet, dass die Membranen durch diesen Prozeß zueinander hingezogen werden. Schließlich werden die Abstoßungskräfte beider Membranen überwunden und die Öffnung einer Fusionspore ermöglicht (Abb. 1.3). Es ist bislang umstritten, ob die Bildung von SNARE-Komplexen allein zur Öffnung der Fusionspore führt oder ob dieser Prozess von weiteren Proteinen, wie Complexinen und/oder Synaptotagminen gesteuert wird (Reim et al., 2001, Geppert et al., 1994).

Nach vollständigem Zusammenschnüren der SNARE-Proteine kann das Vesikel nun mit der Plasmamembran fusionieren und es kommt zur Freisetzung des Vesikellumes in den extrazellulären Raum (Abb. 1.3).

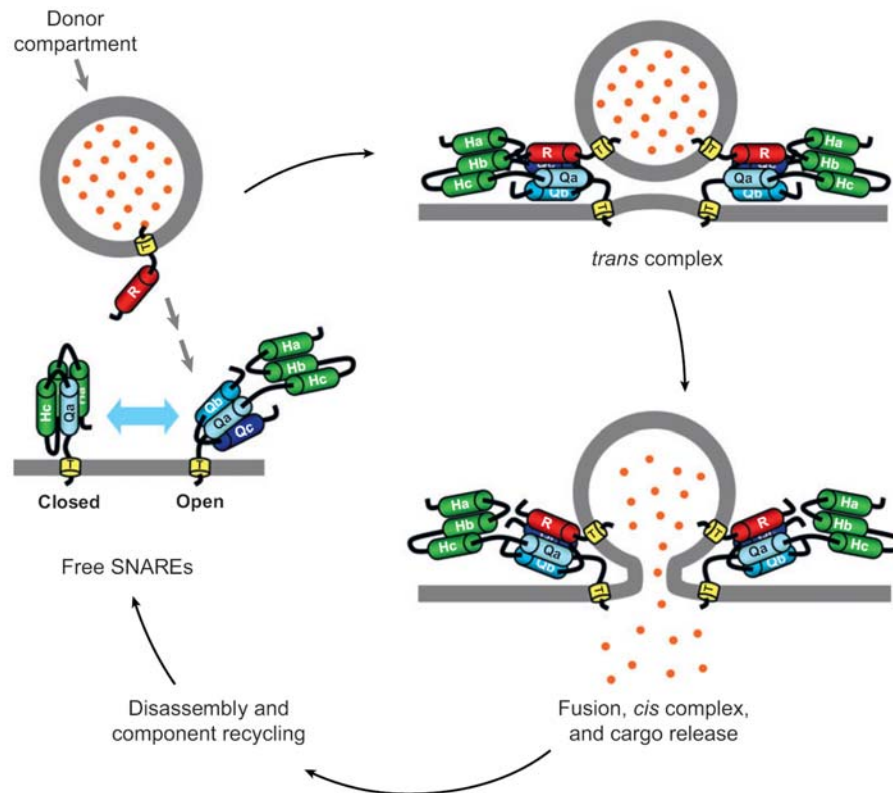


Abb. 1.3: SNARE-Protein vermittelte Membranfusion. Syntaxin1a (Qa) kann in zwei verschiedenen Konformationen vorliegen, der „geschlossenen“ und der „offenen“ Konformation. Syntaxin1a in der „offenen“ Konformation bildet einen binären SNARE-Komplex mit SNAP-25 (Qbc) aus. Diese binäre Interaktion dient als Akzeptorkomplex für das vesikuläre Synaptobrevin2 (R). Der Bindung von Synaptobrevin2 folgt ein reißverschlussartiges Aufwinden der SNARE-Proteine zwischen beiden Membranen. Es bildet sich ein stabiler ternärer SNARE-Komplex. Eine Fusionspore wird gebildet, durch die die Neurotransmitter freigesetzt werden. Nach der Fusion sind ternäre Komplexe in der fusionierten Membran verankert, welche durch NSF und α -SNAP dissoziiert werden können. Die Proteine stehen dann neuen Fusionszyklen zur Verfügung (Abb. modifiziert aus Lipka et al., 2007)

Nach der Fusion sind ternäre Komplexe in *cis*-Konfiguration in der Membran verankert, d.h. die beiden Transmembranregionen befinden sich nun in derselben Membran. *Cis*-SNARE-Komplexe werden in Gegenwart von ATP durch die ATPase NSF und α -SNAP dissoziiert, eine Reaktion, die als „Disassembly-Reaktion“ bezeichnet wird (Söllner et al., 1993b, Hayashi et al., 1995). Die SNARE-Proteine stehen dann neuen Fusionszyklen zur Verfügung.

Während der Exozytose wird der Konformationszyklus der SNARE-Proteine durch mehrere Proteine beeinflusst. Eine besondere Rolle spielen hierbei die Sec1/Munc18 (SM)-Proteine. In den nächsten beiden Kapiteln wird auf die Funktionsweise der SM-Proteine und auf ihr Zusammenspiel mit den SNARE-Proteinen näher eingegangen.

1.5 Die Funktion von Sec1/Munc18 (SM)-Proteinen bei der Membranfusion

SM-Proteine gehören zu einer Familie konservierter zytosolischer Proteine und sind neben den SNARE-Proteinen essentiell für die vesikuläre Membranfusion (Übersicht in Jahn et al., 2003, Weimer et al., 2005). Die SM-Proteinfamilie lässt sich in vier grundsätzliche Typen unterteilen: Sec1/Munc18, Sly1, Vps33 und Vps45. Sec1/Munc18 ist an der Fusion sekretorischer (d.h. auch synaptischer Vesikel) mit der Plasmamembran beteiligt. Sly1 ist essentiell für die Fusion zwischen Endoplasmatischem Retikulum und cis-Golgi-Netzwerk. Vps33 ist an der Fusion von Vesikeln des Trans-Golgi-Netzwerkes mit Lysosomen beteiligt und Vps45 spielt eine wichtige Rolle bei der Fusion von frühen und späten Endosomen.

Das erste SM-Protein, das entdeckt wurde, war Unc18. Unc18 wurde mittels eines genetischen Screen im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* identifiziert. Bei diesem Screen wurden zahlreiche Mutanten isoliert, deren Bewegungsfähigkeit stark eingeschränkt ist (*unc = uncoordinated phenotype*, Brenner, 1974 und Abb.1.4A oben). Würmer, die Mutationen in Unc18 tragen, sind zwar lebensfähig, weisen aber einen paralyzierten Phänotyp auf. Unc18 wird in allen Neuronen von *Caenorhabditis elegans* expremiert. Unc18-Mutanten akkumulieren den Neurotransmitter Acetylcholin und weisen eine Resistenz gegen Aldicarb auf, einem Inhibitor der Acetylcholinesterase (Hosono et al., 1992, Gengyo-Ando et al., 1993). Diese Eigenschaften der Unc18-Mutanten weisen auf eine Störung der Neurotransmitterfreisetzung hin. In der Tat konnten Weimer et al. zeigen, dass es in Unc18-Mutanten zu einer starken Inhibition der Ca^{2+} -abhängigen Neurotransmitterfreisetzung kommt (Abb. 1.4A links) und auch die spontane Freisetzung von Neurotransmittern reduziert ist (Abb. 1.4A rechts) (Weimer et al., 2003). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass in Unc18-Mutanten generell mehr

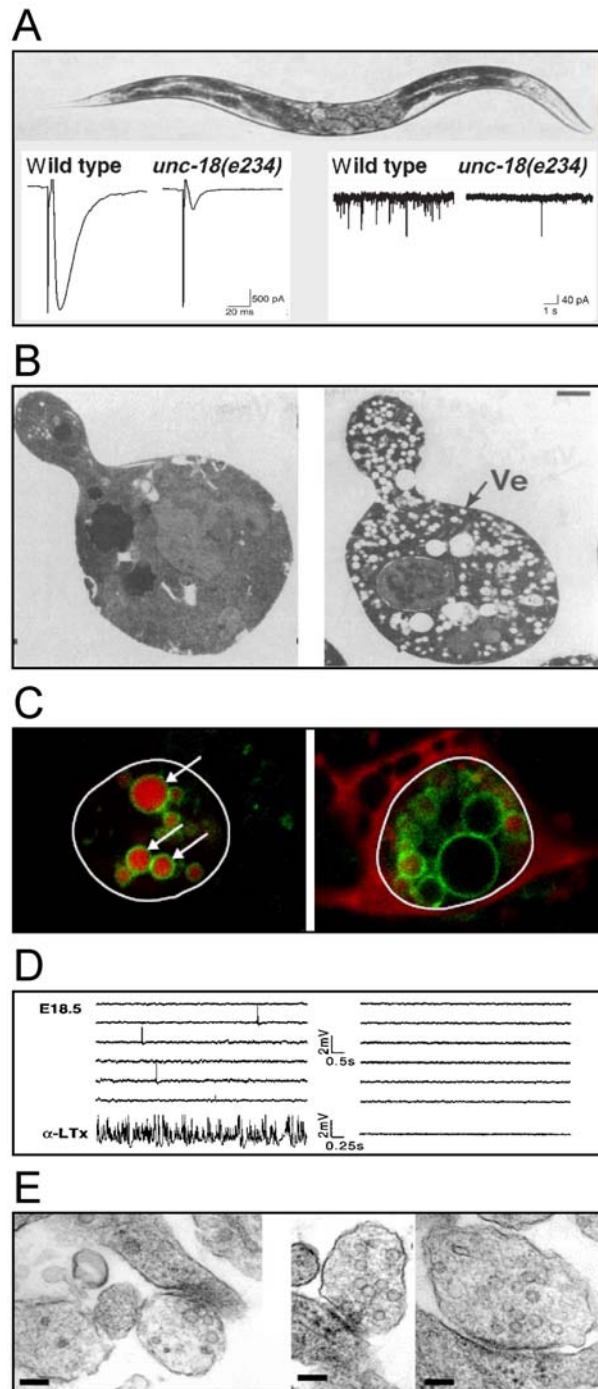


Abb. 1.4: Die Folgen der Ausschaltung von SM-Genen in verschiedenen Organismen. (A) *Unc18*-Mutationen im Wurm *Caenorhabditis elegans* sorgen für einen starken Defekt in der Bewegungsfähigkeit. Auch ist die Freisetzung von Neurotransmittern stark gestört. (B) Die Ausschaltung von *Sec1p* in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* hat eine Akkumulation sekretorischer Vesikel zur Folge (links: Hefe wt, rechts: *Sec1p*-Mutante). (C) Die Ausschaltung von *Vps45* in *Caenorhabditis elegans* blockiert die Endozytose. (D) und (E) Die Ausschaltung von *Munc18a* in der Maus *Mus musculus* hat einen kompletten Block der Neurotransmission zur Folge (D). Synapsen im Neokortex des *Munc18a*-knock outs weisen normale synaptische Strukturen und die gleiche Anzahl gedockter Vesikel im Vergleich zum Wildtyp auf (E). Abbildungen aus Brenner, 1974; Novick et al., 1979; Gengyo-Ando et al., 2007; Verhage et al., 2000.

synaptische Vesikel in der neuromuskulären Endplatte vorhanden sind, allerdings fanden sie, dass das Andocken dieser Vesikel an die Plasmamembran weitgehend unterbunden ist (Weimer et al., 2003). Es wird daher vermutet, dass Unc18 in *Caenorhabditis elegans* das Andocken von synaptischen Vesikeln unterstützt und dadurch die Neurotransmitterfreisetzung fördert (Weimer und Richmond, 2005).

Das zweite SM-Protein, das entdeckt wurde, war Sec1p. Es wurde in einem genetischen Screen entdeckt, durch den 87 Sekretionsmutanten in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* isoliert werden konnten (so genannte *sec*-Mutanten, Novick et al., 1979, Novick et al., 1980). In Sec1-Mutanten ist eine Akkumulation von sekretorischen Proteinen (z.B. Invertase) und sekretorischen Vesikeln zu beobachten (Abb. 1.4B, Ve = sekretorische Vesikel) (Novick et al., 1979). Das deutet daraufhin, dass Sec1-Mutanten der Hefe Defekte bei der Fusion sekretorischer Vesikel mit der Plasmamembran aufweisen. Auch sind das Zellwachstum und die Zellteilung der Hefe gestört. Übereinstimmend damit, findet man Sec1p an einem bekannten Ort der Sekretion in der Hefe: bei der Entstehung einer neuen Tochterzelle (Carr et al., 1999).

Das in der Taufliege *Drosophila melanogaster* für die Exozytose wichtige SM-Protein wird Rop genannt (der Name steht für *Ras opposite*, basierend auf der Position des Nachbar-Gens Ras). Rop wird im Nervensystem und in vielen anderen sekretorischen Zellen der Fliege expremiert. Die Ausschaltung des Rop-Gens ist für die Fliege letal, weswegen Rop-Nullmutanten nicht elektrophysiologisch charakterisiert werden konnten. Elektrophysiologische Studien an temperatursensitiven Mutanten von Rop zeigen bei restriktiver Temperatur eine deutlich reduzierte synaptische Antwort (Harrison et al., 1994). Interessanterweise wurde auch bei einer Überexpression von Rop an der Neuromuskulären Endplatte dosisabhängig weniger Fusionsereignisse beobachtet. (Schulze et al., 1994). Demnach scheint sich sowohl eine Ausschaltung als auch eine Überexpression von Rop negativ auf die Neurotransmission auszuwirken. Es scheint, dass Rop in bestimmter Konzentration vorliegen muss, um die Fusionen synaptischer Vesikel mit der Plasmamembran zu gewährleisten.

Munc18a (*mammalian* Unc18) bzw. n-Sec1 (*neuronal* Sec1), das Säugetierhomolog von Unc18, Sec1p und Rop, wurde als Bindungspartner von Syntaxin1 identifiziert (Hata et al., 1993, Pevsner et al., 1994a). Die Funktion von Munc18a wurde in der Hausmaus *Mus musculus* mittels *knock out* Studien untersucht. Mäuse, denen das

Munc18a-Gen fehlt, sterben bei der Geburt. Bei Untersuchungen an embryonalen neuromuskulären Synapsen stellte sich heraus, dass die Ausschaltung des Munc18a-Gens in Mäusen einen kompletten Block der Ca^{2+} -abhängigen Neurotransmitterfreisetzung und der spontanen Freisetzung von Neurotransmittern zur Folge hat (Verhage et al., 2000 und Abb. 1.4D rechts). Auch eine durch alpha-Latrotoxin (α -LTx) induzierte Vesikelfusion ist nicht zu detektieren (Abb. 1.4D, links und rechts). Alpha-Latrotoxin ist ein Gift aus Spinnen der Gattung *Latrodectus* und bewirkt eine drastische Freisetzung von Neurotransmittern, indem es zusätzliche Kalziumkanäle in der präsynaptischen Nervenzelle öffnet. Durch die Öffnung dieser Kanäle kommt es zur vermehrten Neurotransmitterausschüttung. Weiterhin gibt es in Synapsen im Neokortex des Munc18a *knock outs* der Maus keinen Defekt beim Andocken der synaptischen Vesikel (Verhage et al., 2000). Auch ist die prä- und postsynaptische Struktur von Neuronen nicht verändert (Verhage et al., 2000). Munc18a scheint demnach nicht die Morphologie und Größe von Synapsen zu beeinflussen, sondern die Informationsweiterleitung zwischen Synapsen. Überraschenderweise wurde in chromaffinen Zellen desselben Munc18a *knock outs* kein kompletter Block der Sekretion gefunden. Die chromaffinen Zellen weisen vielmehr eine 10fache Reduktion bei der Ca^{2+} -abhängigen Neurotransmitterfreisetzung auf (Voets et al., 2001). Die spontane Freisetzung von Neurotransmittern ist im Vergleich zum Wildtyp gar nicht reduziert (Voets et al., 2001). Außerdem ist die Anzahl gedockter Vesikel um den Faktor 10 reduziert. In gewisser Hinsicht ähneln sich die Phänotypen der chromaffinen Zellen des Munc18a *knock outs* mit denen der neuromuskulären Endplatten des Unc18 *knock outs* in *Caenorhabditis elegans*. Interessanterweise zeigen neuere Studien, dass eine Überexpression von Munc18a in heterozygoten Munc18a *knock out* Mäusen die Anzahl der gedockten synaptischen Vesikel erhöht und auch die Effizienz der synaptischen Übertragung erhöht (Toonen et al., 2006). Munc18a könnte, wie auch Unc18 in *Caenorhabditis elegans*, das Andocken von synaptischen Vesikeln unterstützen und dadurch die Neurotransmitterfreisetzung fördern.

Neben den sekretorischen SM-Proteinen wurde auch die Funktion von SM-Proteinen, die an intrazellulären Transportschritten beteiligt sind, untersucht. So kommt es in Vps45p- und Vps33p-Mutanten in der Hefe zu einer Akkumulation von Vesikeln, welche eigentlich mit der Vakuolenmembran fusionieren (*vps = vacuole-protein-sorting defect*) (Bankaitis et al., 1986; Piper et al., 1994; Peterson et al.,

2001). Mutationen im SM-Protein Sly1p der Hefe führen zu einem Defekt beim vesikulären Transport vom Endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat (Cao et al., 1998). In *Caenorhabditis elegans* wurde erst kürzlich das SM-Protein Vps45 näher untersucht. Es wurde gezeigt, dass Würmer, denen Vps45 fehlt, Defekte bei der Endozytose aufweisen. Sehr wahrscheinlich ist die homotypische Fusion von Endosomen gestört (Gengyo-Ando et al., 2007). Gengyo-Ando et al. konnten zeigen, dass bestimmte Zelltypen in Würmern (Coelomozyten) injiziertes markiertes BSA (TexasRed-BSA) aufnehmen können. In Vps45-Mutanten ist dieser Vorgang allerdings deutlich verlangsamt (Abb. 1.4C, links: Wildtyp, rechts: Mutante).

Die Phänotypen der verschiedenen SM-Mutanten in diversen Organismen belegen eindeutig, dass SM-Proteine für den Fusionsschritt beim vesikulären Transport absolut notwendig sind. Wie bereits erwähnt, sind SM-Proteine zytosolische Proteine. Wie aber ist dann die Funktion von SM-Proteinen beim vesikulären Transport bzw. bei der Neurotransmission zu erklären? Die Bindung von SM-Proteinen an membranständige SNARE-Proteine könnte diese Funktion vermitteln.

1.6 SM-Proteine interagieren auf verschiedene Weise mit SNARE-Proteinen

Dass SM-Proteine direkt mit SNARE-Proteinen interagieren können, wurde erstmalig in den Arbeitsgruppen von Thomas Südhof und von Richard Scheller gezeigt. In den Bindungsstudien war mit einem GST-Affinitätstag versehenes Syntaxin1a in der Lage, Munc18a aus einem Ratten-Gehirnextrakt zu isolieren (Hata et al., 1993) bzw. rekombinant hergestelltes Munc18a zu binden (Pevsner et al., 1994a). In einer nachfolgenden Studie stellte sich heraus, dass Munc18a Syntaxin1a mit einer sehr hohen Affinität von ca. 5 nM bindet (Pevsner et al., 1994b). Interessanterweise fanden mehrere Forschergruppen in der Folgezeit heraus, dass an Syntaxin1a gebundenes Munc18a nicht in der Lage ist, die SNARE-Partner SNAP-25 und Synaptobrevin2 zu binden (Pevsner et al., 1994b; Yang et al., 2000). Munc18a kann jedoch nicht mehr an Syntaxin1a binden, wenn Syntaxin1a mit SNAP-25 interagiert (Yang et al., 2000). Mit Hilfe der NMR-Spektroskopie wurde gezeigt, dass Syntaxin1a als einzelnes Molekül eher in einer „geschlossenen“ Konformation vorliegt (Dulubova et al., 1999). Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie-Messungen zeigen allerdings, dass nur etwa 30 % aller

Syntaxin1a-Moleküle geschlossen sind und das konformationelle Fluktuationen zwischen „offenen“ und „geschlossenen“ Zuständen sehr schnell erfolgen (Margittai et al., 2003a). In Syntaxin1a wurden zwei Punktmutationen in den Linkerbereich eingeführt, welcher die Habc- und das SNARE-Motiv verbindet (Dulubova et al., 1999). Es wurde gezeigt, dass Munc18a nicht mehr an GST-Syntaxin1a binden kann (Dulubova et al., 1999). Die Autoren folgerten, dass Munc18a nur an die „geschlossene“ Syntaxin1a-Konformation bindet.

Die Kristallstruktur des Munc18a/Syntaxin1a-Komplexes bestätigt, dass Munc18a an die „geschlossene“ Konformation von Syntaxin1a bindet (Misura et al., 2000). Die Struktur von Munc18a zeigt keine Ähnlichkeit mit bereits bekannten Strukturen (Abb. 1.5A). Munc18a besteht aus drei Domänen, diese bilden eine hufeisenähnliche Form aus. Im Inneren dieses Hufeisens liegt Syntaxin1a in der „geschlossenen“ Konformation als Bündel aus vier Helizes vor. Das C-terminale SNARE-Motiv interagiert dabei mit der N-terminalen Habc-Domäne (Abb. 1.5A). Ungefähr die gleiche Anzahl an Aminosäuren von der Habc-Domäne und dem SNARE-Motiv tragen zur Munc18a/Syntaxin1a-Interaktion bei. Die Habc-Domäne bleibt im Wesentlichen unverändert, ob an Munc18a gebunden oder nicht (Fernandez et al., 1998). Im Unterschied dazu liegt das SNARE-Motiv als einzelne, langgestreckte Helix im SNARE-Komplex vor, während es in der Munc18a/Syntaxin1a-Struktur aus drei unterbrochenen Helizes besteht (Misura et al., 2000). Aufgrund der hohen Affinität und der großen Interaktionsfläche des Munc18a/Syntaxin1a-Komplexes wird postuliert, dass ein zusätzlicher Faktor die Konformation von Munc18a verändert müsste, damit sich Syntaxin1a aus der festen Umklammerung von Munc18a lösen kann. (Misura et al., 2000). Interessanterweise weist die Domäne 3 von Munc18a eine Vielzahl von Kontakten mit Syntaxin1a auf, jedoch interagiert sie nicht mit dem Rest des Munc18a-Moleküls. Falls die Domäne 3 von Munc18a sich bewegte, würde Syntaxin1a freigegeben (Misura et al., 2000). Bracher et al. konnten die Kristallstruktur des Tintenfisch-Homologen von Munc18a (sSec1 = *squid* Sec1) ohne Syntaxin1a lösen (Abb. 1.5D) (Bracher et al., 2001). Regionen der Domäne 3, welche in der Struktur des Komplexes mit Syntaxin1a interagieren (Abb. 1.5A), sind in der Kristallstruktur des Tintenfisch-Homologen von Munc18a (sSec1) teilweise unstrukturiert (Abb. 1.5D).

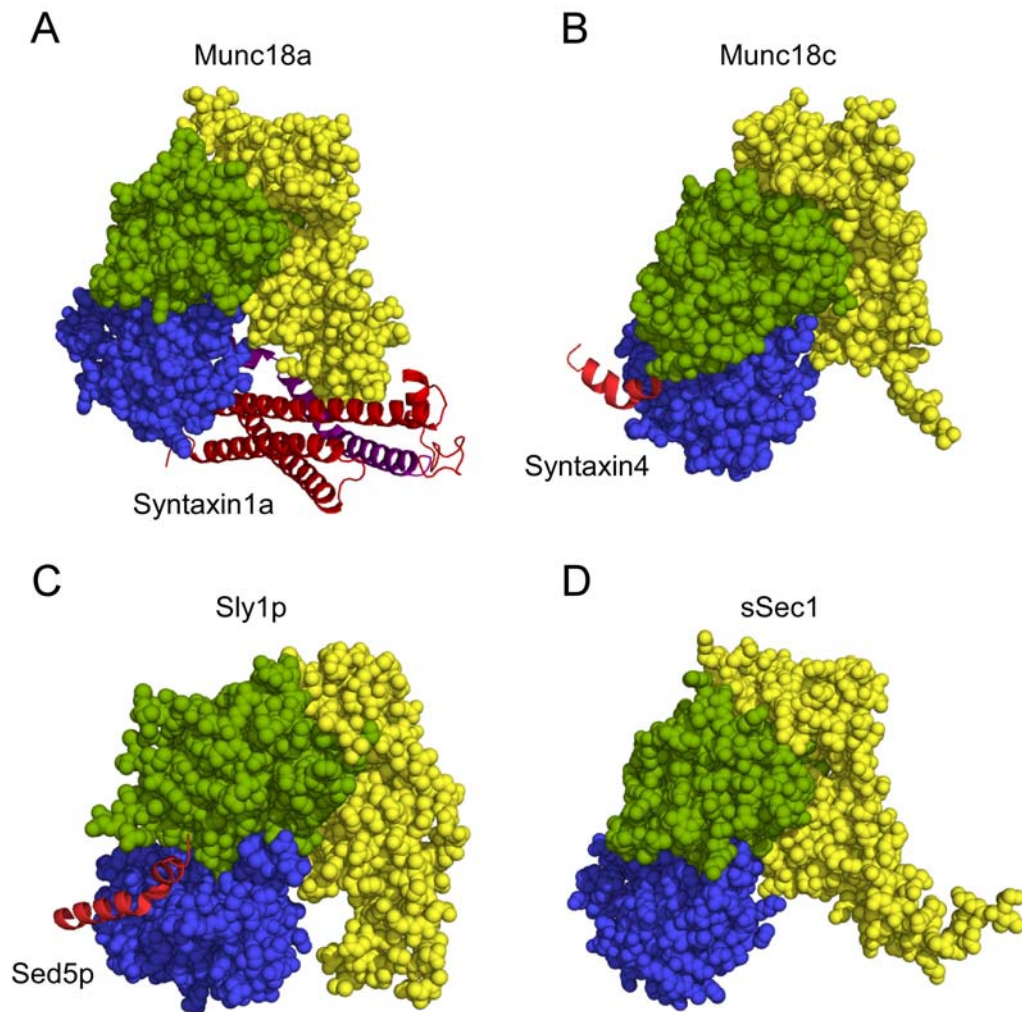


Abb. 1.5: Verschiedene Kristallstrukturen von SM-Proteinen. (A) Die Kristallstruktur des Munc18a/Syntaxin1-Komplexes (Misura et al., 2000; PDB = 1DN1). Munc18a bindet Syntaxin1a in der „geschlossenen“ Konformation. (B) Die Kristallstruktur von Munc18c und Syntaxin4 (Hu et al., 2007; PDB = 2PJX). Das N-terminale Peptid von Syntaxin4 bindet an die äußere Oberfläche der Domäne 1 von Munc18c. (C) Die Kristallstruktur von Sly1p und Sed5p (Bracher et al., 2002; PDB = 1MQS). Das N-terminale Peptid von Sed5p bindet an die Domäne 1 von Sly1p. (D) Die Kristallstruktur des Tintenfisch-Homologen von Munc18a (sSec1) ohne Syntaxin1 (Bracher et al., 2000; PDB = 1EPU). In der Domäne 3 von sSec1 sind Konformationsänderungen im Vergleich zum Munc18a/Syntaxin1a-Komplex zu beobachten. Die Domänen 1 (blau), 2 (grün) und 3 (gelb) der SM-Proteine bilden jeweils eine hufeisenähnliche Form. Für die Darstellungen der Kristallstrukturen wurde das Programm PyMol verwendet (DeLano, 2002).

Nach der Entdeckung, dass Munc18a direkt Syntaxin1a binden kann, wurden weitere SM-Protein/Syntaxin-Paare untersucht. So konnte gezeigt werden, dass das SM-Protein Sly1 Syntaxin5 (in der Hefe wird es als Sed5p bezeichnet) mit hoher Affinität (0.5 nM) bindet (Grabowski et al., 1997). Interessanterweise scheint Sly1 die SNARE-Komplexbildung nicht zu blockieren (Peng et al., 2002). GST- und

„*yeast two-hybrid*“-Bindungsstudien zeigen, dass Sly1 an ein N-terminales Peptid von Syntaxin5 bindet (Kosodo et al., 1998, Yamaguchi et al., 2002). Aufgrund dieser Daten wurde postuliert, dass die Habc-Domäne und das SNARE-Motiv von Syntaxin5 nicht an der Bindung zu Sly1 teilnehmen. Ein sehr ähnlicher Bindungsmechanismus wurde für die Interaktion von Vps45 und Syntaxin16 (wird als Tlg2p in der Hefe bezeichnet) beschrieben (Dulubova et al., 2002). Auch für diese Interaktion reicht das N-terminale Peptid. Wird das N-terminale Peptid von Syntaxin5 bzw. Syntaxin16 entfernt, ist keine Bindung mehr an das jeweilige SM-Protein zu beobachten (Kosodo et al., 1998, Yamaguchi et al., 2002, Dulubova et al., 2002).

Die Kristallstruktur von Sly1p und Sed5p hat schließlich bestätigt, dass Sly1p den N-Terminus von Sed5p bindet (Bracher et al., 2002). Die Struktur zeigt, dass Sly1p eine sehr ähnliche Domänenstruktur wie Munc18a und sSec1 besitzt (Abb. 1.5C). Allerdings bindet das N-terminale Peptid von Sed5p an die äußere Oberfläche der Domäne 1 von Sly1p, also an die gegenüberliegende Seite der Syntaxin1a-Bindungsstelle im Munc18a/Syntaxin1a-Komplex. Für die Kristallisation des Sly1p/Sed5p-Komplexes wurde nur das N-terminale Peptid benutzt, nicht die gesamte zytosolische Domäne von Sed5p (Bracher et al., 2002). Syntaxin5 soll bei der Bindung an Sly1 in der „offenen“ Konformation vorliegen. Allerdings fehlen dafür direkte Beweise.

Eine Reihe von entscheidenden Arbeiten an SM-Proteinen wurden erst während der hier vorliegenden Arbeit publiziert und sind somit in meine Überlegungen eingeflossen. In Vertebraten gibt es drei Munc18-Varianten (i.e. Munc18a, -b, -c) und eine Reihe von sekretorischen Syntaxinen. Überraschenderweise wurde vor kurzem gezeigt, dass Munc18c Syntaxin4 auch über das N-terminale Peptid bindet (Latham et al., 2006). Munc18c reguliert den Vesikeltransport zur Plasmamembran in einer Vielzahl von Zelltypen und hat eine Schlüsselrolle bei dem insulinabhängigen Transport des GLUT4 Glucose Transporters zur Zelloberfläche von Muskelzellen und Zellen des Fettgewebes inne (Thurmond et al., 1998). Die kürzlich veröffentlichte Kristallstruktur des Munc18c/Syntaxin4-Komplexes zeigt, dass der Bindungsmechanismus sehr dem des Sly1p/Sed5p-Komplexes ähnelt (Hu et al., 2007). In der Munc18c/Syntaxin4-Struktur bindet das Syntaxin4-Peptid an die äußere Oberfläche der Domäne 1 von Munc18c (Abb. 1.5B). Auch hier wurde nur

das N-terminale Peptid für die Kristallisation verwendet (Hu et al., 2007). Es ist unklar, ob der Rest des Syntaxin4-Moleküls an der Bindung teilnimmt.

Erst kürzlich veröffentlichte Arbeiten zeigen, dass SM-Proteine nicht nur mit ihren entsprechenden Syntaxinen interagieren, sondern auch mit binären SNARE-Komplexen (SNAP-25/Syntaxin-Homologe) oder ternären SNARE-Komplexen (SNAP-25/Syntaxin/Synaptobrevin-Homologe). So konnte mittels GST-Bindungsstudien bzw. Immunpräzipitation gezeigt werden, dass Sec1p den binären SNARE-Komplex (Scott et al., 2004) und den ternären SNARE-Komplex bindet (Carr et al., 1999, Scott et al., 2004, Togneri et al., 2006). Interessant dabei ist, dass Sec1p die SNARE-Komplexbildung *in vitro* sogar zu beschleunigen vermag (Scott et al., 2004). In dieser Studie wurde der Effekt von Sec1p auf die Fusion von Liposomen untersucht. Wurden Snc2p sowie ein vorformierter Sso1p/Sec9p-Komplex in zwei getrennte Liposomenpopulationen rekonstituiert, wurde die Fusion der Liposomen in Gegenwart von Sec1p beschleunigt (Scott et al., 2004). Auch der Einfluss von Munc18a auf die Fusion artifizierlicher Liposomen wurde untersucht (Shen et al., 2007). Synaptobrevin2 und ein gereinigter Syntaxin1/SNAP-25-Komplex wurden in zwei getrennten Liposomenpopulationen rekonstituiert. Munc18a konnte ebenfalls die Fusion beschleunigen (Shen et al., 2007). Um den positiven Effekt von Munc18a auf die Liposomenfusion besser zu verstehen, wurden Mutationen in Syntaxin1a und Synaptobrevin2 eingeführt. Dabei stellte sich heraus, dass das N-terminale Peptid von Syntaxin1a, sowie N- und C-terminale Bereiche von Synaptobrevin2, entscheidend für den positiven Effekt von Munc18a sind. Diese beobachteten Effekte sind in zweierlei Hinsicht interessant: Munc18a ist scheinbar in der Lage das N-terminale Peptid von Syntaxin1a zu binden (Rickman et al., 2007), ähnlich wie dies bereits bei einer Reihe von SM-Proteinen gezeigt wurde. Weiterhin scheint Munc18a den ternären SNARE-Komplex binden zu können (Shen et al., 2007, Dulubova et al., 2007) und so die Liposomenfusion zu beschleunigen.

Es gibt demnach mehrere Arten der SM-Protein-Bindung an SNARE-Moleküle:

1. SM-Proteine binden Syntaxine in der „geschlossenen“ Konformation (Munc18a bindet Syntaxin1a)
2. SM-Proteine binden eine kurze Sequenz am N-Terminus von Syntaxin (Sly1 bindet Syntaxin5, Vps45 bindet Syntaxin16, Munc18c bindet Syntaxin4)

3. SM-Proteine binden Syntaxin im SNARE-Komplex (Sec1p bindet den binären SNARE-Komplex Sso1p/Sec9p und ternären SNARE-Komplex Sso1p/Sec9p/Snc2p der Hefe, Munc18a ist in der Lage, den neuronalen ternären SNARE-Komplex zu binden)
4. Keine direkte Bindung der SM-Proteine an entsprechende Syntaxine, die SM-Proteine interagieren wahrscheinlich über Komplexe mit anderen löslichen Proteinen (z. B. wurde für Vps33 noch keine direkte Bindung an Syntaxine beschrieben)

Trotz mehrerer kristallographischer Studien (Misura et al., 2000, Bracher et al., 2001, Bracher et al. 2002 und Hu et al., 2007) und vieler *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen scheint die genaue Funktion der SM-Protein bei der Membranfusion noch immer wenig verstanden.

1.7 Ziele dieser Arbeit

Es wurde gezeigt, dass Munc18a *in vitro* die Interaktion von Syntaxin1a mit SNAP-25 und Synaptobrevin2 verhindert (Pevsner et al., 1994b, Yang et al., 2000). Da diese Interaktion als die treibende Kraft für die Fusion von synaptischen Vesikeln mit der Plasmamembran angesehen wird, könnte man annehmen, dass Munc18a die Neurotransmitterausschüttung *in vivo* blockieren müsste. Überraschenderweise wurde jedoch das Gegenteil beobachtet. Die Deletion von Munc18 in verschiedenen Organismen hat eine nahezu vollständige Blockierung der Neurotransmitterausschüttung zur Folge (Harrison et al., 1994, Verhage et al., 2000, Weimer et al., 2003). Dieser scheinbare Widerspruch war meine Motivation, das Zusammenspiel von SM- und SNARE-Proteinen genauer zu untersuchen.

Zu Beginn meiner Arbeit beruhten die meisten bisher durchgeführten Studien zu SM-Proteinen auf semi-quantitativen Protein-Protein-Bindungsstudien. Um die Grundlagen der Interaktion besser verstehen zu können, sollte die Interaktion von Munc18a und Syntaxin1a mit biophysikalischen Methoden nochmals genauer untersucht werden. In bisherigen Untersuchungen war gezeigt worden, dass Munc18a die „geschlossene“ Konformation von Syntaxin1a bindet. Andere SM-Proteine hingegen scheinen nur mit einem kurzen N-terminalen Abschnitt des jeweiligen Syntaxins zu interagieren. Daher sollte vergleichend zur

Munc18a/Syntaxin1a-Interaktion die Interaktion eines zweiten SM-Protein/Syntaxin-Paares, Vps45/Syntaxin16, charakterisiert werden. Des Weiteren sollte der Einfluss von Munc18a auf die neuronale SNARE-Komplexbildung *in vitro* im Detail untersucht werden. Die Rolle von Munc18a während der SNARE-Komplexbildung wird seit Jahren kontrovers diskutiert. Insbesondere eine Frage ist von zentraler Bedeutung für das Verständnis der Neuroexozytose: Wie ist Syntaxin1a in der Lage, sich aus der festen Umklammerung von Munc18a zu befreien und so an der SNARE-Komplexbildung teilzunehmen? Um den Übergang von Munc18a-gebundenem Syntaxin1a in den SNARE-Komplex zu verfolgen, sollten die im Labor zur Verfügung stehenden biochemischen und biophysikalischen Methoden zur Beschreibung der SNARE-Komplexbildung eingesetzt werden.

Kürzlich veröffentlichte Daten scheinen zu zeigen, dass Munc18a auch in der Lage ist, den neuronalen SNARE-Komplex zu binden. Generell, so wurde postuliert, sollen daher alle SM-Proteine über einen konservierten Mechanismus SNARE-Komplexe binden, während die Bindung von Munc18a an die „geschlossene“ Konformation von Syntaxin1a nur einen Spezialfall der Neuroexozytose darstellt. Deswegen sollten zusätzlich die Munc18/Syntaxin1-Interaktion und der Einfluss von Munc18 auf die SNARE-Komplexbildung in einem den Tieren nahe verwandten Einzeller, dem Choanoflagellat *Monosiga brevicollis* untersucht werden. Diese vergleichenden Untersuchungen sollten zeigen, ob die Bindung von Munc18 an die „geschlossene“ Konformation von Syntaxin ein Spezialfall der Neuroexozytose oder ein konservierter Bindungsmechanismus ist.

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. Fluoreszenzfarbstoffe zur Markierung von Cysteinen wurden von Molecular Probes/Invitrogen bezogen.

2.1.2 Enzyme, Kits, Vektoren, Bakterienstämme

Restriktionsendonukleasen 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. Zur Aufreinigung von Plasmiden oder PCR-Produkten wurden Kits von Qiagen und Machery und Nagel verwendet. Alle Klonierungen wurden mit dem Vektor pET28a (Novagen) durchgeführt. Für Klonierungen wurde der *Escherichia coli*-Stamm XL1-Blue von Stratagene verwendet, für Proteinexpressionen der *Escherichia coli*-Stamm BL21 (DE3) (Novagen).

