

1 Einleitung

1.1 Intrazellulärer vesikulärer Transport in eukaryotischen Zellen

Alle eukaryotischen Zellen enthalten zahlreiche membranumschlossene Zellorganellen unterschiedlicher Struktur und Funktion. Diese abgegrenzten Reaktionsräume bilden die verschiedenen Stationen der Proteinsynthese, -modifikation, -sortierung und -sekretion entlang des sekretorischen Transportweges, den Proteine von ihrer Biosynthese bis zum Erreichen ihres Zielortes beschreiten (Abb. 1) (Lodish *et al.*, 1999).

Die einzelnen Komponenten dieses, von der Hefe bis zu Säugerzellen, konservierten Endomembransystems befinden sich miteinander in einem dynamischen Gleichgewicht, das durch gerichtete Transportprozesse aufrecht erhalten wird. Zwischen den einzelnen Kompartimenten werden Proteine und Lipide mittels kleiner membranumschlossener Transportvesikel ausgetauscht, deren Durchmesser zwischen 50 und 100 nm beträgt (Palade, 1975). Diese zielgerichteten intrazellulären Transportprozesse sind für die Zelle wichtig, um einerseits die Struktur und jeweilige Funktion des einzelnen Zellkompartiments aufrecht zu erhalten. So gelangen neusynthetisierte Proteine in ihre jeweiligen Zielkompartimente, wo sie ihre Funktion ausüben können, während andere Proteine stetig zwischen zwei Kompartimenten zirkulieren. Andererseits kann die Zelle durch Ausschleusung (Exozytose) und Aufnahme von Stoffen (Endozytose) aus dem extrazellulären Raum mit ihrer Umgebung wechselwirken (Lodish *et al.*, 1999).

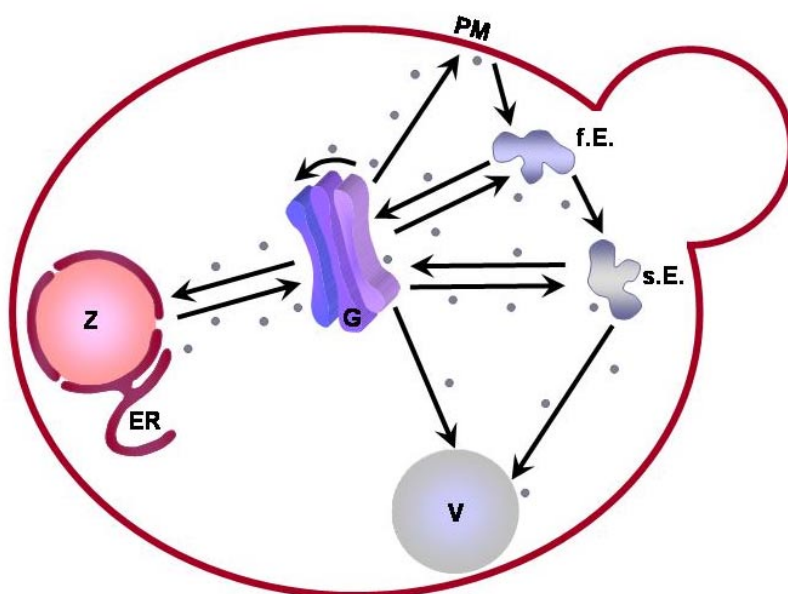


Abb. 1: Schematische Darstellung der verschiedenen Routen des sekretorischen Weges in einer Hefezelle. Die einzelnen vesikulären Transportprozesse sind in allen eukaryotischen Zellen konserviert. Bidirektionale Transportprozesse zwischen zwei Kompartimenten sind durch zwei getrennte Pfeile gekennzeichnet. Z: Zellkern; ER: Endoplasmatisches Retikulum; G: Golgi-Apparat; f.E.: frühes Endosom; s.E.: spätes Endosom; V: Vakuole; PM: Plasmamembran

Trotz der verschiedenen Transportrouten lassen sich intrazelluläre Transportprozesse allgemein in drei Teilschritte unterteilen (Abb.2) (Bonifacino und Glick, 2004): A) Die Bildung eines bläschen- oder röhrenförmigen Transportcarriers durch Abknospung von der Membran des Donorkompartiments, das sog. „Budding“, und der nachfolgende Transport zum jeweiligen Empfängerkompartiment. B) Die Anheftung des Carriers an die Membran des Zielkompartiments, das sog. „Tethering/Docking“. Danach kommt durch SNARE-SNARE Interaktionen zur Ausbildung sog. *trans*-SNARE-Komplexe und zu einer weiteren Annäherung der beiden Membranen. C) Die anschließende Fusion des gebundenen Carriers mit der Empfängermembran.

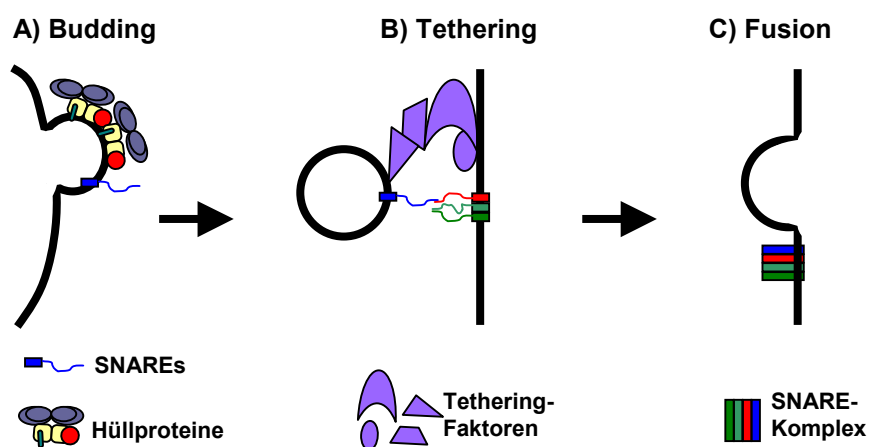


Abb. 2: Vereinfachte schematische Darstellung der Teilschritte, in die sich Transportprozesse allgemein unterteilen lassen. A) Abschnürung eines intrazellulären Transportvesikels von der Donormembran („Budding“). B) Das Vesikel erreicht die Zielmembran und wird durch verschiedene Faktoren an diese gebunden („Tethering“). Im Anschluß an das anfängliche „Tethering“ kommt es zur Ausbildung von SNARE-SNARE Interaktionen, durch die es zur weiteren Annäherung der beiden Membranen kommt. C) Als Folge der SNARE-SNARE Interaktionen kommt es zur Fusion der Membranen.

Jedem dieser Teilschritte liegen molekularen Mechanismen zugrunde, die unter Beteiligung verschiedener konservierter Faktoren ablaufen. Zu diesen Faktoren, die für jedes Organell spezifisch sind, gehören die verschiedenen Hüllproteine (Bonifacino und Glick, 2004), sowie Mitglieder der konservierten Proteinfamilien der kleinen Rab/Ypt-GTPasen (Pfeffer, 2001; Segev, 2001; Zerial und McBride, 2001), der SM-Proteine (Gallwitz und Jahn, 2003; Toonen und Verhage, 2003) und der SNARE-Proteine (Ferro-Novick und Jahn, 1994; Hong, 2005; Jahn, 2004).

Der Prozeß des Buddings beinhaltet die Rekrutierung spezifischer Hüllproteine. Die Aktivierung einer kleinen ARF-GTPase leitet diesen Schritt ein (Nie *et al.*, 2003), der

schließlich zum Abschnüren des Vesikels führt. Am „Tethering“/„Docking“ sind für das jeweilige Kompartiment spezifische Ypt/Rab-GTPasen und „Tethering“-Faktoren beteiligt (Lupashin und Sztul, 2005; Waters und Pfeffer, 1999), die eine molekulare Verbindung zwischen dem Transportvesikel und der Membran des Zielkompartiments herstellen. Im anschließenden Fusionsereignis spielen Interaktionen von SNARE-Proteinen eine zentrale Rolle (Jahn *et al.*, 2003).

1.2 Transport zwischen Endoplasmatischem Retikulum und Golgi Apparat

Innerhalb des sekretorischen Transportweges stellt der Transportschritt vom Endoplasmatischen Retikulum (ER) zum Golgi-Apparat den zentralen Abschnitt dar, den alle neusynthetisierten Proteine auf dem Weg zu ihrem Zielorganell passieren (Lodish *et al.*, 1999).

Das ER bildet dabei die Pforte zu diesem Weg. Hier werden die neusynthetisierten Proteine gefaltet und können eine erste Modifizierung erhalten. In den Zisternen des Golgi-Apparates, der nächsten Station des sekretorischen Weges, werden die Proteine weiter modifiziert. Dies geschieht durch Anhängen von Kohlenhydrat-Seitenketten und / oder proteolytischer Spaltung. In den späten Zisternen werden die Proteine, je nach ihrem Bestimmungsort, in verschiedene Transportvesikel sortiert.

Zwischen diesen beiden Kompartimenten finden bidirektionale Transportereignisse statt, die in unterschiedlich markierten Vesikeln erfolgen (Überblick in Lee *et al.*, 2004). Der vorwärtsgerichtete, anterograde Transport vom ER zum Golgi betrifft alle neusynthetisierten Proteine auf ihrem Weg zu ihrem jeweiligen Zielkompartiment. Die Vesikel dieser Transportrichtung sind durch eine aus COPII-Proteinen bestehende Hülle gekennzeichnet. Der retrograde Transport vom Golgi zum ER dient vorwiegend dazu, Proteine, deren Wirkungsort das ER ist, hierhin zurück zu bringen. Diese Transportvesikel zeichnen sich durch eine andere Proteinhülle aus, die aus dem COPI-Komplex aufgebaut ist.

1.2.1 Anterograder Transport zwischen dem Endoplasmatischem Retikulum und dem Golgi-Apparat

Das Endoplasmatische Retikulum ist ein ausgedehntes Membrannetzwerk, welches das Zytoplasma durchzieht (Lodish *et al.*, 1999). Es umgibt den Zellkern, mit dem es verbunden ist (Kern-ER), und befindet sich auch unter der Plasmamembran (kortikales ER). Man unterscheidet zwischen glattem ER, welches meist in den äußeren Bereichen des Zytoplasmas

vorliegt und überwiegend dem intrazellulären Transport und der Speicherung bestimmter Stoffe dient, und rauhem ER, an dem Ribosomen sitzen und das häufig in der Nähe des Zellkerns vorliegt. Ribosomen docken an bestimmte Stellen auf der ER-Membran an und entladen ihre neusynthetisierten Protein-Polypeptidketten in das Lumen dieses Kompartiments.

Das ER dient hauptsächlich dazu, einen Reaktionsraum zu schaffen, der die Faltung neusynthetisierter Polypeptidketten mittels Chaperonproteinen erlaubt. Des Weiteren erfolgen auch erste post-translationale Modifikationen von Proteinen, wie die Addition von N-verknüpften Glykanketten und die Hydroxylierung von Prolinresten. Darüber hinaus findet hier eine erste Qualitätskontrolle statt, die gewährleistet, dass nur korrekt gefaltete Proteine das ER in COP(coat protein complex)II-Vesikeln verlassen (Mezzacasa und Helenius, 2002).

Der Transport von sekretorischen Frachtmolekülen aus dem ER erfolgt in COPII-Vesikeln, die sich von der Membran des ER abschnüren. In *Saccharomyces cerevisiae* werden COPII-Vesikel entlang der gesamten ER-Membran gebildet (Rossanese *et al.*, 1999). Hingegen findet in *Pichia pastoris*, einer anderen Hefe, die sich wie *S. cerevisiae* durch Sprossenbildung teilt, der gerichtete Export von Ladung, wie in Säugerzellen, nur an definierten, ribosomenfreien Bereichen entlang der ER-Membran statt. Diese besonderen Bereiche der ER-Membran werden als transitional ER sites (t-ER), oder auch ER export sites (ERES) bezeichnet (Orci *et al.*, 1991; Palade, 1975; Rossanese *et al.*, 1999). Die Verteilung der tER-sites wirkt sich in Hefen möglicherweise auch auf die Biogenese und Struktur des Golgi Apparates aus. In *S. cerevisiae* liegt der Golgi als einzelne Cisternen verteilt vor (Preuss *et al.*, 1992), während in *Pichia pastoris* die verschiedenen Golgi-Cisternen eine gestapelte Anordnung aufweisen (Gould *et al.*, 1992).

Beim klassischen Modell für den Proteinexport aus dem ER erfolgt die Bildung der Vesikel an den durch COPII-Proteine markierten, ERES/tER-Bereichen auf der ER Membran (Überblick in Watson und Stephens, 2005). Die schrittweise Polymerisation der COPII-Proteinhülle führt zur Krümmung der Membran und schließlich zur Abschnürung und Freisetzung der Transportvesikel. Da die gebildeten Vesikel Durchmesser zwischen 50 – 100 nm besitzen, beschreibt dieses Modell nur den Transport kleiner Frachtmoleküle. Der Transport großer Frachtmoleküle wird durch ein anderes Modell erklärt, bei dem die Transportstrukturen neben den COPII-markierten ERES/tER-sites entstehen (Mironov *et al.*, 2003). Somit sind zwar auch hier die ERES/tER-sites am Prozess der Vesikelbildung und Abknospung beteiligt, jedoch fungieren sie hier als Markierungen und bilden selbst nicht die Bereiche an denen die Transportcarrier knospen.

