

Der molekulare Mechanismus der Neurotransmitterfreisetzung und Nervenzell-Synapsen (Nobel-Aufsatz)**

Thomas C. Südhof*

Hormonausschüttung · Intrazelluläre Signalweiterleitung · Membranfusion · Synaptische Plastizität · Vesikeltransport

1. Das Problem der Neurotransmitterfreisetzung

Die Erforschung von Synapsen zwischen Nervenzellen hat eine lange Tradition in den Naturwissenschaften. Sie wurden zuerst funktionell von Emil duBois-Reymond (1818–1896) beschrieben, morphologisch von klassischen Neuroanatomen wie Rudolf von Kölliker (1817–1905) und Ramon y Cajal (1852–1934) identifiziert, und 1897 durch Michael Foster (1836–1907) benannt. Obwohl duBois-Reymond bereits postulierte, dass die synaptische Erregungsübertragung ein chemischer Prozess sei, blieb diese Idee aufgrund der unglaublichen Geschwindigkeit der synaptischen Erregungsübertragung lange umstritten. Im Laufe der Zeit häuften sich jedoch die Beweise dafür, dass die Mehrzahl der Synapsen chemische Botenstoffe, so genannte Neurotransmitter, für die Erregungsübertragung verwenden. Hierzu trugen vor allem die bahnbrechenden Entdeckungen von Otto Loewi (1873–1961), Henry Dale (1875–1968), Ulf von Euler (1905–1983), und Julius Axelrod (1912–2004) bei. Zeitgleich lieferten die Arbeiten von Bernhard Katz (1911–2003), in denen er den grundlegenden Mechanismus der synaptischen Erregungsübertragung entschlüsselte,^[1] den wohl wichtigsten Fortschritt zu unserem Verständnis über die Arbeitsweise der Synapsen.

Während sich die frühen Pionierarbeiten zu Synapsen hauptsächlich auf Synapsen der neuromuskulären Endplatte konzentrierten, rückten die Synapsen des zentralen Nervensystems erst in den letzten Jahrzehnten in den Fokus der Aufmerksamkeit. Viele Wissenschaftler, darunter unter anderem George Palade (1912–2008), Rodolfo Llinas, Chuck Stevens, Bert Sakmann, Eric Kandel und Victor Whittaker, bestätigten mit ihren Arbeiten an Synapsen des zentralen Nervensystems nicht nur die ursprünglichen Ergebnisse, die Katz an der neuromuskulären Endplatte erzielt hatte, sondern zeigten auch, dass Synapsen eine enorme Komplexität an Eigenschaften besitzen und außerdem eine unerwartete Kapazität für plastische Veränderungen aufweisen.

Die wohl wichtigste Eigenschaft der synaptischen Erregungsübertragung ist ihre Schnelligkeit – an den meisten Synapsen dauert die synaptische Erregungsübertragung nur wenige Millisekunden. Diese extreme Geschwindigkeit ist von entscheidender Bedeutung für alle Hirnprozesse. Wie sonst könnte ein Torwart in einem Bruchteil einer Sekunde auf einen Torschuss reagieren, oder eine Ballerina eine Pirouette drehen, ohne zu Boden zu fallen? Synapsen unterscheiden sich zwar dramatisch voneinander in einigen Ei-

genschaften, wie etwa in ihrer Stärke oder Plastizität, sie arbeiten aber immer nach demselben von Katz beschriebenen Grundprinzip. Wenn ein Aktionspotential entlang eines Axons weitergeleitet wird, depolarisiert es die Nervenendigungen und löst dort die Öffnung präsynaptischer Kalziumkanäle aus. Die daraufhin in die Nervenendigungen einfließenden Kalzium-Ionen (Ca^{2+}) induzieren dann innerhalb eines bis zu 100 Mikrosekunden kurzen Zeitintervalls die Neurotransmitterfreisetzung.^[2]

Erstaunlicherweise beruht der so außerordentlich schnelle Vorgang der präsynaptischen Neurotransmitterausschüttung auf einem vesikulären Transportprozess, also auf einem üblicherweise eher aus viel langsameren zellulären Prozessen bekannten Mechanismus. Die präsynaptischen Nervenendigungen sind angefüllt mit synaptischen Vesikeln, einheitlich geformten kleinen Membranorganellen mit einem Durchmesser von 35 nm, die eine hohe Konzentration an Neurotransmittermolekülen enthalten. Die Ausschüttung dieser Neurotransmittermoleküle findet dann statt, wenn Ca^{2+} -Ionen die Fusion der Vesikel mit der präsynaptischen Plasmamembran an einer spezialisierten Membranregion, der sogenannten aktiven Zone, stimulieren. Dabei befindet sich die aktive Zone genau gegenüber der postsynaptischen Membran, die die Neurotransmitterrezeptoren enthält, sodass die Neurotransmittermoleküle bei ihrer Freisetzung direkt auf ihre jeweiligen Rezeptoren treffen (Abbildung 1).

In der aktiven Zone ist die Protein-Maschinerie, die die Neurotransmitterfreisetzung bewerkstelligt und reguliert, in einer Weise organisiert, die eine hohe Geschwindigkeit und Präzision der synaptischen Erregungsübertragung ermöglicht, obwohl sie auf einem vesikulären Transportprozess beruht. Hierzu rekrutieren und verankern Proteine der aktiven Zone synaptische Vesikel an den Ort ihrer Fusion („docking“) und überführen sie dort durch einen Reifungsprozess („priming“) in einen fusionskompetenten Zustand, in dem sie

[*] Prof. T. C. Südhof

Department of Molecular and Cellular Physiology and Howard Hughes Medical Institute
Lorry Lokey SIM1 Building 07-535 Room G1021
265 Campus Drive, Stanford University School of Medicine, CA 94305 (USA)

[**] Copyright© Nobelstiftung 2013. Wir danken der Nobelstiftung, Stockholm, für die Genehmigung zum Abdruck einer deutschen Fassung dieses Vortrages.

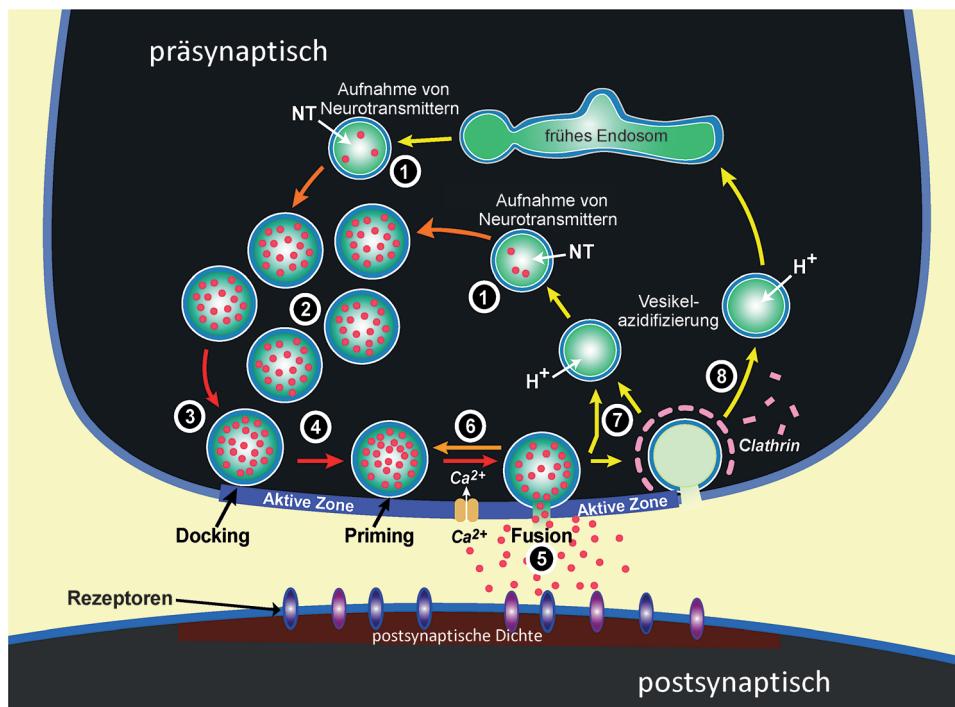


Abbildung 1. Der synaptische Vesikelzyklus. Synaptische Vesikel durchlaufen in den präsynaptischen Nervenenden einen Membranverkehrzyklus, durch den die Neurotransmitterfreisetzung vermittelt wird. Schritt 1: Vesikel werden durch Abschnürung von Endosomen oder durch Endozytose nach zuvor erfolgter Exozytose wiedergewonnen und mit Neurotransmittern (NT) gefüllt. Schritt 2: Die Vesikel werden nah an die aktive Zone der Plasmamembran transportiert, wo sie akkumulieren, um für die Exozytose rekrutiert zu werden. Schritt 3: Die Vesikel werden in einem „docking“-Prozess, der von den Vesikelproteinen Rab3/27 und dem RIM-Protein der aktiven Zone abhängig ist (siehe Abbildung 14), an die Plasmamembran der aktiven Zone gebunden. Schritt 4: Die Vesikel werden für die Ca^{2+} -vermittelte Fusion vorbereitet („priming“), indem sie in einen fusionskompetenten Zustand überführt werden. Schritt 5: Ca^{2+} löst die Öffnung der Fusionspore aus, durch die die Neurotransmitter freigesetzt werden. Schritte 6–8: Die Vesikel werden entweder unmittelbar nach der Öffnung der Fusionspore wiedergewonnen, indem sie direkt an der Membran verbleiben (6, „kiss-and-stay“), oder sie durchlaufen einen schnellen lokalen Clathrin-unabhängigen endozytotischen Weg (7, „kiss-and-run“) bzw. einen langsameren Clathrin-abhängigen Weg, in dem die Vesikel über ein endosomales Intermediat sortiert werden (8). Die meisten der hier beschriebenen Schritte des synaptischen Vesikeltransports wurden in den klassischen Untersuchungen von Heuser und Reese (1973),^[5] Ceccarelli und Mitarbeiter (1973)^[4] und Zimmermann und Whittaker (1977)^[181] ausgearbeitet (Grafik in Anlehnung an Südhof und Jahn (1991)^[7] und Südhof (2004)^[182]).

auf das Ca^{2+} -Signal warten.^[3] Darüber hinaus rekrutiert die aktive Zone Ca^{2+} -Kanäle an die Andockstellen der Vesikel. Diese räumliche Nähe der Ca^{2+} -Kanäle zu den fusionskompetenten Vesikeln am synaptischen Spalt erlaubt es der aktiven Zone auf ein Aktionspotential mit der schnellen Freisetzung von Neurotransmittern zu antworten und die Ausschüttung der Transmitter genau in den synaptischen Spalt zu dirigieren.

Nach der Exozytose werden die Protein- und Membranbestandteile der fusionierten synaptischen Vesikel auf unterschiedlichen Wegen wiedergewonnen. Dazu gehören schnelle endozytotische Vorgänge, die gelegentlich als „kiss-and-run“^[4] bezeichnet werden, aber auch langsamere Prozesse über sogenannte „clathrin-coated pits“^[5] (Abbildung 1).

Im Vergleich zur präsynaptischen Neurotransmitterfreisetzung ist die postsynaptische Neurotransmitterrezeption auf den ersten Blick konzeptionell weniger kompliziert, da sie größtenteils durch die Transmitterbindung an ligandengesteuerte Ionenkanäle vermittelt wird. Postsynaptische iono-

trope Rezeptoren sind hoch entwickelte molekulare Maschinen, die auf der Membran der empfangenden Nervenzelle gegenüber der aktiven Zone verankert sind und ein extrazelluläres Neurotransmittersignal schnell in ein intrazelluläres elektrisches Signal umwandeln (Abbildung 1). Der erste Anschein, dass es sich bei der postsynaptischen Transmitterrezeption um einen einfachen Mechanismus handeln könnte, trügt jedoch, denn postsynaptische Neurotransmitterrezeptoren unterliegen sehr komplexen regulatorischen Prozessen, die unter anderem auch vesikuläre Transportvorgänge einschließen und noch nicht vollständig aufgeklärt sind. Darüber hinaus sind die postsynaptischen Signalübertragungsprozesse in einem ausgeklügelten und vielschichtigen System organisiert, das zwischen den unterschiedlichen Synapsentypen variiert. Angesichts des konzeptionell einfachen aber tatsächlich hoch komplexen kanonischen Entwurfs von chemischen Synapsen kann man nur staunen über die Genialität eines molekularen und zellulären Designs, das durch die Nutzung von spezialisierten prä- und postsynaptischen Protein-Maschinen die für die Hirnfunktion notwendige Geschwindigkeit und Plastizität der synaptischen Erregungsübertragung erlaubt.

Als ich mein Labor 1986 gründete, waren die physiologischen Grundlagen der Neurotransmitterfreisetzung bereits in außerordentlichem Detail bekannt. Es fehlte jedoch ein mechanistisches und molekulares Verständnis, und es gab noch nicht einmal eine Hypothese dazu, wie synaptische Vesikel fusionieren könnten, wie Ca^{2+} -Ionen eine so schnelle Fusion einleiten könnten und wie die Vesikelfusionsmaschinerie an der aktiven Zone organisiert sein könnte. Kein einziger molekularer Baustein war charakterisiert, und es gab keinen konzeptionellen Bezugsrahmen, innerhalb dessen die außergewöhnliche Präzision und Plastizität der Ca^{2+} -gesteuerten Transmitterausschüttung hätte erklärt werden können. Ich entschied daher, mich auf diese Fragestellungen zu konzentrieren, anstatt die postsynaptische Neurotransmitterrezeption zu untersuchen. Die scheinbar unvorstellbare Geschwindigkeit der Ca^{2+} -gesteuerten Neurotransmitterfreisetzung

faszinierte mich. Darüber hinaus trieb mich die Frage an, welche allgemeine Bedeutung das Verständnis eines solch spezialisierten Prozesses wie dem der Neurotransmitterfreisetzung für das Verständnis von anderen Membranverkehrsprozessen wie etwa der Ausschüttung von Hormonen haben könnte.

Ich gebe hier einen kurzen persönlichen Überblick darüber, was wir im Laufe unserer Studien zu den Mechanismen der Neurotransmitterfreisetzung erarbeitet haben. Dabei habe ich versucht, unsere Arbeit im Kontext der Studien aller Kolleginnen und Kollegen vorzustellen, deren Beiträge unerlässlich für unser Vorankommen waren – obwohl es aus Platzgründen nicht möglich war, all den vielen wichtigen Beiträgen zum Thema vollkommen gerecht zu werden. Es ist mir wichtig festzustellen, dass unsere Arbeiten als Teil einer größeren wissenschaftlichen Gemeinschaft stattfanden, die das selbe Problem erforscht. Der vorliegende Beitrag ist deshalb der Versuch, trotz eines begrenzten Rahmens einen ausgewogenen Überblick über das relevante Forschungsfeld zu geben.

2. Die molekulare Anatomie der präsynaptischen Nervenenden

Als wir mit unseren Studien zu den Mechanismen der Neurotransmitterfreisetzung begannen, entschieden wir uns zunächst für einen einfachen Ansatz, nämlich alle wesentlichen Proteine in präsynaptischen Nervenenden zu isolieren und zu klonieren. Vor allem in der Zusammenarbeit mit Reinhard Jahn konzentrierten wir uns zunächst auf die synaptischen Vesikel, da diese in großen Mengen und in einem sehr reinen Zustand gewonnen werden konnten.^[6,7] Späterweiterten wir diesen Ansatz auf die präsynaptische aktive Zone aus. Mit diesen ersten Experimenten zielten wir darauf ab, einen molekularen Katalog aller relevanten präsynaptischen Proteine zusammenzustellen und so eine Basis für die funktionelle Analyse der Neurotransmitterfreisetzung zu schaffen.

Die ersten synaptischen Vesikelproteine, die wir reinigen und klonieren konnten, waren Synaptophysin,^[8] Cytochrom b561,^[9] Synapsine,^[10] Synaptobrevine^[11] (ebenso unabhängig in der Arbeitsgruppe von R. H. Scheller kloniert und Vesikel-assoziiertes Membranprotein [VAMP] benannt^[12]), Komponenten der vesikulären Protonenpumpe,^[13,14] und Synaptotagmine.^[15–17] Darüber hinaus fanden wir, dass Rab3-Proteine, die im Gehirn am häufigsten vorkommenden GTP-bindenden Proteine repräsentieren und aufgrund ihrer Sequenzhomologie mit Ras-Proteinen identifiziert worden waren,^[18] mit synaptischen Vesikeln assoziieren^[19] und während des Exozytoseprozesses vorrübergehend von synaptischen Vesikel dissoziieren.^[20]

Im Zuge dieser Arbeiten war zu Beginn der 1990er Jahre bereits eine recht umfassende molekulare Charakterisierung

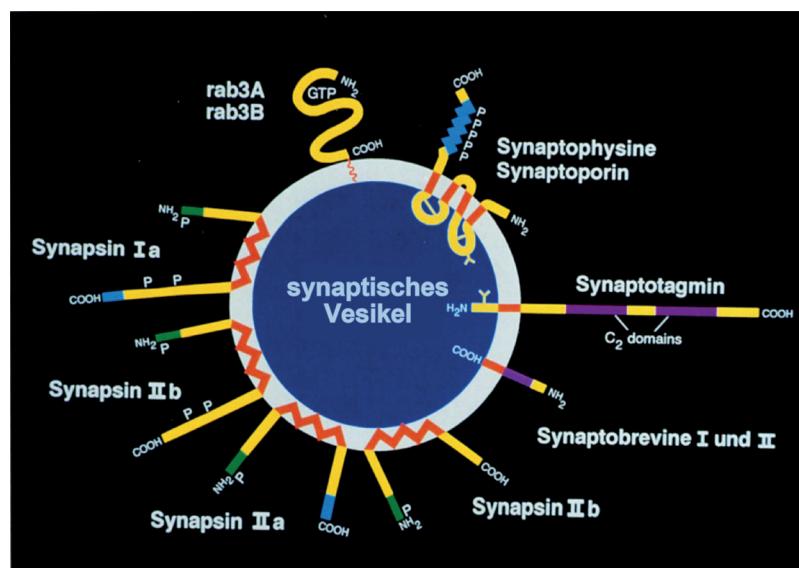


Abbildung 2. Schaubild über die an der Neurotransmitterfreisetzung beteiligten synaptischen Vesikelproteine aus dem Jahr 1991. Zu Beginn des Vorhabens, die molekulare Anatomie synaptischer Vesikel aufzuklären, wurden zunächst fünf wesentliche Klassen an synaptischen Vesikelproteinen identifiziert: Die Synapsine, von denen zu dieser Zeit angenommen wurde, dass sie Hauptkandidaten bei der Regulation der Neurotransmitterfreisetzung wären;^[10] Rab3-Proteine,^[19] Synaptophysine,^[8] Synaptotagmine^[15] und Synaptobrevine/VAMPs.^[11] In späteren Untersuchungen stellte sich heraus, dass drei Klassen (Rab3, Synaptotagmine und Synaptobrevine) dieser Proteine für die Neurotransmitterfreisetzung entscheidend sind (aus Südhof und Jahn, 1991^[7]).

synaptischer Vesikel als Organellen erfolgt (Abbildung 2).^[7] In der Folgezeit klonierten wir und andere eine Reihe weiterer Vesikelproteine, darunter etwa SV2P^[21] und SCAMPs,^[22] und dehnten unsere molekulare Analyse des Prozesses der Neurotransmitterfreisetzung auf die aktive Zone aus. Dabei identifizierten wir Munc18-Proteine,^[23] Complexine,^[24] Munc13-Proteine,^[25] CASK,^[26] RIM-Proteine,^[27] RIM-Bindeproteine (RIM-BPs)^[28] und ELKS^[29] (unabhängig beschrieben von Ohtsuka et al.^[30]). Eine Reihe von Kolleginnen und Kollegen komplementierten diese Untersuchungen und identifizierten α-Liprine,^[31] Bassoon^[32] und Piccolo^[33,34] als Komponenten der aktiven Zone.

Nachdem wir die Primärstrukturen einer wachsenden Anzahl von präsynaptischen Proteinen aufgeklärt hatten, standen wir vor der Herausforderung, deren Funktionen zu ermitteln. Wir entschieden uns dazu, die entsprechenden Proteine umfassend, unvoreingenommen und so systematisch wie möglich zu untersuchen. Dazu wendeten wir eine Kombination aus verschiedenen Methoden an, die von der Strukturbioologie über die Biochemie, Zellbiologie und Elektrophysiologie bis hin zur Mausgenetik reichten.

Diese Untersuchungen führten ultimativ zu einem neuen Verständnis des Prozesses der Neurotransmitterfreisetzung. Allerdings wurden nicht alle Mühen belohnt – für eine Reihe der bekannten, hoch konservierten und abundanten Proteine in Präsynapsen konnten wir keine wichtige Funktion ermitteln. So scheinen etwa die extrem abundanten präsynaptischen Proteine der Synapsin- und Synaptophysin-Familien im synaptischen Vesikelzyklus nur eine untergeordnete Rolle zu spielen, die zwar für den Gesamtorganismus von Bedeutung

ist, jedoch für den grundlegenden Ablauf der Exo- und Endozytose synaptischer Vesikel nicht essenziell ist.^[35,36]

In der folgenden Darstellung diskutiere ich den Prozess der Neurotransmitterfreisetzung in drei Teilvergängen: 1) Die Membranfusion als Grundmechanismus, der die Transmitterausschüttung durch die Exozytose von synaptischen Vesikeln vermittelt, 2) die Ca^{2+} -gesteuerte Einleitung der Fusion als Schlüsselmoment, der die schnelle synaptische Erregungsübertragung ermöglicht, und 3) die räumliche Organisation des Freisetzungskomplexes an der aktiven Zone, die die präzise Kopplung eines präsynaptischen Aktionspotentials mit einer postsynaptischen Antwort erlaubt.

3. Mechanismen der synaptischen Membranfusion

3.1. SNARE-Proteine während der Fusion

Die ersten Erkenntnisse darüber wie synaptische Vesikel während der Neurotransmitterfreisetzung mit der präsynaptischen Plasmamembran verschmelzen könnten, resultierten aus Untersuchungen mit Tetanus- und Botulinumtoxinen. Diese Toxine, die Wundstarrkrampf (Tetanus) bzw. Botulismus verursachen, gehören zu den stärksten bekannten Nervengiften.^[37] Sie sind Metalloproteasen, die die Neurotransmitterausschüttung bereits in Konzentrationen im nanomolaren Bereich zum Stillstand bringen, indem sie die Fusion der synaptischen Vesikel mit der präsynaptischen Membran verhindern.

Untersuchungen, die mit unserer Beteiligung in den Laboren von Cesare Montecucco, Heiner Niemann (1945–1999) und Reinhard Jahn durchgeführt wurden, zeigten 1992, dass Tetanustoxin und Botulinumtoxin B die Fusion synaptischer Vesikel durch die proteolytische Spaltung von Synaptobrevin-2/VAMP blockieren.^[38,39] In den folgenden Jahren zeigten dieselben Arbeitsgruppen, dass andere Subtypen der Botulinumtoxine zwei weitere präsynaptische Membranproteine, SNAP-25 und Syntaxin-1, spalten.^[40,41] Ferner fanden wir, dass selbst die ubiquitär vorkommende Synaptobrevin-Isoform Cellubrevin durch Tetanustoxin gespalten wird, was darauf hin wies, dass die Tetanustoxin-induzierte Spaltung von Synaptobrevin-ähnlichen Proteinen und die daraus resultierende Blockade der Vesikelfusion einen generellen Prozess bei Membranfusionsereignissen darstellt.^[42] Insgesamt lieferten diese Untersuchungen den ersten und wohl noch immer überzeugendsten Beweis dafür, dass Synaptobrevin-2, SNAP-25 und Syntaxin-1 essenzielle Bestandteile des präsynaptischen Vesikeltransportsapparats darstellen. Wie im Folgenden dargestellt, lieferten parallele Untersuchungen aus dem Labor von James Rothman weitere wichtige Erkenntnisse über die mögliche Arbeitsweise dieser Proteine, die später von Rothman SNARE-Proteine getauft wurden (von „soluble NSF-attachment protein receptors“).