2.1.3 DNA-Konstrukte

Alle Klonierungsarbeiten wurden nach molekularbiologischen Standardprotokollen durchgeführt (Sambrook et al., 2001). Die in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte sind in Tab.1 zusammengefasst. Die Sequenz aller Konstrukte wurde durch DNA-Sequenzierung überprüft. Die Sequenzen stammen aus *Rattus norvegicus* (*RaNo*) oder *Monosiga brevicollis* (*MoBr*). Alle Syntaxin1a- und Synaptobrevin-Konstrukte aus *Rattus norvegicus* wurden über die Restriktionsschnittstellen NdeI und XhoI kloniert, SNAP-25-Konstrukte aus *Rattus norvegicus* wurden über die Restriktionsschnittstellen NheI und XhoI kloniert. Munc18a-Konstrukte aus *Rattus norvegicus* wurden über die Restriktionsschnittstellen NdeI und HindIII kloniert. Vps45- und Syntaxin16-Konstrukte aus *Rattus norvegicus* wurden über die Restriktionsschnittstellen NdeI und XhoI kloniert. Syntaxin1-, SNAP-25- und Munc18-Konstrukte aus *Monosiga brevicollis* wurden von der Firma GENSCRIPT

synthetisiert und über die Restriktionsschnittstellen NdeI und XhoI in den Vektor pET28a kloniert. Synaptobrevin-Konstrukte aus *Monosiga brevicollis* wurde über die Restriktionsschnittstellen NdeI und HindIII kloniert.

Tab. 1: Verwendete DNA-Konstrukte

Gen	Aminosäureabschnitt	Klonierung	Vektor	beschrieben in
<i>Rattus norvegicus (RaNo)</i>				
Syntaxin1a	1-262	NdeI/XhoI	pET28a	Margittai et al., 2003
Syntaxin1a	1-265	NdeI/EcoRI	pHO2c	Fasshauer et al., 1997b
Syntaxin1a	1-262, R4A	NdeI/XhoI	pET28a	Burkhardt et al., 2008
Syntaxin1a	1-262, T5A	NdeI/XhoI	pET28a	Burkhardt et al., 2008
Syntaxin1a	1-262, L8A	NdeI/XhoI	pET28a	Burkhardt et al., 2008
Syntaxin1a	1-262, T10A	NdeI/XhoI	pET28a	Burkhardt et al., 2008
Syntaxin1a	1-262, S14A	NdeI/XhoI	pET28a	Burkhardt et al., 2008
Syntaxin1a	1-262, E165A, L166A	NdeI/XhoI	pET28a	Burkhardt et al., 2008
Syntaxin1a	1-262, I233A	NdeI/XhoI	pET28a	Burkhardt et al., 2008
Syntaxin1a	1-262, T197C	NdeI/XhoI	pET28a	Margittai et al., 2003
Syntaxin1a	1-262, E165A, L166A, T197C	NdeI/XhoI	pET28a	Burkhardt et al., 2008
Syntaxin1a	1-240	NdeI/XhoI	pET28a	Burkhardt et al., 2008
Syntaxin1a	1-179	NdeI/XhoI	pET28a	Burkhardt et al., 2008
Syntaxin1a	25-262	NdeI/XhoI	pET28a	Burkhardt et al., 2008
Syntaxin1a	25-262, T197C	NdeI/XhoI	pET28a	Burkhardt et al., 2008
Syntaxin1a	180-262	NdeI/XhoI	pET28a	Fasshauer et al., 1998
SNAP-25	1-206, C84,85,90,92S	NheI/XhoI	pET28a	Fasshauer et al., 1999
SNAP-25	1-206, C84,85,90,92S, S130C	NheI/XhoI	pET28a	Margittai et al., 2003
Synaptobrevin2	1-96	NdeI/XhoI	pET28a	Fasshauer et al., 1997
Synaptobrevin2	1-96, T79C	NdeI/XhoI	pET28a	Margittai et al., 2001
Munc18a	1-594	NdeI/HindIII	pET28a	Schütz et al., 2005
Munc18a	1-594, F115E	NdeI/HindIII	pET28a	diese Arbeit
Munc18a	1-594, L130K	NdeI/HindIII	pET28a	diese Arbeit
Syntaxin16	1-302	NdeI/XhoI	pET28a	Burkhardt et al., 2008
Syntaxin16	1-302, F10A	NdeI/XhoI	pET28a	Burkhardt et al., 2008
Syntaxin16	1-279	NdeI/XhoI	pET28a	Burkhardt et al., 2008
Syntaxin16	1-265	NdeI/XhoI	pET28a	Burkhardt et al., 2008
Syntaxin16	1-283	NdeI/XhoI	pET28a	Burkhardt et al., 2008
Syntaxin16	28-302	NdeI/XhoI	pET28a	Burkhardt et al., 2008
Vps45	1-570	NdeI/XhoI	pET28a	Burkhardt et al., 2008
<i>Monosiga brevicollis (MoBr)</i>				
Syntaxin1	1-279	NdeI/XhoI	pET28a	diese Arbeit
Syntaxin1	20-279	NdeI/XhoI	pET28a	diese Arbeit
SNAP-25	1-210	NdeI/XhoI	pET28a	diese Arbeit
Synaptobrevin	1-75	NdeI/HindIII	pET28a	diese Arbeit
Synaptobrevin	1-75, T54C	NdeI/HindIII	pET28a	diese Arbeit
Munc18	1-649	NdeI/XhoI	pET28a	diese Arbeit

2.1.4 Peptide

Die in dieser Arbeit verwendeten Peptide wurden von der Firma BIOSYNTAN GmbH (Berlin) bezogen. Der Reinheitsgrad der Peptide betrug 95% nach HPLC und Massenspektrometrie. Folgende Peptide wurden verwendet:

Syntaxin1a AS 1-20: MKDRTQELRT AKDSDDDDDDV

Syntaxin16 AS 1-27: MATRRLTDAF LLLRNNSIQN RQLLAEQ

Syntaxin16 AS 1-27 (F10A): MATRRLTDAA LLLRNNSIQN RQLLAEQ

2.2 Methoden

2.2.1 Proteinexpression und -reinigung

Für die Expression rekombinanter Hexa-Histidin-Fusionsproteine wurden zunächst die Plasmide in kompetente *Escherichia coli*-Zellen des Stammes BL21 (DE3) transformiert. Etwa 70 µl tiefgefrorene Zellen wurden langsam auf Eis aufgetaut. Anschließend wurde 5 ng DNA hinzugegeben und der Ansatz gemischt. Es folgte eine zehnmünütige Inkubation auf Eis. Die Zellen wurden 90 s bei 42 °C inkubiert. Nun wurde 1 ml vorgewärmtes LB-Medium zu den transformierten Zellen gegeben und eine Stunde bei 37 °C und 600 rpm inkubiert. Danach wurden 50 bzw. 200 µl Bakteriensuspension auf Kanamycin (30 µg/ml) oder Ampicillin (100 µg/ml) enthaltene LB-Platten ausgestrichen. Die Inkubation der Platten erfolgte über Nacht bei 37 °C.

Um das Hexa-Histidin-Fusionsprotein zu exprimieren, wurde eine einzelne Bakterienkolonie in 100 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum über Nacht bei 37 °C und 200 rpm im Warmluftschüttler inokuliert. Diese Startkultur wurde 1:100 in 800 ml TB-Medium (incl. 10 % v/v TB-Salz) verdünnt und wiederum im Warmluftschüttler bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Sobald die Bakteriensuspension eine optische Dichte von etwa 1,0 bei 600 nm (OD600) erreicht hatte, wurde mit 0,25 mM IPTG die Expression des Fusionsproteins induziert. Nach drei Stunden Inkubation wurden die Zellen in einem Beckmann TY JS 4.2 Rotor sedimentiert (15 min bei 2500 rpm) und in etwa 10 ml Waschpuffer (20 mM Tris pH 7,4, 500 mM NaCl, 15 mM Imidazol) pro Liter Bakterienkultur aufgenommen. Das resuspendierte Pellet wurde bei -20 °C gelagert. Erfolgte die Induktion bei 25 °C (bei

Munc18a und Vps45 aus *Rattus norvegicus* und Munc18 aus *Monosiga brevicollis*), wurde die Bakterienkultur über Nacht bei 25 °C inkubiert.

Die Reinigung der Proteine umfasste eine Ni²⁺-NTA-Agarose-Reinigung und anschließende Ionenaustauschchromatographie. Zur Extraktion der Proteine wurden zu den resuspendierten Bakterien 1 mg/ml Lysozym, 1 mM PMSF, eine Spatelspitze DNaseI und 1 mM MgCl₂ gegeben und 20 min bei RT inkubiert. Zusätzlich erfolgte die Ultraschallbehandlung (4mal 30s) der Bakterienzellen. Danach wurden zusätzlich 1 % (v/v) Triton X-100 und erneut 1 mM PMSF addiert und 10 min bei RT inkubiert. Nun wurde 6 M Harnstoff in der Bakteriensuspension gelöst und weitere 20 min auf Eis inkubiert. Zur Reinigung von Munc18a und Vps45 aus *Rattus norvegicus* und Munc18 aus *Monosiga brevicollis* wurde kein Harnstoff verwendet. Zelltrümmer wurden anschließend im Sorvall SLA-1500 Rotor bei 4 °C mit 14500 rpm für 45 min abzentrifugiert. Der klare Überstand wurde mit etwa 1 ml pro Kolben Ni²⁺-NTA-Agarose (Qiagen) versetzt und für eine Dauer von 1-2 h bei 4 °C inkubiert. Die Ni²⁺-NTA-Agarose wurde mittels Filtration gesammelt und mit etwa 250 ml Waschpuffer (20 mM Tris pH 7,4, 500 mM NaCl, 15 mM Imidazol) gewaschen. Die Elution erfolgte (20 mM Tris pH 7,4, 500 mM NaCl, 400 mM Imidazol) in zwei 12 ml-Schritten. Um den Erfolg der Reinigung zu kontrollieren, wurden 4-8 µl des Eluats mittels SDS-PAGE analysiert. Zur Entfernung des Hexa-Histidin-Tags wurde das Eluat mit etwa 100 Units Thrombin versetzt (für alle Syntaxin1a-Varianten aus *Rattus norvegicus* wurde kein Thrombin verwendet, da ich im Laufe meiner Experimente feststellte, dass Thrombin zusätzlich zum Hexa-Histidin-Tag unspezifisch die ersten 8 AS von Syntaxin1a abspaltet). Anschließend wurde das Eluat gegen 20 mM Tris pH 7,4, 100-200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT bei 4 °C über Nacht dialysiert.

Die Ionenaustauschchromatographie erfolgte mit dem ÄKTA-System von GE Healthcare. Die Proteine wurden an die entsprechende Ionenaustauschmatrix gebunden und durch einen linear steigenden Salzgradienten eluiert. Die Elution wurde fraktioniert und dies bei den Absorptionen 280 nm und 230 nm verfolgt. Um die Reinheit der *peak*-Fraktionen festzustellen, wurden die Fraktionen mittels SDS-PAGE und Coomassie Blue-Färbung analysiert. Die saubersten Fraktionen wurden vereinigt und bei -20 °C gelagert.

Für meine ersten Experimente mit Vps45 und Syntaxin16 wurde mir freundlicherweise Syntaxin16 von Dr. Daniel Zwilling zur Verfügung gestellt.

Außerdem wurde Synaptobrevin 1-96 (T79C) von Dr. Alexander Stein gereinigt und mit dem Farbstoff Alexa488 markiert.

2.2.2 Biochemische Standardmethoden

Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Konzentration der verwendeten Proteine wurde mittels UV-Absorption bei 280 nm bestimmt. Dazu wurde die Absorption der Proteine in Anwesenheit von 6M Guanidinhydrochlorid bestimmt. Der Extinktionskoeffizient des jeweiligen Proteins wurde mit der Aminosäuresequenz auf der Internetseite <http://expasy.org/tools/protparam.html> berechnet. Die Konzentration des Proteins konnte mit Hilfe des Lambert-Beer-Gesetzes bestimmt werden.

Die Konzentration von mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Proteinen wurde mit Hilfe der Bradford-Methode (Bradford et al., 1976) bestimmt. Für eine Standardreihe wurden separat 0, 1, 2, 3, 4 und 6 µg BSA sowie die zu bestimmenden Proteine mit destilliertem Wasser auf ein Volumen von 200 µl aufgefüllt und mit 800 µl Bradford-Reagenz gemischt. Nach 5 min wurde die Absorption der Standardreihe photometrisch bei 595 nm bestimmt. Mit diesen Werten wurde eine Eichgerade erstellt, anhand dieser die Konzentration des Proteins bestimmt wurde. Gleichzeitig durchgeführte Doppel- oder Dreifachbestimmungen garantieren eine genauere Proteinbestimmung.

Polyacrylamidgelelektrophorese

In dieser Arbeit wurde SDS-PAGE nach Laemmli (Laemmli, 1974) und Nativ-PAGE durchgeführt. Dafür wurden das Mini-Protean II-Gelsystem (Biorad), gebrauchsfertige, gasstabilisierte, wässrige Stammlösung mit 30% (w/v) Acrylamid und 0,8% (w/v) Bisacrylamid sowie zusätzlich Trenngelpuffer (1,5 M Tris, pH 8,8, 0,4% (w/v) SDS) und Sammelgelpuffer (0,5 M Tris, pH 6,8, 0,4% (w/v) SDS) verwendet. Es wurden 10%-ige und 15%-ige Trenngele benutzt. Die Vorgehensweise für Nativ-PAGE war die gleiche wie bei der SDS-PAGE nach Laemmli, bis auf den Unterschied, dass SDS in Trenn- und Sammelgel, Laufpuffer und Probenpuffer fehlte. Des Weiteren wurden bei der Nativ-PAGE 9%-ige Trenngele benutzt.

Nach beendeter Elektrophorese wurde das Trenngel für 10 min in 50% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure und 0,2% (w/v) Coomassie Blue auf dem Schüttler

inkubiert. Anschließend wurde das Gel für etwa 5-10 min in 50% (v/v) Ethanol und 10% (v/v) Essigsäure und danach bis zur vollständigen Entfärbung des Hintergrundes in 10% (v/v) Ethanol und 5% (v/v) Essigsäure unter einmaligem Wechsel der Lösungen inkubiert.

2.2.3 Herstellung und Reinigung von SNARE-Komplexen

Die in dieser Arbeit verwendeten SNARE-Komplexe wurden über Ionenaustauschchromatographie gereinigt, um die Verunreinigung durch Einzelproteine, insbesondere von freiem Syntaxin1, auszuschließen. Syntaxin1, SNAP-25 und Synaptobrevin wurden in einem Verhältnis von 1:1:1.5 zusammengegeben und bei 4 °C über Nacht gegen 20 mM Tris pH 7,4, 500 mM NaCl und 1 mM DTT dialysiert. Anschließend wurden die Proteine mit 20 mM Tris pH 7,4 und 1 mM DTT verdünnt und die überschüssigen Monomere über Ionenaustauschchromatographie mit dem ÄKTA-System abgetrennt. Folgende SNARE-Komplexe wurden gereinigt:

- 1) Ternärer Komplex bestehend aus Syntaxin1a ohne Transmembranregion (AS 1-262), SNAP-25 (AS 1-206) und Synaptobrevin2 ohne Transmembranregion (AS 1-96) aus *Rattus norvegicus*
- 2) Ternärer Komplex bestehend aus Syntaxin1a ohne Transmembranregion und ohne N-terminales Peptid (AS 25-262), SNAP-25 (AS 1-206) und Synaptobrevin2 ohne Transmembranregion (AS 1-96) aus *Rattus norvegicus*
- 3) Dementsprechend auch der ternäre Komplex aus *Monosiga brevicollis* bestehend aus Syntaxin1 ohne Transmembranregion (AS 1-279), SNAP-25 (AS 1-210) und Synaptobrevin2 ohne Transmembranregion (AS 1-75)

Die Identität und Reinheit der SNARE-Komplexe wurde durch SDS- und Nativ-PAGE und anschließender Coomassie-Blue-Färbung überprüft.

2.2.4 Fluoreszenzspektroskopie

Protein-Fluoreszenz-Markierung

Einzelcysteinvarianten wurden mit den Fluoreszenzfarbstoffen Oregon Green 488 iodoacetamide (OG) und Texas Red C5 bromoacetamide (TR) (Molecular Probes) markiert. Diese künstlichen Fluoreszenzfarbstoffe binden spezifisch an ein Cystein im Protein. 1 ml aufgereinigtes Protein (1-4 mg/ml) wurde mit 10 mM DTT versetzt und über Nacht gegen entgasten PBS-Puffer ohne DTT dialysiert. Die Proteinlösung wird noch einmal für 1 h gegen entgasten und N₂-begasten PBS-Puffer dialysiert. Nun wurde der entsprechende Farbstoff, gelöst in N, N-Dimethylformamid in zehnfachem molaren Überschuss zu dem Protein gegeben und für 2 h bei RT inkubiert. Nach erneuter Zugabe von 10 mM DTT und 30 minütiger Inkubation wurde der überschüssige Farbstoff über eine Gelfiltration (G-25 Sepharose (Sephadex) superfine) abgetrennt.

Die Effizienz der Markierung ergibt sich aus dem Verhältnis des gekoppelten Farbstoffes und der Proteinmenge. Die Konzentration des markierten Proteins wurde anhand der Absorption des gekoppelten Farbstoffes über den molaren Absorptionskoeffizienten (nach Angaben des Herstellers) bestimmt. Die Markierungseffizienz errechnet sich aus dem Verhältnis dieser Konzentration und der Proteinkonzentration bestimmt mittels Bradford-Methode.

Die Fluoreszenz-Messungen wurden mit einem Fluorolog-3 (HORIBA Jobin Yvon) bei 25 °C durchgeführt. Alle Messungen wurden in 1 cm Quarzküvetten (Hellma) und in PBS-Puffer, pH 7,4 durchgeführt. Die Proben wurden während der Messung kontinuierlich durch einen Magnetrührer gemischt. Die Datenanalyse erfolgte mit Hilfe des Programms Kaleidagraph (Synergy Software).

Tryptophan-Fluoreszenz

In gefalteten Proteinen dominiert zu 90% die Fluoreszenzemission von Tryptophan. Tyrosin wird in Proteinen oft gequench, z.B. durch Wasserstoffbrückenbindung zur OH-Gruppe oder durch Energietransfer zum Tryptophan. Die Emission von Phenylalanin ist schwach und wird wenig untersucht. Die Tryptophan-Fluoreszenz kann verwendet werden, um die Interaktion von Munc18a und Syntaxin1a zu untersuchen, da es aufgrund der Interaktion zur Fluoreszenz-Änderung kommt. Um die Bindung von Munc18a und Syntaxin1a zu untersuchen, wurden die Tryptophane

von Munc18a in Abwesenheit und in Anwesenheit von Syntaxin1a bei 295 nm angeregt. Ein Emissionsspektrum von 305-450 nm wurde aufgenommen. Des Weiteren wurde die Veränderung der Tryptophanfluoreszenz bei 340 nm während der Titration von Syntaxin1a zu Munc18a gemessen.

Fluoreszenz-Anisotropie-Messungen

Änderungen in der Fluoreszenz-Anisotropie können aufgrund der Beweglichkeit des Fluorophors gemessen werden. Je schneller der Fluorophor im angeregten Zustand rotiert, umso zufälliger sind die Schwingungsebenen des emittierten Lichtes verteilt, der Anteil an parallel emittiertem Licht ist gering. Bei kleinen Molekülen ist eine schnelle Rotation des Fluorophors zu verzeichnen, die Fluoreszenz-Anisotropie ist gering. Bei der Zugabe eines Bindungspartners entsteht nach und nach ein größerer Komplex, die Rotation des Fluorophors wird langsamer, der Anteil an parallel emittiertem Licht wird höher und die Fluoreszenz-Anisotropie steigt.

Die Fluoreszenz-Anisotropie-Messungen wurden am FluoroLog-3 (HORIBA Jobin Yvon) in T-Konfiguration durchgeführt. Die T-Konfiguration erlaubt es, das emittierte Licht simultan in der parallelen und der senkrechten Polarisationsebene mit zwei verschiedenen Detektoren zu messen. Da beide Detektoren eine unterschiedliche Detektionseffizienz aufweisen, wurde der gerätespezifische Korrekturfaktor (G-Faktor) bestimmt:

$$G = I_{HV} / I_{HH} \quad (2.1)$$

Darin bezeichnet I_{HV} die Fluoreszenzintensität der horizontalen Polarisationsrichtung des anregenden Lichts x der Fluoreszenzintensität der vertikalen Polarisationsrichtung des emittierten Lichts und I_{HH} die Fluoreszenzintensität der horizontalen Polarisationsrichtung des anregenden Lichts x der Fluoreszenzintensität der horizontalen Polarisationsrichtung des emittierten Lichts. Die Anisotropie (r) berechnet sich aus folgender Gleichung:

$$r = (I_{VV} - G \times I_{VH}) / (I_{VV} + 2 \times G \times I_{VH}) \quad (2.2)$$

Die Farbstoffe Oregon Green (OG) und Texas Red (TR) wurden für Fluoreszenz-Anisotropie-Messungen verwendet. Diese Farbstoffe wurden bei 488 nm (für TR bei

590 nm) angeregt und die Fluoreszenzemission bei 520 nm (für TR bei 610 nm) gemessen.

2.2.5 Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC)

Die Bindungswärme von Protein-Protein-Interaktionen messen ultrasensitive isotherme Titrations-Kalorimeter. Ein Mikrokalorimeter besteht aus zwei Zellen, der Referenzzelle (Wasser oder Puffer) und der Probenzelle (Makromolekül im Puffer). Die Temperatur des Mantels wird konstant gehalten (isotherme Bedingungen). Durch einen Heizstrom wird die Probenzelle so geheizt bzw. gekühlt, dass sie immer die gleiche Temperatur hat wie die Referenzzelle. Wird bei einer Reaktion Wärme aufgenommen/abgegeben, muss ein Heizstrom verstärkt/abgeschwächt werden, damit die Temperatur konstant bleibt. Das Mikrokalorimeter misst die Stromstärke in der Probenzelle und berechnet daraus die Aufnahme/Abgabe von Wärme pro Zeiteinheit ($\mu\text{cal}/\text{sec}$).

ITC wurde mit einem VP-ITC-Instrument (MicroCal) bei 25 °C durchgeführt. Die Proben wurden vorher zweimal gegen entgasten und gefilterten Phosphat-Puffer (19 ml 0,2 M NaH_2PO_4 , 81 ml 0,2 M Na_2HPO_4 , 150 mM NaCl, 1 mM DTT, pH 7,4) dialysiert. Nun wurde eine Proteinlösung in der Meßzelle (1.4 ml) vorgelegt und eine mindestens siebenfach höher konzentrierte Lösung des Bindungspartners in die Injektionskanüle (300 μl) gefüllt. Nach einer Vorlaufzeit, in der eine exakte Temperierung der Probenzelle erfolgte, wurden festgelegte Volumina im μl -Bereich injiziert und aus der Thermostatfunktion die jeweils freigewordene Wärme berechnet. Die Änderung der Wärmemenge während der Proteininteraktionen wurde integriert und die Daten mit der Software Microcal Origin 7.0 (MicroCal Software) analysiert. Unter Annahme eines *single site* Bindungsmodells können die Gleichgewichts-Assoziationskonstante K_a , die Bindungsenthalpie ΔH und die Stöchiometrie n der Interaktion ermittelt werden.

2.2.6 Circular Dichroismus (CD)-spektroskopie

Die Sekundärstruktur und die Stabilität des SNARE-Komplexes aus *Monosiga brevicollis* wurden mittels CD-Spektroskopie untersucht. Dazu wurde der aufgereinigte SNARE-Komplex gegen 20 mM Natriumphosphat pH 7,4, 100 mM

NaCl und 1 mM DTT über Nacht dialysiert. Ein CD-Spektrum von 5 μM des SNARE-Komplexes wurde in 300 μl -Küvetten (Hellma) bei 25 °C mit dem Spektralphotometer Chirascan (Jasco) aufgenommen.

Um die Stabilität des SNARE-Komplexes aus *Monosiga brevicollis* zu bestimmen, wurde der gereinigte Komplex bei einer Proteinkonzentration von 5 μM schrittweise von 20 °C bis 99 °C erhitzt. Das CD-Signal wurde bei 222 nm (in 1 °C-Schritten bei einer Geschwindigkeit von 1 °C/h) aufgezeichnet.

2.2.7 Herstellung von polyklonalen Antikörpern gegen Synaptobrevin aus *Monosiga brevicollis*

Polyklonale Antikörper wurden in Kaninchen gegen rekombinantes Synaptobrevin aus *Monosiga brevicollis* erzeugt. Die zytosolische Domäne von Synaptobrevin (AS 1-75) wurde mittels Affinitätschromatographie gereinigt, der Hexa-Histidin-Tag mit Thrombin entfernt und mit anschließender Ionenaustauschchromatographie gereinigt. Die Kaninchen wurden von Michaela Hellwig (Abteilung Neurobiologie) immunisiert. Dazu wurden zu Beginn 300 μg Synaptobrevin in zwei Kaninchen injiziert. Danach wurden für mehrere Monate alle 4 Wochen weitere 150 μg Synaptobrevin injiziert. Das rekombinante Protein wird im Immunoblot von den Antiseren als einzelne Bande erkannt.

2.2.8 Kultivierung des Choanoflagellaten *Monosiga brevicollis*

Der Choanoflagellat *Monosiga brevicollis* wurde 1981 aus dem Atlantischen Ozean aus einer Höhle (*Church Cave*) auf den Bermuda-Inseln isoliert. Es handelt sich hierbei um eine Mischkultur (*non-axenic culture*), da neben dem Choanoflagellaten *Monosiga brevicollis* auch natürlich im Meerwasser vorkommende Bakterien vorhanden sind. Die *Monosiga brevicollis*-Kultur wurde freundlicherweise von N. King (Universität in Kalifornien, Berkeley, U.S.A) zur Verfügung gestellt. Zur Kultivierung der Choanoflagellaten wurde als erstes Choanoflagellaten-Medium hergestellt. Dazu wurden 200 ml destilliertes Wasser mit 200 ml Cereal Grass Medium (Scholar Chemistry) gemischt. Zu dieser Lösung wurde Meersalz (Hobby-Marin Meersalz der Firma Dohse) gegeben, bis eine Leitfähigkeit von 53 mS/cm erreicht wurde. Das Choanoflagellatenmedium wurde anschließend sterilfiltriert. Die

gefrorenen Choanoflagellatenzellen (1 ml) wurden bei 37 °C aufgetaut und dann sofort unter der Sterilbank zu 15 ml Choanoflagellaten-Medium in Zellkulturflaschen (Roth) pipettiert. Dazu wurde ein steriles Reiskorn gegeben, welches als Stärkequelle für die Bakterien dient. Die Choanoflagellaten wurden bei 25 °C im Inkubator kultiviert. Um die Kultur einmal pro Woche zu teilen, wurden die adherenten Zellen durch Abkratzen mit einem Schaber vom Boden gelöst und vorsichtig mit dem vorhandenen Medium resuspendiert. 1/100 dieser Suspension wurden mit 15 ml neuem Choanoflagellaten-Medium vermischt.

2.2.9 Immunfärbung und Fluoreszenzmikroskopie

Choanoflagellatenzellen wurden bis zu einer Dichte von 10^6 bis 10^7 Zellen/ml kultiviert und dann bei 500 rpm für 10 min abzentrifugiert. Die Zellen wurden mit 4%-iger PFA-Lösung für 15 min auf Eis und für weitere 15 min bei RT fixiert. 0.7 ml der fixierten Zellen wurden auf poly-L-Lysin beschichtete Deckgläser (10 mm), pipettiert und für 30 min inkubiert. Anschließend wurde das Fixativ entfernt und die Deckgläser zweimal mit PEM-Puffer (100 mM PIPES, pH 6.9, 1 mM EGTA, 0.1 mM $MgSO_4$) mit 100 mM NH_4Cl für 15 min gewaschen. Es folgten vier schnelle Waschschrte mit PEM-Puffer und anschließend eine 30-minütige Inkubation mit PBT-Puffer (PEM-Puffer, 1% BSA, 0.3% Triton X-100). Nun folgte die Inkubation mit Erstantikörpern (Verdünnung 1:100 in PBT-Puffer) für 1 h bei RT. Es folgten vier 5-minütige Waschschrte mit PBT-Puffer und die Zweitantikörperbehandlung (Verdünnung 1:100 in PBT-Puffer) für 1 h bei RT. Die Deckgläser wurden abschließend 3x mit PEM-Puffer gewaschen und mittels 4 μ l Dako (Fluorescent Mounting Media) auf Objektträger aufgezogen. Folgende Erstantikörper wurden verwendet: monoklonaler Antikörper gegen E7 anti-Tubulin (Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa, USA), gegen PDI (Abcam) und gegen GM-130 (Becton Dickinson), polyklonaler Antikörper gegen Synaptobrevin. Folgende Zweitantikörper wurden verwendet: Cy2- und Cy5-gekoppelte Ziege-anti-Maus bzw. Ziege-anti-Kaninchen (Jackson Immuno Research).

Zur mikroskopischen Untersuchung von *Monosiga brevicollis* wurde ein inverses, mit einem 100x 1,4 NA plan-apochromatischem Öl-Objektiv ausgestattetes Zeiss Axiovert 200 M Fluoreszenzmikroskop (Zeiss) verwendet. Angeregt wurde mit einer XBO 75 Xenon-Lampe. Bilder wurden mit einer *front-illuminated Charge-coupled-*

Device (CCD)-Kamera (1317 x 1035 Kodak-Chip, Pixelgröße 6.8 x 6.8 μm ; Princeton Instruments) aufgenommen. Für die Fluoreszenzanregung und Detektion wurden die entsprechenden Filtersätze benutzt (Chroma, Rockingham, VT, U.S.A): Cy2 (grün): Anregungsfilter BP 480/40 HQ, Strahlteiler LP 505 LP Q, Emissionsfilter BP 527/30 HQ) und Cy5 (dunkelrot): Anregungsfilter 620/60 HQ, Strahlteiler 660 LP Q, Emissionsfilter 700/75 HQ. Das Mikroskop und die Kamera wurden über das Programm MetaVue/Metamorph gesteuert (Universal Imaging).

2.2.10 Hochdruckgefrierpräparation („High-Pressure-Freezing“) und Kryo-Substitution

Die Hochdruckgefrierpräparation erlaubt es, biologische Materialien in Sekundenbruchteilen einzufrieren, ohne dass diese vorher fixiert werden müssen. So können Fixierungsartefakte minimiert werden. Weiterhin wird durch den hohen Druck zum Zeitpunkt des Einfrierens (ca. 2000 bar) die Bildung kristallinen Eises und somit die Zerstörung der Zellen verhindert. Choanoflagellatenzellen wurden bis zu einer Dichte von 10^6 bis 10^7 Zellen/ml in 50 ml Choanoflagellatenmedium kultiviert und bei 500 rpm für 10 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml Meerwasser mit 20% BSA aufgenommen und ein weiteres Mal abzentrifugiert. Das Pellet wurde nun in 200 μl Meerwasser mit 20% BSA aufgenommen. 3 μl dieser resuspendierten Choanoflagellatenzellen wurden in 300 nm Probenhalter pipettiert und mittels Hochdruckgefrierpräparation („High-Pressure-Freezing“) behandelt. Dazu wurde die HPM 010 (High Pressure Freezing Machine) der Firma Boeckeler Instruments verwendet.

Die Kryo-Substitution wurde mit Hilfe des AFS (Automatic Freeze Substitution System) der Firma Leica durchgeführt. Die fixierten Choanoflagellatenzellen in den Probenhaltern wurden bei $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit 0.1% Tanninsäure und Aceton für 100h inkubiert. Danach wurden die Zellen für 2h mit Aceton und anschließend für 7h mit 2% OsO_4 in Aceton inkubiert. In dem Zeitintervall von $5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{h}$ wurde die Temperatur von $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$ auf $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ erhöht, um danach in einem Zeitintervall von $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{h}$ die Temperatur auf $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zu erhöhen. Es folgten 3 Waschschrte mit Aceton. Die weiteren Arbeitsschritte erfolgten bei RT. Die Zellen wurden vorsichtig aus den Probenkammern gelöst und schrittweise in ein Epoxid-Harz (Epon) eingebettet. Dazu wurden als erstes die Zellen mit einem Gemisch aus Epon und Aceton im Verhältnis

1:1 für 6h inkubiert. Es folgten die Mischverhältnisse 2:1 für 4h und 9:1 über Nacht. Darauf folgte die Inkubation mit 100% Epon für 24h. Die Choanoflagellatenzellen wurden in Einbettungsförmchen mit frischem Epon überführt und über Nacht im Wärmeschrank bei 60 °C polymerisiert. Epon wurde wie folgt angesetzt: 21,4 g Glycidether, 14,4 g DDSA und 11,3 g MNA für 10 min gemischt, dann Zugabe von 0,84 ml DMP-30 und für weitere 20 min gemischt (Chemikalien von Serva).

2.2.11 Transmissions-Elektronenmikroskopie

Die polymerisierten Kunstharzblöcke wurden konisch zurechtgetrimmt, so dass die Choanoflagellatenzellen frei lagen. Am UCT Ultramikrotom (Leica) konnten dann Ultradünnschnitte mit einer Schnittdicke von 70 nm angefertigt werden. Die Ultradünnschnitte wurden auf Kupfergrids (3,05 mm von der Firma Agar Scientific) befestigt und mit 1% Uranyl Acetat in destilliertem Wasser für 10 min und danach in 0.3% Bleicitrat in destilliertem Wasser für 2 min kontrastiert. Zur elektronenmikroskopischen Untersuchung wurden das LEO 912AB Transmissions-Elektronenmikroskop (Zeiss) mit einer ProScan CCD-Kamera benutzt.

3. Ergebnisse

Mitglieder der SM-Proteinfamilie sind essentielle Faktoren in verschiedenen intrazellulären Transportschritten. SM-Proteine interagieren mit SNARE-Proteinen, allerdings ist der genaue molekulare Mechanismus dieser Interaktion noch nicht wirklich aufgeklärt. Die Kristallstruktur des neuronalen Munc18a/Syntaxin1-Komplexes zeigt, dass Munc18a fast das gesamte Syntaxin1a bindet, welches sich in einer so genannten „geschlossenen“ Konformation befindet (Misura et al., 2000). Ist Syntaxin1a durch Munc18a gebunden, kann es *in vitro* keinen SNARE-Komplex ausbilden (Pevsner et al., 1994b, Yang et al., 2000, Rickman et al., 2007). Dieser Befund führte zu der Annahme, dass Munc18a die Neurotransmitterausschüttung *in vivo* blockiert. Interessanterweise wurde genau das Gegenteil beobachtet. In Abwesenheit von Munc18a ist die Freisetzung von Neurotransmittern komplett blockiert (Verhage et al., 2000). Dieser scheinbare Widerspruch zwischen biochemischen und physiologischen Befunden war der Beweggrund, die physikalischen Grundlagen der Munc18a/Syntaxin1a-Interaktion nochmals genauer zu untersuchen.

3.1 Biophysikalische Untersuchungen der Munc18a/Syntaxin1a-Interaktion

3.1.1 Das N-terminale Peptid von Syntaxin1a nimmt an der Bindung zu Munc18a teil

Die thermodynamischen Parameter der Munc18a/Syntaxin1a-Interaktion wurden mittels Isothermaler Titrationskalorimetrie (ITC) bestimmt. ITC ermöglicht es, die Wärmemenge zu bestimmen, die bei einer Protein-Protein-Interaktion aufgenommen bzw. abgegeben wird. Aus dem Titrationsprofil können dann die Dissoziationskonstante, die Bindungsenthalpie und die Stöchiometrie einer Reaktion bestimmt werden. Im ersten Experiment wurde die Interaktion von Munc18a mit der gesamten zytosolischen Domäne von Syntaxin1a (AS 1-262) mittels ITC gemessen. Dazu wurde Munc18a in die Messzelle des Kalorimeters gegeben und Syntaxin1a schrittweise dazu titriert (Abb. 3.1, schwarze Graphen). Die Änderung der

Wärmemenge während der Proteininteraktionen wurde gegen das molare Verhältnis von Munc18a und Syntaxin1a aufgetragen. Anschließend wurde diese Auftragung mit MicroCal Origin 7.0 unter Verwendung des *single site* Bindungsmodells analysiert.

Die Bindung von Munc18a an Syntaxin1a ist eine exotherme Reaktion mit einer Reaktionsenthalpie von -34.6 kcal/mol (Abb. 3.1 und Tab. 2). Die Dissoziationskonstante (K_d) beträgt 1.4 nM, was zeigt, dass die Affinität der Interaktion von Munc18a und Syntaxin1a sehr hoch ist. Die Stöchiometrie (n) von 1.03 der ITC-Messung entspricht der Munc18a/Syntaxin1a-Kristallstruktur, nach der sie einen 1:1 Komplex bilden. In der Kristallstruktur des Munc18a/Syntaxin1a-Komplexes wird deutlich, dass die Habc-Domäne und das SNARE-Motiv von Syntaxin1a in der „geschlossenen“ Konformation an der konkaven Oberfläche der Domäne 1 und 3 von Munc18a binden (Misura et al., 2000 und Abb. 1.5A). Jeweils ungefähr die gleiche Anzahl von Aminosäuren der Habc-Domäne und dem SNARE-Motiv tragen zur Munc18a/Syntaxin1a-Interaktion bei. Die Habc-Domäne bildet eine unabhängig gefaltete Domäne, die, ob an Munc18a gebunden oder nicht, strukturell unverändert bleibt. Im Unterschied dazu liegt das SNARE-Motiv als einzelne, langgestreckte Helix im SNARE-Komplex vor, während es in der Munc18a/Syntaxin1a-Struktur aus drei unregelmäßig unterbrochenen Helizes besteht (Misura et al., 2000).

Um die energetischen Beiträge der verschiedenen Bereiche von Syntaxin1a zur Munc18a-Interaktion zu analysieren, wurden ITC-Experimente mit C-terminal verkürzten Konstrukten durchgeführt. Die Verkürzung von Syntaxin1a um 12 Aminosäuren (Syntaxin1a AS 1-240) hatte keinen Effekt auf die Bindung zu Munc18. Die thermodynamischen Parameter sind im Vergleich zur gesamten zytosolischen Domäne von Syntaxin1a nicht verändert (Tab. 2). Eine weitergehende C-terminale Verkürzung im Syntaxin1a-Molekül hatte dagegen einen deutlich größeren Effekt. So bindet ein um 36 Aminosäuren verkürztes Syntaxin1a (AS 1-226) Munc18a deutlich schlechter, die K_d verändert sich von 1 auf 621 nM und die Reaktionsenthalpie ist von -35 auf -8 kcal/mol verringert (Tab. 2). Ähnliche Ergebnisse erhält man, wenn das gesamte SNARE-Motiv entfernt wurde (AS 1-179, Tab. 2). Die Enthalpie für diese Reaktion beträgt nur noch -5.5 kcal/mol und die K_d 694 nM. Munc18a bindet demnach nur schwach an die verbliebene N-terminale Region von Syntaxin1a. In Übereinstimmung mit einer früheren Studie (Wu et al.,

1999) führte die Punktmutation I233A im SNARE-Motiv von Syntaxin1a zu einer deutlich reduzierten Affinität von 333 nM (Tab. 2). Meine ITC-Daten stehen daher im Einklang mit der Munc18a/Syntaxin1a-Kristallstruktur und bekräftigen die Wichtigkeit dieser C-terminalen Region für die Festigkeit der Munc18a/Syntaxin1a-Interaktion.

