

1 Einleitung

Eukaryontische Zellen enthalten eine Vielzahl membranumschlossener Organellen, die untereinander und mit der Plasmamembran in einem ständigen Austausch von Protein- und Lipidkomponenten stehen. Dieser gerichtete Transport ist ein zentraler Prozeß für die Aufrechterhaltung der inneren Organisation der Zelle und damit ihrer Funktionsfähigkeit. Er erfolgt durch Lipidvesikel, die vom Ausgangskompartiment abgeschnürt werden und nach vektoriellem Transport in der Zelle mit dem Zielorganell fusionieren. Dies erfordert die selektive Erkennung der beiden Fusionspartner, eine Bindung der Membranen aneinander, die auch als *tethering* oder *docking* bezeichnet wird, und schließlich die Fusion ihrer Lipiddoppelschichten.

Erste Erkenntnisse über den intrazellulären vesikulären Transport, der auch als *membrane trafficking* bezeichnet wird, wurden durch Untersuchungen sekretorischer Prozesse in exokrinen Zellen des Pankreas gewonnen. Hier wurde die Hypothese des *protein targeting* aufgestellt, des gezielten Transportes von neu synthetisierten Proteinen aus dem Endoplasmatischen Reticulum (ER) zu ihrem Bestimmungsort (Palade, 1975). Man unterscheidet grundsätzlich den biosynthetisch-sekretorischen Weg, durch den neu synthetisierte Proteine vom ER über den Golgi-Apparat und sekretorische Vesikel zur Plasmamembran gelangen und dort exozytiert werden, und den endozytotischen Weg, der von der Plasmamembran über frühe und späte Endosomen zu den Lysosomen führt. Daneben bestehen zahlreiche weitere Transportrouten: Endozytierte Moleküle können direkt oder über Recycling-Endosomen zurück zur Plasmamembran gelangen. Vom Golgi-Apparat führen Transportwege zu frühen und späten Endosomen sowie zum ER. Dabei stellen Golgi-Apparat und frühe Endosomen zentrale Sortierstationen für Proteine und Lipide in der Zelle dar. Abb. 1 zeigt eine Übersicht über die Komponenten des intrazellulären Transports in eukaryontischen Zellen.

Die verschiedenen Formen der Endozytose und die am endozytotischen Weg beteiligten Organellen sowie die Mechanismen der Membranfusion zwischen den Organellen sollen in den folgenden Kapiteln näher beschrieben werden.

