

Dirk Fasshauer und Reinhard Jahn  
Max-Planck-Institut für Biophysikalische  
Chemie, Göttingen

## Mechanismen intrazellulärer Membranfusion

**Eukaryotische Zellen sind durch Membranen in verschiedene Kompartimente unterteilt. Zerstörung der Plasmamembran oder der Membran von Organellen führt in der Regel zum Tod der Zelle. Zellwachstum, Zellteilung sowie Import und Export von Makromolekülen erfordern daher Mechanismen für die Teilung wie für die Verschmelzung von membranumschlossenen Kompartimenten, bei denen die Integrität der Membranbarrieren nicht beeinträchtigt wird. Die zugrundeliegenden Vorgänge werden als Knospung (budding) und Fusion bezeichnet.**

### Prinzipien der Fusion von Membranen

► Es ist relativ einfach, künstliche Lipidvesikel (Liposomen) herzustellen, deren Eigenschaften biologischen Membranen ähneln. Wenn man die Abstoßungskräfte zwischen Liposomen zeitweilig überwindet, kann man die Membranen zur Fusion bringen. Dabei müssen Zwischenzustände durchlaufen werden, in denen die beteiligten Membranen nicht als Bilayer vorliegen. Im ersten Schritt verschmelzen vermutlich die proximalen Monolayer, während die distalen Monolayer noch getrennt sind (Abb. 1). Dabei entsteht eine stark gekrümmte Verbindung zwischen den fusionierenden Membranen („hemifusion stalk“). Von diesem normalerweise instabilen Zwischenzustand kann es zur Ausbildung einer Fusionspore kommen, wobei die distalen Monolayer lokal miteinander verschmelzen. Möglicherweise entsteht vor der Ausbildung der Fusionspore eine scheibenförmige Trennschicht (Abb. 1), die von den beiden distalen Monolayern ausgebildet wird. Für diese Zwischenzustände sprechen viele Befunde,

obwohl alternative Szenarien noch nicht ausgeschlossen werden können.

Es ist unklar, ob biologische Membranen auf ähnliche Weise fusionieren. Proteine spielen dabei eine entscheidende Rolle. Für die Funktionsweise solcher Fusionsproteine gibt es zwei unterschiedliche Hypothesen. Der ersten Hypothese zufolge beschränkt sich die Rolle der Proteine darauf, die Aktivierungsenergie für die Fusion herabzusetzen, zum Beispiel durch Ausbildung einer stabilen Verbindung zwischen den zu fusionierenden Membranen (Verminderung der Abstoßung). Am Fusionsvorgang selbst sind hiernach ausschließlich Membranlipide beteiligt. Die zweite Hypothese besagt, daß die Proteine selbst mit den hydrophoben Bereichen der Membranlipide interagieren und somit Übergangszustände entstehen, die bei der Fusion proteinfreier Membranen nicht auftreten können. So könnte die Fusionspore, die den Wasserraum auf den beiden distalen Seiten der fusionierenden Membranen verbindet, durch einen Proteinkanal gebildet werden, der beide Bilayer durchspannt und der erst im weiteren Verlauf der Fusion durch Einwandern von Phospholipiden getrennt wird.

Angesichts einer kaum überschaubaren Vielfalt von intrazellulären Fusionsvorgängen, die in Kinetik, Geometrie und Funktion nur wenig gemeinsam haben, ist es überraschend, daß alle diese Fusionen nach ähnlichen Mechanismen unter Beteiligung konservierter Proteine ablaufen. Dazu gehören die SNAREs, eine heterogene Gruppe von Membranproteinen niedrigen Molekulargewichtes, die Rab-Proteine, die zur Ras-Superfamilie der GTPasen gehören, sowie vermutlich auch die Sec1/Munc18-Proteine, die möglicherweise eine Rolle bei der Regulation von SNAREs spielen. In den letzten Jahren sind große Fortschritte in unserem Verständnis dieser wichtigen Komponenten erzielt worden. Obwohl viele Aspekte noch unklar sind und zum Teil kontrovers diskutiert werden, wollen wir in den nächsten Abschnitten versuchen, einen Überblick über den derzeitigen Diskussionsstand geben. Dabei werden wir uns im wesentlichen

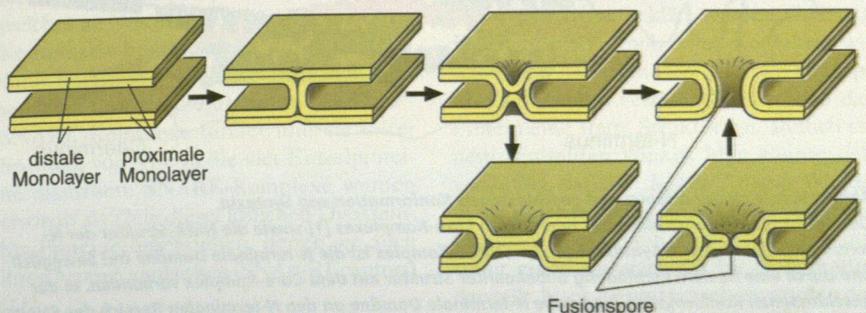


Abb. 1: Zwischenstadien bei der Verschmelzung zweier Doppelmembranen nach der „stalk hypothesis“. Näheres siehe Text.

auf die SNAREs beschränken, denen eine zentrale Rolle beim Fusionsvorgang zugeschrieben wird.

