

Das Prinzip der Membranfusion in der Zelle (Nobelaufsatz)**

James Edward Rothman*

Membranfusion · Nobel-Vortrag · SNAREs · Vesikeltransport · Zellbiologie

Im Jahr 1970 wurde in der inzwischen klassischen Arbeit von George Palade (Nobelpreis 1974; Abbildung 1) nachgewiesen, dass sezernierte Proteine vom endoplasmatischen Reticulum (ER) in speziellen Behältern zur Zelloberfläche transportiert werden. Diese Transportvesikel schnüren sich von einer Membran ab und verschmelzen mit der nächsten. Dabei durchqueren sie die Golgi-Stapel (Abbildung 2). Wir wissen heute, dass dieser intrazelluläre Proteintransport allen Eukaryoten gemeinsam ist. Viele Arten von Vesikeln durchqueren die Zelle, beladen mit vielerlei Fracht, die abgeliefert werden muss. Das Ergebnis ist eine wohlorganisierte Choreographie eines sekretorischen, biosynthetischen und endocytischen Proteinverkehrs, der die internen physiologischen Bedürfnisse der Zelle bedient, die innere Organisation vorantreibt und die Kommunikation mit der Außenwelt und die Aufnahme von Nahrung und Signalen ermöglicht.

Man kann sich für alle Transportvorgänge von Vesikeln zwei Grundschritte vorstellen: Knospung (wenn sich ein Vesikel von einer „Donormembran“ abschnürt) und Fusion (wenn die Vesikelmembran mit der „Akzeptormembran“ am angesteuerten Ziel verschmilzt). Der Membranfusionspro-

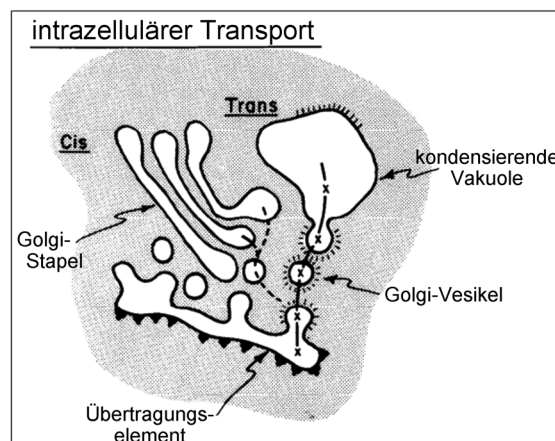


Abbildung 2. Das Konzept des intrazellulären Transports, wie es von Palade in seinem Nobelvortrag 1974 dargelegt wurde. Zu den völlig unbeantworteten Fragen gehörte, wie die postulierten Transportvesikel gebildet werden und wie sie spezifisch mit ihren Zielmembranen verschmelzen können, um die passende Beladung am richtigen Ort zur richtigen Zeit abliefern zu können. Die Abbildung ist dem veröffentlichten Vortrag entnommen.^[1]



George E. Palade (1912–2008)
Yale University, Nobelpreis (1974)

Abbildung 1. Der Begründer der modernen Zellbiologie, George E. Palade, Nobelpreisträger für Physiologie oder Medizin 1974. Palade war zu dieser Zeit an der Yale University, wo er das jetzige Department of Cell Biology gründete, das ich leitete, als ich den Nobelpreis erhielt.

zess hat für die intra- und extrazelluläre Physiologie eine besondere Bedeutung (Abbildung 3). Die Fusion von Vesikeln innerhalb der Zelle muss mit ausgezeichneter Spezifität ablaufen, damit nicht eine Organelle die funktionalen Eigenschaften einer anderen annimmt. Die Fusion mit der Zelloberfläche (Plasmamembran) (Exocytose) führt zur Freisetzung des Vesikelinhalts, der fast immer aus hochaktiven Substanzen besteht und daher sehr genau reguliert werden muss. Die Exocytose wird von fast jeder Zelle und jedem Gewebe im Körper genutzt. Die verwirrende Vielzahl von Signalmolekülen, die durch Exocytose ausgeschieden wird, bietet einen umfassenden Überblick über die Physiologie und oft auch über verwandte Erkrankungen: Neurotransmitter und ihre Ionenkanal-Rezeptoren, endokrine Hormone wie Insulin, Transporter für Glucose und andere Nährstoffe, sys-

[*] Prof. J. E. Rothman
Department of Cell Biology, Yale University
333 Cedar Street, CT 06520 New Haven (USA)

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

temische Mediatoren wie Histamin und Adrenalin, Wachstumsfaktoren und viele andere.