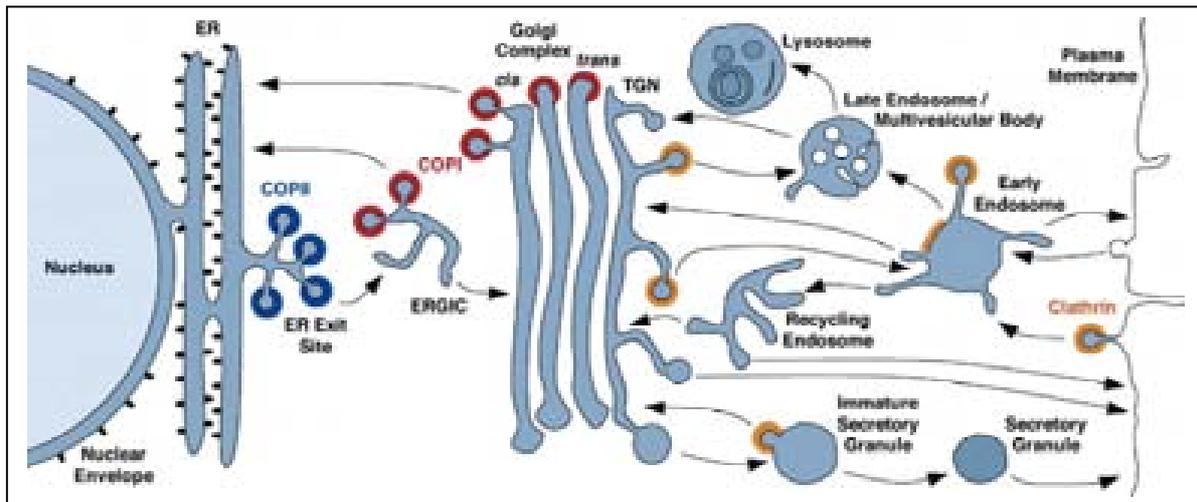


Abb. 1: Übersicht über die intrazellulären Transportwege (Bonifacino und Glick, 2004). Das Schema zeigt die Bestandteile des biosynthetisch-sekretorischen und endozytotischen Weges in eukaryontischen Zellen. Alle Transportwege sind durch Pfeile dargestellt, die am jeweiligen Abschnürungsschritt beteiligten Coat-Proteine sind rot (COPI), blau (COPII) und orange (Clathrin) markiert. ER, Endoplasmatisches Reticulum; ERGIC, ER-Golgi *intermediate compartment*; COP, *coat protein*, TGN, *trans golgi network*.

1.1 Endozytose

Endozytose bezeichnet die Aufnahme von Molekülen, Makromolekülen und größeren Partikeln in die Zelle. Sogar ganze Zellen können von bestimmten Zelltypen internalisiert werden. Dies geschieht mit Hilfe von Transportvesikeln, die von der Plasmamembran ins Zellinnere abgeschnürt werden. Endozytose gewährleistet die kontrollierte und selektive Aufnahme extrazellulärer Substanzen in die Zelle und spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Zellen und Geweben, der Immunantwort, der Signaltransduktion und der Kommunikation zwischen den Zellen. Auch an der neuronalen Signalübertragung ist sie beteiligt (Mellman, 1996). Bei der Abwehr von Mikroorganismen bietet sie eine wirksame Verteidigung, allerdings kann der endozytotische Weg auch von pathogenen Mikroorganismen und Viren zum Eintritt in die Zelle genutzt werden. Einige bakterielle Toxine werden ebenfalls endozytotisch von der Zelle aufgenommen (Mukherjee *et al.*, 1997). Man unterscheidet zwei Formen der Endozytose: Phagozytose (*cell eating*) und Pinozytose (*cell drinking*). Abb. 2 zeigt eine Übersicht über die verschiedenen Formen von Endozytose in eukaryontischen Zellen.

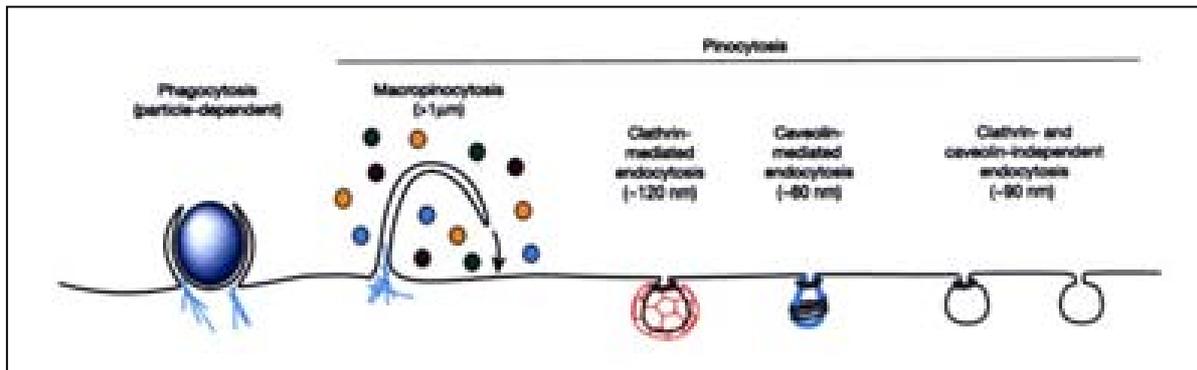


Abb. 2: Übersicht der verschiedenen Formen von Phagozytose und Pinozytose (Conner und Schmid, 2003). Angegeben sind jeweils die Größen der internalisierten Vesikel bei den verschiedenen Endozytoseformen.