### SNAREs – zentrale Komponenten zellulärer Fusionsmaschinen

Die Superfamilie der SNAREs umfaßt inzwischen mehr als 60 Mitglieder, die in allen eukaryotischen Zellen vertreten sind. SNAREs sind zumeist kleine (12–35 kDa), überwiegend membrangebundene Proteine, die einen konservierten Abschnitt von ca. 60 Aminosäuren, das SNARE-Motiv, enthalten. Während eines Fusionsvorganges müssen mehrere unterschiedliche SNARE-Proteine miteinander kooperieren. Am längsten bekannt und am besten untersucht sind die SNAREs, die an der Exocytose synaptischer Vesikel in Neuronen beteiligt sind: das Vesikelprotein Synaptobrevin und die plasmamembranständigen Proteine Syntaxin und SNAP-25. Synaptobrevin und Syntaxin besitzen jeweils eine C-terminale Transmembranregion, an die sich N-terminal ein SNARE-Motiv anschließt. SNAP-25 ist durch Palmytolierung von zentralen Cysteinseitenketten in der Membran verankert. Beidseitig der Cystein-Ankerregion befindet sich je ein SNARE-Motiv.

Die unterschiedliche Lokalisation der neuronalen SNAREs führte zu einer er-

sten Einteilung der SNARE-Proteine in v-SNAREs (vesikuläre SNAREs) und t-SNAREs (SNAREs, die an der Ziel(target)-membran lokalisiert sind). Diese Unterteilung läßt sich jedoch nicht aufrechterhalten, da auch gleichartige Organelle miteinander fusionieren können. Sie ist daher kürzlich durch eine strukturell begründete Klassifizierung in Q-SNAREs und R-SNAREs ersetzt worden ([1, 2], s. unten).

Fusionsproteine müssen Energie aufbringen, um die Barrieren der Fusionsreaktion zu überwinden. SNARE-Proteine erfüllen hierfür alle Voraussetzungen: Sie durchlaufen Assembly-Disassembly Zyklen, bei denen Energie freigesetzt wird und die mit ausgedehnten Konformationsänderungen verbunden sind.

### Assembly des neuronalen Core-Komplexes

Interessanterweise weisen Synaptobrevin und SNAP-25 in physiologischen Salzlösungen kaum Sekundärstruktur auf. Dagegen enthält Syntaxin  $\alpha$ -helikale Bereiche. Gibt man die Proteine zusammen, so bildet sich, begleitet von gewaltigen Konformationsänderungen [3], spontan ein stabiler ternärer Komplex aus, den man auch als „Core“-Komplex bezeichnet. Es entsteht ein langgestrecktes Helixbündel, in dem die vier SNARE-Motive parallel angeordnet

sind und die Transmembrandomänen von Syntaxin und Synaptobrevin an einem Ende nebeneinander liegen [1].

Der Assembly-Reaktion solcher Core-Komplexe wird eine entscheidende Rolle bei der Membranfusion zugeschrieben. Überraschenderweise geht diese Reaktion, die in der Synapse in Bruchteilen von Sekunden ablaufen sollte, im Reagenzglas nur relativ langsam vonstatten. Hierfür ist zumindest teilweise der N-Terminus von Syntaxin verantwortlich, der eine aus drei aneinandergelagerten  $\alpha$ -Helices bestehende, eigenständige Domäne ausbildet [4] (Abb. 2). Diese Domäne bindet an den N-terminalen Bereich des SNARE-Motivs und verhindert die Ausbildung von Core-Komplexen. Syntaxin kann also in zwei Konformationen vorliegen, einer „geschlossenen“, in der das SNARE-Motiv an die N-terminale Domäne gebunden ist, und einer „offenen“, in der das SNARE-Motiv frei beweglich ist und einen Core-Komplex mit anderen SNAREs ausbilden kann [5-6] (Abb. 2). Der Bildung von Core-Komplexen muß wahrscheinlich ein Wechsel von der geschlossenen in die offene Konformation von Syntaxin vorausgehen, denn die Reaktionsgeschwindigkeit des Assemblys läßt sich durch Entfernen der N-terminalen Domäne deutlich beschleunigen [5].