Tab. 2: Thermodynamische Parameter der Interaktion von Syntaxin1a und Munc18a gemessen mittels ITC bei 25 °C. Syntaxin1a ist mit Syx1a abgekürzt, die Zahlen in Klammern geben den Sequenzbereich der verwendeten Konstrukte an.

Interaktion von	K_d [nM]	ΔH [kcal/mol]	n
Syx1a (1-262) / Munc18a	1.4 ± 0.3	-34.6 ± 0.2	1.03
Syx1a (1-240) / Munc18a	2.7 ± 1.2	-34.3 ± 0.2	1.01
Syx1a (1-226) / Munc18a	621.1 ± 107.2	-8.0 ± 0.5	0.84
Syx1a (1-179) / Munc18a	693.9 ± 84.2	-5.5 ± 0.5	0.91
Syx1a (1-20) / Munc18a	–	–	–
Syx1a (25-262) / Munc18a	8.1 ± 1.0	-25.1 ± 0.2	1.01
Syx1a (180-262) / Munc18a	–	–	–
Syx1a (180-262) + Syx1a (1-179) / Munc18a	277.8 ± 33.7	-21.2 ± 0.8	0.94
Syx1a ^{LE} / Munc18a	7.7 ± 0.6	-34.8 ± 0.2	0.99
Syx1a ^{I233A} / Munc18a	333.3 ± 58.4	-16.0 ± 0.7	0.93
<hr/>			
Syx1a ^{R4A} / Munc18a	9.4 ± 1.6	-27.3 ± 0.3	1.03
Syx1a ^{T5A} / Munc18a	1.9 ± 0.7	-32.6 ± 0.3	1.01
Syx1a ^{L8A} / Munc18a	9.1 ± 1.7	-27.3 ± 0.3	1.01
Syx1a ^{T10A} / Munc18a	0.4 ± 0.2	-34.6 ± 0.2	1.05
Syx1a ^{S14A} / Munc18a	2.6 ± 1.3	-33.5 ± 0.4	1.03
<hr/>			
Syx1a (1-262) / Munc18a ^{F115E}	6.6 ± 1.2	-25.8 ± 0.2	0.91
Syx1a (1-262) / Munc18a ^{L130K}	28.2 ± 3.7	-22.7 ± 0.3	0.84
<hr/>			
SNARE-Komplex mit Syx1a (1-262) / Munc18a	719.4 ± 118.0	-4.8 ± 0.4	0.84
SNARE-Komplex mit Syx1a (25-262) / Munc18a	–	–	–

Als nächstes wurde ein Syntaxin1a-Fragment (AS 25-262) zu Munc18a titriert, dem die ersten 24 Aminosäuren entfernt worden sind (Abb. 3.1, blaue Graphen). Dieses N-terminal verkürzte Syntaxin1a-Fragment bindet Munc18a mit einer etwas geringeren Affinität ($K_d = 8.1$ nM) als die gesamte zytosolische Domäne von Syntaxin1a (AS 1-262). Bemerkenswerterweise ist die Reaktionsenthalpie deutlich geringer, sie beträgt nur noch -25.1 kcal/mol (Tab. 2). Die Differenz in der Reaktionsenthalpie zwischen den zwei Syntaxin1a-Varianten deutet daraufhin, dass

der N-terminale Bereich von Syntaxin1a, von nun an als N-terminales Peptid bezeichnet, an der Bindung zu Munc18 teilnimmt. Interessanterweise ist das N-terminale Syntaxin1a-Peptid in der Munc18a/Syntaxin1a-Kristallstruktur jedoch nicht vorhanden.

Das N-terminale Peptid von Syntaxin1a (AS 1-20) allein bindet Munc18a nicht (Tab. 2). Das Entfernen des N-terminalen Peptids von Syntaxin1a senkt die Affinität von ca. 1 nM auf 8 nM ($\Delta\Delta G^\circ = 1.2$ kcal/mol). Geht man davon aus, dass das N-terminale Peptid unabhängig vom Rest des Syntaxin1a-Moleküls bindet, entspricht die verbleibende Gibb'sche Energie einer K_d von 130 mM. Dies erklärt, warum ich keine Bindung des N-terminalen Peptids (AS 1-20) detektieren kann.

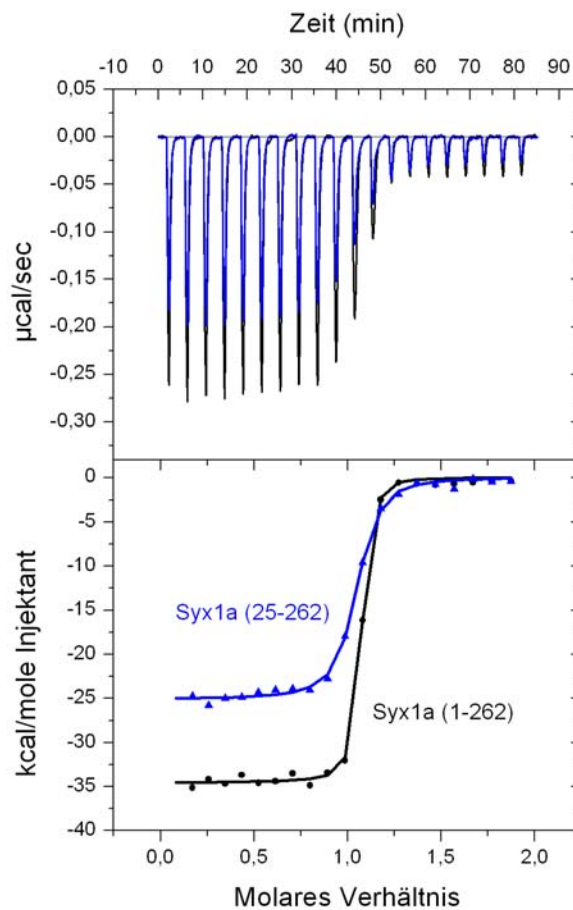


Abb. 3.1: Das N-terminale Peptid von Syntaxin1a nimmt an der Bindung zu Munc18a teil. Kalorimetrische Titrations von Syntaxin1a (AS 1-262) und Syntaxin1a (AS 25-262) in Munc18a. Je $20 \mu\text{M}$ der Syntaxin1a-Variante wurde zu $2.5 \mu\text{M}$ Munc18a titriert (oben). Die bei der Reaktion freiwerdende Wärme ist proportional zur Fläche unter jeden Peak. Die pro mol injizierte Syntaxin1a freiwerdende Wärme wurde gegen das molare Verhältnis von Syntaxin1a und Munc18a aufgetragen (unten). Die Linien repräsentieren die beste Anpassung nach Nutzung des *single site*-Bindungsmodells.

Die Munc18a/Syntaxin1a-Interaktion wurde auch mit Hilfe der Tryptophanfluoreszenz untersucht. Aus Vorarbeiten von Dr. Dirk Fasshauer ging hervor, dass man die Bindung von Munc18a und Syntaxin1a aufgrund einer deutlichen Änderung der intrinsischen Fluoreszenz beobachten kann. Wie in Abbildung 3.2 zu sehen ist, kommt es bei der Zugabe von Syntaxin1a (AS 1-262) bzw. Syntaxin1a (AS 25-262) zu Munc18a zu einem Anstieg der Tryptophanfluoreszenz (Abb. 3.2A).

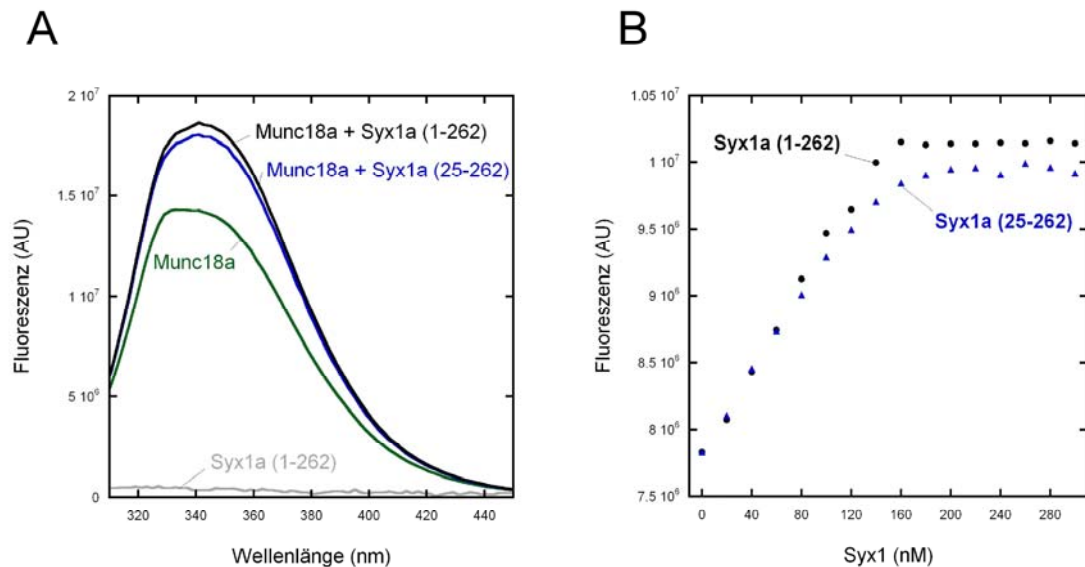


Abb. 3.2: Charakterisierung der Munc18a/Syntaxin1a-Bindung mittels Tryptophanfluoreszenz. (A) Emissionsspektren von Syntaxin1a, Munc18a, Munc18a vermisch mit Syntaxin1a (AS 1-262) und Munc18a vermisch mit Syntaxin1a (AS 25-262) nach Anregung bei 295 nm. Ein vorher aufgezeichnetes Pufferspektrum wurde von allen Spektren abgezogen. (B) Veränderung der Tryptophanfluoreszenz bei 340 nm während der Titration von Syntaxin1a (AS 1-262) bzw. Syntaxin1a (AS 25-262) zu 150 nM Munc18a.

Munc18a besitzt 5 Tryptophane und 23 Tyrosine. Syntaxin1a dagegen besitzt keine Tryptophane und nur 5 Tyrosine. Höchstwahrscheinlich ist der Anstieg der Tryptophanfluoreszenz damit zu erklären, dass sich bei der Bindung von Syntaxin1a zu Munc18a die Fluoreszenzemission von mindestens einem Tryptophan von Munc18a umgebungsabhängig verändert. Interessant ist, dass der Anstieg der Tryptophanfluoreszenz in Anwesenheit von Syntaxin1a (AS 25-262) immer etwas geringer ausfiel, als in Anwesenheit von Syntaxin1a (AS 1-262). Ein kleiner Unterschied in der Konformation beider Komplexe könnte hierfür verantwortlich sein.

Um eventuelle Unterschiede in der Affinität messen zu können, wurde als nächstes die Änderung der Tryptophanfluoreszenz von Munc18a bei einer schrittweisen Zugabe von Syntaxin1a (AS 1-262) bzw. Syntaxin1a (AS 25-262) aufgezeichnet (Abb. 3.2B). Die Sättigung erfolgt bei einem Verhältnis von 1:1 der beiden Interaktionspartner. Die Ergebnisse der Tryptophanfluoreszenz bestätigen, dass beide Syntaxin1a-Varianten binden Munc18a mit hoher Affinität binden. Es scheint aber, dass Syntaxin1a (AS 25-262) etwas weniger affin bindet. Wie schon mittels ITC gezeigt, scheint es Unterschiede in der Affinität und auch in der Interaktionsfläche bzw. Konformation zwischen den Komplexen aus Munc18a/Syntaxin1a (AS 1-262) und Munc18a/Syntaxin1a (AS 25-262) zu geben.

Zusätzlich zu den ITC- und Tryptophanfluoreszenz-Messungen wurde die Munc18a/Syntaxin1a-Interaktion mittels Fluoreszenz-Anisotropie untersucht. Bei Fluoreszenz-Anisotropie-Messungen wird ein Fluorophor mit polarisiertem Licht angeregt. Je schneller der Fluorophor im angeregten Zustand rotiert, umso zufälliger sind die Schwingungsebenen des emittierten Lichtes verteilt, der Anteil an parallel emittiertem Licht ist gering. Werden kleine Moleküle mit einem Fluorophor gekoppelt, ist eine schnelle Rotation des Fluorophors zu verzeichnen. Die Fluoreszenz-Anisotropie ist dann gering. Bei der Zugabe eines Bindungspartners entsteht ein größerer Komplex, die Rotation des Fluorophors wird langsamer, der Anteil an parallel emittiertem Licht wird höher und die Fluoreszenz-Anisotropie steigt. Ein Anstieg der Fluoreszenz-Anisotropie ist zu verzeichnen, wenn mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiertes Syntaxin1a mit Munc18a einen Komplex bildet. Die Änderung in der Anisotropie habe ich ausgenutzt, um die Geschwindigkeit der Bindung von Munc18a und Syntaxin1a zu messen.

Die Assoziation von Syntaxin1a und Munc18a wurde mit Hilfe einer „stopped-flow“-Prozedur untersucht. Es handelt sich hierbei um ein schnelles Mischverfahren. Die Reaktanten werden durch Injektion aus zwei Spritzen sehr schnell durch Luftdruck vermischt. Der Fluss wird abrupt angehalten und anschließend der Reaktionsverlauf verfolgt. Mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiertes Syntaxin1a wurde mit Munc18a vermischt und der Anstieg der Anisotropie verfolgt (Abb. 3.3B). Die Geschwindigkeitskonstanten für die Assoziation von Syntaxin1a (AS 1-262) und Syntaxin1a (AS 25-262) mit Munc18a wurden mit Hilfe der Pro-KII-Software (Applied Photophysics) bestimmt. Diese betragen $5.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ für Syntaxin1a (AS

1-262) und $4.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ für Syntaxin1a (AS 25-262). Um die Geschwindigkeitskonstanten für die Dissoziation von Syntaxin1a (AS 1-262 bzw. AS 25-262) von Munc18a zu bestimmen, wurde zunächst 100 nM markiertes Syntaxin1a mit 200 nM Munc18a vermischt. Dies führt zu einem Anstieg der Fluoreszenz-Anisotropie. Dann wurde ein Überschuss an unmarkiertem Syntaxin1a (5 μM) dazugegeben und die darauf folgende Abnahme der Fluoreszenz-Anisotropie beobachtet (Abb. 3.3B).

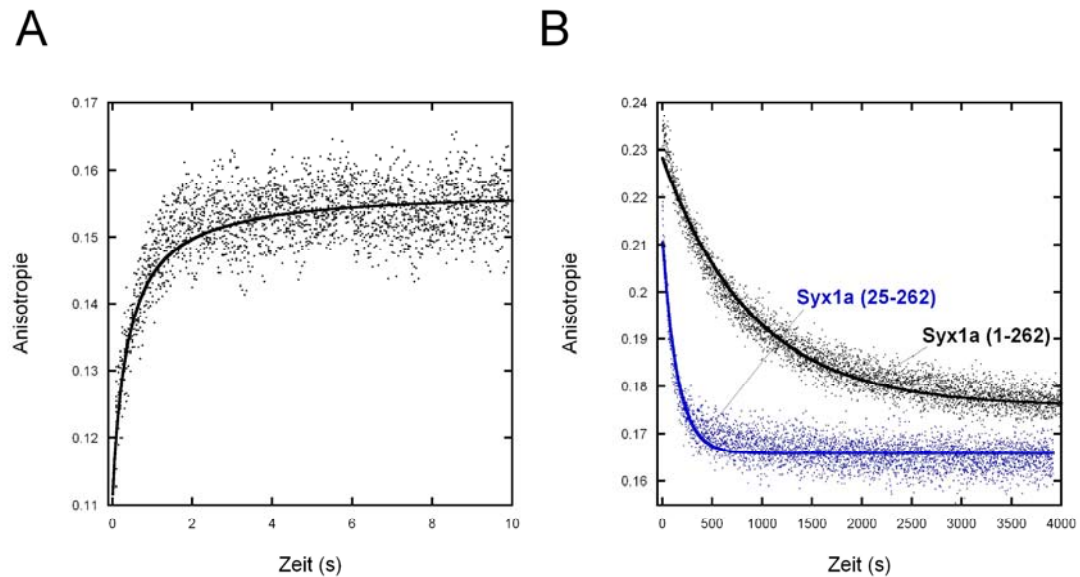


Abb. 3.3: Charakterisierung der Munc18a/Syntaxin1a-Bindung mittels Fluoreszenz-Anisotropie. (A) Bindung von Munc18a an markiertes Syntaxin1a (AS 1-262). Je 500 nM Munc18a wurden mit Syntaxin1a markiert mit OregonGreen an Position 197 gemischt. Gezeigt sind 12 verschiedene Experimente (schwarze Punkte) und die beste Anpassung (*fit*) an diese (schwarze Linie). **(B)** Dissoziation des Munc18a/Syntaxin1a-Komplexes durch Zugabe von unmarkiertem Syntaxin1a. Ein Überschuss an nicht markierten Syntaxin1a-Varianten (5 μM) wurde jeweils zu einem vorvormierten Munc18a/Syntaxin1a-Komplex (100 nM/200 nM) gegeben und der Abfall der Fluoreszenz-Anisotropie gemessen.

Die Messungen zeigen eindeutig, dass der Komplex aus Munc18a und Syntaxin1a (AS 1-262) deutlich langsamer zerfällt als der Komplex aus Munc18a und Syntaxin1a (AS 25-262). Das N-terminale Syntaxin1a-Peptid trägt demnach zur Stabilität des Munc18a/Syntaxin1a-Komplexes bei. Der Abfall der Fluoreszenz-Anisotropie nach Zugabe eines Überschusses an unmarkiertem Syntaxin1a kann durch einen exponentiellen *fit* beschrieben werden (Kaleidagraph 4.0, *exponential decay curve fit*). Es ergeben sich folgende Dissoziationskonstanten: $k_{\text{off}} = 0.0011\text{s}^{-1}$ für Syntaxin1a (AS 1-262) und 0.0067s^{-1} für Syntaxin1a (AS 25-262). Die aus den

kinetischen Daten ermittelte Dissoziationskonstante K_d ($K_d = K_{off}/K_{on}$) von 0.3 nM für den Munc18a/Syntaxin1a (AS 1-262) - Komplex ist vergleichbar mit der Dissoziationskonstante von 1.4 nM, welche mittels ITC bestimmt wurde. Syntaxin1a ohne N-terminales Peptid (AS 25-262) bindet Munc18a ca. sechsmal schlechter als Syntaxin1a mit intaktem N-terminalen Peptid (Fluoreszenz-Anisotropie: 0.3 nM im Vergleich zu 1.7 nM → Faktor 5.7; ITC: 1.4 nM im Vergleich zu 8.1 nM → Faktor 5.8).

Messungen mit Hilfe der Isothermalen Titrationskalorimetrie, Tryptophanfluoreszenz und Fluoreszenz-Anisotropie zeigen eindeutig, dass für eine hoch affine binäre Interaktion von Munc18a und Syntaxin1a sowohl Kontakte vom N-terminalen Peptid als auch von der „geschlossenen“ Konformation von Syntaxin1a nötig sind. Allerdings fehlt das N-terminale Peptid in der Kristallstruktur von Munc18a/Syntaxin1a (Misura et al., 2000). Im folgenden Abschnitt, werde ich auf diesen scheinbaren Widerspruch genauer eingehen.

3.1.2 Neue verfeinerte Munc18a/Syntaxin1a-Struktur - Das N-terminale Peptid von Syntaxin1a ist in der Kristallstruktur sichtbar

Die Erkenntnis, dass das N-terminale Peptid an der Bindung zu Munc18a teilnimmt, veranlasste mich in Zusammenarbeit mit Christian Stegmann (Arbeitsgruppe Kristallographie von Markus Wahl), die publizierte Munc18a/Syntaxin1a-Struktur zu überprüfen. In der Originalstruktur von Misura et al. (2000) wurde berichtet, dass die ersten 26 Aminosäuren von Syntaxin1a keiner Elektronendichte zugeordnet werden konnten. Hieraus wurde geschlossen, dass diese im Kristall unstrukturiert vorliegen. Allerdings ist Restelektronendichte an der äußeren Oberfläche der Domäne 1 von Munc18a zu beobachten. Diese Elektronendichte ist in Abb. 3.4A dargestellt.

Die in den nachfolgenden Jahren publizierten Kristallstrukturen von Munc18c/Syntaxin4 (Hu et al., 2007) und Sly1p/Sed5p (Bracher et al., 2002) halfen, die nicht zugeordnete Elektronendichte im Munc18a/Syntaxin1a-Komplex als das N-terminale Peptid von Syntaxin1a zu identifizieren (Abb. 3.4B). In Zusammenarbeit mit Douglas A. Hattendorf und William I. Weis (Stanford University, Kalifornien, USA) konnte die bereits publizierte Elektronendichte der Munc18a/Syntaxin1a-Struktur weiter verfeinert werden. So war es möglich, die Aminosäuren 2 bis 9 vom N-terminalen Syntaxin1a-Peptid in die Elektronendichte einzubauen (Abb. 3.4B).

Demnach bindet das N-terminale Syntaxin1a-Peptid an die äußere Oberfläche der Domäne 1 von Munc18a (Abb. 3.5). Die verbesserte Struktur wurde von uns mittlerweile publiziert (Burkhardt et al., 2008).

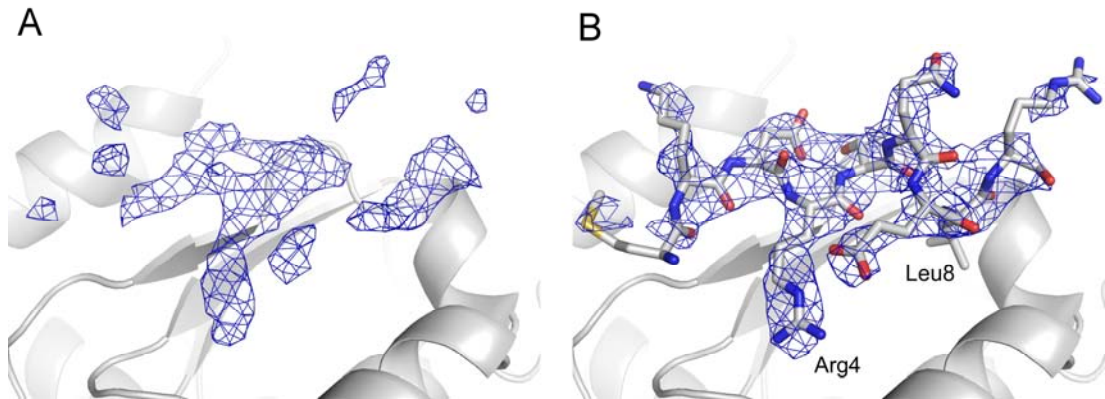


Abb. 3.4: Das N-terminale Peptid von Syntaxin1a ist in der Munc18a/Syntaxin1a-Kristallstruktur vorhanden. Die Elektronendichte des Peptids vor Verfeinerung (A) und nach Verfeinerung (B) mit dem Programm Phenix (Version 2007_08_18_1856) als blaues Gitter konturiert. Mit Hilfe der Programme O (Jones und Kjeldgard, 1997) und Coot (Emsley und Cowton, 2004) war es möglich die Aminosäuren 2 bis 9 vom N-terminalen Syntaxin1a-Peptid in die verfeinerte Elektronendichte einzubauen.

Für die Aminosäuren 10 bis 26 ist keine weitere Elektronendichte vorhanden, so dass man davon ausgehen kann, dass dieser Bereich unstrukturiert ist. Die regulatorische Habc-Domäne, die Linkerregion und das SNARE-Motiv von Syntaxin1a sind im Vergleich zur Originalstruktur unverändert und binden in einer so genannten „geschlossenen“ Konformation gegenüber vom N-terminalen Syntaxin1a-Peptid an der konkaven Oberfläche der Domänen 1 und 3 von Munc18 (Abb. 3.5).

Die Faltung des gebundenen Syntaxin1a-Peptids ist der des Syntaxin4-Peptids in der Munc18c/Syntaxin4-Struktur sehr ähnlich (Abb. 3.6). In beiden Fällen ist ein kurzer, entfalteter Abschnitt, gefolgt von einer kurzen alpha-Helix zu erkennen. Die alpha-Helix wird durch die drei konservierten Aminosäuren Asparaginsäure (D) Arginin (R) und Threonin (T) (DRT-Motiv, Hu et al., 2007) durch intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert. Allerdings fällt auf, dass das N-terminale Syntaxin1a-Peptid nur 4 Wasserstoffbrückenbindungen und ca. 40 van der Waals-Kontakte zu Munc18a ausbildet. Das Syntaxin4-Peptid dagegen bildet 13 Wasserstoffbrückenbindungen und ca. 140 van der Waals-Kontakte zu Munc18c aus

(Abb. 3.6 orange farbene Oberfläche). Das kann zu einem Teil damit erklärt werden, dass es Unterschiede in der Aminosäuresequenz in den Peptid-Bindungsstellen

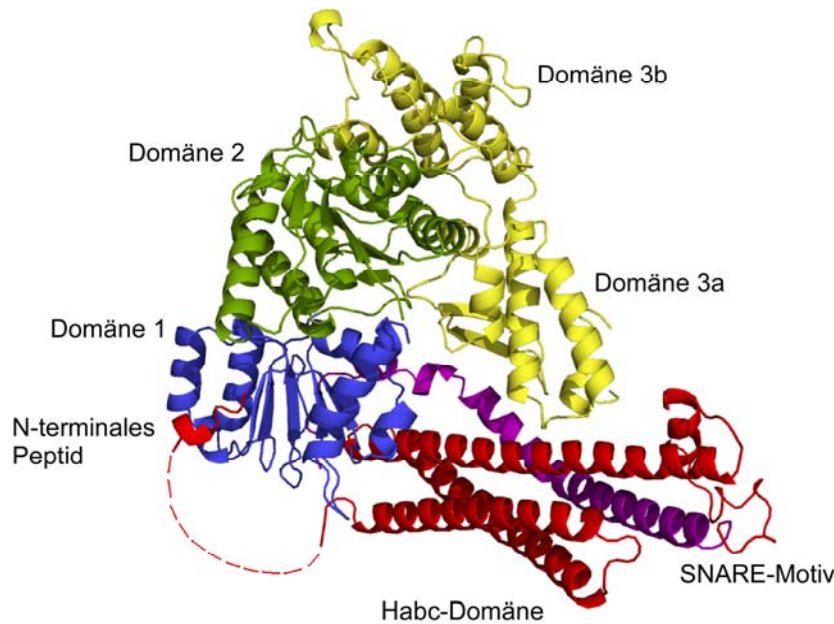


Abb. 3.5: Neue verfeinerte Munc18a/Syntaxin1a-Struktur. Das N-terminale Peptid bindet an die Oberfläche der Domäne 1 von Munc18a, während die Habc-Domäne, die Linkerregion und das SNARE-Motiv von Syntaxin1a an die konkave Oberfläche der Domänen 1 und 3 binden. Die Domänen 1 (blau), 2 (grün) und 3 (gelb) von Munc18a bilden eine hufeisenähnliche Form. Das SNARE-Motiv von Syntaxin1a ist purpurn, die Habc-Domäne und das N-terminale Peptid sind rot dargestellt. Die gestrichelte Linie repräsentiert die Aminosäuren 10 bis 26, für diese Aminosäuren ist keine Elektronendichte sichtbar.

beider Munc18-Homologen gibt. So interagiert zum Beispiel Asparaginsäure³ (Asp³) von Syntaxin⁴ mit den Seitenketten Arginin¹³² (Arg¹³²) und Lysin¹³⁴ (Lys¹³⁴) von Munc18^c. Anstelle dieser Aminosäuren gibt es in Munc18^a zwei Threonine (Thr¹²⁹ und Thr¹³¹). Aufgrund ihrer Position können sie nicht Asp³ von Syntaxin^{1a} binden (Abb. 3.6). Auch die Glutaminsäure (Glu²³³) in Domäne 2 von Munc18^c interagiert mit dem Stickstoffatom der Hauptkette der Asp³. In Munc18^a ist der komplette $\alpha 8$ loop in einer anderen Konformation und somit eine Interaktion mit dem N-terminalen Peptid nicht möglich (Abb. 3.6).

Obwohl Sequenzunterschiede die geringere Anzahl der beobachteten Kontakte zwischen Munc18^a und Syntaxin^{1a} im Vergleich zu Munc18^a und Syntaxin⁴ erklären können, gibt es Kontakte zwischen konservierten Aminosäuren, die deutlich abgeschwächt sind. Beachtenswert ist, dass das Leucin⁸ (Leu⁸) des Syntaxin^{1a}-Peptids nicht sehr gut in die hydrophobe Tasche packt, welche von den hydrophoben

Aminosäuren Phenylalanin115 (Phe115), Valin119 (Val119), Alanin124 (Ala124), Isoleucin127 (Ile127) und Leucin130 (Leu130) in Munc18a gebildet wird. Die Elektronendichte für die Seitenkette von Leu8 ist schwach ausgeprägt (Abb. 3.4B), die Aminosäure könnte demnach in verschiedenen Konformationen vorliegen. Zudem ist das Arginin4 (Arg4) von Syntaxin1a zu weit vom Cystein110 (Cys110) in Munc18a entfernt, um eine Wasserstoffbrücke auszubilden. Hingegen ist diese Wasserstoffbrücke in der Munc18c/Syntaxin4-Struktur gut ausgebildet.

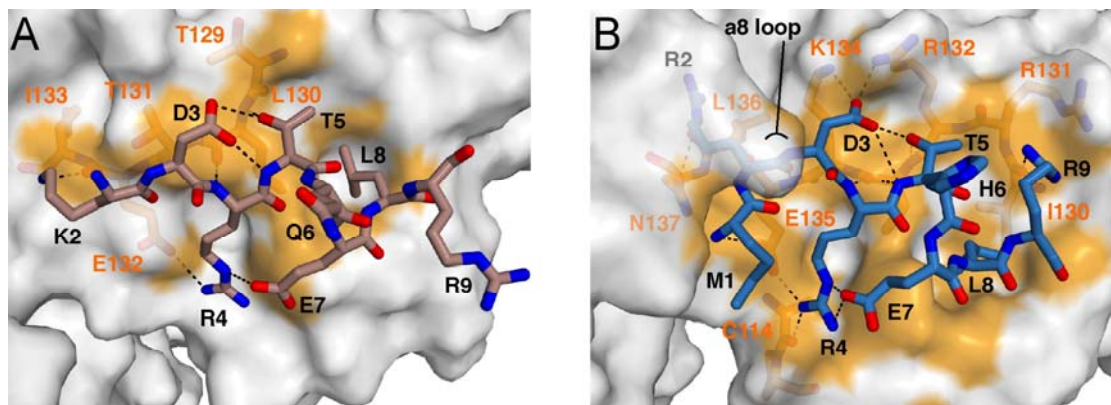


Abb. 3.6: Vergleich der N-terminalen Syntaxin1a-Bindungsstellen bei (A) Munc18a und (B) Munc18c. In beiden Fällen ist das Munc18-Homolog in grau mit Oberflächenrepräsentation dargestellt, wobei die Atome, welche Kontakt zu Syntaxin1a haben, orange dargestellt sind. Aminosäuren, die Wasserstoffbrücken mit Syntaxin bilden, sind unterhalb der Oberfläche von Munc18 zu sehen. Die Wasserstoffbrücken sind als schwarz gestrichelte Linien gezeigt. In (A) ist das Syntaxin1a-Peptid (braun) und in (B) ist das Syntaxin4-Peptid (hellblau) zu sehen. Die Aminosäuren 10 bis 19, welche nur in der Munc18c/Syntaxin4-Struktur beobachtet wurden, sind nicht dargestellt.

Die beobachteten Unterschiede in der Interaktion konservierter Aminosäuren im Munc18a/Syntaxin1a-Komplex und im Munc18c/Syntaxin4-Komplex, veranlassten mich dazu, den Beitrag konservierter Aminosäuren im Syntaxin1a-Peptid zur Gesamtaffinität der Interaktion mittels ITC zu untersuchen (Tab. 2). Dazu wurden verschiedene Alanin-Mutanten im Syntaxin1a-Peptid eingeführt. Die Mutationen von Arg4 (R4A) (Abb. 3.7 und Tab. 2) und Leu8 (L8A) reduzieren die Affinität und die Reaktionsenthalpie deutlich. Die Reaktionsenthalpie beträgt nur noch ca. -27 kcal/mol und die Affinität nur noch ca. 9 nM (Tab. 2). Threonin10 (Thr10) hatte keinen Effekt auf die Bindung. Allerdings verminderte die Mutation von Serin14 (S14A) die Bindung des N-terminalen Peptids ein wenig, obwohl Serin14 nicht in der Kristallstruktur zu sehen ist.

Auch in Munc18a wurden Punktmutationen eingefügt. Die Mutation von Phe115 zu Glutaminsäure (F115E) erfolgte, um die hydrophobe Tasche zu beseitigen, in die das Leu8 von Syntaxin1a bindet. Die Mutation von L130 zu Lysin (L130K) in Munc18a sollte die Ausbildung der Wasserstoffbrücke zum Arginin4 (Arg4) im Syntaxin1a stören. In der Tat sind die Reaktionsenthalpie und die Affinität bei der Titration von Munc18a (F115E) bzw. Munc18a (L130K) zu Syntaxin1a deutlich reduziert (Abb. 3.7 für L130K und Tab. 2). Beide Punktmutationen in Munc18a scheinen die Bindung des Syntaxin1a-Peptids an Munc18a zu verhindern. Diese Ergebnisse verdeutlichen eindrucksvoll, dass die konservierten Aminosäuren Arg4 und Leu8 in Syntaxin1a und Phe115 und Leu130 in Munc18a für die Interaktion des N-terminalen Peptids mit Munc18 verantwortlich sind.

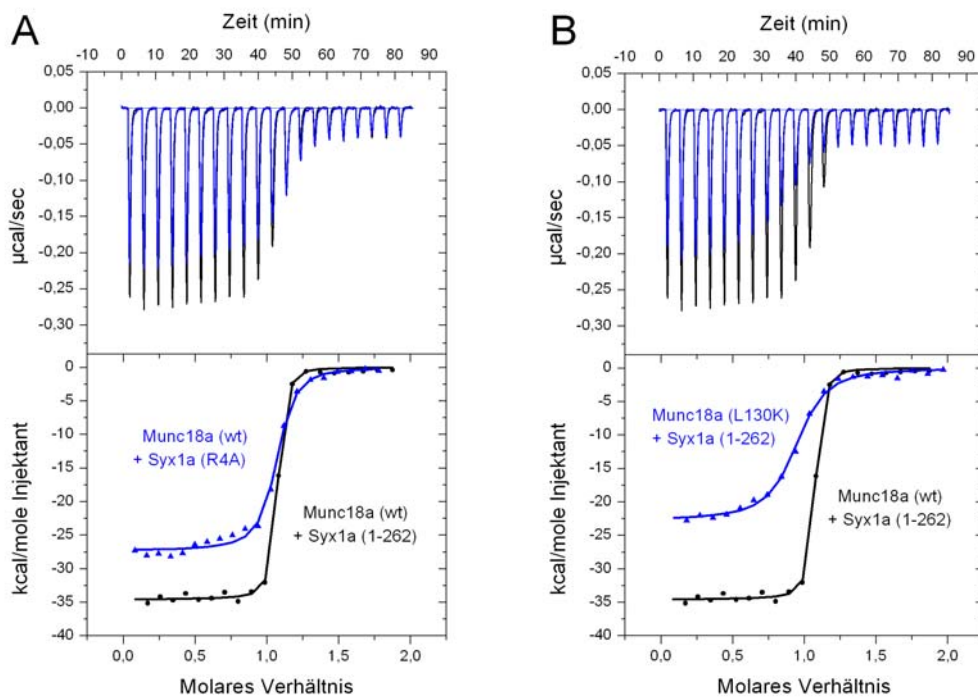
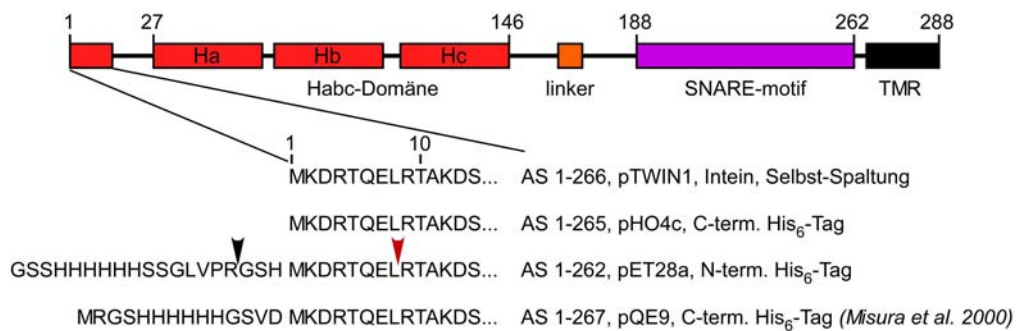


Abb. 3.7: Punktmutationen in Syntaxin1a oder in Munc18a verhindern eine Interaktion des N-terminalen Peptids mit Munc18a. (A) Kalorimetrische Titrations von 20 μM Syntaxin1a (R4A) zu 2.5 μM Munc18a (wt) im Vergleich zu Syntaxin1a (wt). Die Punktmutation im Syntaxin1a-Peptid hat eine Reduktion der Affinität und Reaktionsenthalpie zur Folge. (B) Hier wurden 20 μM Syntaxin1a (wt) zu je 2.5 μM Munc18a (L130K) bzw. Munc18a (wt) titriert. Auch hier hat die Mutation eine Reduktion der Affinität und der Enthalpie im Vergleich zum Wildtyp zur Folge.

Das für die Kristallisation benutzte Syntaxin1a-Konstrukt (pQE9-Vektor) besitzt einen nicht absplätzbaren N-terminalen Polyhistidin-Affinitätstag. Interessanterweise

bindet diese Syntaxin1a-Variante Munc18a mit einer Affinität, die der Affinität eines N-terminal verkürzten Syntaxin1a (AS 25-262) entspricht (Abb. 3.8). Dieser Befund weist daraufhin, dass ein N-terminaler Affinitätstag die Peptidbindung in Lösung inhibieren könnte. Dies könnte erklären, warum bestimmte Kontakte konservierter Aminosäuren zwischen Syntaxin1-Peptid und Munc18a in der Kristallstruktur im Vergleich zur Munc18c/Syntaxin4-Struktur abgeschwächt sind (wie bereits erläutert, ist die Elektronendichte von Leu8 schwach ausgeprägt und das Arg4 von Syntaxin1a zu weit vom Cys110 in Munc18a entfernt, um eine Wasserstoffbrücke zu bilden).