Die COPII-Proteinhülle setzt sich aus den Proteinen Sec23p, Sec24p, Sec13p und Sec31p zusammen (Hicke und Schekman, 1989; Hicke *et al.*, 1992; Salama *et al.*, 1997; Salama *et al.*, 1993). Sie erfüllt, neben der Markierung von ER-exit sites, drei wesentliche Funktionen:

- 1) Die Selektion und Rekrutierung von membranverankerter und löslicher sekretorischer Ladung an die Vesikel (Aridor *et al.*, 1999; Aridor *et al.*, 1998; Kuehn *et al.*, 1998; Miller *et al.*, 2002; Otte und Barlowe, 2004).
- 2) Die Einlagerung von Maschinerieproteinen, die für das „Tethering“ und die Fusion benötigt werden. Hierzu gehören die Ypt-/Rab-Proteine (Allan *et al.*, 2000) und die SNARE-Proteine (Matsuoka *et al.*, 1998; Miller *et al.*, 2003; Mossessova *et al.*, 2003; Rowe *et al.*, 1998; Springer und Schekman, 1998).
- 3) Die Krümmung der ER-Membran und schließlich die Abschnürung des Vesikels (Antonny *et al.*, 2003; Bannykh *et al.*, 1996; Barlowe *et al.*, 1994; Bonifacino und Glick, 2004; Matsuoka *et al.*, 1998).

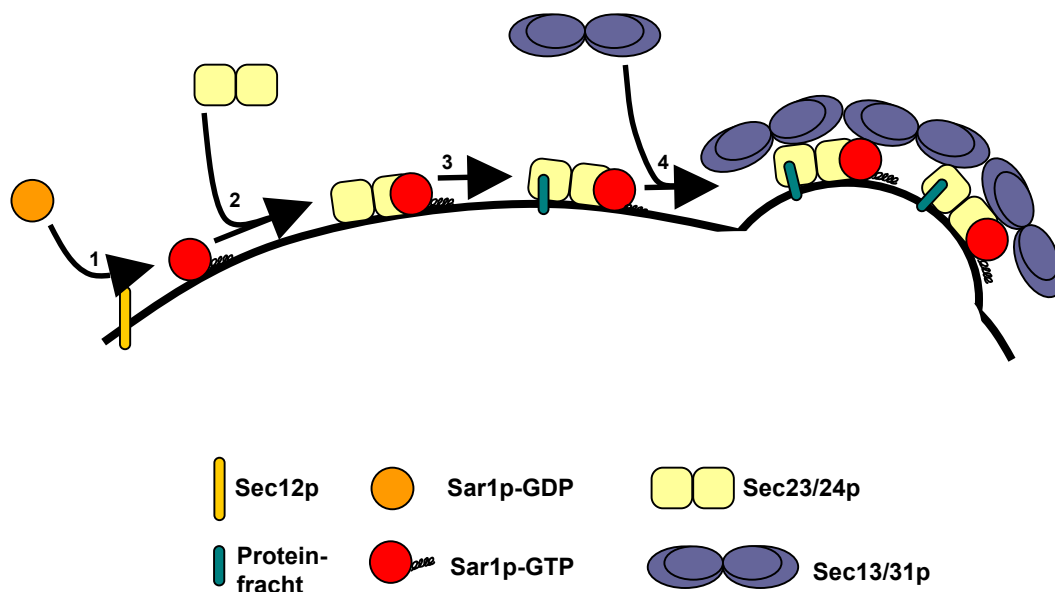


Abb. 3: Bildung der COPII-Proteinhülle. 1) Das GEF (guanine nucleotide exchange factor) Sec12p rekrutiert die GTPase Sar1p an die Donormembran, indem es den Austausch von gebundenem GDP durch GTP katalysiert. Sar1p-GTP ist durch eine amphiphatische α -Helix mit der Donormembran assoziiert. 2) Das aktivierte Sar1p-GTP wiederum rekrutiert das Sec23/24p-Heterodimer. 3) Es kommt zur Rekrutierung und Konzentrierung von Proteinladung. 4) Das Heterodimer Sec13/31p wird rekrutiert. Dadurch kommt es zur Deformation der Membran und schließlich zur Abschnürung des Vesikels.

Der COPII-Komplex besteht aus zwei verschiedenen heterodimeren Untereinheiten, gebildet aus den Proteinen Sec23p/Sec24p sowie Sec13p und Sec31p, die nacheinander zum Gesamtkomplex zusammengefügt werden. Der Aufbau der Vesikelhülle verläuft in zwei Stufen: In der ersten Stufe wird die kleine GTPase Sar1p aktiviert, indem sie vom inaktiven und GDP-gebundenen in den GTP-gebundenen, aktiven, Zustand übergeführt wird (Kuge *et al.*, 1994; Nakano und Muramatsu, 1989). Diese Reaktion wird von Sec12p, einem ER-ständigen GEF (GDP exchange factor)-Protein, katalysiert (Barlowe und Schekman, 1993; Nakano *et al.*, 1988). Die zweite Stufe beinhaltet den Aufbau der Proteinhülle. Zunächst rekrutiert das aktivierte Sar1p-GTP die heterodimere Sec23p/Sec24p-Untereinheit des COPII-Komplexes (Barlowe *et al.*, 1994). Dieser aus Sec23/24-Sar1p bestehende "prebudding" Komplex selektiert anschließend Frachtmoleküle, Rezeptormoleküle für lösliche Frachtmoleküle, sowie SNAREs (Aridor *et al.*, 1998; Kuehn *et al.*, 1998). Die Bindung und Polymerisation von Sec13p/Sec31p-Heterodimeren an das Sec23/24p-Gerüst induziert die Krümmung der ER-Membran und führt schließlich zur Abschnürung des Transportvesikels (Lee *et al.*, 2005; Matsuoka *et al.*, 1998). Nach der Freisetzung des Vesikels von der ER-Membran fällt die COPII-Proteinhülle von diesem wieder ab. Die kombinierte Wirkung von Sec23p/24p und Sec13p/31p erhöht die GTPase Aktivität von Sar1p auf den Vesikeln (Antonny *et al.*, 2001; Yoshihisa *et al.*, 1993). In Abwesenheit des GEF Sec12p (Barlowe *et al.*, 1994) fällt Sar1p nach der Hydrolyse von GTP von der Vesikelhülle ab und destabilisiert den übrigen COPII-Komplex weiter, so dass dieser schließlich ebenfalls auseinander fällt (Sato und Nakano, 2005).

Damit vor der Abschnürung des Vesikels genügend sekretorische Ladung an die Exportbereiche rekrutiert und dort aufkonzentriert werden kann, müssen die Hüllproteine ausreichend lange die Vesikelmembran umgeben. Die Bildung der COPII-Hülle, sowie ihr Auseinanderfallen, müssen daher hochgradig regulierte Prozesse sein. *In vitro* ist der aus Sar1p, Sec23p/24p und Sec13p/31p bestehende Komplex instabil. Aufgrund der hohen Hydrolyserate, die Sar1p nach Bindung an Sec23p zeigt, fällt der Komplex sofort wieder auseinander (Antonny *et al.*, 2001). Jedoch läßt sich der Komplex stabilisieren, in dem man Sec12p diesem *in vitro* System hinzufügt. Das GEF Sec12p kompensiert die erhöhte GTPase Aktivität von Sar1p. Geeignete Ladungsmoleküle, wie z.B. SNAREs führen ebenfalls zu einer stabileren Assoziation von Sec23p/24p mit der Vesikelmembran (Sato und Nakano, 2005).

Vesikuläre Frachtproteine enthalten Exportsignale unterschiedlicher Art, die eine effiziente Selektion in COPII-Vesikel ermöglichen (Bonifacino und Glick, 2004; Miller *et al.*, 2003; Mossessova *et al.*, 2003; Nufer *et al.*, 2003). Transmembranproteine werden durch direkte

Bindung an die COPII-Komponenten Sec23p oder Sec24p selektiert und in COPII-Vesikel aufkonzentriert. In Sec23p und Sec24p wurden verschiedene Bindungstaschen identifiziert, die Signalsequenzen von Frachtmolekülen und von SNAREs erkennen und binden (Miller *et al.*, 2003; Mossessova *et al.*, 2003). Sec24p enthält drei Bindungsstellen, die unterschiedliche Sequenzmotive in verschiedenen ER-Golgi SNAREs erkennen und diese konformationsspezifisch binden. Lösliche Frachtproteine werden über Rezeptoren selektiert und in COPII-Vesikel angereichert (Belden und Barlowe, 2001; Otte und Barlowe, 2004).

Die Rekrutierung von für die jeweilige Donormembran spezifischen Hüllproteinen, zusammen mit signal-spezifischen Interaktionen zwischen Frachtproteinen und der Proteinhülle des Vesikels, erhöht die Spezifität vesikulärer Transportprozesse.

1.2.2 Retrograder ER-Golgi Transport

Der retrograde Transport von der *cis*-Seite des Golgi-Komplexes zum ER erfolgt in COPI-umhüllten Vesikeln (Gaynor *et al.*, 1998). Er dient vorwiegend dazu, ER-residente Proteine, sowie misgefaltete Proteine, die den Golgi erreicht haben, wieder zurück zum ER zu transportieren und somit die Funktionalität dieses Kompartiment zu gewährleisten bzw. fehlgefaltete Proteine der Degradation zu zuführen. Auf diesem Weg wird auch die, für die Bildung und Fusion von anterograden Transportvesikeln, benötigte Proteinmaschinerie recycelt.

Die COPI-Proteinhülle, auch coatomer genannt, ist ein multimerer Proteinkomplex, bestehend aus dem COPI-Komplex und der GTPase ARF bzw. Arf1/2p in der Hefe (Serafini *et al.*, 1991; Stearns *et al.*, 1990). Der COPI-Komplex selbst setzt sich aus den sieben COP-Proteinen (**coatomer protein**) α -COP, β -COP, β' -COP, δ -COP, ϵ -COP, γ -COP, und ζ -COP zusammen (Cosson *et al.*, 1996; Duden *et al.*, 1994; Duden *et al.*, 1998; Hosobuchi *et al.*, 1992; Letourneur *et al.*, 1994; Stenbeck *et al.*, 1992).

COPI-Vesikelhülle	Säuger	Hefe	Molekulargewicht (kDa)
Coatomer-Proteine	α -COP	Ret1p/Sec33p	140
	β -COP	Sec26p	107
	β' -COP	Sec27p	102
	δ -COP	Ret2p	57
	ϵ -COP	Sec28p	97
	γ -COP	Sec21p	35
	ζ -COP	Ret3p	20
GTPase	ARF	Arf1/2p	20

Tabelle 1: Auflistung der Bestandteile der coatomer/COPI-Proteinhülle in Säuger- und Hefezellen. Das angegebene Molekulargewicht in kDa wurde anhand der Aminosäurezusammensetzung berechnet.

Der Bildung von COPI-Vesikeln liegt im Prinzip ein analoges Schema zugrunde, wie der COPII-Vesikelbildung. Durch die Rekrutierung der GTPase Arf1p (ADP ribosylation factor) an die Golgi-Membran wird die Vesikelbildung eingeleitet (Donaldson *et al.*, 1992; Palmer *et al.*, 1993). Wie Sar1p, wird auch Arf1p in der GDP-gebundenen Form an die Membran rekrutiert und muß erst durch Interaktion mit einem GEF-Protein aktiviert werden, d. h. gebundenes GDP gegen GTP ausgetauscht werden. Durch die Bindung von GTP vollzieht ARF1 eine Konformationsänderung bei der ein N-terminaler Myristoylanker herausklappt und eine Verankerung in der Golgi-Membran ermöglicht (Kahn *et al.*, 1992). Die wahrscheinlich am *cis*-Golgi lokalisierten Proteine Gea1p und Gea2p wirken als GEFs für Arf1/2p. Gea1/2p sind lösliche Proteine und gehören zur Familie der Sec7p-Proteine (Peyroche *et al.*, 1996). Neben ihrer Aktivität als Austauschfaktoren wird ARF-GEFs allgemein eine zentrale Rolle zugeschrieben, bei der Determination der Membranlokalisierung der Arf-GTPase und damit der Membranbereiche an denen COPI-Vesikel gebildet werden (Donaldson *et al.*, 2005). Da sie jedoch keinen Membrananker enthalten war bis vor kurzem unklar, wie sie selbst an die Membran rekrutiert werden. In der Hefe wurde nun das Protein Gmh1p als erster Interaktionspartner von Gea1/2p mit einer Transmembrandomäne identifiziert (Chantalat *et al.*, 2003). Gmh1p ist ein evolutionär konserviertes Protein, das im frühen Golgi lokalisiert ist und an eine konservierte Domäne in Gea1/2p bindet.