Rothman hatte zelluläre Membranfusionsprozesse untersucht, indem er mit biochemischen Methoden *in vitro* den Membranverkehr zwischen den einzelnen Teilen des Golgi-Apparats rekonstituierte.^[43] In diesen Experimenten isolierte Rothman einen „N-ethyl maleimide-sensitive factor“ (NSF) und NSF-Adaptorproteine, die die Membranassoziation von

NSF vermittelten (SNAPs; unglücklicherweise dasselbe Akronym wie für SNAP-25). In Rothmans In-vitro-Studien erwiesen sich NSF und SNAPs als essenzielle Komponenten des Membranverkehrs im Golgi-Apparat, und es zeigte sich weiterhin, dass die beiden Proteine Homologe von Hefeproteinen sind, die an Sekretionsprozessen beteiligt sind. Diese Ergebnisse ließen interessanterweise auf eine fundamentale Rolle von NSF und SNAPs in Membranverkehrsprozessen schließen.^[44,45] In einem entscheidenden Experiment in Rothmans Labor wurden immobilisiertes NSF und SNAP als eine Art Affinitätsmatrix genutzt, um SNAP-Rezeptoren (z.B. SNARE-Proteine) aus dem Gehirn zu reinigen – das Gehirn stellt die reichste Quelle an diesen Rezeptoren dar. Der Ansatz führte zur Isolierung von Synaptobrevin-2, Syntaxin-1 und SNAP-25 als SNAP-Rezeptoren, exakt zu der selben Zeit als diese Proteine als Substrate der Tetanus- und Botulinumtoxine identifiziert wurden.^[46] Weiterhin zeigte Rothman in Zusammenarbeit mit Richard Scheller, dass Synaptobrevin-2, Syntaxin-1 und SNAP-25 einen Protein-Komplex miteinander formen, und dass dieser Komplex von NSF, das als ATPase arbeitet, dissoziiert wird.^[47] Diese brillanten Experimente lieferten eine plausible Erklärung dafür, wie diese Proteine während der Fusion arbeiten könnten, obwohl es noch mehrere Jahre dauerte, bis ein überzeugender Mechanismus für ihre Rolle bei der Membranfusion formuliert wurde. In Zusammenarbeit mit Heiner Niemann fanden wir heraus, dass SNARE-Komplexe extrem stabil und SDS-resistent sind, und dass nur der SNARE-Komplex, nicht aber freie SNARE-Proteine, an SNAPs und NSF binden, wohingegen nur freie SNARE-Proteine und nicht solche innerhalb eines SNARE-Komplexes von Botulinum- und Tetanustoxinen gespalten werden.^[48,49]

Zusammenfassend zeigten uns die beschriebenen Versuchsergebnisse, dass die Entstehung von SNARE-Komplexen zwischen synaptischen Vesikeln und der präsynaptischen Plasmamembran deren Fusion vermittelten könnte. Der genaue Mechanismus der Fusion blieb allerdings unklar. Einer aus dieser Zeit stammenden Hypothese zu Folge wurden NSF und SNAPs als die eigentlichen Fusionsproteine angesehen, während die SNARE-Proteine die Spezifität der durch NSF und SNAPs vermittelten Fusionsreaktion sicherstellen würden, um dann nach der Formation der SNARE-Komplexe als Rezeptoren für NSF und SNAPs zu fungieren.^[46,47] Eine andere Idee, die wir favorisierten, basierte auf den Ergebnissen der Botulinum- und Tetanustoxin-Experimente und besagte, dass SNARE-Proteine, im Besonderen Synaptobrevin-2, direkt an der Fusion beteiligt sind, obwohl wir den genauen Mechanismus nicht kannten.^[50]

Zwei aufeinanderfolgende Schlüsselexperimente klärten daraufhin die Frage, ob NSF und SNAPs oder die SNARE-Proteine die eigentlichen Membranfusionsproteine darstellen. Zunächst zeigte Bill Wickners Labor in eleganten Experimenten, dass NSF in der Hefe nicht an der Fusion von Vakuolen beteiligt ist, sondern nur für die Aktivierung der SNARE-Proteine vor der Fusion benötigt wird und die Komponenten des SNARE-Komplexes nach der Fusion recycelt.^[51] In einem weiteren ausschlaggebenden Versuch zeigten Reinhard Jahn und John Heuser, dass sich SNARE-Komplexe in einer parallelen Anordnung zusammenlegen,

sodass die C-terminalen Transmembranregionen der einzelnen SNARE-Proteine durch die Zusammensetzung der Protein-Komplexe eng zusammengeführt werden.^[52] Die bahnbrechenden Ergebnisse von Heuser und Jahn führten unmittelbar zu einem Modell dafür, wie SNARE-Proteine die Membranfusion vermitteln könnten, nämlich indem sie sich von ihren N-Termini aus in Richtung ihrer C-Termini einem Reißverschluss gleich zusammenschließen („zippering“) und so die zu fusionierenden Membranen in der unmittelbaren Nähe der C-terminalen Transmembranregionen der SNARE-Proteine eng zusammenziehen. Dieses Modell wurde kurze Zeit später durch biophysikalische und strukturbiologische Untersuchungen bestätigt^[53,55] und durch Rothman in *In-Vitro*-Experimenten, in denen die durch SNARE-Proteine vermittelte Fusion von Liposomen untersucht wurde, weiter verfeinert.^[56] Es ist mittlerweile das Standardmodell auf diesem Gebiet.

3.2. SM-Proteine sind obligatorische SNARE-Partner während der Membranfusion

Im Jahr 1993, kurz nachdem die SNARE-Proteine als Komponenten des Membranfusionsapparats identifiziert worden waren, suchten wir mittels Affinitätschromatographie mit immobilisiertem Syntaxin-1-Protein nach weiteren Bau- teilen der Fusionsmaschinerie.^[23] Wir isolierten ein 65 kDa schweres Protein, das wir aufgrund seiner Sequenzhomologie zu dem Unc-18-Protein in *C. elegans* Munc18-1 nannten (Abbildung 3 A). Ursprünglich hatte Sidney Brenner *unc-18*-Mutanten isoliert, da diese unkoordinierte lokomotorische Bewegungen zeigten (engl. „uncoordinated“), aber die Funktion des *unc-18*-Gens blieb unbekannt.^[57] Da Munc18 an ein wesentliches Protein des Membranfusionsapparats binden konnte und *unc-18* in *C. elegans* für normale Lokomotion essenziell war, formulierten wir die Hypothese, dass Munc18-1 ein intrinsischer Bestandteil der Fusionsmaschinerie sein und mit den SNARE-Proteinen während der Fusion zusammenarbeiten könnte (Abbildung 3 A).

Weitere Untersuchungen zeigten, dass Munc18-1 auch eine Homologie zu *sec1* aufwies, das erste Gen, das von Peter Novick und Randy Schekman in Screens nach mutanten Hefezellen mit defekter Sekretion isoliert worden war, aber dessen Funktion, ähnlich wie im Fall von *unc-18*, unbekannt geblieben war.^[58] Genau genommen führte diese Homologie dazu, dass einige Wissenschaftler Munc18-1 als n-sec1 oder rb-sec1 bezeichneten.^[59,60] Anschließend wurden mehrere weitere homologe Proteine zu Sec1p und Munc18 beschrieben, sodass die Mitglieder der entsprechenden Proteinfamilie mittlerweile als Sec1/Munc18-ähnliche Proteine bezeichnet werden.^[61]

Nach der Entdeckung von Munc18-1 herrschte zunächst große Verwirrung über dessen Funktion, die zum Teil durch widersprüchliche Beobachtungen befeuert wurde. Auf der einen Seite zeigten *sec1*-Mutationen in der Hefe eine Blockade der Vesikelfusion,^[58] führte die Ausschaltung des Munc18-1-Gens in *Drosophila* (*rop*) zu einem Verlust der synaptischen Informationsweiterleitung^[62] und wiesen Munc18-1 Knockout-Mäuse einen vollständigen Verlust der

Neurotransmitterfreisetzung auf^[63] (Abbildung 3B). Diese Ergebnisse legten den Schluss nahe, dass Munc18-1 selbst eine essenzielle Rolle bei der Fusionsreaktion spielt, eine Hypothese, die durch elegante Untersuchungen Novicks gestützt wurde, der nachwies, dass das Sec1-Protein an SNARE-Komplexe binden kann^[64] und auch nach der Zusammensetzung der SNARE-Komplexe agiert.^[65] Auf der anderen Seite fanden wir, dass Syntaxin-1 außerhalb des SNARE-Komplexes eine „geschlossene“ Konformation einnimmt, in der sich die N-terminale Habc-Domäne auf das SNARE-Motiv von Syntaxin-1 faltet und dass Munc18-1 an diese geschlossene Syntaxin-1-Konformation bindet.^[66] Habc-Domänen sind ein konserviertes Merkmal von Syntaxin-Proteinen und machen die Hälfte ihrer Sequenz aus, wohingegen das SNARE-Motiv der Syntaxin-Proteine die SNARE-Komplexe formt, indem es sich an ähnliche SNARE-Motive von Synaptobrevinen und SNAP-25 oder deren homologer Proteine anlagert, was zur Ausbildung eines Komplexes aus vier parallel angeordneten α -Helices führt (Abbildung 3C).^[55,67] In der geschlossenen Syntaxin-1 Konformation verhindert also die intramolekulare Interaktion der N-terminalen Habc-Domäne mit dem SNARE-Motiv von Syntaxin-1, dass Syntaxin-1 SNARE-Komplexe ausbilden kann. Diese Ergebnisse wiesen darauf hin, dass Munc18-1 ein negativer Regulator bei der Entstehung von SNARE-Komplexen sein könnte. So entstand eine paradoxe Datenlage, der zu Folge Munc18-1 einerseits zwar für den Membranfusionsvorgang essenziell war, gleichzeitig aber durch die Inhibition der SNARE-Komplex-Zusammensetzung dazu in der Lage war, die Membranfusion zu verhindern.

Diese anscheinende Widersprüchlichkeit in der Wirkweise von Munc18-1 konnte aufgelöst werden, als wir in enger Zusammenarbeit mit Josep Rizo herausfanden, dass die SM-Proteine, die an dem Transport von Vesikeln vom Endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat beteiligt sind (Sly1), sowohl in Wirbeltieren als auch in der Hefe an ihre verwandten Syntaxin-Proteine (Syntaxin-5 und Syntaxin-18 in Wirbeltieren und Sed5p und Ufe1p in der Hefe) über ein kurzes konserviertes N-terminales Peptid binden (das „N-Peptid“,^[68] Abbildung 3C und 3D). Wir fanden weiterhin, dass ein anderes SM-Protein (Vps45), das an der Fusion von Endosomen und dem Trans-Golgi-Apparat beteiligt ist, den gleichen Mechanismus verwendet und über ein sehr ähnliches N-Peptid an sein verwandtes Syntaxin-16 (Tlg2p in der Hefe) bindet.^[69] Über diesen Bindungsmechanismus könnten die SM-Proteine auch während der Entstehung des SNARE-Komplexes mit ihren jeweiligen Syntaxin-Partnern assoziiert bleiben. Diese Ergebnisse sind im Einklang mit Novicks Untersuchungen zum Sec1-Protein,^[65] wobei zu beachten ist, dass sich die Details der Interaktion zwischen Sec1-Proteinen und dem SNARE-Komplex in der Hefe möglicherweise von der Situation in Synapsen unterscheiden. In jedem Fall fiel auf, dass in Wirbeltieren die Syntaxin-Proteine der Plasmamembran eine sehr ähnliche konservierte N-terminale Sequenz aufwiesen (Abbildung 3D), was für uns den Ausschlag dazu gab, nach einem ähnlichen Bindemechanismus zwischen Munc18-1 und Syntaxin-1 zu suchen.

Tatsächlich fanden wir, dass Munc18-1 mit hoher Affinität an zusammengesetzte SNARE-Komplexe binden

konnte, und zwar über einen Mechanismus, der von dem N-terminalen Peptid von Syntaxin-1 abhängig war (Abbildung 3E;^[70] James Rothmans Labor machte zeitgleich ähnliche Beobachtungen^[71]). Bereits die Fusion eines kleinen Myc-Epitops an das N-terminale Peptid von Syntaxin-1 beeinträchtigte die Bindung an Munc18-1, wohingegen die Bindung von Munc18-1 an die geschlossene, monomere Syntaxin-1-Konformation das Syntaxin-1-N-Peptid nicht benötigte.

Zusammenfassend zeigten uns diese Ergebnisse, dass Munc18-1 über zwei aufeinanderfolgende Mechanismen und unter Einbeziehung unterschiedlicher Syntaxin-1-Konformationen an Syntaxin-1 bindet (Abbildung 4): Eine Exozytose-spezifische Interaktion, in der Munc18-1 unabhängig von dem N-Peptid an die geschlossene Konformation von Syntaxin-

1 bindet^[66] und einen allgemeinen Bindemechanismus, der dem einiger anderer SM-Protein/SNARE-Komplex-Interaktionen ähnlich ist und über den Munc18-1 das Syntaxin-1-N-Peptid in der geöffneten Form von Syntaxin-1 innerhalb des SNARE-Komplexes bindet und mit anderen Bestandteilen des SNARE-Komplexes interagiert.^[70]

Unklar blieb zu diesem Zeitpunkt jedoch, welche Funktionen sich hinter den zwei Bindemechanismen von Munc18-1 an SNARE-Proteine verbargen und welche der beiden Interaktionen für die Fusion wichtiger war. In der Held'schen Calyx zeigten die ersten Peptid-Kompetitions-Experimente, dass durch die Verdrängung des N-Terminus von Syntaxin-1 durch Munc18-1 die Fusion synaptischer Vesikel behindert wird.^[72] Weitere Untersuchungen zeigten, dass Mutationen in Munc18-1, die zu einer verminderten Bindung von Munc18-1 an die N-terminalen Sequenzen von Syntaxin-1 führten, ebenfalls die Vesikelfusion beeinträchtigten.^[73] In diesem Zusammenhang ist festzustellen, dass in einer späteren

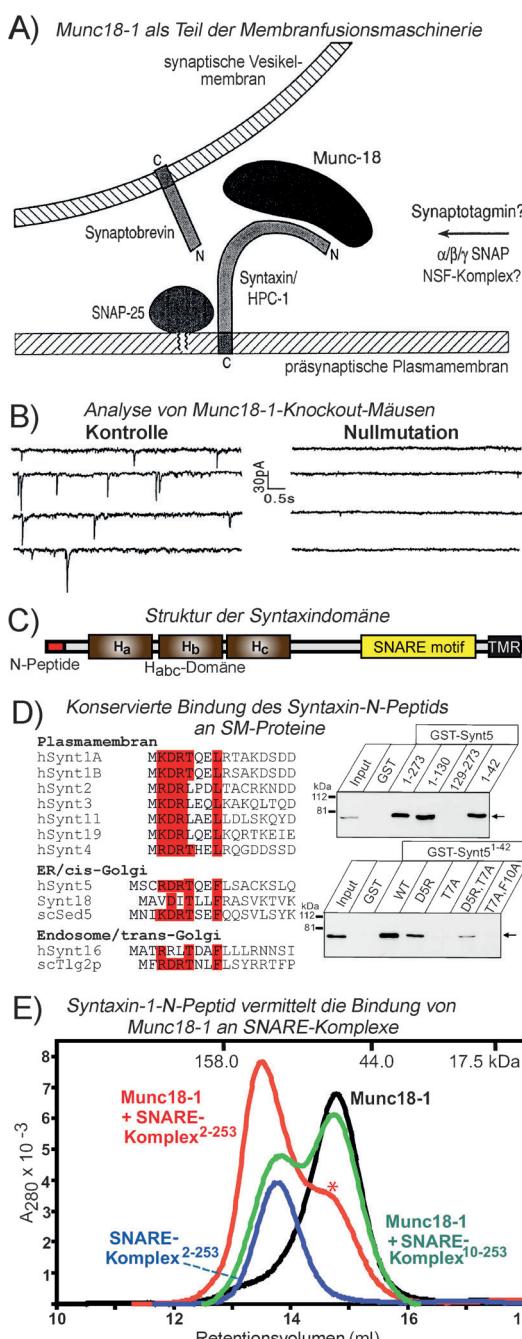


Abbildung 3. Interaktionen der Sec1/Munc18-ähnlichen („SM“) Proteine mit Syntaxinen und dem SNARE-Komplex während der Fusion synaptischer Vesikel. A) Schaubild über die Munc18-1/SNARE-Interaktionen aus der ursprünglichen Beschreibung von Munc18-1 (seinerzeit als Munc-18 bezeichnet) als ein Syntaxin-1-Bindeprotein, das Teil des Vesikel-Fusionsapparats ist (aus Hata et al.^[23]). B) Nachweis darüber, dass Munc18-1 für die Vesikelfusion essenziell ist und nicht in erster Linie als negativer Regulator der Fusion agiert. Die Bilder zeigen im Kortex gemessene synaptische Aktivitäten von neugeborenen Wildtyp-Mäusen (Kontrolle) und Munc18-1-Knockout-Wurfgeschwistern (Nullmutation). Es ist ein kompletter Verlust der elektrischen Aktivität in Abwesenheit von Munc18-1 zu erkennen (aus Verhage et al.^[63]). C) Die Domänenstruktur der Syntaxine besteht aus einer konservierten N-terminalen Sequenz (N-Peptid), einer autonom gefalteten Habc-Domäne, bestehend aus drei α -Helices,^[67] dem SNARE-Motiv, das sich mit den SNARE-Sequenzen von Synaptobrevin-2 und SNAP-25 oder deren homologen Proteinen zu einem SNARE-Komplex zusammensetzt, und einer C-terminalen Transmembranregion (TMR). Außerhalb des SNARE-Komplexes bilden Syntaxine spontan eine „geschlossene“ Konformation in der sich die N-terminalen Habc-Domäne zurück auf das SNARE-Motiv faltet, dadurch das SNARE-Motiv verdeckt und auf diese Weise die Zusammensetzung von SNARE-Komplexen verhindert. D) Entdeckung eines konservierten N-terminalen Sequenzmotivs, das in einem Großteil der SM-Proteine die Bindung an ihre entsprechenden Syntaxin-Partner vermittelt. Auf der linken Seite ist ein Vergleich der N-terminalen Syntaxin-Sequenzen zu sehen (rot, an der Bindung zu den SM-Proteinen beteiligte konservierte Aminosäurereste) sowie Immunblots, die zum ersten Mal zeigten, dass der N-Terminus des ER/Golgi-Proteins Syntaxin-5 an das SM-Protein Sly1 bindet und dass diese Bindung vom konservierten N-terminalen Syntaxin-5 Sequenzmotiv abhängt (aus Yamaguchi et al.^[68]). E) Gelfiltrationsexperimente zeigten, dass Munc18-1 mit dem vollständig zusammengesetzten SNARE-Komplex einen stabilen Komplex bildet. Munc18-1 oder synaptische SNARE-Komplexe, die die komplett N-terminalen Sequenzen von Syntaxin-1 besaßen, wurden entweder isoliert untersucht (Munc18-1, schwarze Kurve; SNARE-Komplex, blaue Kurve), oder es wurde eine Kombination aus Munc18-1 und SNARE-Komplexen verwendet, die entweder die vollständige N-terminalen Sequenzen von Syntaxin-1 (rote Kurve) oder aber eine N-terminal verkürzte Version des Syntaxin-1-Proteins enthielten (grüne Kurve). Munc18-1 wurde in Anwesenheit der SNARE-Komplexe, die die vollständige N-terminalen Sequenzen von Syntaxin-1 enthielten, fast vollständig zusammen mit diesen eluiert, während Munc18-1 in Anwesenheit von SNARE-Komplexen, die die N-terminal verkürzte Version von Syntaxin-1 enthielten, nicht mit den SNARE-Komplexen eluiert wurde (aus Dulubova et al.^[70]).

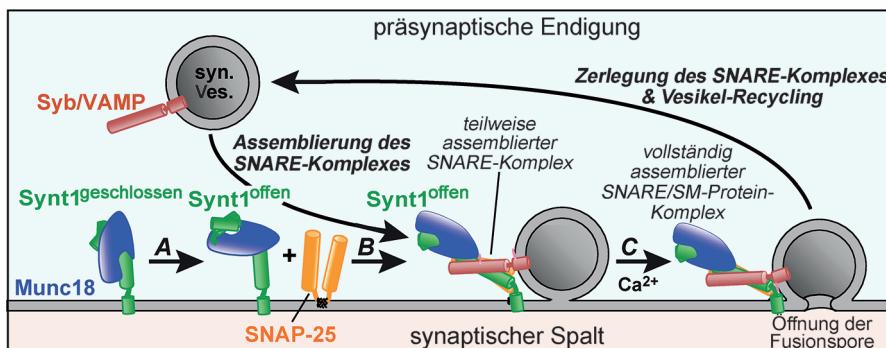


Abbildung 4. Konformationsänderungen von SNARE- und SM-Proteinen vermitteln die Fusion synaptischer Vesikel. Syntaxin-1 nimmt vor der Fusion eine „geschlossene“ Konformation ein, indem es Munc18-1 über eine Syntaxin-1-N-Peptid-unabhängige Interaktion bindet.^[66] In Reaktion A wird Syntaxin-1 „geöffnet“ (vermutlich katalysiert durch Munc13),^[73] um synaptische Vesikel für die Fusion vorzubereiten („priming“). In Reaktion B bilden sich durch den fortschreitenden Zusammenschluss der Proteine von deren jeweiligen N-Termini zu den C-Termini teilweise zusammengesetzte SNARE-Komplexe,^[52] während Munc18-1 weiterhin über die Bindung zum N-Peptid mit Syntaxin-1 assoziiert bleibt.^[72] In Reaktion C gibt Ca^{2+} das Startsignal für die Öffnung der Fusionspore, indem es den vollständigen Zusammenschluss des SNARE-Komplexes stimuliert: Auch Munc18-1 ist an diesem Prozess beteiligt und wird in diesem Schritt für die Öffnung der Fusionspore benötigt, da die Bindung von Munc18-1 zu SNARE-Komplexen für die Öffnung der Fusionspore essenziell ist.^[79] Nach der Fusion werden die SNARE-Komplexe durch die NSF-ATPase und deren SNAP-Proteinadapter (es besteht keine Verwandtschaft mit dem SNARE-Protein SNAP-25) dissoziiert, und Vesikel werden durch Endozytose wieder gewonnen (siehe Abbildung 1), wobei Munc18-1 weiterhin mit Syntaxin-1 assoziiert bleibt und Syntaxin-1 in „geschlossener“ Konformation eine heterodimere Interaktion mit Munc18-1 eingeht. Es liegen also zwei grundlegende Konformationsänderungen während der exozytotischen Membranfusion vor: Die Öffnung von Syntaxin-1 durch eine Veränderung der Bindungsweise von Munc18-1 an Syntaxin-1 und die Zusammensetzung der SNARE-Proteine zu SNARE-Komplexen.

Studie, in der unsere Ergebnisse zur Bindung von Munc18-1 an die N-terminalen Sequenzen von Syntaxin-1 angefochten wurde, Mutationen verwendet wurden, die den von uns verwendeten zwar ähnlich waren aber schwächere Effekte auf die Bindung hatten^[74] sodass diese Mutationen in Munc18-1 die Bindung an das Syntaxin-1-N-Peptid nur unvollständig inhibierten. In den entsprechenden Untersuchungen fanden alle physiologischen Experimente nach einer starken Überexpression der jeweiligen Proteine statt, was eine verminderte Bindeaffinität leicht kompensiert haben könnte. Darüber hinaus zeigten Experimente in *C. elegans* auf elegante Weise, dass das Syntaxin-1-N-Peptid für die Fusionsreaktion essenziell ist, für seine Funktion aber nicht mit Syntaxin-1 verbunden sein muss solange es sich in der Nähe der SNARE-Komplexe befindet.^[75] In Übereinstimmung mit diesen Befunden fanden wir, dass das Syntaxin-1-N-Peptid in Säugetiersynapsen auch für die Vesikelfusion unter physiologischen Bedingungen benötigt wird.^[76]

In der Zusammenschau zeigen die oben diskutierten Experimente, dass die Bindung von Munc18-1 an die „geöffnete“ Konformation von Syntaxin-1 innerhalb des SNARE-Komplexes für die Membranfusion essenziell ist. Sie bestätigen weiterhin, dass Munc18-1 – analog zu Sec1p – ein intrinsischer Bestandteil der Fusionsmaschinerie ist, aber sie lassen die Frage nach der Bedeutung der Bindung von Munc18-1 an die „geschlossene“ Form von Syntaxin-1 offen. Um diese Funktion von Munc18-1 zu untersuchen, stellten wir Knock-in-Mäuse her, die Syntaxin-1-Proteine nur in ihrer

konstitutiv geöffneten Form (Syntaxin-1^{OPEN}) produzierten, sodass die Bindung von Munc18-1 an die „geschlossene“ Form von Syntaxin-1 unterdrückt wurde.^[77] Durch diese in Mäusen erzeugte Mutation wurden sowohl Syntaxin-1 als auch Munc18-1 und Syntaxin-1 destabilisiert und lagen in verringerten Mengen in Zellen vor. Diese Ergebnisse wiesen zusammen mit weiteren Indizien darauf hin, dass der Komplex aus Munc18-1 und der geschlossenen Form von Syntaxin-1 beide Proteine stabilisiert.^[63] Die reduzierte Menge an Syntaxin-1- und Munc18-1-Protein in Synapsen der Syntaxin-1^{OPEN}-Mäuse führte dazu, dass weniger fusionskompetente Vesikel in den Synapsen vorlagen, sehr wahrscheinlich dadurch bedingt, dass weniger Fusionsplätze für die Verschmelzung der Vesikel mit der Membran zur Verfügung standen.^[77,78]

Trotz dieses Defekts war die Wahrscheinlichkeit der Ca^{2+} -gesteuerten Neurotransmitterfreisetzung in den Syntaxin-1^{OPEN}-Synapsen dramatisch erhöht und die Fusion war gesteigert. Selbst die Verschmelzung einzelner Vesikel mit der Plasmamembran, gemessen an der Kinetik einzelner Vesikelfusionsereignisse, sogenannter „mini“-Ereignisse (engl. „miniature“), war schneller in den Syntaxin-1^{OPEN}-Synapsen im Vergleich zu Wildtyp-Synapsen.^[78] Diese Daten und weitere Ergebnisse, die zeigten, dass die Habc-Domäne von Syntaxin-1 im Unterschied zu dem N-Peptid nicht für die Fusion essenziell ist,^[79] führten zu dem Nachweis, dass die Bindung von Munc18-1 an die „geschlossene“ Konformation von Syntaxin-1 keine Bedeutung für die Fusionsreaktion hat, wobei die Interaktion mit der „geöffneten“ Form von Syntaxin-1 innerhalb des SNARE-Komplexes essenziell für die Verschmelzung der Vesikel ist. Die Bindung von Munc18-1 an die geschlossene Form von Syntaxin-1 scheint jedoch zwei wichtige Funktionen zu haben, die nicht direkt mit dem Fusionsprozess zu tun haben, nämlich die gegenseitige Stabilisierung von Munc18-1 und Syntaxin-1 sowie eine Rolle als eine Art „Schleuse“ für die Fusionsreaktion, durch die die Fusionsrate über die Zusammensetzung von SNARE-Komplexen kontrolliert wird.