Syntaxin1a-Konstrukt	Kd [nM]	ΔH [kcal/mol]	n
pTWIN1*	2.7 ± 0.6	-32.2 ± 0.2	0.99
pHO4c	1.7 ± 1.2	-35.2 ± 0.2	1.06
pET28a	1.4 ± 0.3	-34.6 ± 0.2	1.03
pQE9*	10.0 ± 0.5	-22.1 ± 0.2	1.01

Abb. 3.8: Ein intaktes N-terminales Syntaxin1a-Peptid ist nötig für die Bindung an Munc18a. Schematische Darstellung des Affinitätstags und des N-terminalen Peptids der verschiedenen, in dieser Arbeit verwendeten Syntaxin1a-Konstrukte. Die eigentliche Thrombin-Schnittstelle ist mit einem schwarzen Pfeil dargestellt, die zusätzliche Thrombin-Schnittstelle ist mit einem roten Pfeil markiert. Die Ergebnisse der ITC-Experimente sind darunter tabellarisch gezeigt. Die in der Kristallstruktur verwendete Syntaxin1a-Variante zeigt die geringste Affinität und Reaktionsenthalpie der verschiedenen Syntaxin1a-Varianten. Die mit einem Stern gekennzeichneten Messungen wurden von Douglas A. Hattendorf (Stanford University, Kalifornien, USA) durchgeführt.

Des Weiteren habe ich während meiner Experimente herausgefunden, dass Thrombin, eine Protease die im Labor standardmäßig genutzt wird, um spezifisch den Polyhistidin-Affinitätstag zu entfernen, zusätzlich die ersten 8 Aminosäuren von Syntaxin1a entfernt (N-terminale Sequenzierung wurde in Zusammenarbeit mit F. Lottspeich, U. Pleßmann und H. Urlaub durchgeführt). Die reduzierte Affinität und Reaktionsenthalpie zeigt, dass das N-terminale Peptid dieses Syntaxin1a-Fragments

nicht mehr in der Lage ist Munc18a zu binden (Abb. 3.8). Deshalb musste ich viele meiner ITC-Experimente wiederholen und habe nachfolgend immer die ungeschnittene Syntaxin1a-Variante (pET28a-Vektor) benutzt.

Eine Syntaxin1a-Variante mit einem C-terminalen Polyhistidin-Affinitätstag (pHO4c-Vektor) kann Munc18a mit der gleichen Affinität und Reaktionsenthalpie binden, wie die ungeschnittene Syntaxin1a-Variante (Abb. 3.8). Allerdings zeigte dieses Konstrukt die Tendenz zu aggregieren und wurde deshalb nicht für weitere Experimente benutzt. Um mögliche Artefakte von Affinitätstags auszuschließen, wurde von Douglas Hattendorf (Stanford University) Syntaxin1a zusätzlich in einen Intein Vektor kloniert (pTWIN1). In diesem Konstrukt befinden sich am C-terminalen Ende von Syntaxin1a eine chitinbindene Domäne und ein selbstspaltendes Intein. Die Reinigung des Fusionsproteins erfolgt mittels Affinitätschromatographie an Chitin. Das Intein unterliegt in Gegenwart von Thiolreagenzien (z.B. DTT) einer Selbstspaltung an seinem N-terminalen Cysteinrest. Als Endprodukt erhält man Syntaxin1a, das weder am N-Terminus noch am C-Terminus einen Affinitätstag trägt. Dieses Syntaxin1a besitzt die gleiche Affinität und Reaktionsenthalpie wie das ungeschnittene Syntaxin1a im pET28a-Vektor (Abb. 3.8). Der N-terminale Polyhistidin-Affinitätstag von Syntaxin1a im pET28a-Vektor scheint demnach die Interaktion des N-terminalen Peptids mit Munc18a nicht zu stören.

Der Effekt des N-terminalen Affinitätstags zeigt, dass für die detaillierte Beschreibung der Interaktion des N-terminalen Peptids mit Munc18a die Kristallisation eines Syntaxin1a-Konstrukts mit intaktem N-Terminus nötig sein könnte. Allerdings zeigen die kristallographischen Daten klar, dass das N-terminale Peptid an die Oberfläche der Domäne 1 von Munc18a bindet und zwar in der gleichen Weise, wie das schon für andere SM-Protein/Syntaxin-Paare (i.e. Munc18c/Syntaxin4 und Sly1p/Sed5p) gezeigt wurde.

Vor kurzem wurde mittels GST-Bindungsstudien und NMR-Spektroskopie gezeigt, dass Munc18a auch den assemblierten ternären SNARE-Komplex binden kann (Dulubova et al., 2007, Shen et al., 2007). In diesen Studien ist allerdings nicht eindeutig geklärt worden, welche Regionen des ternären SNARE-Komplexes zu dieser Interaktion beitragen. Meine ITC-Experimente zeigen keine detektierbare Interaktion zwischen Munc18a und dem SNARE-Komplex mit N-terminal verkürztem Syntaxin1a (AS 25-262). Dagegen bindet Munc18a den SNARE-Komplex mit Syntaxin1a (AS 1-262), wenn auch mit einer eher geringen Affinität

($K_d = 720 \text{ nM}$, Tab. 2). Interessanterweise sind die Affinität und die Reaktionsenthalpie der Interaktion von Munc18a und SNARE-Komplex in etwa identisch mit der von Munc18a und isolierter Habc-Domäne von Syntaxin1a (AS 1-179) (Tab. 2). Das deutet daraufhin, dass das N-terminale Peptid und die Habc-Domäne von Syntaxin1a die Bindung von Munc18a an den SNARE-Komplex vermitteln. Das Vier-Helix-Bündel des SNARE-Komplexes scheint demnach keinen signifikanten Beitrag zu leisten.

3.1.3 Für eine hochaffine Interaktion mit Vps45 sind das N-terminale Peptid und die „geschlossene“ Konformation von Syntaxin16 entscheidend

Wie in den Kapiteln zuvor beschrieben, bindet Munc18a gleichzeitig das N-terminale Peptid und die „geschlossene“ Konformation von Syntaxin1a. Dieser Befund veranlasste mich, die Interaktion von Vps45 und Syntaxin16 genauer zu untersuchen. Vps45 gehört zur SM-Proteinfamilie und ist an der Membranfusion von frühen Endosomen beteiligt. Vps45 bindet Syntaxin16, ein SNARE-Protein, welches ebenfalls an der Fusion von frühen Endosomen beteiligt ist (Übersicht in Jahn und Scheller, 2006). Der Domänenaufbau von Syntaxin16 gleicht dem von Syntaxin1a (Dulubova et al., 2002). Vor der Habc-Domäne befindet sich ein unstrukturierter Bereich von etwa 50 Aminosäuren. Mittels einer GST-Bindungsstudie konnte gezeigt werden, dass dieser Bereich für die Interaktion mit Vps45 wichtig ist (Dulubova et al., 2002). Allerdings geht aus dieser Studie nicht hervor, ob weitere Bereiche von Syntaxin16 an der Bindung zu Vps45 teilnehmen.

Um zu ermitteln, ob andere Bereiche von Syntaxin16 mit Vps45 interagieren, wurde die Vps45/Syntaxin16-Interaktion mittels ITC von mir näher untersucht. Das isolierte N-terminale Syntaxin16-Peptid (AS 1-27) bindet Vps45 mit einer K_d von 27 nM und einer Reaktionsenthalpie von -11.6 kcal/mol (Abb. 3.9, blaue Graphen). Sehr ähnliche thermodynamische Parameter wurden gemessen, wenn eine längere Syntaxin16-Variante (AS 1-183) eingesetzt wurde, welches die Habc-Domäne umfasst (Tab. 3). Als nächstes wurde die gesamte zytosolische Domäne von Syntaxin16 zu Vps45 titriert. Erstaunlicherweise bindet Syntaxin16 mit einer deutlich höheren Affinität ($K_d \approx 1 \text{ nM}$) und Reaktionsenthalpie ($\Delta H = -23.8 \text{ kcal/mol}$, Abb. 3.9, schwarze Graphen). Das deutet daraufhin, dass auch der restliche Teil des Syntaxin16-Moleküls zur Bindung beiträgt. Keine Bindung zwischen Vps45 und

Syntaxin16 ist zu beobachten, wenn ein N-terminal verkürztes Syntaxin16-Konstrukt verwendet wurde (Tab. 3). Folglich scheint es, dass das N-terminale Peptid und der verbleibende Rest des Syntaxin16-Moleküls die hochaffine Interaktion zu Vps45 vermitteln, allerdings mit unterschiedlichen energetischen Beiträgen im Vergleich zur Munc18a/Syntaxin1a-Interaktion.

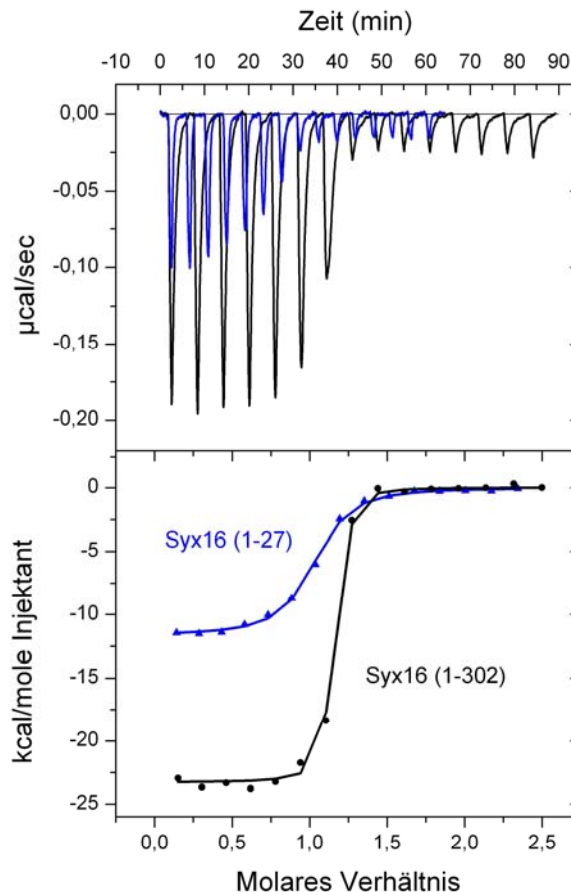


Abb. 3.9: Das N-terminale Peptid und die „geschlossene“ Konformation von Syntaxin16 sind an der Bindung zu Vps45 beteiligt. Kalorimetrische Titrations von je 29 μM Syntaxin16 (AS 1-27 und AS 1-302) zu 2.5 μM Vps45 (oben). Die bei der Reaktion freiwerdende Wärme ist proportional zur Fläche unter jeden Peak. Die pro mol injizierte Syntaxin16 freiwerdende Wärme wurde gegen das molare Verhältnis von Syntaxin16 und Vps45 aufgetragen (unten). Die Linien repräsentieren die beste Anpassung nach Nutzung des *single site*-Bindungsmodells.

In der oben erwähnten GST-Bindungsstudie ist weiterhin gezeigt worden, dass die Punktmutation F10A die Bindung von Syntaxin16 an Vps45 verhindert (Dulubova et al., 2002). In Anbetracht meiner bisherigen Ergebnisse, habe ich mich entschieden, die Interaktion dieser Syntaxin16-Mutante mit Vps45 noch einmal genauer anzuschauen. Mittels ITC stellte sich interessanterweise heraus, dass die Syntaxin16

F10A-Mutante an Vps45 bindet, allerdings mit geringerer Affinität ($K_d \approx 117\text{nM}$, Tab. 3). Wenn dieselbe Mutation in das isolierte N-terminale Peptid von Syntaxin16 eingeführt wurde (AS 1-27 F10A), konnte es Vps45 nicht mehr binden (Tab. 3). Ähnlich wie im Munc18a/Syntaxin1a-Komplex kooperieren für eine hochaffine Bindung an Vps45 das N-terminale Peptid und der verbleibende Rest des Syntaxin16-Moleküls.

Um zu testen, ob Syntaxin16 eine ähnliche Konformation wie Syntaxin1a im Komplex mit dem SM-Protein einnimmt, habe ich die Bindung von C-terminal verkürzten Syntaxin16-Konstrukten untersucht. Diesen Konstrukten fehlten Teile des SNARE-Motivs. Syntaxin16 (AS 1-279), welches Syntaxin1a (AS 1-240) entspricht, bindet mit einer Affinität von ca. 1 nM an Vps45 (Tab. 3). Ein noch kürzeres Fragment, Syntaxin16 (AS 1-265), welches Syntaxin1a (AS 1-226) entspricht, interagiert mit Vps45 mit einer reduzierten Affinität von 12 nM (Tab. 3). Das deutet auf eine Interaktion zwischen dem C-terminalen SNARE-Motiv von Syntaxin16 und Vps45 hin, ähnlich wie auch das C-terminale SNARE-Motiv von Syntaxin1a entscheidend für die Bindung an Munc18a ist. Die einfachste Erklärung für diese Daten ist, dass Syntaxin16 eine geschlossene Konformation eingehen kann, die von Vps45 gebunden wird. Meine Experimente deuten demnach darauf hin, dass Munc18a/Syntaxin1a und Vps45/Syntaxin16 über einen konservierten Bindungsmechanismus interagieren. So scheint es, dass die beiden Bindungsstellen, das N-terminale Peptid und als auch das SNARE-Motiv des jeweiligen Syntaxins bei der Bindung an Munc18a bzw. Vps45 kooperieren.

Tab. 3: Thermodynamische Parameter der Interaktion von Syntaxin16 und Vps45 gemessen mit ITC bei 25 °C. Syntaxin16 ist mit Syx16 abgekürzt, die Zahlen in Klammern geben den Sequenzbereich der verwendeten Konstrukte an.

Interaktion von	K_d [nM]	ΔH [kcal/mol]	n
Syx16 (1-302) / Vps45	2.1 ± 1.2	-23.8 ± 0.2	1.09
Syx16 (1-279) / Vps45	0.85 ± 0.3	-26.3 ± 0.1	0.96
Syx16 (1-265) / Vps45	11.7 ± 3.6	-13.8 ± 0.2	1.07
Syx16 (1-183) / Vps45	32.5 ± 0.3	-12.0 ± 0.1	0.93
Syx16 (1-27) / Vps45	26.9 ± 0.3	-11.6 ± 0.1	0.95
Syx16 (1-27) ^{F10A} / Vps45	–	–	–
Syx16 (1-302) ^{F10A} / Vps45	116.6 ± 16.5	-15.6 ± 0.5	0.85
Syx16 (28-302) / Vps45	–	–	–

3.2 Die Rolle von Munc18a bei der SNARE-Komplexbildung

3.2.1 Munc18a hemmt die SNARE-Komplexbildung *in vitro*

Der Widerspruch, dass Munc18a die SNARE-Komplexbildung *in vitro* verhindert (Pevsner et al., 1994b), Munc18a für die Sekretion von Neurotransmittern allerdings absolut notwendig ist (Verhage et al., 2000), veranlasste mich auch die Rolle von Munc18a bei der SNARE-Komplexbildung nochmals genauer zu untersuchen. Mit Hilfe einer fluoreszenzspektroskopischen Methode habe ich untersucht, welchen Einfluss Munc18a auf die SNARE-Komplexbildung *in vitro* hat, um eine wichtige, aber noch immer unbeantwortete Frage zu beantworten: Wie kann sich Syntaxin1a aus der festen Umklammerung von Munc18a befreien?

Um den Einfluss von Munc18a auf die neuronale SNARE-Komplexbildung zu untersuchen, machte ich mir zunutze, dass die SNARE-Proteine einen SDS-resistenten SNARE-Komplex bilden (Hayashi et al., 1994). Der SNARE-Komplex ist in einem SDS-Polyacrylamidgel als Einzelbande zu beobachten, wenn die Probe nicht vorher erhitzt wird. Als erstes wurde mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiertes Synaptobrevin2 mit Syntaxin1a (AS 1-262) und SNAP-25 vermischt. Es bildete sich ein SDS-resistenter SNARE-Komplex, der fluoreszierendes Synaptobrevin enthält (Abb. 3.10A). Danach wurden Munc18a und Syntaxin1a in einem äquimolaren Verhältnis für 5 min bei RT inkubiert. Der nun ausgebildete Munc18a/Syntaxin1a-Komplex wurde anschließend mit Synaptobrevin2 und SNAP-25 vermischt. In diesem Experiment bildete sich kein SDS-resistenter SNARE-Komplex aus (Abb. 3.10A). Demnach bindet Munc18a Syntaxin1a und verhindert dadurch die SNARE-Komplexbildung.

Um den Einfluss von Munc18a auf die SNARE-Komplexbildung zeitlich besser verfolgen zu können, habe ich die SNARE-Komplexbildung mittels Fluoreszenz-Anisotropie verfolgt. Dazu wurde wieder das mit Fluoreszenzfarbstoff markierte Synaptobrevin2 mit den beiden SNARE-Partnern Syntaxin1a und SNAP-25 gemischt und die Änderung der Anisotropie verfolgt. Die ternäre SNARE-Komplexbildung geht mit einem deutlichen Anisotropie-Anstieg einher (Abb. 3.10B, schwarze Kurve). Um den Einfluss von Munc18a auf die SNARE-Komplexbildung messen zu können, wurden markiertes Synaptobrevin2, Munc18a und Syntaxin1a in gemischt, und die Reaktion durch Zugabe von SNAP-25 gestartet. Ein deutlich langsamerer Anstieg der Anisotropie war zu verzeichnen (Abb. 3.10B, graue Kurve).

Die Experimente zeigen (Abb. 3.10A+B), dass durch die Anwesenheit von Munc18a die SNARE-Komplexbildung nahezu blockiert ist.

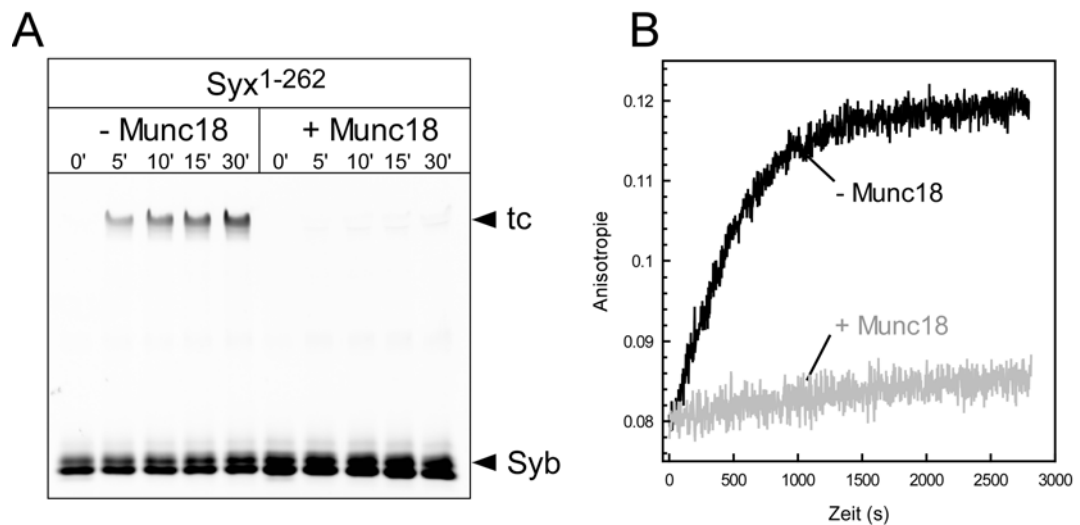


Abb. 3.10: Munc18a inhibiert die SNARE-Komplexbildung. (A) Die Bildung von SNARE-Komplexen in Ab- und Anwesenheit von Munc18a wurde anhand der Formation von SDS-resistenten Komplexen mit Synaptobrevin2 markiert mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa488 an Position 79, Syntaxin1a (AS 1-262) und SNAP-25 untersucht. In Anwesenheit von Munc18a ist die SNARE-Komplexbildung blockiert (tc = ternärer Komplex). (B) Die ternäre SNARE-Komplexbildung wurde mittels Fluoreszenz-Anisotropie verfolgt. 40 nM mit Alexa488 an Position 79 markiertes Synaptobrevin2 wurde mit 500 nM Syntaxin1a und 750 nM SNAP-25 vermischt. Munc18a (750 nM) inhibiert auch hier die ternäre SNARE-Komplexbildung.

3.2.2 Entfernt man das N-terminale Peptid von Syntaxin1a, ist Munc18 nicht mehr in der Lage die SNARE-Komplexbildung zu unterbinden

Wie in Kapitel 3.1.1 gezeigt, sind für die Bindung von Syntaxin1a an Munc18a das N-terminale Peptid und die „geschlossene“ Konformation von Syntaxin1a wichtig. Um die funktionale Rolle des N-terminalen Peptids von Syntaxin1a bei der SNARE-Komplexbildung zu verstehen, wurde die oben beschriebenen Experimente mit dem N-terminal verkürzten Syntaxin1a (AS 25-262) wiederholt. Überraschenderweise stellte sich heraus, dass das N-terminal verkürzte Syntaxin1a (AS 25-262) auch in Anwesenheit von Munc18a einen SDS-resistenten SNARE-Komplex bilden kann (Abb. 3.11A). Dieses Ergebnis ist sehr interessant, zeigt es doch, dass Munc18a in diesem Experiment die SNARE-Komplexbildung nicht blockiert. Die SDS-resistente SNARE-Komplexbande erscheint ein wenig schwächer in Anwesenheit von Munc18a (Abb. 3.11A). Das könnte daran liegen, dass die Banden von Munc18a und

SDS-resistenten SNARE-Komplex bei gleichem apparentem Gewicht laufen und das Munc18a mit der Intensität der fluoreszierenden SNARE-Komplexbande interferiert.

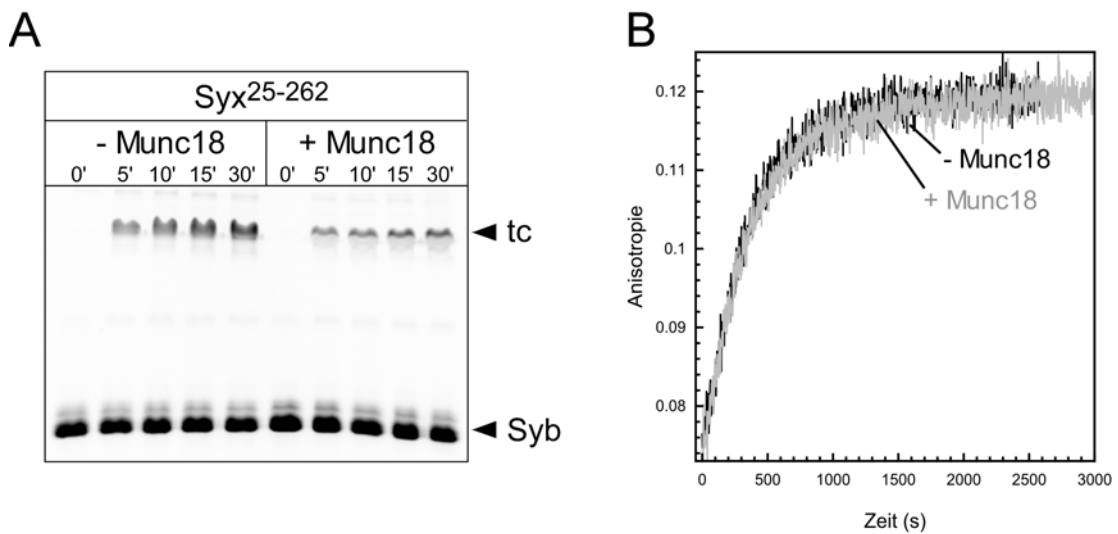


Abb. 3.11: Die Rolle des N-terminalen Peptids bei der SNARE-Komplexbildung. (A) Die Bildung von SNARE-Komplexen mit markiertem Synaptobrevin2, SNAP-25 und mit dem N-terminal verkürzten Syntaxin1a (AS 25-262) wurde in Ab- und Anwesenheit von Munc18a untersucht. Eine klare SDS-resistente Bande war auch bei Anwesenheit von Munc18a zu beobachten (tc = ternärer Komplex). (B) Die ternäre SNARE-Komplexbildung wurde mittels Fluoreszenz-Anisotropie verfolgt. Dazu wurden zu 40 nM mit Alexa488 an Position 79 markiertes Synaptobrevin2 mit 500 nM Syntaxin1a (AS 25-262) und 750 nM SNAP-25 vermischt. Munc18a (750 nM) ist nicht in der Lage, die ternäre SNARE-Komplexbildung zu blockieren. Die SNARE-Komplexbildung verläuft mit ähnlicher Geschwindigkeit, wie in Abwesenheit von Munc18a.

Für eine bessere zeitliche Auflösung, wurde die ternäre SNARE-Komplexbildung des N-terminal verkürzten Syntaxin1a (AS 25-262) in Abwesenheit und Gegenwart von Munc18a wiederum mittels Fluoreszenz-Anisotropie untersucht (Abb. 3.11B). Dieser Ansatz bestätigte, dass Munc18a nicht mehr in der Lage ist, die ternäre SNARE-Komplexbildung zu blockieren. Die Rate der SNARE-Komplexbildung verläuft mit ähnlicher Geschwindigkeit, wie in Abwesenheit von Munc18a (Abb. 3.11B).

Der binäre Komplex aus Syntaxin1a und SNAP-25 gilt als Intermediat der ternären SNARE-Komplexbildung (Fasshauer et al., 2004). Der Einfluss von Munc18a auf die binäre Interaktion von Syntaxin1a und SNAP-25 wurde von mir genauer untersucht. Der binäre SNARE-Komplex ist nicht SDS-resistent, es ist aber möglich,

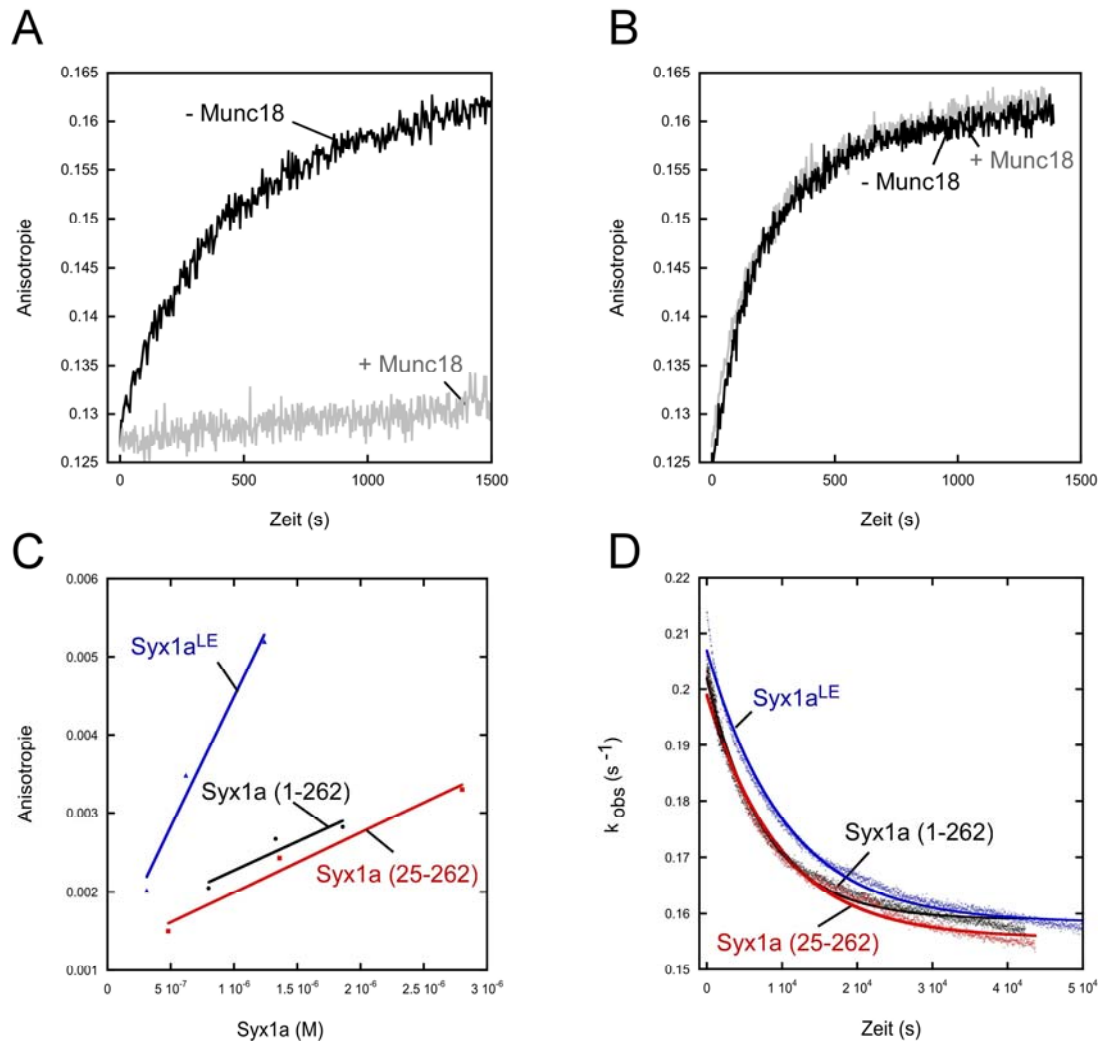


Abb. 3.12: Die Rolle des N-terminalen Peptids bei der binären SNARE-Interaktion. (A) und (B) Die Bindung von Syntaxin1a an Position 84 mit TexasRed markiertes SNAP-25 wurde mittels Fluoreszenz-Anisotropie untersucht. Munc18a verhindert die Bindung von Syntaxin1a (AS 1-262) an SNAP-25, nicht aber die Interaktion von Syntaxin1a (AS 25-262) an SNAP-25. (C) Bestimmung der Assoziationskonstanten für die binäre Interaktion von verschiedenen Syntaxin1a-Varianten und SNAP-25. Für jeden einzelnen Datenpunkt, wurde 80 nM an Position 130 mit TexasRed markiertes SNAP-25 mit verschiedenen Mengen an Syntaxin1a-Varianten gemischt. Die Zeitkonstanten der einzelnen Reaktionen wurden gegen die jeweilige Syntaxin1a-Konzentration aufgetragen und die Bindungsgeschwindigkeit als Anstieg der linearen Auftragung bestimmt. Sie betragen für Syx1a (AS 1-262) $\approx 730 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ schwarze Kurve; Syx1a (AS 25-262) $\approx 760 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ rote Kurve und Syx^{L165A, E166A} $\approx 3320 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ blaue Kurve. Syx^{L165A, E166A} bindet schneller an SNAP-25 als Syx1a (AS 1-262), aber langsamer als das isolierte SNARE-Motiv, was daraufhin deutet, dass nicht alle Syx1a^{LE}-Moleküle in einer komplett „offenen“ Konformation vorliegen. (D) Bestimmung der Dissoziationskonstanten des Syntaxin1a/SNAP-25-Komplexes. Ein Überschuss an SNAP-25 ($5 \mu\text{M}$) wurde jeweils zu einem Mix aus 80 nM markiertem SNAP-25 und der Syntaxin1a-Variante gegeben. Die Dissoziationsraten wurden mit einem „single exponential fit“ angepasst: alle drei Syntaxin1a-Varianten besitzen eine Dissoziationskonstante von $\approx 0.0001 \text{ s}^{-1}$. Syntaxin1a und SNAP-25 liegen in Lösung hauptsächlich als 2:1-Komplex vor. Eine etwas bessere Anpassung konnte durch einen „double exponential fit“ erreicht werden (Daten nicht gezeigt).

die Bildung des binären SNARE-Komplexes mittels Fluoreszenz-Anisotropie zu verfolgen. Dazu wurde ein mit Fluoreszenzfarbstoff markiertes SNAP-25 mit Syntaxin1a vermischt. Der deutliche Anisotropie-Anstieg erlaubte es, die binäre SNARE-Interaktion zu verfolgen (Abb. 3.12A, schwarze Kurve). Ein deutlich langsamer Anstieg der Anisotropie war zu beobachten, wenn das Experiment in Anwesenheit von Munc18a wiederholt wurde (Abb. 3.12A, graue Kurve). Daraus lässt sich schließen, dass Munc18a die Bindung von Syntaxin1a (AS 1-262) an markiertes SNAP-25 inhibiert. In einem weiteren Experiment habe ich getestet, ob das N-terminal verkürzte Syntaxin1a (AS 25-262) in Anwesenheit von Munc18a SNAP-25 binden kann. Bemerkenswert ist, dass die Bindung des N-terminal verkürzten Syntaxin1a (AS 25-262) an SNAP-25 in Anwesenheit von Munc18a nicht blockiert ist (Abb.3.12B, graue Kurve). Die binäre SNARE-Interaktion verläuft mit ähnlicher Geschwindigkeit, wie in Abwesenheit von Munc18a. Die Ergebnisse zeigen eindrucksvoll, dass Munc18a die binäre SNARE-Komplexbildung regulieren kann.

Der Effekt des N-terminalen Syntaxin1a-Peptids auf die SNARE-Komplexbildung wurde von mir durch gezielte Punktmutationen getestet. Dazu wurden Syntaxin1a-Varianten getestet, welche je eine Punktmutation im N-terminalen Peptid tragen. Der Effekt einzelner Punktmutationen im Syntaxin1a-Peptid auf die Bindung an Munc18a wurde von mir bereits in Kapitel 3.1.2 beschrieben. Es zeigte sich, dass Syntaxin1a (T10A) die ternäre SNARE-Komplexbildung in Anwesenheit von Munc18a blockiert. Wie zuvor erläutert, hat Syntaxin1a (T10A) keinen messbaren Effekt auf die Bindung an Munc18a (Tab. 2). Die Punktmutation T10A scheint demnach die Interaktion vom N-terminalen Peptid mit Munc18a nicht zu behindern. Die SNARE-Komplexbildung ist demnach weiterhin blockiert. Syntaxin1a (R4A) und (L8A) blockieren die SNARE-Komplexbildung in Anwesenheit von Munc18a mit einer deutlich geringeren Effizienz als Syntaxin1a (wt) (Abb. 3.12A für Syntaxin1a (R4A), rote Kurve). Die Punktmutationen R4A und L8A in Syntaxin1a haben einen deutlich messbaren Effekt auf die Bindung an Munc18a (Tab. 2). Beide Syntaxin1a-Varianten (i.e. R4A und L8A) haben eine geringere Affinität und auch Reaktionsenthalpie als Syntaxin1a (wt) (Tab. 2). Die Punktmutationen R4A und L8A scheinen demnach die Interaktion vom N-terminalen Peptid mit Munc18a zu stören und sehr wahrscheinlich ist deswegen die Formation des SNARE-Komplexes ermöglicht.

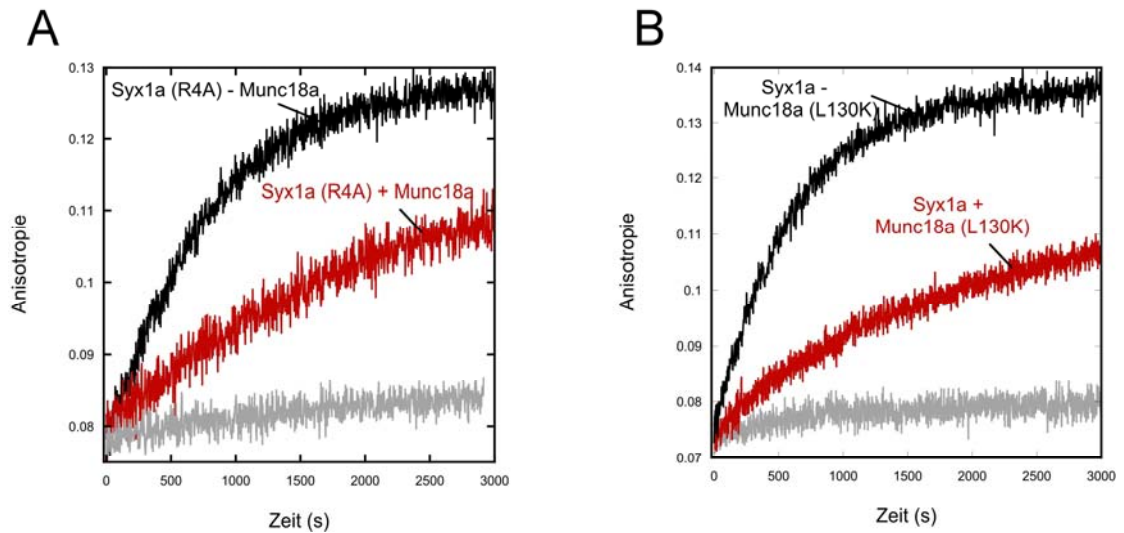


Abb. 3.13: Der Effekt von Punktmutationen in Syntaxin1a und Munc18a auf die SNARE-Komplexbildung. Die Formation des ternären SNARE-Komplexes wurde durch den Anstieg der Anisotropie von Synaptobrevin2 markiert mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa488 verfolgt. **(A)** In Anwesenheit von Syntaxin1a (R4A) inhibiert Munc18a die SNARE-Komplexbildung nur teilweise (rote Kurve). Die schwarze Kurve zeigt die SNARE-Komplexbildung von Syntaxin1a (R4A), SNAP-25 und Synaptobrevin2 in Abwesenheit von Munc18a. **(B)** Auch Munc18a (L130K) verhindert die Formation des SNARE-Komplexes nur teilweise (rote Kurve). Die schwarze Kurve zeigt die SNARE-Komplexbildung in Abwesenheit von Munc18a (L130K). Die grauen Kurven in (A) und (B) zeigen die Formation des SNARE-Komplexes in Anwesenheit von Syntaxin1a (wt) und Munc18a (wt).

Auch der Effekt von in Munc18a eingeführten Mutationen (i.e. F115E und L130K) auf die SNARE-Komplexbildung wurde von mir untersucht. Die Mutationen befinden sich auf der Oberfläche der Domäne1 von Munc18a und haben, wie zuvor in Kapitel 3.1.2 beschrieben, einen deutlichen Effekt auf die Bindung des N-terminale Peptids. Die Affinitäten, die Reaktionsenthalpien (Tab. 2) und die Geschwindigkeitskonstanten (F115E: $k_{\text{on}} = 5.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{off}} = 0.0084 \text{ s}^{-1}$ und L130K: $k_{\text{on}} = 5.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{off}} = 0.0094 \text{ s}^{-1}$) der Interaktion von Munc18a (F115E) bzw. Munc18a (L130K) und Syntaxin1a sind vergleichbar mit denen der Interaktion von Munc18a (wt) und dem N-terminal verkürztem Syntaxin1a (AS 25-262). Zuvor konnte ich zeigen, dass Munc18a die SNARE-Komplexbildung von Syntaxin1a (AS 25-262) nicht blockiert, während die von Syntaxin1a (AS 1-262) blockiert ist. Das deutet daraufhin, dass die Interaktion von Munc18a mit dem N-terminalen Peptid nötig ist, um die SNARE-Komplexbildung unterbinden zu können. Da beide Munc18a-Mutanten das N-terminale Peptid von Syntaxin1a weniger effektiv binden können als Munc18a (wt), war zu erwarten, dass sie die SNARE-Komplexbildung

von Syntaxin1a (wt) weniger effektiv unterbinden können. Und in der Tat, die beiden Munc18a-Mutanten F115E und L130K erlauben die Bildung des SNARE-Komplexes (Abb. 3.12B für Munc18a (L130K), rote Kurve).