### Struktur und Eigenschaften von Core-Komplexen

Die Kristallstruktur des neuronalen Core-Komplexes [1], die kürzlich gelöst worden ist, ist an dieser Stelle bereits eingehend dargestellt worden [7]. Die Kontakte zwischen den vier Helices im Komplex werden überwiegend durch hydrophobe Aminosäuren im Kern des Bündels ausgebildet, die in mehr oder weniger parallelen Ebenen senkrecht zur Längsachse angeordnet sind. Jedoch befindet sich eine hydrophile Interaktionsebene in der Mitte des Bündels, die aus drei Glutaminresten (Q) und einem Argininrest (R) gebildet wird. Diese Aminosäuren sind hochkonserviert und begründen die Einteilung in Q-SNAREs und R-SNAREs [2]. Sequenzvergleiche in der SNARE-Superfamilie ergaben weiterhin, daß die hydrophoben Aminosäuren im Kern des Bündels ebenfalls konserviert sind. In der Tat lassen sich einzelne SNAREs im Komplex durch andere Familienmitglieder ersetzen, ohne daß die Kinetik des Assemblys oder die Stabilität des Komplexes beeinträchtigt wird [8, 9]. Diese „Promiskuität“ ist überraschend, denn in der Zelle werden einzelne Fusions Schritte jeweils durch einen spezifischen Satz von SNARE-Proteinen katalysiert. Offensichtlich wird diese Selektivität durch andere Proteine erreicht, die dafür sorgen, daß nur die für einen Fusions-

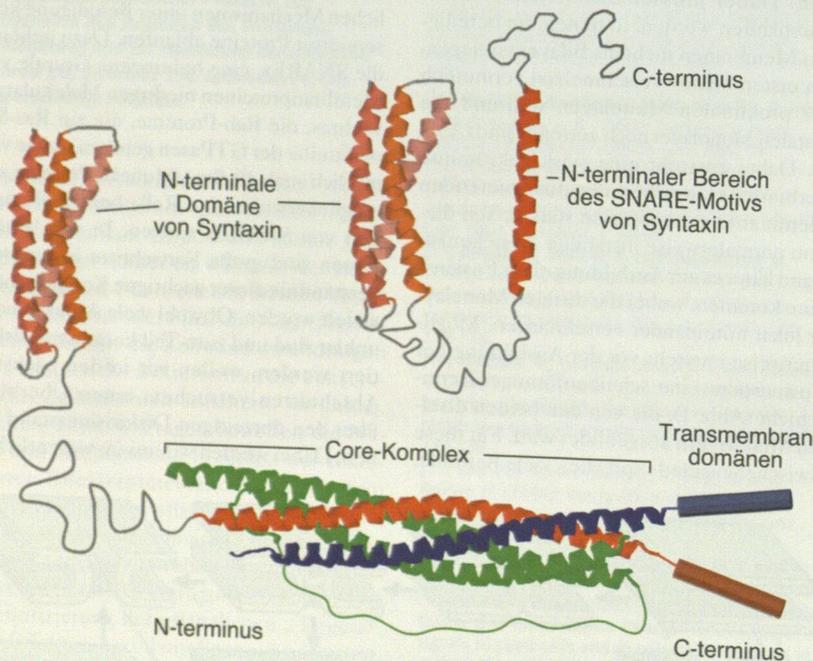


Abb. 2: Vergleich der offenen und geschlossenen Konformation von Syntaxin. Gezeigt ist die Kristallstruktur des neuronalen Core-Komplexes [1] sowie die NMR-Struktur der N-terminalen Domäne von Syntaxin1 [4]. Im SNARE-Komplex ist die N-terminale Domäne frei beweglich und durch eine flexible Verbindung unbekannter Struktur mit dem Core-Komplex verbunden. In der geschlossenen Konformation bindet die N-terminale Domäne an den N-terminalen Bereich des SNARE-Motivs, welches auch hier eine  $\alpha$ -helikale Struktur hat. Der C-terminale Teil des Motivs ist dagegen nicht strukturiert. Die Transmembrandomänen sind als Zylinder dargestellt, Bereiche unbekannter Struktur als Linien.

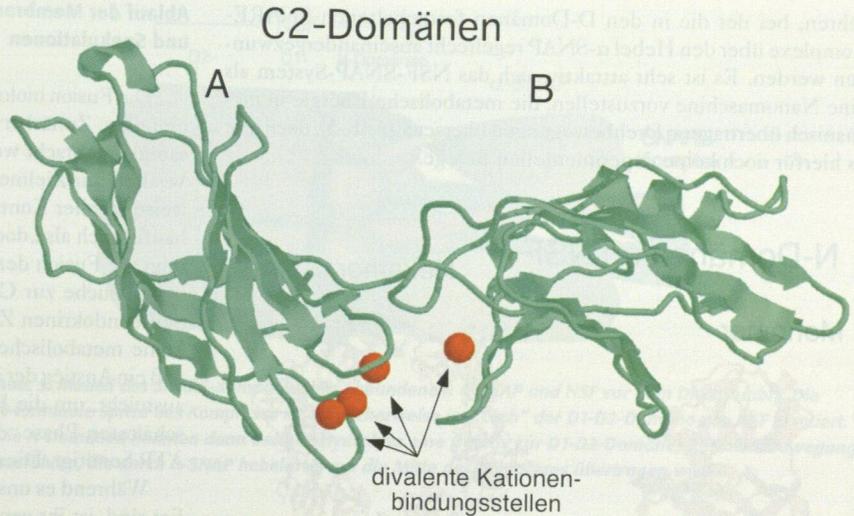
schrift zuständigen SNAREs miteinander interagieren können.