3.3. Wie vermitteln SNARE- und SM-Proteine die Fusion?

Im Prinzip arbeiten die SNARE-Proteine über einen einfachen Mechanismus: Sie sind mit beiden für die Fusion bestimmten Membranen verbunden und bilden einen trans-Komplex, indem sich die vier α -Helices der einzelnen SNARE-Komplex-Komponenten wie bei einem Reißver-

schluss schrittweise vom N- zum C-Terminus aneinanderfügen. Über diesen Mechanismus bringen die SNARE-Proteine die zu verschmelzenden Membranen eng zusammen und destabilisieren deren Oberflächen. Auf diese Weise wird eine Fusionspore geöffnet, durch deren Ausweitung die trans-SNARE-Komplexe in cis-SNARE-Komplexe umgewandelt werden. Diese cis-SNARE-Komplexe werden anschließend durch NSF und SNAP-Adapterproteine dissoziiert, was die Wiederverwendung der SNARE-Proteine für eine neue Fusionsrunde ermöglicht (Abbildung 4).

Allerdings kommen an diesem Punkt mindestens zwei grundlegende Fragen auf, nämlich erstens ob SNARE-Proteine vor allem die Krafterzeugung für die Fusion übernehmen, indem sie die beiden fusionierenden Membranen zusammenziehen (was *in vitro* für die Einleitung der Fusion bereits ausreichend sein könnte) oder ob sie selbst sogar die Fusionspore bilden, und zweitens, was die genaue Bedeutung und Funktion der SM-Proteine während der Fusion ist.

In-vitro-Experimente zeigten, dass die Transmembranregionen von Synaptobrevin und Syntaxin-1 miteinander in der Ebene der Membran interagieren, und die SNARE-Motive dieser Proteine zusammen mit ihren Transmembranregionen eine kontinuierliche starre α -Helix bilden. Dies weist daraufhin, dass die Transmembranregionen von Synaptobrevin und Syntaxin-1 aktiv an der Entstehung der Fusionspore beteiligt sein könnten.^[80] Allerdings fanden wir vor kurzem, dass Synaptobrevin-2 und Syntaxin-1 auch dann noch die Vesikelfusion vermitteln können, wenn sie nicht über ihre Transmembranregionen sondern mit flexibleren, so genannten Lipidankern mit ihren jeweiligen Membranen verbunden sind. Diese Befunde zeigen uns, dass die Transmembranregionen der SNARE-Proteine nicht essenzielle Bestandteile der Fusionsmaschinerie sind,^[79] und sie unterstützen die Annahme, dass die SNARE-Proteine die Energie für die Fusion erzeugen aber ihre Transmembranregionen in diesem Prozess nicht als Fusionsbeschleuniger fungieren.

Trotz der bisher erzielten Fortschritte bleibt die Frage nach der genauen Rolle der SM-Proteine während der Fusion unklar. Die Tatsache, dass diese Proteine während der Zusammensetzung der SNARE-Komplexe fortlaufend benötigt werden, spricht dafür, dass sie entweder bei der Organisation der SNARE-Komplex-Zusammensetzung beteiligt sind und so die Entstehung falsch geformter, so genannter „dead-end“-SNARE-Komplexe verhindern, oder dass sie bei der Vermischung der Membranlipide während der Fusion helfen. Zum jetzigen Zeitpunkt gibt es noch keine eindeutigen Beweise für die Richtigkeit einer der beiden Hypothesen, sodass diese Frage viele von uns noch über einige Jahre beschäftigen wird.

3.4. SNARE-Chaperone sind für die Erhaltung der Integrität in den präsynaptischen Nervenenden essenziell

Nervenzellen feuern oft hochfrequente Salven („bursts“) oder Folgen von Aktionspotentialen, deren Frequenzen 100 Hz überschreiten können. Jedes einzelne Neurotransmitterfreisetzungereignis involviert die Faltung und Entfaltung von reaktiven SNARE-Proteinen, was dazu führen kann, dass das präsynaptische Zytosol aufgrund der reaktiven

SNARE-Motive schädlichen Fehlfaltungen der SNARE-Proteine und fehlerhaft zusammengesetzten Komplexen ausgesetzt ist. Es überrascht daher nicht, dass Nervenzellen spezialisierte Chaperone produzieren, die bei der richtigen Faltung der SNARE-Proteine helfen, und dass der Verlust dieser Chaperone neurodegenerative Prozesse zur Folge hat. Wir entdeckten zwei Klassen solcher Chaperone, CSP α (cysteine-string protein- α), das seinen Namen einer Kette palmitoylierter Cystein-Reste verdankt, über die CSP α an Vesikel bindet,^[81] und die Synukleine, die so benannt wurden, weil zunächst angenommen wurde, dass sich diese Proteine auch im Nukleus befinden.^[82]

Unsere Entdeckung, dass CSP α und die Synukleine als SNARE-Chaperone fungierten, war ein glücklicher Zufall. Wir fanden nämlich heraus, dass die Ausschaltung von CSP α in Mäusen eine massive Neurodegeneration hervorruft, die durch eine Beeinträchtigung der Zusammensetzung der SNARE-Komplexe hervorgerufen wird und dazu führt, dass die betroffenen Tiere innerhalb von 3–4 Monaten sterben.^[83] Überraschenderweise wurde diese Neurodegeneration durch eine leichte Überexpression von CSP α unterdrückt.^[84] Als wir diese Beobachtungen weiterverfolgten, fanden wir, dass CSP α – welches eine DNA-J Domäne besitzt und einen katalytisch aktiven, ATP-abhängigen Chaperon-Komplex mit Hsc70 und dem Tetratricoepitid-Repeat-Protein SGT bildet^[85] – die richtige Faltung von SNAP-25 katalysiert und so SNAP-25 zu der SNARE-Komplex-Zusammensetzung befähigt.^[86–88] In CSP α -KO-Mäusen führt die Fehlfaltung von SNAP-25 zu einer Beeinträchtigung der SNARE-Komplex Zusammensetzung, was wiederum eine Neurodegeneration hervorruft. Interessanterweise kann α -Synuklein diese Neurodegeneration revertieren, indem es über eine nichtklassische, ATP-unabhängige Chaperon-Aktivität die Zusammensetzung der SNARE-Komplexe in unabhängiger Weise vorantreibt.^[89]

Obwohl diese Beobachtungen eine interessante Facette der SNARE-Protein-Biologie ans Licht gebracht haben, wissen wir noch nicht, in welchem Verhältnis die physiologischen Aktivitäten von α -Synuklein zu dessen neurotoxischen Effekten bei der Parkinson'schen Krankheit stehen. Eine attraktive Hypothese wäre in diesem Zusammenhang, dass die Aggregation von α -Synuklein in Nervenzellen bei der Parkinson'schen Krankheit die Erschöpfung eines Vorrats an funktionalem α -Synuklein verursacht und dadurch zu einer schädlichen SNARE-Proteinfeflfaltung führt. Allerdings erscheinen andere Hypothesen, wie zum Beispiel die, dass α -Synuklein-Oligomere eine direkte pathologischen bzw. neurotoxische Aktivität besitzen, ebenso plausibel.

4. Ca²⁺-Steuerung der Fusion: Synaptotagmine und ihre Partner

Parallel zu unseren Arbeiten zur synaptischen Membranfusion untersuchten wir eine wichtige verwandte Frage, nämlich die nach dem Mechanismus, mittels dessen Ca²⁺-Ionen die synaptische Membranfusion während der Neurotransmitterfreisetzung steuern. Diese Frage beschäftigte mich bereits seit meiner Zeit als Doktorand in Victor Whittakers

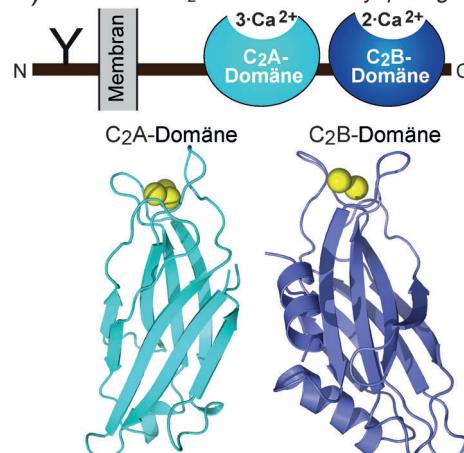
Labor in Göttingen. Die zentrale Bedeutung der Ca^{2+} -gesteuerten Neurotransmitterfreisetzung für die Gehirnfunktion sowie deren unglaubliche Geschwindigkeit und Plastizität faszinierten mich, und die Ähnlichkeit der Ca^{2+} -induzierten Exozytose von synaptischen Vesikeln zu anderen Arten der Ca^{2+} -induzierten Exozytose, wie sie etwa der Hormonsekretion, der Mastzelldegranulation oder der Eizell-Befruchtung zu Grunde liegen, führten mich zu dem Schluss, dass ein Verständnis der Ca^{2+} -gesteuerten Neurotransmitterfreisetzung auch allgemein für das Verständnis anderer zellulärer Signalübertragungsprozesse von Bedeutung sein müsste. Obwohl einige unserer Schlüsselbeobachtungen zu den Synaptotagminen bereits zeitgleich zur Entdeckung der SNARE- und SM-Proteine gemacht wurden, streckten sich unsere Arbeiten zu den Synaptotagminen über einen längeren Zeitraum, um selbst die strengsten Kritiker zu überzeugen. Darüber hinaus wurden einige der bedeutendsten Entdeckungen erst vor kurzem gemacht.

4.1. Die Entdeckung von Syntaptotagmin-1: Die Identifizierung der C2-Domänen als vielfältige Ca^{2+} -Bindedomänen

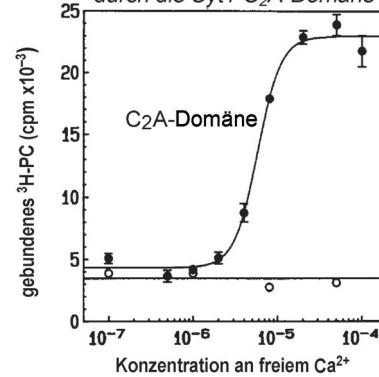
Während wir die molekulare Anatomie synaptischer Vesikel erforschten, suchten wir zeitgleich auch nach einem Kandidaten für den Ca^{2+} -Sensor, der die Ca^{2+} -Steuerung der Exozytose von synaptischen Vesikeln vermitteln könnte. Als wir Synaptotagmin-1 (Syt1) klonierten, das zuvor bereits mithilfe eines gegen Synaptosomen gerichteten monoklonalen Antikörpers als synaptisches Vesikelprotein beschrieben wurde,^[90] waren wir sofort von seiner Primärstruktur fasziniert, da Syt1 zwei C2-Domänen besaß, die über eine Transmembranregion mit der Vesikelmembran verankert waren (Abbildung 2 und 5A).^[15] Zu dieser Zeit wusste man fast nichts über C2-Domänen, außer dass sie die „zweite konstante Region“ des klassischen Proteinkinase-C-Isoenzymes (PKC) darstellten.^[91] Da die klassischen PKC-Isoenzyme durch Ca^{2+} reguliert werden und mit Phospholipiden interagieren, mutmaßten wir, dass die C2-Domänen von Synaptotagmin Ca^{2+} -Bindemodule sein könnten, die mit Phospholipiden interagieren, und dass Syt1 der Ca^{2+} -Sensor für die Neurotransmitterfreisetzung sein könnte.^[15] In den zwei Jahrzehnten, in denen wir diese Hypothese verfolgten, konnten wir zeigen, dass die Ca^{2+} -Steuerung der Neurotransmitterfreisetzung durch die Bindung von Ca^{2+} an Syt1 und andere Synaptotagmine vermittelt wird und dass verschiedene Synaptotagmin-Isoformen ähnliche Funktionen als Ca^{2+} -Sensoren in anderen Ca^{2+} -abhängigen Exozytoseprozessen übernehmen.

Die erste Herausforderung nach der Beschreibung von Syt1 bestand darin zu testen, ob die C2-Domänen von Syt1 tatsächlich eine neue Form der Ca^{2+} /Phospholipid-Bindedomänen darstellten. Wir fanden, dass die C2-Domänen von Syt1 an Phospholipide binden,^[15] dass diese Bindung auch durch gereinigtes Syt1 aus dem Gehirn in Ca^{2+} -abhängiger Weise vermittelt wurde^[92] und dass eine einzelne C2-Domäne von Syt1 – die C2A-Domäne – aus einer autonom gefalteten Domäne besteht, die Ca^{2+} und Phospholipide in einem tripartiten Komplex bindet (Abbildung 5B).^[93,94] Darüber

A) Struktur der C₂-Domänen von Syaptotagmin-1



B) Ca^{2+} -abhängige Phospholipidbindung durch die Syt1-C₂A-Domäne



C) Ca^{2+} -Bindestellen der C₂A-Domäne von Syt1

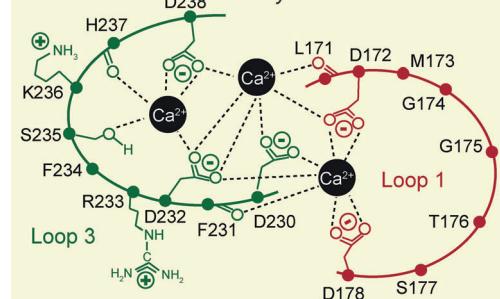


Abbildung 5. Domänenstruktur und Ca^{2+} -Bindung von Syntaptotagmin-1. A) Die Domänenstruktur von Synaptotagmin-1 (Syt1) und die Struktur der C2-Domänen von Syt1 (mit freundlicher Genehmigung von J. Rizo; Shao et al.,^[183] Fernandez et al.^[102]). B) Nachweis darüber, dass die C2A-Domäne von Syt1, und im weiteren Sinne auch andere C2-Domänen, autonom faltende Ca^{2+} -Binedomänen darstellen. Die Daten zeigen, dass die gereinigte rekombinante C2A-Domäne hochaffin und durch Ca^{2+} -Ionen hoch kooperativ reguliert an Phospholipide bindet (aus Davletov und Südhof^[93]). C) Architektur der Ca^{2+} -Bindestellen in der C2A-Domäne von Syt1, ermittelt durch NMR-Spektroskopie (in Anlehnung an Fernandez-Chacon et al.,^[22]). Mehrere Ca^{2+} -Ionen werden in unvollständigen Koordinationssphären über mehrere Aspartatreste gebunden.

hinaus beobachteten wir und andere, dass die C2-Domänen von Syt1 in Abhängigkeit von Ca^{2+} auch Syntaxin-1 und den SNARE-Komplex binden könnten.^[95,96] In Zusammenarbeit

mit Steven Sprang und Josep Rizo erhielten wir die atomare Struktur der C2-Domänen von Syt1 und bestimmten die Architektur der Ca^{2+} -Bindestellen (Abbildung 5 A).^[97–102] Unsere Strukturstudien zeigten, dass die C2-Domänen von Syt1 aus stabilen β -Sandwiches mit beweglichen Schleifen bestehen, die oben und unten aus der Sandwich-Struktur herausragen, und dass Ca^{2+} in unvollständigen Koordinationssphären ausschließlich an die oberen Schleifen der C2-Domänen bindet (Abbildung 5 A und 5 C). Demzufolge band Ca^{2+} die C2-Domänen von Syt1 mit intrinsisch niedriger Affinität, wobei die Affinität dieser Bindung durch die Interaktion mit Phospholipiden, über die die Ca^{2+} -Koordinationssphären vervollständigt werden, dramatisch erhöht wird.^[93, 94, 100, 102]

Die biochemische und strukturelle Beschreibung der Syt1-C2A-Domäne als ein sich autonom faltendes Ca^{2+} -Bindemodul – die erste für C2-Domänen überhaupt – stellte sich später als paradigmatisch für alle C2-Domänen heraus, die inzwischen in vielen Proteinen als weit verbreitete Ca^{2+} -Bindemotive bekannt sind.^[103, 104] Allerdings binden nicht alle C2-Domänen Ca^{2+} . Einige C2-Domänen sind Ca^{2+} -unabhängige Phospholipid-Bindemodule (z.B. die PTEN C2-Domäne^[105]), während andere Ca^{2+} -unabhängige Proteininteraktionsdomänen darstellen (z.B. die N-terminale C2-Domäne von Munc13, die, wie im Folgenden besprochen, RIM-Proteine bindet^[106, 107]). Selbst Ca^{2+} -bindende C2-Domänen sind funktionell divers. Zum Beispiel weisen einige C2-Domänen im Unterschied zu den C2-Domänen von Syt1 auch in der Abwesenheit von Phospholipiden eine hohe intrinsische Ca^{2+} -Affinität auf (z.B. die zentrale C2-Domäne von Munc13-2^[108]). Somit sind C2-Domänen vielseitige Proteinmodule, die meistens als Ca^{2+} /Phospholipid-Bindedomänen agieren aber auch eine Vielzahl anderer Funktionen übernehmen können.

4.2. Syt1 wird als Ca^{2+} -Sensor für die Exozytose nachgewiesen

Nachdem unsere biochemischen Untersuchungen bewiesen hatten, dass Syt1 Ca^{2+} bindet, bestand die nächste Herausforderung darin herauszufinden, ob Syt1 tatsächlich Katz' lange vorhergesagter Ca^{2+} -Sensor für die Neurotransmitterfreisetzung war. Erste Experimente in *C. elegans* und *Drosophila* kamen jedoch zu dem enttäuschenden Ergebnis, dass die Neurotransmitterfreisetzung nach der Ausschaltung von Syt1 lediglich signifikant reduziert aber nicht vollständig unterbunden war.^[109–111] Unsere elektrophysiologischen Analysen von Syt1-Knockout-Mäusen, mithilfe derer eine höhere Auflösung bei der Messung der Neurotransmitterfreisetzung erzielt werden konnte, zeigten, dass Syt1 in Nervenzellen des Vorderhirns spezifisch und unbedingt für die schnelle synchrone synaptische Vesikelfusion benötigt wird, wobei es für langsamere Formen der Ca^{2+} -induzierten Freisetzung entbehrlich ist (Abbildung 6).^[112, 113] Diese Experimente in Zusammenarbeit mit Chuck Stevens am Salk Institute erklärten die Phänotypen in *Drosophila* und *C. elegans* und bewiesen, dass Syt1 für die schnelle Ca^{2+} -gesteuerte Freisetzung essenziell ist, nicht aber für den Fusionsprozess im eigentlichen Sinne – Syt1 wird noch nicht einmal für alle

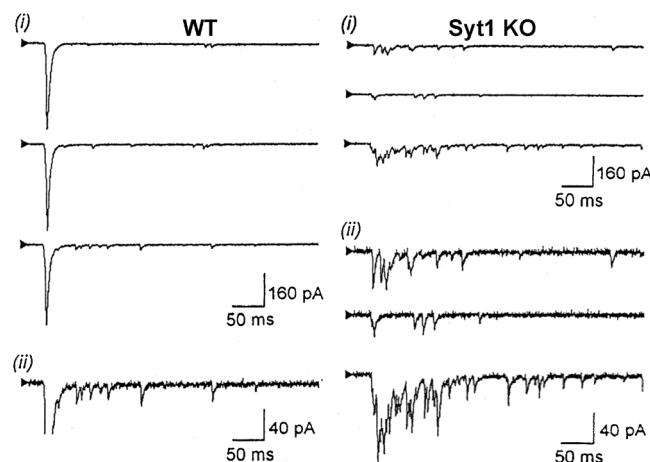


Abbildung 6. Der Synaptotagmin-1-Knockout verhindert selektiv die schnelle, synchronisierte Neurotransmitterfreisetzung. Ableitungen evozierter postsynaptischer Ströme, aufgenommen in hippocampalen Mausneuronen in Wildtyp- (WT, links) und Syt1-Knockout-Wurfgeschwistern (rechts). Die synaptischen Antworten wurden durch isolierte Aktionspotentiale hervorgerufen. Zwei verschiedene Maßstäbe sind unter (i) und (ii) mit ihren jeweiligen Messbalken gezeigt. Es wird deutlich, dass die schnelle synchrone, nicht jedoch die langsame asynchrone Neurotransmitterfreisetzung, in Syt1-Knockout-Neuronen vollständig eliminiert ist (aus Geppert et al.^[112]).

Ca^{2+} -gesteuerten Fusionsprozesse benötigt. Darüber hinaus zeigten wir, dass die Ausschaltung von Syt1 die spontanen „mini“ Freisetzungen in einigen Synapsen erhöhte. Diese Ergebnisse wiesen darauf hin, dass Syt1 in Abwesenheit einer Stimulation daran beteiligt ist, die spontane Exozytose synaptischer Vesikel zu verhindern.^[113, 114]

Die Untersuchung der Syt1-Knockout-Mäuse unterstützte die Hypothese, dass Synaptotagmin als Ca^{2+} -Sensor fungiert, schloss jedoch die Möglichkeit nicht aus, dass Syt1 an der Positionierung der Vesikel in die Nähe von Ca^{2+} -Kanälen beteiligt ist – mittlerweile ist allerdings bekannt, dass diese Funktion durch RIM und RIM-BP vermittelt wird.^[115] Solch eine Rolle würde es einem weiteren, „echten“ Ca^{2+} -Sensor ermöglichen, die eigentliche Ca^{2+} -Steuerung vorzunehmen. Diese viel diskutierte alternative Hypothese^[116] würde auch die nicht vollständig ausgeschaltete Ca^{2+} -induzierte Freisetzung der Syt1-Knockout-Synapsen erklären, jedoch nicht, warum Syt1 in diesem Fall selbstständig Ca^{2+} binden kann.