James Edward Rothman wurde am 3. November 1950 als Sohn von Gloria Rothman (geborene Hartnick, geb. 1923) und Martin Rothman (1915–2005) in Haverhill, Massachusetts (USA) geboren; er hat zwei jüngere Brüder, Richard und John. Er ist mit Joy Hirsch verheiratet, die ebenfalls Professorin in Yale ist, und hat zwei Kinder, Matthew (1977) und Lisa (1982). Rothman besuchte Public Schools in Haverhill, Massachusetts (6 Jahre Elementary School) und dann ab 1964 die Pomfret School (Pomfret, Connecticut), die er 1967 abschloss. Er immatriku-

lierte sich am Yale College, erhielt 1971 den B.A. in Physik mit *summa cum laude*, nachdem er Scholar of the House war. Rothman schrieb sich dann an der Harvard Medical School als Master-Student ein und nahm am M.D./Ph.D.-Programm teil. Er promovierte 1976 in Biochemie bei Eugene P. Kennedy. Von dort wechselte er zur Arbeitsgruppe von Harvey F. Lodish ans Department of Biology am MIT als Damon-Runyan-Postdoktorand (1976–1978). 1978 ging er als Assistant Professor an das Department of Biochemistry der Stanford University, erhielt 1981 als Associate Professor eine feste Stelle und wurde 1984 zum Full Professor befördert. Rothman übernahm 1988 den E. R. Squibb-Lehrstuhl für Molekulare Biologie am Department of Molecular Biology der Princeton University. 1991 wechselte er an das Memorial Sloan-Kettering Cancer Center das Cellular Biophysics and Biochemistry Department, war stellvertretender Leiter des Sloan-Kettering Institute for Cancer Research und war Inhaber des Paul Marks-Lehrstuhls. Im Jahr 2004 übernahm Rothman eine Professur am Columbia University College of Physicians and Surgeons am Department of Physiology and Cellular Biophysics, leitete gleichzeitig das Columbia Genome Center und hatte den Clyde and Helen Wu-Lehrstuhl für Chemische Biologie inne. 2008 kehrte er dann nach Yale zurück, wo er gegenwärtig Wallace-Professor of Biomedical Science und Leiter des Department of Cell Biology ist. Daneben leitet er auch das Nanobiology Institute und ist Professor für Chemie.

Vor der Verleihung des Nobelpreises wurden Rothmans Beiträge zur Zellbiologie, Biochemie und den Neurowissenschaften mit zahlreichen Preisen und Ehrungen gewürdigt. Dazu gehören: der Eli Lilly Award for Fundamental Research in Biological Chemistry, USA (1986); der Passano Young Scientist Award, USA (1986); der Alexander-von-Humboldt-Preis, Deutschland (1989); der Heinrich-Wieland-Preis, Deutschland (1990); die Wahl zum Mitglied der US National Academy of Sciences (1993); der Rosenstiel Award in Biomedical Sciences, USA (1994); die Wahl zum Fellow der American Academy of Arts and Sciences (1994); der Fritz Lipmann Award, USA (1995); die Wahl zum Mitglied des Institute of Medicine, National Academy of Sciences, USA (1995); Ehrendoktor der Universität Regensburg, Deutschland (1995); die Wahl zum Foreign Associate, European Molecular Biology Organization (1995); der Gairdner Foundation International Award, Kanada (1996); der King Faisal International Prize in Science, Saudi-Arabien (1996); die Harden Medaille der British Biochemical Society, UK (1997); der Lounsbery Award, National Academy of Sciences, USA (1997); der Feodor Lynen Award, USA (1997); Ehrendoktor der Universität Genf (1997); der Jacobæus Prize, Dänemark (1999); der Heineken Prize for Biochemistry, Niederlande (2000); die Otto-Warburg Medaille, Deutsche Biochemische Gesellschaft, Deutschland (2001); der Louisa Gross Horwitz Prize, USA (2002); der Lasker Basic Research Award, USA (2002); die Wahl zum Ehrenmitglied der Japanese Biochemical Society (2005); der Beering Award USA (2005); die Wahl zum Fellow der American Association for the Advancement of Science (2007); die E.B. Wilson Medal, American Society for Cell Biology (2010); der Kavli Prize in Neuroscience, Norwegen (2010); und der Massry Prize. USA

Die Vorgeschichte

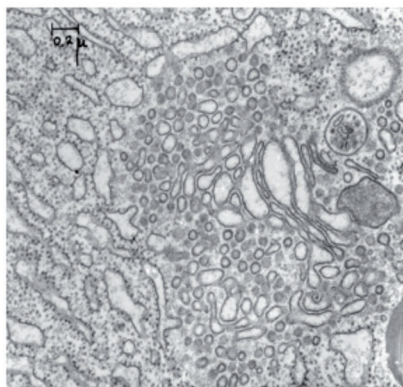
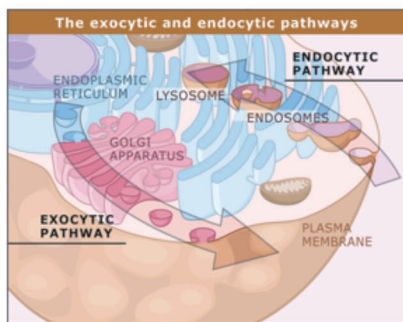
Solange ich mich erinnern kann, wollte ich Wissenschaftler werden, genauer Physiker. Ich weiß nicht, wie dieser Wunsch entstand, doch sicher spielte meine Familie eine Rolle, die auf Bildung insbesondere in Wissenschaft und Medizin besonderen Wert legte. Meine Mutter Gloria mit ihrer Konzentration und ihrem Schwung wäre in der heutigen Zeit eine anspruchsvolle Führungskraft. Sie organisierte den Haushalt und die pädiatrische Praxis meines Vaters und brachte mir zum Beispiel Organisation und Managen bei. Mein Vater war ein intellektueller Kleinstadtarzt, der als junger Mann medizinische Forschung betreiben wollte, der aber seine Ausbildung während der Weltwirtschaftskrise abschloss und dann in die Wirren des 2. Weltkriegs verstrickt wurde. Er legte immer Wert darauf, mich an seinem Leben teilhaben zu lassen. Mit etwa zehn Jahren begleitete ich ihn bei nächtlichen Hausbesuchen, manchmal auch zum Krankenhaus. Ich half ihm, die QT-Intervalle in den EKGs seiner Patienten zu bestimmen und Blutanalysen im Labor hinter seinem Büro durchzuführen.