### Regulation von SNAREs durch andere Proteine

Die zentrale Rolle von SNAREs bei intrazellulären Fusionsschritten hat viele Forscher dazu veranlaßt, nach Kontrollproteinen zu suchen, die spezifisch an SNAREs binden und/oder funktionell (z.B. in genetischen Screens) mit SNAREs interagieren. So sind allein für Syntaxin 1 inzwischen mehr als ein Dutzend potentielle Interaktionspartner beschrieben worden. Es ist jedoch oft nicht einfach, zu klären, ob es sich bei diesen Bindungen um Reagenzglas-Artefakte oder um physiologisch relevante Regulationen handelt. Außerdem ist in vielen Fällen noch unklar, in welcher Phase des SNARE-Assembly-Disassembly-Zyklus diese Interaktionen erfolgen.

Am besten belegt ist eine Kontrollfunktion für das neuronale Protein Munc-18-1 (auch als n-sec1 oder rb-sec1 bezeichnet). Es bindet spezifisch und mit hoher Affinität die N-terminale Domäne von Syntaxin und verhindert die Ausbildung von Core-Komplexen. Munc-18 bindet ausschließlich die „geschlossene“ Konformation von Syntaxin [6], wie kürzlich durch die Lösung der Kristallstruktur eines Komplexes aus Munc-18 und Syntaxin eindrucksvoll bestätigt worden ist (R. H. Scheller, persönliche Mitteilung). Ist es also die Funktion von Munc-18, die Ausbildung von Core-Komplexen durch eine Begrenzung der verfügbaren Menge von Syntaxin zu kontrollieren? Diese Frage kann noch nicht beantwortet werden, da unklar ist, wie der Komplex von Munc-18 und Syntaxin wieder dissoziiert. Munc-18 interagiert auch mit anderen Proteinen, darunter mit Rab-Proteinen sowie mit Proteinkinasen, aber der Einfluß dieser Interaktionen ist nicht untersucht.

Ein weiterer interessanter Regulator der SNARE-Funktion in der Synapse ist das vesikuläre Protein Synaptotagmin (Abb. 3). Synaptotagmin repräsentiert eine Familie von Transmembranproteinen, die auf der cytoplasmatischen Seite zwei sogenannte C2-Domänen aufweisen. C2-Domänen wurden zuerst in einigen Isoformen der Protein-Kinase C beschrieben. Dort sind sie für die  $Ca^{2+}$ -abhängige reversible Bindung des Enzyms an Membranen verantwortlich. Die Exocytose von synaptischen Vesikeln wird durch  $Ca^{2+}$ -Ionen kontrolliert, wobei die Kopplung zwischen  $Ca^{2+}$ -Einstrom aus dem Extrazellulärraum und der Membranfusion nur mit wenigen hundert Mikrosekunden Verzögerung erfolgt und damit nahezu diffusionslimitiert ist. Synaptotagmin ist derzeit der beste Kandidat für das Kopplungsprotein, das das  $Ca^{2+}$ -Signal in Membranfusi-



**Abb. 3:** Kristallstruktur der C2-Domänen von Synaptotagmin [23]. Die roten Kugeln deuten die Position der divalenten Kationen an.  $Ca^{2+}$ -Bindung ist nicht mit einer meßbaren Konformationsänderung verbunden. Die Bindung dieser Domänen an Phospholipide bzw. SNAREs wird vermutlich ausschließlich durch die Fixierung der positiv geladenen Ionen an der Protein-Oberfläche bewirkt („electrostatic switch“).

on übersetzt. Nach Deletion von Synaptotagmin in Fliegen und Mäusen ist die  $Ca^{2+}$ -abhängige Exocytose fast vollständig gehemmt, während sie durch  $Ca^{2+}$ -unabhängige Reize noch normal ausgelöst werden kann.

Was hat Synaptotagmin mit SNARE-Proteinen zu tun? Anders als bei Protein-Kinase C steuert  $Ca^{2+}$  nicht nur die Bindung an Membranlipide, sondern auch an SNARE-Proteine. Dabei bindet das Protein sowohl an monomere SNARE-Proteine (Syntaxin und SNAP-25) wie auch an den ternären Komplex [10]. Es ist jedoch noch ungeklärt, ob und in welcher Weise die Funktion der SNARE-Proteine durch Synaptotagmin beeinflusst wird.