1.1.1 Phagozytose

Durch Phagozytose werden größere Partikel über 0,5 µm Durchmesser internalisiert. Neben phagozytotischen Protozoen besitzen auch eine Reihe von eukaryontischen Zellen die Fähigkeit zur Phagozytose, darunter Leukozyten und Makrophagen des Immunsystems. Diese werden auch als Phagozyten bezeichnet. Während Phagozytose in Protozoen vermutlich vorwiegend der Nahrungsaufnahme dient (Cohen *et al.*, 1994), bildet sie in Säugetieren vor allem eine erste Verteidigungslinie gegen Pathogene wie Bakterien und ist zur gezielten Entsorgung toter oder entarteter Zellen und extrazellulärer Ablagerungen unerlässlich. Phagozytose wird über zahlreiche Zelloberflächenrezeptoren vermittelt, unter anderem durch den Fc-Rezeptor, der mit IgG-Molekülen markierte Partikel erkennt. Nach Bindung des Rezeptors an Liganden auf der Partikeloberfläche kommt es zu einer lokal begrenzten Aktin-Polymerisation und der Internalisierung des Partikels als Phagosom. Nach der Internalisierung verlieren die Phagosomen die Aktinhülle und reifen durch Fusionsereignisse mit Vesikeln des endozytotischen Weges zu reifen Phagolysosomen, in denen der Inhalt durch zahlreiche saure Hydrolasen abgebaut wird (Allen und Aderem, 1996; Aderem und Underhill, 1999).

1.1.2 Pinozytose

Pinozytose, die Aufnahme von extrazellulärer Flüssigkeit, findet in nahezu allen eukaryontischen Zellen kontinuierlich statt. Dabei kann die Zelle binnen kurzer Zeit einen Großteil ihres Volumens an extrazellulärer Flüssigkeit und darin gelöster Stoffe

internalisieren. Dieser Prozeß wird auch als *Fluid phase*-Endozytose bezeichnet. Dabei ist die Menge der aufgenommenen Stoffe direkt proportional zu ihrer Konzentration in der extrazellulären Flüssigkeit. Durch unspezifische Bindung an die Plasmamembran kann die Endozytose-Effizienz erhöht werden (adsorptive Endozytose). Beide Formen werden auch als konstitutive (ligandenunabhängige) Endozytose bezeichnet. Die effizienteste Möglichkeit zur Internalisierung bietet jedoch die Bindung von Substanzen an Rezeptoren auf der Plasmamembran (rezeptorvermittelte Endozytose).

Es existieren mindestens vier Formen der Pinozytose in eukaryontischen Zellen: 1. Makropinozytose, 2. Clathrin-abhängige Endozytose, 3. Caveolae-vermittelte Endozytose, 4. Clathrin- und Caveolae-unabhängige Endozytose (Conner und Schmid, 2003).

1.1.2.1 Makropinozytose

Bei der Makropinozytose fusionieren lange, aktinhaltige Membranausstülpungen mit der Plasmamembran und schließen dabei große Mengen der extrazellulären Flüssigkeit ein. Die Ausstülpung der Membran kann durch Zytocalasin und Nocodazol gehemmt werden, daher scheinen neben Aktinfilamenten auch Mikrotubuli daran beteiligt zu sein (Racoosin und Swanson, 1992; Swanson und Watts, 1995). In RBL-Zellen wurden nach Makropinozytose kometenförmige Aktinschwänze an Vesikeln gefunden, die vermutlich am Abknospungsprozeß beteiligt sind (Merrifield *et al.*, 1999). Makropinosomen können eine Größe von über 1 µm erreichen und internalisieren durch ihr geringeres Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis gelöste Stoffe in der extrazellulären Flüssigkeit wesentlich effektiver als kleinere Vesikel. In Makrophagen reifen sie zunächst durch die Fusion mit endosomalen Vesikeln, schrumpfen durch den Verlust von Wasser und fusionieren schließlich mit Lysosomen (Racoosin und Swanson, 1993). In humanen A431-Zellen zeigen Makropinosomen dagegen kaum Interaktionen mit endosomalen Kompartimenten und scheinen eine eigene Endosomenpopulation zu bilden (Hewlett *et al.*, 1994). Auf ihrem Weg von der Plasmamembran ins Zellinnere wandern sie entlang von Mikrotubuli (Allen und Aderem, 1996). Dabei ähneln sie in ihrer Zusammensetzung zunächst frühen, dann späten Endosomen. Dieser Prozeß dauert etwa 5-20 Minuten. Anschließend werden die Membranbestandteile der Makropinosomen wiederverwertet, indem sie vermutlich über andere Organellen zurück zur Plasmamembran gelangen und dort durch Exozytose eingefügt werden (Nichols und Lippincott-Schwartz, 2001).