Um direkt zu untersuchen, ob die Ca^{2+} -Bindung an Syt1 tatsächlich die Neurotransmitterfreisetzung steuert, führten wir in das endogene Syt1-Gen der Maus eine Punktmutation (R233Q) ein, die die Ca^{2+} -Bindeaffinität von Syt1 während der Phospholipidbindung um das zweifache herabsetzte aber keine messbaren Auswirkungen auf die Ca^{2+} -abhängige Syntaxin-1-Bindung hatte (Abbildung 7 A und 7 B).^[117] Elektrophysiologische Messungen, die in Zusammenarbeit mit Christian Rosenmund durchgeführt wurden, zeigten dann, dass die R233Q-Mutation die synaptische Hemmung (Depression) während der Hochfrequenzstimulation in eine synaptische Bahnung (Fazilitation) umwandelt. Diese Ergebnisse wiesen auf eine herabgesetzte Transmitter-Freisetzungswahrscheinlichkeit in Anwesenheit der R233Q-Mutante hin (Abbildung 7 C), und weitere Analysen zeigten, dass

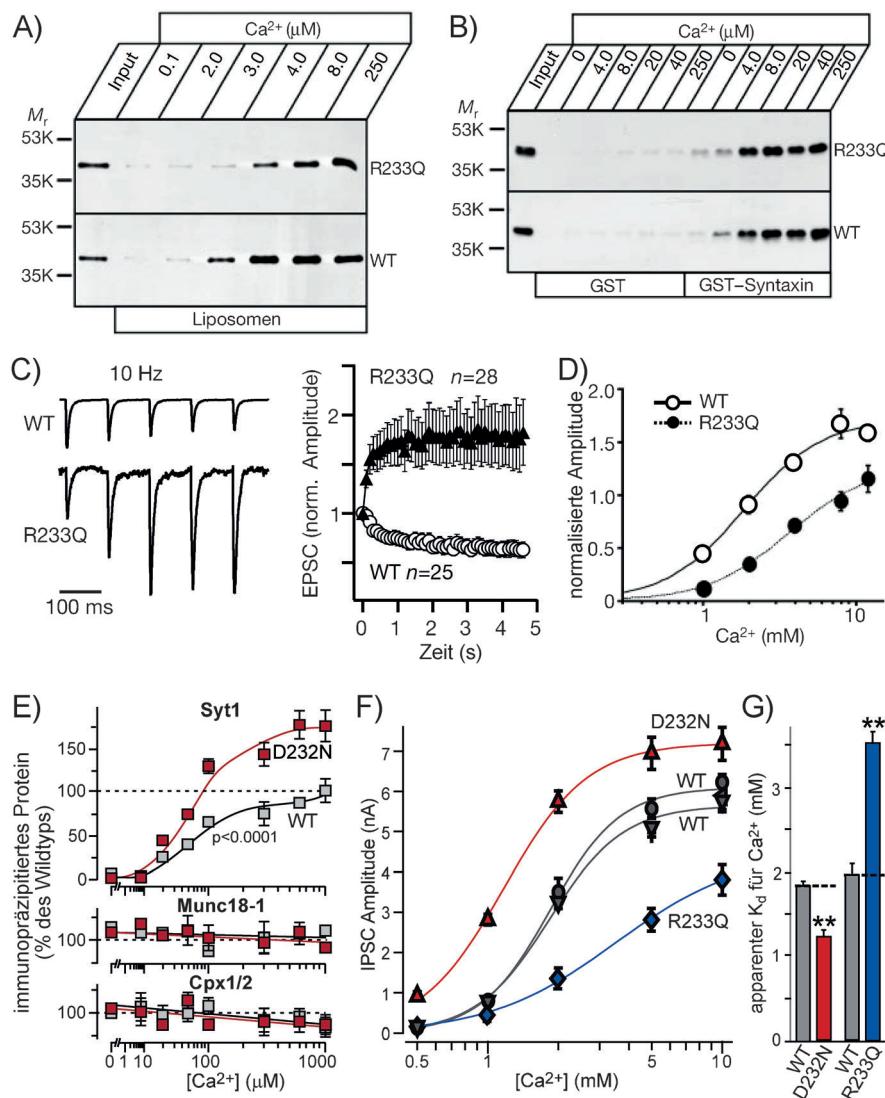


Abbildung 7. Knock-in-Mäuse mit Syt1-Mutationen, die zu veränderten Ca²⁺-Affinitäten führen, zeigen, dass die Ca²⁺-Bindung an Synaptotagmin-1 (Syt1) die Neurotransmitterfreisetzung auslöst. A,B) Der Austausch einer einzelnen Aminosäure in der C2A-Domäne von Syt1 (R233Q) vermindert die apparte Ca²⁺-Affinität von Syt1 während der Phospholipidbindung, nicht jedoch die der Interaktion mit Syntaxin-1. Die Messdaten zeigen die Ca²⁺-abhängige Bindung des gesamten cytoplasmatischen Fragments von endogenem Syt1 aus Wildtyp-Mäusen und R233Q-mutierten Syt1-Knock-in-Wurfgeschwistern an Liposomen (A) oder an immobilisiertes GST-Syntaxin-1 (B). C) Der R233Q-Aminosäureaustausch verhindert die Wahrscheinlichkeit der Neurotransmitterfreisetzung, was durch einen Wechsel von synaptischer Hemmung (Depression) in Wildtyp-Synapsen zu einer synaptischen Bahnung (Fazilitation) in Synapsen der R233Q-Mutante ersichtlich wird. Synaptische Antworten, gemessen während einer 10 Hz Stimulation (links, repräsentative Aufzeichnungen; rechts, normalisierte Daten). D) Die R233Q-Mutante zeigt eine auf 50 % reduzierte apparte Ca²⁺-Affinität bei der Neurotransmitterfreisetzung, hervorgerufen durch die verminderte Freisetzungswahrscheinlichkeit, wie in (C) gezeigt. Der Effekt der Mutante auf die Neurotransmitterfreisetzung ist ähnlich wie der Effekt auf die apparte Ca²⁺-Affinität bei der Phospholipidbindung (siehe A). Die Daten zeigen normalisierte Amplituden synaptischer Antworten als eine Funktion der extrazellulären Ca²⁺-Konzentration. E) Ein weiterer einfacher Aminosäureaustausch in der C2A-Domäne von Syt1 (D232N) wirkt sich anders auf die Ca²⁺-Bindeneigenschaften von Syt1 aus: Er erhöht die Ca²⁺-abhängige Bindung von Syt1 an den SNARE-Komplex. Die Messdaten zeigen die Ca²⁺-abhängige Bindung von Wildtyp-Syt1 und D232N-mutiertem Syt1 aus Knock-in-Mäusen an in Triton X-100 gelöste SNARE-Komplexe aus Gehirnhomogenaten. Die SNARE-Komplexe wurden in Anwesenheit der angegebenen freien Ca²⁺-Konzentrationen immunpräzipitiert. Die Immunpräzipitate wurden mithilfe von quantitativem Immunblotting für Syt1 (obere Abbildung), Munc18-1 und Complexine (untere Abbildungen) analysiert. Munc18-1 und Complexine co-immunopräzipitieren mit SNARE-Komplexen auf konstitutive Weise, während die Co-Immunopräzipitation von Syt1 bei zunehmenden Ca²⁺-Konzentrationen dramatisch gesteigert war. F,G) Ein direkter Vergleich der Syt1-D232N- und Syt1-R233Q-Knock-in Mutationen zeigt, dass diese beiden Mutationen, die sich gegensätzlich auf die Ca²⁺-Bindeneigenschaften von Syt1 auswirken, auch zu entsprechend entgegengesetzten Veränderungen der jeweiligen appartenen Ca²⁺-Affinität während der Neurotransmitterfreisetzung führen. F) Messung der absoluten Amplitude der evozierten inhibitorischen postsynaptischen Ströme als Funktion der extrazellulären Ca²⁺-Konzentration in kultivierten Neuronen von Syt1-D232N- oder Syt1-R233Q-mutierten Knock-in Mäusen und ihren jeweiligen Wildtyp-Wurfgeschwistern (WT) (jede Mutante hat ihre eigene Wildtyp-Kontrolle). Die synaptischen Amplituden können durch eine Hill-Funktion beschrieben werden. G) Die apparte Ca²⁺-Affinität der synaptischen Transmitterfreisetzung (Vergleich zwischen Wildtyp-Kontrollen und ihren jeweiligen Syt1-D232N- oder Syt1-R233Q-Mutationen) kann durch die in F bestimmten Hill-Funktionen berechnet werden. (Abbildungen (A)–(D) aus Fernandez-Chacon et al.,^[22] Abbildungen (E)–(G) aus Pang et al.^[118,126] und Xu et al.^[114]).

die verminderte Freisetzungswahrscheinlichkeit durch eine um das zweifache herabgesetzte apparenre Ca^{2+} -Affinität der Neurotransmitterfreisetzung hervorgerufen wurde. Diese Daten bewiesen eindeutig, dass Syt1 der Ca^{2+} -Sensor für die Neurotransmitterfreisetzung ist (Abbildung 7D).

In Folgestudien weiteten wir diese Analyse aus und führten weitere Punktmutationen über Knock-in-Mäuse in das Syt1-Gen ein. Darunter befand sich unter anderem eine Mutation (D232N), die die Ca^{2+} -abhängige Interaktion von Syt1 mit SNARE-Proteinen verstärkte (Abbildung 7E).^[118] Wir fanden, dass diese Mutation gleichermaßen die Neurotransmitterausschüttung erhöhte. In einem detaillierten Vergleich zwischen der R233Q- und der D232N-Punktmutation, die jeweils eine Verminderung bzw. Erhöhung der apparenen Ca^{2+} -Affinität von Syt1 verursachten, zeigten wir, dass sie sich ebenso gegensätzlich auf die apparenre Ca^{2+} -Affinität der Transmitterfreisetzung auswirkten (Abbildung 7F und 7G). Darüber hinaus beobachteten wir in parallelen Untersuchungen in Zusammenarbeit mit Erwin Neher, dass Syt1 auch in chromaffinen Zellen als Ca^{2+} -Sensor bei der endokrinen Exozytose von Granula beteiligt ist.^[119,120] Allerdings verursacht die Ausschaltung von Syt1 in chromaffinen Zellen nur eine sehr geringe Beeinträchtigung der Ca^{2+} -gesteuerten Exozytose, da die Funktion von Syt1 hier größtenteils von Syt7 übernommen werden kann (siehe die Diskussion im Folgenden).^[121]

Insgesamt bewiesen diese Untersuchungen, dass Syt1 als ein Ca^{2+} -Sensor bei der Exozytose von synaptischen Vesikeln fungiert. Wir fragten uns daraufhin, ob eine Ca^{2+} -Bindung zu beiden C2-Domänen von Syt1 bei der Steuerung der Neurotransmitterfreisetzung beteiligt sein könnte. Erste Untersuchungen in *Drosophila* zeigten, dass die Ca^{2+} -Bindestellen in der C2B-Domäne von Syt1 für die Neurotransmitterfreisetzung essenziell sind.^[122] Eine ähnliche Studie legte nahe, dass die Ca^{2+} -Bindestellen der C2A-Domäne funktionell entbehrlich sein könnten,^[123] wobei aufgrund der limitierten Empfindlichkeit der verwendeten Messmethoden nicht eindeutig ausgeschlossen werden konnte, dass die Ca^{2+} -Bindestellen in der C2A-Domäne von Syt1 doch signifikant zur Neurotransmitterfreisetzung beitragen. Um einen direkten und quantitativen Vergleich der Ca^{2+} -Steuerungseigenschaften der Syt1-Mutanten, denen die Ca^{2+} -Bindestellen entweder in der C2A- oder der C2B-Domäne fehlten, zu erzielen, zeigten wir durch systematische Reexpression von Syt1-Mutanten in Syt1-Knockout-Nervenzellen, dass die Ca^{2+} -Bindestellen in der C2A-Domäne zusätzlich zu denen der C2B-Domäne an der Transmitterfreisetzung beteiligt sind.^[124] Darüber hinaus beobachteten wir, dass die Ca^{2+} -gesteuerte Freisetzung in der Abwesenheit der Ca^{2+} -Bindestellen der C2A-Domäne eine signifikante Herabsetzung der apparenen Ca^{2+} -Kooperativität aufwies. Diese Ergebnisse bewiesen, dass die Ca^{2+} -Bindung an die C2A-Domäne von Synaptotagmin-1 direkt an der Ca^{2+} -Steuerung der schnellen Neurotransmitterfreisetzung beteiligt ist.

4.3. Die Vielfältigkeit von Synaptotagminen bei der schnellen Ca^{2+} -gesteuerten Neurotransmitterfreisetzung

Das Säugetiergenom kodiert für 16 Synaptotagmine (definiert als Proteine mit einer doppelten C2-Domäne und einer N-terminalen Transmembranregion). Die C2-Domänen von acht Synaptotagminen (Syt1–Syt3, Syt5–Syt7, Syt9 und Syt10) binden Ca^{2+} , wohingegen die übrigen acht Synaptotagmine kein Ca^{2+} binden können. Die acht Ca^{2+} -bindenden Synaptotagmine bilden zwei Klassen hinsichtlich der Anwesenheit (Syt3, Syt5, Syt6 und Syt10) oder Abwesenheit (Syt1, Syt2, Syt7 und Syt9) einer N-terminalen Disulfidbrücke, über die die jeweiligen Synaptotagmine kovalent dimerisieren können. Angesichts dieser Vielfältigkeit der Synaptotagmine (z.B. Geppert et al.,^[16] Li et al.^[17]) war es umso erstaunlicher, dass der Syt1-Knockout einen solch dramatischen Phänotyp hervorrief, denn zumindest einige der weiteren Synaptotagmine werden zusammen mit Syt1 in denselben Nervenzellen exprimiert. Wir konnten jedoch durch systematische Reexpression von Syt-Isoformen in Syt1-Knockout-Nervenzellen zeigen, dass tatsächlich nur drei der acht Ca^{2+} -bindenden Synaptotagmine – Syt1, Syt2 und Syt9 – die schnelle Exozytose synaptischer Vesikel vermitteln können.^[125] Diese Synaptotagmine besitzen eine unterschiedliche Kinetik, was bedeutete, dass Syt2 im Vergleich zu Syt1 die Transmitterfreisetzung beschleunigt, während Syt9 sie langsamer vermittelte. Die meisten Nervenzellen des Vorderhirns exprimieren nur Syt1, eine Tatsache, die den dramatischen Syt1-Knockout-Phänotyp erklärt. Syt2 hingegen ist der Ca^{2+} -Sensor für schnelle Synapsen im Hirnstamm und an der neuromuskulären Endplatte (Abbildung 8A und 8B),^[126,127] während Syt9 vor allem im limbischen System vorliegt.^[125] Interessanterweise entsprechen die kinetischen Eigenschaften von Syt1, Syt2 und Syt9 den funktionellen Anforderungen der jeweiligen Synapsentypen, in denen sie vorliegen.

In den ersten Syt1-Knockout-Untersuchungen^[128] beobachten wir eine langsamere Form der Ca^{2+} -gesteuerten Transmitterfreisetzung, obwohl die schnelle Neurotransmitterfreisetzung fast vollständig blockiert war (Abbildung 6). Wir wollten daher die Beteiligung der „schnellen“ Synaptotagmin-abhängigen Form der Freisetzung biophysikalisch nachweisen und die Eigenschaften der residuellen, langsameren Freisetzung in Abwesenheit von Syt1 charakterisieren. Dafür wählten wir die Held'sche Calyx als Modellsystem, da sie es uns ermöglichte, gleichzeitig prä- und postsynaptische Kompartimente zu kontrollieren bzw. zu messen, und somit eine einmalige Auflösung für elektrophysiologischen Messungen bot.^[129,130] Die Held'sche Calyx exprimiert von den „schnellen“ Synaptotagminen nur Syt2 (Abbildung 8A).^[127] Der Knockout von Syt2 schaltete die schnelle Ca^{2+} -gesteuerte Neurotransmitterfreisetzung in der Held'schen Calyx fast vollständig aus, sodass nur eine langsamere Form der Freisetzung messbar blieb (Abbildung 8B). Im Unterschied zu unseren Beobachtungen in den Syt1-Knockout-Synapsen hippocampaler und kortikaler Neuronen (siehe Maximov und Südhof,^[113] und Abbildung 9 unten), zeigte diese residuelle Ca^{2+} -gesteuerte Freisetzung in der Held'schen Calyx von Syt2-Knockout-Mäusen keine Fazilitation während hochfrequenter Stimulation. Vielmehr resultierte der Syt2-Knockout

unabhängig von der Stimulationsfrequenz in einer Blockade des größten Teils der Ca^{2+} -gesteuerten Transmitterfreisetzung.^[127]

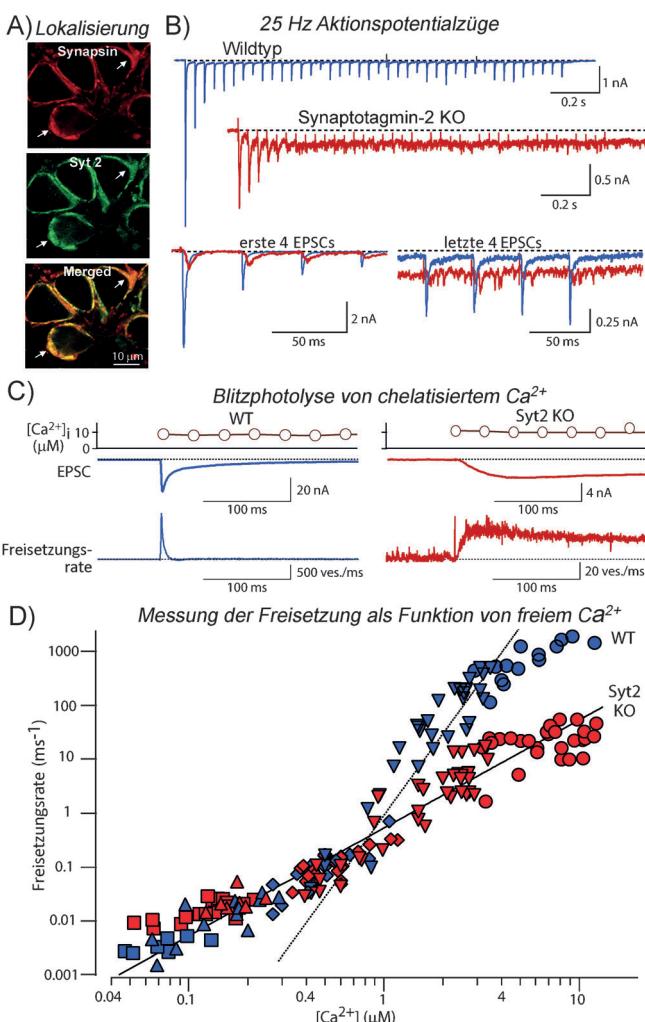
Wir untersuchten daraufhin mithilfe von photolytischen Ca^{2+} -Freisetzungen die Ca^{2+} -Abhängigkeit der Neurotransmitterfreisetzung in der Held'schen Calyx von Wildtyp- und Syt2-Knockout-Mäusen. Dabei nutzten wir eine Methode, die durch die Arbeitsgruppen von Sakmann, Schneggenburger und Neher etabliert wurde,^[131,132] und die es erlaubt, die postsynaptischen Antworten zu analysieren, die eine genaue Berechnung der synaptischen Vesikelexozytose erlauben, und gleichzeitig mithilfe von Mikrofluorometrie das präsynaptische Ca^{2+} -Niveau zu messen. Wir fanden in diesen Experimenten, dass – wie bereits aus früheren Studien bekannt^[131] – die Transmitterfreisetzung bei physiologischen Ca^{2+} -Konzentrationen eine apparte Ca^{2+} -Kooperativität von 5 aufwies, was der Anzahl der gebundenen Ca^{2+} -Ionen an die Synaptotagmine entsprach (Abbildung 8C und 8D). Im Gegensatz dazu hatte die residuelle Ca^{2+} -gesteuerte Freisetzung in Syt2-Knockout-Calyces nur eine apparte Ca^{2+} -Kooperativität von 2. Dieses Ergebnis wies darauf hin, dass der langsame Typ der Neurotransmitterfreisetzung von einem Ca^{2+} -Sensor vermittelt wird, der sich in seinen Eigenschaften,

zumindest in der Held'schen Calyx, von Syt1, Syt2 und Syt9 unterscheidet.^[127]

4.4. Die Rolle von Synaptotagmin-7 bei der langsamen Ca^{2+} -gesteuerten Neurotransmitterfreisetzung

In der Folgezeit widmeten wir uns der Frage, welcher Ca^{2+} -Sensor für die langsame Neurotransmitterfreisetzung verantwortlich ist, die in Syt1- und Syt2-Knockout-Neuronen noch messbar ist, wobei unser Fokus auf den anderen fünf Ca^{2+} -bindenden Synaptotagminen lag. Die residuelle Transmitterfreisetzung in Syt1-Knockout-Neuronen weist typische Eigenschaften auf, die unter anderem auch von den Eigenschaften des jeweiligen Synapsentyps abhängen. Während die

Abbildung 8. Die Ausschaltung von Synaptotagmin-2 (Syt2), einem schnellen Ca^{2+} -Sensor für die Neurotransmitterfreisetzung, bringt in der Held'schen Calyx eine langsamere Form der Ca^{2+} -gesteuerten Freisetzung ans Licht, die durch einen zweiten untergeordneten Ca^{2+} -Sensor mit einer niedrigeren Ca^{2+} -Kooperativität als Syt2 kontrolliert wird. A) Immunhistochemische Färbungen zeigen eine starke Syt2-Expression in den präsynaptischen Nervenenden der Held'schen Calyx. B) Der Knockout (KO) von Syt2 in der Held'schen Calyx eliminiert einen Großteil der schnellen synchronisierten Neurotransmitterfreisetzung, gemessen durch Hochfrequenzstimulation (40 Stimuli bei 25 Hz). Der obere Teil der Abbildung zeigt repräsentative synaptische Antworten (EPSCs), aufgenommen während der Stimulation (Wildtyp- und KO-Antworten sind in einem unterschiedlichen Maßstab dargestellt), und der untere Teil der Abbildung zeigt die Vergrößerung der ersten und letzten vier EPSCs (hier sind die Wildtyp- und KO-Antworten im selben Maßstab dargestellt, dieser unterscheidet sich jedoch zwischen den ersten und letzten vier EPSCs). Die Verschiebung der Basislinie in den Syt2-KO-Messungen ist bedingt durch die asynchrone Neurotransmitterfreisetzung, die in Wildtyp-Synapsen nicht stattfindet. C) Die Ausschaltung von Syt2 beeinträchtigt die durch hohe Ca^{2+} -Konzentrationen gesteuerte Neurotransmitterfreisetzung in der Held'schen Calyx-Synapse. Präsynaptische Nervenenden wurden durch eine Patch-Pipette mit Ca^{2+} -Chelatoren („caged“ Ca^{2+}) sowie mit einem Ca^{2+} -Indikatorfarbstoff gefüllt, und die Neurotransmitterfreisetzung wurde durch die photolytische Freisetzung von Ca^{2+} gesteuert. Die Menge an freigesetzten Neurotransmittern wurde postsynaptisch detektiert, indem die EPSCs gemessen wurden und daraus die Anzahl der freigesetzten Vesikel zu einem bestimmten Zeitpunkt bestimmt wurde (Freisetzungsraten). Die präsynaptische Ca^{2+} -Konzentration wurde zeitgleich mithilfe von Mikrofluorometrie gemessen. D) Die Ca^{2+} -gesteuerte Neurotransmitterfreisetzung weist eine zweiphasige Ca^{2+} -Konzentrations-abhängigkeit in Wildtyp-Calyx-Synapsen auf (WT), die durch eine niedrige apparte Ca^{2+} -Kooperativität während der Freisetzung bei niedrigen Ca^{2+} -Konzentrationen (ca. 2 Ca^{2+} -Ionen) und eine hohe apparte Ca^{2+} -Kooperativität bei hohen Ca^{2+} -Konzentrationen (ca. 5 Ca^{2+} -Ionen) charakterisiert ist. Die Ausschaltung von Syt2 eliminiert spezifisch die durch eine hohe Ca^{2+} -Kooperativität charakterisierte Freisetzungssphase und vermindert dadurch die Freisetzungsraten bei physiologischen Ca^{2+} -Konzentrationen fast um das 100-fache, ohne jedoch die Ca^{2+} -gesteuerte Freisetzung bei niedrigen Ca^{2+} -Konzentrationen signifikant zu verändern. Die Daten zeigen eine Zusammenfassung der höchsten Vesikel-Freisetzungsraten als Funktion von verschiedenen freiem Ca^{2+} -Konzentrationen im präsynaptischen Nervenende. Die gestrichelte Linie stellt eine Modellfunktion fünften Grades für die Messwerte der Wildtyp-Nervenenden bei $> 1 \mu\text{M}$ freiem Ca^{2+} dar. Die durchgehende Linie zeigt eine Funktion zweiten Grades für die Daten der Syt2-KO-Nervenenden für alle Ca^{2+} -Konzentrationen. Die Wildtyp-Antworten bei niedrigen Ca^{2+} -Konzentrationen folgen der durchgehenden Linie. (Alle Daten in Anlehnung an Sun et al.^[127]).



residuelle Transmitterfreisetzung in der Held'schen Calyx von Syt2-Knockout-Mäusen selbst bei hohen Stimulationsfrequenzen niedrig und konstant bleibt (Abbildung 8B), zeigt die residuelle „asynchrone“ Transmitterfreisetzung während der hochfrequenten Stimulation in hippocampalen und kortikalen Syt1-Knockout-Synapsen eine massiv Fazilitation (Abbildung 9A). Dies führt dazu, dass sich die absolute Menge der Ca^{2+} -gesteuerten Transmitterfreisetzung während der hochfrequenten Stimulation zwischen Wildtyp- und Syt1-Knockout-Neuronen nicht unterscheidet, obwohl die Anfangsrate der schnellen Transmitterfreisetzung in hippocampalen und kortikalen Syt1-Knockout-Synapsen auf weniger als ein Zehntel verringert ist.^[113,133]

Bei der Suche nach dem Ca^{2+} -Sensor, der für die residuelle Transmitterausschüttung in hippocampalen Syt1-Knockout-Neuronen verantwortlich ist, konzentrierten wir uns auf Syt7. Wir hatten zunächst herausgefunden, dass Syt7, ähnlich wie Syt1, als Ca^{2+} -Sensor an der Exozytose in chromaffinen Zellen und in anderen neuroendokrinen und endokrinen Zellen beteiligt ist,^[134–137] und Paul Brehm hatte gezeigt, dass Syt7 an der neuromuskulären Endplatte eine Rolle bei der Transmitterfreisetzung spielt.^[138] In weiteren Studien fanden wir, dass ein Funktionsverlust von Syt7 in Nervenzellen, die noch Syt1 produzierten, keine wesentlichen Veränderungen der Neurotransmitterfreisetzung hervorrief,^[139] aber dass die langsame Ca^{2+} -gesteuerte Ausschüttung in Syt1-Knockout-Neuronen durch den Funktionsverlust von Syt7 fast vollständig unterbunden wurde (Abbildung 9).^[140] Der durch den Funktionsverlust von Syt7 in Syt1-Knockout-Neuronen hervorgerufene Phänotyp konnte bereits durch die alleinige Expression der funktionalen Ca^{2+} -Bindestellen von Syt7 gerettet werden. Diese Beobachtung deutete darauf hin, dass Syt7 als Ca^{2+} -Sensor fungiert. Im Unterschied zu Syt1, für das die Ca^{2+} -Bindestellen der C2B-Domäne von größerer Bedeutung sind als die der C2A-Domäne, wirkte sich die Mutation und entsprechende Blockierung der Ca^{2+} -Bindestellen der C2B-Domäne von Syt7 nicht auf dessen Aktivität aus, während eine homologe Mutation der Ca^{2+} -Bindestellen der C2A-Domäne die Funktion von Syt7 komplett inhibierte.^[140] Diese Ergebnisse zeigten, dass sich die Funktionsmechanismen von Syt1 und Syt7 zum Teil unterscheiden.

