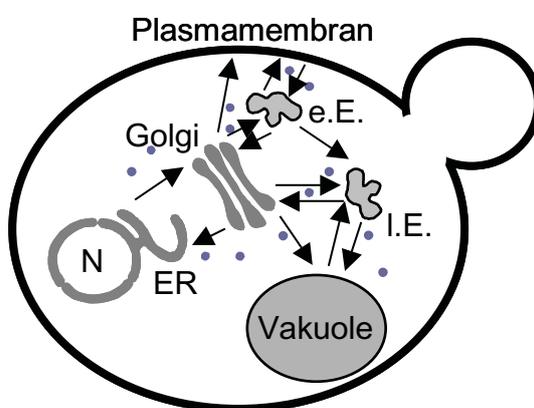


# 1 Einleitung

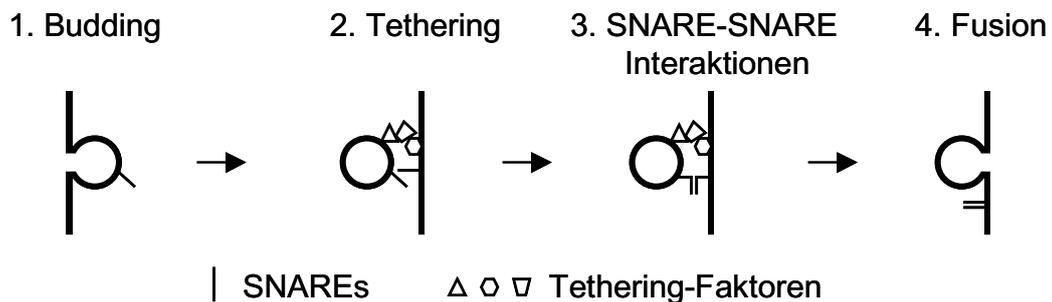
## 1.1 Intrazellulärer Vesikeltransport von Proteinen in eukaryotischen Zellen

Die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* ist ein einzelliger Organismus der Gruppe der Eukaryoten. Obwohl sich Hefe- und Säugerzellen in ihrer Zellgröße deutlich von einander unterscheiden, besitzen sie einen sehr ähnlichen Aufbau. Die Art und Funktion der Zellorganellen wie z.B. des endoplasmatischen Retikulums (ER), des Golgi-Apparats, der Endosomen und der Lysosomen (= Vakuole in Hefen) sind weitestgehend ähnlich. Der intrazelluläre Transport zwischen diesen verschiedenen Zellkompartimenten wird durch kleine ( $\varnothing$  50-100 nm) membranumschlossene Strukturen vermittelt, die als Transportvesikel bezeichnet werden (Palade, 1975). In Abbildung 1 sind die verschiedenen Organellen und Transportwege der Hefezelle schematisch dargestellt. Der zielgerichtete Transport von Vesikeln innerhalb dieses Systems ist äußerst wichtig, um sowohl die Struktur als auch die Funktionsfähigkeit der einzelnen membranösen Kompartimente zu gewährleisten. Es werden unter anderem Proteine durch den Transport in Vesikeln zu ihrem Zielkompartiment gebracht, wo sie schließlich ihre Funktion ausüben können. So gelangen beispielsweise Proteine, die von der Zelle sezerniert werden müssen, vom ER über den Golgi-Apparat, wo sie noch weitergehend modifiziert werden können, zur Plasmamembran. Dort werden die Proteine dann durch Exozytose von der Zelle ausgeschleust (Abbildung 1; Übersichten in Mellman und Warren, 2000; Rothman, 1994).



**Abbildung 1: Schematische Darstellung des sekretorischen Vesikel-Transportsystems in *S. cerevisiae*.** Die Pfeile markieren die verschiedenen Wege der Vesikel zwischen den einzelnen Kompartimenten. N, Nucleus (Zellkern); e.E., frühe (*early*) Endosomen; l.E., späte (*late*) Endosomen. Die Vakuole der Hefe entspricht den Lysosomen in höheren Eukaryoten.

Dieser Vesikeltransport muß natürlich mit hoher Spezifität und Effektivität ablaufen, da die Fehlsortierung von Vesikeln zur unnötigen Verschwendung von Energie und zur Störung unzähliger zellulärer Prozesse führen würde. In der Vergangenheit konnten viele Faktoren isoliert und charakterisiert werden, die für eine Direktionalität des Vesikeltransports verantwortlich sind (Bennett und Scheller, 1993; Ferro-Novick und Jahn, 1994; Novick und Zerial, 1997). Der Mechanismus dieses gezielten Transports zwischen den einzelnen Kompartimenten ist prinzipiell identisch, jedoch sind die involvierten Faktoren spezifisch für das jeweilige Organell.



**Abbildung 2: Darstellung der verschiedenen Schritte zwischen Vesikelabschnürung und Fusion mit der Zielfolie.** (1) Abschnürung eines intrazellulären Transportvesikels von der Donormembran (*Budding*). (2) Der Vesikel erreicht die Zielfolie und wird durch verschiedene Faktoren an dieser gebunden (*Tethering*). (3) Durch die Interaktion von  $v$ -SNAREs auf den Vesikeln und  $t$ -SNAREs auf der Zielfolie kommt es zu einer Annäherung und anschließend zur Fusion (4) der beiden Membranen.