Ich denke aber, dass meine Begeisterung für die Wissenschaft mindestens genauso durch das Umfeld bestimmt wurde, in dem ich groß wurde. In den 50er und 60er Jahren wurden Wissenschaft und Technik von den Amerikanern nach dem Sieg im 2. Weltkrieg intuitiv als Hauptpfeiler wirtschaftlicher und politischer Macht angesehen. Diese Ära begann mit der Polio-Impfung, die eine bedrohliche Krankheit ausrottete, und der Atomenergie (mit allen Vor- und Nachteilen). Sie endete mit dem Transistor, dem Computer und den ersten Menschen auf dem Mond. Die bekanntesten Wissenschaftler und Praktiker waren öffentliche Helden: Salk, Einstein, Oppenheimer und die ersten Astronauten (Abbildung 4).

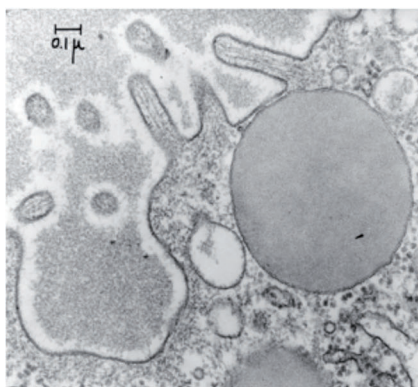
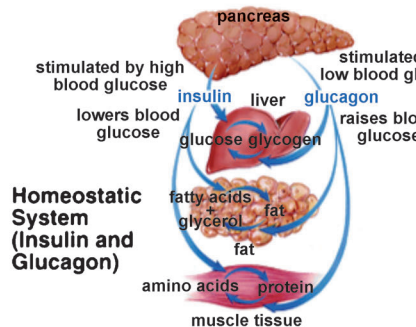
War es in einem solchen Umfeld, mit der Unterstützung meiner Familie und mit einem frühen Talent für Mathematik überraschend, dass ich mich mit Elektronik befasste und Raketen entwickelte, während ich noch in der Grundschule war (Abbildung 5)? Raketen waren eine tolle Sache für mich. In der 7. Klasse eignete ich mir selbst die Grundlagen der Trigonometrie an, sodass ich die Höhe der Raketen triangulieren konnte, und dann Analysis, sodass ich die maßgebliche Physik besser verstand. Als ich Physik und Mathematik in der Highschool und danach dann ernsthaft studierte, verschlang ich den Stoff regelrecht und las Vieles über den Unterrichtsinhalt der Secondary School hinaus, soviel, dass ich den Abschluss bereits ein Jahr früher ablegen konnte. Als ich 1967 ans Yale College kam, war ich absolut auf theoretische Physik fixiert.

Das ist zwar nicht das Ende der Geschichte, doch die Physik lehrte mich, schonungslos die Bestandteile eines Problems zu analysieren, indem ich mir zuerst vorstellte, wie eine mögliche Lösung aussehen könnte. Dies kann ein hilfreicher Ansatz sein, wenn man in dem Nebel herumstochert, der die unbekannten Wasser der Biologie bedeckt. Während meines vorletzten Jahres in Yale vollzog ich im letzten Moment und fast übergangslos eine Wendung hin zur Biologie (mit der ich einem nachdrücklichen Vorschlag meines Vaters folgte, ich solle es mit etwas Biologischem versuchen statt mit all dieser

Zellwachstum und -teilung



endokrine & exokrine Physiologie



Neurophysiologie

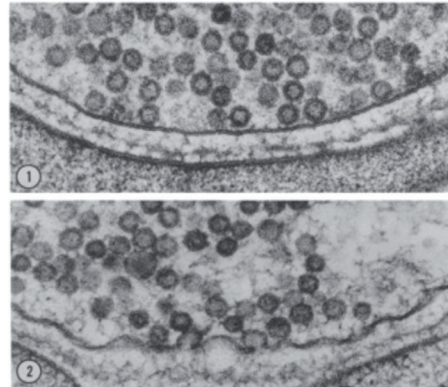
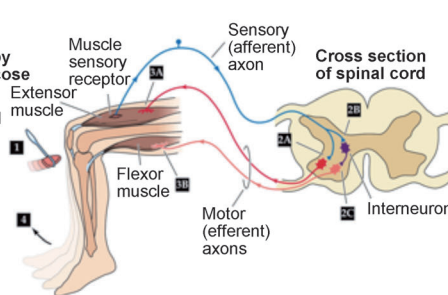