Insgesamt wisen diese Beobachtungen darauf hin, dass Syt7 – wie auch die anderen Synaptotagmine in dessen Klasse (Syt1, Syt2 und Syt9) – als Ca^{2+} -Sensor bei der Exozytose fungiert. Allerdings besitzt es eine langsamere Kinetik als Syt1, wodurch seine Funktion in Wildtyp-Synapsen normalerweise keine wesentliche Rolle spielt, da das schnellere Syt1 das langsamere Syt7 dominiert. Obwohl die Funktion von Syt7 in einem Großteil normaler Synapsen nicht unmittelbar erkennbar war (Abbildung 9), zeigten Paarableitungen, dass Syt7 selbst im Beisein von Syt1 eine physiologisch relevante Rolle bei der Transmitterausschüttung spielt.^[140] Diese Ergebnisse führen zu dem Schluss, dass die gesamte Neurotransmitterfreisetzung an Synapsen fast vollständig von vier Synaptotagminen (Syt1, Syt2, Syt7 und Syt9) übernommen wird. Die Geschwindigkeitsunterschiede in der Arbeitsweise von Syt1 und Syt7 könnten mit der unterschiedlichen Lokalisation dieser Proteine zusammenhängen, da in mehreren Untersuchungen gezeigt wurde, dass Syt7 anders als Syt1

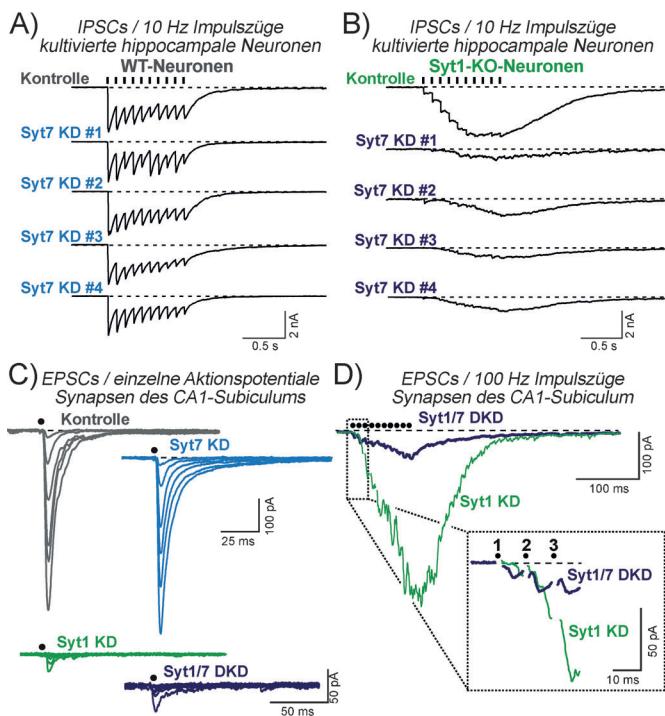


Abbildung 9. Synaptotagmin-7-Knockdown beeinträchtigt die langsame Freisetzung in Synaptotagmin-1-Knockout Nervenzellen. A, B) Die Unterdrückung der Syt7-Expression in kultivierten hippocampalen Wildtyp-Neuronen durch einen Knockdown (KD) von Syt7 hat keine signifikanten Auswirkungen auf die durch Hochfrequenzstimulation hervorgerufene synaptische Neurotransmitterfreisetzung (A). Allerdings führt eine Unterdrückung der Syt7-Expression in Syt1-KO-Neuronen zu einer fast vollständigen Beeinträchtigung der langsamsten und bahnenenden (fazilitierenden) Ca^{2+} -gesteuerten Freisetzung, die nach der Ausschaltung von Syt1 detektierbar bleibt (B). Die Abbildung zeigt repräsentative inhibitorische postsynaptische Ströme (IPSC-Antworten), die durch eine 10-Hz-Stimulation in Kontrollneuronen und in Neuronen, die vier verschiedene Syt7-shRNAs zur Sicherstellung der Reproduzierbarkeit exprimieren, hervorgerufen wurden. In hippocampalen Syt1-KO-Neuronen ruft die Hochfrequenzstimulation eine stark fazilitierende Form der asynchronen Neurotransmitterfreisetzung hervor, so dass sich die absolute Menge der Transmitterfreisetzung zwischen Syt1-KO- und Wildtyp-Neuronen kaum unterscheidet. Im Unterschied dazu wurde in der Held'schen Calyx von Syt2 KO Mäusen keine solche Beeinträchtigung beobachtet (siehe Abbildung 8B). C, D) In akuten Gehirnschnitten hat die selektive Unterdrückung der Syt7-Expression ebenfalls keine signifikanten Auswirkungen auf die Neurotransmitterfreisetzung. Die Unterdrückung der Syt1-Expression eliminiert hier wieder die erste Phase der Freisetzung, wobei eine residuelle, stark fazilitierende Form der asynchronen Neurotransmitterfreisetzung messbar bleibt, die durch die zusätzliche Unterdrückung der Syt7-Expression stark beeinträchtigt wird. Die Abbildungen zeigen EPSC-Messungen, die durch einzelne Stimuli in aufsteigender Stärke (C) oder durch eine 100-Hz-Stimulation mit einer Dauer von 100 ms hervorgerufen wurden (D, repräsentative Antworten mit einer unten angefügten Vergrößerung der ersten Antwort). Die Messungen wurden in akuten hippocampalen Schnitten von Mäusen vorgenommen, denen zwei Wochen vor dem Experiment ein Virus in die CA1-Region injiziert wurde, das für die shRNAs zum Knockdown der jeweiligen oben angezeigten Synaptotagmine kodiert. Die EPSCs wurden nach der präsynaptischen Stimulation von Axonen, die von CA1-Neuronen stammten, in postsynaptischen Neuronen des Subiculums gemessen. (Alle Daten in Anlehnung an Bacaj et al.^[140]).

nicht auf synaptischen Vesikeln lokalisiert.^[139,141] Da Syt7 jedoch auf endokrinen Granula vorhanden ist, ist es denkbar, dass Syt7 in der Synapse so langsam arbeitet, weil es im Vergleich zu Syt1 weiter von den Stellen der Ca^{2+} -gesteuerten Fusion entfernt liegt.

4.5. Complexine unterstützen die Synaptotagmin-abhängige Ca^{2+} -Steuerung der Fusion

Wir entdeckten die Complexine, eine Familie kleiner, saurer Proteine, aufgrund ihrer Fähigkeit, mit hoher Affinität an SNARE-Komplexe aber nicht an einzelne SNARE-Proteine zu binden (später auch unabhängig von Ishizuka et al.^[142] beschrieben).^[24] Die Kristallstruktur eines Komplexes zwischen Complexin und dem SNARE-Komplex wurde in Zusammenarbeit mit Josep Rizo charakterisiert und zeigte, dass Complexin eine zentrale α -Helix besitzt, die sich in antiparalleler Orientierung in die Furche zwischen den SNARE-Motiven von Syntaxin-1 und Synaptobrevin-2 legt.^[143] Der zentralen α -Helix von Complexin gehen N-terminal eine akzessorische α -Helix und eine kurze unstrukturierte Sequenz voran, und sie wird C-terminal von einer längeren unstrukturierten Sequenz flankiert. Untersuchungen von Complexin-defizienten Nervenzellen zeigten, dass Complexin ein Co-faktor für Synaptotagmin ist, der unter physiologischen Bedingungen die Ca^{2+} -gesteuerte Vesikelfusion gleichzeitig inhibiert und beschleunigt.^[144–148] Nervenzellen, denen Complexine fehlten, zeigten einen ähnlichen Phänotyp wie Syt1-Knockout-Neurone, der allerdings schwächer ausgeprägt war und durch eine partielle Unterdrückung der schnellen synchronisierten Exozytose und eine Erhöhung der spontanen Exozytoserate gekennzeichnet war. Diese Ergebnisse wiesen darauf hin, dass Complexine und Synaptotagmine funktionell voneinander abhängen.

Allerdings kam bald eine substantielle Verwirrung über die Funktionsweise von Complexinen auf, da In-vitro-Fusionsexperimente darauf hinwiesen, dass die einzige Funktion der Complexine darin besteht, die spontane Vesikelfusion zu verhindern,^[149] während Messungen der synaptischen Erregungsübertragung in autaptischen Neuronen (isolierte Nervenzellen, die in Abwesenheit einer Partnerzellen Synapsen mit sich selbst ausbilden) zeigten, dass Complexine die Ca^{2+} -gesteuerte Vesikelfusion nur aktivieren. Nachfolgende Untersuchungen wiesen rasch nach, dass Complexin in dissozierten Neuronenkulturen beide Funktionen wahnnimmt. In diesem Präparat erhöht nämlich der Funktionsverlust von Complexin die Rate der spontanen „mini“-Transmitterfreisetzung (was als eine fehlende Inhibition der spontanen Vesikelfusion interpretiert wurde), während die durch Aktionspotentiale evozierte Neurotransmitterfreisetzung stark beeinträchtigt ist (was als eine fehlende Aktivierung der Fusion interpretiert wurde; Abbildung 10).^[147]

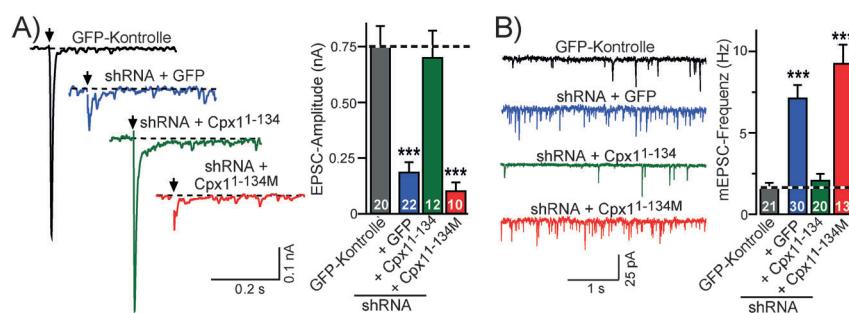


Abbildung 10. Complexin fungiert als Aktivator und Inhibitor der synaptischen Vesikelfusion. A,B) Exzitatorische postsynaptische Ströme (EPSCs) ausgelöst durch einzelne Aktionspotentiale (A), und spontane „mini“-EPSCs (mEPSCs; B), gemessen in Kontrollneuronen und in Complexin-Knockdown-Neuronen mit oder ohne Re-Expression von Complexin-Konstrukten (Wildtyp-Complexin [Cpx^{1-134}] und eine Complexin-1-Mutante, die nicht an SNARE-Komplexe bindet [Cpx^{1-134M}]). Repräsentative Messungen auf der linken und Übersichtsgraphen auf der rechten Seite veranschaulichen die duale Natur der Complexin-Funktion als Aktivator der Ca^{2+} -gesteuerten Exozytose (A) und als Inhibitor der spontanen „mini“-Fusionen (B). (Daten in Anlehnung an Maximov et al.^[147]).

Unklar blieb zu diesem Zeitpunkt allerdings, wie die Fusion synaptischer Vesikel durch ein so kleines Molekül wie Complexin, das nur aus etwa 130 Aminosäureresten besteht, gleichzeitig aktiviert und inhibiert werden kann und wie dieser Prozess mit der Funktion von Synaptotagmin in Verbindung steht. Die zentrale α -Helix von Complexin, die den SNARE-Komplex bindet, wird nur für die Inhibition nicht aber für die Aktivierung der Vesikelfusion benötigt. Dies bedeutet, dass die inhibitorische Funktion von Complexin keine Voraussetzung für dessen die Vesikelfusion aktivierende Funktion ist.^[148] Die bewegliche N-terminale Sequenz von Complexin vermittelt im Gegenzug nur die aktivierende, nicht aber die inhibierende Funktion von Complexin.^[147–150] Neuere Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die aktivierende Funktion von Complexin wohl unerwartet komplex ist (das Wortspiel ist unbeabsichtigt), da Complexin auch an der Reifung („priming“) der synaptischen Vesikel beteiligt ist. Allerdings wird für diese Facette der aktivierenden Funktion die C-terminale Sequenz von Complexin benötigt.^[148,151]

Auf den beschriebenen Untersuchungen basiert unser derzeitiges Modell, demzufolge Complexin an SNARE-Proteine bindet und den SNARE/SM-Proteinkomplex aktiviert, während zumindest ein Teil von Complexin mit Synaptotagmin um die Bindung an den SNARE-Komplex konkurriert und so die vollständige Zusammensetzung des SNARE-Komplexes inhibiert.^[145] Ca^{2+} -aktiviertes Synaptotagmin verdrängt diesen Teil von Complexin und ermöglicht über diesen Mechanismus die Öffnung der Fusionspore (Abbildung 11). Allerdings ist es durchaus möglich, dass die inhibierende Funktion von Complexin relativ weniger wichtig ist als dessen aktivierende Funktion. Obwohl eine durch den Funktionsverlust von Complexin hervorgerufene, um das zehnfache erhöhte spontane Vesikelfusionsrate signifikant klingt, ist sie auf eine Synapse bezogen weiterhin eher gering. Wenn man bedenkt, dass jede Nervenzelle Informationen über tausende von synaptischen Eingängen empfängt, bedeutet die in Complexin-defizienten Synapsen erhöhte „mini“-Rate nur ein Freisetzungereignis oder weniger pro Synapse und

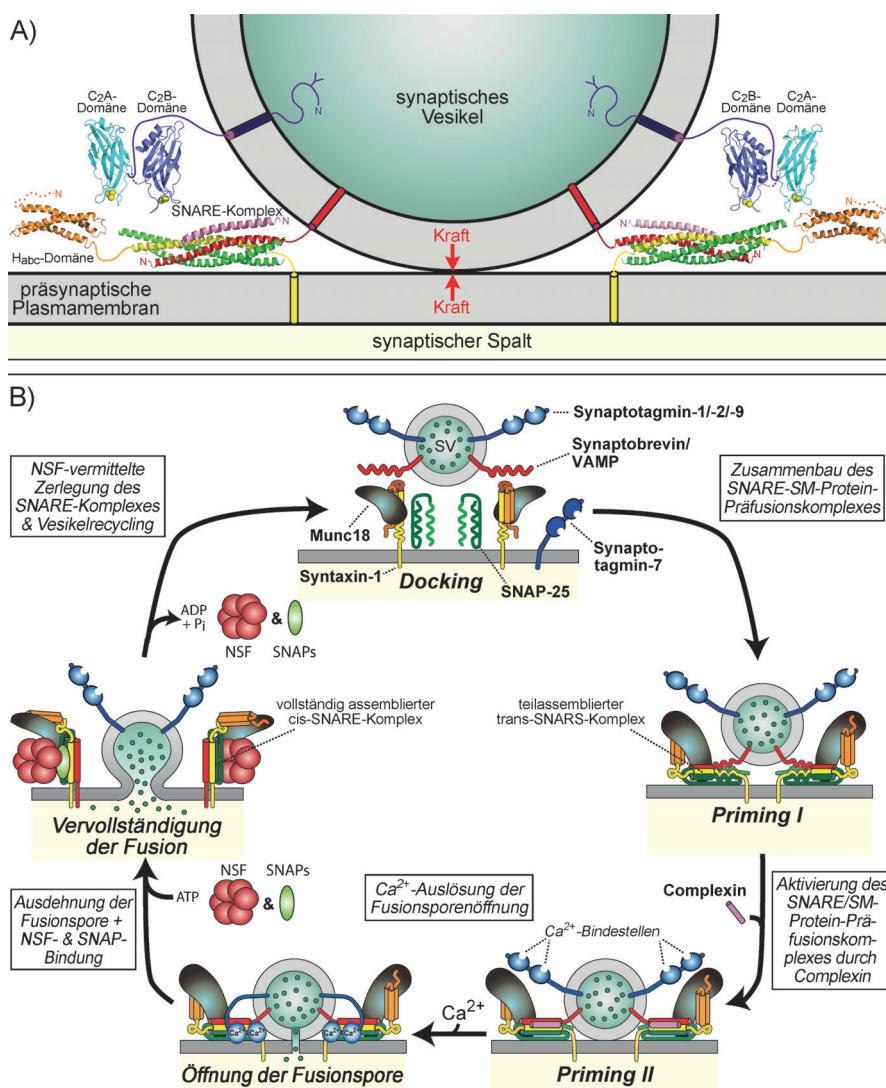


Abbildung 11. Modell zur Kooperation der SNARE- und SM-Proteine mit Synaptotagminen und Complexinen bei der Ca^{2+} -gesteuerten Neurotransmitterfreisetzung. A) Atomare Strukturen der SNARE-Proteine, der Complexine und von Syt1 während der Vesikelfusion. Die Illustration zeigt die atomaren Strukturen der C2-Domänen von Syt1,^[183,102] der Syntaxin-1-Habc-Domäne,^[184] und der zusammengesetzten SNARE-Komplexe mit gebundenem Complexin (pink^[143]). Die Strukturen sind das Ergebnis von Untersuchungen, die zusammen mit Josep Rizo durchgeführt wurden (UT Southwestern). Die jeweiligen Transmembranregionen sind als Zylinder dargestellt, und die Linker-Sequenzen sind als einfache Linien gezeigt. Alle Strukturen sind im richtigen Größenverhältnis zu einem synaptischen Vesikel dargestellt. Die Skizze veranschaulicht die räumliche Enge, die während der Zusammenarbeit von Syt1 und Complexin bei der Zusammensetzung des SNARE-Komplexes herrscht. Munc18-1 bindet gleichzeitig an den SNARE-Komplex (siehe Abbildungen 3 und 4), ist aber hier nicht dargestellt, da keine Strukturinformationen über die Bindung von Munc18-1 an den SNARE-Komplex vorliegen. Die Richtung der durch die Zusammensetzung des SNARE-Komplexes hervorgerufenen Kraft, die die Phospholipidmembranoberflächen destabilisiert, ist eingezzeichnet. B) Schematisches Diagramm zur Funktion von Synaptotagminen und Complexinen innerhalb des SNARE/SM-Proteinzyklus. Der SNARE/SM-Proteinzyklus beinhaltet die Zusammensetzung der SNARE-Proteine Synaptobrevin/VAMP, SNAP-25 und Syntaxin-1 zu Komplexen, deren vollständige Assoziation die Fusionspore zur Öffnung zwingt. Das SM-Protein Munc18-1 bleibt während des gesamten Zyklus mit Syntaxin-1 assoziiert und ist essentiell für die Öffnung der Fusionspore. Nach der Fusion katalysieren das Chaperon NSF, eine ATPase, und dessen SNAP-Adapter die Dissoziation der SNARE-Komplexe. Complexin bindet während der Vorbereitung der Vesikel auf die Fusion („Priming“) an die unvollständig zusammengesetzten SNARE-Komplexe und dient so als essentieller Adapter, der es Synaptotagmin erlaubt als Ca^{2+} -Sensor das Signal zur Öffnung der Fusionspore zu geben (unterer Rand des Zyklus). Synaptotagmin interagiert zudem in einer Ca^{2+} -abhängigen Weise konstitutiv mit dem SNARE/SM-Proteinkomplex, um so einen Präfusionskomplex vor dem Ca^{2+} -Signal für die Exozytose zu formen. Weiterhin führt die Bindung von Ca^{2+} an Synaptotagmin in diesem Zusammenhang – anders als bei der Bindung von Synaptotagmin an Phospholipide – nicht zu einer Alles-oder-Nichts-Reaktion, sondern sie führt stattdessen zu einer Neuanordnung des Präfusionskomplexes. Dieser Schritt ist in der Abbildung aufgrund der Schwierigkeiten, diese facettenreichen dreidimensionalen Interaktionen in einem zweidimensionalen Format wiederzugeben, nicht dargestellt. Synaptotagmine und Complexine dienen beide zusätzlich als eine Art Klammer, die die spontane Neurotransmitterfreisetzung verhindert, was wahrscheinlich auf ihre Ca^{2+} -unabhängigen konstitutiven Interaktionen mit teilweise zusammengesetzten SNARE-Komplexen zurückzuführen ist. Drei vesikuläre Synaptotagmine fungieren als Ca^{2+} -Sensoren für die schnelle Exozytose (Syt1, Syt2 und Syt9). Darüber hinaus vermittelt Syt7, das nicht auf synaptischen Vesikeln lokalisiert ist, sondern wahrscheinlich in präsynaptische Membranen integriert wird,^[134] eine langsamere Form der Ca^{2+} -gesteuerten Exozytose (Syt7 ist zur Vereinfachung nur in der oberen Übersichtsabbildung dargestellt). (Grafik modifiziert nach Südhof^[185]).

Minute.^[152] Darüber hinaus übernehmen einige der nur in geringen Mengen exprimierten Complexin-Isoformen (Complexin-3 und -4) keine inhibierende Funktion.^[151] Auch die bei der Ca^{2+} -gesteuerten Exozytose von IGF-1-gefüllten Vesikeln (siehe unten) beteiligten Complexine hindern die Vesikelfusion nicht.^[153] Daher ist es wahrscheinlich, dass Complexine vor allem als Aktivatoren der Exozytose fungieren und die inhibierende Funktion eine Begleiterscheinung darstellt oder lediglich eine untergeordnete Rolle bei der Feinabstimmung der synaptischen Erregungsübertragung spielt.

4.6. Ein Vorschlag, wie SNARE- und SM-Proteine mit Synaptotagminen und Complexinen bei der Ca^{2+} -gesteuerten Fusion zusammenarbeiten könnten

Die biochemischen und biophysikalischen Informationen über den molekularen Apparat, der die Neurotransmitterfreisetzung steuert, lieferten uns in der Gesamtschau ein vorläufiges Modell, das einen möglichen Ablauf der Ca^{2+} -gesteuerten Neurotransmitterfreisetzung beschreibt (Abbildung 11).