Nach der Rekrutierung und Aktivierung von Arf1/2p an die Golgi-Membran folgt die Bindung der Coatomer-Hülle. Der COPI-Komplex assembliert im Zytosol und wird als

Ganzes an die Membran gebunden (Hara-Kuge *et al.*, 1994; Lowe und Kreis, 1995; Palmer *et al.*, 1993). Das Auseinanderfallen der COPI-Vesikelhülle nach der Freisetzung der Vesikel von der Golgi-Membran wird durch die GTP-Hydrolyse des GTP-gebundenen ARF1 eingeleitet. Da GTP-ARF1, im Gegensatz zu GTP-Sar1p, nur eine geringe Hydrolyseaktivität zeigt, erfordert die Umwandlung von aktivem ARF-GTP in inaktives ARF-GDP die Beteiligung eines GAP (**G**TPase **a**ctivating **p**rotein)-Proteins (Randazzo und Kahn, 1994). Im Transportbereich zwischen ER und Golgi wirken die beiden Proteine Gcs1p und Glo3p, deren Funktion teilweise überlappt, als GAPs für ARF-GTP (Dogic *et al.*, 1999; Poon *et al.*, 1999). Neben den coatomer-Proteinen am *cis*-Golgi rekrutiert ARF1 vesikuläre Hüllproteine auch an *trans*-Golgi-Membranen (Übersicht in Donaldson *et al.*, 2005).

Die Rückführung von Proteinen aus dem frühen Golgi-Apparat in das ER erfolgt in einer spezifischen Weise und hängt von bestimmten Sortierungssignalen ab, die in den zirkulierenden Proteinen enthalten sind (Pelham, 1996; Teasdale und Jackson, 1996). Bisher sind mindestens drei verschiedene Typen von Signalsequenzen bekannt, die auf diese Weise eine Rückführung des Proteins ins ER bedingen.

Bei einer dieser Signalsequenzen handelt es sich um ein Dilysin-Motiv der Aminosäuresequenz „KKXX“ oder „KXKXX“ das am C-terminalen zytoplasmatischen Ende von TypI-Transmembranproteinen enthalten ist. Mit diesem Dilysin-Signal interagieren Coatomer Proteine *in vitro* (Cosson und Letourneur, 1994). Am Beispiel des Hefeproteins Emp47p konnte erstmals eine direkte Beteiligung von Coatomer am retrograden Golgi-ER Transport gezeigt werden (Lewis und Pelham, 1996). Emp47p ist ein Transmembranprotein, das eine KKXX-Sequenz enthält. Unter Gleichgewichtsbedingungen ist es überwiegend am *cis*-Golgi lokalisiert, zirkuliert jedoch stetig zwischen ER und Golgi.

Das zweite Erkennungssignal ist die HDEL-Sequenz, die C-terminal in vielen löslichen ER-residenten Hefeproteinen enthalten ist (Pelham *et al.*, 1988). In der Hefe findet sich dieses Signal auch am C-Terminus der Transmembranproteine Sed4p und Sec20p (Hardwick *et al.*, 1992; Sweet und Pelham, 1992). Lösliche ER-Proteine in Säugerzellen enthalten KDEL als entsprechende Erkennungssequenz (Munro und Pelham, 1987). Die direkte Rückführung von Proteinen mit einer H/KDEL-Erkennungssequenz ins ER erfolgt durch einen aktiven, rezeptor-abhängigen Mechanismus (Lewis und Pelham, 1990; Semenza *et al.*, 1990). Erd2p und sein Homolog in Säugerzellen binden spezifisch die H/KDEL-Sequenz am *cis*-Golgi.

Auch Sec12p, das GEF im anterograden ER-Golgi-Transportschritt und ein TypII-Transmembranprotein, wird durch Bindung an einen Rezeptor zum ER zurücktransportiert. Als Rezeptor wurde das Golgi-lokalisierte Protein Rer1p identifiziert (Nishikawa und

Nakano, 1993), das mit der Transmembrandomäne von Sec12p interagiert und so dessen Rückführung bestimmt (Boehm *et al.*, 1997; Boehm *et al.*, 1994; Sato *et al.*, 1996).

1.3 Intra-Golgi Transport

Die zweite Station entlang des sekretorischen Weges ist der Golgi-Komplex. Er bildet den zentralen Knotenpunkt des intrazellulären Transportweges, an dem Transportträger aus verschiedenen Richtungen ankommen und von dem wiederum Carrierstrukturen in unterschiedliche Richtungen abgehen (Lodish *et al.*, 1999). Er besteht aus einer Reihe membranumschlossener Cisternen, in denen Membranproteine sowie sekretorische Proteine posttranslational modifiziert werden. Verschiedene der enthaltenen modifizierenden Enzyme, wie z. B. Glykosyltransferasen, lokalisieren spezifisch in Cisternen des *cis*-, mittleren- oder *trans*-Golgi-Apparates. Proteinfracht aus dem ER kommt an der *cis*-Seite an und passiert den Golgi-Apparat in Richtung der *trans*-Seite. Das ER-ferne *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) fungiert als Sortierstation für Proteine, die, entsprechend ihres Transportziels, in Vesikel mit Zielrichtung Plasmamembran, Endosom oder aber Vakuole aufkonzentriert werden.

Das Transportmodell von Palade (1975) basiert darauf, dass der gesamte biosynthetische Verkehr in der Zelle durch Vesikel erfolgt, die von einem stabilen Donorkompartiment abknospen und mit dem jeweiligen Akzeptorkompartiment fusionieren. Durch ein ausgewogenes Verhältnis von anterograd- und retrograd-gerichteten Vesikeln wird die Stabilität der einzelnen Kompartimente erhalten. Ein umstrittener Punkt im Hinblick auf den Golgi-Apparat ist dabei, ob die einzelnen Cisternen des Golgi-Komplexes verschiedene stabile Einzelkompartimente darstellen, oder ob sie untereinander Verbindungen ausbilden können, auch wenn diese transientser Natur sind. Entsprechend dem vesikulären Modell, dem die Annahme zugrunde liegt, dass die verschiedenen Kompartimente des sekretorischen Weges stabile Einheiten bilden, knospen kleine COPI-Vesikel an den Rändern einer Golgi-Cisterne ab und führen den vorwärtsgerichteten Transport zur nächsten Cisterne aus (Orci *et al.*, 1986). Daher sollten in diesen ca. 60 nm großen Vesikeln bestimmte Frachtmoleküle angereichert werden. Aufgrund der geringen Größe der Transportvesikel kann dieses Modell jedoch nicht den Transport großer Frachtmoleküle erklären. Kürzlich wurde in Säugerzellen gezeigt, dass bestimmte Frachtmoleküle, wie das große Protein Prokollagen I und das kleine VSVG (vesicular stomatitis virus G protein)-Protein, unter Transportbedingungen, aber auch unter Gleichgewichtsbedingungen, aus COPI-Vesikeln sogar ausgeschlossen sind, (Mironov *et al.*, 2001; Trucco *et al.*, 2004).

Parallel zu diesem vesikulären Modell gibt es ein weiteres Konzept für den *intra*-Golgi Transport. Entsprechend dem Modell der Cisternen-Reifung durchwandern die einzelnen Cisternen den Golgi-Stapel von der *cis*- zur *trans*-Seite. In den Cisternen enthaltene Frachtmoleküle verbleiben dabei im Lumen der jeweiligen Cisterne. Zentraler Bestandteil dieses Modells ist, dass mit der Progression der Proteinfracht durch den Golgi-Komplex ein, in entgegen gesetzter Richtung erfolgender, Rückfluß von Golgi-Enzymen durch COPI-Vesikel verbunden ist (Glick *et al.*, 1997; Glick und Malhotra, 1998; Weiss und Nilsson, 2000). Jedoch enthält auch dieses Modell einige Kontroversen. *In vivo* wurde in Säugerzellen bisher nur ein Golgi-Enzym gefunden, das in diesen Vesikeln angereichert ist (Martinez-Menarguez *et al.*, 2001), während andererseits gezeigt wurde, dass *in vivo* mehrere Golgi-Enzyme aus diesen Vesikeln sogar ausgeschlossen werden (Kweon *et al.*, 2004). Auch sollte diesem Modell zufolge das Recycling der verschiedenen Golgi-Enzyme von allen Cisternen ausgehen, also alle Cisternen COPI-ummantelte Knospen tragen. Jedoch werden in Säugerzellen vom letzten *trans*-Kompartiment keine COPI-Knospen erhalten (Ladinsky *et al.*, 1999; Ladinsky *et al.*, 2002). *In vitro* ist die Bildung von Vesikeln, in denen Golgi-Enzyme und SNAREs angereichert sind, COPI abhängig (Lanoix *et al.*, 2001), jedoch wurde *in vitro* auch bei Verwendung von ARF- und COPI-freiem Zytosol keine verlangsamte *intra*-Golgi Transportrate gemessen (Pullikuth und Weidman, 2002).

Jüngst wurde ein weiteres Modell für den *intra*-Golgi Transport entwickelt, das aus einer Kombination von vesikulärem Transport und Cisternen-Reifung hervorgeht. Das sog. Carrier-Reifung-Progressions-Modell (Mironov *et al.*, 2005) basiert darauf, dass ein vom ER stammender, mit Proteinfracht beladener Transportcarrier die Fusion von COPI-Vesikeln mit der Membran der Golgi-Cisternen induziert, wenn er am *cis*-Golgi Netzwerk ankommt. Dadurch kommt es zu einer Reduzierung der vorhandenen Anzahl an COPI-Vesikeln und gleichzeitig zu einer Umverteilung der Membranen zwischen den einzelnen Cisternen. Anschließend fusioniert der Transportcarrier mit einer der mittleren Cisternen und schließlich mit der *trans*-Cisterne. Dieser letzte Fusionsschritt stimuliert die Bildung von post-Golgi Vesikeln. Bei diesem Modell ist unklar, wie die sog. Ladungsdomänen sich von einer Cisterne wieder ablösen, oder ob sie sich überhaupt ablösen.

1.4 „Tethering“/„Docking“ und Fusion von Vesikeln

Nach der Freisetzung des Transportcarriers vom Donorkompartiment und dem Transport zum Akzeptorkompartiment folgt in allen Transportprozessen das „Vesikeltargeting“, d. h. die gezielte Erkennung und Anheftung des Vesikels an die Akzeptormembran, an die sich dann die Fusion des Vesikels mit der Ziellmembran anschließt (Bonifacino und Glick, 2004). Um das intrazelluläre Fließgleichgewicht entlang der Transportrouten aufrecht zu erhalten und gleichzeitig ungeeignete Verschmelzungen von Kompartimenten zu verhindern, muß es sich bei „Targeting“ und Fusion in beiden Fällen um exakt regulierte Prozesse handeln.

Das „Tethering“ stellt einen frühen Schritt innerhalb des „Vesikeltargetings“ dar, der dem Prozeß Spezifität verleiht (Whyte und Munro, 2002). Es bezeichnet ein erstes physikalisches Anheften des Transportvesikels an die Ziellmembran bevor es zur Ausbildung stabilerer Interaktionen zwischen Molekülen auf dem Vesikel und der Ziellmembran, dem „Docking“, und dem Beginn des Fusionsereignisses kommt (Cao *et al.*, 1998; Lowe *et al.*, 1998; Ungermann *et al.*, 1998b; Waters und Pfeffer, 1999). Da „Tethering“ und „Docking“ keine klar von einander abgrenzbaren Prozesse darstellen, sondern fließend in einander übergehen, werden beide Bezeichnungen oft synonym verwendet.

Sog. „Tethering-Faktoren“ verbinden Vesikel und Akzeptormembran miteinander und beeinflussen daher die Spezifität des „Targetings“ (Lupashin und Sztul, 2005). Diese Faktoren umfassen eine heterogene Gruppe zytosolischer Proteine, die selbst erst an die Membranen rekrutiert werden müssen. Daher können sie die hohe Spezifität von Fusionsreaktion nicht allein bestimmen.

Alle bisher beschriebenen „Tethering“-Ereignisse sind eng mit der Funktion kleiner Ypt/Rab-GTPasen verbunden (Waters und Hughson, 2000). Ypt/Rab-Proteine pendeln zwischen einem cytosolischen inaktiven Zustand und einem membrangebunden aktiven Zustand. Meist ist ein aktives Rab-Protein an der koordinierten Rekrutierung von Effektorproteinen beteiligt. Haftet das Vesikel an der Ziellmembran kommt es zu weiteren Interaktionen zwischen beiden und zur Einleitung der Fusion, an der lösliche SM-Proteine als mögliche Regulatoren, und SNARE-Proteine als zentrale Komponenten beteiligt sind. Ypt/Rab-Proteine befinden sich während und nach der Fusion in ihrem inaktiven, zytosolischen Zustand und stehen so für neue „Tethering“-Ereignisse zur Verfügung.

SNARE-Proteine befinden sich auf beiden Membranen und lagern sich zu Beginn der Fusionsreaktion zu einem sog. *trans*-SNARE-Komplex zusammen, der beide Membranen eng miteinander verbindet. Bei der anschließenden Membranfusion lagert sich dieser SNARE-

Komplex in die *cis*-Form um, so dass die einzelnen Komponenten nun in derselben Membran verankert sind. Nach der Fusion wird der *cis*-SNARE-Komplex durch die ATPase NSF/Sec18p und ihrem Cofaktor α -SNAP/Sec17p wieder auseinander gebaut und die einzelnen SNAREs können neue Fusionsreaktionen katalysieren.