Abbildung 3. Vesikelfusion – der Transportprozess. Die Membranfusion ist der fundamentale Vorgang, der den ortsspezifischen Transport der Fracht ermöglicht. Die Fusion von Vesikeln, die unterschiedliche Frachten tragen, unterliegt einer Vielzahl grundlegender Prozesse in den Zellen und der Physiologie des Organismus, von der Verteilung spezifischer Gruppen von Proteinen zu vorbestimmten Kompartimenten im Cytoplasma, darunter Signalrezeptoren an der Plasmamembran (Zellwachstum und -teilung; oben links), Sekretion von Hormonen und anderen Signalmolekülen (endokrine und exokrine Physiologie; oben Mitte) und synaptische Übertragung (oben rechts), die ein spezieller Fall interzellulärer Kommunikation ist. Elektronenmikroskopische Aufnahmen (untere Reihe, von links) zeigen die Transportvesikel, die ER und Golgi im frühen sekretorischen Weg verbinden (exokrine azinöse Pankreaszelle), größere sekretorische Speichervesikel mit Insulin vor und nach der Fusion (endokrine Pankreas-β-Zellen) und synaptische Vesikel (die Neurotransmitter enthalten) bevor (oben) und nachdem (unten) die Ausschüttung durch Veränderung des Membranpotentials ausgelöst wurde (neuromuskuläre Endplatte).



Abbildung 4. Die Zeit von 1950–1965, als ich aufwuchs, war in vieler Hinsicht ein Höhepunkt der physikalischen Ära. Die Ära der Biologie hatte schon begonnen, war aber noch nicht voll im Gange. Jonas Salk gelang die Produktion des ersten weithin verfügbaren Impfstoffes gegen Polio (oben links). Die Physiker Albert Einstein und J. Robert Oppenheimer beim Anbruch der Ära der Kernenergie (unten links). Der Mercury-Astronaut Alan Shepherd vor dem Start (rechts).

Physik). Und schon in der allerersten Vorlesung in allgemeiner Biologie (von dem charismatischen und brillanten Bio-



Abbildung 5. Der Autor (zweiter von rechts) bereitet im Alter von 12 Jahren den Abschuss eines Raketenmodells vor. Ich war von Mathematik, Physik und Technologie fasziniert.

physiker Frederic Richards) war ich überrascht, dass – im Gegensatz zu dem hochstrukturierten Gebiet der Physik – die Forschungsfront der Molekularbiologie unmittelbar zugänglich erschien, dennoch aber ähnlich streng und strukturbasiert sein konnte.

Eine Reihe von Ereignissen brachte mich mit Donald Engelmann zusammen, der damals ein neuer Assistant Professor für Biophysik in Yale war; durch ihn wurde mein experimenteller Zugang zur Wissenschaft durch die Biophysik von Membranen geprägt. Yale ermöglichte mir, alle formalen Kurse fallenzulassen (und trotzdem weiter an meinem Abschluss zu arbeiten; das erlauben sie inzwischen nicht mehr ...), um mich mit voller Kraft der Forschung zu widmen, wofür ich immer dankbar sein werde. In diesem Jahr lernte ich von Engelmann, jeden Datenkrümel zu zerlegen, um möglichst viel Information zu gewinnen, und ich wurde Wissenschaftler. Danach wechselte ich 1971 zur Harvard Medical School mit dem Wunsch, Biologie umfassend zu erlernen (statt sie praktisch auszuüben). Ich verließ das MD-Programm nach den Grundkursen, aber mit genügend Einblick in die Klinik, um für mein ganzes Leben Respekt vor der klinischen Medizin zu erwerben.

Als Student im ersten Jahr in Medizin lernte ich in Histologie zuerst den sekretorischen Weg kennen, als die Entdeckungen von George Palade noch frisch und aufregend waren. Welch ein erstaunlicher Prozess – wie können Zellen aus Membranen Vesikel herstellen? Wie kann jedes Vesikel wissen, wo es hingehört? Wie kann es verschmelzen? Der Vorgang war besonders deshalb so bemerkenswert, weil es zu dieser Zeit noch nicht möglich war, sich eine molekulare Erklärung dafür auch nur in Umrissen vorzustellen. Das Problem fesselte meine Phantasien, aber es war noch nicht genügend bekannt, um sich produktiv damit auseinanderzusetzen.

In meiner Doktorarbeit an der Harvard Medical School bei Eugene Kennedy (Abbildung 6), einem Meister der Membranbiochemie, klärte ich auf, wie die Lipiddoppel-



Eugene Patrick Kennedy
(1919 – 2011)

Abbildung 6. Der Betreuer meiner Doktorarbeit, Gene Kennedy, ein Meister der Biochemie von Zellmembranen.

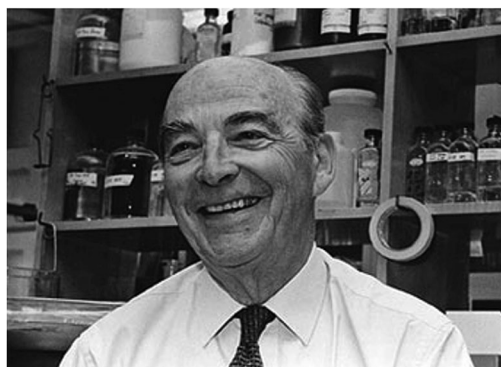
schicht durch asymmetrische Biosynthese gebildet wird. Kennedy, ein brillanter Intellektueller und ein origineller Denker, brachte mir bei, komplexe Probleme biochemisch zu beschreiben.