Werden die atomaren Strukturen von Complexin, Synaptotagmin und den SNARE-Proteinen im richtigen Größenverhältnis zu einem gedockten und fusionsfähigen synaptischen Vesikel gezeichnet, wird offensichtlich, wie wenig Platz es gibt für alle an der Fusion beteiligten Protein-Partner, um schnell miteinander interagieren zu können (Abbildung 11A). Wie oben beschrieben, erfordert die Fusion der synaptischen Vesikel zwei aufeinanderfolgende Konformationsänderungen. Wenn wir betrachten, wie die Interaktion zwischen den SNARE- und SM-Proteinen mit Complexin und Synaptotagmin die Ca^{2+} -Steuerung der Fusion hier vermitteln könnten, scheint es am wahrscheinlichsten, dass Complexin und Synaptotagmin schon während dieser Konformationsänderungen mit den SNARE/SM-Komplexen interagieren (Abbildung 11B; siehe auch Abbildung 4). Um es genauer zu formulieren, nachdem die gedockten und gebundenen Vesikel durch die Öffnung der zuvor geschlossenen Syntaxin-1-Konformation und nach der partiellen Zusammensetzung der trans-SNARE-Komplexe für die Fusion vorbereitet wurden („Priming I“, Abbildung 11B), bindet Complexin an den unvollständig zusammengesetzten trans-SNARE-Komplex, um diesen in einen aktiveren („superpriming“) Zustand zu überführen und die Vesikel über diesen Mechanismus für die Ca^{2+} -gesteuerte Fusion mit Energie zu laden („Priming II“). Auch Synaptotagmine binden wahrscheinlich in einer Ca^{2+} -unabhängigen Weise konstitutiv an sich zusammensetzende SNARE-Komplexe, und die Interaktion von Complexin und Synaptotagmin mit dem SNARE-Komplex könnte dazu beitragen, dass unvollständig zusammengesetzte SNARE-Komplexe sozusagen „eingefroren“ werden, um so eine vorzeitige spontane Fusion zu verhindern. Ca^{2+} gibt den Startschuss für die Öffnung der Fusionspore, indem es an Synaptotagmin bindet, das daraufhin Membranphospholipide bindet und durch die zeitgleiche Interaktion mit dem trans-SNARE-Komplex Complexin von diesem teilweise verdrängt. Es ist sehr wahrscheinlich, dass Synap-

totagmin und Complexin in Ca^{2+} -unabhängiger Weise konstitutiv mit dem SNARE/SM-Proteinkomplex interagieren und so einen Präfusionskomplex bilden. Darüber hinaus bedeutet die Bindung von Ca^{2+} an Synaptotagmin aller Wahrscheinlichkeit nach nicht, dass Synaptotagmin den SNARE-Komplex in einer Alles-oder-Nichts-Reaktion bindet, wie es zum Beispiel für die Interaktion von Synaptotagmin mit Phospholipiden der Fall ist, sondern dass Synaptotagmin stattdessen die Präfusionskomplexe neu anordnet (siehe z.B. Shin et al.^[154]).

Der einfachste Mechanismus, durch den die Fusionspore durch die Ca^{2+} -Bindung an Synaptotagmin geöffnet werden könnte, wäre, dass Synaptotagmin eine Zugwirkung auf den SNARE/SM-Proteinkomplex ausübt. Dies könnte durch die Ca^{2+} -gesteuerte Bindung von Synaptotagmin an Membranphospholipide erreicht werden. Daraufhin weitet sich die geöffnete Fusionspore, und NSF und SNAPS werden an den vollständig zusammengesetzten cis-SNARE-Komplex rekrutiert. NSF löst im Anschluss daran den cis-SNARE-Komplex wieder auf, der Munc18-1/SNARE-Komplex wird in den heteromeren Munc18-1/Syntaxin-1-Komplex überführt, und synaptische Vesikel werden durch einen der vielen bekannten Endozytose-Wege wiedergewonnen (siehe Abbildung 1).

4.7. Parallele Wege bei der Synaptotagmin-vermittelten Ca^{2+} -gesteuerten Exozytose

Die vier Synaptotagmine, denen die N-terminalen Disulfidbrücken fehlen (Syt1, Syt2, Syt7 und Syt9), sind an der Exozytose synaptischer Vesikel und an Exozytoseprozessen in neuroendokrinen Zellen beteiligt. Dem gegenüber blieb lange unklar, welche Rolle die anderen vier Ca^{2+} -bindenden Synaptotagmine spielen, die als über Disulfidbrücken verbundene Dimere vorliegen. Jüngere Untersuchungen zeigten, dass eines dieser Synaptotagmine, Syt10, auch als Ca^{2+} -Sensor bei der Exozytose fungiert, wobei sich die entsprechende Form der Exozytose von der Exozytose synaptischer Vesikel und neuroendokriner Granula unterscheidet. Insbesondere fanden wir, dass Syt10 in olfaktorischen Neuronen als Ca^{2+} -Sensor für die Fusion spezialisierter IGF-1-enthaltender Vesikel fungiert.^[155] Diese Vesikel unterscheiden sich von den Neuropeptiden enthaltenden Vesikeln, die ebenfalls in diesen Zellen vorliegen, und die sich eher wie neuroendokrine Granula verhalten und Syt1 enthalten.^[153] Unsere Experimente zeigten unter anderem, dass verschiedene Synaptotagmine selbst innerhalb derselben Nervenzelle als Ca^{2+} -Sensoren an unterschiedlichen Ca^{2+} -gesteuerten Fusionsreaktionen beteiligt sind (Abbildung 12). Darüber hinaus wiesen unsere Beobachtungen darauf hin, dass die Ca^{2+} -gesteuerte Exozytose generell Synaptotagmine als Ca^{2+} -Sensoren benötigt und dass verschiedene Synaptotagmine zu der Spezifität und den unterschiedlichen Eigenschaften bestimmter Exozytosewege beitragen.

Interessanterweise unterstützt Complexin nicht nur die Funktion der Synaptotagmine, die bei der Neurotransmitterfreisetzung beteiligt sind, sondern auch die Syt10-abhängige Sekretion von IGF-1 – trotz der unterschiedlichen kovalenten Strukturen von Syt1 und Syt10.^[153] Das bedeutet, dass Com-

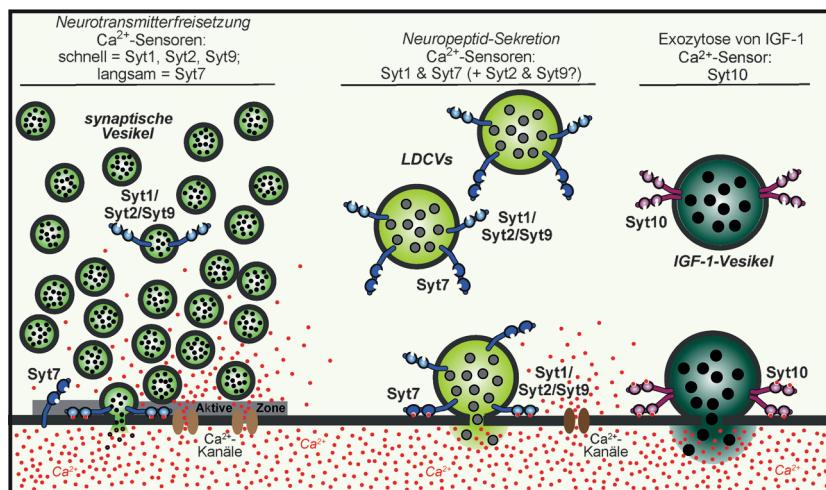


Abbildung 12. Redundante und nicht redundante Funktionen verschiedener Synaptotagmine bei der Ca^{2+} -Steuerung von verschiedenen Exozytoseformen in einer Nervenzelle. Drei Arten der Ca^{2+} -gesteuerten Exozytose sind gezeigt. Links: Die Exozytose synaptischer Vesikel vermittelt die Neurotransmitterfreisetzung mithilfe der schnellen Ca^{2+} -Sensoren Syt1, Syt2, und/oder Syt9^[150] und des langsamen Ca^{2+} -Sensors Syt7^[140]. Mitte: Die Exozytose großer Vesikel mit elektronendichtem Kern (large dense-core vesicle; LDCV) verwendet dieselben Ca^{2+} -Sensoren wie die Exozytose synaptischer Vesikel (Syt1 und Syt7, wie aus Arbeiten in chromaffinen Zellen hervorgegangen ist,^[134, 186] und wahrscheinlich auch Syt2 und Syt9). Rechts: Die Exozytose einer separaten Klasse von Vesikeln, die größer als die LDCVs sind und Syt10 als Ca^{2+} -Sensor verwenden.^[153, 155] Obwohl es an der Exozytose von synaptischen Vesikeln und LDCVs beteiligt ist, ist Syt7 nicht auf synaptischen Vesikeln, wohl aber auf LDCVs zu finden. Daher wird angenommen, dass die langsamere Funktionsweise von Syt7 bei der Neurotransmitterfreisetzung durch diesen Unterschied in der Lokalisation zu erklären ist. (Diagramm modifiziert nach Cao et al.^[155]).

plexin sehr wahrscheinlich ein genereller Cofaktor für alle Synaptotagmine bei der regulierten Exozytose ist. Diese Hypothese wird von der Tatsache unterstützt, dass Complexin ubiquitär in allen Zellen vorliegt^[24] und ebenfalls zentral an der postsynaptischen Membranintegration von Glutamatrezeptoren des AMPA-Typs während der Langzeitpotenzierung (long-term potentiation; LTP) beteiligt ist.^[156] Dies weist darauf hin, dass Complexine generelle Cofaktoren der regulierten Exozytose darstellen.

5. Die Organisation des Transmitterfreisetzungsaufbaus an der aktiven Zone

In einem präsynaptischen Nervenende docken und fusionieren synaptische Vesikel an der aktiven Zone der präsynaptischen Plasmamembran. Die aktive Zone ist eine spezialisierte Region, die in elektronenmikroskopischen Aufnahmen von fixiertem Gewebe sehr elektronendicht erscheint und die sich exakt auf der gegenüberliegenden Seite der Cluster an postsynaptischen Rezeptoren befindet (Abbildung 1). Das erste spezifische Protein der aktiven Zone, das wir entdeckten war Munc13-1,^[25] dessen Name ähnlich wie Munc18-1 klingt (keine Verwandtschaft!). Munc13-1 wurde nach einem homologen Gen in *C. elegans* (*unc13*) benannt, das für koordinierte Bewegungsabläufe im Wurm unbedingt benötigt wurde, dessen Funktion aber unbekannt war.^[57] Da die Homologie zu *unc13* bestand, der „unkoordinierte“ („uncoordinated“) Wurmphänotyp bekannt war und Munc13-1 an der aktiven Zone detektiert wurde, vermuteten wir, dass Munc13-1 ein Teil des für die Neurotransmitterausschüttung verantwortlichen Proteinapparats sein könnte.^[25] Unsere Annahmen bestätigten sich, als wir herausfanden, dass Munc13-1-Knockout-Synapsen ein dramatisches Defizit bei der Neurotransmitterausschüttung aufwiesen, weil synaptische Vesikel nicht mehr für die Fusion vorbereitet werden konnten.^[157]

Kurz nach Munc13-1 entdeckten wir eine Reihe weiterer Proteine der aktiven Zone, darunter CASK,^[26] RIM-Proteine (für Rab3-interagierende Moleküle^[27]), RIM-BPs^[28] und ELKS,^[29] während weitere Proteine der aktiven Zone wie α -Liprine,^[31] Bassoon^[32] und Piccolo^[33, 34] von anderen beschrieben wurden. Interessanterweise interagierten die meisten dieser Proteine direkt oder indirekt miteinander und formten dadurch ein Proteinnetzwerk an der aktiven Zone.^[2] Vor allem binden die RIM-Proteine an Munc13-1, RIM-BPs, ELKS (obwohl es nicht klar ist, ob diese Bindung physiologisch relevant ist) und α -Liprine. Diese Tatsache weist darauf hin, dass die RIM-Proteine den zentralen Knotenpunkt dieses Proteinnetzwerkes darstellen, während einige der weiteren

Proteine über andere Interaktionen miteinander verknüpft sind.^[28, 158–160] Viele Fragen über aktive Zonen, wie etwa die nach dem Mechanismus, der aktive Zonen gegenüber der postsynaptischen Spezialisierung positioniert, sind bisher unbeantwortet geblieben. Dennoch haben wir bereits eine stimmige Vorstellung davon, wie die aktive Zone ihre drei Hauptfunktionen ausführt, nämlich die Anbindung der synaptischen Vesikel („Docking“) an die Plasmamembran, die Reifung („Priming“) solcher Vesikel zur Vorbereitung auf die Fusion und die Rekrutierung von Ca^{2+} -Kanälen in die Nähe der gedockten und fusionsfähigen Vesikel.

5.1. Die Anbindung („Docking“) der synaptischen Vesikel an die aktive Zone

Wie in anderen Membranverkehrsprozessen auch, werden für die Anbindung der synaptischen Vesikel an die aktive Zone Rab-Proteine benötigt, kleine GTPasen, die entfernt mit den Ras-Proteinen verwandt sind. Die zentrale Rolle der Rab-Proteine während des Membranverkehrs wurde in Novicks Studien zu Sec4p entdeckt.^[161] Als wir 1992 Novicks Arbeit aufgriffen, beobachteten wir in Zusammenarbeit mit Reinhard Jahn, dass Rab3, das am weitesten verbreitete Rab-Protein im Gehirn, während des Ruhezustands hoch konzentriert auf synaptischen Vesikeln vorliegt, während der Exozytose jedoch von den Vesikeln dissoziert. Diese Daten wiesen auf eine Rolle von Rab3 bei der Neu-

rotransmitterfreisetzung hin.^[19,20] Anschließende mausgenetische Untersuchungen der vier verschiedenen Rab3-Isoformen (Rab3A, 3B, 3c und 3D) bestätigten, dass Rab3 eine zentrale Rolle bei der Neurotransmitterfreisetzung spielt.^[128,162-164]

Auf der Suche nach dem Wirkmechanismus der Rab3-Proteine testeten wir zunächst die funktionelle Beteiligung von Rabphilin, dem ersten vermeintlichen Rab3-Effektor, der durch Yoshimi Takai beschrieben wurde.^[165] Die Ausschaltung von Rabphilin verursachte allerdings nur geringe Veränderungen bei der Neurotransmitterfreisetzung, was bedeutete, dass es sich bei Rabphilin nicht um einen der Hauptakteure handeln konnte.^[166,167]

Wir suchten anschließend nach weiteren Rab3-Effektorproteinen, die sich durch eine GTP-abhängige Bindung an Rab3, nicht aber an andere wichtige Rab-Proteine, auszeichnen. Dabei identifizierten wir die RIM-Proteine (für Rab3-interagierende Moleküle), eine Gruppe von evolutio-när konservierten großen Multidomänenproteinen der aktiven Zone.^[27,29] In Säugetieren werden vier RIM-verwandte Gene exprimiert, von denen nur zwei Gene (*RIMS1* und *RIMS2*) Proteine mit der Rab3-Bindedomäne erzeugen.^[28,29] Die *RIMS1*- und *RIMS2*-Gene besitzen allerdings mehrere unabhängige Promotoren und es ergeben sich daraus fünf Hauptformen (RIM1 α , RIM1 β , RIM2 α , RIM2 β und RIM2 γ), die durch extensives alternatives Splicing weiter diversifiziert werden.

Die anschließenden Untersuchungen erstreckten sich über einen Zeitraum von 15 Jahren und zeigten, dass RIM-Proteine mehrere Funktionen an der aktiven Zone übernehmen, die weit über ihre Rolle als Rab3-Effektoren hinausgehen. Wie wir im Weiteren erfahren werden, sind RIM-Proteine nicht nur für die Anbindung/Andockung der synaptischen Vesikel an die Plasmamembran der aktiven Zone wichtig, sondern auch für die Rekrutierung von Ca²⁺-Kanälen an die aktive Zone und für die Einleitung des Reifeprozesses der synaptischen Vesikel, der durch die Munc13-Proteine vermittelt wird. Die Anbindung- und Andockungsfunktion der RIM-Proteine, die aufgrund ihrer Anwesenheit an der aktiven Zone und ihrer Interaktion mit Rab3 vorhergesagt wurde, konnte zuerst in *C. elegans* validiert werden. *C. elegans* besitzt nur ein einziges RIM-Gen (bezeichnet als *unc10*).^[168,169] Die Ausschaltung individueller RIM-Isoformen in Mäusen, darunter auch die des prädominanten RIM1 α , zeigte in Untersuchungen, die konventionelle elektronenmikroskopische Methoden verwendeten, keine Veränderung in der Fähigkeit, Vesikel an die Membran zu docken.^[160] Doppelt konditionale Knockouts, in denen alle durch die *RIMS1*- und *RIMS2*-Gene hergestellten Isoformen ausgeschaltet werden, zeigten jedoch eine dramatische Beeinträchtigung in der Fähigkeit von Nervenzellen, Vesikel an die Membran der aktiven Zone zu binden.^[115,170] Aufgrund dieser Ergebnisse ist es sehr wahrscheinlich, dass synaptische Vesikel über die GTP-abhängige Bindung der RIM-Proteine der aktiven Zone an die Rab3/27-Proteine der Vesikel an die aktive Zone gebunden („gedockt“) werden.

In diesem Zusammenhang sollte allerdings erwähnt werden, dass in elektronenmikroskopischen Studien unter Verwendung von chemisch fixierten und traditionell mit

Schwermetall gefärbten Schnitten außer den RIM-Proteinen keine weiteren Proteine identifiziert werden konnten, die für den Prozess der Vesikel-Andockung essenziell waren. Ein komplett anderes Bild ergibt sich jedoch, wenn das Gewebe ohne chemische Fixierung und durch schnelle Einfrierung der Probe für die Elektronenmikroskopie vorbereitet wird – hier wurde inzwischen eine große Anzahl weiterer Proteine beschrieben, die an dem „Docking“-Prozess beteiligt sind. In diesen Präparationen zeigen selbst die RIM1 α -Knockout-Mäuse einen „Docking“-Phänotyp. Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass so viele Proteine gleichzeitig und nicht-redundant an der Anbindung der Vesikel an die Membran der aktiven Zone beteiligt sind. Wahrscheinlicher ist vielmehr, dass die Art von „Docking“-Phänotyp, der in Gefrierproben detektierbar ist, eine Beeinträchtigung bei dem Reifeprozess („Priming“) der Vesikel dokumentiert. Obwohl wohl mehrere Moleküle bei der stabilen Anbindung der synaptischen Vesikel an die Membran der aktiven Zone beteiligt sein können, scheinen nur die RIM-Proteine für den eigentlichen „Docking“-Prozess an sich von Bedeutung zu sein. Es sollte auch erwähnt werden, dass der „Docking“-Prozess der sekretorischen Granula in chromaffinen Zellen andere Charakteristika aufweist als der von synaptischen Vesikeln an der aktiven Zone. So führt die Ausschaltung von Syt1 zum Beispiel zu einer Beeinträchtigung der Fähigkeit von Zellen, sekretorische Granula an die Membran zu docken,^[171] was jedoch für synaptische Vesikel nicht der Fall ist.^[112,128] Die Ausschaltung von Syt1 hat jedoch im Vergleich zu seinem großen Effekt auf die synaptische Exozytose, nur einen geringen Effekt auf die Ca²⁺-gesteuerte Transmitterfreisetzung in chromaffinen Zellen. Diese Beobachtung kann wahrscheinlich dadurch erklärt werden, dass Syt1 und Syt7 für die Exozytose in chromaffinen Zellen vollständig redundant sind, was jedoch nicht für die synaptische Exozytose gilt.^[121,125] Dieser Widerspruch zwischen „Docking“- und Exozytose-Phänotypen deutet darauf hin, dass der „Docking“-Prozess in chromaffinen Zellen im Unterschied zu dem in Synapsen, für die Transmitterfreisetzung womöglich nicht einmal von Bedeutung sein mag.

5.2. Die Vorbereitung der Vesikel auf die Fusion

Es wird angenommen, dass Vesikel während eines Reifungsprozesses („Priming“) in einen für die Ca²⁺-gesteuerte Verschmelzung mit der Membran fusionsfähigen Zustand überführt werden und so einen unmittelbar freisetzbaren Vesikelpool (readily-releasable pool; RRP) bilden. Neben den Proteinen, die an dem Fusionsprozess an sich beteiligt sind (z.B. SNARE- und SM-Proteine), und neben den Complexinen sind Munc13 und RIM die wahrscheinlich wichtigsten Faktoren für diesen Reifungsprozess. Munc13- und RIM-Proteine binden einander. Untersuchungen, die größtenteils in den Gruppen von Nils Brose und Josep Rizo durchgeführt wurden, zeigten, dass Munc13 für den Reifungsprozess von Vesikeln essenziell ist, da es wahrscheinlich über seine MUN-Domäne die Zusammensetzung des SNARE-Komplexes katalysiert.^[157,172] Die gereinigte MUN-Domäne von Munc13 kann die Öffnung des „geschlossenen“ Syntaxin-1 für die

anschließende SNARE-Komplex-Zusammensetzung erleichtern, was auf einen molekularen Mechanismus hinweist, der den dramatischen Phänotyp der Munc13-Mausmutanten erklärt.^[173] Eine überraschende Erkenntnis war in diesem Zusammenhang, dass die Funktion von Munc13 durch verschiedene Signalwege stark reguliert wird. Die neuronalen Munc13-Isoformen besitzen unter anderem eine C1-Domäne, die N-terminal zu der zentralen Ca^{2+} -bindenden C2-Domäne liegt. Diese C1-Domäne von Munc13 bindet unter physiologischen Bedingungen Diacylglycerol und kann pharmakologisch durch Phorbolester aktiviert werden.^[174] Die Bindung von Diacylglycerol an die C1-Domäne von Munc13-1 reguliert die Funktion der Synapse, da Mausmutanten, in denen die Phorbolesterbindung an Munc13-1 nicht mehr stattfinden kann, eine dramatische Beeinträchtigung des Vesikelreifungsprozesses und der synaptischen Kurzzeitplastizität aufweisen.^[175] Die Ca^{2+} -Bindung an die C2-Domäne von Munc13 ist ebenso wichtig und trägt ebenfalls signifikant zur synaptischen Kurzzeitplastizität bei.^[108] Schließlich binden Munc13-Proteine Ca^{2+} /Calmodulin, was eine weitere Regulation der Funktion von Munc13 ermöglicht.^[176]

Auch die Ausschaltung der RIM-Proteine verursacht eine schwer wiegende Beeinträchtigung während des Reifeprozesses der Vesikel.^[160,168] Diese Beeinträchtigung scheint jedoch indirekt zu sein, da RIM-Proteine an Munc13-Proteinen binden und dadurch deren Funktion aktivieren.^[177] Die N-terminale Sequenz der RIM-Proteine enthält ein Zinkfinger-Motiv, das an die Ca^{2+} -unabhängige N-terminale C2-Domäne von Munc13-Proteinen bindet.^[106,107] Ohne diese Bindung dimerisiert die C2-Domäne von Munc13 zu einem konstitutiven Homodimer, das durch die Interaktion der RIM-Zinkfingerdomäne mit den C2-Domänen der dimeren Munc13-Komplexe in ein RIM-Munc13 Heterodimer umgewandelt wird. Wir fanden erstaunlicherweise, dass in RIM-defizienten Synapsen die Beeinträchtigung der Reifung synaptischer Vesikel zumindest zum Teil durch die Überexpression einer N-terminal truncierten Munc13-1-Mutante, der die N-terminale C2-Domäne fehlt und die deshalb nicht homodimerisiert, revertiert werden kann. Die Überexpression von Wildtyp-Munc13-1 hatte keinen solchen Effekt.^[177] Diese Befunde sind im Einklang mit einer zentralen Funktion der RIM-Proteine an der aktiven Zone und weisen auf einen möglichen Mechanismus hin, über den die RIM-Proteine den Vesikelreifungsprozess über Munc13-Proteine regulieren könnten.

5.3. Die Rekrutierung von Ca^{2+} -Kanälen an die aktive Zone

Um die schnelle, mit dem Aktionspotential synchronisierte Neurotransmitterfreisetzung sicher zu stellen, müssen sich vor allem die Ca^{2+} -Kanäle der aktiven Zone in der Nähe der gedockten und fusionsbereiten Vesikel befinden. Nur eine solche An-

ordnung ermöglicht kurze Ca^{2+} -Diffusionswege, die für die erforderliche Geschwindigkeit der Synapse benötigt werden. Darüber hinaus kann nur ein kurzer Ca^{2+} -Diffusionsweg erklären, wie die so extrem kurzen präsynaptischen Ca^{2+} -Transienten die Transmitterfreisetzung einleiten können – denn letztendlich sind die Ca^{2+} -Sensoren bei der schnellen synaptischen Neurotransmitterfreisetzung und der langsameren neuroendokrinen Exozytose dieselben.