### Disassembly von Core-Komplexen

Im Reagenzglas sind Core-Komplexe außerordentlich stabil. Sie können jedoch durch hochkonservierte Proteine unter Aufwendung metabolischer Energie in Monomere dissoziiert werden. Diese Proteine sind: SNAPs (Akronym für soluble NSF Attachment Protein;  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ -Isoformen), welches im N-terminalen Bereich von Core-Komplexen bindet, sowie die Chaperon-ähnliche ATPase NSF (Akronym für NEM-sensitive fusion protein), die an die SNAP-SNARE-Komplexe bindet und sie unter Spaltung von ATP in die vier Einzelproteine dissoziiert. SNARE-Komplexe wurden erstmals als Ziele dieser löslichen Disassembly-Proteine beschrieben, denen sie auch ihren Namen verdanken (SNAP-REceptors) [11].

Hochauflösende Elektronenmikroskopie [12-13] sowie Röntgenstrukturanalyse [14-18] haben in jüngster Zeit zu einem ver-

tieften Verständnis dieser Disassembly-Reaktion geführt. NSF gehört zur Familie der sog. AAA-Proteine (ATPases associated with various cellular activities). Es ist ein Hexamer mit drei Domänen pro Untereinheit, die als D2, D1 und N bezeichnet werden. Im Hexamer bilden die D2- und die D1-Domäne zwei aufeinanderliegende Ringe mit sechszähliger Symmetrie. Beide D-Domänen enthalten eine ATP-Bindungsstelle. Jedoch ist nur diejenige der D1-Domäne katalytisch aktiv, während diejenige der D2-Domäne für die Oligomerisierung verantwortlich ist (Abb. 4). Die N-Domäne bindet  $\alpha$ -SNAP und ist somit für die Verbindung zum SNARE-Komplex zuständig. NSF bindet an das N-terminale Ende des Core-Komplexes (Abb. 5), wobei dieses möglicherweise in ein „Loch“ in der Mitte der D-Hexamere eintaucht.

Wie EM-Aufnahmen gezeigt haben, durchläuft die N-Domäne bei ATP-Spaltung großräumige Konformationsänderungen [12] [13]. Während der letzten Monate sind die Raumstrukturen der NSF-N-Domäne [16] [17] sowie der Hefe-Variante von  $\alpha$ -SNAP (Sec17p) [18] aufgeklärt worden (Abb. 4). Die multiplen „knob-hole“-Kontakte zwischen den helikalen Bereichen im Sec17p-Molekül führen vermutlich dazu, daß das Protein eine starre Struktur hat, ähnlich einem verdrehten Winkel. Man könnte sich vorstellen, daß die „Kanten“ dieser Winkel in die Furchen zwischen den Helices auf der Oberfläche des Core-Komplexes binden und somit einen Ansatzpunkt für Hebelkräfte darstellt. Nach dieser Hypothese würden die N-Domänen von NSF zwischen den anderen Enden des  $\alpha$ -SNAP-Winkels liegen und bei ATP-Spaltung eine Drehbewegung aus-

führen, bei der die in den D-Domänen festgehaltenen SNARE-Komplexe über den Hebel  $\alpha$ -SNAP regelrecht auseinandergezwungen werden. Es ist sehr attraktiv, sich das NSF-SNAP-System als eine Nanomaschine vorzustellen, die metabolische Energie in mechanisch übertragene Drehbewegungen übersetzt (Abb. 5), doch gibt es hierfür noch keine experimentellen Belege.

### N-Domäne von NSF

Monomer

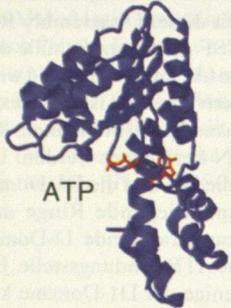


Hexamer



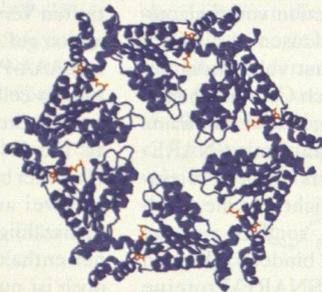
### D2-Domäne von NSF

Monomer

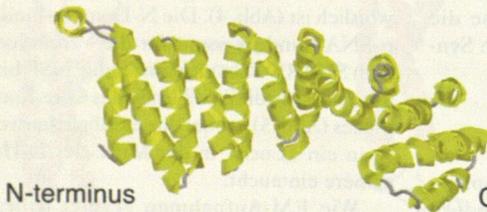


ATP

Hexamer



### SEC17



N-terminus

C-terminus

**Abb. 4: Kristallstrukturen des SNAP-Proteins aus Hefe (Sec17p) [18] sowie der D2 [14-15] und N-Domäne von NSF [16-17]. Die D2-Domäne wurde als Hexamer kristallisiert, sie enthält ein ATP-Molekül (rot), das aber nicht hydrolysiert wird. Das  $\gamma$ -Phosphat des ATP-Moleküls bindet jeweils an eine Seitenkette der benachbarten Untereinheit. Dies erklärt, warum ATP für den Zusammenhalt des Hexamers benötigt wird.**