Die Schlüsselemente für einen Durchbruch

Rückblickend sieht man leicht, dass viele Elemente sich auf glückliche Weise zusammenfügten und mir so die Entdeckungen ermöglichten, die heute mit dem Nobelpreis gewürdigt werden. Ich griff das Sortierproblem in den späten 70er Jahren mit breitem Hintergrundwissen außerhalb des Gebietes auf. Dies erwies sich als hilfreich, ließ mich aber dennoch hinreichend unbefangen an die Sache gehen. Andere Schlüsselfaktoren waren die Ausbildung und die Perspektive eines jungen Wissenschaftlers (ich habe bereits darüber gesprochen); eine Arbeitsumgebung in einer Abteilung, in der zu Risikobereitschaft ermutigt wurde; eine stabile Forschungsförderung über ein Jahrzehnt, die Innovationen ermöglichte; die geschickte Wahl eines Problems (zur richtigen Zeit, noch schwierig, aber nicht unmöglich und dennoch wichtig); eine besondere und produktive Art, Probleme anzugehen (in meinem Fall durch den vereinfachenden, aus der physikalischen Chemie entlehnten Ansatz, den ich noch beschreiben werden); die richtigen (herausragenden) Studenten zur richtigen Zeit; und natürlich harte Arbeit und Ausdauer, um eine Methode zu entwickeln, die nach zahlreichen schmerzlichen Fehlversuchen auch funktionierte.

Erstens, eine ideale Arbeitsumgebung: Ich hatte das große Glück, ein Angebot des Biochemie-Departments in Stanford zu erhalten, während ich noch Medizin studierte, eine Gelegenheit, die ich nicht vorübergehen lassen konnte, denn es bot sich mir die seltene Chance, meine eigene Forschung in dem außergewöhnlichen Umfeld zu beginnen, das von Arthur Kornberg, einem der großen Biochemiker des 20. Jahrhunderts (Abbildung 7), geschaffen worden war. Zum Glück war Stanford bereit, etwa ein Jahr auf mich zu warten, bis ich meine Postdoktorandenstelle antrat. So verließ ich 1976 die Harvard Medical School (nach abgeschlossener Promotion) und ging zum MIT zu Harvey Lodish, Stanford fest im Blick. Lodish brachte mir bei, mit komplexen zellfreien Systemen (Translokation über die Membran, gekoppelt mit der Proteinbiosynthese) zu arbeiten – und auch, wie man ein großes Labor mutig und energisch führt.

Mit meinem Umzug nach Stanford im Sommer 1978 begann ein neuer Abschnitt meiner Entwicklung als Wissenschaftler. Von Kornberg lernte ich zwei entscheidende Dinge zu einem entscheidenden Zeitpunkt: wie man die Strategie zur erfolgreichen biochemischen Zergliederung eines komplexen Systems formuliert; und einen tiefen Glauben daran, dass, egal wie komplex ein Problem sei, die Biochemie (irgendwann) erfolgreich sein und tatsächlich den einen sicheren Weg zu den zugrundeliegenden molekularen Mechanismen weisen würde. Kornbergs Bekenntnis zu dieser Aussage war überzeugend, denn es stand auf sehr festem Fundament. Schließlich war die zellfreie Rekonstitution der zentrale experimentelle Ansatz der gesamten Biochemie seit ihrer Begründung mit der Entdeckung der alkoholischen Gärung in



Arthur Kornberg (1918– 2007)

Stanford University, Nobelpreis (1959)

Abbildung 7. Arthur Kornberg, ein glänzender Enzymologe und Begründer des Department of Biochemistry an der Stanford University, das er de facto noch immer leitete, als ich dort 1978 als Assistant Professor anging. Im Nachbarlabor zeigte er mir durch sein Vorbild, wie ein großer Wissenschaftler mit Buchners Weltsicht einen komplexen biologischen Prozess aufklärt.

Hefeextrakten durch Eduard Buchner (Nobelpreis 1907) am Ende des 19. Jahrhunderts, der das entwickelte, was dann die moderne Biochemie wurde (Abbildung 8). Und bis zum Ende der 70er Jahre waren die Kernprinzipien der ATP-Synthese, der DNA-Replikation, der RNA-Transkription, der Proteinsynthese und sogar der genetische Code relativ neue „Trophäen“ des Rekonstitutionsansatzes, der sehr effizient die Feinheiten der physiologischen Regulation abstreift und die robuste Maschinerie im Zentrum nachweist.

Die Auswahl des richtigen Problems zur richtigen Zeit: Man muss sich intensiv auf den zentralen Aspekt und nicht auf eine Randfrage eines relevanten Problems konzentrieren, das reif für den richtigen Ansatz ist. Wie bereits erwähnt, war ich schon als Medizinstudent in den frühen 70er Jahren begeistert von dem „Sortierproblem“ (wie es damals genannt

Eduard Buchner (1860–1917)

Nobel Prize (1907) "for his discovery of cell-free fermentation" dispelling vitalism, firmly rooting biology in chemistry



"We are seeing cells more and more clearly as chemical factories, where the various products are manufactured in separate workshops, the enzymes act[ing] as the overseers" - Nobel Lecture (1907)