1.5 Proteine der intrazellulären Fusionsmaschinerien

1.5.1 SNAREs

Eine zentrale Rolle bei intrazellulären Membranfusionen in allen Kompartimenten, mit Ausnahme der Mitochondrien und Peroxisomen, spielt die hoch konservierte Familie der SNARE (soluble NSF attachment protein receptor)-Proteine, deren Name sich von ihrer Funktion als Rezeptoren für lösliche SNAP-Proteine ableitet (Ferro-Novick und Jahn, 1994; Söllner *et al.*, 1993b). SNARE-Proteine sind niedermolekulare Membranproteine, die C-terminal meist eine Transmembrandomäne besitzen. Charakteristisches Merkmal aller Mitglieder dieser Proteinfamilie ist das SNARE-Motiv, eine evolutionär konservierte, 60 – 70 Aminosäurereste umfassende, Domäne in der Nähe des Membranankers (Weimbs *et al.*, 1997). Jeweils vier SNARE-Domänen lagern sich zu einem SNARE-Komplex zusammen, dessen Bildung die Triebkraft des Fusionsprozesses ist (Fasshauer *et al.*, 1998a; Fasshauer *et al.*, 1997; Hanson *et al.*, 1997). Neben ihrer Rolle als Katalysatoren der Membranfusion, interagieren SNAREs auch mit verschiedenen Hüllproteinen und könnten daher aktiv an der Knospung von Transportvesikeln beteiligt sein. Während der Vesikelbildung am ER interagiert z. B. die Sec24p-Komponente des COPII-Hüllkomplexes mit Signalsequenzen in ER-Golgi SNARE-Proteinen (Miller *et al.*, 2003; Mossessova *et al.*, 2003). Des Weiteren wurden auch Interaktionen von SNAREs mit Proteinen des COPI-Hüllkomplexes (Rein *et al.*, 2002) beschrieben.

1.5.1.1 Allgemeine strukturelle Merkmale von SNAREs

Von allen bekannten Mitgliedern dieser Proteinfamilie sind die an der Exozytose beteiligten neuronalen SNAREs am besten untersucht. In der Präsynapse sind an der Fusion synaptischer Vesikel mit der Plasmamembran die Proteine Syntaxin1a, Synaptobrevin/VAMP2 und SNAP-25 beteiligt (Chen und Scheller, 2001; Jahn *et al.*, 2003; Rizo und Sudhof, 2002). SNAP-25 weist zwei Besonderheiten auf. Zum einen enthält es zwei SNARE-Domänen, zum anderen ist es über Palmitoylseitenketten mit der Plasmamembran assoziiert und zählt damit zu den wenigen SNAREs, die keine Transmembrandomäne enthalten. Synaptobrevin

lokalisiert an synaptische Vesikel, während die beiden anderen Proteine sich an der Plasmamembran befinden. Entsprechend ihrer Lokalisation auf der Vesikel- oder Zielmembran, unterteilt man diese Proteine daher zunächst in v-(vesicular) und t-(targetmembrane) SNAREs (Rothman, 1994; Söllner *et al.*, 1993b).

In vitro lagern sich vier SNARE-Domänen zu einer stabilen coiled-coil Struktur zusammen, die aus vier umeinander-gewundenen parallel angeordneten α -Helices besteht. Jede Helix bildet sich aus einem unterschiedlichen SNARE-Motiv, wobei Syntaxin1 und Synaptobrevin je eine Helix und SNAP-25 zwei Helices einbringen (Sutton *et al.*, 1998). Analog dem neuronalen SNARE-Komplex enthalten alle SNARE-Komplexe je ein SNARE-Motiv eines Syntaxin-Homologen, eines Synaptobrevin-Homologen, sowie zweier SNARE-Motive, die homolog zur N- bzw. C-terminalen SNARE-Domäne von SNAP-25 sind. Die Kristallstrukturen des neuronalen, sowie des frühen und späten endosomalen SNARE-Komplexes (Antonin *et al.*, 2002b; Sutton *et al.*, 1998; Zwilling, 2005) zeigen, dass sich im Inneren dieses Helix-Bündels 16 Ebenen befinden, die jeweils aus vier, überwiegend unpolaren, Aminosäureresten aufgebaut sind. In der Mitte dieser Schichtenstruktur befindet sich eine sehr hoch konservierte Aminosäureschicht, die sich, bis auf wenige Ausnahmen, aus einer Arginin- und drei Glutaminseitenketten zusammensetzt (Abb.4).

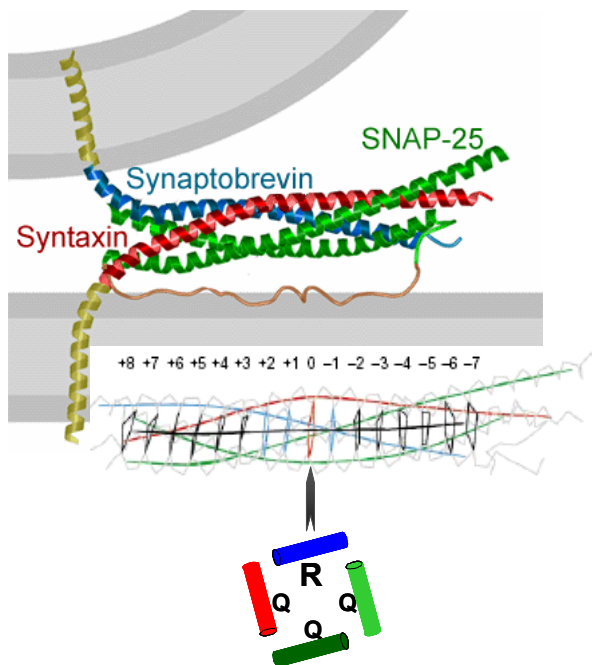


Abb. 4: Kristallstruktur des neuronalen SNARE-Komplexes. Oben: Die Kristallstruktur des neuronalen SNARE-Komplexes ist in Vesikel und Membran modelliert. Mitte: Darstellung der inneren 16 Ebenen, die sich aus je vier Aminosäureresten zusammensetzen. Unten: Die Anordnung der Aminosäuren der '0'-Ebene ist schematisch vergrößert dargestellt. Blau: Synaptobrevin; Grün: N- und C-terminale Helix von SNAP-25; Rot: Syntaxin Die Abbildung wurde aus (Sutton *et al.*, 1998) übernommen und modifiziert.

Diese 1R:3Q Stöchiometrie der '0'-Ebene ist ein allgemeines Merkmal von SNARE-Komplexen und führte zu einer neuen Klassifizierung der SNAREs. Folglich wurden SNARE-Proteine in Abhängigkeit von der zentralen Aminosäureseitenkette innerhalb ihrer

SNARE-Domäne und der Position der Helix innerhalb des Komplexes in R-, Qa-, Qb- und Qc-SNAREs unterteilt (Fasshauer *et al.*, 1998b; Jahn *et al.*, 2003; Uemura *et al.*, 2004).

Die meisten SNAREs enthalten N-terminale Domänen, die unterschiedliche regulatorische Funktionen ausführen (Dietrich *et al.*, 2003). Sie lassen sich grob in vier Haupttypen unterteilen:

- 1) Die N-terminale Domäne von Qa-SNAREs besteht aus einem drei-Helix Bündel, das sich aus den Domänen Ha, Hb und Hc zusammen setzt, dem eine kurze N-terminale Peptidsequenz vorangeht.

Dieses drei-Helix-Bündel kann zurückklappen und mit dem C-terminalen SNARE-Motiv unter Bildung der geschlossenen Konformation interagieren (Antonin *et al.*, 2002a; Dietrich *et al.*, 2003; Fasshauer, 2003; Misura *et al.*, 2000). Vor oder während des Assembly des SNARE-Komplexes muß diese geschlossene Konformation in eine offene Konformation übergeführt werden, bei der die Habc-Domäne sich von der SNARE-Domäne trennt. Man geht davon aus, dass diese Konformationsänderung meist durch regulatorische Proteine, wahrscheinlich SM-Proteine, erfolgt. In anderen SNARE-Proteinen hingegen interagiert die Habc-Domäne nicht mit dem SNARE-Motiv, so dass diese Qa-SNAREs in der offenen Konformation vorliegen (Fasshauer, 2003). Bei manchen dieser Qa-SNAREs ist die N-terminale Domäne an der Wechselwirkung mit SM-Proteinen beteiligt. So binden die N-Termini von Sed5p/Syn5 und Ufe1p/Syn18 an Sly1 (Bracher und Weissenhorn, 2002; Dulubova *et al.*, 2003; Yamaguchi *et al.*, 2002). Ähnlich wie Sly1p mit Sed5p interagiert auch das endosomale SM-Protein Vps45 mit den Syntaxinen Tlg2p/Syn16 (Dulubova *et al.*, 2002).

N-terminale drei-helikale Domänen enthalten auch die Q-SNAREs Vti1b, Syn6/Tlg1p und Syn8/Syn8p (Antonin *et al.*, 2002a; Misura *et al.*, 2002).

- 2) Die R-SNAREs Ykt6p/Ykt6 und Sec22p/Sec22b enthalten N-terminal eine Longin-Domäne (Filippini *et al.*, 2001; Rossi *et al.*, 2004a).

Auch Ykt6p kann eine geschlossene Konformation einnehmen, bei der die N-terminale profilin-ähnliche Longin-Domäne an das C-terminale SNARE-Motiv bindet (Tochio *et al.*, 2001). Kürzlich wurde für die Longin-Domäne von Ykt6p eine Palmitoylierungsaktivität während der Vakuolenfusion beschrieben (Dietrich *et al.*, 2004; Veit, 2004). Obwohl in Sec22p die N-terminale Region ebenfalls eine profilin-ähnliche Struktur aufweist, nimmt Sec22p wahrscheinlich eine offene Konformation ein (Gonzalez *et al.*, 2001).

- 3) VAMP4 ist ein R-SNARE, das nur in Säugerzellen konserviert und im TGN angereichert ist. Es enthält eine N-terminale Domäne mit einem Dileuzin-Motiv und einen Cluster saurer Aminosäuren. Diese N-terminale Domäne ist am „Targeting“ zum *trans*-Golgi beteiligt (Hiners *et al.*, 2003; Peden *et al.*, 2001; Zeng *et al.*, 2003).
- 4) Auch die Golgi-ER SNAREs Sec20p/Sec20 und Use1p/Use1 enthalten je eine N-terminale Domäne (Burri *et al.*, 2003; Dilcher *et al.*, 2003; Nakajima *et al.*, 2004). Sec20 aus Säugern hat eine BH3-Domäne, die an der Apoptose beteiligt ist.

1.5.1.2 Der SNARE-Zyklus

Die Struktur des SNARE-Komplexes zeigt auffallende Ähnlichkeit zur Konformation, die von Fusionsproteinen mehrerer umhüllter Viren, darunter auch Influenza und HIV, während der Infektion eingenommen wird (Hughson, 1999; Skehel und Wiley, 1998; Stegmann, 2000). Nach der Insertion viraler Fusionspeptide in ihre Zielmembran kommt es zu einer Konformationsänderung des Fusionspeptids. Diese führt zur Bildung eines stabilen helikalen Bündels führt, wodurch die gegenüberliegenden Membranen zusammen gebracht werden.

Für den Aktionsmodus von SNARE-Proteinen wurde ein Zyklus vorgeschlagen. Zunächst wird das vesikuläre SNARE-Protein, zusammen mit weiteren Frachtmolekülen, in Transportvesikel gepackt, die von der Donormembran abknospen und anschließend zum Zielkompartiment transportiert werden. In der unmittelbaren Peripherie des Zielkompartiments kommen dann „Tethering“-Faktoren zusammen mit Rab-GTPasen zum Einsatz. „Tethering“-Faktoren interagieren sowohl mit Molekülen auf dem Vesikel, als auch mit Molekülen auf dem Zielkompartiment und führen so zu einer losen Anheftung des Vesikels an die Membran des Zielorganells. Im nächsten Schritt interagieren SNAREs auf dem Vesikel und auf der Akzeptormembran miteinander und es kommt zur Ausbildung von *trans*-SNARE-Komplexen. Die Bildung des SNARE-Komplexes beginnt an den N-Termini der vier SNARE-Domänen und schreitet entlang der parallel angeordneten SNARE-Domänen zu den C-terminalen Membranankern voran (Hanson *et al.*, 1997; Hay und Scheller, 1997). Hierbei bildet sich ein *trans*-SNARE-Komplex, auch SNAREpin genannt, der die gegenüberliegenden Membranen überbrückt (Weber *et al.*, 1998). Während die Komplexbildung nach einem Reißverschlußprinzip voranschreitet, werden die beiden Membranen näher zusammen gezogen. Es kommt zur Überwindung der Membranabstoßung und schließlich zur Fusion, wodurch der *trans*-Komplex in einen *cis*-SNARE-Komplex übergeht, bei dem die einzelnen SNAREs nun alle in derselben Membran verankert sind. Als Triebkraft des Fusionsprozesses dient die bei der Ausbildung der helikalen Struktur

freigesetzte Energie (Fasshauer, 2003). Damit die einzelnen SNAREs für weitere Fusionsereignisse zur Verfügung stehen, muß der *cis*-Komplex wieder disassembliert werden. Dies erfolgt durch die ATPase NSF/Sec18p in Zusammenspiel mit ihrem Cofaktor α -SNAP/Sec17p. Hierbei interagiert hexameres NSF über drei α -SNAP Moleküle mit dem *cis*-SNARE-Komplex unter Bildung des transienten 20S-Komplexes (Brunger und DeLaBarre, 2003; Furst *et al.*, 2003; Hohl *et al.*, 1998; Wimmer *et al.*, 2001). Die Hydrolyse von ATP durch NSF führt schließlich zum Auseinanderfallen des 20 S-Komplexes und die nun freien SNAREs können anschließend entweder zu ihrem Ursprungskompartiment zurücktransportiert werden (v-SNAREs) oder für eine weitere Fusionsrunde kompetent gemacht werden (t-SNAREs).