Das bedeutet, dass wenn das N-terminale Syntaxin1a-Peptid von Munc18a gelöst wird oder aber gezielt Punktmutationen in Syntaxin1a oder in die Peptidbindungsstelle von Munc18a eingeführt werden, die Inhibition der SNARE-Komplexbildung aufgehoben wird. Wie im Kapitel 3.1.1 gezeigt, bindet Syntaxin1a (AS 25-262) Munc18a sehr affin. Trotzdem kann Munc18a nicht die SNARE-Komplexbildung blockieren (Abb. 3.11 und 3.12). Interessanterweise verläuft die SNARE-Komplexbildung genauso schnell wie in Abwesenheit von Munc18a. Das deutet daraufhin, dass Munc18a und Syntaxin1a nicht zuvor dissoziieren müssen. Ich habe die Bindungsraten der Interaktion von Munc18a und Syntaxin1a und die der Interaktion von Syntaxin1a und SNAP-25 bestimmt, um ein besseres Verständnis der zugrunde liegenden Vorgänge zu erhalten. Dabei zeigte sich, dass beide Syntaxin1a-Varianten (AS 1-262 und AS 25-262) Munc18a 10 000x schneller als SNAP-25 binden (Abb. 3.3 und Abb. 3.12C: $\approx 5.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ im Vergleich zu $\approx 8.0 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Die Dissoziation des Munc18a/Syntaxin1a (AS 1-262)-Komplexes ist sehr langsam ($t_{1/2} = 15 \text{ min}$, Abb. 3.3B schwarze Kurve). Im Einklang mit einer etwas reduzierten Affinität der Munc18a/Syntaxin1a (AS 25-262)-Interaktion, dissoziiert das N-terminal verkürzte Syntaxin1a etwa sechsmal schneller von Munc18a ($t_{1/2} = 2.5 \text{ min}$, Abb. 3.3B blaue Kurve). Der Unterschied in den Assoziationsraten von Syntaxin1a und Munc18a im Vergleich zu Syntaxin1a und SNAP-25 legt nahe, dass Syntaxin1a nicht dissoziieren kann, bevor es mit SNAP-25 interagiert. Legt man die Kristallstruktur zugrunde, sollte die SNAP-25-Bindung an den Munc18a/Syntaxin1a-Komplex nicht ohne weiteres möglich sein, da das SNARE-Motiv von Syntaxin1a im Komplex nicht frei zugänglich ist (Misura et al., 2000). Denkbar wäre eine Konformationsänderung im Munc18a/Syntaxin1a-Komplex, die durch das N-terminale Peptid von Syntaxin1a reguliert wird. Das N-terminale Peptid könnte die Konformation des Munc18a/Syntaxin1a-Komplexes so beeinflussen, dass bei Abwesenheit des N-terminalen Peptids, das SNARE-Motiv von Syntaxin1a durch SNAP-25 gebunden werden kann.

3.2.3 Munc18a bindet eine „offene“ Syntaxin1a-Mutante mit hoher Affinität, blockiert aber die SNARE-Komplexbildung nicht

Untersuchungen in denen nur die SNARE-Komplex-bildenden Regionen von Syntaxin1a und SNAP-25 verwendet wurden, legen nahe, dass die Interaktion von Syntaxin1a und SNAP-25 am N-Terminus der jeweiligen SNARE-Helizes beginnt (Fasshauer et al., 2004). Im Munc18a/Syntaxin1a-Komplex ist dieser Syntaxin1a-Abschnitt Teil der geschlossenen Konformation und für SNAP-25 nicht zugänglich. Das N-terminale Peptid von Syntaxin1a bindet dagegen an die gegenüberliegende Oberfläche der Domäne 1 von Munc18a. Das N-terminale Peptid und der N-Terminus des SNARE-Motivs sind demnach durch ca. 30 Å voneinander entfernt. Wie könnte das N-terminale Peptid in dieser Position die SNARE-Komplexbildung überhaupt beeinflussen? Eine so genannte „offene“ Syntaxin1a-Mutante könnte dafür eine Erklärung liefern. Die Linkerregion zwischen der Habc-Domäne und dem SNARE-Motiv, der Bereich zwischen den Aminosäuren 155 bis 185, enthält eine kurze alpha-Helix (Aminosäuren 161 bis 170, die Abb. 1.2 zeigt die Domänenstruktur von Syntaxin1a). Im Komplex mit Munc18a bildet diese alpha-Helix intramolekulare Kontakte mit Aminosäuren der Habc-Domäne und dem SNARE-Motiv aus (Abb. 3.13C) und scheint so die „geschlossene“ Konformation von Syntaxin1a zu stabilisieren (Misura et al., 2000). Außerdem liegt die Glutaminsäure166 (Glu166) von Syntaxin1a in der Nähe einer elektrostatisch positiven Region der Domäne 3a von Munc18a. Es wurde berichtet, dass die Syntaxin1a-Mutante (L165A/E166A) Munc18a in einem GST-Bindungstest nicht mehr binden kann (Dulubova et al., 1999). Weiterhin konnte mittels NMR-Spektroskopie gezeigt werden, dass diese Syntaxin1a-Mutante keine „geschlossene“ Konformation eingehen kann (Dulubova et al., 1999). Deswegen erhielt diese Doppelmutante den Namen „offene“ Syntaxin1a-Mutante. Allerdings wurde in einer nachfolgenden Studie gefunden, dass die „offene“ Mutante in einem „*yeast two-hybrid*“-Test Munc18a binden kann (Dulubova et al., 2003). Ich habe mich deshalb entschieden, die Interaktion der „offenen“ Syntaxin1a-Mutante und Munc18a mit Hilfe der Mikrokolorimetrie nochmals anzuschauen. Dabei stellte ich überraschenderweise fest, dass die „offene“ Syntaxin1a-Mutante Munc18a sehr fest bindet (Abb. 3.13A). Die Affinität der Interaktion beträgt ca. 8 nM (Tab. 2).

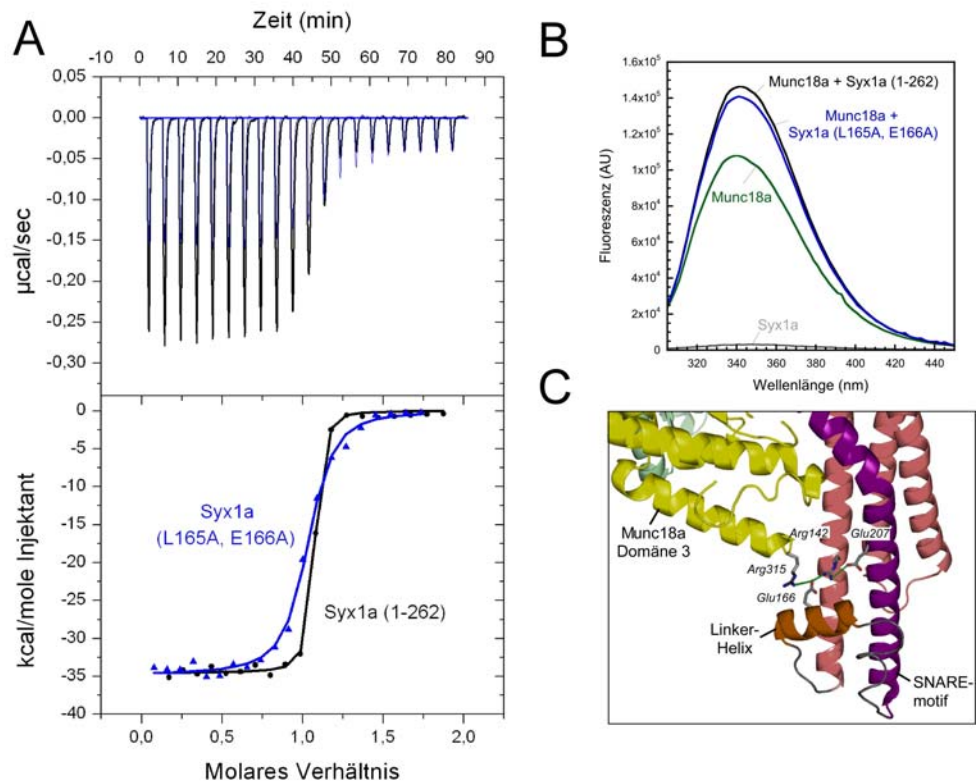


Abb. 3.14: Munc18a bindet eine „offene“ Syntaxin1a-Mutante mit hoher Affinität. (A) Kalorimetrische Titrationsen der „offenen“ Syntaxin1a-Mutante (Syx1a^{L165A/E166A}) zu Munc18a. 10 µM Syx1a^{L165A/E166A} wurde zu 1.5 µM Munc18a titriert. Die Affinität der Interaktion ist im Vergleich zu Syntaxin1a geringer, die Reaktionsenthalpie ist sehr ähnlich (ca. -35 kcal/mol). (B) Emissionsspektren von Syntaxin1a, Munc18a, Munc18a vermisch mit Syntaxin1a (AS 1-262) und Munc18a vermisch mit Syx1a^{L165A/E166A} nach Anregung bei 295 nm. Ein vorher aufgezeichnetes Pufferspektrum wurde von allen Spektren abgezogen. Syx1a^{L165A/E166A} bindet Munc18a, allerdings ist der Anstieg der Tryptophanfluoreszenz immer etwas geringer im Vergleich zu Syntaxin1a. (C) Ausschnitt aus der Munc18a/Syntaxin1a-Struktur: Glu166 aus der Linkerregion von Syntaxin1a interagiert nicht nur mit Arg315 von Munc18a, sondern auch mit Arg142 der Hc-Helix von Syntaxin1a. Arg142 interagiert auch mit Glu206 vom SNARE-Motiv. Die Mutation von Glu166 zu einem Alanin könnte dafür sorgen, dass sich Arg315 und Arg142 gegenseitig abstoßen.

Die „offene“ Syntaxin1a-Mutante bindet Munc18a deutlich fester als eine Syntaxin1a-Mutante (AS 1-179), der das SNARE-Motiv fehlt (siehe auch Domänenstruktur in Abb. 1.2). Des Weiteren bindet die „offene“ Syntaxin1a-Mutante mit der gleichen Reaktionsenthalpie wie die gesamte zytosolische Domäne von Syntaxin1a (-35 kcal/mol, Tab. 2 und Abb. 3.13A). Dieses Ergebnis ist bemerkenswert. Es scheint, dass sowohl das N-terminale Peptid als auch die „geschlossene“ Konformation dieser Syntaxin1a-Mutante mit Munc18a interagiert.

Demnach trägt das SNARE-Motiv der „offenen“ Syntaxin1a-Mutante zur Bindung an Munc18 bei. Weitere ITC-Experimente sprechen für diese Theorie. Munc18a ist nicht in der Lage das isolierte SNARE-Motiv von Syntaxin1a (AS 180-262) zu binden. Dagegen bewirkt die Zugabe des isolierten SNARE-Motivs (AS 180-262) zu einem Komplex aus Munc18a und der Habc-Domäne (AS 1-179) eine Bindung an Munc18a. Dieser ternäre Komplex, bestehend aus Munc18a, Habc (AS 1-179) und Syntaxin1a (AS 180-262) ist stabiler als der binäre Komplex bestehend aus Munc18a und Habc (AS 1-179) (Tab. 2). Das deutet darauf hin, dass das SNARE-Motiv in Anwesenheit der Habc-Domäne Munc18a binden kann, sogar wenn die Linkerregion vom SNARE-Motiv getrennt vorliegt.

Die Interaktion von Munc18a und der „offenen“ Syntaxin1a-Mutante wurde auch mittels Tryptophanfluoreszenz in einem ähnlichen Experiment, wie bereits in Kapitel 3.1.1 beschrieben, untersucht. Bei der Interaktion von Munc18a und der „offenen“ Syntaxin1a-Mutante kam es wie bei Syntaxin1a (AS 1-262) zu einem deutlichen Anstieg der Tryptophanfluoreszenz (Abb. 3.13B). Interessanterweise fiel der Anstieg der Tryptophanfluoreszenz immer etwas geringer aus im Vergleich zu Syntaxin1a (AS 1-262). Eine mögliche Erklärung ist, dass sich der Munc18a/Syntaxin1a (AS 1-262)-Komplex und der Munc18a/Syntaxin1a (E165A/L166A)-Komplex etwas in ihrer Konformation unterscheiden. Ein ähnlicher Befund war für die Interaktion von Munc18a und dem N-terminal verkürztem Syntaxin1a (AS 25-262) zu beobachten (Kapitel 3.1.1). Auch hier fiel der Anstieg der Tryptophanfluoreszenz von Munc18a in Anwesenheit von Syntaxin1a (AS 25-262) immer etwas geringer aus, als in Anwesenheit von Syntaxin1a (AS 1-262).

Als nächstes wurde untersucht, ob Munc18a die SNARE-Komplexbildung von der „offenen“ Syntaxin1a-Mutante blockieren kann. Meine bisherigen Ergebnisse zeigen, dass Munc18a die SNARE-Komplexbildung reguliert. Nur wenn das N-terminale Peptid an Munc18a bindet, ist die Bildung des SNARE-Komplexes inhibiert. Da die „offene“ Syntaxin1a-Mutante auch über das N-terminale Peptid mit Munc18a interagiert, sollte die SNARE-Komplexbildung in Anwesenheit von Munc18a blockiert sein. Erstaunlicherweise ist das nicht der Fall. Munc18a kann in Anwesenheit von der „offenen“ Syntaxin1a-Mutante die SNARE-Komplexbildung kaum inhibieren (Abb. 3.14A + B). Ähnlich wie das N-terminal verkürzte Syntaxin1a (AS 25-262) bindet die „offene“ Syntaxin1a-Mutante Munc18a mit hoher Affinität, blockiert die SNARE-Komplexbildung allerdings nicht. Die Assoziation-

und Dissoziationskonstanten von der „offenen“ Syntaxin1a-Mutante und Munc18a sind vergleichbar mit denen des N-terminal verkürzten Syntaxin1a (AS 25-262) und Munc18a ($k_{on} = 2.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_{off} = 0.0063 \text{ s}^{-1}$). Die Bindungsrate der „offenen“ Syntaxin1a-Mutante und SNAP-25 (Abb. 3.12C) sind unvereinbar damit, dass Munc18a von Syntaxin1a dissoziiert, bevor SNAP-25 binden kann. Obwohl Munc18a sehr fest an die „offene“ Syntaxin1a-Mutante bindet, scheint das SNARE-Motiv für SNAP-25 zugänglich zu sein. Das wiederum deutet daraufhin, dass die Kontakte zwischen Munc18a und der Linkerregion von Syntaxin1a wichtig für die Inhibition der SNARE-Komplexbildung sind.

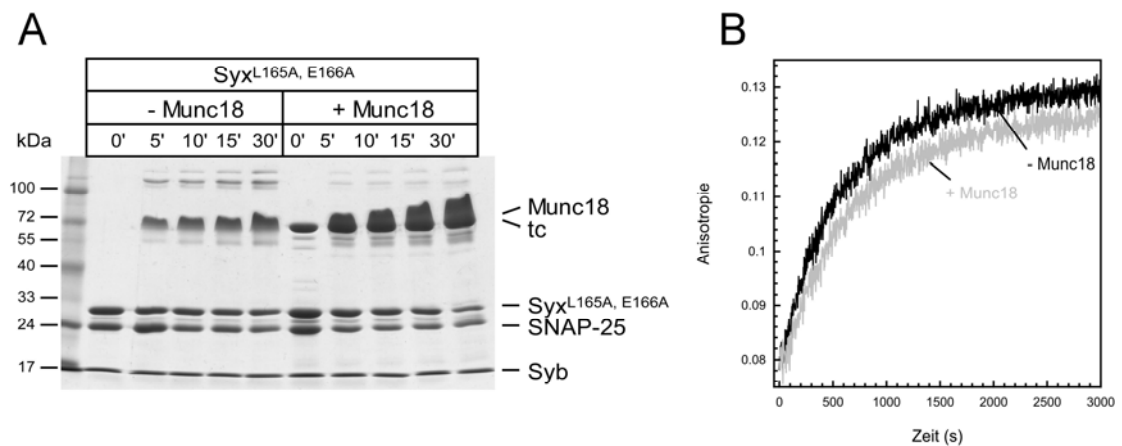


Abb. 3.15: Munc18 kann, gebunden an eine „offene“ Syntaxin1a-Mutante, die SNARE-Komplexbildung nicht verhindern. (A) Zu $\text{Syx}^{\text{L165A, E166A}}$ wurde im gleichen molaren Verhältnis SNAP-25 und Syntobrevin2 in Ab- und Anwesenheit von Munc18a gegeben. Das SDS-Gel wurde mit Coomassie-Blue gefärbt (tc = ternärer Komplex). (B) Die ternäre SNARE-Komplexbildung wurde mittels Fluoreszenz-Anisotropie verfolgt. Zu 40 nM markiertem Synaptobrevin2 wurden 750nM SNAP-25 und 500 nM $\text{Syx}^{\text{L165A, E166A}}$ gegeben (schwarze Kurve). Munc18a (750nM) inhibiert die SNARE-Komplexbildung kaum (graue Kurve).

3.3 Untersuchung der Munc18/Syntaxin-Interaktion in dem Choanoflagellat *Monosiga brevicollis*

In den ersten beiden Kapiteln dieser Arbeit (3.1 und 3.2) wurde die Interaktion der beiden neuronalen Proteine Syntaxin1a und Munc18a mit thermodynamischen, kinetischen und strukturellen Daten beschrieben. Dabei konnte ich zeigen, dass Munc18a simultan das N-terminale Peptid und den Rest des Moleküls in der

„geschlossenen“ Konformation von Syntaxin1a bindet. Des Weiteren scheint dieser kooperative Bindungsmechanismus mindestens in einem zweiten SM-Protein/Syntaxin-Paar, Vps45 und Syntaxin16, konserviert zu sein. Weiterhin deuten meine Befunde daraufhin, dass das N-terminale Peptid von Syntaxin1a in der Lage ist eine Konformationsänderung in Munc18a zu bewirken. An Syntaxin1a gebundenes Munc18a blockiert die SNARE-Komplexbildung, wohingegen die Deletion des N-terminalen Syntaxin1a-Peptids von Munc18a die neuronale SNARE-Komplexbildung erlaubt.

Interessanterweise kann Sec1p, das Munc18-Homolog aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, das Syntaxin1a-Homolog Sso1p nicht binden (Carr et al., 1999, Togneri et al., 2006). Es konnte vielmehr gezeigt werden, dass Sec1p den ternären SNARE-Komplex Sso1p/Sec9p/Snc2p der Hefe bindet und sogar die SNARE-Protein katalysierte Liposomenfusion *in vitro* beschleunigt (Scott et al., 2004). Auch Munc18a ist in der Lage, die Liposomenfusion *in vitro* zu beschleunigen (Shen et al., 2007). Es wurde postuliert, dass Munc18a das Vier-Helix-Bündel des neuronalen SNARE-Komplexes bindet, wodurch die Liposomenfusion beschleunigt wird (Shen et al., 2007, Dulubova et al., 2007). Nach diesem Modell sollen daher Vertreter aller SM-Proteine über einen konservierten Mechanismus SNARE-Komplexe binden (Shen et al., 2007). Die Bindung von Munc18a an die „geschlossene“ Konformation von Syntaxin1a stellt nach diesem Modell nur einen Spezialfall der Neuroexozytose dar, die nicht direkt an der Fusion beteiligt sein soll. Ursprünglichere Munc18-Homologe sollten daher hauptsächlich an SNARE-Komplexe binden, während die Interaktion mit der „geschlossenen“ Konformation eine weniger prominente Rolle spielen sollte. Ich habe deswegen begonnen, die Interaktion von Munc18 und sekretorischen SNARE-Proteinen in Choanoflagellaten zu studieren. Choanoflagellaten nehmen in der Evolution der Tiere eine Sonderstellung ein. Phylogenetische Untersuchungen zeigen, dass Choanoflagellaten eine Schwestergruppe der Tiere sind, Choanoflagellaten und Tiere repräsentieren demnach zwei nahe verwandte Gruppen (King et al., 2004, King et al., 2008, Carr et al., 2008). In Abbildung 3.16 ist das Verwandtschaftsverhältnis von Pflanzen, Pilzen, Choanoflagellaten und einigen Tierarten schematisch dargestellt. Untersuchungen von SNARE- und SM-Proteinen in Choanoflagellaten könnten Einblicke in die Mechanismen des vesikulären Transports in Tieren geben. So könnten vergleichende Studien zwischen Choanoflagellaten und z.B. Vertebraten, konservierte Funktionen

von SNARE- und SM-Proteinen enthüllen. Diese Informationen könnten für das Verständnis der Neuroexozytose von sehr großer Bedeutung sein.

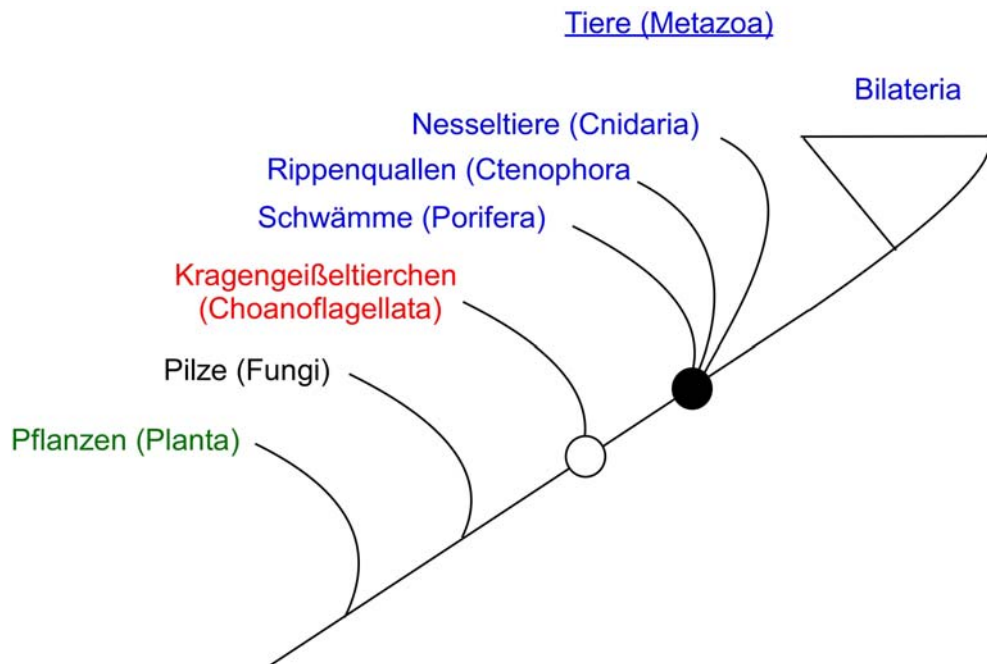


Abb. 3.16: Choanoflagellaten als nächst verwandte Einzeller der Tiere. Die enge Verwandtschaft von Choanoflagellaten und Tieren ist dargestellt. Choanoflagellaten und Tiere besitzen einen gemeinsamen Vorfahren (Kreis ohne Füllung). Choanoflagellaten sind z.B. näher mit den Tieren verwandt, als die Pilze mit den Tieren. Das erste sequenzierte Choanoflagellaten-Genom von *Monosiga brevicollis* könnte auch Aufschluss über den letzten gemeinsamen Vorfahren der Tiere (Kreis mit Füllung) geben (modifiziert nach King et al., 2004).

3.3.1 Der Sekretionsapparat in einem primitiven Einzeller: SNAREs und Munc18 in dem Choanoflagellat *Monosiga brevicollis*

Der Choanoflagellat *Monosiga brevicollis* ist ein einzelliger Organismus, von dem man weiß, dass er einer der engsten Verwandten der Tiere ist (King et al., 2008). *Monosiga brevicollis* besitzt einen einfachen Satz an SNARE-Proteinen (Kloepper et al., 2008). In Abbildung 3.17 ist die enge Verwandtschaft der sekretorischen SNARE-Proteine von *Monosiga brevicollis* und *Rattus norvegicus* schematisch dargestellt. Das sekretorische Syntaxin1 von *Monosiga brevicollis* besitzt ein N-terminales Peptid. Des Weiteren enthält SNAP-25 ein kurzes Stück mit Cysteinen am C-terminalen Ende der Qb-SNARE-Motivs (Kloepper et al., 2008). In Vertebraten werden diese Cysteine *in vivo* palmyliert, um für die Membranverankerung von SNAP-25 zu sorgen (Veit et al., 1996). Interessanterweise fehlen bei der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* konservierte Aminosäuren im N-terminalen Peptid von

Syntaxin1 (i.e. Arg4 und Leu8). Auch sind die vier Cysteine am C-terminalen Ende des Qb-SNARE-Motivs von SNAP-25 nicht vorhanden.

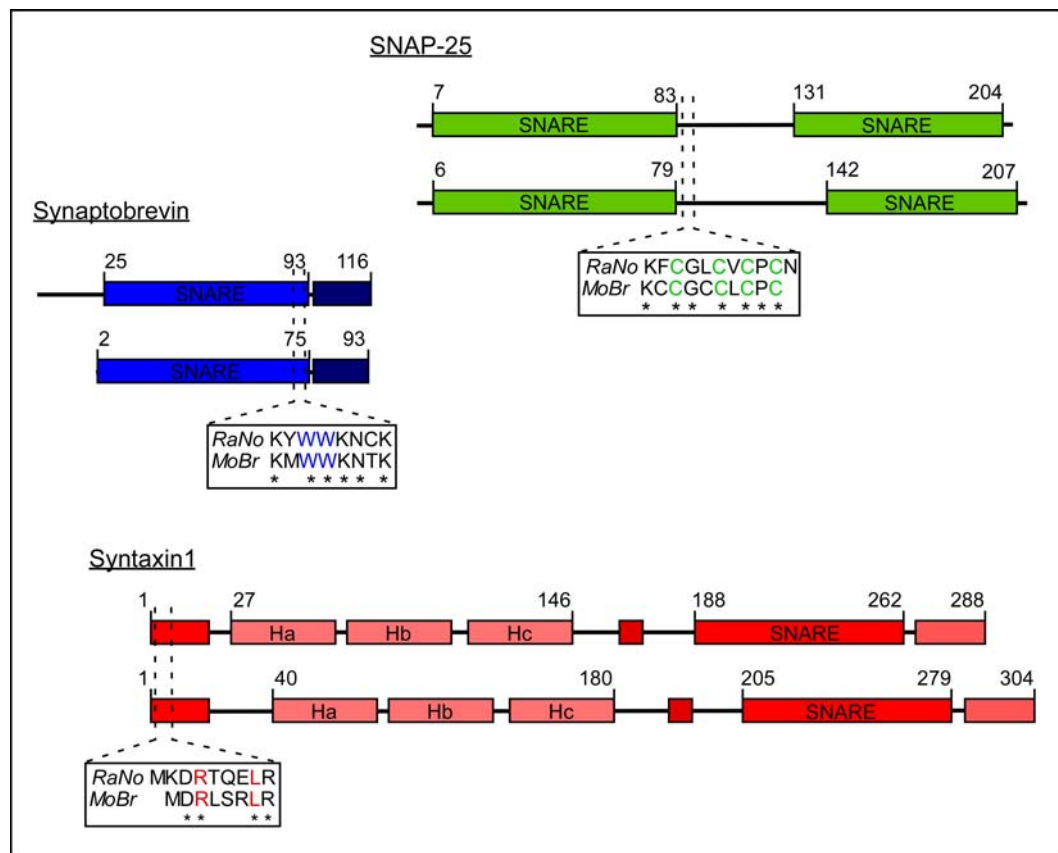


Abb. 3.17: Vergleich der sekretorischen SNARE-Proteine aus der Wanderratte *Rattus norvegicus* und dem Choanoflagellat *Monosiga brevicollis*. Die Domänenstruktur der einzelnen SNARE-Proteine ist dargestellt. Die SNARE-Proteine von *Monosiga brevicollis* und *Rattus norvegicus* sind eng miteinander verwandt. Insbesondere die Ähnlichkeit wichtiger Aminosäuren ist auffallend. So enthält SNAP-25 von *Monosiga brevicollis* vier Cysteine am C-terminalen Ende des Qb-SNARE-Motivs. Das Syntaxin1 aus dem Choanoflagellat umfasst ein N-terminales Peptid, mit den beiden für die Bindung an Munc18 wichtigen Aminosäuren Arg4 und Leu8.

Um das Zusammenspiel von SNARE-Proteinen und Munc18 in dem Choanoflagellat *Monosiga brevicollis* zu untersuchen, habe ich als erstes die Bildung des SNARE-Komplexes *in vitro* untersucht. Synaptobrevin ohne Transmembran-Domäne (AS 1-75) wurde aus einer *Monosiga brevicollis* cDNA-Bank (freundlicherweise von N. King, Universität in Kalifornien, Berkeley, U.S.A zur Verfügung gestellt) isoliert. Syntaxin1 ohne Transmembran-Domäne (AS 1-279) und SNAP-25 (AS 1-210) wurden von der Firma GENSCRIPT synthetisiert. In einem ersten Schritt wurden die drei SNARE-Proteine mittels Affinitätschromatographie und

Ionenaustauschchromatographie aufgereinigt. Um zu untersuchen, ob die drei SNARE-Proteine aus Choanoflagellaten einen SNARE-Komplex bilden können, wurden die Monomere in äquimolaren Mengen bei Raumtemperatur inkubiert und mittels SDS-PAGE analysiert (Abb. 3.18).

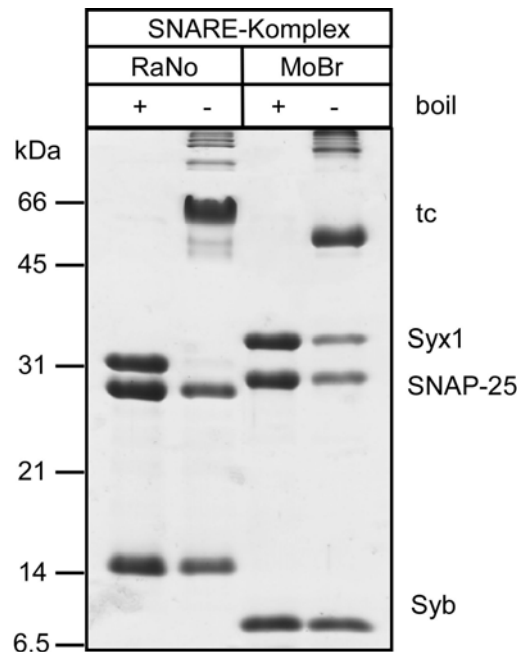


Abb. 3.18: Ein SDS-resistenter SNARE-Komplex in dem Choanoflagellat *Monosiga brevicollis*. Äquimolare Mengen von Syntaxin1, SNAP-25 und Synaptobrevin aus *Monosiga brevicollis* wurden für 3 Stunden bei RT inkubiert. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert. Die SNARE-Proteine von *Monosiga brevicollis* bilden einen SDS-resistenten Komplex (tc = ternärer Komplex) mit einem Molekulargewicht von ~ 60 kDa. Zum Vergleich wurden die neuronalen SNARE-Proteine bei RT inkubiert und die Bildung des SNARE-Komplexes verfolgt. Der neuronale SDS-resistente SNARE-Komplex läuft im SDS-Gel mit einem Molekulargewicht von ~ 66 kDa etwas größer als der SNARE-Komplex des Choanoflagellaten.

Eine neue SDS-resistente Bande mit einem Molekulargewicht von ~ 60 kDa war zu beobachten (Abb. 3.18, *MoBr*, tc). Diese Bande zerfällt wieder, wenn die Proben vor der Analyse gekocht wurden. Die Monomere Syntaxin1, SNAP-25 und Synaptobrevin aus *Monosiga brevicollis* sind demnach, wie auch die Proteine aus *Rattus norvegicus* in der Lage einen SDS-resistenten SNARE-Komplex auszubilden. Allgemein zeichnen sich SNARE-Komplexe durch eine alpha-helikale Sekundärstruktur und durch eine ungewöhnlich hohe Stabilität aus (Fasshauer et al., 1997a+b, Antonin et al., 2000, Strop et al., 2008). Analog dazu, wurden die Sekundärstruktur und die Stabilität des SNARE-Komplexes aus Choanoflagellaten

untersucht. Dazu wurden die drei SNARE-Proteine Syntaxin1, SNAP25 und Synaptobrevin in einem Verhältnis von 1:1:1.5 über Nacht bei 4 °C inkubiert. Danach konnte der ternäre SNARE-Komplex mittels Ionenaustausch-Chromatographie von den Monomeren getrennt werden. Der aufgereinigte SNARE-Komplex des Choanoflagellaten wurde mittels CD-Spektroskopie untersucht. Es zeigt sich eindeutig, dass der SNARE-Komplex von *Monosiga brevicollis* eine alpha-helikale Sekundärstruktur aufweist (Abb. 3.19A).

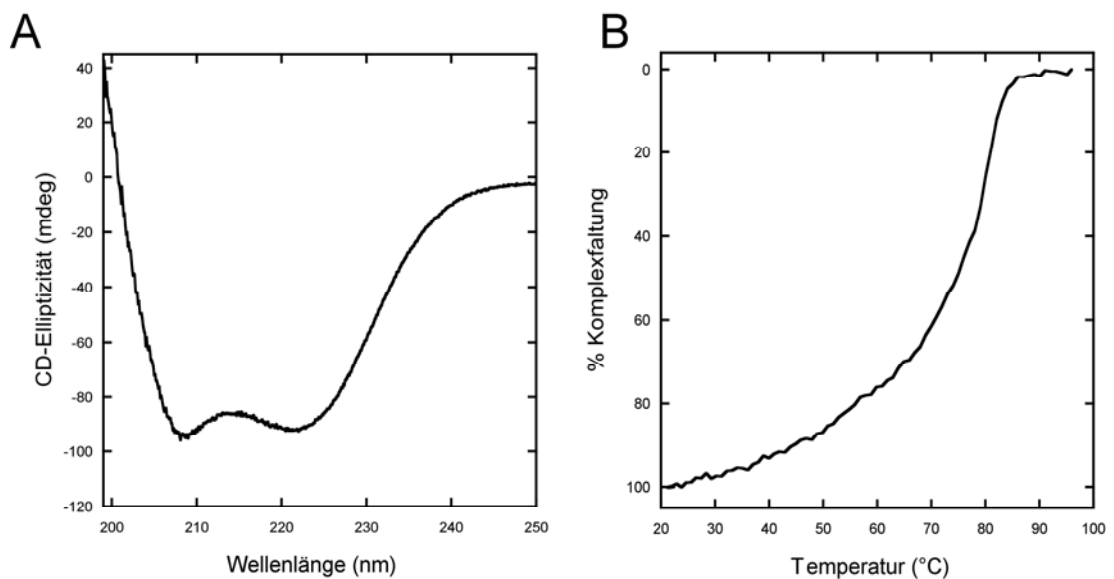


Abb. 3.19: Der SNARE-Komplex von *Monosiga brevicollis* ist alpha-helikal und weist eine hohe Schmelztemperatur auf. (A) Ein CD-Spektrum von 5 μ M des gereinigten SNARE-Komplexes von *Monosiga brevicollis* wurde aufgezeichnet. Die für alpha-Helizes spezifischen Minima bei 222 nm und 208 nm sind zu beobachten. (B) Der gereinigte SNARE-Komplex wurden bei einer Konzentration von 5 μ M in Natriumphosphat-Puffer (20 mM Natriumphosphat pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM DTT) von 20 °C – 99 °C (60 °C/h) erhitzt. Die Abnahme der Elliptizität wurde CD-spektroskopisch bei 222 nm gemessen. Der Komplex zerfällt bei ca. 80 °C.

Wie bereits zuvor gezeigt, sind die SNARE-Komplexe von *Rattus norvegicus* und *Monosiga brevicollis* SDS-resistent und müssen sehr stark erhitzt werden, bevor sie in ihre Einzelproteine zerfallen (Abb. 3.18). Der SNARE-Komplex aus Choanoflagellaten wurde mittels CD-Spektroskopie auf seine Stabilität getestet. Ein thermales Denaturierungsexperiment wurde durchgeführt, bei dem die Entfaltung des SNARE-Komplexes aus *Monosiga brevicollis* verfolgt wurde. Der SNARE-Komplex aus *Monosiga brevicollis* zeichnet sich durch eine hohe Stabilität aus und zerfällt bei ca. 80 °C (Abb. 3.19B). Im Vergleich dazu entfaltet sich der neuronale SNARE-Komplex bei 90 °C (Fasshauer et al., 1997b).

3.3.2 Ein konservierter Bindungsmechanismus zwischen Munc18 und Syntaxin1 in dem Choanoflagellat *Monosiga brevicollis*

Im Abschnitt zuvor konnte ich zeigen, dass die SNARE-Proteine Syntaxin1, SNAP-25 und Synaptobrevin aus dem Choanoflagellaten *Monosiga brevicollis* einen SNARE-Komplex, mit biochemischen und biophysikalischen Eigenschaften ähnlich denen des neuronalen SNARE-Komplexes, ausbilden. Wie bereits erwähnt, bindet Munc18a das neuronale Syntaxin1a mit hoher Affinität und inhibiert die Formation des SNARE-Komplexes *in vitro* (Hata et al. 1993, Pevsner et al., 1994b und Yang et al., 2000, diese Arbeit Abb. 3.10). Es stellte sich nun die Frage, ob diese Eigenschaft von Munc18 in Choanoflagellaten konserviert ist. Deshalb wurde die Interaktion von Munc18 und Syntaxin1 aus dem Choanoflagellat *Monosiga brevicollis* untersucht. Munc18-DNA aus *Monosiga brevicollis* wurde ebenfalls von der Firma GENSCRIPT synthetisiert. Munc18 (AS 1-649) wurde in *Escherichia coli* expremiert und anschließend mittels Affinitäts- und Ionenaustauschchromatographie aufgereinigt. Die thermodynamischen Parameter der Munc18/Syntaxin1-Interaktion wurden mittels Isothermaler Titrationskalorimetrie (ITC) bestimmt. Syntaxin1 wurde schrittweise zu Munc18 titriert (Abb. 3.20, schwarze Graphen). Interessanterweise bindet Munc18 aus Chaonoflagellaten Syntaxin1 mit einer Reaktionsenthalpie von -37.0 ± 0.3 kcal/mol und einer sehr hohen Affinität ($K_d = 4.1 \pm 0.6$ nM). Die Stöchiometrie der Interaktion liegt bei ungefähr 1 (0.91). Die thermodynamischen Parameter sind mit denen des neuronalen Munc18a/Syntaxin1a-Komplexes zu vergleichen. Um herauszufinden, ob das N-terminale Peptid von Syntaxin1 auch in Choanoflagellaten an der Bindung zu Munc18 teilnimmt, habe ich ein N-terminal verkürztes Syntaxin1-Fragment (AS 20-279) hergestellt. In einem weiteren ITC-Experiment wurde diese N-terminal verkürzte Syntaxin1-Variante zu Munc18 titriert (Abb. 3.20, blaue Graphen). Die verkürzte Syntaxin1-Variante bindet Munc18 mit einer geringeren Affinität ($K_d = 63.7 \pm 7.1$ nM) als Syntaxin1a (AS 1-279). Ebenso ist die Reaktionsenthalpie deutlich geringer, sie beträgt nur noch -25.8 ± 0.4 kcal/mol. Die Stöchiometrie der Interaktion liegt bei 0.91. Die Differenz in der Reaktionsenthalpie zwischen den zwei Syntaxin1-Varianten deutet darauf hin, dass das N-terminale Peptid von Syntaxin1a an der Bindung zu Munc18 teilnimmt.