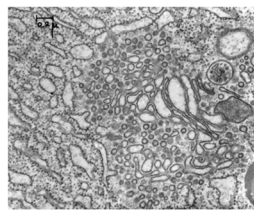
Abbildung 8. Eduard Buchner gilt als Begründer der modernen Biochemie.

wurde: wie werden neu synthetisierte Proteine von den Ribosomen zu ihren spezifischen Bestimmungsorten in der Zelle verteilt?), doch war es nicht vor dem Ende des Jahrzehnts reif für einen Angriff. Die Situation änderte sich damals dramatisch, als das Sortierproblem aufgrund mehrerer entscheidender Befunde viel präziser definiert werden konnte. Günter Blobel (Nobelpreis 1999) hatte inzwischen herausgefunden, dass diese Proteine eingebaute Signale tragen, die sie ins ER dirigieren, und folgerte, dass Proteine ganz allgemein Signalsequenzen enthalten, die ihre Lokalisation in der Zelle festlegen. Inzwischen ist dies als Grundprinzip anerkannt. Michael Brown und Joseph Goldstein (Nobelpreis 1985) hatten bei der Aufklärung des grundlegenden Mechanismus der Cholesterin-Homöostase gerade die ersten sicheren Hinweise darauf geliefert, dass der selektive Transport zwischen Kompartimenten durch Vesikel vermittelt wird, wobei Rezeptoren beteiligt sind, die für die Signale in der transportierten Ladung spezifisch sind (Partikel aus Lipoprotein niedriger Dichte, LDL). Clathrin-beschichtete Vesikel^[2,3] übernehmen die Endocytose von Plasmalipoproteinen, sodass ihr Cholesterin in den Lysosomen zur Wiederverwendung durch die Zellen freigesetzt wird. Diese Vesikel sammeln Lipoproteine aus dem Medium mithilfe eines Rezeptors (LDL-Rezeptor), der an den ausgekleideten Regionen der Membran, die an der Knospung beteiligt sind, lokalisiert ist. Aus all dem folgte, dass die Lösung des Sortierproblems erfordert, dass man versteht, wie jeder Vesikeltyp zur korrekten Zielmembran in der Zelle gelangt und mit ihr fusioniert.

Ein einzigartiger Weg, um das Problem anzugehen: Indem ich die Gedankenwelt eines Physikers auf die Komplexitäten und Geheimnisse der Zellbiologie anwendete, eröffnete ich mir eine Perspektive und einen Ansatz, um das Problem produktiv anzugehen. Physiker suchen universelle Gesetzmäßigkeiten, um alle verwandten Prozesse auf einer gemeinsamen Grundlage zu erklären und erreichen dies, indem sie die einfachste Hypothese formulieren um die Fakten zu erklären. Die vorherrschende Meinung unter den Zellbiologen war ohne Zweifel, dass die anatomische Anordnung der Endomembransysteme in der Zelle – zum Beispiel die Tatsache, dass das Durchgangs-ER (von dem die Vesikel abgeschnürt werden, um Sekretionsprodukte zu den Golgi-Feldern zu transportieren) in der Nähe der Golgi-Felder liegt – lebenswichtig ist, um die Ablieferung der Beladung sicherzustellen. Wie in Abbildung 9 (links) in einer klassischen Mikrophotographie von Palade zu sehen ist, scheint das ER die Vesikel fast „mit Gewalt“ in den Eingang der Golgi-Stapel (cis-Seite) zu zwingen; dies entspricht der Idee, dass die Anatomie die Spezifität bestimmt. Die einfachste Idee aber ist genau entgegengesetzt – intrinsische chemische Spezifität ermöglicht die spezifische Ablieferung der Beladung, und die beobachtete Anatomie entsteht als Konsequenz der chemischen Spezifität in Verlauf des Prozesses (Abbildung 9, rechts).

Die verbreitetere und komplexere Vorstellung, dass die Anatomie die Spezifität bestimmt, würde bedeuten, dass ein genauer Vesikelverkehr ohne eine vorher existierende zelluläre Organisation nie möglich wäre. Dieses starke Vorurteil – tief verwurzelt in der Zellbiologie aufgrund ihres Ursprungs

Anatomie bestimmt Spezifität



Spezifität bestimmt Anatomie

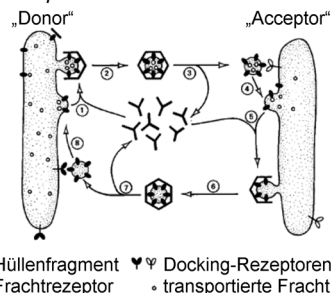


Abbildung 9. Meine Überlegungen von 1978, auf denen der Ansatz der zellfreien Rekonstitution beruhte. Die einfachste Hypothese war, dass die intrinsische chemische Spezifität den Transport bestimmt, nicht die intrazelluläre Anatomie. Das Modell (veröffentlicht 1982 in den Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, Band XLVI) wurde gezeichnet lange bevor irgendetwas von der Proteinmaschinerie bekannt war. Die logische Organisation des Weges war korrekt, auch wenn die verantwortlichen (aber damals noch hypothetischen) Proteine noch nicht identifiziert waren.

als Zweig der mikroskopischen Anatomie – war ohne Zweifel für einen Großteil der Skepsis verantwortlich, mit der unser Rekonstitutionsexperiment viele Jahre lang aufgenommen wurde.