1.5.1.3 Die SNARE-Hypothese

Intrazelluläre Transportprozesse erfordern ein hohes Maß an Spezifität, damit die Aufrechterhaltung und einzigartige Natur der verschiedenen Kompartimente gewährleistet ist. Die klare intrazelluläre Verteilung der SNARE-Proteine, zusammen mit der Beobachtung stabiler SNARE Komplexe *in vitro*, führten zu der Annahme, dass die Bildung spezifischer SNARE-Komplexe durch passende SNARE-Proteine *in vivo* die Spezifität intrazellulärer Fusionsereignisse bedingt (**SNARE Hypothese**) (Söllner *et al.*, 1993b). Inzwischen ist klar, dass „Targetingprozesse“ viel feiner nuanciert sind, weshalb spezifische Interaktionen von SNARE-Proteinen nicht allein das Vesikeltargeting bestimmen können.

In vitro Untersuchungen mit rekombinanten SNAREs zeigten eine deutliche Promiskuität hinsichtlich der Komplexbildung (Fasshauer *et al.*, 1999; Tsui und Banfield, 2000; Yang *et al.*, 1999). Die Stabilitäten von SNARE-Komplexen aus zusammen passenden bzw. nicht zusammen gehörenden SNARE-Proteinen waren meist vergleichbar. *In vivo* sind einige SNARE an mehr als einem „Trafficking“-Schritt beteiligt (Dilcher *et al.*, 2001; Gotte und von Mollard, 1998; Kweon *et al.*, 2003; McNew *et al.*, 1997; Spang und Schekman, 1998; von Mollard *et al.*, 1997) und konnten in mehreren unterschiedlichen SNARE-Komplexen isoliert werden (Fischer von Mollard und Stevens, 1999; Holthuis *et al.*, 1998; Lupashin *et al.*, 1997). Des Weiteren erfolgt die Sekretion, sowohl in Neuronen, als auch in der Hefe, nur an gut definierten Domänen innerhalb der Membran (Neuronen: Aktive Zone; Hefe: Knospenspitze) obwohl in beiden Fällen die t-SNAREs über einen weiten Bereich verteilt sind (Brennwald *et al.*, 1994; Garcia *et al.*, 1995).

Viele thermodynamisch günstige intrazelluläre Reaktionen laufen so langsam ab, dass sie physiologisch nicht ins Gewicht fallen. Oft werden diese langsamen Reaktionen durch die

Wirkung von Katalysator-Proteinen auf physiologisch relevante Geschwindigkeiten gebracht. Auch die Bildung kognater SNARE-Komplexe könnte unter kinetischer Kontrolle stehen. Zum einen ist *in vitro* die intrinsische Assemblierungsrate sehr niedrig (Fasshauer *et al.*, 2002). Für die exozytotischen Hefe SNAREs konnte gezeigt werden, dass die Bildungsrate des Komplexes sehr langsam ist, was auf die geschlossene Konformation von *SSO1* zurückzuführen ist (Fiebig *et al.*, 1999; Nicholson *et al.*, 1998). Durch Deletion der N-terminalen regulatorischen Domäne in *Sso1p* konnte die Assemblierungsrate des Komplexes aus rekombinanten Proteinen um das 2000 Fache beschleunigt werden (Nicholson *et al.*, 1998). Geeignete Kandidaten für die Rolle solcher Konformationsregulatoren wären SM-Proteine, da sie spezifisch an Syntaxin-homologe SNAREs binden.

Die Verteilung von Syntaxin 1A und SNAP-25 auf der Plasmamembran und Synaptobrevin auf der Vesikelmembran führte zu der Vorstellung, dass Syntaxin 1A und SNAP-25 einen Akzeptorkomplex für das vesikelständige Synaptobrevin bilden (Rothman, 1994; Söllner *et al.*, 1993a; Söllner *et al.*, 1993b). Kinetische Untersuchungen des „Refolding“-Prozesses bekräftigten die Ansicht eines intermediären Akzeptorkomplexes (Fasshauer *et al.*, 2002). Für den exozytotischen SNARE-Komplex der Hefe wurde gezeigt, dass die Bildung eines Akzeptorkomplexes aus *Sso1/2p* und *Sec9p* eine Vorbedingung ist, damit *Snc1/2p* binden kann (Nicholson *et al.*, 1998). Im Falle der neuronalen SNAREs wurde *in vitro* zunächst die Bildung eines Komplex-Intermediates gefunden, das jedoch aus SNAP25 und zwei Molekülen Syntaxin1A besteht und *in vivo* sehr wahrscheinlich nicht relevant ist (Fasshauer *et al.*, 1997). In der Tat zeigte jüngst eine detaillierte kinetische Untersuchung der Assemblierung des neuronalen SNARE-Komplexes, dass ein transienter 1:1 Akzeptorkomplex, bestehend aus je einem Molekül Syntaxin und SNAP-25, die Bindungsstelle für Synaptobrevin darstellt (Fasshauer und Margittai, 2004).

1.5.1.4 SNARE-Proteine

In Säugerzellen sind 35 SNARE-Proteine und in *S. cerevisiae* 24 SNAREs bekannt (Abb. 5) (Bock *et al.*, 2001; Burri und Lithgow, 2004; Chen und Scheller, 2001; Jahn *et al.*, 2003).

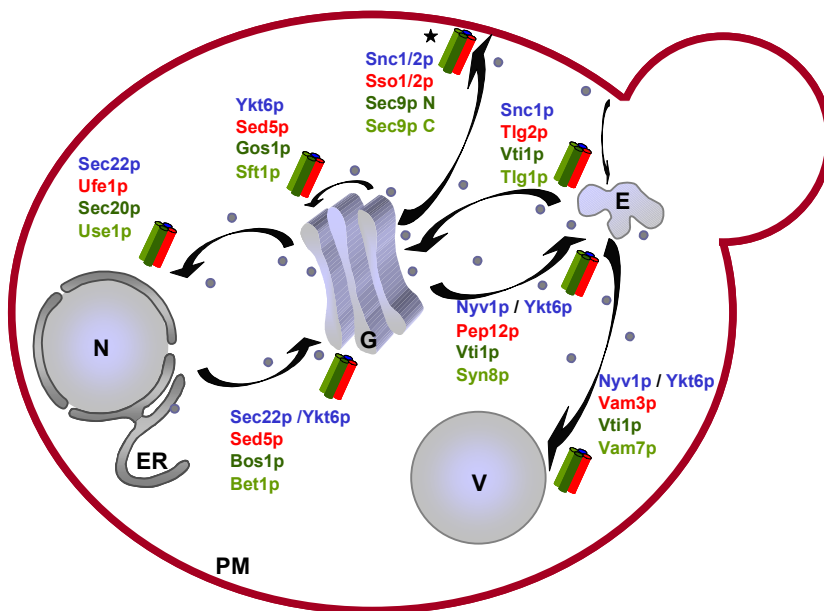


Abb. 5: Schemadarstellung der an der einzelnen Transportschritten beteiligten SNAREs in der Hefe. Rot: Qa-SNARE, dunkelgrün: Qb-SNARE; Hellgrün: Qc-SNARE; blau: R-SNARE. *Bei der Sporulation ist hier ein analoger SNARE-Komplex involviert. Dieser besteht aus Sso1p, Snc1/2p und Spo20p. N: Zellkern, ER: Endoplasmatisches Retikulum; G: Golgi-Apparat; E: Endosom; V: Vakuole; PM: Plasmamembran

Vier der in Hefe bekannten SNAREs enthalten keine Transmembrandomäne (Ykt6p, Sec9p, Spo20p, Vam7p). Statt dessen sind sie mit der Membran durch Prenylierung (Fukasawa *et al.*, 2004) oder Palmitoylierung von Cystein-Seitenketten verankert (Fukasawa *et al.*, 2004; Prekeris *et al.*, 2000; Veit *et al.*, 1996). Bisher wurden für die Hefeproteine Vam3p, dem Syntaxin-Homologen, das am Transport vom Endosom zur Vakuole beteiligt ist, und Vam7p, das ebenfalls am Transport zur Vakuole beteiligt ist, keine homologen SNAREs in Säugerzellen identifiziert. Vam7p ist ein SNARE ohne Transmembrandomäne und enthält eine PX-Domäne, die an Phosphatidylinositol-3-Phosphat bindet (Boeddinghaus *et al.*, 2002; Cheever *et al.*, 2001; Sato *et al.*, 1998).

Der SNARE-Komplex, der am Transport vom ER zum Golgi beteiligt ist, setzt sich in der Bäckerhefe aus dem R-SNARE Sec22p, dem Synaptobrevinhomologen, dem Qa-SNARE und Syntaxinhomologen Sed5p, sowie Bos1p und Bet1p zusammen, die im SNARE-Komplex die entsprechende Qb- und Qc-Positionen einnehmen (Abb. 6)

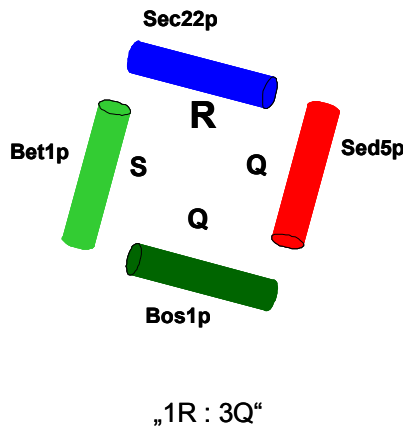


Abb. 6: Die '0'-Ebene des ER-Golgi SNARE-Komplexes in der Bäckerhefe. Rot: Qa-Position (Sed5p); Dunkelgrün: Qb (Bos1p); Hellgrün: Qc (Bet1p); blau: R (Sec22p). Im Unterschied zum neuronalen, sowie zum analogen SNARE-Komplex in Säugerzellen, enthält der Hefekomplex in der Qc-Position ein Serin (Sacher *et al.*, 1997; Stone *et al.*, 1997).

Zwei dieser Proteine sind in weiteren SNARE-Komplexen isoliert worden. So ist das R-SNARE Sec22p auch am retrograden Transport vom Golgi zurück zum ER beteiligt (Lewis *et al.*, 1997), wo es mit den SNAREs Ufe1p (Qa), Sec20p (Qb) und Use1p (Qc) einen Komplex bildet (Burri *et al.*, 2003; Dilcher *et al.*, 2003; Lewis *et al.*, 1997). Das Qa-SNARE Sed5p interagiert *in vitro* mit mehreren anderen SNARE-Proteinen (Tsui und Banfield, 2000) und ist *in vivo* zusätzlich zum ER-Golgi Transport an Transportschritten innerhalb des Golgi-Apparates beteiligt. Man nimmt an, dass es hier mit den SNARE-Proteinen Ykt6p (R), Gos1p (Qb) und Sft1p (Qc) interagiert (Parlati *et al.*, 2002; Tsui *et al.*, 2001).

