

Intrazelluläre Transportmechanismen – Nobelpreis für Medizin 2013

Kirsten Bacia*

Hefegenetik · Membranen · Membranproteine ·
Rekonstitution · Vesikel

Wie werden Biomoleküle zwischen zellulären Kompartimenten transportiert? Für ihre Forschungsarbeiten zu den molekularen Mechanismen des intrazellulären Vesikeltransports wurden James E. Rothman, Randy W. Schekman und Thomas C. Südhof am 7.10.2013 mit dem Nobelpreis für Physiologie oder Medizin ausgezeichnet.

Die Zellen eukaryotischer Organismen sind nicht nur von einer äußeren Membran, der Plasmamembran, umhüllt. Sie enthalten darüber hinaus innere Kompartimente, die ebenfalls von Membranen umhüllt sind und auf verschiedene Stoffwechselprozesse spezialisiert sind. Die Existenz solcher interner Membranstrukturen wurde schon 1897 von Camillo Golgi (Nobelpreis 1906) mittels Lichtmikroskopie dank einer von ihm entwickelten Färbemethode erkannt. Eine detailliertere Beschreibung gelang George Palade (Nobelpreis 1974) und Mitarbeitern, indem sie sich die wesentlich höhere räumliche Auflösung der Elektronenmikroskopie zu Nutze machten. Palade konnte damit die Route aufzeigen, die von neu-synthetisierten Proteinen auf dem sogenannten sekretorischen Weg durch die Zelle genommen wird: vom endoplasmatischen Retikulum (ER) durch die Zisternen des Golgi-Apparates bis zur Zelloberfläche. Dabei wurde deutlich, dass die Überführung des zellulären Transportgutes von Kompartiment zu Kompartiment von kleinen, membranumschlossenen intrazellulären Containern, den Vesikeln, bewerkstelligt wird.

Aufbauend auf dieser morphologischen Betrachtung gelang es Randy Schekman, James Rothman, Thomas Südhof und weiteren Forschern, wichtige Prinzipien dieses Transportschemas auf molekularer Ebene aufzuklären. Randy Schekman näherte sich dem Problem auf genetischer Ebene. Er orientierte sich an den Arbeiten von Leland H. Hartwell (Nobelpreis 2001), der auf ähnlichem Wege essenzielle Proteine für den Vorgang der Zellteilung identifiziert hatte, und wählte für seine Analyse des intrazellulären Transportes als Modellorganismus ebenfalls die Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*).

Obwohl Schekman noch keine Erfahrung mit genetischen Arbeiten in Hefe besaß, begab er sich mit seinem ersten

Doktoranden, Peter Novick, daran, Hefemutanten zu suchen, die Defekte in der Sekretion aufweisen. Da solche Mutanten nicht überleben können, wenn ein essenzielles Protein des sekretorischen Weges nicht funktionsfähig ist, machten sich die beiden den Effekt der Temperaturempfindlichkeit zu Nutze. Mutationen, die die thermische Stabilität eines Proteins mäßig verringern, erlauben eine Anzucht des Stammes bei 25 °C (permissive Temperatur). Wird die Temperatur aber vorübergehend erhöht (restriktive Temperatur), so zeigen sich die Auswirkungen des Defekts.

Novick und Schekman entdeckten und beschrieben die Auswirkungen einer temperatursensitiven Mutation in einem ersten Gen, dessen Produkt für die Sekretion essenziell ist. Der *sec1*-Stamm wies bei 37 °C eine Ansammlung von zahlreichen Vesikeln auf, die bei der restriktiven Temperatur nicht in der Lage sind, mit der Plasmamembran zu fusionieren (Abbildung 1). Die angestauten Vesikel enthalten Enzymmoleküle, die von der Zelle normalerweise sezerniert werden.^[1]