Andererseits ist der große Vorteil der einfacheren Idee die bemerkenswerte Voraussage, die sie trifft: Ein genauer Vesikelverkehr kann prinzipiell auch in solchen zellfreien Extrakten stattfinden, in denen eine Enzymologie im Stile Kornbergs möglich ist. Einmal rekonstituiert könnte der zellfreie Transport als Testsystem verwendet werden, in dem man die beteiligten Enzymproteine anhand ihrer funktionalen Erfordernisse entdecken und reinigen kann.

Der richtige Partner, um das Problem anzugehen: Dies war mein erster Postdoktorand Erik Fries (Abbildung 10, rechts), ein junger Schwede, der gerade vom neu begründeten Europäischen Laboratorium für Molekularbiologie (EMBL) in Heidelberg nach Stanford gekommen war. Er hatte bei Ari Helenius und Kai Simons gearbeitet und dort wesentliche Erkenntnisse gewonnen, mit denen der Mechanismus des Vireneintritts in Zellen aufgeklärt werden konnte. Erik brachte ein tiefes Verständnis von Zellbiologie und physikalischer Biochemie mit, zusammen mit einem ihm eigenen stringenten und quantitativen Stil. Außerdem hatte er die seltene Kombination von Abenteuerlust und Ausdauer, mit der er sich einer Aufgabe verschrieb.

Die zellfreie Rekonstitution des Vesikeltransports

Unser Ziel war also, den Transport eines Proteins zwischen membrangebundenen Kompartimenten in einem zellfreien Extrakt nachzuweisen. Weil es noch nicht möglich war, klonierte Gene in tierischen Zellen zu exprimieren, untersuchten wir den Transport eines Membranglycoproteins (G-Protein), das während der Infektion mit dem vesikulären Stomatitisvirus (VSV) hoch exprimiert wird. Dies war seinerzeit ein sehr verbreitetes System, das ich bei Harvey Lodish kennengelernt hatte. Die Prozessierung der Oligo-



“More Dounce Per Ounce”



Erik Fries
um 1980

Abbildung 10. Links: der Dounce-Homogenisator, den mein erster Postdoktorand Erik Fries und ich 1979 benutzen, um den „intrazellulären“ Transport in einem zellfreien Extrakt erfolgreich zu rekonstituieren. Mittlerweile befindet er sich im Nobelmuseum. Ursprünglich war er als Abschiedsgeschenk an Erik gegangen (sein Bild rechts stammt aus dieser Zeit). Erik ist inzwischen Professor an der Uppsala Universität, und es war mir eine Freude, ihn in meinem Nobelvortrag vorzustellen.

saccharide des G-Proteins während der Passage durch die Golgi-Felder lieferte uns einen notwendigen biochemischen Angriffspunkt, um den möglichen Transport im Homogenat zu verfolgen. Der genaue Weg, nach dem über Asn gebundene Oligosaccharidketten durch weitere Prozessierung reifen, war erst vor kurzem von Stuart Kornfeld und anderen aufgeklärt worden.

Wie in Abbildung 11 gezeigt, beginnt die Prozessierung der Oligosaccharide mit der Addition eines Vorläufer-Oligosaccharids an das Protein im ER. Anschließend werden schrittweise bestimmte Glucose- und Mannosereste wieder abgespalten, und die „terminalen“ Zucker N-Acetylglucosamin (GlcNAc), Galactose und Sialinsäure werden an aufeinanderfolgenden Stellen in den Golgi-Feldern angehängt. Phillips Robbins hatte gerade einen eleganten Weg ausgearbeitet, um die Saccharidprozessierung mit SDS-Proteingelen zu verfolgen. Er verwendete dazu eine ungewöhnliche mikrobielle Endoglycosidase (EndoH), die die Vorläufer- und unreifen Saccharidketten, die für ER und den frühen Golgi-Apparat charakteristisch sind, abspaltet, nicht aber die prozessierten Ketten, die GlcNAc oder andere terminale Zucker enthalten, die erst später im Golgi-Apparat angefügt werden. Da die Saccharidkette (mit Ausnahme des einzelnen inneren GlcNAc, das direkt mit Asn verknüpft ist) entfernt wird, wird das Gesamtmolekulargewicht des Glycoproteins merklich kleiner und seine Bande verschiebt sich auf dem SDS-Gel (zur G_S-Position). Wenn nur ein Teil der G-Protein-Population in die Golgi-Felder transportiert und dort prozessiert wird, lassen sich zwei Banden beobachten: die ursprüngliche Bande (G_R, resistent gegen EndoH) und die verschobene Bande (G_S, sensitiv gegen EndoH). Frühere Methoden zur