In Säugerzellen erfolgt der vesikuläre Transport vom ER zum *cis*-Golgi Apparat in zwei Schritten. Zunächst werden ER-Vesikel zum ERGIC (**ER-Golgi intermediate compartment**) transportiert, von dem aus sich der vesikuläre Transport an den *cis*-Golgi anschließt. Ein zum anterograden ER-Golgi SNARE-Komplex in Hefe analoger SNARE-Komplex ist auch in Säugerzellen bekannt. Dieser Komplex setzt sich aus den SNAREs Syn5 (Qa), GS27 (Qb), Bet1 (Qc) und Sec22b (R) zusammen und ist an der homotypischen Fusion von ER-Vesikeln zum ERGIC beteiligt (Zhang *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 1997). Am vesikulären Transport vom ERGIC zum *cis*-Golgi ist ein anderer SNARE-Komplex beteiligt, der sich aus Syn5 (Qa), GS28 (Qb), Bet1 (Qc) und Ykt6 (R) zusammensetzt (Zhang und Hong, 2001). Bet1, das in beiden anterograden Transportschritten involviert ist, wird wahrscheinlich nicht zum ER recycelt, sondern bleibt im ERGIC und dient im nächsten Transportabschnitt zum *cis*-Golgi als v-SNARE, wobei es mit einem anderen t-SNARE-Komplex interagiert (Hong, 2005). Am retrograden Transport vom Golgi zum ER ist in Säugerzellen der aus den Proteinen Syn18 (Qa), BNiP (Qb?), Use1/p31 (Qc) und Sec22b (R) bestehende SNARE-Komplex involviert und ist zum entsprechenden SNARE-Komplex in der Hefe homolog (Burri *et al.*, 2003; Dilcher *et al.*, 2003; Hirose *et al.*, 2004; Nakajima *et al.*, 2004). Ebenso wie das SNARE

Sec20p aus der Bäckerhefe interagiert auch das Säugerhomologe mit Tip20p/RINT-1 (Nakajima *et al.*, 2004). Tip20p ist ein Bestandteil des „Dsl1p“-Komplexes (Ungar und Hughson, 2003; Whyte und Munro, 2002), eines möglichen „Tethering“-Faktors des retrograden Transportschrittes. Auch im *intra*-Golgi bzw. Endosom-TGN Traffick ist das Syntaxin Syn5 beteiligt. Hier liegt es in einem SNARE-Komplex vor, der aus Syn5 (Qa), GS28 (Qb), GS15 (Qc) und Ykt6 (R) besteht (Parlati *et al.*, 2002; Shorter *et al.*, 2002; Tai *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2002).

1.5.2 „Tethering“-Faktoren

Der erste physikalische Kontakt zwischen Vesikel und Zielmembran wird als „Tethering“ bezeichnet. Folglich werden Moleküle, die diese physikalische Verknüpfung von Vesikel und Akzeptormembran herstellen, als Tethering-Faktoren bezeichnet. In Abb. 7 sind die verschiedenen bekannten „Tethering“-Faktoren in der Hefe dargestellt.

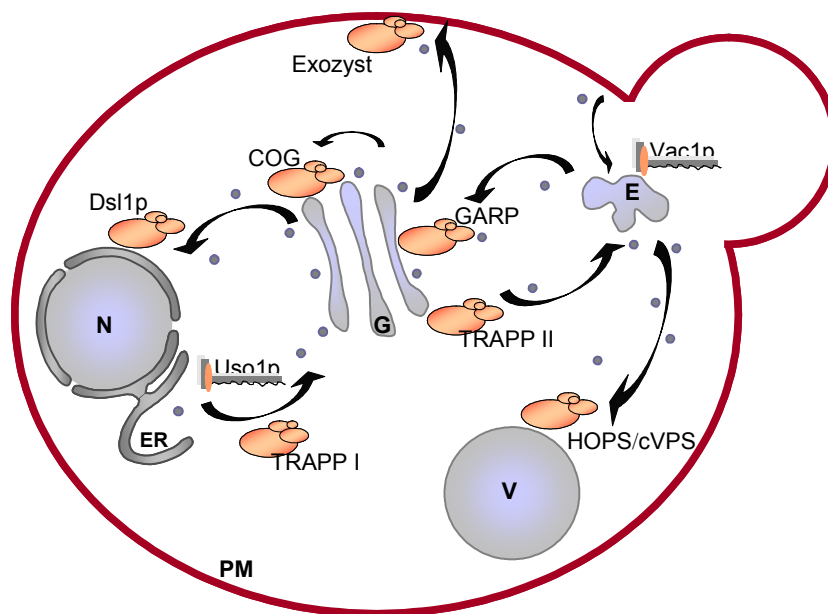


Abb. 7: Schematische Darstellung der an den verschiedenen Transportschritten beteiligten „Tethering“-Faktoren in der Bäckerhefe. Uso1p und Vac1p sind längliche coiled-coil Proteine, die anderen „Tethering“-Faktoren multimere Protein-komplexe. Die homologen Proteine von Uso1p und Vac1p in Säugerzellen sind p115 und EEA1. N: Zellkern, ER: Endoplasmatisches Retikulum; G: Golgi-Apparat; E: Endosom; V: Vakuole; PM: Plasmamembran

An den einzelnen Transportschritten sind verschiedene, evolutionär nicht verwandte „Tethering“-Faktoren beteiligt. Trotz ihrer Heterogenität lassen sich „Tethering“-Faktoren generell in zwei Gruppen unterteilen. Die eine Gruppe von „Tethering“-Faktoren besteht aus Proteinen, die eine längliche coiled-coil Struktur aufweisen. Hierzu zählen die Proteine Uso1p/p115, GM130, Giantin, mehrere Golgine und EEA1/Vac1p. Die zweite Gruppe beinhaltet die multimeren Protein-Komplexe COG (Ungar *et al.*, 2002; Whyte und Munro,

2001), TRAPP (Gavin *et al.*, 2002; Sacher *et al.*, 2001; Sacher *et al.*, 1998), GARP/VFT (Conibear *et al.*, 2003; Conibear und Stevens, 2000; Siniossoglou und Pelham, 2002), HOPS/Class C VPS (Sato *et al.*, 2000), sowie den Exozyst-Komplex (Kee *et al.*, 1997; TerBush *et al.*, 1996).

Uso1p wurde in einem genetischen Screen nach Mutanten mit Sekretions- und Glykosylierungsdefekten als ER-Golgi Transportfaktor identifiziert (Nakajima *et al.*, 1991) und ist *in vitro* am „Tethering“ von COPII-Vesikeln mit Golgi Membranen beteiligt (Barlowe, 1997). Uso1p ist ein stabförmiges homodimeres Molekül mit zwei N-terminalen globulären Domänen und einem langen coiled-coil Bereich, der in einer sauren Domäne endet (Yamakawa *et al.*, 1996). Biochemische Untersuchungen zeigten eine von der Rab-GTPase Ypt1p abhängige Assoziation von Uso1p mit Golgi-Membranen und lieferten den ersten Hinweis auf ein „Tethering“ von Transportintermediaten (Cao *et al.*, 1998). In Abwesenheit von Uso1p konnten sich ER-abgeleitete Vesikel *in vitro* zwar bilden, jedoch banden sie nicht effizient an Golgi-Membranen. Da eine Inhibierung der kurz vor der eigentlichen Fusion wirkenden SNARE-Proteine zu keiner Beeinträchtigung des Uso1p-abhängigen „Tethering“-Schrittes führte, wurde das „Tethering“ als ein von der Funktion der entsprechenden SNARE-Proteine unabhängiger Schritt betrachtet.

Das strukturelle und funktionelle Orthologe von Uso1p in Säugerzellen ist das Protein p115 (Sapperstein *et al.*, 1995; Waters *et al.*, 1992). Es ist am anterograden ER-Golgi Transport (Alvarez *et al.*, 1999) und am *intra*-Golgi Transport beteiligt (Seemann *et al.*, 2000; Waters *et al.*, 1992). Weiterhin wird es *in vitro* in einem zellfreien System für den Wiederaufbau des fragmentierten Golgi-Apparates nach der Mitose benötigt (Rabouille *et al.*, 1995).

Sowohl Uso1p, als auch p115, enthalten eine sehr flexible Domäne, die durch eine Konformationsänderung Vesikel und Akzeptormembran näher zusammen bringen könnte (Yamakawa *et al.*, 1996).

Im *intra*-Golgi Transport wurde ein mögliches p115-abhängiges „Tethering“ von COPI-Vesikeln als eine Reihe von Interaktionen zwischen den Proteinen Giantin (Linstedt und Hauri, 1993), p115, GM130 (Golgi Matrix Protein of 130 kDa) (Nakamura *et al.*, 1995) und GRASP65 (Golgi Stacking Protein of 65 kDa) vorgeschlagen (Barr *et al.*, 1997; Sönnichsen *et al.*, 1998). Giantin, ein in COPI-Vesikeln enthaltenes, Transmembranprotein (Linstedt *et al.*, 1995; Sönnichsen *et al.*, 1998) interagiert mit p115, welches wiederum mit GM130 interagiert, einem am *cis*-Golgi lokalisierten löslichen Protein (Nakamura *et al.*, 1997). GM130 selbst wird indirekt durch Bindung an GRASP65 (Barr *et al.*, 1998), einem Golgi-Protein mit einem Myristoyl-Anker (Barr *et al.*, 1997), an die Golgi-Membran rekrutiert.

Somit wäre p115 als Verbindungsglied in einem langen „Tether“-Verbund denkbar. Jedoch wurden bisher nur binäre Interaktionen zwischen p115 und Giantin bzw. p115 und GM130 gefunden (Linstedt *et al.*, 2000), was darauf beruht, dass die Bindungsdomänen für GM130 und Giantin in derselben C-terminalen Region von p115 liegen und beide Proteine um die Bindungsstelle konkurrieren.

Von den fünf multimeren „Tethering“-Faktoren, sind am „Tethering“ von ER- bzw. *Intra-Golgi*-Vesikeln mit Golgi-Membranen die Komplexe COG (Kim *et al.*, 1999; VanRheenen *et al.*, 1998; VanRheenen *et al.*, 1999) und TRAPP (Sacher *et al.*, 1998).

Der COG (conserved oligomeric Golgi)-Komplex setzt sich aus acht Untereinheiten (COG1-8) zusammen (Ungar *et al.*, 2002). Obwohl dieser Komplex noch wenig charakterisiert ist, ist eine Vielzahl inter-molekularer Wechselwirkungen bekannt. So sind genetische und /oder physikalische Interaktionen des Komplexes mit einer Reihe integraler Golgi-Proteine, der Rab-GTPase Ypt1p, dem SM-Protein Sly1p, verschiedenen *intra-Golgi*-SNAREs und mit der COPI-Vesikelhülle beschrieben worden (Oka *et al.*, 2004; Ram *et al.*, 2002; Suvorova *et al.*, 2002; VanRheenen *et al.*, 1998; VanRheenen *et al.*, 1999). Trotz seiner vielfältigen Interaktionen ist die genaue Rolle dieses Protein-Komplexes im Membrantransport unklar. Bis dato wurde eine Beteiligung des COG-Komplexes an der Sortierung von Proteinen nach dem Verlassen des ER (Morsomme und Riezman, 2002; Muniz *et al.*, 2001; Suvorova *et al.*, 2002), am „Tethering“ von ER- und / oder COPI-Vesikeln an Golgi-Membranen (Kim *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 1999; VanRheenen *et al.*, 1998; VanRheenen *et al.*, 1999), sowie an der Retention von Golgi-Proteinen vorgeschlagen (Oka *et al.*, 2004; Ram *et al.*, 2002; Spelbrink und Nothwehr, 1999; Suvorova *et al.*, 2002). Auch ist der molekulare Mechanismus über den dieser periphere „Tethering“-Komplex an Golgi-Membranen rekrutiert wird bisher nicht bekannt.

Der COG-Komplex könnte, zusammen mit den an späteren Transportschritten beteiligten „Tethering“-Faktoren Exozyst und GARP/cVPS eine Familie entfernt verwandter multimerer „Tethering“-Komplexe darstellen, aufgrund gewisser struktureller Ähnlichkeiten zwischen verschiedenen Untereinheiten dieser drei Komplexe (Whyte und Munro, 2001). EM-Aufnahmen des gereinigten COG-Komplexes aus dem Rind zeigten, dass sich der COG-Komplex aus zwei vergleichbar großen globulären Domänen zusammensetzt (Ungar *et al.*, 2002). Basierend auf neuesten Untersuchungen ergibt sich ein detaillierteres Bild für den Aufbau dieses Komplexes. Demnach setzt sich der Gesamtkomplex aus zwei heterotrimeren Teilkomplexen (Cog2/3/4 und Cog5/6/7) zusammen, die durch eine heterodimere Einheit,

bestehend aus den beiden übrigen COG-Komponenten Cog1/8, miteinander verbunden sind (Oka *et al.*, 2005; Ungar *et al.*, 2005).