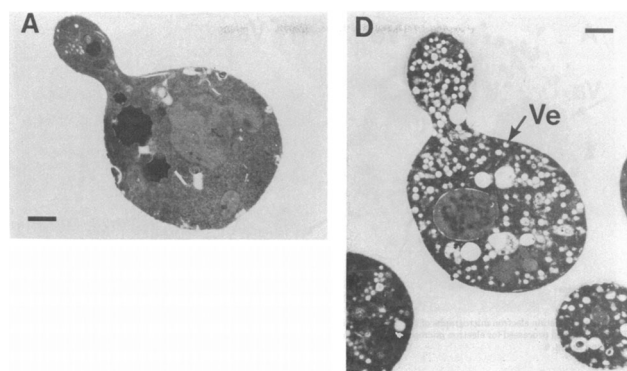


Abbildung 1. Elektronenmikroskopieaufnahmen von *S. cerevisiae* Wildtyp (links) und *sec1-1* Mutante (rechts). Die Mutante weist eine Ansammlung von sekretorischen Vesikeln auf. Maßstabsbalken = 500 nm. [Abdruck nach Lit. [1] mit freundlicher Genehmigung der Autoren.]

Durch die Entwicklung einer Zentrifugationsmethode, mit der sich diejenigen Hefezellen anreichern ließen, in denen sich durch die Blockierung von Schritten im sekretorischen Weg übermäßig viel ER-, Golgi- oder Transportvesikel-Membranen angesammelt hatten, konnten weitere Gene des sekretorischen Weges aufgespürt werden.^[2] Des Weiteren

[*] Jun.-Prof. Dr. K. Bacia

HALOmem, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Kurt-Mothes-Straße 3, 06120 Halle/Saale (Deutschland)
E-Mail: kirsten.bacia@chemie.uni-halle.de
Homepage: <http://www.halomem.de>

wurden Gene identifiziert, deren Produkte für den Einbau von Membranproteinen in die ER-Membran notwendig sind. Die Bedeutung der gefundenen Gene des sekretorischen Weges beschränkt sich dabei keineswegs auf den Organismus Hefe. Da die Transportvorgänge unter den verschiedenen eukaryotischen Spezies auffallend konserviert sind, finden sich zahlreiche Homologe der *SEC*-Gene bei Pflanzen, Tieren und Mensch.

James E. Rothman verwendete einen anderen Ansatz zur Aufklärung des sekretorischen Transportwegs. Während bei dem von Schekman verwendeten genetischen Ansatz die lebende Hefezelle in ihrer Gesamtheit genutzt wird, isolierten Rothman und Mitarbeiter Golgi-Zisternen aus Säugetierzellen und rekonstituierten den Transport zwischen verschiedenen Golgi-Zisternen im Reaktionsgefäß, also „zellfrei“. Dabei machten sie sich geschickt ein virales Glykoprotein (VSV G) und dessen enzymatisch kontrollierte Modifikation mit dem Zucker *N*-Acetylglucosamin zunutze, um den Transportweg dieses Proteins zwischen den Golgi-Zisternen zu verfolgen (Abbildung 2). Sie kombinierten Golgi-Zisternen aus infizierten Zellen, die das virale Protein zwar herstellen, aber – da Zellen mit einem Enzymdefekt genutzt wurden – nicht entsprechend modifizieren konnten und mischten sie mit Golgi-Zisternen aus Zellen, die zwar nicht mit dem Virus infiziert waren, aber die enzymatische Modifikation entsprechend durchführen konnten.^[3] Es ließ sich nachweisen, dass tatsächlich eine Modifikation des viralen Proteins in dieser Mischung stattfand. Offenbar findet also eine Weiterleitung über Transportvesikel statt, ohne dass eine spezielle räumliche Anordnung von Ausgangs- und Zielkompartiment vonnöten ist.

Das von Rothman eingesetzte zellfreie und damit offen zugängliche System erlaubte in der Folge wichtige weitere biochemische Experimente, mit deren Hilfe zwei für die Membranfusion notwendige zytosolische Proteine, nämlich NSF (*N*-ethylmaleimide sensitive factor) und SNAP (soluble NSF attachment protein) identifiziert werden konnten. Es stellte sich heraus, dass die Gene von NSF und SNAP Homologe der von Schekman und Novick ermittelten Gene

SEC18 und *SEC17* sind. Diese Konvergenz der ursprünglich unabhängig voneinander begonnenen Arbeiten von Schekman und Rothman verdeutlichte die Relevanz von Schekmans Hefesystem auch für Säugetierzellen. Sie zeigte außerdem, dass Rothmans zellfreie Experimente eine Aussagekraft für den natürlichen Vorgang besitzen.