Über den Nachweis, dass RIM-Proteine zusammen mit ihren Bindungspartnern, den RIM-BPs, Ca^{2+} -Kanäle an die Vesikelfreisetzungsstellen rekrutieren, entschlüsselten wir den molekularen Mechanismus, über den die Ca^{2+} -Kanäle in die Nähe von fusionsbereiten synaptischen Vesikeln an der aktiven Zone gebracht werden (Abbildung 13).^[115] Da RIM-Proteine auch synaptische Vesikel an die aktive Zone binden und grundlegend an dem Reifungsprozess der Vesikel beteiligt sind, stellen RIM-Proteine die zentralen Elemente bei der Organisation der aktiven Zone dar, die die eindrucksvollen Eigenschaften der Neurotransmitterfreisetzung determinieren. Die einfache Architektur der aktiven Zone, in der ein

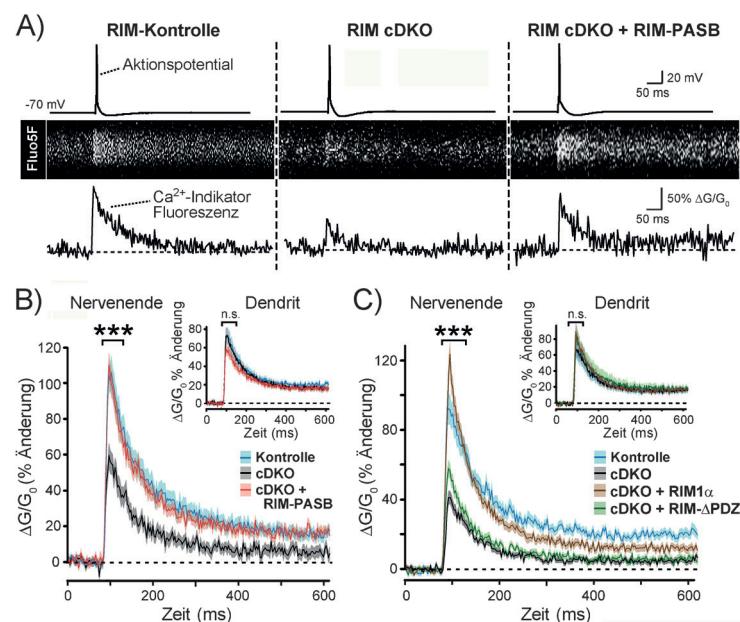


Abbildung 13. Die Deletion von RIM-Proteinen vermindert präsynaptische Ca^{2+} -Transienten. A) Einzelne Aktionspotentiale verursachen einen Anstieg der präsynaptischen Ca^{2+} -Konzentration, die durch die Ausschaltung von RIM-Proteinen (RIM cDKO) beeinträchtigt wird, aber durch die Re-Expression eines RIM1-Fragments, das Ca^{2+} -Kanäle binden kann (RIM-PASB), wiederhergestellt werden kann. Die Abbildung zeigt repräsentative Messungen von Aktionspotentialen (oben), Linienscans der Ca^{2+} -Transienten in präsynaptischen Kompartimenten, die durch die Aktionspotentiale hervorgerufen wurden, die Fluoreszenz des Ca^{2+} -Indikators FluoSF (Mitte) und die Quantifizierung der Ca^{2+} -Transienten (unten). B) Darstellung des zeitlichen Verlaufs der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen in präsynaptischen Nervenenden und Dendriten (Einschub) während eines Aktionspotentials. Die Abbildung zeigt die durchschnittlichen Ca^{2+} -Konzentrationen aus mehreren unabhängigen Experimenten wie in (A) dargestellt, gemessen in Wildtyp-Neuronen, in Neuronen ohne RIM-Proteine (cDKO) und in Neuronen, die in der Abwesenheit der RIM-Proteine ein RIM-Fragment exprimieren, das die Bindung an Ca^{2+} -Kanäle ermöglicht (cDKO + RIM-PASB). C) Analoge Abbildung zu (B), wobei hier die Revertierung der defizienten Ca^{2+} -Transienten nach RIM-Deletion in Anwesenheit einer RIM-Variante getestet wurde, die die PDZ-Domäne fehlt. (Alle Abbildungen aus Kaeser et al.^[115])

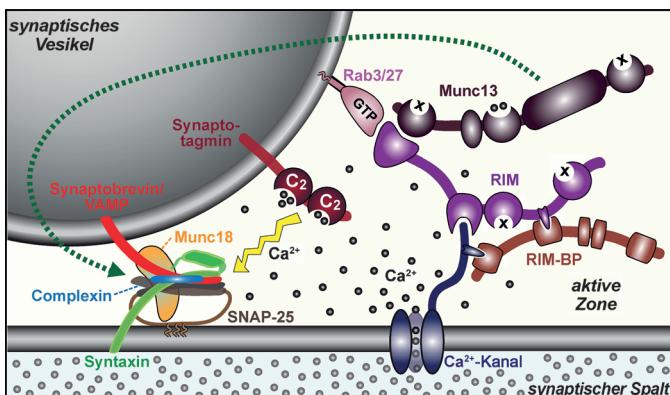


Abbildung 14. Schematisches Diagramm des RIM-, RIM-BP- und Munc13-Proteinkomplexes, der gleichzeitig Rab3/27 auf den synaptischen Vesikeln und Ca^{2+} -Kanäle in der Plasmamembran bindet und über diese Interaktion die Anbindung der Vesikel an die Freisetzungszone („Docking“), die Reifung der Vesikel für die Freisetzung („Priming“, Pfeil mit gestrichelter Linie) und die Rekrutierung der Ca^{2+} -Kanäle in die Nähe der gebundenen Vesikel vermittelt. RIM, RIM-BP, und Munc13 sind Multidomänenproteine, die einen stabilen Protein-Komplex bilden, der drei essenzielle Funktionen der aktiven Zone vermittelt, nämlich die Rekrutierung der Ca^{2+} -Kanäle, wodurch der Ca^{2+} -Einstrom in die Nähe des Ca^{2+} -Sensors Synaptotagmin dirigiert wird und so Aktionspotential und Neurotransmitterfreisetzung eng gekoppelt werden, das Andocken der Vesikel an die Fusionszonen und die Munc13-abhängige Reifung der Fusionsmaschinerie bestehend aus den SNARE-Proteinen Syntaxin, SNAP-25 und Synaptobrevin/VAMP, sowie aus Munc18-1. Die Kugeln stellen Ca^{2+} -Ionen dar. Von den dargestellten Domänen wurden nur die C2-Domänen speziell gekennzeichnet. Andere Proteine der aktiven Zone wie α -Liprine und ELKS, die an den RIM/Munc13/RIM-BP-Komplex binden und zur Transmitterfreisetzung beitragen, sind nicht gezeigt. (Modifiziert nach Kaeser et al.^[115] und Südhof^[3]).

einzelnes Protein als zentraler Vermittler die Zusammensetzung aller Komponenten an einem Ort kontrolliert, macht die Neurotransmitterfreisetzung gleichzeitig effizient und effektiv (Abbildung 14).

In weiteren Studien zeigten wir, dass RIM-Proteine direkt und selektiv an die Ca^{2+} -Kanäle der aktiven Zone binden. Der Beweis dafür, dass RIM-Proteine bei der Rekrutierung von Ca^{2+} -Kanälen an die aktive Zone beteiligt sind, gelang erst, nachdem wir, wie schon bei dem Nachweis der Beteiligung der RIM-Proteine an der Anbindung/Andockung der Vesikel, alle RIM-Isoformen in präsynaptischen Nervenenden ausschalteten.^[115] Dabei fanden wir, dass die Ausschaltung der RIM-Proteine zu einem verminderten Ca^{2+} -Einstrom in die Präsynapse führte, was auf eine verminderte Anzahl an präsynaptischen Ca^{2+} -Kanälen hindeutete, und dass die enge Kopplung zwischen Aktionspotential und Transmitterfreisetzung verloren ging (Abbildung 13).^[115, 170, 178] RIM-Proteine erfüllen ihre Schlüsselrolle an der aktiven Zone also, indem sie mit Ca^{2+} -Kanälen, mit weiteren Proteinen der aktiven Zone, wie etwa mit den RIM-BPs (die wiederum ebenfalls Ca^{2+} -Kanäle binden) und mit Munc13-1, sowie mit den synaptischen Vesikeln einen Super-Komplex bilden. Die Funktion der RIM-Proteine und der RIM-BPs bei der Rekrutierung der Ca^{2+} -Kanäle zur aktiven Zone und bei der Andockung der Vesikel an die aktive Zone

ist evolutionär konserviert^[179, 180] und stellt einen grundlegenden Mechanismus bei der synaptischen Erregungsübertragung dar.

6. Die Zusammenführung aller Komponenten

Die drei Phasen der Neurotransmitterfreisetzung, die wir untersucht haben – die Membranfusion, die Ca^{2+} -Steuerung der Fusion und die Organisation des Ca^{2+} -regulierten Fusionsapparats an der aktiven Zone – stellen eine hierarchische Kaskade unabhängiger Prozessen dar. Wie bei einer russischen Matroschka-Puppe sind diese drei Phasen ineinander eingebettet, wobei der eigentliche Membranfusionsprozess den inneren Kern bildet, der von dem Ca^{2+} -abhängigen Steuerungsprozess „umgeben“ bzw. kontrolliert wird. Beide Prozesse sind eingebettet in ein übergeordnetes Organisationsprinzip, das die exakte und für die Geschwindigkeit der synaptischen Signalübertragung essentielle Zusammensetzung der aktiven Zone garantiert. Mit unserer Arbeit enthüllten wir zusammen mit anderen einen stimmigen Mechanismus, der erklärt, wie synaptische Vesikel während der Neurotransmitterfreisetzung schnell mit der Plasmamembran verschmelzen, wie diese Fusion durch Ca^{2+} eingeleitet wird und wie die Schlüsselprozesse im präsynaptischen Nervenende räumlich so organisiert werden, dass das einströmende Ca^{2+} -Signal nach der Öffnung der Ca^{2+} -Kanäle durch ein Aktionspotential schnell in ein Fusionsereignis übersetzt werden kann.

Insgesamt ist der von uns beschriebene Proteinapparat des Transmitterfreisetzungsprozesses für die unglaubliche Schnelligkeit und Präzision der Ca^{2+} -gesteuerten synaptischen Signalübertragung verantwortlich. Zudem weisen das Design dieses Proteinapparats und die regulatorischen Proteindomänen innerhalb dieses Apparats auf Mechanismen hin, die die dramatische Kurz- und Langzeitplastizität der Transmitterfreisetzung erklären können. Diese wiederum spielen eine zentrale Rolle bei den neuronalen Netzwerkeigenschaften, die die Gehirnfunktion steuern.

Trotz aller Fortschritte bleiben viele wichtige Fragen offen. Welche physikochemischen Mechanismen liegen der Membranfusion zu Grunde? Wie genau funktionieren SNARE- und SM-Proteine? Welche Rolle spielt der hier vorgestellte Fusionsapparat bei der Entstehung von Krankheiten wie der Parkinson'schen Krankheit? Wie verändern sich präsynaptische Nervenenden während langfristiger plastischer Prozesse und welche Rolle spielt die synaptische Plastizität beim Langzeitgedächtnis? Welche Mechanismen sind für die funktionellen Unterschiede zwischen verschiedenen Synapsentypen verantwortlich? Warum besitzen zum Beispiel inhibitorische Synapsen oft eine höhere Transmitter-Freisetzungswahrscheinlichkeit als exzitatorische Synapsen und welche Mechanismen führen zu den unterschiedlichen Plastizitätsformen in den verschiedenen Synapsentypen? Wie wird die präsynaptische aktive Zone mit so großer Präzision gegenüber dem postsynaptischen Transmitter-Rezeptorenapparat ausgerichtet und wie wird die Größe der aktiven Zone reguliert?

Viel bleibt noch zu tun und ich wünsche mir, die Beantwortung von zumindest einem Teil dieser Fragen noch mit erleben zu dürfen.

Danksagung

Ich danke meinen wissenschaftlichen Mentoren M.S. Brown, V.P. Whittaker und J.L. Goldstein, für ihre fortwährende Beratung und meinen Kollegen und Kollaborationspartnern, im Besonderen Reinhard Jahn, Robert E. Hammer, Nils Brose, Rafael Fernandez-Chacon, Zhiping Pang, Irina Dulubova, Christian Rosenmund und Josep Rizo, für ihre außerordentlich wertvollen Ratschläge und ihre Unterstützung. Dem Howard Hughes Medical Institute, dem NIMH und dem NINDS bin ich für die fast 30-jährige finanzielle Unterstützung zu Dank verpflichtet.

Eingegangen am 18. Juni 2014

Online veröffentlicht am 22. Oktober 2014

Übersetzt von Cordelia Imig, Göttingen

- [1] B. Katz, *The Release of Neural Transmitter Substances*, Liverpool University Press, Liverpool, **1969**.
- [2] „Timing of neurotransmission at fast synapses in the mammalian brain“: B. L. Sabatini, W. G. Regehr, *Nature* **1996**, 384, 170–172.
- [3] „The presynaptic active zone“: T. C. Südhof, *Neuron* **2012**, 75, 11–25.
- [4] „Turnover of transmitter and synaptic vesicles at the frog neuromuscular junction“: B. Ceccarelli, W. P. Hurlbut, A. Mauro, *J. Cell Biol.* **1973**, 57, 499–524.
- [5] „Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction“: J. E. Heuser, T. S. Reese, *J. Cell Biol.* **1973**, 57, 315–344.
- [6] „The morphology and acetylcholine content of isolated cerebral cortical synaptic vesicles“: V. P. Whittaker, M. N. Sheridan, *J. Neurochem.* **1965**, 12, 363–372.
- [7] „Proteins of synaptic vesicles involved in exocytosis and membrane recycling“: T. C. Südhof, R. Jahn, *Neuron* **1991**, 6, 665–677.
- [8] „Synaptophysin: A synaptic vesicle protein with four transmembrane regions and a novel cytoplasmic domain“: T. C. Südhof, et al., *Science* **1987**, 238, 1142–1144.
- [9] „The structure of cytochrome b561, a secretory vesicle-specific electron transport protein“: M. S. Perin, V. A. Fried, C. A. Slaughter, T. C. Südhof, *EMBO J.* **1988**, 7, 2697–2703.
- [10] „Synapsins: mosaics of shared and individual domains in a family of synaptic vesicle phosphoproteins“: T. C. Südhof, et al., *Science* **1989**, 245, 1474–1480.
- [11] „A synaptic vesicle membrane protein is conserved from mammals to Drosophila“: T. C. Südhof, M. Baumert, M. S. Perin, R. Jahn, *Neuron* **1989**, 2, 1475–1481.
- [12] „VAMP-1: a synaptic vesicle-associated integral membrane protein“: W. S. Trimble, D. M. Cowan, R. H. Scheller, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, 85, 4538–4542.
- [13] „Human endomembrane H⁺-pump strongly resembles the ATP-synthetase of archaebacteria“: T. C. Südhof, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, 86, 6067–6071.
- [14] „Structure of the 116 kDa polypeptide of the clathrin-coated vesicle/synaptic vesicle proton pump“: M. S. Perin, et al., *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 3877–3881; „Structural and functional conservation of synaptotagmin (p65) in Drosophila and humans“: M. S. Perin, et al., *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 615–622.
- [15] „Phospholipid binding by a synaptic vesicle protein homologous to the regulatory region of protein kinase C“: M. S. Perin, et al., *Nature* **1990**, 345, 260–263.
- [16] „Synaptotagmin II: a novel differentially distributed form of synaptotagmin“: M. Geppert, B. T. Archer III, T. C. Südhof, *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 13548–13552.
- [17] „Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent activities of neural and nonneuronal synaptotagmins“: C. Li, et al., *Nature* **1995**, 375, 594–599.
- [18] „Four additional members of the ras gene superfamily isolated by an oligonucleotide strategy: molecular cloning of YPT-related cDNAs from a rat brain library“: N. Touchot, P. Chardin, A. Tavitian, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, 84, 8210–8214.
- [19] „Rab3 is a small GTP-binding protein exclusively localized to synaptic vesicles“: G. F. von Mollard, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, 87, 1988–1992.
- [20] „A small GTP-binding protein (rab3A) dissociates from synaptic vesicles during exocytosis“: G. F. von Mollard, T. C. Südhof, R. Jahn, *Nature* **1991**, 349, 79–81.
- [21] „SVOP, an evolutionarily conserved synaptic vesicle protein, suggests novel transport functions of synaptic vesicles“: R. Janz, K. Hofmann, T. C. Südhof, *J. Neurosci.* **1998**, 18, 9269–9281.
- [22] „Novel SCAMPs lacking NPF repeats: ubiquitous and synaptic vesicle-specific forms implicate SCAMPs in multiple membrane-trafficking functions“: R. Fernández-Chacón, T. C. Südhof, *J. Neurosci.* **2000**, 20, 7941–7950.
- [23] „Synaptic vesicle fusion complex contains unc-18 homologue bound to syntaxin“: Y. Hata, C. A. Slaughter, T. C. Südhof, *Nature* **1993**, 366, 347–351.
- [24] „Complexins: cytosolic proteins that regulate SNAP-receptor function“: H. T. McMahon, M. Missler, C. Li, T. C. Südhof, *Cell* **1995**, 83, 111–119.
- [25] „Mammalian homologues of *C. elegans* unc-13 gene define novel family of C2-domain proteins“: N. Brose, K. Hofmann, Y. Hata, T. C. Südhof, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 25273–25280.
- [26] „CASK: A novel dlg/PSD95 homologue with an N-terminal CaM kinase domain identified by interaction with neurexins“: Y. Hata, S. Butz, T. C. Südhof, *J. Neurosci.* **1996**, 16, 2488–2494.
- [27] „RIM: A putative Rab3-effector in regulating synaptic vesicle fusion“: Y. Wang, et al., *Nature* **1997**, 388, 593–598.
- [28] „The RIM/NIM family of neuronal SH3-domain proteins: interactions with Rab3 and a new class of neuronal SH3-domain proteins“: Y. Wang, S. Sugita, T. C. Südhof, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 20033–20044.
- [29] „A family of RIM-binding proteins regulated by alternative splicing: Implications for the genesis of synaptic active zones“: Y. Wang, X. Liu, T. Biederer, T. C. Südhof, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 14464–14469.
- [30] „Cast: a novel protein of the cytomatrix at the active zone of synapses that forms a ternary complex with RIM1 and munc13-1“: T. Ohtsuka, et al., *J. Cell Biol.* **2002**, 158, 577–590.
- [31] „The liprin protein SYD-2 regulates the differentiation of presynaptic termini in *C. elegans*“: M. Zhen, Y. Jin, *Nature* **1999**, 401, 371–375.
- [32] „Bassoon, a novel zinc-finger CAG/glutamine-repeat protein selectively localized at the active zone of presynaptic nerve terminals“: S. tom Dieck, et al., *J. Cell Biol.* **1998**, 142, 499–509.
- [33] „Aczonin, a 550-kD putative scaffolding protein of presynaptic active zones, shares homology regions with Rim and Bassoon and binds profilin“: X. Wang, et al., *J. Cell Biol.* **1999**, 147, 151–162.
- [34] „Piccolo, a presynaptic zinc finger protein structurally related to bassoon“: S. D. Fenster, et al., *Neuron* **2000**, 25, 203–214.

- [35] „Short term synaptic plasticity is altered in mice lacking synapsin I“: T. W. Rosahl, M. Geppert, D. Spillane, J. Herz, R. E. Hammer, R. C. Malenka, T. C. Südhof, *Cell* **1993**, *75*, 661–670.
- [36] „Essential roles in synaptic plasticity for synaptotagmin I and synaptophysin I“: R. Janz, et al., *Neuron* **1999**, *24*, 687–700.
- [37] „Internalization and mechanism of action of clostridial toxins in neurons“: C. Grumelli, et al., *Neurotoxicology* **2005**, *26*, 761–767.
- [38] „Tetanus toxin action: Inhibition of neurotransmitter release linked to synaptobrevin proteolysis“: E. Link, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1992**, *189*, 1017–1023.
- [39] „Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin“: G. Schiavo, et al., *Nature* **1992**, *359*, 832–835.
- [40] a) „Botulinum neurotoxin A selectively cleaves the synaptic protein SNAP-25“: J. Blasi, E. R. Chapman, E. Link, T. Binz, S. Yamasaki, P. De Camilli, T. C. Südhof, H. Niemann, R. Jahn, *Nature* **1993**, *365*, 160–163; „Botulinum neurotoxin C1 blocks neurotransmitter release by means of cleaving HPC-1/syntaxin“: b) J. Blasi, E. R. Chapman, S. Yamasaki, T. Binz, H. Niemann, R. Jahn, *EMBO J.* **1993**, *12*, 4821–4828.
- [41] „Identification of the nerve terminal targets of botulinum neurotoxin serotypes, A, D and E“: G. Schiavo, et al., *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 23784–23787.
- [42] „Cellubrevin: A ubiquitous tetanus-toxin substrate homologous to a putative synaptic vesicle fusion protein“: H. McMahon, et al., *Nature* **1993**, *364*, 346–349.
- [43] „Reconstitution of the transport of protein between successive compartments of the Golgi measured by the coupled incorporation of N-acetylglucosamine“: W. E. Balch, W. G. Dunphy, W. A. Braell, J. E. Rothman, *Cell* **1984**, *39*, 405–416.
- [44] „A fusion protein required for vesicle-mediated transport in both mammalian cells and yeast“: D. W. Wilson, et al., *Nature* **1989**, *339*, 355–359.
- [45] „SNAPs, a family of NSF attachment proteins involved in intracellular membrane fusion in animals and yeast“: D. O. Clary, I. C. Griff, J. E. Rothman, *Cell* **1990**, *61*, 709–721.
- [46] „SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion“: T. Söllner, et al., *Nature* **1993**, *362*, 318–324.
- [47] „A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion“: T. Söllner, M. K. Bennett, S. W. Whiteheart, R. H. Scheller, J. E. Rothman, *Cell* **1993**, *75*, 409–418.
- [48] „Synaptic vesicle membrane fusion complex: Action of clostridial neurotoxins on assembly“: T. Hayashi, et al., *EMBO J.* **1994**, *13*, 5051–5061.
- [49] „Synaptic core complex of synaptobrevin, syntaxin, and SNAPS forms high affinity α -SNAP binding site“: H. T. McMahon, T. C. Südhof, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 2213–2217.
- [50] „Membrane fusion protein machinery: Insights from synaptic proteins“: T. C. Südhof, P. DeCamilli, H. Niemann, R. Jahn, *Cell* **1993**, *75*, 1–4.
- [51] „Sec18p (NSF)-driven release of Sec17p (alpha-SNAP) can precede docking and fusion of yeast vacuoles“: A. Mayer, W. Wickner, A. Haas, *Cell* **1996**, *85*, 83–94.
- [52] „Structure and conformational changes in NSF and its membrane receptor complexes visualized by quick-freeze/deep-etch electron microscopy“: P. I. Hanson, et al., *Cell* **1997**, *90*, 523–535.
- [53] „Structural organization of the synaptic exocytosis core complex“: R. C. Lin, R. H. Scheller, *Neuron* **1997**, *19*, 1087–1094.
- [54] „The synaptic SNARE complex is a parallel four-stranded helical bundle“: M. A. Poirier, et al., *Nat. Struct. Biol.* **1998**, *5*, 765–769.
- [55] „Brunger at Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution“: R. B. Sutton, D. Fasshauer, R. Jahn, *Nature* **1998**, *395*, 347–353.
- [56] „SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion“: T. Weber, et al., *Cell* **1998**, *92*, 759–772.
- [57] „The genetics of *Caenorhabditis elegans*“: S. Brenner, *Genetics* **1974**, *77*, 71–94.
- [58] „Secretion and cell-surface growth are blocked in a temperature-sensitive mutant of *Saccharomyces cerevisiae*“: P. Novick, R. Schekman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1979**, *76*, 1858–1862.
- [59] „A rat brain Sec1 homologue related to Rop and UNC18 interacts with syntaxin“: E. P. Garcia, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 2003–2007.
- [60] „n-Sec1: a neural-specific syntaxin-binding protein“: J. Pevsner, S. C. Hsu, R. H. Scheller, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 1445–1449.
- [61] „The Membrane Fusion Enigma: SNAREs, SM Sec1/Munc18 Proteins, and Their Accomplices—Guilty as Charged?“: J. Rizo, T. C. Südhof, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2012**, *28*, 279–308.
- [62] „Mutations in the *Drosophila* Rop gene suggest a function in general secretion and synaptic transmission“: S. D. Harrison, K. Broadie, J. van de Goor, G. M. Rubin, *Neuron* **1994**, *13*, 555–566.
- [63] „Synaptic assembly of the brain in the absence of neurotransmitter secretion“: M. Verhage, et al., *Science* **2000**, *287*, 864–869.
- [64] „Sec1p binds to SNARE complexes and concentrates at sites of secretion“: C. M. Carr, et al., *J. Cell Biol.* **1999**, *146*, 333–344.
- [65] „Ordering the final events in yeast exocytosis“: E. Grote, C. M. Carr, P. J. Novick, *J. Cell Biol.* **2000**, *151*, 439–452.
- [66] „A conformational switch in syntaxin during exocytosis“: I. Dulubova, et al., *EMBO J.* **1999**, *18*, 4372–4382.
- [67] „Three-dimensional structure of an evolutionarily conserved N-terminal domain of syntaxin 1A“: I. Fernandez, et al., *Cell* **1998**, *94*, 841–849.
- [68] „Sly1 binds to Golgi and ER syntaxins via a conserved N-terminal peptide motif“: T. Yamaguchi, et al., *Developmental Cell* **2002**, *2*, 295–305.
- [69] „How Tlg2p/syntaxin16 ‘snares’ Vps45“: I. Dulubova, et al., *EMBO J.* **2002**, *21*, 3620–3631.
- [70] „Munc18–1 Binds Directly to the Neuronal SNARE Complex“: I. Dulubova, M. Khvotchev, T. C. Südhof, J. Rizo, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 2697–2702.
- [71] „Selective activation of cognate SNAREpins by Sec1/Munc18 proteins“: J. Shen, et al., *Cell* **2007**, *128*, 183–195.
- [72] „Dual Modes of Munc18-1/SNARE Interactions Are Coupled by Functionally Critical Binding to Syntaxin-1 N-terminus“: M. Khvotchev, et al., *J. Neurosci.* **2007**, *27*, 12147–12155.
- [73] „Munc18-1 Binding to the Neuronal SNARE Complex Controls Synaptic Vesicle Priming“: F. Deák, Y. Xu, W.-P. Chang, I. Dulubova, M. Khvotchev, X. Liu, T. C. Südhof, J. Rizo, *J. Cell Biol.* **2009**, *184*, 751–764.
- [74] „Munc18–1 mutations that strongly impair SNARE-complex binding support normal synaptic transmission“: M. Meijer, et al., *EMBO J.* **2012**, *31*, 2156–2168.
- [75] „Syntaxin N-terminal peptide motif is an initiation factor for the assembly of the SNARE-Sec1/Munc18 membrane fusion complex“: S. S. Rathore, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 22399–22406.
- [76] „Lipid-Anchored SNARE Lacking Transmembrane Regions Support Membrane Fusion During Neurotransmitter Release“: P. Zhou, et al., *Neuron* **2013**, *80*, 470–483.
- [77] „Conformational Switch of Syntaxin-1 Controls Synaptic Vesicle Fusion“: S. H. Gerber, et al., *Science* **2008**, *321*, 1507–1510.
- [78] „Microsecond Dissection of Neurotransmitter Release: SNARE-Complex Assembly Dictates Speed and Ca^{2+} -Sensitivity“: C. Acuna, Q. Guo, J. Burre, M. Sharma, J. Sun, T. C. Südhof, *Neuron* **2014**, *82*, 1088–1100.