Der TRAPP Komplex, der zweite multimere „Tethering“-Faktor des frühen sekretorischen Weges, umfaßt 10 verschiedene Untereinheiten. Er lokalisiert an *cis*-Golgi Membranen ohne zwischen ER und Golgi zu zirkulieren (Barrowman *et al.*, 2000) und könnte deshalb ankommenden COPI- und COPII-Vesikeln als Markierung des *cis*-Golgi dienen (Sacher *et al.*, 2001). In der Hefe sind zwei Formen dieses Komplexes bekannt. Der TRAPPI-Komplex besteht aus sieben Untereinheiten (Bet5p, Trs20p, Bet3p, Trs23p, Trs33p, Trs31p und Trs85p) (Sacher *et al.*, 1998) und ist am ER-Golgi Transport beteiligt (Barrowman *et al.*, 2000). Der TRAPP II-Komplex ist als „Tethering“-Faktor im *intra*-Golgi Transport involviert und enthält drei zusätzliche Untereinheiten (Trs65p, Trs120p und Trs130p) (Sacher *et al.*, 2001). Obwohl keine der zehn Untereinheiten einen Transmembrananker enthält, weisen biochemische Untersuchungen in Hefe und Säugerzellen auf eine stabile Assoziation des Komplexes mit dem Golgi (Sacher *et al.*, 2000). Bisher wurden keine Rezeptoren für diesen Komplex identifiziert, so dass der molekulare Mechanismus für diese Verankerung ist noch unklar ist. Erste Hinweise, über welchen Mechanismus die Assoziation des TRAPP-Komplexes an die Membran erfolgen könnte, ergeben sich aus der jüngst publizierten Kristallstruktur der Bet3-Untereinheit aus der Maus (Kim *et al.*, 2005b; Turnbull *et al.*, 2005). Bet3 kristallisiert als homodimeres Molekül, dessen Monomere jeweils einen zentralen hydrophoben Kanal enthalten, in den sich ein hydrophober Myristoyl- oder Palmitoylanker einlagern kann. Die Öffnung dieses hydrophoben Kanals liegt in einer Domäne, die eine ebene Struktur besitzt und mehrere positiv geladene Aminosäureseitenketten aufweist. Über die positiven Ladungen könnte Bet3 verhältnismäßig unspezifisch mit der Golgi-Membran wechselwirken. Die Kristallstruktur des Säuger bet3-trs33 Komplexes ergab ein heterodimeres Molekül, in dem die beiden Monomere bet3 und Trs33, trotz sehr verschiedener Primärstruktur, sehr ähnlich gefaltet sind (Kim *et al.*, 2005a). *In vitro* Untersuchungen zeigten, dass die Bindung von Bet3p an Trs33p benötigt wird, damit Bet3p mit der Bet5p-Untereinheit interagieren kann. Hierauf basierend wurde vorgeschlagen, dass Trs33p für den Einbau der Bet3p Untereinheit in den sich bildenden TRAPP-Komplex wichtig ist (Kim *et al.*, 2005a; Kummel *et al.*, 2005). Dem TRAPPI-Komplex wird neben der „Tethering“- auch eine GEF-Funktion zugeschrieben. Hieraus resultiert folgendes Modell für die Wirkungsweise des TRAPPI-Komplexes. TRAPPI ist der anfängliche Rezeptor für neu ankommende COPII-Vesikel an der Golgi-Membran. Nachdem das COPII-Vesikel an TRAPPI gebunden hat, kommt dessen GEF-

Aktivität zum Tragen. TRAPPI aktiviert Ypt1p, welches weitere „Tethering“-Faktoren an die Membran rekrutiert (Sacher *et al.*, 2001).

Ein multimerer, evolutionär konservierter, Proteinkomplex, der einen potentiellen weiteren „Tethering“-Faktor repräsentieren könnte, ist am retrograden Transport vom Golgi zum ER beteiligt. Der „Dsl1p“-Komplex (Ungar und Hughson, 2003; Whyte und Munro, 2002) setzt sich aus den löslichen Proteinen Dsl1p, Tip20p und Dsl3p zusammen und stabilisiert einen teilassemblierten, aus drei SNARE-Proteinen bestehenden, SNARE-Komplex (Kraynack *et al.*, 2005). DSL1 wurde in zwei von einander unabhängigen Synthetischen-Letalität-Screens als Interaktionspartner des SM-Proteins Sly1p und des ER-Golgi SNAREs Sec22p isoliert (Andag *et al.*, 2001; Vanrheenen *et al.*, 2001). Die Interaktion der Tip20p-Untereinheit des „Dsl1p“-Komplexes mit Sec20p, einem Golgi-ER-SNARE, war schon länger bekannt (Cosson *et al.*, 1997; Sweet und Pelham, 1993). Da dieser Komplex ER-lokalisierte SNARE-Proteine und seine Dsl1p-Untereinheit auch an Coatomer binden kann (Andag und Schmitt, 2003), ist eine Beteiligung dieses Komplexes am „Tethering“ von Vesikeln am ER sehr wahrscheinlich. Die gleichzeitig Bindung von SNAREs und Coatomer an den „Dsl1p“-Komplex wurde bisher jedoch noch nicht gezeigt.

1.5.3 Sec1p/Munc-18-Proteine

Sec1/Munc18-ähnliche Proteine (SM-Proteine) gehören zu einer evolutionär konservierten Proteinfamilie hydrophiler peripherer Membranproteine mittleren Molekulargewichtes. Sie sind wesentliche Faktoren intrazellulärer Transportprozesse (Übersicht in Gallwitz und Jahn, 2003). Ursprünglich wurden sie als negative Regulatoren der SNARE-Komplexbildung angesehen, doch ist ihre genaue Funktion weiterhin unklar.

In der Bäckerhefe sind vier SM-Proteine bekannt (Abb. 8), von denen zwei (Sec1p und Sly1p) essentiell sind. Sly1p, das am Transport zwischen ER und Golgi beteiligte SM-Protein (Dascher *et al.*, 1991; Ossig *et al.*, 1991), bindet an zwei Syntaxin-Homologe. Es interagiert sowohl mit Sed5p, das am ER-Golgi Transport beteiligt ist, als auch mit Ufe1p, welches im retrograden Transport zum ER wirkt (Lupashin und Waters, 1997; Salminen und Novick, 1987).

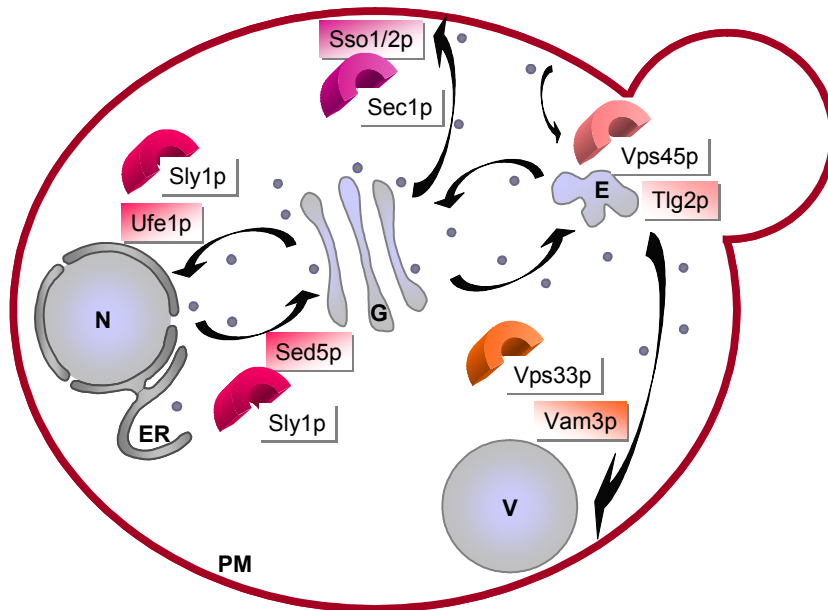


Abb. 8: SM-Proteine und ihre Syntaxin-Partner in der Bäckerhefe. Die an den einzelnen Transportschritten beteiligten Sec1 / Munc-18 Proteine sind durch verschiedenfarbige Bögen dargestellt, ihre jeweiligen Syntaxin-Partner sind farblich entsprechend unterlegt. N: Zellkern, ER: Endoplasmatisches Retikulum; G: Golgi-Apparat; E: Endosom; V: Vakuole; PM: Plasmamembran

Die meisten SM-Proteine binden *in vitro* mit sehr hoher Affinität an ein oder zwei spezifische Syntaxin-Proteine (Toonen und Verhage, 2003) und zeigen *in vivo* eine klare Spezifität für einen bestimmten Transportabschnitt (Khan *et al.*, 2001; Verhage *et al.*, 2000).

Die Kristallstrukturen dreier SM-Proteine zeigen, dass diese eine bogenförmige Struktur aufweisen, die sich aus drei Domänen zusammensetzt (Bracher *et al.*, 2000; Bracher und Weissenhorn, 2002; Misura *et al.*, 2000). Trotz konservierter Proteinstrukturen beider Bindungspartner wurden bisher unterschiedliche Bindungsmodi von SM-Proteinen an SNARE-Proteine beschrieben:

- 1) Das SM-Protein bindet das entsprechende Syntaxin in der geschlossenen Konformation. In der Kristallstruktur (Misura *et al.*, 2000) des neuronalen Munc18-1-Syntaxin1-Komplexes befindet sich im Hohlraum des bogenförmigen Munc18-1 das Syntaxin1 in der geschlossenen Konformation.
- 2) Das SM-Protein bindet das entsprechende Syntaxin in der offenen Konformation. In Säuger- und Hefezellen binden die SM-Proteine Vps45p und Sly1p an eine konservierte N-terminale Sequenz im jeweiligen Syntaxin (Bracher und Weissenhorn, 2002; Dulubova *et al.*, 2002; Yamaguchi *et al.*, 2002). Diese Bindungsvariante erlaubt die gleichzeitige Bindung von SM-Protein und weiteren SNARE-Komplex Partnern an das jeweilige Syntaxin (Bryant und James, 2001; Peng und Gallwitz, 2002) und spricht damit gegen eine negativ regulatorische Funktion von SM-Proteinen. Die Sed5p-Bindungsstelle an der äußeren Oberfläche in Sly1p ist innerhalb der SM-Proteine konserviert. Sie ist sogar in Munc18-1 enthalten, doch scheint sie hier nicht

an der Bindung von Syntaxin 1 beteiligt zu sein. Jüngst wurde durch NMR-Untersuchungen von rSly1 gezeigt, dass mit der Bindung an den N-Terminus des Syntaxins eine Konformationsänderung im SM-Protein einhergeht (Arac *et al.*, 2005). Diese Konformationsänderung führt sehr wahrscheinlich zu einer drastischen Veränderung der Gesamtstruktur des SM-Proteins und ist daher entscheidend für dessen Funktion.

- 3) Das SM-Protein bindet das Syntaxin über einen Multiproteinkomplex. Das SM-Protein Vps33p, das am Golgi-Vakuolen-Transport beteiligt ist und mit dem Syntaxin Vam3p interagiert (Sato *et al.*, 2000), ist Teil des HOPS/C-Vps Komplexes. Die selben Interaktionen von Vps33p-Homologen und Mitgliedern des C-Vps Komplexes wurden auch in *D. melanogaster* beobachtet (Sevrioukov *et al.*, 1999).

Es ist sehr außergewöhnlich, dass in strukturell und funktionell konservierten Proteinen alternative Bindungsvarianten nebeneinander bestehen. Hinsichtlich der Funktion von SM-Proteinen finden sich in der Literatur zum Teil sehr widersprüchliche Beobachtungen. Ursprünglich wurden SM-Proteine als negative Regulatoren der SNARE-Komplexbildung vorgeschlagen (Pevsner *et al.*, 1994), doch kann aufgrund der derzeitigen Kenntnisse über SM-Proteine diese Rolle nur für den Bindungsmodus von Munc18-1/UNC-18 aufrechterhalten werden. In allen anderen Fällen scheint die Bindung von SM-Proteinen die Bildung des SNARE-Komplexes positiv zu beeinflussen. Aus der Bäckerhefe ist bekannt, dass Sly1p die Bildung von *trans*-SNARE-Komplexen begünstigt (Peng und Gallwitz, 2002) obwohl es hierfür nicht essentiell ist (Kosodo *et al.*, 2002). Auch funktionales Vps45p bzw. Vps33p sind nötig, damit sich die entsprechenden SNARE-Komplexe bilden können (Bryant und James, 2001; Sato *et al.*, 2000). Für einige SM-Proteine gibt es klare Hinweise dafür, dass sich ihre molekulare Funktion sich um das „Tethering“ konzentriert (Cowles *et al.*, 1994; Voets *et al.*, 2001). Doch scheint dies nicht ein universelles Prinzip für alle SM-Proteine und Transportrouten zu sein. Beispielsweise blockiert in der Bäckerhefe eine *sly1*-Mutante die Fusion ohne das „Docking“ zu beeinflussen (Cao *et al.*, 1998). Genetische Interaktionen von SM-Proteinen deuten teilweise auch auf eine mögliche Funktion bei der Rekrutierung von Vesikeln hin (Dascher *et al.*, 1991; Finger und Novick, 2000; Ossig *et al.*, 1991; Salminen und Novick, 1987).

Da die genaue Funktion von SM-Proteinen nach wie vor unklar ist, läßt sich derzeit lediglich sagen, dass SM-Proteine innerhalb des Traffickings sehr wahrscheinlich auf den Schritt der SNARE-Komplexbildung wirken, und weitere Funktionen besitzen, die von dieser unabhängig sind.

1.5.4 Ypt/Rab-Proteine

Ypt/Rab-Proteine sind kleine GTPasen, die zur Protein-Superfamilie der Ras-ähnlichen GTPasen gehören und hierin die größte Untergruppe bilden. Sie können in zwei unterschiedlichen Formen vorliegen: einer inaktiven, GDP-gebundenen oder einer aktiven, GTP-gebundenen Form. Innerhalb der Zelle zeigen sie eine klare subzelluläre Verteilung (Simons und Zerial, 1993) und haben eine Schlüsselrolle bei der Regulation von Transportprozessen (Chavrier und Goud, 1999; Schimmoller *et al.*, 1998).