Auf NSF und SNAP folgte die Identifizierung von membranverankerten Proteinen, die an SNAP binden und daher SNARE-Proteine (SNAP-Rezeptorproteine) getauft wurden. Diese Proteine waren zuvor schon u. a. in Arbeiten von Richard H. Scheller und Thomas Südhof beschrieben worden. Die neuen Erkenntnisse führten nun zur Aufstellung von Rothmans richtungsweisender „SNARE-Hypothese“, die besagte, dass SNARE-Proteine als ein über die Evolution konservierter Fusionsapparat funktionieren und dass jeweils zueinander passende SNAREs als v-SNARE (Vesikel-SNARE) und t-SNAREs (Zielmembran-SNAREs) die für einander vorgesehenen Membranen fusionieren. (Die Unterteilung in v-SNAREs und t-SNAREs wurde später durch eine strukturbasierte Klassifizierung abgelöst, die sich auch auf Fusionen gleichartiger Vesikel anwenden lässt.^[4])

Zur Frage der genauen Funktion von NSF und SNAP bei der Membranfusion gab es zunächst unterschiedliche Vorstellungen. Bill Wickner und Kollegen zeigten später, dass diese Proteine in einem ATP-abhängigen Vorgang für die Trennung und damit die Regeneration der SNARE-Proteine nach vollzogener Membranfusion gebraucht werden.

Proteine der SNARE-Familie treten in vielerlei intrazellulären Transportschritten auf, beispielsweise in dem von Schekman untersuchten ER-Golgi-Transport, in dem von Rothman untersuchten Transport zwischen verschiedenen Zisternen des Golgi-Apparates, in dem von Bill Wickner untersuchten Fusionsvorgang von Hefevakuolen und auch in dem u. a. von Thomas Südhof und Reinhard Jahn untersuchten Fusionsvorgang synaptischer Vesikel mit der Plasmamembran, bei der auf ein Calciumsignal hin Neurotransmitter in den synaptischen Spalt entlassen werden. Das Ergebnis der Strukturuntersuchungen des SNARE-Komplexes mittels Elektronenmikroskopie und Röntgenkristallographie stützte

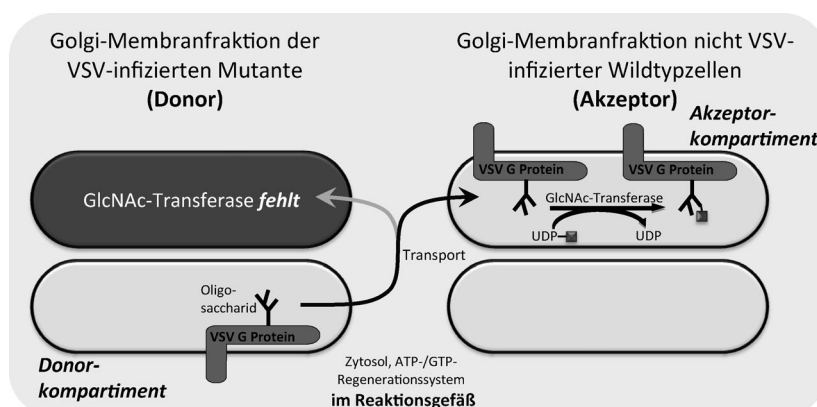


Abbildung 2. Prinzip des zellfreien Transportversuchs mit aufgereinigten Golgi-Zisternen aus „Donor“- und „Akzeptor“-Zellen. Den „Donor“-Zellen fehlt das Enzym *N*-Acetylglucosamin-Transferase; sie wurden mit VSV (vesicular stomatitis virus) infiziert und produzieren daher das Protein VSV G. Die Modifikation des VSV-G-Proteins mit *N*-Acetylglucosamin (GlcNAc) findet in Golgi-Zisternen statt, die vom Akzeptorstamm stammen. Dieser ist nicht mit VSV infiziert, verfügt aber über das Enzym *N*-Acetylglucosamin-Transferase. [Darstellung in Anlehnung an Lit. [3].]