Makropinozytose kann vorübergehend in den meisten Zellen induziert werden und spielt eine Rolle bei der schnellen Herunterregulierung von aktivierten Signalmolekülen. Durch Aktivierung der Rho-GTPase Rac und der p21-aktivierten Kinase (PAK) induzierte Makropinozytose ist möglicherweise an der Zell-Migration beteiligt (Ridley, 2001). Auch einige Bakterien wie *Salmonella* und *Shigella* nutzen diesen Weg zum Eintritt in die Zelle, indem sie Toxine injizieren, die Rho-GTPasen aktivieren und Makropinozytose induzieren (Steele-Mortimer *et al.*, 2000). In Synapsen neuronaler Zellen wurde neben Clathrin-abhängiger Endozytose eine Form der Makropinozytose gefunden, die vermutlich nicht essentiell am Recycling synaptischer Vesikel beteiligt ist, möglicherweise aber eine Rolle für die strukturelle und funktionale Plastizität der synaptischen Endigung spielt (Holt *et al.*, 2003).

1.1.2.2 Clathrin-abhängige Endozytose

Die Clathrin-abhängige Endozytose ist der zuerst entdeckte und bei weitem am besten charakterisierte Weg zur Internalisierung von extrazellulären Molekülen in die Zelle. Die frühere Bezeichnung als „rezeptorvermittelte Endozytose“ ist nicht ganz korrekt, da die meisten pinozytotischen Wege Interaktionen von Liganden mit ihren Rezeptoren einschließen. Die Clathrin-abhängige Endozytose dient der kontinuierlichen Aufnahme essentieller Substanzen wie z.B. Eisen, das im Komplex mit Transferrin durch Bindung an Transferrinrezeptoren in die Zelle transportiert wird (Li und Qian, 2002). Weitere bedeutende Funktionen der Clathrin-abhängige Endozytose sind die Regulation der Signaltransduktion durch Kontrolle der Expression von Zelloberflächenrezeptoren und die Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase durch Regulation der Internalisierung von Membran-Pumpen für bestimmte Ionen und andere kleinere Moleküle (Brown und Sabolic, 1993; Cavalli *et al.*, 2001; Clague und Urbe, 2001; McPherson *et al.*, 2001). Daneben ist sie am Recycling von synaptischen Vesikeln beteiligt (De Camilli und Takei, 1996; s. auch Kap. 1.2.1).

Die Clathrin-abhängige Endozytose erfolgt über charakteristische Strukturen, Clathrin-coated Pits und Clathrin-coated Vesicles. Coated Pits werden nicht an der gesamten Plasmamembran gefunden, sondern treten gehäuft an sogenannten endozytotischen *hot spots* auf, deren Organisation zumindest teilweise durch Aktinfilamente erfolgt (Qualmann *et al.*, 2000; Qualmann und Kessels, 2002). Die Clathrin-abhängige Endozytose läßt sich in

verschiedene Schritte unterteilen: Lokale Ansammlung der endozytotischen Maschinerie an der Plasmamembran, Deformation und Einstülpung der Membran (Bildung von Coated Pits), Abschnürung der Coated Pits von der Membran (Bildung von Coated Vesicles), Transport der Coated Vesicles ins Zytoplasma, Verlust des Protein-Coats und Reifung zu endozytotischen Vesikeln.