Die N-Domäne ist mit der ATP-hydrolysierenden D1-Domäne verbunden. Deren Struktur ist unbekannt, jedoch kann man aufgrund von Sequenz-Ähnlichkeiten sowie Elektronenmikroskopie davon ausgehen, daß sie der D2-Domäne ähnelt. Die Struktur der N-Domäne weist Parallelen zu den Domänen 2 und 3 von EF-Tu, einem an der Proteinsynthese beteiligten Elongationsfaktor, auf. In beiden Proteinen ist diese Domäne mit einer ATPase bzw. GTPase Domäne verbunden, und beide Domänen durchlaufen großräumige Konformationsänderungen. Die Domäne wurde als Monomer kristallisiert, die hier ebenfalls dargestellte hexamere Anordnung ist hypothetisch.

Sec17p besteht aus einer Reihe von antiparallel angeordneten  $\alpha$ -Helices. Solche Faltungen sind in Strukturproteinen wie Clathrin (schwere Kette) zu finden.

## Ablauf der Membranfusion – Tatsachen, Hypothesen und Spekulationen

Die Fusion biologischer Membranen läßt sich in mehrere Schritte einteilen. Zunächst müssen die zu fusionierenden Membranen zusammengebracht werden, zum Beispiel durch den Transport eines Vesikels zur Zielmembran. Anschließend wird ein zumindest zeitweise stabiler Kontakt zwischen den Membranen hergestellt, der häufig auch als „docking“ bezeichnet wird. Im nächsten Schritt erfolgt die Fusion der beteiligten Membranen.

Versuche zur  $\text{Ca}^{2+}$ -regulierten Exocytose von Neuronen bzw. neuroendokrinen Zellen haben ergeben, daß die Exocytose selbst keine metabolische Energie in Form von ATP benötigt, sondern daß ein Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration („triggering“) ausreicht, um die Fusion auszulösen. Dagegen wird in der vorgeschalteten Phase, die während oder nach dem „docking“ erfolgt, ATP benötigt. Diese Phase wird auch als „priming“ bezeichnet.

Während es unstrittig ist, daß die SNAREs an der Fusion beteiligt sind, ist ihr genauer Mechanismus noch unklar. Nach einer ursprünglich von uns aufgestellten und inzwischen weitgehend akzeptierten Arbeitshypothese leitet die Assembly-Reaktion die Fusion ein [19]. Danach würden sich Komplexe zwischen SNAREs der beiden zu fusionierenden Membranen ausbilden (*trans*-Komplexe). Die Bildung der Komplexes würde an den distalen (N-terminalen) Enden beginnen und durch zunehmendes helikales „Aufrollen“ in die Richtung der Membrananker fortschreiten. Dabei würden die Membranen regelrecht zusammengezurr. Es entstünde ein gespannter Übergangszustand, in dem die cytoplasmatischen Anteile der SNAREs bereits zu einem Helixbündel zusammengelagert wären, während die Transmembrandomänen noch getrennt in den jeweiligen Membranen steckten. Es gibt Hinweise darauf, daß, zumindest in neuroendokrinen Zellen, diese Schritte des Assemblys reversibel sind und nach dem „priming“ ablaufen [20]. Es könnten lose Zwischenzustände entstehen, in denen nur der N-terminale Bereich des langgestreckten Helixbündels ausgebildet ist, während die C-terminalen Bereiche noch nicht miteinander verbunden sind.

Möglicherweise reicht die in den *trans*-Komplexen enthaltene Spannung in einigen Fällen bereits aus, um die Bilayer zu fusionieren. So könnte sich das Reißverschlußartige Zusammenziehen der SNAREs bis in die Transmembrandomänen hinein erstrecken, zwischen denen spezifische Bindungen nachgewiesen wurden. In der Tat kann man Fusionsaktivität messen, wenn SNAREs in die Membran künstlicher Lipidvesikel inkorporiert werden [21]. Diese Experimente sind jedoch nicht schlüssig, unter anderem deshalb, weil viele an biologischer Membranfusion unbeteiligte Peptide und Proteine in solchen Assays Fusionsaktivität aufweisen. In anderen Fällen, zum Beispiel bei regulierter Exocytose, benötigen die SNAREs jedoch die Interaktion mit einem anderen Protein (wahrscheinlich Synaptotagmin), um die Membranen zur Fusion zu bringen. In jedem Fall aber ist es nach diesen Vorstellungen die im SNARE-*trans*-Komplex gespeicherte Konformationsenergie, deren Relaxierung während der Fusion den entscheidenden Beitrag zur Fusion leistet.