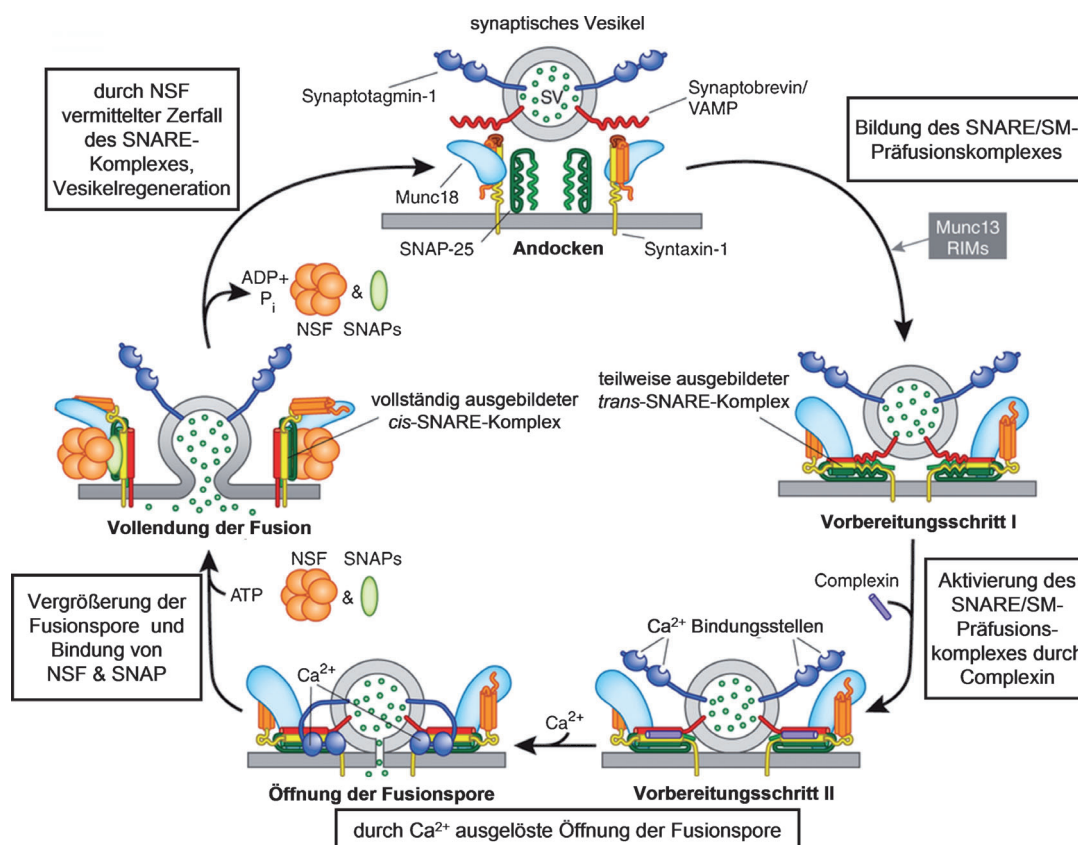


Abbildung 3. Aktuelles Modell der Fusion (Verschmelzung) synaptischer Vesikel mit der Plasmamembran. [Abdruck in veränderter Form nach Lit. [6] mit Genehmigung von Macmillan Publishers, Copyright (2013); Übersetzung K. Bacia.]

die Vorstellung, dass die in Vesikel- und Zielmembran verankerten SNARE-Proteine sich reißverschlussartig in Form eines Helixbündels zusammenlagern und damit die Membranen in eine die Fusion begünstigende räumliche Nähe bringen.

Um die SNARE-Hypothese zu testen, rekonstituierten Rothman und Mitarbeiter SNARE-Proteine in künstliche Liposomen. Auf diese Weise konnten Fusionsversuche unter isolierten Bedingungen ohne den Einfluss weiterer zellulärer Faktoren durchgeführt werden. Tatsächlich war zu beobachten, dass die Fusion der Liposomen durch in der Zelle zueinander gehörende SNAREs vermittelt wird^[5] – auch wenn die Geschwindigkeit der Fusion im künstlichen System deutlich zu langsam war. Ungeklärt blieb, auf welche Weise der Fusionsvorgang in der Zelle ausgelöst wird und wie insbesondere Nervenzellen eine rasche Fusion der synaptischen Vesikel bewerkstelligen. Es war bekannt, dass die durch Calciumionen ausgelöste Fusion synaptischer Vesikel mit der Plasmamembran der Zelle sich innerhalb von weniger als einer Millisekunde vollzieht, aber es gab hierfür keine Erklärung auf molekularer Ebene.