Es existiert eine Reihe bekannter Internalisierungssequenzen in der zytoplasmatischen Domäne von Transmembranrezeptoren, zum Beispiel ein Tyrosinrest in einer bestimmten Position, ein Dileucin- oder Dilysinmotiv oder eine Folge saurer Aminosäuren. (Kirchhausen *et al.*, 1997). Daneben kann auch Monoubiquitinierung der zytoplasmatischen Domäne als Internalisierungssignal dienen (Strous und Govers, 1999; Haglund *et al.*, 2003; Hicke und Dunn, 2003). Diese Internalisierungssequenzen werden von sogenannten *assembly proteins* (APs) erkannt, die Bestandteile des Vesikel-Coats sind. Es existieren zwei Klassen von strukturell und funktionell verschiedenen APs: Das monomere AP180 und die heterotetrameren AP-Komplexe. An der Clathrin-abhängigen Endozytose ist neben AP180 der AP2-Komplex beteiligt. Eine Untereinheit von AP2 interagiert mit Clathrin, einem weiteren Coat-Protein, das in einer dreibeinigen Struktur, dem sogenannten Triskelion, in der Zelle vorliegt, die aus je drei schweren und leichten Clathrin-Ketten besteht und nach Bindung an den AP2-Komplex in polyedrische Gitterstrukturen polymerisiert (Pishvaei und Payne, 1998). Das Zusammenwirken von Clathrin, AP2-Komplex und weiterer Faktoren wie PIP₂, AP180, Eps15, Epsin und Intersectin führt zu einer Einstülpung der Plasmamembran und der Bildung des Coated Pits (von Poser *et al.*, 2000; Takei und Haucke, 2001).

Für die weitere Reifung und anschließende Abschnürung des Coated Pits von der Plasmamembran sind vor allem Dynamin und Amphiphysin von Bedeutung. Dynamin ist eine GTPase, die im Zytosol als Homotetramer vorliegt (McNiven *et al.*, 2000; Brodsky *et al.*, 2001). Über eine Pleckstrin-homologe Domäne interagiert Dynamin mit PIP₂ und bindet dadurch an die Plasmamembran. Nach Assoziation mit der Plasmamembran oligomerisiert Dynamin zu Ringstrukturen, wobei durch Aktivierung seiner GTPase-Effektordomäne die GTPase-Aktivität um das 50-100fache gesteigert wird. Dies ermöglicht eine Abschnürung des Coated Pits von der Plasmamembran und die Bildung eines Coated Vesicles (Damke *et al.*, 1994; Takei *et al.*, 1995; Sever *et al.*, 2000; Kozlov, 2001). In *in vitro*-Liposomenassays wurde eine Bindung von Amphiphysin an Clathrin gefunden, zudem bindet es an den AP2-Komplex und über eine Lipid-Bindestelle an Membranen. Es bildet so einen molekularen

Linker zwischen den einzelnen Coat-Bestandteilen und der Plasmamembran (Farsad *et al.*, 2003). Über die Membranbindung beeinflusst es zusätzlich die Membrankrümmung (Takei *et al.*, 1999; Farsad *et al.*, 2001).

Nach Abschnürung von der Membran verlieren die Coated Vesicles ihren Coat, um eine Fusion mit ihren Zielkompartimenten zu ermöglichen und die Coat-Komponenten erneut für die Endozytose zugänglich zu machen. Dabei wird zunächst das Chaperon Hsc70 (*heat shock cognate protein of 70 kDa*) durch den Kofaktor Auxilin an die Vesikelmembran rekrutiert, um den Clathrin-Coat zu entfernen. Dieser Schritt wird möglicherweise durch die Phosphatase Synaptojanin reguliert, die wiederum mit Endophilin interagieren kann. Die AP2-Komplexe werden ebenfalls durch Hsc70 in Zusammenarbeit mit weiteren zytosolischen Faktoren entfernt. Hsc70 selbst bleibt anschließend mit den Clathrin-Triskelions assoziiert, die so für die erneute Zusammenlagerung in Gitterstrukturen bereitgestellt werden (Cremona *et al.*, 1999; Lemmon, 2001; Takei und Haucke, 2001).