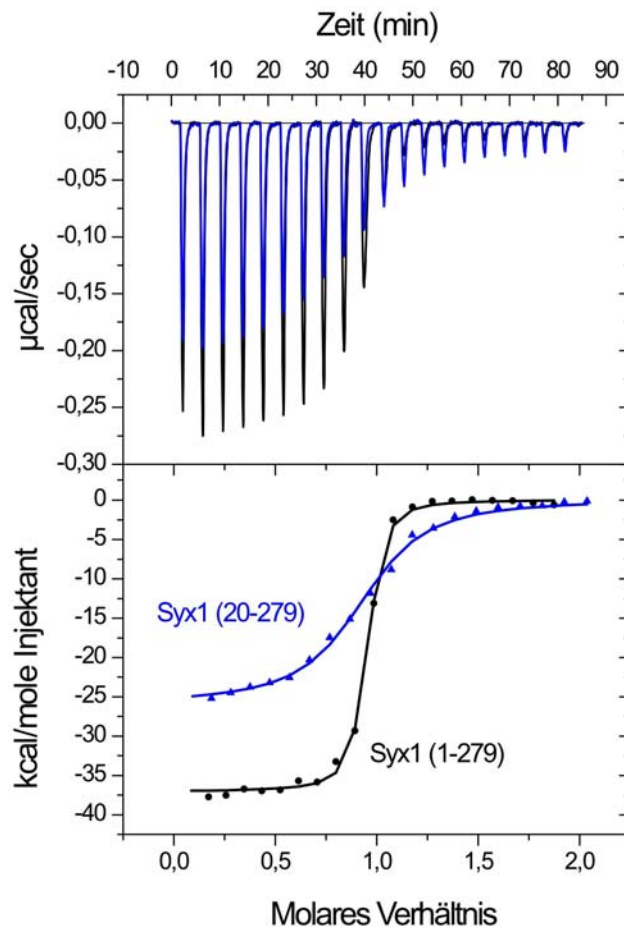


Abb. 3.20: Die Munc18/Syntaxin1-Interaktion in dem Choanoflagellat *Monosiga brevicollis* gemessen mit Isothermaler Titrationskalorimetrie (ITC). Kalorimetrische Titrations von Syx1 (AS 1-279) und Syx1 (AS 20-279) in Munc18. Je $20 \mu\text{M}$ der Syntaxin1-Variante wurde zu $2.5 \mu\text{M}$ Munc18 titriert (oben). Die bei der Reaktion freiwerdende Wärme ist proportional zur Fläche unter jeden Peak. Die pro mol injizierte Syntaxin1a freiwerdende Wärme wurde gegen das molare Verhältnis von Syntaxin1 und Munc18 aufgetragen (unten). Die Linien repräsentieren die beste Anpassung nach Nutzung des *single site*-Bindungsmodells.

3.3.3 Die SNARE-Komplexbildung in *Monosiga brevicollis* wird von Munc18 beeinflusst

Zwei Aspekte der Studien der Munc18/Syntaxin1-Interaktion in Choanoflagellaten sind hervorzuheben. Zum einen kann Munc18 monomeres Syntaxin1a binden. Das ist zum Beispiel in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* nicht der Fall, hier ist das Munc18a-Homolog (Sec1p) nicht in der Lage, das Syntaxin1-Homolog (Sso1p) zu binden. Zum anderen zeigen meine Daten, dass auch Munc18 aus dem Choanoflagellaten *Monosiga brevicollis* über einen kooperativen

Bindungsmechanismus das N-terminale Peptid und die „geschlossene“ Konformation von Syntaxin1 bindet. Munc18a aus *Rattus norvegicus* ist in der Lage die Formation des neuronalen SNARE-Komplexes zu regulieren. Es stellt sich demnach die Frage, ob Munc18 in Choanoflagellaten ebenfalls die Formation des SNARE-Komplexes regulieren kann?

Um das zu testen, wurde mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiertes Synaptobrevin aus *Monosiga brevicollis* mit Syntaxin1 (AS 1-279) und SNAP-25 vermischt und die Formation des SDS-resistenten SNARE-Komplexes beobachtet. Es bildete sich ein SDS-resistenter SNARE-Komplex. (Abb. 3.20A). In Anwesenheit von Munc18 bildete sich kein SDS-resistenter SNARE-Komplex mehr. Munc18 aus *Monosiga brevicollis* kann demnach die SNARE-Komplexbildung blockieren. Wurde hingegen die N-terminal verkürzte Syntaxin1-Variante (AS 20-279) mit Munc18 vorinkubiert, bildete sich trotzdem eine klare SDS-resistente SNARE-Komplexbande (Abb. 3.20C, tc).

Der Einfluss von Munc18 auf die SNARE-Komplexbildung wurde ebenfalls mittels Fluoreszenz-Anisotropie untersucht. Das mit Fluoreszenzfarbstoff markierte Synaptobrevin wurde mit SNAP-25 und den beiden Syntaxin1a-Varianten mit und ohne N-terminalem Peptid (AS 1-279 und 20-279) vermischt. Der deutliche Anisotropie-Anstieg erlaubt es, die ternäre SNARE-Komplexbildung zu verfolgen (Abb. 3.20B+D, schwarze Kurven). Wurde zu markiertem Synaptobrevin vorinkubiertes Munc18a und Syntaxin1a (AS 1-279) gegeben, und die Reaktion durch Zugabe von SNAP-25 gestartet, war ein deutlich geringerer Anstieg der Anisotropie zu verzeichnen (Abb. 3.20B, graue Kurve). Interessanterweise war kein Block der SNARE-Komplexbildung zu beobachten, wenn Munc18 und Syntaxin1 ohne N-terminales Peptid (AS 20-279) vorformiert wurden und die Reaktion durch Synaptobrevin und SNAP-25 gestartet wurde (Abb. 3.20D, graue Kurve). Diese Ergebnisse zeigen eindrucksvoll, dass Munc18 aus *Monosiga brevicollis* die SNARE-Komplexbildung regulieren kann.

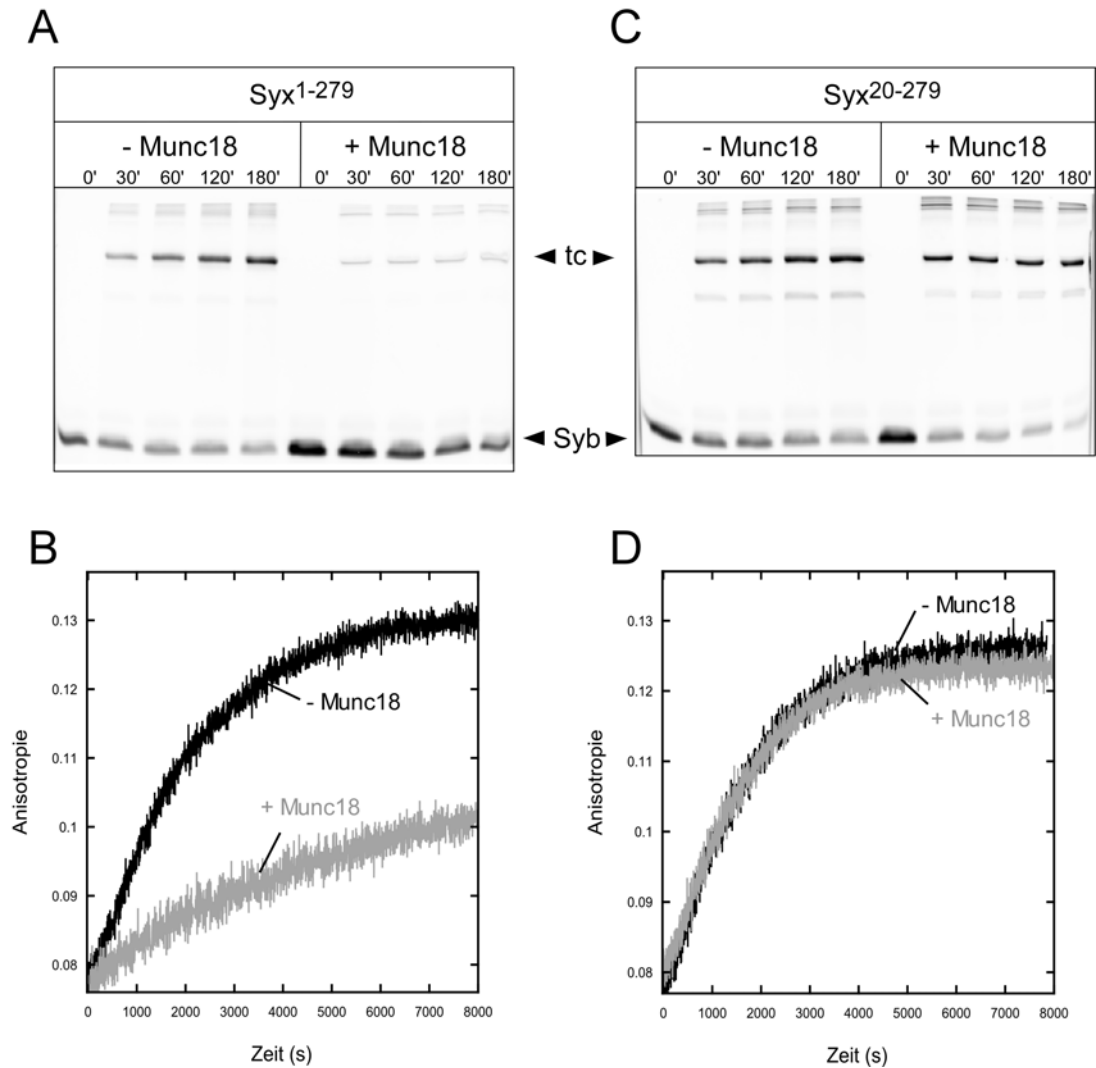


Abb. 3.21: Der Einfluss von Munc18 auf die SNARE-Komplexbildung in dem Choanoflagellat *Monosiga brevicollis*. (A, C) Die Formation SDS-resistenter SNARE-Komplexe in Ab- und Anwesenheit von Munc18 mit OregonGreen markiertem Synaptobrevin an Position 58 ist dargestellt. Beide Syntaxin1-Varianten, Syx1 (AS 1-279) und Syx1 (AS 20-279) bilden SNARE-Komplexe in Abwesenheit von Munc18 (tc = ternärer Komplex). In Anwesenheit von Munc18 ist die SNARE-Komplexbildung bei Syx1 (AS 1-279) blockiert, bei der Interaktion von Munc18 mit Syx1 (AS 20-279) dagegen nicht. (B, D) Die SNARE-Komplexbildung wurde mittels Fluoreszenz-Anisotropie verfolgt. 50 nM mit OregonGreen an Position 58 markiertes Synaptobrevin wurde mit 1 μ M Syntaxin1 und 3 μ M SNAP-25 vermischt. Syx1 (AS 1-279) und Syx1 (AS 20-279) bilden ternäre SNARE-Komplexe aus (B, D). Munc18 (1 μ M) inhibiert die ternäre SNARE-Komplexbildung bei Syx1 (AS 1-279) (B, graue Kurve), nicht aber bei Syx1 (AS 20-279) (D, graue Kurve). Die SNARE-Komplexbildung verläuft mit ähnlicher Geschwindigkeit, wie in Abwesenheit von Munc18a.

3.3.4 Die Lokalisation des Sekretionsapparates von *Monosiga brevicollis*

Die neuronalen SNARE-Proteine Syntaxin1a, SNAP-25 und Synaptobrevin2 bilden äußerst stabile alpha-helikale SNARE-Komplexe aus, die dafür sorgen, dass in Nervenzellen synaptische Vesikel mit der Plasmamembran verschmelzen. Dabei werden Neurotransmitter in den synaptischen Spalt ausgeschüttet, binden an Rezeptoren der gegenüberliegenden Membran und sorgen so für eine schnelle Informationsweiterleitung. Der Choanoflagellat *Monosiga brevicollis* besitzt SNARE-Proteine, die mit den neuronalen SNARE-Proteinen Syntaxin1a, SNAP-25 und Synaptobrevin2 aus Vertebraten sehr eng verwandt sind (Kloepper et al., 2008). Auch der SNARE-Komplex aus Choanoflagellaten ist ein sehr stabiler und alpha-helikaler Komplex. Allerdings ist nicht klar, an welchem Fusionschritt die SNARE-Proteine von *Monosiga brevicollis* beteiligt sind. Deswegen habe ich als nächstes die subzelluläre Lokalisation von Synaptobrevin in Choanoflagellaten untersucht. Ein polyklonaler Antikörper wurde gegen die zytosolische Domäne von Synaptobrevin aus *Monosiga brevicollis* generiert. Die subzelluläre Lokalisation von Synaptobrevin wurde nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellen immunfluoreszenzmikroskopisch untersucht. Der Zellkörper von *Monosiga brevicollis* ist ca. 5 µm groß und besitzt ein apikales Flagellum, welches von einem Kragen aus Mikrovilli umgeben ist (Leadbeater et al., 2001, Abedin et al., 2008). Als erstes wurde eine Doppelfärbung mit einem monoklonalen Tubulin-Antikörper (Beta-Tubulin) und dem von mir generierten polyklonalen Synaptobrevin-Antikörper durchgeführt. Tubulin ist im gesamten Zellkörper und im apikalen Flagellum von *Monosiga brevicollis* lokalisiert (Abb. 3.22A + C). Synaptobrevin dagegen ist auf eine apikale Region der Zelle beschränkt (Abb. 3.22B + E + H). Um einen genaueren Einblick in die Organisation der Choanoflagellatenzelle zu erhalten und so auch die Synaptobrevinlokalisierung innerhalb der Zelle besser einordnen zu können, wurden Färbungen mit spezifischen Organellenmarkern durchgeführt. Dazu wurde eine Doppelfärbung mit einem monoklonalen Golgi-Antikörper (GM-130) und dem Synaptobrevin-Antikörper durchgeführt (Abb. 3.22D + E). Es zeigt sich eine klare Überlappung von Synaptobrevin und dem Golgi-Marker (Abb. 3.22F). Der Golgi-Apparat befindet sich demnach, wie auch ein möglicher Sekretionsapparat, in einer apikalen Region des Choanoflagellaten. Die Doppelfärbung mit einem monoklonalen Endoplasmatischen Retikulum-Antikörper (PDI) und dem

Synaptobrevin-Antikörper zeigt dagegen keine Überlappung von Endoplasmatischen Retikulum und Synaptobrevin (Abb. 3.22G + H + I).

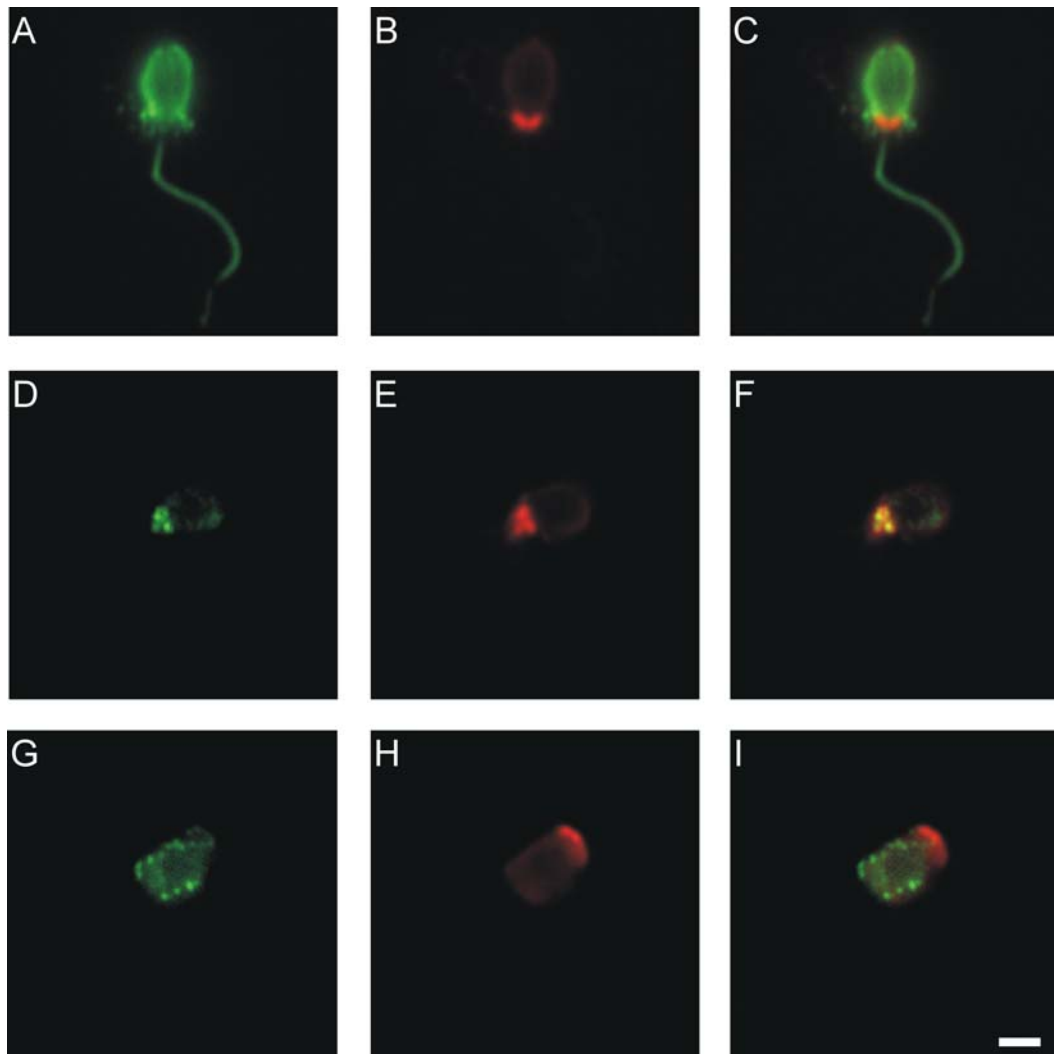


Abb. 3.22: Lokalisation von Synaptobrevin in *Monosiga brevicollis*. Die Lokalisation von Synaptobrevin (**B**, **E**, **H**) verglichen mit der von Tubulin (beta-Tubulin) (**A**), vom Golgi-Apparat (GM-130) (**D**) und vom Endoplasmatischen Retikulum (PDI) (**G**). Die Zellen wurden nach Fixierung und Permeabilisierung mit den verschiedenen Antikörpern inkubiert. Aus den überlagerten Bildern wird deutlich, das Synaptobrevin in einer apikalen Region der Zelle lokalisiert ist (**C**) und stark mit dem Golgi-Apparat kolokalisiert (**F**), nicht aber mit dem Endoplasmatischen Retikulum (**I**), Balken 2 μ M.

Um einen ultrastrukturellen Einblick in den Aufbau der Zellen zu erhalten, habe ich Choanoflagellaten mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie untersucht. Dazu wurden lebende Choanoflagellaten angereichert und mittels Hochdruckgefrierpräparation („High-Pressure-Freezing“) behandelt. Durch den hohen Druck zum Zeitpunkt des Einfrierens (ca. 2000 bar) wird die Bildung

kristallinen Eises und somit die Zerstörung der Zellen weitgehend unterbunden. Das so fixierte Material wurde bei tiefen Temperaturen (-90 °C) gegen ein Lösungsmittel und anschließend gegen ein Kunstharz ausgetauscht. Nach Aushärtung des Kunstharzes wurden 70nm dünne Schnitte am Ultramikrotom durchgeführt und elektronenmikroskopisch untersucht.

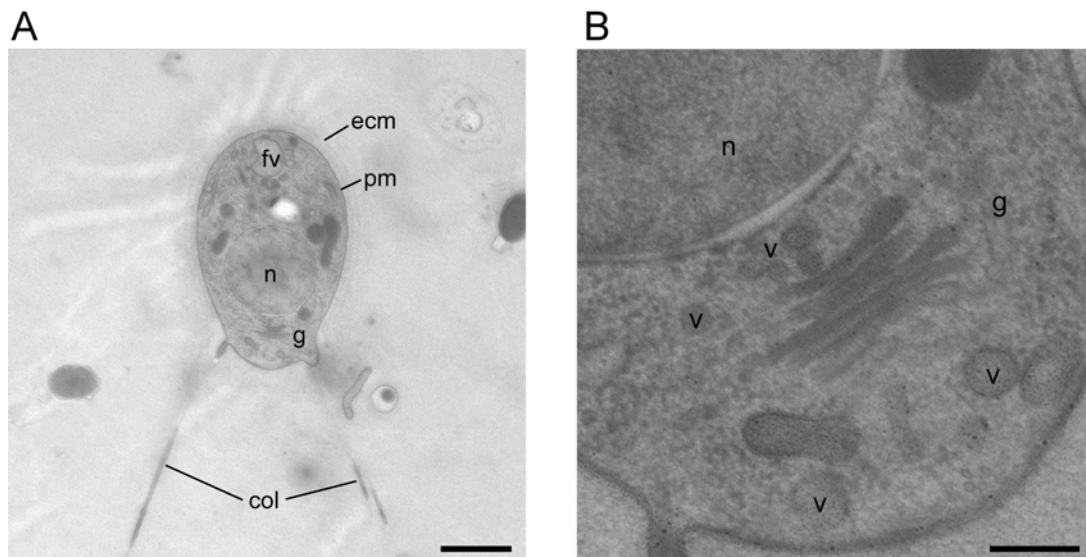


Abb. 3.23: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von *Monosiga brevicollis*. (A) *Monosiga brevicollis* bei einer 3250fachen Vergrößerung: **ecm**, extrazelluläre Membran; **pm**, Plasmamembran; **fv**, Nahrungsvakuole; **n**, Zellkern; **g**, Golgi-Apparat; **col**, Kragen. Balken = 1µM. (B) 20000fache Vergrößerung der apikalen Region lassen Vesikel (**v**) verschiedener Größen erkennen. Balken = 200 nm.

Die Bilder zeigen, dass *Monosiga brevicollis* auf der äußeren Oberfläche der Plasmamembran von einer feinen Schicht umhüllt ist. (Abb. 3.23A). Diese Schicht könnte die extrazelluläre Matrix sein. Weiterhin ist ein Zellkern zu erkennen, dieser deckt ca. ein Drittel der Gesamtfläche des Choanoflagellaten ab. In der basalen Region der Zelle ist eine membranumschlossene Organelle zu erkennen, hierbei könnte es sich um einen Nahrungsvakuole handeln. Das Flagellum ist nicht zu sehen, dafür aber drei längliche Zellfortsätze außerhalb des Zellkörpers. Dies könnten drei Mikrovilli des Kragens sein. In der apikalen Region von *Monosiga brevicollis* ist ein Golgi-Apparat lokalisiert. In der Umgebung des Golgi-Apparates sind Vesikel zu beobachten. (Abb. 3.22B). Die Größen der hier dargestellten Vesikel variieren zwischen ca. 30 und 100nm im Durchmesser. Die Lokalisation des Golgi-Apparates und der den Golgi-Apparat umringenden Vesikel (Abb. 3.23B), stimmen mit den Immunfluoreszenzfärbungen mit Synaptobrevin- und Golgi-Antikörpern (Abb. 3.22)

überein. Demnach könnte Synaptobrevin auf Vesikeln in *Monosiga brevicollis* lokalisiert und ein wichtiger Bestandteil des Sekretionsapparates in Choanoflagellaten sein.

4. Diskussion

4.1 Ein konservierter Bindungsmechanismus von SM- und SNARE-Proteinen

Die Exozytose synaptischer Vesikel in Neuronen wird durch die plasmamembranständigen Proteine Syntaxin1a und SNAP25 und das Vesikelprotein Synaptobrevin2 vermittelt. Sie werden als SNARE-Proteine bezeichnet. Die Komplexbildung der drei Membranproteine zwischen Plasma- und Vesikelmembran leitet die Membranfusion ein. Intrazelluläre Fusionsvorgänge wie z.B. die Fusion von frühen Endosomen laufen nach einem ähnlichen Mechanismus unter Beteiligung homologer SNARE-Proteine ab. So bilden Syntaxin16 (Qa-SNARE), vti1a (Qb-SNARE), Syntaxin6 (Qc-SNARE) und VAMP4 (R-SNARE) einen SNARE-Komplex aus, welcher die Fusion von frühen Endosomen katalysiert.

Neben den SNARE-Proteinen sind SM-Proteine essentiell für die Fusion von Vesikel- und Zielmembran (Übersicht in Rizo et al., 2008). Ähnlich wie bei den SNARE-Proteinen nehmen verschiedene SM-Proteintypen an den einzelnen intrazellulären Membrantransportschritten teil (Übersicht in Jahn et al., 2003). SM-Proteine lassen sich in vier grundsätzliche Typen unterteilen: Sec1/Munc18, Sly1, Vps33 und Vps45. Sec1/Munc18 ist essentiell für die Fusion sekretorischer Vesikel mit der Plasmamembran. Sly1 wirkt bei der Fusion zwischen Endoplasmatischem Retikulum und cis-Golgi-Netzwerk. Vps33 ist wichtig für die Fusion von Vesikeln des Trans-Golgi-Netzwerkes mit Lysosomen und Vps45 für die von frühen und späten Endosomen. Das am besten untersuchte SM-Protein ist Munc18a. Munc18a bindet spezifisch und mit hoher Affinität das neuronale Protein Syntaxin1a (Hata et al., 1993, Pevsner et al., 1994b) in der so genannten „geschlossenen“ Konformation (Abbildung 4.1, rechts). Munc18a besitzt eine hufeisenartige Form die sich in drei Domänen unterteilt lässt. Syntaxin1a wird von dieser hufeisenartigen Form umschlossen. Syntaxin1a besteht aus einem Vier-Helix-Bündel, der Habc-Domäne und der H3-Domäne, dem so genannten SNARE-Motiv. Dieser Bindungsmechanismus ist kristallographisch bisher nur für die Proteine Munc18a und Syntaxin1a beschrieben worden (Misura et al., 2000). Mehrere andere SM-Proteine scheinen einen anderen Mechanismus für die Bindung an ihren Syntaxinpartner zu verwenden. Diese SM-Proteine interagieren mit einem kurzen N-terminalen Peptid des jeweiligen Syntaxins. Munc18c bindet den N-Terminus von

Syntaxin4 (Latham et al., 2006; Hu et al., 2007), Sly1p den N-Terminus von Sed5p (Bracher et al., 2002) und Vps45 den N-Terminus von Syntaxin16 (Dulubova et al., 2002). Die Kristallstrukturen des Munc18c/Syntaxin4- und Sly1p/Sed5p-Komplexes zeigen, dass die beiden SM-Proteine eine hufeisenartige Form haben, die der von Munc18a sehr ähnelt. Allerdings binden die jeweiligen Syntaxine an die äußere Oberfläche von Munc18c bzw. Sly1p. Als Beispiel dafür sei auf die Munc18c/Syntaxin4-Kristallstruktur verwiesen (Abb. 4.1, links). Nur Aminosäurereste der Domäne 1 von Munc18c binden Syntaxin4. Man sollte sich jedoch vor Augen führen, dass die Kristallstrukturen von Munc18c/Syntaxin4 und Sly1p/Sed5p nur beweisen, dass das N-terminale Peptid an die äußere Oberfläche des SM-Proteins bindet. Aufgrund dieser Daten ist natürlich nicht auszuschließen, dass auch der Rest des jeweiligen Syntaxin-Moleküls an der Bindung teilnimmt.

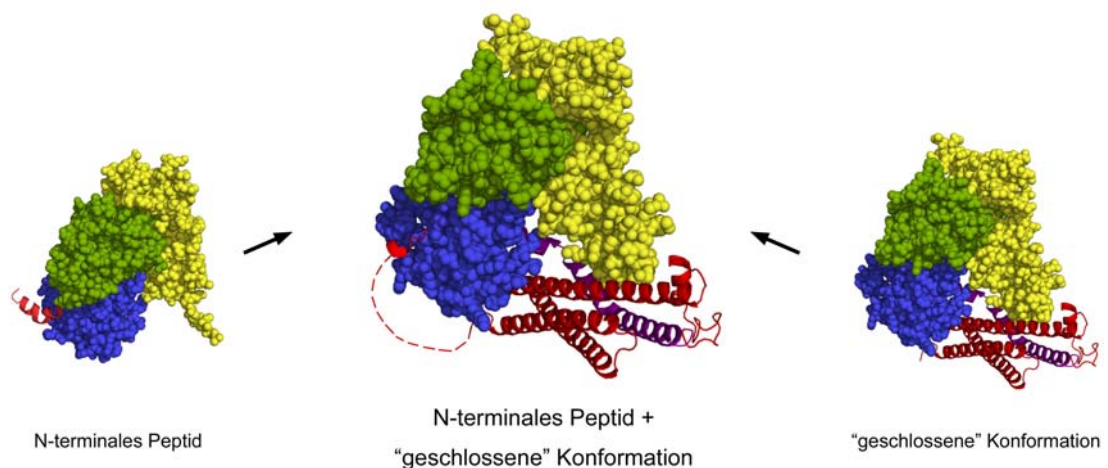


Abb. 4.1: Ein konservierter Bindungsmechanismus zwischen SM- und SNARE-Proteinen. Die neue, verfeinerte Munc18a/Syntaxin1a-Struktur zeigt, dass das N-terminale Peptid und die „geschlossene“ Konformation von Syntaxin1a gleichzeitig in der Lage sind, Munc18a zu binden. Bisher waren diese beiden Bindungsmechanismen getrennt voneinander beobachtet worden. Links ist die Munc18c/Syntaxin4-Struktur (Hu et al., 2007) zu sehen, rechts die alte Munc18a/Syntaxin1a-Struktur (Misura et al., 2000).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die thermodynamischen und kinetischen Parameter der Munc18a/Syntaxin1a-Interaktion bestimmt. Dabei stellte sich heraus, dass für eine hoch affine binäre Interaktion von Munc18a und Syntaxin1a nicht nur Kontakte von der „geschlossenen“ Konformation sondern auch Kontakte vom N-terminalen Peptid von Syntaxin1a nötig sind. So wird von Munc18a sowohl der gesamte zytosolische Bereich von Syntaxin1a als auch ein Syntaxin1a ohne N-terminales

Peptid fest gebunden. Allerdings ist bei der Bindung der verkürzten Variante an Munc18a eine etwas geringere Affinität und Reaktionsenthalpie zu beobachten. Die Enthalpie einer Reaktion erlaubt einen Einblick in die Anatomie der Bindung. Die Reaktionsenthalpie setzt sich unter anderem aus der Bildung von nichtkovalenten Bindungen und aus eventuellen Konformationsänderungen zusammen. Die Differenz in der Reaktionsenthalpie zwischen den beiden Syntaxin1a-Varianten weist darauf hin, dass das N-terminale Peptid von Syntaxin1a an der Bindung zu Munc18 teilnimmt. Des Weiteren wurde an der äußeren Oberfläche der Domäne 1 von Munc18a Elektronendichte in der Struktur des Munc18a/Syntaxin1a-Komplexes (Misura et al., 2000) beobachtet. Diese Elektronendichte wurde in der ersten Analyse der Kristallstruktur übersehen. Aufgrund meiner Erkenntnisse konnte in Zusammenarbeit mit Douglas A. Hattendorf und William I. Weis (Stanford University, Kalifornien, USA) diese Elektronendichte verfeinert werden und die Aminosäuren vom N-terminalen Syntaxin1a-Peptid in die Elektronendichte eingebaut werden. Die verfeinerte Struktur zeigt, dass das Syntaxin1a-Peptid an die äußere Oberfläche der Domäne 1 von Munc18a bindet, während der Rest des Syntaxin1a-Moleküls in der „geschlossenen“ Konformation Munc18a bindet (Abb. 4.1, Mitte). Dieser neuartige, kooperative Bindungsmechanismus war zuvor noch nicht beschrieben worden.

In vor kurzem veröffentlichten Daten wurde gezeigt, dass Munc18a den ternären SNARE-Komplex bindet (Khvotchev et al., 2007, Shen et al., 2007, Dulubova et al., 2007). Da das Hefe-Homolog von Munc18a, Sec1p ebenfalls den ternären SNARE-Komplex bindet (Carr et al., 1999, Tognieri et al., 2006), wurde postuliert, dass die konservierte Eigenschaft von SM-Proteinen die Bindung an SNARE-Komplexe ist. Es wird vermutet, dass während sich SNARE-Proteine reißverschlussartig zusammenlagern, SM-Proteine die Fusion von Vesikeln mit der Zielmembran stimulieren (Shen et al., 2007). Diese Stimulation soll über eine Interaktion von SM-Proteinen mit SNARE-Komplexen erfolgen (Südhof and Rothman, 2009). Die Bindung von Munc18a an die „geschlossene“ Konformation von Syntaxin1a stellt nach diesem Modell nur einen Spezialfall der Neuroexozytose dar (Shen et al., 2007, Rizo et al., 2008). Es wurde gezeigt, dass für die Bindung von Munc18a an den SNARE-Komplex das N-terminale Peptid von Syntaxin1a nötig ist (Dulubova et al., 2007). Bisher ist allerdings nicht genau geklärt worden, welche Regionen im Vier-Helix-Bündel des ternären SNARE-Komplexes zu der Interaktion mit Munc18a

beitragen. Mittels ITC konnte ich die Bindung von Munc18a an den SNARE-Komplex bestätigen. Jedoch zeigten meine Untersuchungen, dass Munc18a den SNARE-Komplex im Vergleich zu monomeren Syntaxin1a mit einer deutlich geringeren Affinität bindet ($K_d \approx 740$ nM im Vergleich zu $K_d \approx 1.4$ nM). Interessanterweise sind die Affinität und die Reaktionsenthalpie nahezu identisch mit der von der isolierten Habc-Domäne von Syntaxin1a. Das deutet daraufhin, dass das N-terminale Peptid und die Habc-Domäne von Syntaxin1a die Bindung von Munc18a an den SNARE-Komplex vermitteln. Das Vier-Helix-Bündel des SNARE-Komplexes scheint dagegen aufgrund meiner Daten nicht an der Bindung teilzunehmen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde von mir ein weiteres SM-Protein/Syntaxin-Paar untersucht. Ich konnte zeigen, dass für eine hochaffine Interaktion von Vps45 und Syntaxin16 neben dem N-terminalen Peptid auch der gesamte Rest des Syntaxin16-Moleküls wichtig ist. Syntaxin16-Konstrukte, denen das SNARE-Motiv C-terminal verkürzt wurde, weisen eine verminderte Reaktionsenthalpie und Affinität bei der Bindung an Vps45 auf. Die C-terminale Region des SNARE-Motivs ist auch in Syntaxin1a wichtig für die Bindung an Munc18a, da sie entscheidend ist für die Ausbildung einer „geschlossenen“ Konformation. Daher kann man davon ausgehen, dass Syntaxin16 bei der Bindung an Vps45 ebenfalls in einer „geschlossenen“ Konformation vorliegt. In der Tat belegen Punktmutationen in verschiedenen SM-Proteinen und Syntaxinen, welche mit der Bindung des N-terminalen Peptids interferieren, dass SM-Proteine über weitere Bindungsstellen mit den entsprechenden Syntaxinen interagieren können (Peng et al., 2004, D'Andrea-Merrins et al., 2007, McEwen et al., 2008, Johnson et al., 2008). Meine Ergebnisse legen nahe, dass Vps45/Syntaxin16 und Munc18a/Syntaxin1a *in vitro* über einen Bindungsmechanismus interagieren, in dem das N-terminale Peptid und die „geschlossene“ Konformation des jeweiligen Syntaxins gleichzeitig an Munc18a bzw. Vps45 binden. Bisher war man davon ausgegangen, dass sich diese beiden Bindungsarten gegenseitig ausschließen. Meine Ergebnisse weisen daraufhin, dass weitere SM-Protein/Syntaxin-Paare über einen konservierten Bindungsmechanismus interagieren könnten.

4.2 Mögliche Funktion von Munc18a während der Neuroexozytose

Schon vor einigen Jahren wurde beschrieben, dass Syntaxin1a gebundenes Munc18a die SNARE-Komplexbildung *in vitro* blockiert (Pevsner et al., 1994; Yang et al., 2000, Misura et al., 2000). Diese inhibitorische Rolle lässt sich allerdings nicht mit der absoluten Notwendigkeit von Munc18a bei der Neuroexozytose in Einklang bringen (Verhage et al., 2000; Toonen et al., 2007). Dieser Widerspruch ist bis heute nicht aufgeklärt worden. Insbesondere eine Frage ist unbeantwortet geblieben: Wie kann sich Syntaxin1a aus der festen Umklammerung von Munc18a lösen?

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss von Munc18a auf die SNARE-Komplexbildung nochmals untersucht, in der Hoffnung, dass eventuell etwas übersehen wurde. Meine Untersuchungen zeigten, dass Munc18a nur dann die SNARE-Komplexbildung von gebundenem Syntaxin1a blockieren konnte, wenn das N-terminale Peptid von Syntaxin1a an Munc18a bindet. Wird das Peptid entfernt oder die Bindung durch Punktmutationen im N-terminalen Peptid bzw. in der Munc18a-Bindestelle torpediert, war die SNARE-Komplexbildung in Anwesenheit von Munc18a nicht mehr blockiert.