Entscheidende Beiträge zu dieser Frage leistete Thomas Südhof.^[6] Südhof hatte gezielt Proteine aus synaptischen Vesikeln und ihrer Zielmembran isoliert und charakterisiert, darunter das v-SNARE Synaptobrevin, das calciumbindende Protein Synaptotagmin, das an den SNARE-Komplex bindende Complexin sowie Munc18-1, ein Homolog des von

Schekman in Hefezellen identifizierten Sec1 (die Proteine dieser Familie werden auch Sec1/Munc18-ähnliche Proteine [SM-Proteine] genannt). Südhof zeigte, dass Munc18-1 ein notwendiger Bestandteil des SNARE-Fusionsmechanismus ist. Synaptotagmin, das mit einer Transmembrandomäne im Vesikel verankert ist, bindet calciumabhängig an Membranlipide und außerdem an den SNARE-Komplex. In Verbindung mit Complexin hat Synaptotagmin damit offenbar eine wichtige Funktion in der Kontrolle der schnellen, neuronalen Membranfusion durch ein Calciumsignal (Abbildung 3).^[7]

Die Untersuchungen der Preisträger zum intrazellulären Transport führten nicht nur zu Erkenntnissen über die Fusion der Transportvesikel mit ihrer Zielmembran, sondern auch zu Erkenntnissen über die Ausbildung der Transportvesikel an ihren Ausgangskompartimenten, welche durch Proteinhüllkomplexe wie Coatomer (COPI), COPII und Clathrin vermittelt werden.

Die von Rothman, Schekman und Südhof untersuchten Vorgänge sind für unser Verständnis eukaryotischer Zellen sowie für die Medizin und Wirkstoffentwicklung von erheblicher Bedeutung. So werden z.B. einige Stoffwechselerkrankungen durch Fehler im intrazellulären Transportsystem verursacht. In der pharmazeutischen Industrie wird ein Teil des gentechnisch hergestellten Insulin zur Behandlung des Diabetes mellitus in Hefezellen produziert und die Abgabe auf dem sekretorischen Weg nach außen ausgenutzt.

Sowohl für die Medizin als auch für die Grundlagenforschung von Interesse ist, dass die neuronalen SNARE-Proteine Angriffspunkte für clostridiale Toxine (Tetanustoxin und Botulinumtoxine) darstellen. Botulinumtoxine hemmen durch eine Spaltung von SNARE-Proteinen die Vesikelfusion und damit die Abgabe von Neurotransmittern in den synaptischen Spalt. Die resultierenden Muskellähmungen können bei Lebensmittelvergiftungen tödlich sein. Die Toxine haben sich aber auch als äußerst nützliche Hilfsmittel bei der Erforschung der Fusionsmaschinerie erwiesen. Botulinumtoxin wird außerdem medizinisch bei krankhaft verkrampften Muskeln (Dystonien) und kosmetisch gegen mimische Falten eingesetzt.

Eingegangen am 14. Oktober 2013

Online veröffentlicht am 8. November 2013

-
- [1] P. Novick, R. Schekman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1979**, 76, 1858–1862.
 - [2] P. Novick, C. Field, R. Schekman, *Cell* **1980**, 21, 205–215.
 - [3] W. E. Balch, W. G. Dunphy, W. A. Braell, J. E. Rothman, *Cell* **1984**, 39, 405–416.
 - [4] R. Jahn, R. H. Scheller, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2006**, 7, 631–643.
 - [5] T. Weber, B. V. Zemelman, J. A. McNew, B. Westermann, M. Gmachl, F. Parlati, T. H. Söllner, J. E. Rothman, *Cell* **1998**, 92, 759–772.
 - [6] T. C. Südhof, *Nat. Med.* **2013**, 19, 1227–1231.
 - [7] J. Tang, A. Maximov, O. H. Shin, H. Dai, J. Rizo, T. C. Südhof, *Cell* **2006**, 126, 1175–1187.