1.1.2.3 Caveolae-vermittelte Endozytose

Caveolae wurden zunächst morphologisch als flaschenförmige Einstülpungen der Plasmamembran beschrieben (Yamada, 1955). In den folgenden Jahrzehnten wurden eine Reihe biochemischer Eigenschaften von Caveolae definiert: Resistenz gegen Solubilisierung durch Detergenzien wie Triton X-100, reduzierte Dichte im Vergleich zu anderen Regionen der Plasmamembran, Anreicherung von Glykosphingolipiden, Cholesterol und Membranproteinen (Anderson, 1998). Diese Eigenschaften teilen sie mit *lipid rafts*, ebenfalls spezialisierten Plasmamembrandomänen, sie lassen sich aber durch die spezifische Lokalisation von Caveolin, dem Markerprotein der Caveolae, unterscheiden. Caveolae erfüllen eine Vielzahl von Funktionen in der Zelle, so sind sie an der intrazellulären Cholesterol-Homöostase und der Signaltransduktion beteiligt (Razani *et al.*, 2002). Liganden wie Simian Virus 40 können eine Signalkaskade aktivieren und so ihre Aufnahme in die Zelle über Caveolae induzieren (Pelkmans *et al.*, 2002). An der Caveolae-vermittelten Endozytose scheinen sowohl Dynamin als auch Aktinfilamente beteiligt zu sein. In den meisten Zellen werden Caveolae relativ langsam internalisiert und die entstehenden kleinen Vesikel von 50-60 nm Durchmesser enthalten wenig Volumen. Daher scheint die Caveolae-vermittelte Endozytose nicht an der Internalisierung großer Mengen extrazellulärer Flüssigkeit beteiligt zu sein (Conner und Schmid, 2003).

1.1.2.4 Clathrin- und Caveolae-unabhängige Endozytose

Neben den bereits beschriebenen Endozytoseformen existieren bisher wenig charakterisierte Formen der Clathrin- und Caveolae-unabhängigen Endozytose. In HeLa-Zellen mit Temperatur-sensitiven Dynamin-Mutanten wird die *Fluid phase*-Endozytose bei nicht-permissiver Temperatur inhibiert, jedoch nach 30-60 min durch einen Clathrin- und Dynamin-unabhängigen Mechanismus ersetzt (Damke *et al.*, 1995). Der Interleukin 2-Rezeptor und der Diphtherie-Toxin-Rezeptor werden ebenfalls über einen Clathrin- und Caveolin-unabhängigen Weg internalisiert (Skretting *et al.*, 1999; Lamaze *et al.*, 2001). Auch in Neuronen und neuroendokrinen Zellen wurden Clathrin-unabhängige Mechanismen der Endozytose gefunden, die an der schnellen Wiederaufnahme von exozytotisch in die Plasmamembran eingefügten Proteinen beteiligt sind. Sie treten vermutlich nur während starker und dauerhafter Stimulation der Zellen gegenüber der Clathrin-abhängigen Endozytose in den Vordergrund (Artalejo *et al.*, 2002).

1.2 Der endozytotische Weg

Die Identifizierung der Kompartimente des endozytotischen Weges gelang in den 1980er Jahren durch morphologische und biochemische Untersuchungen. Endozytierte Moleküle werden zunächst über endozytotische Vesikel in frühe Endosomen transportiert, wo die meisten beschriebenen Pinozytosewege konvergieren. Anschließend gelangen sie entweder über den Degradationsweg in die späten Endosomen und schließlich in die Lysosomen, wo sie abgebaut werden, oder über den Recycling-Weg zurück zur Plasmamembran. Daneben existieren weitere Transportwege, zum Beispiel von frühen Endosomen zum Golgi-Apparat oder direkt zurück zur Plasmamembran (s. auch Abb. 1). Es wurden zudem Fusionsereignisse der Organellen dieser Transportwege untereinander gefunden, dabei bezeichnet man die Fusion gleicher Organellen als homotypisch, die sequentieller Organellen wie endozytotischer Vesikel mit frühen Endosomen als heterotypisch.