- [79] „Syntaxin-1 N-Peptide and Habc-Domain Perform Distinct Essential Functions in Synaptic Vesicle Fusion“: P. Zhou, et al., *EMBO J.* **2013**, *32*, 159–171.
- [80] „Helical extension of the neuronal SNARE complex into the membrane“: A. Stein, G. Weber, M. C. Wahl, R. Jahn, *Nature* **2009**, *460*, 525–528.
- [81] „Extensive lipidation of a Torpedo cysteine string protein“: C. B. Gundersen, A. Mastrogiamico, K. Faull, J. A. Umbach, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 19197–19199.
- [82] „Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal“: L. Maroteaux, J. T. Campagnelli, R. H. Scheller, *J. Neurosci.* **1988**, *8*, 2804–2815.
- [83] „The synaptic vesicle protein CSP α prevents presynaptic degeneration“: R. Fernández-Chacón, et al., *Neuron* **2004**, *42*, 237–251.
- [84] „ α -Synuclein Cooperates with CSP α in Preventing Neurodegeneration“: S. Chandra, et al., *Cell* **2005**, *123*, 383–396.
- [85] „A trimeric protein complex functions as a synaptic chaperone machine“: S. Tobaben, et al., *Neuron* **2001**, *31*, 987–999.
- [86] „CSP α Knockout Causes Neurodegeneration by Impairing SNAP-25 Function“: M. Sharma, et al., *EMBO J.* **2011**, *31*, 829–841.
- [87] „CSP α Promotes SNARE-Complex Assembly by Chaperoning SNAP-25 during Synaptic Activity“: M. Sharma, J. Burré, T. C. Südhof, *Nat. Cell Biol.* **2011**, *13*, 30–39.
- [88] „Proteasome Inhibition Alleviates SNARE-Dependent Neurodegeneration in CSP α Knockout Mice“: M. Sharma, J. Burré, T. C. Südhof, *Sci. Transl. Med.* **2012**, *4*, 147ra113.
- [89] „ α -Synuclein Promotes SNARE-Complex Assembly in Vivo and in Vitro“: J. Burré, et al., *Science* **2010**, *329*, 1664–1668.
- [90] „Identification of a synaptic vesicle-specific membrane protein with a wide distribution in neuronal and neurosecretory tissue“: W. D. Matthew, L. Tsavaler, L. F. Reichardt, *J. Cell Biol.* **1981**, *91*, 257–269.
- [91] „Multiple, distinct forms of bovine and human protein kinase C suggest diversity in cellular signaling pathways“: L. Coussens, et al., *Science* **1986**, *233*, 859–866.
- [92] „Synaptotagmin: A Ca²⁺-sensor on the synaptic vesicle surface“: N. Brose, A. G. Petrenko, T. C. Südhof, R. Jahn, *Science* **1992**, *256*, 1021–1025.
- [93] „A single C2-domain from synaptotagmin I is sufficient for high affinity Ca²⁺/phospholipid-binding“: B. A. Davletov, T. C. Südhof, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 26386–26390.
- [94] „Ca²⁺-dependent conformational change in synaptotagmin I“: B. A. Davletov, T. C. Südhof, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 28547–28550.
- [95] „Distinct Ca²⁺- and Sr²⁺-binding properties of synaptotagmins: definition of candidate Ca²⁺-sensors for the fast and slow components of neurotransmitter release“: C. Li, B. A. Davletov, T. C. Südhof, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 24898–24902.
- [96] „Ca²⁺ regulates the interaction between synaptotagmin and syntaxin 1“: E. R. Chapman, P. I. Hanson, S. An, R. Jahn, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 23667–23671.
- [97] „Structure of the first C2-domain of synaptotagmin I: A novel Ca²⁺/phospholipid binding fold“: A. B. Sutton, et al., *Cell* **1995**, *80*, 929–938.
- [98] „Bipartite Ca²⁺-binding motif in C2 domains of synaptotagmin and protein kinase C“: X. Shao, et al., *Science* **1996**, *273*, 248–251.
- [99] „Synaptotagmin-syntaxin interaction: the C2-domain as a Ca²⁺-dependent electrostatic switch“: X. Shao, et al., *Neuron* **1997**, *18*, 133–142.
- [100] „Ca²⁺ binding to synaptotagmin: how many Ca²⁺ ions bind to the tip of a C2-domain?“: J. Ubach, X. Zhang, X. Shao, T. C. Südhof, J. Rizo, *EMBO J.* **1998**, *17*, 3921–3930.
- [101] „The C2B domain of synaptotagmin I is a monomeric Ca²⁺-binding module“: J. Ubach, Y. Lao, I. Fernandez, A. Demet, T. C. Südhof, J. Rizo, *Biochemistry* **2001**, *40*, 5854–5860.
- [102] „Three-dimensional structure of the synaptotagmin 1 C2B-domain: Synaptotagmin 1 as a phospholipid binding machine“: I. Fernandez, et al., *Neuron* **2001**, *32*, 1057–1069.
- [103] „C2-domains, structure of a universal Ca²⁺-binding domain“: J. Rizo, T. C. Südhof, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 15879–15882.
- [104] „Signaling through C2 domains: More than one lipid target“: S. Corbalan-Garcia, J. C. Gómez-Fernández, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2014**, *1838*, 1536–1547.
- [105] „Crystal structure of the PTEN tumor suppressor: implications for its phosphoinositide phosphatase activity and membrane association“: J. O. Lee, et al., *Cell* **1999**, *99*, 323–334.
- [106] „A Munc13/RIM/Rab3 Tripartite Complex: From Priming to Plasticity?“: I. Dulubova, et al., *EMBO J.* **2005**, *24*, 2839–2850.
- [107] „Structural Basis for a Munc13–1 Homodimer-Munc13–1/RIM Heterodimer Switch: C2-domains as Versatile Protein-Protein Interaction Modules“: J. Lu, et al., *PLOS Biol.* **2006**, *4*, e192.
- [108] „Munc13 C2B-domain—an activity-dependent Ca²⁺-regulator of synaptic exocytosis“: O.-H. Shin et al., *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2010**, *17*, 280–288.
- [109] „Mutational analysis of Drosophila synaptotagmin demonstrates its essential role in Ca²⁺-activated neurotransmitter release“: J. T. Littleton, et al., *Cell* **1993**, *74*, 1125–1134.
- [110] „Synaptic transmission persists in synaptotagmin mutants of Drosophila“: A. DiAntonio, K. D. Parfitt, T. L. Schwarz, *Cell* **1993**, *73*, 1281–1290.
- [111] „Synaptic function is impaired but not eliminated in *C. elegans* mutants lacking synaptotagmin“: M. L. Nonet, K. Grundahl, B. J. Meyer, J. B. Rand, *Cell* **1993**, *73*, 1291–1305.
- [112] „Synaptotagmin I: A major Ca²⁺-sensor for transmitter release at a central synapse“: M. Geppert, et al., *Cell* **1994**, *79*, 717–727.
- [113] „Autonomous Function of Synaptotagmin 1 in Triggering Synchronous Release Independent of Asynchronous Release“: A. Maximov, T. C. Südhof, *Neuron* **2005**, *48*, 547–554.
- [114] „Synaptotagmin-1 functions as a Ca²⁺ sensor for spontaneous release“: J. Xu, Z. P. Pang, O. H. Shin, T. C. Südhof, *Nat. Neurosci.* **2009**, *12*, 759–766.
- [115] „RIM proteins tether Ca²⁺-channels to presynaptic active zones via a direct PDZ-domain interaction“: P. S. Kaeser, et al., *Cell* **2011**, *144*, 282–295.
- [116] „Mice sans synaptotagmin“: E. Neher, R. Penner, *Nature* **1994**, *372*, 316–317.
- [117] „Synaptotagmin I functions as a Ca²⁺-regulator of release probability“: R. Fernández-Chacón, et al., *Nature* **2001**, *410*, 41–49.
- [118] „A gain-of-function mutation in Synaptotagmin-1 reveals a critical role of Ca²⁺-dependent SNARE-complex binding in synaptic exocytosis“: Z. P. Pang, et al., *J. Neurosci.* **2006**, *26*, 12556–12565.
- [119] „Intracellular calcium dependence of large dense-core vesicle exocytosis in the absence of synaptotagmin I“: T. Voets, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 11680–11685.
- [120] „Examining synaptotagmin 1 function in dense core vesicle exocytosis under direct control of Ca²⁺“: J. B. Sørensen, R. Fernández-Chacón, T. C. Südhof, E. Neher, *J. Gen. Physiol.* **2003**, *122*, 265–276.
- [121] „Synaptotagmin-1 and -7 are functionally overlapping Ca²⁺ sensors for exocytosis in adrenal chromaffin cells“: J. Schonn, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 3998–4003.
- [122] „Mutations in the second C2 domain of synaptotagmin disrupt synaptic transmission at Drosophila neuromuscular junctions“: J. M. Mackler, N. E. Reist, *J. Comp. Neurol.* **2001**, *436*, 4–16.

- [123] „Synaptotagmin I and IV promote transmitter release independently of Ca^{2+} binding in the C2A domain“: I. M. Robinson, R. Ranjan, T. L. Schwarz, *Nature* **2002**, *418*, 336–340.
- [124] „Differential but convergent functions of Ca^{2+} -binding to Synaptotagmin-1 C2-domains mediate neurotransmitter release“: O.-H. Shin, J. Xu, J. Rizo, T. C. Südhof, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 16469–16474.
- [125] „Synaptotagmin-1, -2, and -9: Ca^{2+} -sensors for fast release that specify distinct presynaptic properties in subsets of neurons“: J. Xu, T. Mashimo, T. C. Südhof, *Neuron* **2006**, *54*, 801–812.
- [126] „Genetic Analysis of Synaptotagmin 2 in Spontaneous and Ca^{2+} -Triggered Neurotransmitter Release“: Z. P. Pang, et al., *EMBO J.* **2007**, *25*, 2039–2050.
- [127] „A Dual Ca^{2+} -Sensor Model for Neuro-transmitter Release in a Central Synapse“: J. Sun, et al., *Nature* **2007**, *450*, 676–682.
- [128] „The role of Rab3A in neurotransmitter release“: M. Geppert, et al., *Nature* **1994**, *369*, 493–497.
- [129] „Direct patch recording from identified presynaptic terminals mediating glutamatergic EPSCs in the rat CNS, in vitro“: I. D. Forsythe, *J. Physiol.* **1994**, *479* (Pt 3), 381–387.
- [130] „Calcium influx and transmitter release in a fast CNS synapse“: J. G. Borst, B. Sakmann, *Nature* **1996**, *383*, 431–434.
- [131] „Calcium sensitivity of glutamate release in a calyx-type terminal: J. H. Bollmann, B. Sakmann, J. G. Borst, *Science* **2000**, *289*, 953–957.
- [132] „Intracellular calcium dependence of transmitter release rates at a fast central synapse“: R. Schneggenburger, E. Neher, *Nature* **2000**, *406*, 889–893.
- [133] „Distinct Neuronal Coding Schemes in Memory Revealed by Selective Erasure of Fast Synchronous Synaptic Transmission“: W. Xu, W. Morishita, P. S. Buckmaster, Z. P. Pang, R. C. Malenka, T. C. Südhof, *Neuron* **2012**, *73*, 990–1001.
- [134] „Synaptotagmin VII as a plasma membrane Ca^{2+} -sensor in exocytosis“: S. Sugita, et al., *Neuron* **2001**, *30*, 459–473.
- [135] „Impaired insulin secretion and glucose intolerance in Synaptotagmin-7 null mutant mice“: N. Gustavsson, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 3992–3997.
- [136] „Synaptotagmin-7 is a principle Ca^{2+} sensor for Ca^{2+} -induced glucagon exocytosis in pancreas“: N. Gustavsson, et al., *J. Physiol.* **2009**, *587*, 1169–1178.
- [137] „Synaptotagmin-1 and -7 are functionally overlapping Ca^{2+} sensors for exocytosis in adrenal chromaffin cells“: J. Schonn, A. Maximov, Y. Lao, T. C. Südhof, J. B. Sørensen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 3998–4003.
- [138] „Distinct roles for two synaptotagmin isoforms in synchronous and asynchronous transmitter release at zebrafish neuromuscular junction“: H. Wen, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 13906–13911.
- [139] „Genetic analysis of Synaptotagmin-7 function in synaptic vesicle exocytosis“: A. Maximov, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 3986–3991.
- [140] „Synaptotagmin-1 and -7 Trigger Synchronous and Asynchronous Phases of Neurotransmitter Release“: T. Bacaj, et al., *Neuron* **2013**, *80*, 947–959.
- [141] „Synaptotagmins form a hierarchy of exocytotic Ca^{2+} -sensors with distinct Ca^{2+} -affinities“: S. Sugita, et al., *EMBO J.* **2002**, *21*, 270–280.
- [142] „Synaphin: a protein associated with the docking/fusion complex in presynaptic terminals“: T. Ishizuka, H. Saisu, S. Odani, T. Abe, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1995**, *213*, 1107–1114.
- [143] „Three-dimensional structure of the complexin/SNARE complex“: X. Chen, et al., *Neuron* **2002**, *33*, 397–409.
- [144] „Complexins regulate the Ca^{2+} -sensitivity of the synaptic neurotransmitter release machinery“: K. Reim, et al., *Cell* **2001**, *104*, 71–81.
- [145] „A Complexin/Synaptotagmin-1 Switch Controls Fast Synaptic Vesicle Exocytosis“: J. Tang, et al., *Cell* **2006**, *126*, 1175–1187.
- [146] „A complexin fusion clamp regulates spontaneous neurotransmitter release and synaptic growth“: S. Huntwork, J. T. Littleton, *Nat. Neurosci.* **2007**, *10*, 1235–1237.
- [147] „Complexin Controls the Force Transfer from SNARE complexes to membranes in Fusion“: A. Maximov, et al., *Science* **2009**, *323*, 516–521.
- [148] „Complexin Clamps Asynchronous Release by Blocking a Secondary Ca^{2+} -Sensor via its Accessory α -Helix“: X. Yang, et al., *Neuron* **2010**, *68*, 907–920.
- [149] „A clamping mechanism involved in SNARE-dependent exocytosis“: C. G. Giraudo, W. S. Eng, T. J. Melia, J. E. Rothman, *Science* **2006**, *313*, 676–680.
- [150] „Distinct domains of complexin I differentially regulate neurotransmitter release“: M. Xue, et al., *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2007**, *14*, 949–958.
- [151] „C-terminal Complexin Sequence is Selectively Required for Clamping and Priming but Not for Ca^{2+} -Triggering of Synaptic Exocytosis“: Y. J. Kaeser-Woo, X. Yang, T. C. Südhof, *J. Neurosci.* **2012**, *32*, 2877–2885.
- [152] „Deconstructing complexin function in activating and clamping Ca^{2+} -triggered exocytosis by comparing knockout and knockdown phenotypes“: X. Yang, P. Cao, T. C. Südhof, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 20777–20782.
- [153] „Complexin Activates Exocytosis of Distinct Secretory Vesicles Controlled by Different Synaptotagmins“: P. Cao, X. Yang, T. C. Südhof, *J. Neurosci.* **2013**, *33*, 1714–1727.
- [154] „Sr²⁺-Binding to the Ca^{2+} -Binding Site of the Synaptotagmin 1 C2B-Domain Triggers Fast Exocytosis Without Stimulating SNARE Interactions“: O.-H. Shin, et al., *Neuron* **2003**, *37*, 99–108.
- [155] „Activity-Dependent IGF-1 Exocytosis is Controlled by the Ca^{2+} -Sensor Synaptotagmin-10“: P. Cao, A. Maximov, T. C. Südhof, *Cell* **2011**, *145*, 300–311.
- [156] „Postsynaptic Complexin Controls AMPA Receptor Exocytosis During LTP“: M. Ahmad, et al., *Neuron* **2012**, *73*, 260–267.
- [157] „Munc-13 is essential for fusion competence of glutamatergic synaptic vesicles“: I. Augustin, C. Rosenmund, T. C. Südhof, N. Brose, *Nature* **1999**, *400*, 457–461.
- [158] „A family of RIM-binding proteins regulated by alternative splicing: Implications for the genesis of synaptic active zones“: Y. Wang, X. Liu, T. Biederer, T. C. Südhof, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 14464–14469; „Genomic Definition of RIM Proteins: Evolutionary Amplification of a Family of Synaptic Regulatory Proteins“: Y. Wang, T. C. Südhof, *Genomics* **2003**, *81*, 126–137.
- [159] „Functional interaction of the active zone proteins Munc13-1 and RIM1 in synaptic vesicle priming“: A. Betz, et al., *Neuron* **2001**, *30*, 183–196.
- [160] „RIM1 α forms a protein scaffold for regulating neurotransmitter release at the active zone“: S. Schoch, et al., *Nature* **2002**, *415*, 321–326.
- [161] „A ras-like protein is required for a post-Golgi event in yeast secretion“: A. Salminen, P. J. Novick, *Cell* **1987**, *49*, 527–538.
- [162] „A complete genetic analysis of neuronal Rab3 function“: O. M. Schlüter, et al., *J. Neurosci.* **2004**, *24*, 6629–6637.
- [163] „Rab3 Superprimes Synaptic Vesicles for Release: Implications for Short Term Synaptic Plasticity“: O. M. Schlüter, T. C. Südhof, C. Rosenmund, *J. Neurosci.* **2006**, *26*, 1239–1246.
- [164] „Rab3B protein is required for long-term depression of hippocampal inhibitory synapses and for normal reversal learning“: T. Tsetsenis, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 14300–14305.
- [165] „Rabphilin-3A, a putative target protein for smg p25A/rab3A p25 small GTP-binding protein related to synaptotagmin“: H. Shirataki, et al., *Mol. Cell Biol.* **1993**, *13*, 2061–2068.

- [166] „Rabphilin knock-out mice reveal rat rabphilin is not required for rab3 function in regulating neurotransmitter release“: O. M. Schlüter, et al., *J. Neurosci.* **1999**, *19*, 5834–5846.
- [167] „Rabphilin Regulates SNARE-Dependent Re-Priming of Synaptic Vesicles for Fusion“: F. Deák, et al., *EMBO J.* **2006**, *25*, 2856–2866.
- [168] „A post-docking role for active zone protein Rim“: S. P. Koshika, et al., *Nat. Neurosci.* **2001**, *4*, 997–1005.
- [169] „Direct interactions between *C. elegans* RAB-3 and Rim provide a mechanism to target vesicles to the presynaptic density“: E. O. Gracheva, G. Hadwiger, M. L. Nonet, J. E. Richmond, *Neurosci. Lett.* **2008**, *444*, 137–142.
- [170] „RIM determines Ca^{2+} -channel density and vesicle docking at the presynaptic active zone“: Y. Han, P. S. Kaeser, T. C. Südhof, R. Schneggenburger, *Neuron* **2011**, *69*, 304–316.
- [171] „Synaptotagmin-1 docks secretory vesicles to Syntaxin-1/SNAP-25 acceptor complexes“: H. de Wit, et al., *Cell* **2009**, *138*, 935–946.
- [172] „Total arrest of spontaneous and evoked synaptic transmission but normal synaptogenesis in the absence of Munc13-mediated vesicle priming“: F. Varoqueaux, et al., *Proc Natl Acad Sci USA* **2002**, *99*, 9037–9042.
- [173] „Munc13 mediates the transition from the closed syntaxin-Munc18 complex to the SNARE complex“: C. Ma, W. Li, Y. Xu, J. Rizo, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2011**, *18*, 542–549.
- [174] „Munc13–1 is a presynaptic phorbol ester receptor that enhances neurotransmitter release“: A. Betz, et al., *Neuron* **1998**, *21*, 123–136.
- [175] „Beta phorbol ester- and diacylglycerol-induced augmentation of transmitter release is mediated by Munc13s and not by PKCs“: J. S. Rhee, et al., *Cell* **2002**, *108*, 121–133.
- [176] „Dynamic control of synaptic vesicle replenishment and short-term plasticity by Ca^{2+} -calmodulin-Munc13–1 signaling“: N. Lipstein, et al., *Neuron* **2013**, *79*, 82–96.
- [177] „RIM Proteins Activate Vesicle Priming by Reversing Auto-Inhibitory Homodimerization of Munc13“: L. Deng, P. S. Kaeser, W. Xu, T. C. Südhof, *Neuron* **2011**, *69*, 317–331.
- [178] „RIM Genes Differentially Contribute to Organizing Presynaptic Release Sites“: P. S. Kaeser, L. Deng, M. Fan, T. C. Südhof, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 11830–11835.
- [179] „RIM-binding protein, a central part of the active zone, is essential for neurotransmitter release“: K. S. Liu, et al., *Science* **2011**, *334*, 1565–1569.
- [180] „RIM promotes calcium channel accumulation at active zones of the Drosophila neuromuscular junction“: E. R. Graf, et al., *J. Neurosci.* **2012**, *32*, 16586–16596.
- [181] „Morphological and biochemical heterogeneity of cholinergic synaptic vesicles“: H. Zimmermann, V. P. Whittaker, *Nature* **1977**, *267*, 633–635.
- [182] „The synaptic vesicle cycle“: T. C. Südhof, *Annu. Rev. Neurosci.* **2004**, *27*, 509–547.
- [183] „Solution structures of the Ca^{2+} -free and Ca^{2+} -bound C2A domain of synaptotagmin I: does Ca^{2+} induce a conformational change?“: X. Shao, I. Fernandez, T. C. Südhof, J. Rizo, *Biochemistry* **1998**, *37*, 16106–16115.
- [184] „Three-dimensional structure of an evolutionarily conserved N-terminal domain of syntaxin 1A“: I. Fernandez, J. Ubach, I. Dulubova, X. Zhang, T. C. Südhof, J. Rizo, *Cell* **1998**, *94*, 841–849.
- [185] „Neurotransmitter release: The last millisecond in the life of a synaptic vesicle“: T. C. Südhof, *Neuron* **2013**, *80*, 675–690; „Membrane Fusion: Grappling with SNARE and SM Proteins“: T. C. Südhof, J. E. Rothman, *Science* **2009**, *323*, 474–477; „A molecular machine for neurotransmitter release: Synaptotagmin and beyond“: T. C. Südhof, *Nat. Med.* **2013**, *19*, 1227–1231.
- [186] „Synaptotagmin-1 and -7 are functionally overlapping Ca^{2+} sensors for exocytosis in adrenal chromaffin cells“: J. Schonn, A. Maximov, Y. Lao, T. C. Südhof, J. B. Sørensen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 3998–4003.
- [187] „Synaptotagmin-2 is Essential for Survival and Contributes to Ca^{2+} -Triggering of Neurotransmitter Release in Central and Neuromuscular Synapses“: Z. P. Pang, et al., *J. Neurosci.* **2007**, *26*, 13493–13504.
- [188] „Short-term presynaptic plasticity“: W. G. Regehr, *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* **2012**, *4*, a005702.
- [189] „Distinct Ca^{2+} dependent properties of the first and second C2-domains of synaptotagmin I“: S. Sugita, Y. Hata, T. C. Südhof, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 1262–1265.