Wie allerdings ist die Rolle des N-terminalen Peptids bei der SNARE-Komplexbildung mechanistisch zu erklären? Eine mögliche Erklärung dafür ergibt sich aus Vergleichen mit der in dieser Arbeit präsentierten, überarbeiteten Munc18a/Syntaxin1a-Kristallstruktur und der Munc18-Kristallstruktur des Tintenfisches (Bracher et al., 2001). In der Struktur des Komplexes bindet das N-terminale Peptid von Syntaxin1a an die äußere Oberfläche von Munc18a und scheint Kontakte zwischen dem SNARE-Motiv und Regionen in den Domänen 1 und 3 von Munc18a zu stabilisieren. In der Struktur des ungebundenen Munc18 erkennt man Konformationsänderungen in den Domänen 1 und 3 (Bracher et al., 2001 und Abb. 1.5A und D). Insbesondere die Bereiche der Domäne 3, die im Komplex in der Nähe der Syntaxin1a Linkerregion liegen, sind bei Abwesenheit von Syntaxin1a unstrukturiert. Es könnte also sein, dass durch eine Konformationsänderung von Munc18a die Interaktion mit diesem Bereich von Syntaxin1a beeinflusst werden kann. Der Linkerbereich von Syntaxin1a ist entscheidend für die Zugänglichkeit des SNARE-Motivs. Meine Ergebnisse zur „offenen“ Syntaxin1a-Mutante haben gezeigt, dass diese Syntaxin1a-Mutante (Syx1a^{L165A, E166A}) fest an Munc18a bindet, die SNARE-Komplexbildung aber nicht blockiert ist. Das ist überraschend, da die

„offene“ Syntaxin1a-Mutante auch über das N-terminale Peptid mit Munc18a interagiert und demnach die Formation des SNARE-Komplexes eigentlich blockiert sein müsste. Wird die Interaktion von der Syntaxin1a-Linkerregion mit Domäne 3 von Munc18a gestört, scheint sich höchstwahrscheinlich die Konformation des Munc18a/Syntaxin1a-Komplexes zu verändern. Diese Konformationsänderung könnte ähnlich sein, wie dies im Munc18a/Syntaxin1a-Komplex ohne N-terminales Peptid (AS 25-262) der Fall ist. Meine Experimente mittels Tryptophanfluoreszenz legen nahe, dass es Konformationsunterschiede in Munc18a gibt. Das SNARE-Motiv von der „offenen“ Syntaxin1a-Mutante scheint in Anwesenheit von Munc18a für SNAP-25 zugänglich zu sein.

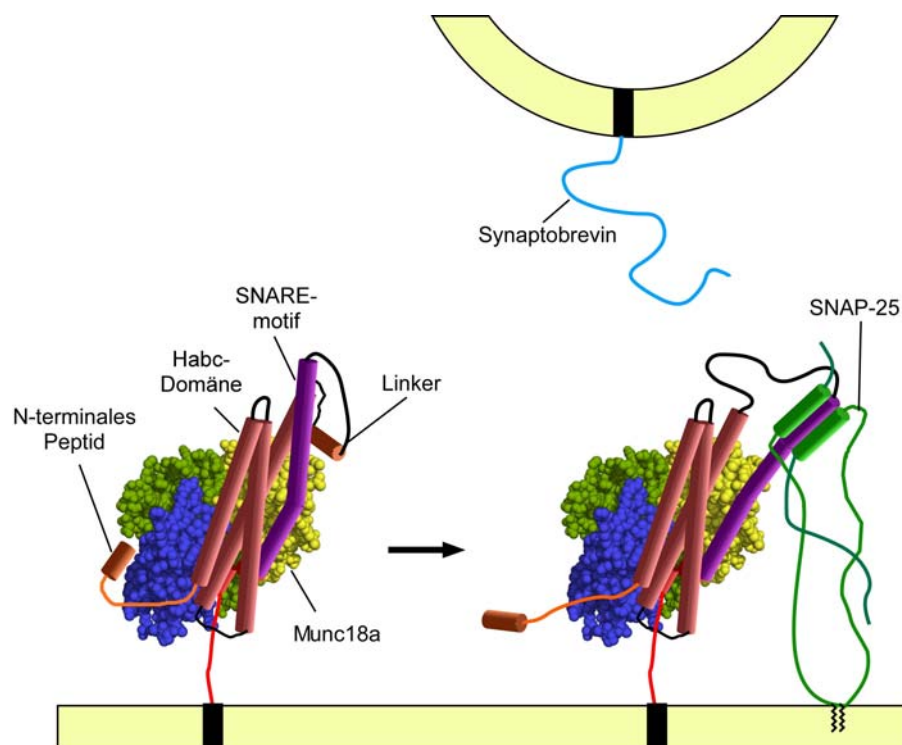


Abb. 4.2: Schematisches Modell wie sich Syntaxin1a aus der festen Umklammerung von Munc18a lösen könnte. Wenn das N-terminale Peptid von Syntaxin1a an Munc18a bindet, ist die SNARE-Komplexbildung blockiert. Die Freisetzung des N-terminalen Peptids erlaubt dagegen die SNARE-Komplexbildung. Der Status des N-terminalen Peptids von Syntaxin1a könnte durch einen noch unbekanntem Faktor beeinflusst werden.

Meine Ergebnisse aus dieser Arbeit sind in ein neues Modell eingeflossen (schematisch in Abb. 4.2 dargestellt). Nach diesem Modell reguliert Munc18a die Zugänglichkeit von Syntaxin1a (N-terminales Peptid gebunden an Munc18a). Wenn das N-terminale Peptid nicht mehr gebunden ist, unterstützt Munc18a Syntaxin1a einen SNARE-Komplex zu bilden (Freisetzung des N-terminalen Peptids). Demnach

würde Munc18a entscheidend die Zugänglichkeit von Syntaxin1a zu den SNARE-Partnern SNAP-25 und Synaptobrevin2 kontrollieren. Gleichwohl gibt es bisher keinen direkten Beweis dafür, dass das N-terminale Peptid eine Konformationsänderung in Munc18a hervorruft. Um die regulatorische Funktion des N-terminalen Peptids genau zu verstehen, ist es nötig, die Munc18a/Syntaxin1a-Kristallstruktur ohne das Syntaxin1a-Peptid zu lösen. Elektronen paramagnetische Resonanz (EPR)- und Kernmagnetische Resonanz (NMR)-Messungen könnten ebenfalls Einblicke in eine eventuelle Konformationsänderung bei der Interaktion von Munc18a und dem N-terminal verkürztem Syntaxin1a geben.

Welche Rolle könnte der hier gefundene neuartige Bindungsmechanismus von Munc18a und Syntaxin1a bei der Neurosekretion spielen? Aus einer Reihe von *in vivo* Studien geht hervor, dass Munc18a eine Rolle beim Andocken (*docking*) von synaptischen Vesikel an die Plasmamembran spielt und ebenfalls wichtig für die auf das Andocken folgende ATP- und Ca^{2+} -abhängige Reifungsreaktion synaptischer Vesikel (*priming*) ist (Übersicht in Toonen und Verhage, 2007). Munc18a könnte, wenn das N-terminale Syntaxin1a-Peptid gebunden vorliegt, die Bildung unpassender (*non cognate*) SNARE-Komplexe verhindern. Proteine, die neben Munc18a für das Andocken von Vesikeln an die Plasmamembran wichtig sind, könnten mit dem Munc18a/Syntaxin1a-Komplex interagieren und den Bindungsstatus des N-terminalen Peptids kontrollieren. So könnte sichergestellt werden, dass sich trans-SNARE-Komplexe am richtigen Ort und zur richtigen Zeit ausbilden können. Die Bindung von Munc18a an das N-terminale Peptid und die „geschlossene“ Konformation von Syntaxin1a schließen sich demnach in ihrer Funktion nicht aus, wie in Kapitel 4.1 erläutert wurde. Vielmehr ist der kooperative Bindungsmechanismus für die Funktion von Munc18a wichtig: die Kontrolle der SNARE-Komplexbildung.

Das von mir vorgestellte Modell der Funktion von Munc18a bei der Neuroexozytose erklärt ebenfalls einen bisher nicht verstandenen Sachverhalt. Im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* wurde durch eine Punktmutation das Syntaxin1a-Homolog (*unc64*) ausgeschaltet (Richmond et al., 2001). Würmer, die diese Mutation tragen, weisen sehr starke Defekte in ihrer Bewegungsfähigkeit und bei der Neurotransmitterausschüttung auf. Durch die Überexpression von Syntaxin1a (wt) und der so genannte „offenen“ Mutante (Syx^{L165A, E166A}) kann der Defekt verhindert werden (Richmond et al., 2001). Des Weiteren wurde getestet, ob Syntaxin1a und die

„offene“ Syntaxin1a-Mutante die Defekte von Proteinen wie RIM, Unc13 (=Munc13) und Unc18 (=Munc18), die für das *priming* von Vesikeln eine wichtige Rolle spielen, verhindern können (Richmond et al., 2001; Koushika et al., 2001; Weimer et al., 2003; Hammerlund et al., 2007). Syntaxin1a konnte keinen der Defekte verhindern, die „offene“ Syntaxin1a-Mutante die der Proteine RIM und Unc13, interessanterweise aber nicht den von Unc18 (Weimer et al., 2003). Dieser Befund war überraschend, da man eigentlich angenommen hatte, dass die bereits „offene“ Syntaxin1a-Mutante Munc18a nicht mehr benötige und direkt SNARE-Komplexe ausbilden könne. Meine Ergebnisse zeigen allerdings, dass die „offene“ Syntaxin1a-Mutante Munc18a sehr wohl mit hoher Affinität binden kann und dass Munc18a die SNARE-Komplexbildung kontrolliert. Dies erklärt möglicherweise, warum die „offene“ Syntaxin1a-Mutante den Defekt von Unc18 nicht verhindern kann. Auch die „offene“ Syntaxin1a-Mutante müsste demnach mit Munc18a interagieren, um SNARE-Komplexe auszubilden.

In einer weiteren Studie wurde der physiologische Effekt von Syntaxin1 in der „offenen“ Konformation untersucht (Gerber et al., 2008). Zunächst wurden Syntaxin1a und Syntaxin1b in der Maus *Mus musculus* ausgeschaltet (*double knock out*). Die Funktion des Proteins wurde durch eine *knock in*-Studie von Syntaxin1b oder einer „offenen“ Syntaxin1b-Mutante untersucht. Es zeigte sich, dass Syntaxin1b *knock in*-Mäuse keine Unterschiede in der Neurotransmission im Vergleich zu nicht manipulierten Mäusen zeigen. *Knock in*-Mäuse, die die „offene“ Syntaxin1b-Mutante exprimieren, weisen dagegen 25 % mehr gedockte Vesikel, bis zu 40 % mehr Fusion von synaptischen Vesikeln und einen ataktischen Phänotyp auf (Gerber et al., 2008). Auch diese Befunde lassen sich gut mit meinen Ergebnissen in Einklang bringen. Meine Daten zeigen, dass die „offene“ Syntaxin1a-Mutante Munc18a bindet. Allerdings ist Munc18a nicht mehr in der Lage, die SNARE-Komplexbildung der „offenen“ Mutante zu verhindern. *In vivo* könnte dieser Defekt eine vermehrte Bildung von SNARE-Komplexen zur Folge haben, was dann zu der beobachteten, erhöhten Neurotransmission führe.

Meine Daten unterstützen die Idee, dass SNAP-25 direkt mit Munc18a gebundenem Syntaxin1a interagiert. Dieser vermeintliche ternäre SNAP-25/Syntaxin1a/Munc18a-Komplex könnte ein Akzeptorkomplex für das vesikuläre Synaptobrevin2 sein. Ein ähnliches Szenario wurde kürzlich durch Experimente in exozytosekompetenten Plasmamembranpräparationen von Phaeochromocytoma Zellen (PC12)

vorgeschlagen (Zilly et al., 2006). Die Bindung von SNAP-25 an Syntaxin1a gebundenes Munc18a scheint aber eine schwache bzw. transiente Interaktion zu sein, da eine Reinigung dieses Komplexes mittels Gelfiltration nicht möglich war. *In vivo* könnte der Komplex aus SNAP-25, Syntaxin1a und Munc18a durch zusätzliche Faktoren stabilisiert werden.

Wie bereits erwähnt, deuten die meisten *in vivo* Versuche darauf hin, dass Munc18a eine entscheidende Rolle beim *docking* und *priming* von synaptischen Vesikel an die Plasmamembran innehat. Es gibt allerdings Befunde, die mit diesem Modell der Munc18a-Funktion nicht unbedingt vereinbar sind. So bindet das Munc18a-Homolog Sec1p aus *Saccharomyces cerevisiae* den ternären SNARE-Komplex, nicht aber monomeres Sso1p (Syntaxin1-Homolog) (Carr et al., 1999, Togneri et al., 2006). Dieser Bindungsmechanismus deutet daraufhin, dass Sec1p direkt an der Fusion sekretorischer Vesikel beteiligt sein könnte (Carr et al., 1999; Togneri et al., 2006). Auch für Munc18a wurde eine direkte Rolle bei der Membranfusion beschrieben. So soll Munc18a an der Fusionsporenkinetik (die Ausdehnungsgeschwindigkeit der Fusionspore) beteiligt sein, also an einem Schritt, der nach der kompletten SNARE-Komplexbildung stattfindet (Fischer et al., 2001). Dazu wurden jeweils Munc18a (wt) und eine Munc18a-Mutante (R39C), welche Syntaxin1a nicht mehr so stark binden kann, in chromaffinen Zellen überexprimiert und die Fusionsporenkinetik gemessen. Im Vergleich zur Überexpression von Munc18a (wt) hat die Überexpression der R39C-Mutante eine Verringerung der freigesetzten Transmittermenge und eine Beschleunigung im Zeitverlauf der Transmitterfreisetzung aus einzelnen Vesikeln zur Folge (Fischer et al., 2001). Allerdings beruhen die Experimente auf verhältnismäßig wenigen Datensätzen und die Überexpression von Munc18a bzw. der R39C-Mutante erfolgte in Zellen, in denen auch endogenes Munc18a vorhanden war (Fischer et al., 2001). Der Befund, dass Munc18a die Fusionsporenkinetik beeinflusst, wurde später von einer anderen Studie in Frage gestellt (Gulyas-Kovacs et al., 2007). In dieser Studie wurde die R39C-Mutante in chromaffinen Zellen expremiert, denen endogenes Munc18a fehlt (*knock out*). Dabei wurde keine Veränderung der Fusionporenkinetik gemessen (Gulyas-Kovacs et al., 2007). Daher muss angezweifelt werden, dass Munc18a eine Funktion nach der kompletten SNARE-Komplexbildung innehat. Des Weiteren wird angenommen, dass die Bindung von Munc18a an den neuronalen SNARE-Komplex, die Liposomenfusion *in vitro* stimuliert (Shen et al., 2007; Dulubova et al., 2007).

Allerdings fehlen dafür direkte Beweise. Munc18a stimulierte die Liposomenfusion nur dann, wenn es für mehrere Stunden bei 4 °C mit Liposomen inkubiert wurde, in denen jeweils Synaptobrevin2 und ein gereinigter Syntaxin1a/SNAP-25-Komplex rekonstituiert wurden (Shen et al., 2007). Im Vergleich zu Studien, in denen ein stabilisierter Syntaxin1a/SNAP-25 Akzeptorkomplex benutzt wurde (Pobbati et al., 2006), war der stimulierende Effekt von Munc18a auf die Liposomenfusion allerdings deutlich geringer. Munc18a könnte den Status des binären SNARE-Komplexes so beeinflussen, dass das Verhältnis des binären SNARE-Komplexes von 2:1 nach 1:1 verschoben wird. Dies könnte die Beschleunigung der Liposomenfusion durch Munc18a erklären. Meine Daten zeigen weiterhin, dass Munc18a das Vier-Helix-Bündel des SNARE-Komplexes nicht bindet.

4.3 Das Zusammenspiel von Munc18 und sekretorischen SNAREs in dem Choanoflagellat *Monosiga brevicollis*

Der Übergang von einzelligen zu mehrzelligen Organismen war ein zentraler Schritt in der Evolution von Tieren. Man nimmt an, dass alle Tiere einen gemeinsamen mehrzelligen Vorfahren besaßen, welcher sich sehr wahrscheinlich aus koloniebildenden Flagellaten entwickelte (Kent, 1881; Brooke et al., 2003; King, 2004). Die Suche nach dem gemeinsamen Vorfahren aller Tiere gestaltet sich als schwierig, da bisher keine Fossilienfunde vorliegen. Bereits im 19. Jahrhundert haben Wissenschaftler festgestellt, dass Choanoflagellaten und Tiere eng miteinander verwandt sein könnten. So sind Choanoflagellaten von Choanozyten (auch als Kragengeißelzellen bekannt) in Schwämmen mikroskopisch nicht zu unterscheiden (James-Clark, 1868; Kent, 1881). Choanoflagellaten und Choanozyten besitzen ein apikales Flagellum und einen Saum aus schleimtragenden Mikrovilli, welche wichtig für die Nahrungsaufnahme sind. Ähnliche Kragengeißelzellen wurden danach in anderen Tieren beobachtet, wie z.B. in Nesseltieren (Cnidaria), Plattwürmern (Platyhelminthes), Rädertierchen (Rotifera) und Stachelhäutern (Echinodermata), nicht aber in Pilzen (Fungi) oder Pflanzen (Planta). Schon im Jahre 1881 wurden Schwämme als Bindeglied (*missing link*) zwischen Tieren und ihren einzelligen Vorfahren vermutet (Kent 1881). Heutzutage zeigen phylogenetische Untersuchungen, dass Choanoflagellaten eine Schwestergruppe der Tiere sind und mit den Schwämmen engverwandt sind (King et al., 2001, Baldauf et al. 2003, Delsuc et al. 2005, King et al., 2008, Carr et al., 2008). Choanoflagellaten gelten als

nächst verwandter Einzeller aller Tiere. Choanoflagellaten und Tiere scheinen demnach einen gemeinsamen Vorfahren gehabt zu haben. Vergleiche von Genen aus heute noch lebenden Choanoflagellaten mit verschiedenen Tieren zeigen, dass Choanoflagellaten Gene besitzen, welche bisher nur in Tieren gefunden worden waren. Auch dieser Befund bestärkt die Theorie, dass Choanoflagellaten mit den Tieren eng verwandt sind. So konnte z.B. gezeigt werden, dass der Choanoflagellat *Monosiga brevicollis*, ein einzelliger Organismus, eine Vielzahl von Cadherinen besitzt (Abedin et al., 2008). Cadherine sind Adhäsionsproteine, die bisher nur in mehrzelligen, tierischen Zellen beschrieben wurden. Sie spielen unter anderem eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung von Zell-Zell-Kontakten. Durch das enge Verwandtschaftsverhältnis von Choanoflagellaten und Tieren könnten Untersuchungen von Protein-Protein-Interaktionen in Choanoflagellaten Aufschlüsse über die ursprüngliche Funktionsweise von Proteinen in dem gemeinsamen Vorfahren aller Tiere geben. Mittels vergleichender Studien zwischen Choanoflagellaten und z.B. höheren Tieren, wie den Säugetieren, könnte der Erhaltungsgrad (Konservierung) eines Gens bzw. Proteins im Verlauf der Evolution der Tiere ermittelt werden. Diese Annahme und die beiden unterschiedlichen Funktionen von SM-Proteinen in Hefen und Säugern, waren meine Motivation, das Zusammenspiel von Munc18 und sekretorischen SNAREs in dem Choanoflagellat *Monosiga brevicollis* zu untersuchen.

Phylogenetische Untersuchungen zu SNARE-Proteinen in Choanoflagellaten zeigen, dass Choanoflagellaten ein relativ simples Repertoire an SNARE-Proteinen besitzen und in der Tat mit den Tieren enger verwandt sind, als mit allen anderen untersuchten Eukaryoten (Kloepper et al., 2008). Insbesondere die sekretorischen SNARE-Proteine von *Monosiga brevicollis* sind denen der Tiere sehr ähnlich, die für die regulierte Exozytose verantwortlich sind. SNAP-25 enthält ein kurzes Stück mit Cysteinen am C-terminalen Ende des Qb-SNARE-Motivs (Kloepper et al., 2008). In Vertebraten werden diese Cysteine *in vivo* palmyliert, um für die Membranverankerung von SNAP-25 zu sorgen (Veit et al., 1996). Diese vier Cysteine am C-terminalen Ende des Qb-SNARE-Motivs von SNAP-25 sind in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* nicht vorhanden. Des Weiteren ist das N-terminale Peptid von Syntaxin1 in *Monosiga brevicollis* konserviert. Wie ich in dieser Arbeit zeigen konnte, bindet Munc18a gleichzeitig das N-terminale Peptid und die „geschlossene“ Konformation von Syntaxin1a. Im Gegensatz dazu, bindet Sec1p aus

der Hefe nicht Sso1p (Carr et al., 1999). Interessanterweise zeigen Sequenzanalysen von Syntaxin1 aus verschiedenen eukaryotischen Organismen, dass in allen Vertretern der Tiere, in dem Choanoflagellaten *Monosiga brevicollis* und in dem Pilz *Rhizopus oryzae* das N-terminale Peptid mit dem DRT/LxxL-Motiv vorhanden ist (Abb. 4.3, das Motiv ist rot gekennzeichnet). In vielen weiteren Pilzen scheint kein N-terminales Peptid mit diesem Motiv vorhanden zu sein (Abb. 4.3). Der Pilz *Rhizopus oryzae* gehört zu den sehr ursprünglichen Pilzen, später entstandene Pilze scheinen das N-terminale Peptid teilweise (*Ustilago maydis*) oder ganz (darunter auch *Saccharomyces cerevisiae*) verloren zu haben. So fehlen bei der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* konservierte Aminosäuren im N-terminalen Peptid von Sso1p, welche die Interaktion mit Sec1p vermitteln könnten. Dies könnte erklären, warum Sec1p Sso1p nicht direkt binden kann (Carr et al., 1999; Togneri et al., 2006). So wurde für die SM-Proteine Munc18c, Sly1p und Vps45 beobachtet, dass diese die jeweiligen Syntaxine nur binden können, wenn das N-terminale Peptid vorhanden ist (Latham et al., 2006, Yamaguchi et al., 2002, Dulubova et al., 2002).

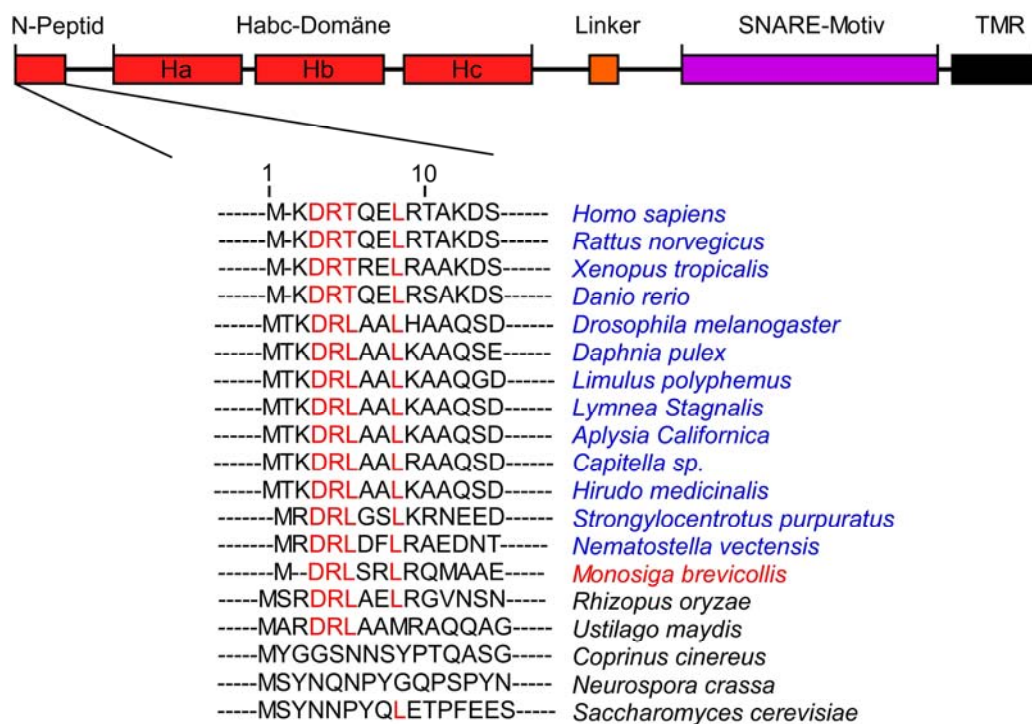


Abb. 4.3: Sequenzvergleich des N-terminalen Peptids von Syntaxin1. Mit Hilfe des Programms T-Coffee (Notredame et al., 2000) wurde die Sequenzen von Syntaxin1 aus verschiedenen Tieren (blau), Pilzen (schwarz) und dem Choanoflagellaten *Monosiga brevicollis* (rot) analysiert. In allen Vertretern der Tiere, in dem Choanoflagellaten *Monosiga brevicollis* und dem Pilz *Rhizopus oryzae* ist das N-terminale Peptid vorhanden (DRT/LxxL-Motiv).

In dieser Arbeit habe ich die biochemischen und biophysikalischen Eigenschaften der sekretorischen SNAREs aus *Monosiga brevicollis* untersucht. Es stellte sich heraus, dass die SNARE-Proteine Syntaxin1, SNAP-25 und Synaptobrevin aus *Monosiga brevicollis* einen SDS-resistenten SNARE-Komplex ausbilden. Mit Hilfe der CD-Spektroskopie konnte gezeigt werden, dass der SNARE-Komplex aus Choanoflagellaten alpha-helikally ist und eine hohe Schmelztemperatur aufweist. SNARE-Proteine aus Choanoflagellaten besitzen somit sehr ähnliche Eigenschaften wie neuronale SNARE-Proteine. Wie zu erwarten war, scheint der grundlegende molekulare Mechanismus der Membranfusion bei der Sekretion auch in Choanoflagellaten hoch konserviert zu sein.

Weiterhin wurde untersucht, ob Munc18 aus Choanoflagellaten in der Lage ist, Syntaxin1 zu binden. Mittels Isothermaler Titrationskalorimetrie konnte ich zeigen, dass Munc18 Syntaxin1 in der Tat bindet. Auch das N-terminale Peptid von Syntaxin1 nimmt an der Bindung zu Munc18 teil, da ein N-terminal verkürztes Syntaxin1-Fragment Munc18 mit einer geringeren Affinität und Reaktionsenthalpie bindet. Da die thermodynamischen Parameter der Munc18/Syntaxin1-Interaktion in Choanoflagellaten im Vergleich zu der Munc18a/Syntaxin1a-Interaktion in Säugetieren sehr ähnlich sind, kann man davon ausgehen, dass auch in Choanoflagellaten Munc18 das N-terminale Peptid und die „geschlossene“ Konformation von Syntaxin1 gleichzeitig bindet. Demnach ist die Interaktion von Munc18 und Syntaxin1 in Choanoflagellaten und Säugetieren hoch konserviert. Es ist anzunehmen, dass Munc18 auch in *Monosiga brevicollis* essentiell für die Sekretion ist.

Darüber hinaus wurde der Einfluss von Munc18 auf die SNARE-Komplexbildung in *Monosiga brevicollis* untersucht. So blockiert Munc18 aus *Monosiga brevicollis* die SNARE-Komplexbildung *in vitro*. Wird ein N-terminal verkürztes Syntaxin1 mit Munc18, Synaptobrevin und SNAP-25 vermischt, ist Munc18 nicht mehr in der Lage, die SNARE-Komplexbildung zu blockieren. Munc18 reguliert demnach auch in Choanoflagellaten die SNARE-Komplexbildung. Der Mechanismus dieser Regulation scheint in Choanoflagellaten und Vertebraten gleich zu sein. Durch eine mögliche Konformationsänderung in Munc18a kann SNAP-25 und Synaptobrevin2 Munc18a gebundenes Syntaxin1a binden. Wie bereits erwähnt, wurde vor kurzem postuliert, dass die Bindung von Munc18 an die „geschlossene“ Konformation von Syntaxin1 und die daraus resultierende Inhibition der SNARE-Komplexbildung ein

Spezialfall der Neuroexozytose ist (Shen et al., 2007, Dulubova et al., 2007). Diese Annahme sollte in Anbetracht der hier präsentierten Daten neu überdacht werden. Nicht nur die Bindung von Munc18 an die „geschlossene“ Konformation von Syntaxin1 ist von Choanoflagellaten bis zu Säugetieren hoch konserviert, sondern auch die regulative Funktion von Munc18 bei der SNARE-Komplexbildung. Es scheint, dass die Fähigkeit von Munc18 das N-terminale Peptid und die „geschlossene“ Konformation von Syntaxin1a zu binden, der Normalfall der regulativen Aufgabe von Munc18 ist.

In der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* fand man heraus, dass das Munc18-Homolog Sec1p monomeres Syntaxin1a (Sso1p) nicht bindet (Togneri et al., 2006). Weiterhin wurde beschrieben, dass Sec1p den assemblierten SNARE-Komplex der Hefe bindet (Carr et al., 1999, Togneri et al., 2006). Die Interaktion des SM-Proteins Sec1p mit dem assemblierten SNARE-Komplex könnte ein Spezialfall in Hefen sein. Die genaue Funktion der Interaktion von Sec1p mit dem SNARE-Komplex bei der Membranfusion ist unklar. Die Interaktion von Sec1p mit dem SNARE-Komplex wurde allerdings bisher nur mittels GST-Bindungsstudien untersucht. In Zukunft sollte die Interaktion von Sec1p und SNARE-Komplex mit quantitativen Proteinbindungsstudien genauer untersucht werden. Diese würden einen besseren Vergleich zu meinen Daten erlauben.

4.4 Ein möglicher Sekretionsapparat in Choanoflagellaten

Die neuronalen SNARE-Proteine Syntaxin1a, SNAP-25 und Synaptobrevin2 sind Teil eines hochkomplizierten Sekretionsapparates in Nervenzellen. Dieser Apparat erlaubt den Nervenzellen Neurotransmitter aus synaptischen Vesikeln freizusetzen und sorgt so für die Weiterleitung von Informationen zwischen benachbarten Nervenzellen. In Nervenzellen ist Synaptobrevin das am häufigsten vorkommende Protein auf synaptischen Vesikeln (Takamori et al., 2006) und demnach wichtiger Bestandteil des Sekretionsapparates. Mehrere meiner Ergebnisse legen nahe, dass der Choanoflagellat *Monosiga brevicollis* einen Sekretionsapparat besitzt. So besitzt *Monosiga brevicollis* SNARE-Proteine, die den sekretorischen SNARE-Proteinen in Tieren sehr ähneln. Die SNARE-Proteine aus *Monosiga brevicollis* sind in der Lage, stabile alpha-helikale Komplexe auszubilden, die sehr wahrscheinlich die Fusion sekretorischer Vesikel mit der apikalen Plasmamembran vermitteln. Des Weiteren ist Munc18 in der Lage, die SNARE-Komplexbildung direkt zu beeinflussen. Munc18

könnte somit ebenfalls Teil des Sekretionsapparates von *Monosiga brevicollis* sein. Meine immunfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigen, dass Synaptobrevin nur in einer ganz bestimmten apikalen Region von *Monosiga brevicollis* lokalisiert ist. Eine Doppelfärbung mit dem Golgi-Marker GM-130 und Synaptobrevin-Antikörper zeigte eine klare Überlappung. Der Golgi-Apparat befindet sich demnach, wie auch ein möglicher Sekretionsapparat, in einer apikalen Region des Choanoflagellaten. Elektronenmikroskopische Aufnahmen bestätigen die Lokalisation des Golgi-Apparates in der apikalen Region. Des Weiteren konnten mittels Elektronenmikroskopie verschieden große Vesikel in der Nähe des Golgi-Apparates beobachtet werden. Synaptobrevin könnte auf diesen Vesikeln lokalisiert sein. In Zukunft soll mittels Immunogold-Elektronenmikroskopie gezeigt werden, auf welchen Vesikeln Synaptobrevin lokalisiert ist.

Der Sekretionsapparat in *Monosiga brevicollis* scheint jedoch sehr einfach zu sein, da Choanoflagellaten nach vorläufiger Inspektion des Genoms ein Proteinapparat fehlt, mit dem die sekretorischen SNARE-Proteine Kalzium-abhängig kontrolliert werden könnten. So besitzen Choanoflagellaten nicht das Kalzium-bindende, neuronenspezifische Protein Synaptotagmin1. Auch das spezifisch den neuronalen SNARE-Komplex bindende Protein Complexin fehlt in Choanoflagellaten. Was aber könnte dann der Auslöser für eine kontrollierte Sekretion in *Monosiga brevicollis* sein? Eine Antwort darauf könnte die durch SNARE- und SM-Protein vermittelte Translokation von Glucose-Transportern auf die Zelloberfläche bestimmter Zellen in Säugern geben. Steigt der Blutzuckerspiegel nach Aufnahme von kohlenhydratreicher Nahrung an, wird von den beta-Zellen der Bauchspeicheldrüse Insulin ins Blut ausgeschüttet. Muskel-, Leber- und Fettgewebszellen besitzen Insulin-Rezeptoren auf der Plasmamembran, die durch das ausgeschüttete Insulin aktiviert werden können. Insulin bindet an Insulin-Rezeptoren und aktivieren diese. Der intrazelluläre Teil des Rezeptors fungiert als Tyrosin-spezifische Proteinkinase und bewirkt die Phosphorylierung verschiedener intrazellulärer Proteine. Phosphoryliertes Insulin-Rezeptor-Substrat-1 (IRS-1) aktiviert das Enzym Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) zur Bildung von Phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphat (PIP₃). PIP₃ wiederum aktiviert die Proteinkinase B (PKB). PKB bewirkt schließlich, dass Vesikel mit dem sonst auf der Zelloberfläche nicht vorhandenen GLUT4-Glucose-Transporter mit der Zellmembran von Muskel- und Leber- und Fettgewebszellen verschmelzen (Übersicht in Bryant et al., 2002). An der

Fusion dieser Vesikel mit der Plasmamembran sind die SNARE-Proteine Syntaxin4, SNAP-23, Synaptobrevin2 und das SM-Protein Munc18c beteiligt (Thurmond et al., 2000). Diese Proteine bilden den eigentlichen Fusionsapparat, der aber offensichtlich anders als in Neuronen aktiviert werden kann. Sobald der Glukose-Transporter sich in der Plasmamembran befindet, sorgt dieser für eine schnelle Glukoseaufnahme und damit für eine Senkung des Blutzuckerspiegels. Das Beispiel des insulinabhängigen Glucosetransports zeigt, dass die kontrollierte Fusion von Vesikeln mit der Plasmamembran auch kalziumunabhängig erfolgen kann. Man nimmt an, dass in Nervenzellen der Einstrom von Kalziumionen in das Zellinnere und die anschließende Bindung an Synaptotagmin der Auslöser für die Fusion von Vesikeln ist. In Muskel-, Leber- und Fettgewebszellen löst die Bindung von Insulin an die extrazelluläre Domäne des Insulin-Rezeptors eine Kaskade von intrazellulären Phosphorylierungsreaktionen aus, welche die Fusion von Vesikeln zur Folge hat. Ein vergleichbarer Mechanismus ist in Choanoflagellaten vorstellbar. Wie bereits erwähnt, besitzt *Monosiga brevicollis* ein apikales Flagellum, welches von einem Kragen aus Mikrovilli umgeben ist (King et al., 2008, Abedin et al., 2008). Interessanterweise dienen das Flagellum und der schleimtragende Kragen der Nahrungsaufnahme (Leadbeater et al., 1974). Choanoflagellaten nehmen Bakterien aus dem sie umgebenden Medium auf, indem sie mit der Bewegung ihres Flagellums diese in ihren Kragen strudeln. Die Bakterien gelangen danach zur apikalen Plasmamembran und werden dort über Phagozytose aufgenommen (Boenigk et al., 2002, Abedin et al., 2008). Bisher ist nur wenig über den molekularen Mechanismus der Nahrungsaufnahme bei *Monosiga brevicollis* bekannt. Interessanterweise wurden kürzlich Zelladhäsionsproteine (Cadherine) in *Monosiga brevicollis* entdeckt, welche unter anderem an der apikalen Plasmamembran lokalisiert sind (King et al., 2003, Abedin et al., 2008). Zelladhäsionsproteine wurden bislang nur in Tieren beschrieben, hingegen ist die Funktion von Cadherinen in dem einzelligen Organismus *Monosiga brevicollis* völlig unklar. Cadherine könnten möglicherweise einen Kontakt zwischen Bakterien und Choanoflagellaten vermitteln (ebenfalls ein Zelladhäsionsmechanismus). So konnte gezeigt werden, dass in Tieren bestimmte Cadherine auf Epithelzellen (E-Cadherine) von pathogenen Bakterien gebunden werden. Diese Bindung ist wichtig für das Eindringen der Bakterien in diese Epithelzellen (Mengaud et al., 1996; Boyle et al., 2003, Blau et al., 2007). In Cadherinen aus *Monosiga brevicollis* wurden Domänen entdeckt (Src-Homology₂

(SH2)-Domäne und Tyrosin-Phosphatase-Domäne), welche für intrazelluläre Signaltransduktionen wichtig sind (Abedin et al., 2008). Ein Cadherin-vermittelter Kontakt zwischen Bakterienzelle und Choanoflagellatenzelle könnte eine Kaskade von intrazellulären Phosphorylierungsreaktionen in *Monosiga brevicollis* auslösen. *Monosiga brevicollis* wäre so in der Lage, direkt auf extrazelluläre Signale aus der Umgebung (z.B. Kontakt mit Bakterien) zu reagieren. Die Antwort darauf könnte die SNARE- und SM-Protein vermittelte Sekretion bestimmter Moleküle sein. Es wäre denkbar, jedoch sehr spekulativ, dass Phagozytose-Rezeptoren in sekretorischen Vesikeln zur apikalen Plasmamembran transportiert werden und dort mit dieser verschmelzen. Diese Rezeptoren würden dann die Aufnahme (Phagozytose) des Bakteriums in die Choanoflagellatenzelle einleiten. Vorstellbar wäre ebenfalls, dass bestimmte Moleküle in den extrazellulären Raum sekretiert werden. So könnten Polysaccharide oder Enzyme ausgeschüttet werden, um weitere Bakterien anzulocken oder um mit der Verdauung von Bakterien zu beginnen. Der Sekretionsapparat von *Monosiga brevicollis* könnte demnach durch die Bindung von Bakterien an Cadherine oder Rezeptoren an der Zelloberfläche von Choanoflagellaten kontrolliert werden. *Monosiga brevicollis* wäre so in der Lage, auf Reize aus der Umgebung zu reagieren und je nach Reiz eventuell verschiedene Moleküle zu sekretieren.