1.2.1 Recycling von synaptischen Vesikeln

In Neuronen findet sich ein Spezialfall des endozytotischen Weges. Hier können synaptische Vesikel zahlreiche Zyklen von Exozytose und Recycling durchlaufen. In unstimulierten Nervenendigungen sind die Bestandteile der endozytotischen Maschinerie kreisförmig um die Areale der Plasmamembran angeordnet, in denen Exozytose der synaptischen Vesikel

stattfindet (Roos und Kelly, 1999; Jarousse und Kelly, 2001). Es werden zwei unterschiedliche Modelle diskutiert. Nach dem sogenannten *kiss-and-run*-Modell öffnet sich nach der Membranfusion lediglich eine Fusionspore, durch die der Neurotransmitter in den synaptischen Spalt gelangt. Anschließend schließt sich die Pore wieder, ohne daß die Membranbestandteile des Vesikels in die Plasmamembran eingefügt werden (Klingauf *et al.*, 1998). Dabei mischen sich die synaptischen Vesikel nicht mit endosomalen Kompartimenten (Murthy und Stevens, 1998). Synaptische Vesikel können auch vollständig mit der Plasmamembran fusionieren, wobei die Membranbestandteile anschließend durch Endozytose recycelt werden. Dabei werden Clathrin-coated Vesicles als Intermediate gefunden. Allerdings ist unklar, ob diese nach Verlust des Coats direkt als synaptische Vesikel vorliegen oder über ein endosomales Kompartiment recyceln, von dem synaptische Vesikel abgeschnürt werden (Takei *et al.*, 1996). Dieser Recyclingweg wäre deutlich langsamer als das *kiss-and-run*-Modell (Cousin und Robinson, 1999; Gundelfinger *et al.*, 2003). In neuroendokrinen PC12-Zellen konnte gezeigt werden, daß auf frühen Endosomen Proteine der regulierten Exozytose von *synaptic like microvesicles* (SLMVs) recyceln (Holroyd *et al.*, 1999). Möglicherweise existieren beide Recyclingwege in Synapsen, um sowohl ein schnelles Recycling zu ermöglichen als auch durch das endosomale Kompartiment eine Kontrolle der korrekten Zusammensetzung der synaptischen Vesikel sicherzustellen.

1.2.2 Frühe Endosomen und Recycling-Endosomen

Auf ihrem Weg in die Zelle gelangen internalisierte Moleküle durch Fusion der endozytotischen Vesikel nach ca. 1-10 min in die frühen Endosomen, die eine erste Sortierstation in der Zelle darstellen und daher auch als *sorting endosomes* bezeichnet werden. Sie sind vorwiegend in der Zellperipherie nahe der Plasmamembran lokalisiert (Luzio *et al.*, 2001). In ihrem Inneren herrscht ein pH-Wert von ca. 6,0, der durch eine ATPase in der Membran aufrechterhalten wird und ausreicht, um zahlreiche Liganden von ihren Rezeptoren zu dissoziieren. Zudem enthalten Endosomen zahlreiche saure Hydrolasen, für deren Aktivität der niedrige pH-Wert essentiell ist (Clague *et al.*, 1994). Sie weisen eine pleiomorphe Organisation auf: Neben tubulären Strukturen mit ca. 60 nm Durchmesser und einer Länge von bis zu 4 µm weisen sie größere Vesikel mit einem Durchmesser von 300-400 nm auf. Ihre Morphologie kann zudem in verschiedenen Zelltypen stark variieren (Marsh *et al.*, 1986; Gruenberg, 2001). Auf den Vesikeln wurden zahlreiche