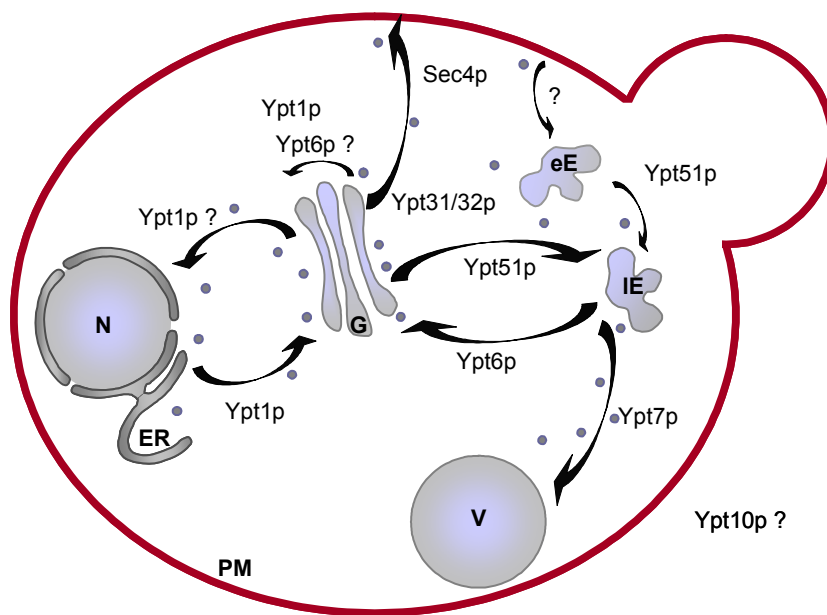


Abb. 9: Ypt-Proteine in der Bäckerhefe. In *S.cerevisiae* sind 11 Ypt-Proteine bekannt, von welchen neun an verschiedenen Transportschritten beteiligt sind. Die Funktion von Ypt10p ist unbekannt. Von den drei funktionell sehr ähnlichen GTPasen Ypt51p, Ypt52p und Ypt53p ist in der Abbildung der Übersichtlichkeit wegen nur Ypt51p dargestellt. N: Zellkern, ER: Endoplasmatisches Retikulum; G: Golgi-Apparat; E: Endosom; V: Vakuole; PM: Plasmamembran

In *S. cerevisiae* sind 11 Ypt -Proteine (yeast protein transport) bekannt (Abb. 9). Neun dieser Proteine konnte bisher eine klar definierte Rolle in verschiedenen Transportschritten zugeschrieben werden (Lazar *et al.*, 1997). Die Proteine Ypt1p (Gallwitz *et al.*, 1983), Ypt31/32p (Benli *et al.*, 1996) und Sec4p (Salminen und Novick, 1987) sind an der sekretorischen Transportroute beteiligt. Von den verbleibenden fünf Ypt-Proteinen sind vier (Ypt51/52/53p und Ypt7p) an der endozytotischen Route beteiligt (Horazdovsky *et al.*, 1994; Singer-Kruger *et al.*, 1994; Wichmann *et al.*, 1992). Ypt6p ist am retrograden Transport beteiligt, doch erstreckt sich der entsprechende der Transportbereich vom Endosom zum ER, weshalb die genaue Funktion dieser GTPase weiterhin unklar ist (Li und Warner, 1996; Luo und Gallwitz, 2003). Für die Lebensfähigkeit von Hefezellen sind nur die an der Exozytose beteiligten Ypts essentiell. Kürzlich wurde gezeigt, dass Ypt11p mit dem Myosin Myo2p sowohl genetisch, als auch biochemisch interagiert und an der Verteilung von Mitochondrien

auf Tochterzellen beteiligt ist (Itoh *et al.*, 2004; Itoh *et al.*, 2002). Im Gegensatz zur Bäckerhefe sind in Säugerzellen weit über 50 Rab-(**R**as genes from rat **b**rain)-Proteine bekannt (Bock *et al.*, 2001; Pereira-Leal und Seabra, 2000). Die unterschiedliche Anzahl an Ypt/Rab-Proteinen in Hefe und Säugern beruht vor allem darauf, dass Säugerzellen eine Reihe von Rabs enthalten, die entweder nur in Zellen mit spezialisierten Funktionen vorkommen oder nur an einzelnen Entwicklungsstadien beteiligt sind. Hinsichtlich ihrer Aminosäuresequenz, Funktion und Lokalisation sind Ypt/Rab-Proteine dagegen konserviert.

Ypt/Rabs interagieren mit einer Vielzahl von Effektorproteinen, die trotz der Konservierung der GTPasen selbst, keine oder nur geringe Homologien aufweisen. Sog. GEF (**g**uanine nucleotide exchange **f**actor)-Proteine aktivieren die Umwandlung der GDP-gebundenen Form des Ypts in die GTP-gebundene, während die Hydrolyse von GTP, und damit die Rückführung in den GDP-gebundenen Zustand, durch sog. GAP (**G**TPase **a**ctivating **p**rotein)-Proteine stimuliert wird. Das Wechseln von Ypts zwischen der zytosolischen und der membrangebundenen Form regulieren zwei weitere Faktoren. GDI (**G**DP-**d**issociation-**i**nhibitor)-Faktoren ziehen GDP-gebundene Ypt-Proteine von Membranen ab und führen sie ihrem Donorkompartiment zurück. Die noch wenig charakterisierten GDF (**G**DI-**d**isplacement-**f**actor)-Proteine rekrutieren Ypts an spezifische Donormembranen.

In der Hefe sind derzeit fünf GEF-Proteine bekannt, die neun Ypts zugeordnet werden (Tab. 2) (Hama *et al.*, 1999; Jones *et al.*, 2000; Siniosoglou *et al.*, 2000; Walch-Solimena *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2000; Wurmser *et al.*, 2000), sowie acht GAPs (Gyp1p – Gyp8p) (Albert und Gallwitz, 1999; Albert und Gallwitz, 2000; De Antoni *et al.*, 2002; Du *et al.*, 1998; Strom *et al.*, 1993; Vollmer *et al.*, 1999), die *in vitro* meist keine eindeutige Spezifität für ein bestimmtes Ypt-Protein zeigen und *in vivo* nicht essentiell sind (Bi *et al.*, 2000; Richardson *et al.*, 1998).

GTPase	GEF	GAP
Ypt1p	TRAPP	Gyp1, Gyp3p, Gyp5, Gyp7p, Gyp8p
Ypt31/32p	TRAPP	Gyp3p, Gyp7p
Sec4p	Sec2p	Gyp2p, Gyp3p, Gyp4p
Ypt51p	Vps9p	Gyp3p
Ypt6p	Ric1p/Rgp1p	Gyp2p, Gyp3p, Gyp4p
Ypt7p	Vps39p (HOPS)	Gyp4p, Gyp7p

Tabelle 2: Regulatoren von Ypt-Proteinen. In der Tabelle sind die jeweiligen GEF (guanine nucleotide exchange factor)- und GAP (GTPase activating protein)-Regulatoren der einzelnen Ypt-GTPasen zusammengefaßt. Von den drei funktionell sehr ähnlichen GTPasen Ypt51p, Ypt52p und Ypt53p ist nur Ypt51p aufgelistet.

Ebenso wie SNARE-Proteine durchlaufen auch Ypt/Rab-Proteine, unter Einbeziehung ihrer verschiedenen Effektoren, einen Kreisprozeß, den sog. „Rab-Zyklus“. Damit beinhalten Fusionsereignisse zwei, wahrscheinlich miteinander verbundene, konservierte Kreisprozesse (Jahn *et al.*, 2003). Ypt-Proteine interagieren über C-terminale Geranylgeranyl-Einheiten mit Membranen und wandern zusammen mit dem GDI-Protein (GDP-dissassoziations-Inhibitor) durch das Zytoplasma. Im klassischen Rab-Zyklus (Bourne, 1988; Ferro-Novick und Novick, 1993) wird das Ypt-GDP durch das GDI an die Donormembran gebracht (Wu *et al.*, 1996). Dort interagiert das Ypt mit einem GEF-Faktor, wodurch es zum Austausch von gebundenem GDP gegen GTP kommt. Das nun aktivierte, über eine c-terminale Geranylgeranyl-Einheit mit der Membran verbundene, Ypt-GTP wird in das Transportvesikel eingebaut und zum Zielkompartiment transportiert. Hier ist das Ypt in einer von der GTP-Hydrolyse abhängigen Weise am „Targeting“ beteiligt. Nach der Hydrolyse von GTP wird das GDP-Ypt durch GDI wieder aus der Membran entfernt und zur Donormembran transportiert, wo es für ein weiteres „Vesikeltargeting“ zur Verfügung steht. Jedoch stellte die Beobachtung, dass Rab-Proteine, die mittels einer Transmembrandomäne irreversibel membranverankert sind immer noch funktional sind (Ossig *et al.*, 1995) die funktionale Bedeutung des Zirkulierens von Rab-Proteinen zwischen Donor- und Akzeptormembran in Frage. Des Weiteren zeigen neuere

Untersuchungen, dass der Wirkungsort von Rab-Proteinen nicht die Donor- sondern die Akzeptormembran ist (Cao und Barlowe, 2000; Lupashin und Waters, 1997), was die funktionale Bedeutung der gut dokumentierten Assoziation von Rab-Protein und Vesikel relativiert.

Ursprünglich nahm man an, dass Ypts in den der Vesikelbildung anschließenden Transportschritten „Targeting“ und „Tethering“ beteiligt sind (Salminen und Novick, 1987). Da SNARE-Proteine aufgrund ihrer promiscuen Interaktionen primär nicht am spezifischen „Tethering“ von Transportvesikeln an Akzeptormembranen beteiligt sind, wären Rabs ausgezeichnete Kandidaten, um Ereignisse, die vor der Bildung von *trans*-SNARE-Komplexen stattfinden, zeitlich und räumlich zu dirigieren. Auch ging man zunächst davon aus, dass ein bestimmtes Ypt-Protein einen individuellen Transportschritt reguliert, doch wurde in Hefe und Säugerzellen eine Beteiligung einzelner Ypts an mehreren Transportschritten beobachtet. So ist Ypt1p am „Targeting“ vom ER zum *cis*-Golgi sowie innerhalb des Golgi beteiligt (Jedd *et al.*, 1995). Des Weiteren wurde gezeigt, dass auch Ypt51p an zwei Trafficking-Schritten beteiligt ist, die das „Targeting“ zum späten Endosom betreffen (Gerrard *et al.*, 2000). Daher wurden Ypt/Rabs zunächst als Regulatoren des ankommenden und ausgehenden Transports an einem bestimmten Kompartiment betrachtet. Im Laufe der Zeit wurde jedoch deutlich, dass Ypts an vielen unterschiedlichen Teilschritten des vesikulären Transports beteiligt sind, die sich von der Vesikelbildung (Carroll *et al.*, 2001; Mammoto *et al.*, 2000), über den Transport von Vesikeln zum Donorkompartiment und dem „Tethering“ bis zur Fusion erstrecken. Hinweise dafür, dass Ypts auch eine direkte Rolle bei der Membranfusion spielen könnten, ergeben sich aus der Interaktion von Vac1p, einem Effektor von Ypt51p, mit Vps45p, einem SM-Protein (Peterson *et al.*, 1999; Tall *et al.*, 1999). Dadurch könnten Ypt/Rab-Proteine über einen Effektor die Bildung von *trans*-SNARE-Komplexen regulieren.

Aufgrund der Vielzahl an Interaktionen, die Ypts mit unterschiedlichen Effektor-Proteinen eingehen, sind Ypts in der Lage sowohl in mehreren Transportabschnitten zu wirken, als auch innerhalb eines bestimmten Transportabschnitts unterschiedliche Funktionen wahrzunehmen.

1.6 Zielsetzung und Konzept dieser Arbeit

Zielsetzung dieser Arbeit war, *in vivo* funktionelle Interaktionen von SNARE-Proteinen zu untersuchen. Dazu sollte in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* am Beispiel des Transportes vom ER zum Golgi-Apparat die Gültigkeit der „1R:3Q“ Regel *in vivo* eingehend überprüft werden. Der am Transport vom ER zum Golgi beteiligte SNARE-Komplex setzt sich aus den Proteinen Sec22p, Sed5p, Bos1p und Bet1p zusammen. Zwei dieser Proteine wurden in weiteren SNARE-Komplexen isoliert. Das R-SNARE Sec22p ist am retrograden Transport vom Golgi zurück zum ER beteiligt, das Qa-SNARE Sed5p ist zusätzlich am *intra*-Golgi-Transport involviert. Diese „multifunktionalen“ SNAREs erschweren die eindeutige Zuordnung einzelner SNARE-Proteine zu einem bestimmten Transportabschnitt.

Verschiedene rotationssymmetrische Substitutionen wurden in der '0'-Ebene der einzelnen ER-Golgi SNAREs mittels zielgerichteter Mutagenese eingeführt und Hefemutanten erzeugt, deren ER-Golgi SNARE-Komplex unterschiedliche R:Q Verhältnisse aufweisen. Die einzelnen Hefemutanten wurden näher charakterisiert indem die Effekte der verschiedenen R:Q Stöchiometrien innerhalb der '0'-Ebene auf das Wachstumsverhalten, den intrazellulären Transport, sowie die Lokalisation und Sekretion weiterer Proteine in den jeweiligen Hefestämmen untersucht wurden.