Die Komplexität von Nervensystemen hat im Verlauf der Evolution von den basalen Metazoen zu den Vertebraten kontinuierlich zugenommen (Sanes, Reh and Harris, Development of the Nervous System, 2006). Der einfache Sekretionsapparat in heute noch lebenden Choanoflagellaten zeigt, wie ein möglicher Sekretionsapparat in dem gemeinsamen Vorfahren aller Tiere vor 600 Millionen Jahren ausgesehen haben könnte. Dieser Sekretionsapparat könnte der grundlegende Bauplan für Sekretionsapparate der Tiere gewesen sein, bis hin zu dem hoch komplizierten Sekretionsapparat in Nervenzellen. Das konservierte Zusammenspiel von Munc18 und SNARE-Proteinen sprächen für diese Hypothese. In Tieren sind wahrscheinlich viele neue Faktoren in den Sekretionsapparat integriert worden. Der einfache Sekretionsapparat von *Monosiga brevicollis* bietet die Möglichkeit den grundlegenden Aufbau zu studieren.

5. Zusammenfassung

Membranfusionsereignisse zwischen den verschiedenen Kompartimenten eukaryotischer Zellen werden durch zwei konservierte Proteinfamilien vermittelt: SNARE- und Sec1/Munc18 (SM)-Proteine. Die SNARE-Proteine Syntaxin1a, SNAP-25 und Synaptobrevin2 sind in Nervenzellen an der Fusion synaptischer Vesikel mit der Plasmamembran beteiligt. Syntaxin1a und SNAP-25 sind auf der Plasmamembran lokalisiert, Synaptobrevin2 auf der Vesikelmembran. Die Komplexbildung der drei Membranproteine zwischen Plasma- und Vesikelmembran leitet die Fusion ein. SM-Proteine interagieren mit SNARE-Proteinen, allerdings ist der genaue molekulare Mechanismus dieser Interaktion noch nicht wirklich aufgeklärt. So bindet das SM-Protein Munc18a fast die gesamte zytosolische Domäne von Syntaxin1a in der so genannten „geschlossenen“ Konformation. Mehrere andere SM-Proteine (i.e. Munc18c, Sly1, Vps45) scheinen dagegen nur ein kurzes N-terminales Peptid für die Bindung an ihren Syntaxinpartner zu verwenden. Im ersten Teil dieser Arbeit konnte ich mittels ITC zeigen, dass für eine hochaffine Bindung von Munc18a und Syntaxin1a nicht nur Kontakte von der „geschlossenen“ Konformation, sondern zusätzlich Kontakte vom N-terminalen Peptid von Syntaxin1a nötig sind. In der Tat konnte das N-terminale Peptid in eine zuvor übersehene Elektronendichte in der Kristallstruktur eingefügt werden. Diese befindet sich an der äußeren Oberfläche der Domäne 1 von Munc18a. Die Elektronendichte konnte verfeinert werden und die Aminosäuren 2-9 vom N-terminalen Syntaxin1a-Peptid in die Elektronendichte eingebaut werden. Des Weiteren wurde ein zweites SM-Protein/Syntaxin-Paar untersucht. Auch für eine hochaffine Interaktion von Vps45 und Syntaxin16 ist das N-terminale Peptid und der gesamte Rest des Syntaxin16-Moleküls, sehr wahrscheinlich in einer „geschlossenen“ Konformation, an der Bindung beteiligt. Meine Arbeit zeigt, dass SM-Protein/Syntaxin-Paare über einen konservierten Bindungsmechanismus interagieren. An der kooperativen Bindung scheinen jeweils zwei Bereiche von Syntaxin1a beteiligt.

Im zweiten Abschnitt der Arbeit wurde der Einfluss von Munc18a auf die SNARE-Komplexbildung untersucht. Es ist seit einiger Zeit bekannt, dass Munc18a Syntaxin1a bindet und die SNARE-Komplexbildung *in vitro* blockiert. Bisher konnte allerdings nicht geklärt werden, wie Syntaxin1a sich aus der festen Umklammerung von Munc18a befreien kann. In der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden,

dass die Interaktion von Munc18a mit dem N-Peptid nötig ist, um die SNARE-Komplexbildung unterbinden zu können. Wurde das N-terminale Peptid von Syntaxin1a entfernt oder die Bindung durch Punktmutationen im N-terminalen Peptid bzw. in der Munc18a-Bindestelle gestört, war die SNARE-Komplexbildung in Anwesenheit von Munc18a nicht mehr blockiert. Dieser Befund weist auf einen möglichen Konformationswechsel im Munc18a/Syntaxin1a-Komplex hin.

Abschließend wurde die Interaktion von Munc18 und Syntaxin1 und die Rolle von Munc18 bei der SNARE-Komplexbildung in dem Choanoflagellaten *Monosiga brevicollis*, einem den Tieren nahe verwandter Einzeller, untersucht. Es stellte sich heraus, dass nicht nur die Bindung von Munc18 an das N-terminale Peptid und die „geschlossene“ Konformation von Syntaxin1 in Choanoflagellaten hoch konserviert ist, sondern auch die regulative Funktion von Munc18 bei der SNARE-Komplexbildung. Des Weiteren legen meine licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen nahe, dass *Monosiga brevicollis* einen Sekretionsapparat besitzt, welcher sich in der apikalen Region der Zelle befindet.

6. Summary

Membrane fusion events between various intracellular compartments in eukaryotic cells are mediated by two conserved protein families: SNARE- and Sec1/Munc18 (SM)-proteins. The SNARE proteins syntaxin1, SNAP-25, and synaptobrevin2 play a central role during fusion of synaptic vesicles with the plasma membrane. Syntaxin1 and SNAP-25 are located in the plasma membrane, whereas synaptobrevin2 resides on synaptic vesicles. Their assembly into a membrane-bridging ternary SNARE complex is believed to drive fusion. SM-proteins interact with SNARE-proteins but the molecular basis for this interaction is not entirely understood. Munc18a binds the cytosolic domain of syntaxin1a in a so called “closed” conformation. A binding mode distinct from that of Munc18a/syntaxin1a appears to govern the interaction of several other SM-proteins (i.e. Munc18c, Sly1, Vps45) with their cognate syntaxins. In these complexes the far N-terminal region of syntaxin binds to the SM-protein.

In the first part of this thesis it is shown that Munc18a binds simultaneously to the “closed” conformation of syntaxin1a and to the N-terminal peptide of syntaxin1a by ITC. In addition, residual electron density on the outer surface of domain 1 of Munc18a was uncovered, a finding that had been overlooked until now. Re-refinement of the Munc18a/syntaxin1a-structure improved the electron density within this region, and residues 2–9 of syntaxin1a could be modelled. A second SM-protein/syntaxin-pair was also investigated. It was observed that the N-terminal peptide of syntaxin 16 binds to the SM-protein Vps45, while the remainder of syntaxin 16, probably in a “closed” conformation strongly enhances the affinity of the interaction. Collectively these data indicate that SM-proteins interact with their cognate syntaxins via a conserved binding mechanism. Two regions of syntaxin appear to cooperatively bind Munc18a.

Next, the role of Munc18a in controlling SNARE complex assembly was investigated. It has previously been established, that Munc18a binds syntaxin1a and thereby blocks SNARE-complex assembly *in vitro*. However, how syntaxin1a can escape the tight grip of Munc18a, thus enabling its participation in SNARE complex formation remains unclear. Here it is demonstrated, that the interaction of Munc18a with the N-terminal peptide of syntaxin1a is essential for the inhibition of SNARE-complex formation. Removal of the N-terminal peptide of syntaxin1a, and either

point mutations in the peptide, or in the Munc18a binding site, allowed for SNARE complex formation of Munc18a-bound syntaxin1a. These results suggest a conformational change in the Munc18a/syntaxin1a-complex.

In the third section, the interaction of Munc18 and syntaxin1 and the role of Munc18 in SNARE-complex assembly in the choanoflagellate *Monosiga brevicollis*, a unicellular organism believed to be the closest known relative of animals, was investigated. The results indicate that not only is the binding of Munc18 to the N-terminal peptide and the “closed” conformation of syntaxin1 conserved, but also the regulative function of Munc18 in controlling SNARE-complex assembly in choanoflagellates. Furthermore using light- and electron microscopy it was shown that *Monosiga brevicollis* appears to possess a secretion apparatus localized to the apical region of the cell.

Abedin, M., King, N. (2008), The premetazoan ancestry of cadherins. *Science* 319:946-8

Antonin, W., Holroyd, C, Fasshauer, D., Pabst, S., Von Mollard, G. F., Jahn, R. (2000) A SNARE complex mediating fusion of late endosomes defines conserved properties of SNARE structure and function. *EMBO J.* 23:6453–64

Antonin, W., Fasshauer, D., Becker, S., Jahn, R. and Schneider, T. R. (2002) Crystal structure of endosomal SNARE complex reveals common structural principles of all SNAREs. *Nat Struct Biol.* 9:107-11

Balch, W. E., Dunphy, W. G., Braell, W. A. and Rothman, J. E. (1984) Reconstitution of the transport of protein between successive compartments of the Golgi measured by the coupled incorporation of N-acetylglucosamine. *Cell* 39:405-16

Baldauf, S. L. (2003) The deep roots of eukaryotes. *Science*, 3:1703-6

Bennett, M. K., García-Arrarás, J. E., Elferink, L. A., Peterson, K., Fleming, A. M., Hazuka, C. D., and Scheller, R. H. (1993) The syntaxin family of vesicular transport receptors. *Cell* 74:863-873

Blasi, J., Chapman, E. R., Yamasaki, S., Binz, T., Niemann, H. and Jahn, R. (1993a) Botulinum neurotoxin C1 blocks neurotransmitter release by means of cleaving HPC 1 / syntaxin. *EMBO J.* 12:4821-8

Blasi, J., Chapman, E. R., Link, E., Binz, T., Yamasaki, S., De Camilli, P., Südhof, T.C., Niemann, H. and Jahn, R. (1993b) Botulinum neurotoxin A selectively cleaves the synaptic protein SNAP 25. *Nature* 365:160-3

Blau, K., Portnoi, M., Shagan, M., Kaganovich, A., Rom, S., Kafka, D., Chalifa, Caspi, V., Porgador, A., Givon-Lavi, N., Gershoni, J. M., Dagan, R., Mizrahi, Nebenzahl, Y. (2007) Flamingo cadherin: a putative host receptor for *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis.* 195:1828-37

- Block, M. R., Glick, B. S., Wilcox, C. A., Wieland, F. T., and Rothman, J. E.** (1988) Purification of an *N*-ethylmaleimide-sensitive protein catalyzing vesicular transport. Proc Natl Acad Sci USA 85:7852-7856
- Bock, J. B., Matern, H. T., Peden, A. A., Scheller, R. H.** (2001) A genomic perspective on membrane compartment organization. Nature 409:839-41
- Boenigk, J., Arndt, H.** (2002) Bacterivory by heterotrophic flagellates: community structure and feeding strategies. Antonie Van Leeuwenhoek. 81:465-80
- Boyle, E. C., Finlay, B. B.** (2003) Bacterial pathogenesis: exploiting cellular adherence. Curr Opin Cell Biol. 15:633-9
- Bracher, A., Perrakis, A., Dresbach, T., Betz, H., Weissenhorn, W.** (2000) The X-ray crystal structure of neuronal Sec1 from squid sheds new light on the role of this protein in exocytosis. Structure 15:685-94
- Bracher, A., Weissenhorn, W.** (2001) Crystal structures of neuronal squid Sec1 implicate inter-domain hinge movement in the release of t-SNAREs. J Mol Biol. 9:7-13
- Bracher, A., Weissenhorn, W.** (2002) Structural basis for the Golgi membrane recruitment of Sly1p by Sed5p. The EMBO J. 21:6114-24
- Bradford, M. M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72:248-54
- Brenner, S.** (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. Genetics 77, 71-94
- Broadie K., S.** (1995) Genetic dissection of the molecular mechanisms of transmitter vesicle release during synaptic transmission. J Physiol Paris. 89:59-70

Brooke, N. M., Holland, P.W. (2003) The evolution of multicellularity and early animal genomes. *Curr Opin Genet Dev.* 13:599-603

Bryant, N., J., Govers, R., James, D. E. (2002) Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3:267-77

Burgoyne, R. D., Morgan, A. (2007) Membrane trafficking: three steps to fusion. *Curr Biol.* 3:R255-8

Burkhardt, P., Hattendorf, D. A., Weis, W. I., Fasshauer, D. (2008) Munc18a controls SNARE assembly through its interaction with the syntaxin N-peptide. *EMBO J.* 27:923-933

Cao, X., Ballew, N., Barlowe, C. (1998) Initial docking of ER-derived vesicles requires Usa1p and Ypt1p but is independent of SNARE proteins. *EMBO J.* 17:2156-65

Carr C. M., Grote E., Munson M., Hughson F. M., Novick P. J. (1999) Sec1p binds to SNARE-Complexes and Concentrates at Sites of Secretion. *J Cell Biol.* 146:333-44

Carr, M., Leadbeater, B. S., Hassan, R., Nelson, M., Baldauf, S.L. (2008) Molecular phylogeny of choanoflagellates, the sister group to Metazoa. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:16641-6

Clary, D.O. and Rothman, J.E. (1990) Purification of three related peripheral membrane proteins needed for vesicular transport. *J Biol Chem.* 265:10109-17

Clary, D.O., Griff, I.C. and Rothman, J.E. (1990) SNAPs, a family of NSF attachment proteins involved in intracellular membrane fusion in animals and yeast. *Cell* 61:709-21

D'Andrea-Merrins, M., Chang, L., Lam, A. D., Ernst, S. A., Stuenkel, E. L. (2007) Munc18c interaction with syntaxin 4 monomers and SNARE complex intermediates in GLUT4 vesicle trafficking. J Biol Chem. 282:16553-66

Deitcher, D. L., Ueda, A., Stewart, B. A., Burgess, R. W., Kidokoro, Y., Schwarz, T. L. (1998) Distinct requirements for evoked and spontaneous release of neurotransmitter are revealed by mutations in the Drosophila gene neuronal synaptobrevin. J Neurosci. 18:2028–39

DeLano, W., L. (2002) The PyMOL Molecular Graphics System. Palo Alto, CA, USA: DeLano Scientific

Delsuc, F., Brinkmann, H., Philippe, H. (2005) Phylogenomics and the reconstruction of the tree of life. Nat Rev Genet. 6:361-75

Dulubova, I., Yamaguchi, T., Gao, Y., Min, S. W., Huryeva, I., Südhof, T. C., Rizo J. (2002) How Tlg2p/syntaxin16 'snares' Vps45. EMBO J. 21:3620-31

Dulubova, I., Sugita, S., Hill, S., Hosaka, M., Fernandez, I., Südhof, T. C. and Rizo, J. (1999). A conformational switch in syntaxin during exocytosis: role of Munc18. EMBO J. 18:4372-82

Dulubova, I., Khvotchev, M., Liu, S., Huryeva, I., Südhof, T.C., Rizo, J. (2007) Munc18-1 binds directly to the neuronal SNARE complex. Proc Natl Acad Sci USA 104:2697–2702

Emsley, P., Cowtan, K. (2002) Coot: model-building tools for molecular graphics. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 60:2126-32

Fasshauer, D., Bruns, D., Shen, B., Jahn, R., Brunger, A. T. (1997a) A structural change occurs upon binding of syntaxin to SNAP-25. J Biol Chem 272:4582–90

Fasshauer, D., Otto, H., Eliason, W. K., Jahn, R., Brunger, A. T. (1997b) Structural changes are associated with soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptor complex formation. J Biol Chem. 272:28036–41

- Fasshauer, D., Eliason, W. K., Brunger, A. T., Jahn, R.** (1998a) Identification of a minimal core of the synaptic SNARE complex sufficient for reversible assembly and disassembly. *Biochemistry* 37:10354–62
- Fasshauer, D., Sutton, R. B., Brunger, A. T., Jahn, R.** (1998b) Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs. *Proc Natl Acad Sci USA* 26:15781–6
- Fasshauer, D., Antonin, W., Subramaniam, V., Jahn, R.** (2002) SNARE assembly and disassembly exhibit a pronounced hysteresis. *Nat Struct Biol.* 2:144–51
- Fasshauer, D., Margittai, M.** (2004) A transient N-terminal interaction of SNAP-25 and syntaxin nucleates SNARE assembly. *J Biol Chem.* 9:7613–21
- Fernandez, I., Ubach, J., Dulubova, I., Zhang, X., Südhof, T. C., Rizo, J.,** (1998) Three-dimensional structure of an evolutionarily conserved N-terminal domain of syntaxin 1A. *Cell* 6:841–9
- Fiebig, K. M., Rice, L. M., Pollock, E., Brunger, A. T.** (1999) Folding intermediates of SNARE complex assembly. *Nat Struct Biol.* 2:117–23
- Fisher, R. J., Pevsner, J. and Burgoyne, R. D.** (2001). Control of fusion pore dynamics during exocytosis by Munc18. *Science* 291:875-8
- Gallwitz, D., Jahn, R.** (2003) The riddle of the Sec1/Munc-18 proteins - new twists added to their interactions with SNAREs. *Trends Biochem Sci.* 28:113-6
- Gengyo-Ando, K., Kamiya, Y., Yamakawa, A., Kodaira, K., Nishiwaki, K., Miwa, J., Hori, I. and Hosono, R.** (1993). The *Caenorhabditis elegans* unc-18 gene encodes a protein expressed in motor neurons. *Neuron* 11:703-11
- Gengyo-Ando K, Kuroyanagi H, Kobayashi T, Murate M, Fujimoto K, Okabe S, Mitani S.** (2007) The SM protein VPS-45 is required for RAB-5-dependent endocytic transport in *Caenorhabditis elegans*. *EMBO Rep.* 8:152-7

Geppert, M., Goda, Y., Hammer, R. E., Li, C., Rosahl, T. W., Stevens, C. F., Südhof, T. C. (1994) Synaptotagmin I: a major Ca²⁺ sensor for transmitter release at a central synapse. Cell 4:717–27

Glick, B. S. and Rothman, J. E. (1987) Possible role for fatty acyl-coenzyme A in intracellular protein transport. Nature 326:309-12.

Grabowski, R., Gallwitz, D. (1997) High-affinity binding of the yeast cis-Golgi t-SNARE, Sed5p, to wild-type and mutant Sly1p, a modulator of transport vesicle docking. FEBS Lett. 411:169-72

Gulyas-Kovacs, A., de Wit, H., Milosevic, I., Kochubey, O., Toonen, R., Klingauf, J., Verhage, M., Sorensen, J. B. (2007) Munc18-1: sequential interactions with the fusion machinery stimulate vesicle docking and priming. J Neurosci. 27:8676–8686

Hammarlund, M., Palfreyman, M. T., Watanabe, S., Olsen, S., Jorgensen, E. M. (2007) Open syntaxin docks synaptic vesicles. PLoS Biol. 5:e198

Hanson, P. I., Heuser, J. E., Jahn, R. (1997a) Neurotransmitter release - four years of SNARE complexes. Curr Opin Neurobiol 7:310–5

Hanson, P. I., Roth, R., Morisaki, H., Jahn, R., Heuser, J. E. (1997b) Structure and conformational changes in NSF and its membrane receptor complexes visualized by quick-freeze/deep-etch electron microscopy. Cell 90:523–35

Harrison, S. D., Broadie, K., van de Goor, J. and Rubin, G. M. (1994). Mutations in the Drosophila Rop gene suggest a function in general secretion and synaptic transmission. Neuron 13:555-66

Hata, Y., Slaughter, C. A. and Südhof, T. C. (1993). Synaptic vesicle fusion complex contains unc-18 homologue bound to syntaxin. Nature 366:347-51

Hayashi, T., McMahon, H., Yamasaki, S., Binz, T., Hata, Y., Südhof, T. C., Niemann, H., (1994) Synaptic vesicle membrane fusion complex: action of clostridial neurotoxins on assembly. EMBO J. 2:5051–5061

Hayashi, T., Yamasaki, S., Nauenburg, S., Binz, T. and Niemann, H. (1995) Disassembly of the reconstituted synaptic vesicle membrane fusion complex in vitro. EMBO J., 14:2317-25

Hess, D. T., Slater, T. M., Wilson, M. C., Skene, J. H. (1992) 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. J Neurosci 12:4634–41

Hosono, R., Hekimi, S., Kamiya, Y., Sassa, T., Murakami, S., Nishiwaki, K., Miwa, J., Taketo, A. and Kodaira, K. I. (1992). The unc-18 gene encodes a novel protein affecting the kinetics of acetylcholine metabolism in the nematode *Caenorhabditis elegans*. J Neurochem 58:1517-25

Hu, S. H., Latham, C. F., Gee, C. L., James, D. E., Martin, J. L. (2007) Structure of the Munc18c/Syntaxin4 N-peptide complex defines universal features of the N-peptide binding mode of Sec1/Munc18 proteins. Proc Natl Acad Sci USA 104:8773–8778

Jahn, R., Lang, T., Südhof, T. C. (2003) Membrane fusion. Cell 112:519–33

Jahn, R., Scheller. R. H. (2006) SNAREs - engines for membrane fusion. Nat Rev Mol Cell Biol. 7:631–643

James-Clark, H., (1868) On the spongiae ciliatae as infusoria flagellata; or observations on the structure, animality, and relationship of *Leucosolenia botryoides*. Annals and Magazine of Natural History 1:133–142; 188–215; 250–264

- Johnson, J. R., Ferdek, P., Lian, L. Y., Barclay, J. W., Burgoyne, R. D., Morgan, A.** (2008) Binding of UNC-18 to the N-terminus of syntaxin is essential for neurotransmission in *Caenorhabditis elegans*. *Biochem J.* Immediate Publication, doi:10.1042/BJ20081956
- Jones, T. A., Kjeldgaard, M.** (1997) Electron density map interpretation. *Methods Enzymol* 277:173–208
- Katz, B.** (1971). Quantal mechanism of neural transmitter release. *Science* 173:123-6
- Kent, W. S.** (1880–1881) A Manual of the Infusoria, Volumes, 1–3. , David Bogue, London
- Khvotchev, M., Dulubova, I., Sun, J., Dai, H., Rizo, J., Südhof, T. C.** (2007) Dual modes of Munc18-1/SNARE interactions are coupled by functionally critical binding to syntaxin-1 N terminus. *J Neurosci.* 27:12147–12155
- King, N., Carroll, S. B.** (2001) A receptor tyrosine kinase from choanoflagellates: molecular insights into early animal evolution. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98:15032-7.
- King, N., Hittinger, C.T. and Carroll, S.B.** (2003) Evolution of key cell signaling and adhesion protein families predates animal origins. *Science* 301:361–363
- King, N.** (2004) The unicellular ancestry of animal development. *Dev. Cell* 7:313–325
- King, N., Westbrook, M. J., Young, S. L., Kuo, A., Abedin, M., Chapman, J., Fairclough, S., Hellsten, U., Isogai, Y., Letunic, I., Marr, M., Pincus, D., Putnam, N., Rokas, A., Wright, K. J., Zuzow, R., Dirks, W., Good, M., Goodstein, D., Lemons, D., Li, W., Lyons, J. B., Morris, A., Nichols, S., Richter, D. J., Salamov, A., Sequencing, J. G., Bork, P., Lim, W. A., Manning, G., Miller, W. T., McGinnis, W., Shapiro, H., Tjian, R., Grigoriev, I. V., and Rokhsar, D.** (2008) The genome of the choanoflagellate *Monosiga brevicollis* and the origins of metazoan multicellularity. *Nature* 451:783-788

Klopper, T. H., Nickias Kienle, C., Fasshauer, D. (2007) An Elaborate Classification of SNARE Proteins Sheds Light on the Conservation of the Eukaryotic Endomembrane System. Mol Biol Cell. 18:3463-71

Klopper, T. H., Kienle, C. N, Fasshauer D. (2008) SNAREing the basis of multicellularity: consequences of protein family expansion during evolution. Mol Biol Evol. 25:2055-68

Koushika, S. P., Richmond, J.E., Hadwiger, G., Weimer, R.M., Jorgensen, E. M., Nonet, M.L. (2001) A post-docking role for active zone protein Rim. Nat Neurosci 4:997–1005

Laemml, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 5259:680–5

Latham, C. F., Lopez, J. A., Hu, S. H., Gee, C. L., Westbury, E., Blair, D. H., Armishaw, C. J., Alewood, P. F., Bryant, N.J., James, D. E., Martin, J. L. (2006) Molecular dissection of the Munc18c/syntaxin4 interaction: implications for regulation of membrane trafficking. Traffic 7:1408-19

Leadbeater, B. S., Morton, C. (1974) A microscopical study of a marine species of Codosiga James-Clark (Choanoflagellata) with special reference to the ingestion of bacteria. Biol. J. Linn. Soc. 6:337-347

Leadbeater, B. S., Kelly, M. (2000) Evolution of animals - choanoflagellates and sponges. Warer & Atmosphere 9:9-11

Lin, R. C., Scheller, R. H. (1997) Structural organization of the synaptic exocytosis core complex. Neuron 19:1087–94

Link, E., Edelman, L., Chou, J. H., Binz, T., Yamasaki, S., Eisel, U., Baumert, M., Südhof, T. C., Niemann, H., Jahn, R. (1992) Tetanus toxin action: inhibition of neurotransmitter release linked to synaptobrevin proteolysis. Biochem Biophys Res Commun. 189:1017–23

- Margittai, M., Widengren, J., Schweinberger, E., Schroder, G. F., Felekyan, S., Hausteil, E., Konig, M., Fasshauer, D., Grubmuller, H., Jahn, R., Seidel, C. A.** (2003a) Single-molecule fluorescence resonance energy transfer reveals a dynamic equilibrium between closed and open conformations of syntaxin 1. Proc Natl Acad Sci U S A 100:15516–21
- McEwen, J. M., Kaplan, J.M.** (2008) UNC-18 promotes both the anterograde trafficking and synaptic function of syntaxin. Mol Biol Cell. 19:3836-46
- Mengaud, J., Ohayon, H., Gounon, P., Mege, R-M., Cossart, P.** (1996) E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of L. monocytogenes into epithelial cells. Cell 22:923-32
- Misura, K. M., Scheller, R. H. and Weis, W. I.** (2000) Three-dimensional structure of the neuronal-Sec1-syntaxin 1a complex. Nature 404:355-62
- Montecucco, C., Rossetto, O., Schiavo, G.** (2004) Presynaptic receptor arrays for clostridial neurotoxins. Trends Microbiol 12: 442–6
- Nonet, M. L., Saifee, O., Zhao, H., Rand, J. B., Wei, L.** (1998) Synaptic transmission deficits in Caenorhabditis elegans synaptobrevin mutants. J Neurosci. 18:70–80
- Notredame, C., Higgins, D. G., Heringa, J.** (2000) T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. J Mol Biol.8:205-17
- Novick, P., and Schekman, R.** (1979) Secretion and cell surface growth are blocked in a temperature-sensitive mutant of Saccharomyces cerevisiae. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 1858-1862
- Novick, P., Field, C., and Schekman, R.** (1980) Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway. Cell 21:205-215

Palade, G. (1975) Intracellular aspects of the process of protein synthesis. Science 189:347-58

Peng, R. and Gallwitz, D. (2002) Sly1 protein bound to Golgi syntaxin Sed5p allows assembly and contributes to specificity of SNARE fusion complexes. J Cell Biol 157:645-55

Peng, R. and Gallwitz, D. (2004) Multiple SNARE interactions of an SM protein: Sed5p/Sly1p binding is dispensable for transport. EMBO J. 23:3939-49

Peterson, M. R., Emr, S. D. (2001) The class C Vps complex functions at multiple stages of the vacuolar transport pathway. Traffic 2:476-86

Pevsner, J., Hsu, S. C., Scheller, R. H. (1994a) n-Sec1: a neural-specific syntaxin-binding protein. Proc Natl Acad Sci U S A. 91:1445-9

Pevsner, J., Hsu, S. C., Braun, J. E., Calakos, N., Ting, A. E., Bennett, M. K., Scheller, R. H. (1994b) Specificity and regulation of a synaptic vesicle docking complex. Neuron 13:353-61

Piper, R. C., Whitters, E. A., Stevens, T. H. (1994) Yeast Vps45p is a Sec1p-like protein required for the consumption of vacuole-targeted, post-Golgi transport vesicles. Eur J Cell Biol. 65:305-18

Pobbati, A. V., Stein, A., Fasshauer, D. (2006) N- to C-terminal SNARE complex assembly promotes rapid membrane fusion. Science 313:673–6

Reim, K., Mansour, M., Varoqueaux, F., McMahon, H. T., Südhof, T. C., Brose, N., Rosenmund, C. (2001) Complexins regulate a late step in Ca²⁺-dependent neurotransmitter release. Cell 104:71–81

Richmond, J. E., Weimer, R. M., Jorgensen, E. M. (2001) An open form of syntaxin bypasses the requirement for UNC-13 in vesicle priming. Nature 412:338-

Rickman, C., Medine, C. N., Bergmann, A., Duncan, R. R. (2007) Functionally and spatially distinct modes of munc18-syntaxin1 interaction. J Biol Chem. 282:12097–12103

Rizo, J., Südhof. T. C. (2002) SNAREs and Munc18 in synaptic vesicle fusion. Nat Rev Neurosci 3:641–653

Rizo, J., Rosenmund, C. (2008) Synaptic vesicle fusion. Nat Struct Mol Biol. 15:665-74

Saifee, O., Wei, L., Nonet, M. L. (1998) The Caenorhabditis elegans unc-64 locus encodes a syntaxin that interacts genetically with synaptobrevin. Mol Biol Cell 9:1235–52

Sambrook, J., Russell, D. W. (2001) Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press

Sanes, D. H., Reh, T. A., Harris, W. A. (2006) Development of the Nervous System, Elsevier Academic Press, pp. 1-23

Schiavo, G., Papini, E., Genna, G., Montecucco, C. (1990) An intact interchain disulfide bond is required for the neurotoxicity of tetanus toxin. Infect Immun 58:4136–41

Schiavo, G., Benfenati, F., Poulain, B., Rossetto, O., Laureto, P., Polverino D.; DasGupta, B. R., Montecucco, C. (1992) Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. Nature 359:832–5

Schulze, K. L., Broadie, K., Perin, M. S., Bellen, H. J. (1995) Genetic and electrophysiological studies of Drosophila syntaxin-1A demonstrate its role in nonneuronal secretion and neurotransmission. Cell 80:311–20

Schütz, D., Zilly, F., Lang, T., Jahn, R., Bruns, D. (2005) A dual function for Munc-18 in exocytosis of PC12 cells. Eur J Neurosci. 21:2419-32

Scott, B. L., Van Komen, J. S., Irshad, H., Liu, S., Wilson, K. A., McNew, J.A. (2004) Sec1p directly stimulates SNARE-mediated membrane fusion in vitro. J Cell Biol. 167:75–85

Schoch, S., Deak, F., Königstorfer, A., Mozhayeva, M., Sara, Y., Südhof, T. C., Kavalali, E. T. (2001) SNARE function analyzed in synaptobrevin/VAMP knockout mice. Science 294:1117–22

Schulze, K. L., Littleton, J. T., Salzberg, A., Halachmi, N., Stern, M., Lev, Z. and Bellen, H. J. (1994). Rop, a Drosophila homolog of yeast Sec1 and vertebrate n-Sec1/Munc-18 proteins, is a negative regulator of neurotransmitter release in vivo. Neuron 13:1099-108

Shen J, Tareste DC, Paumet F, Rothman JE, Melia TJ (2007) Selective activation of cognate SNAREpins by Sec1/Munc18 proteins. Cell 128:183–195

Sollner, T., Whiteheart, S. W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P., Rothman, J. E. (1993a) SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. Nature 362:318–24

Sollner, T., Bennett, M. K., Whiteheart, S. W., Scheller, R. H., Rothman, J. E. (1993b) A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. Cell 75:409–18

Sorensen, J. B., Wiederhold, K., Müller, E.M., Milosevic, I., Nagy, G., Groot, B. L., Grubmüller, H., Fasshauer, D. (2006) Sequential N- to C-terminal SNARE complex assembly drives priming and fusion of secretory vesicles. EMBO J. 25:955–

Strop, P., Kaiser, S. E., Vrljic, M., Brunger, A. T. (2008) The structure of the yeast plasma membrane SNARE complex reveals destabilizing water-filled cavities. J Biol Chem. 283:1113-9

Südhof, T. C., Rothman, J. E. (2009) Membrane Fusion: Grappling with SNARE and SM Proteins. Science. 323:474-477

Sutton, R. B., Fasshauer, D., Jahn, R. and Brünger, A. T. (1998) Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. Nature, 395:347-53

Takamori, S., Holt, M., Stenius, K., Lemke, E. A., Grønborg, M., Riedel, D., Urlaub, H., Schenck, S., Brügger, B., Ringler, P., Müller, S. A., Rammner, B., Gräter, F., Hub, J. S., De Groot, B. L., Mieskes, G., Moriyama, Y., Klingauf, J., Grubmüller, H., Heuser, J., Wieland, F., Jahn, R. (2006) Molecular anatomy of a trafficking organelle. Cell 127:831–46

Thurmond, D. C., Pessin, J. E. (2000) Discrimination of GLUT4 vesicle trafficking from fusion using a temperature-sensitive Munc18c mutant. EMBO J. 17:3565-75

Togneri, J., Cheng, Y. S., Munson, M., Hughson, F. M., Carr, C. M. (2006) Specific SNARE complex binding mode of the Sec1/Munc-18 protein, Sec1p. Proc Natl Acad Sci USA. 103:17730-5

Toonen, R. F., Wierda, K., Sons, M. S., de Wit, H., Cornelisse, L. N., Brussaard. A., Plomp. J.J., Verhage. M. (2006) Munc18-1 expression levels control synapse recovery by regulating readily releasable pool size. Proc Natl Acad Sci USA.28:18332-7

Toonen, R. F., Verhage, M. (2007) Munc18-1 in secretion: lonely Munc joins SNARE team and takes control. Trends Neurosci. 30:564-72

Trimble, W. S., Cowan, D. M., and Scheller, R. H. (1988) VAMP-1: A synaptic vesicle-associated integral membrane protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:4538-4542

Verhage, M., Maia, A. S., Plomp, J. J., Brussaard, A. B., Heeroma, J. H., Vermeer, H., Toonen, R. F., Hammer, R. E., van den Berg, T. K., Missler, M., Geuze, H. J. and Südhof, T. C. (2000). Synaptic assembly of the brain in the absence of neurotransmitter secretion. Science 287:864-9

Veit, M., Söllner, T. H., Rothman, J. E. (1996) Multiple palmitoylation of synaptotagmin and the t-SNARE SNAP-25. FEBS Lett. 385:119-23

Voets, T., Toonen, R. F., Brian, E. C., de Wit, H., Moser, T., Rettig, J., Südhof, T. C., Neher, E. and Verhage, M. (2001) Munc18-1 promotes large dense-core vesicle docking. Neuron 31 (4): 581-91

Washbourne, P., Thompson, P. M., Carta, M., Costa, E. T., Mathews, J. R., Lopez-Bendito, G., Molnar, Z., Becher, M. W., Valenzuela, C. F., Partridge, L. D., Wilson, M. C. (2002) Genetic ablation of the t-SNARE SNAP-25, distinguishes mechanisms of neuroexocytosis. Nat Neurosci 1:19–26

Weimbs, T., Mostov, K., Low, S. H., Hofmann, K. (1998) A model for structural similarity between different SNARE complexes based on sequence relationships. Trends Cell Biol. 7:260–2

Weimer, R. M., Richmond, J. E., Davis, W. S., Hadwiger, G., Nonet, M. L., Jorgensen E. M. (2003) Defects in synaptic vesicle docking in unc-18 mutants. Nat Neurosci. 6:1023-30

Weimer, R. M., Richmond, J. E. (2005) Synaptic vesicle docking: a putative role for the Munc18/Sec1 protein family. Curr Top Dev Biol. 65:83-113

Whiteheart, S.W., Griff, I.C., Brunner, M., Clary, D.O., Mayer, T., Buhrow, S.A. and Rothman, J.E. (1993) SNAP family of NSF attachment proteins includes a brain-specific isoform. Nature, 362, 353-5

Wilson, D. W., Wilcox, C. A., Flynn, G. C., Chen, E., Kuang, W.-J., Henzel, W. J., Block, M. R., Ullrich, A., and Rothman, J. E. (1989) A fusion protein required for vesicle-mediated transport in both mammalian cells and yeast. Nature 339, 355-359

Wu, M. N., Fergestad, T., Lloyd, T. E, He, Y., Broadie, K., Bellen, H. J. (1999) Syntaxin 1A interacts with multiple exocytic proteins to regulate neurotransmitter release in vivo. Neuron 23:593-605

Yang, B., Steegmaier, M., Gonzalez, L. C., Jr. and Scheller, R. H. (2000). nSec1 binds a closed conformation of syntaxin1A. J Cell Biol 148:247-52

Zilly, F. E., Sorensen, J., Jahn, R., Lang, T. (2006) Munc18-Bound Syntaxin Readily Forms SNARE Complexes with Synaptobrevin in Native Plasma Membranes. PLoS Biology 10:e330

Zwilling, D., Cypionka, A., Pohl, W. H., Fasshauer, D., Walla, P. J., Wahl, M. C., Jahn, R. (2007) Early endosomal SNAREs form a structurally conserved SNARE complex and fuse liposomes with multiple topologies. EMBO J. 26:9–18

Publikationsliste

Burkhardt, P., Hattendorf, D. A., Weis, W. I., Fasshauer, D. (2008) Munc18a controls SNARE assembly through its interaction with the syntaxin N-peptide. EMBO J. 27:923-933

Burkhardt, P., Kienle, N. C., Kloepper, T., Hartisch, M., Abedin, M., King, N., Varoqueaux, F., Fasshauer, D. The secretory apparatus of the chaonoflagellate *Monosiga brevicollis*. Manuskript in Vorbereitung

Curriculum Vitae

Pawel Burkhardt

Adresse

Kurze-Geismar-Str. 23
D-37073 Göttingen
Telefon: +49-551-201-1935
Fax: +49-551-201-1499
Email: pburkha@gwdg.de

Persönliche Angaben

Geschlecht: männlich
Geburtsdatum: 06. Mai 1979
Geburtsort: Wroclaw (Polen)
Staatsangehörigkeit: deutsch

Ausbildung

- 07/1997 Abitur am Archenhold-Gymnasium in Berlin-Treptow
- 09/1999 – 02/2005 Studium der Biologie an der Georg-August-Universität in Göttingen,
Hauptfach: Zoologie, Nebenfächer: Mikrobiologie und Organische
Chemie
- 06/2004 – 02/2005 Diplomarbeit angefertigt am Max-Planck-Institut für
biophysikalische Chemie in Göttingen, Titel der Diplomarbeit:
„Biophysikalische Untersuchungen zu Munc18 interagierenden
Proteinen“
Betreuer: Dr. Dirk Fasshauer
- Seit 03/2005 Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in
Göttingen
Betreuer: Dr. Dirk Fasshauer

Zivildienst

- 08/1997 – 08/1998 Alten- und Pflegeheim Bischof-Ketteler-Haus in Berlin-Weißensee

Stipendien

- 03/2005 – 02/2008 Promotionsstipendium des Graduiertenkollegs 521 “Protein-Protein-
Interactions During Intracellular Transport of Macromolecules”