Nach erfolgter Fusion befinden sich die SNAREs nebeneinander in derselben Membran. Der Komplex ist relaxiert („*cis*“-Komplexe) und muß erst durch Interaktion mit NSF und  $\alpha$ -SNAP dissoziiert werden, um wieder einen Fusionsvorgang zu katalysieren.

Ein von dem oben beschriebenen Modell etwas abweichendes Szenario wurde aus Untersuchungen zur Fusion von Vakuolen aus Hefezellen abgeleitet. Die Fusion dieser Vakuolen kann man mit einem eleganten biochemischen Assay im Reagenzglas messen. Die Kombination von Biochemie und Genetik, die in diesem System möglich ist, erlaubt es, die Proteinzusammensetzung der an der Fusion beteiligten Membranen gezielt zu manipulieren. Nach die-

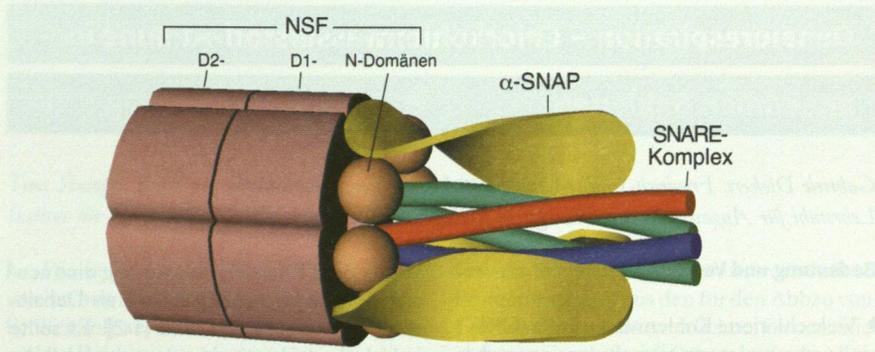
sen Untersuchungen erfolgt die Aktivierung der SNAREs durch NSF erst kurz vor der Fusion in einer komplexen Abfolge von Protein-Protein-Interaktionen, die anschließend zur Ausbildung von *trans*-SNARE-Komplexen führen. Interessanterweise scheint es in diesem System noch mehrere Schritte zu geben, die dem SNARE-Assembly nachgeschaltet sind, darunter ein Calmodulin-abhängiger Schritt sowie eine Phosphatase-Reaktion. Weiterhin gibt es Hinweise dafür, das NSF nicht nur *cis*-Komplexe dissoziiert, sondern auch *trans*-Komplexe angreifen kann. Offensichtlich können die SNARE-Komplexe bereits wieder dissoziiert werden, bevor die Fusion erfolgt ist [22]. Diese Sichtweise ist mit dem oben beschriebenen Modell nur schwer in Einklang zu bringen. Weitere Versuche müssen klären, ob diese Unterschiede durch die Besonderheiten der vakuolären Fusion zu erklären sind oder ob das oben beschriebene Modell revidiert werden muß.

**Ausblick**

In nur wenigen Jahren hat sich unser Verständnis der intrazellulären Membranfusion von der mikroskopisch-deskriptiven Ebene verlagert. Fusionen sind komplexe Vorgänge, an denen Hunderte von Molekülen beteiligt sind und deren Studium sowohl physikalische wie biochemische und zellbiologische Methoden erfordert. Noch immer sind nicht alle Proteine bekannt, die dabei eine Rolle spielen. Nicht zuletzt dank der Beiträge strukturbiochemischer Arbeiten kann man jedoch davon ausgehen, daß die molekularen Mechanismen proteinkatalysierter Membranfusion in ihren Grundzügen bald verstanden sein werden.

**Literatur**

1. Sutton RB, Fasshauer D, Jahn R, Brünger AT. (1998) Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature*, 395, 347-53.
2. Fasshauer D, Sutton RB, Brünger AT, Jahn R. (1998) Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 15781-6.
3. Fasshauer D, Otto H, Eliason WK, Jahn R, Brünger AT. (1997) Structural changes are associated with soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptor complex formation. *J Biol Chem*, 272, 28036-41.
4. Fernandez I, Ubach J, Dulubova I, Zhang X, Südhof TC, Rizo J. (1998) Three-dimensional structure of an evolutionarily conserved N-terminal domain of syntaxin 1A. *Cell*, 94, 841-9.
5. Nicholson KL, Munson M, Miller RB, Filip TJ, Fairman R, Hughson FM. (1998) Regulation of SNARE complex assembly by an N-terminal domain of the t-SNARE Sso1p. *Nat Struct Biol*, 5, 793-802.