Zunächst kommt es zu einer Abschnürung des Vesikels von der Donormembran (*Budding*). Erreicht der Vesikel die Zielfolie (Akzeptormembran), so erfolgt dort eine erste schwache Interaktion zwischen Proteinen (Ankopplungsfaktoren; „Tethering“-Faktoren) des Vesikels und der Zielfolie (*Tethering*). Die Interaktionen zwischen SNARE-Proteinen (s. u.) der beiden Membranen verstärken die Bindung und führen zu einer Annäherung von Vesikel und Zielfolie (*Docking*). Schließlich führen diese SNARE-SNARE Interaktionen zur Fusion der beiden Membranen, wodurch der Inhalt des Vesikels in das Lumen des Akzeptorkompartiments bzw. in die Umgebung der Zelle (Exozytose) abgegeben wird (Abbildung 2).

## 1.2 Transport zwischen dem endoplasmatischen Retikulum und dem Golgi-Apparat

Der Transport von Proteinen zwischen dem endoplasmatischen Retikulum und dem Golgi-Apparat findet in COPII- (*coat protein*) und COPI-umhüllten Vesikeln statt (Bednarek et al., 1996). Das ER besteht aus einem dynamischen Netzwerk von Membranen, das auch Bereiche der äußeren Kernmembran darstellt und somit fest mit dem Kern verbunden ist. Aufgrund der Struktur wird es in glattes und rauhes ER unterteilt. Das rauhe ER stellt den Ort der Proteinsynthese dar und kann somit als Ausgangspunkt für die Sekretion von Proteinen angenommen werden. Der Golgi-Apparat besteht aus einem Stapel flacher Membransäcke, die als *cis*-, *medial*- und *trans*-Region bezeichnet werden. In einem als „Vesikel-Modell“ bezeichneten Szenario verschmelzen vom rauhen ER abgeschnürte Transportvesikel mit der *cis*-Membran des Golgi-Apparats. Der Inhalt wird anschließend durch Transport in Vesikeln über den medialen Bereich in die *trans*-Region (*trans*-Golgi Netzwerk; TGN) weitergegeben. In einem anderen Modell („Reifungsmodell“) wird postuliert, daß der *cis*-Golgi aus Verschmelzung vesikulärer ER-Strukturen hervorgeht. Es wird angenommen, daß die Verschmelzung von COPII-Vesikeln, die am ER gebildet wurden, zu einem sogenannten ERGIC-Bereich (**ER-Golgi intermediate compartment**; Synonym: VTCs; *vesicular tubular clusters*) führt. Durch Verschmelzung dieser ERGIC-Kompartimente entsteht dann der *cis*-Golgi. Aus diesem *cis*-Bereich gehen dann durch Reifung die späteren Golgi-Kompartimente hervor. Vesikel dienen in diesem Modell ausschließlich dem Rücktransport residenter Proteine innerhalb des Golgi-Apparats sowie dem Transport zur Plasmamembran und dem ER (Übersicht in Pelham, 1998). Bisher konnte die Existenz eines derartigen ERGIC-Kompartiments in *S. cerevisiae* Zellen nicht nachgewiesen werden.

Da es für beide Modelle experimentelle Indizien gibt, kann zur Zeit weder das eine noch das andere Modell ausgeschlossen oder favorisiert werden. Ein klarer Hinweis auf eine Reifung von Organellen stammt aus Untersuchungen über die Sekretion von Partikeln (Prokollagen), die zu groß sind, um in Transportvesikel aufgenommen zu werden (Bonfanti et al., 1998). Allerdings steht die hohe Geschwindigkeit des Transports im Widerspruch zu einer Reifung der Golgi-Kompartimente. Mit Hilfe des Reifungsmodells läßt sich auch nicht erklären, daß verschiedene Proteine unterschiedlich schnell den Golgi-Komplex durchlaufen. Aufgrund dieser Tatsachen

ist die Gültigkeit beider Modelle und die daraus resultierende gegenseitige Ergänzung nicht auszuschließen.

### 1.3 Anterograder ER-Golgi Transport

#### 1.3.1 Komponenten und Mechanismus der Bildung von COPII-Vesikel

Der vesikuläre Transport vom ER zum Golgi-Apparat erfolgt durch COPII-Vesikel. Die COPII-Hülle setzt sich aus den folgenden fünf zytosolischen Proteinen zusammen: Sar1p, einem kleinen GTP-bindenden Protein (Barlowe et al., 1993; Nakano und Muramatsu, 1989), und den beiden heterodimeren Komplexen Sec23p/Sec24p bzw. Sec13p/Sec31p (Salama et al., 1993; Barlowe et al., 1994). Diese Komponenten wurden mit Hilfe von Mutanten, die Sekretionsdefekte aufwiesen (*sec*-Mutanten), identifiziert und charakterisiert (Kaiser und Schekman, 1990). Weiterhin konnte durch Untersuchungen der Vesikelbildung in einem Zell-freien System gezeigt werden, daß diese fünf Proteine genügen, *Budding* von künstlichen Membranen zu induzieren (Rexach und Schekman, 1991). In Tabelle 1 sind die Hefepoteine sowie die homologen Säugerproteine aufgeführt.

COPII	Hefe	Säuger	Größe
Sec13-Komplex	Sec13p	hSec13p	~34 kDa
	Sec31p	hSec31p	~150 kDa
Sec23-Komplex	Sec23p	hSec23p	~85 kDa
	Sec24p	hSec24p	~105 kDa
GTPase	Sar1p	Sar1	~21 kDa

**Tabelle 1:** Auflistung der Hüllproteine von COPII-Vesikeln in Hefe- und Säugerzellen. Das angegebene Molekulargewicht in kDa wurde anhand der Aminosäurezusammensetzung berechnet.

Die Bildung der COPII-Vesikel beginnt mit der Aktivierung des Sar1p. Die GDP-Form des Sar1p befindet sich im Zytosol und wird durch die Interaktion mit dem ER-residenten Membranprotein Sec12p an die ER-Membran rekrutiert. Bei Sec12p handelt es sich um den Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor (*guanine nucleotide*