**Abb. 5: Modell des SNARE-Komplexes mit gebundenem  $\alpha$ -SNAP und NSF vor dem Disassembly. Die N-terminale Spitze des Komplexes ist möglicherweise im „Loch“ der D1-D2-Domäne von NSF arretiert. Die N-Domänen könnten dann bei ATP-Hydrolyse eine (relativ zur D1-D2-Domäne) Rotationsbewegung ausführen, die durch  $\alpha$ -SNAP hebelartig auf die Mitte des Komplexes übertragen wird.**

6. Dulubova I, Sugita S, Hill S, Hosaka M, Fernandez I, Südhof TC, Rizo J. (1999) A conformational switch in syntaxin during exocytosis: role of munc18. *Embo J*, 18, 4372-82.
7. Otto H. (1998) Der SNARE-Komplex - zwischen Vesikelbindung und Membranfusion. *Biospektrum*, Heft 1, 1999, 36-37.
8. Fasshauer D, Antonin W, Margittai M, Pabst S, Jahn R. (1999) Mixed and non-cognate SNARE complexes. Characterization of assembly and biophysical properties. *J Biol Chem*, 274, 15440-9.
9. Yang B, Gonzalez L, Jr., Prekeris R, Steegmaier M, Advani RJ, Scheller RH. (1999) SNARE interactions are not selective. Implications for membrane fusion specificity. *J Biol Chem*, 274, 5649-53.
10. Davis AF, Bai J, Fasshauer D, Wolowick MJ, Lewis JL, Chapman ER. (1999) Kinetics of synaptotagmin responses to  $Ca^{2+}$  and assembly with the core SNARE complex onto membranes. *Neuron*, 24, 363-76.
11. Rothman JE. (1994) Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature*, 372, 55-63.
12. Hanson PI, Roth R, Morisaki H, Jahn R, Heuser JE. (1997) Structure and conformational changes in NSF and its membrane receptor complexes visualized by quick-freeze/deep-etch electron microscopy. *Cell*, 90, 523-535.
13. Hohl TM, Parlati F, Wimmer C, Rothman JE, Söllner TH, Engelhardt H. (1998) Arrangement of subunits in 20 S particles consisting of NSF, SNAPs, and SNARE complexes. *Mol Cell*, 2, 539-48.
14. Yu RC, Hanson PI, Jahn R, Brünger AT. (1998) Structure of the ATP-dependent oligomerization domain of N-ethylmaleimide sensitive factor complexed with ATP. *Nat Struct Biol*, 5, 803-11.
15. Lenzen CU, Steinmann D, Whiteheart SW, Weis WI. (1998) Crystal structure of the hexamerization domain of N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein. *Cell*, 94, 525-36.
16. Yu RC, Jahn R, Brünger AT. (1999) NSF N-terminal domain crystal structure: models of NSF function. *Mol Cell*, 4, 97-107.
17. May AP, Misura KM, Whiteheart SW, Weis WI. (1999) Crystal structure of the amino-terminal domain of N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein. *Nat Cell Biol*, 1, 175-82.
18. Rice LM, Brünger AT. (1999) Crystal structure of the vesicular transport protein Sec17: implications for SNAP function in SNARE complex disassembly. *Mol Cell*, 4, 85-95.

19. Hanson PI, Heuser JE, Jahn R. (1997) Neurotransmitter release - four years of SNARE complexes. *Curr Opin Neurobiol*, 7, 310-315.
20. Xu T, Rammner B, Margittai M, Artalejo AR, Neher E, Jahn R. (1999) Inhibition of SNARE complex assembly differentially affects kinetic components of exocytosis. *Cell*, 99, 713-22.
21. Weber T, Zemelman BV, McNew JA, Westermann B, Gmachl M, Parlati F, Sollner TH, Rothman JE. (1998) SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell*, 92, 759-72.
22. Ungermann C, Wickner W, Xu Z. (1999) Vacuole acidification is required for trans-SNARE pairing, LMA1 release, and homotypic fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 11194-9.
23. Sutton RB, Ernst JA, Brünger AT. (1999) Crystal structure of the cytosolic C2A-C2B domains of synaptotagmin III. Implications for  $Ca^{2+}$ -independent SNARE complex interaction. *J Cell Biol*, 147, 589-98.

**Korrespondenzadresse**

Dr. Dirk Fasshauer  
 Prof. Dr. Reinhard Jahn  
 Abteilung Neurobiologie  
 Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie  
 Am Fassberg 11  
 D-37077 Göttingen  
 Tel.: 0551-2011635  
 Fax: 055-2011499  
 e-mail: dfassha@mpibpc.gwdg.de  
 e-mail: rjahn@gwdg.de



Dirk Fasshauer



Reinhard Jahn