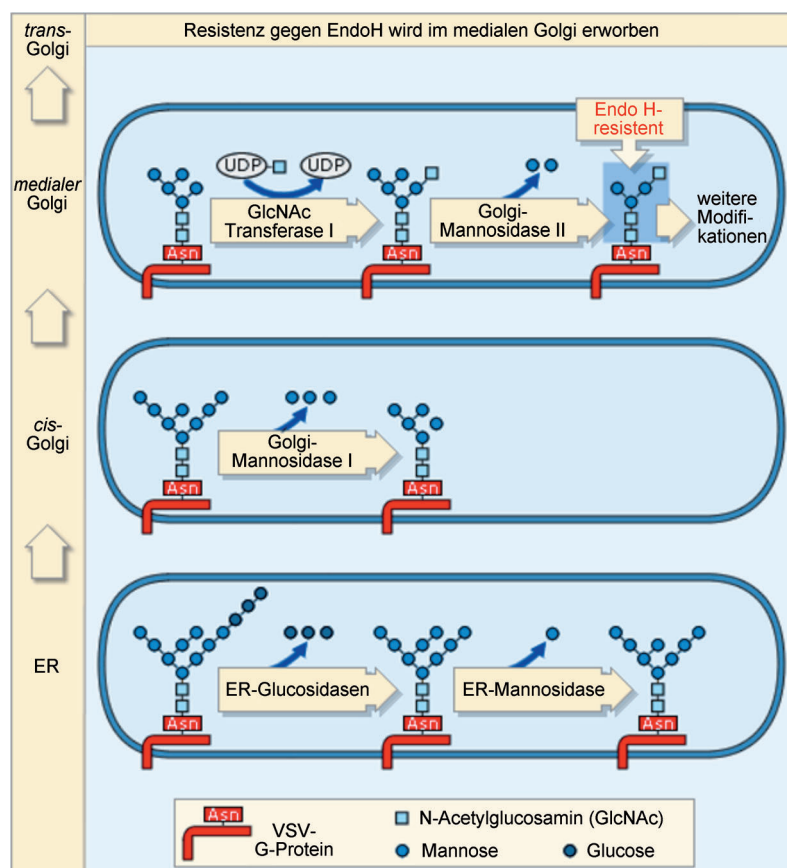


Abbildung 11. Der Weg der Prozessierung der Asn-gekoppelten Oligosaccharide des aus dem ER stammenden Glycoproteins im Golgi, wie er 1976–1978 überwiegend von Stuart Kornfeld aufgeklärt wurde. N-verknüpfte Komplexe werden resistent gegen Spaltung durch Endoglycosidase H, wenn N-Acetylglucosamin durch die GlcNAc-Transferase I angekoppelt und anschließend Mannosereste von der Golgi-Mannosidase II im medialen Golgi abgespalten werden.

Analyse der Saccharidketten, die zahlreiche Schritte der Fragmentierung und Chromatographie umfassten und Tage dauerten, waren für einen Routine-Enzymtest, wie er uns für die Rekonstitution des Transports vorschwebte, nicht geeignet.

Erik begann damit, VSV-infizierte Hamsterzellen in Gewebekultur mit ^{35}S -Methionin solange (etwa 5 Minuten) zu markieren, bis das neu synthetisierte G-Protein nach unseren Kenntnissen ins ER gelangt war, noch nicht jedoch in den Golgi-Apparat. Dann schlossen wir die Zellen auf (mit genau dem Dounce-Homogenisator, der in Abbildung 10 links, gezeigt ist), inkubierten das Homogenat mit ATP und bestimmten, ob Teile des EndoH-sensitiven G-Proteins, das zu Beginn der zellfreien Inkubation im ER vorlag, EndoH-resistent geworden war (was auf einen Transport aus dem ER in den Golgi-Apparat hindeuten würde).

Es wurden höchstens minimale Mengen an G_R gebildet. Als wir die Markierungszeit verlängerten, erschien ein kleines Signal (G_R , produziert im Homogenat), doch es wurde schnell überstrahlt von der stetig anwachsenden Menge an G_R im Homogenat zu Beginn der zellfreien Inkubation, die den zunehmenden Anteil von G-Protein repräsentierte, der in den Golgi-Apparat der Zelle eintrat. Dieses Bild ließ sich mit

noch soviel Herumprobieren an den Versuchsbedingungen nicht verbessern. Schlimmer noch, wir konnten noch nicht einmal sicher sein, dass unser kleines Signal tatsächlich einen Transport im Homogenat abbildete. Das zusätzlich in vitro produzierte G_R konnte auch einfach durch die Vervollständigung der Prozessierung von G-Protein entstanden sein, das den Golgi-Apparat bereits vor dem Zellaufschluss erreicht hatte.

Die Lösung dieses Problems brachte den Durchbruch. Ich erkannte, dass eine mutierte Hamsterzelllinie (Klon 15B), die in einem spezifischen Glycosylierungsschritt im Golgi-Apparat defekt war, in einer Variante des beschriebenen Experiments eingesetzt werden konnte, um einerseits den Hintergrund an EndoH-resistentem G-Protein zu Beginn der Inkubation zu eliminieren und andererseits sicherzustellen, dass jede Glycosylierung während der Inkubation nur durch den Transport des Proteins zustande kommen konnte. Die Mutante, Klon 15B, war von Stuart Kornfeld anhand ihrer Resistenz gegen ein normalerweise toxisches Pflanzenlektin isoliert worden. Ihr fehlt das Enzym N-Acetyl-Glucosamintransferase I (NAGT-I, auch als GlcNAc-Transferase bezeichnet), das im Wildtyp in den zentralen Zisternen der Golgi-Stapel vorkommt (Abbildung 11). Aufgrund dieses Enzymausfalls können 15B-Zellen das G-Protein nicht bis zur EndoH-Resistenz prozessieren, auch wenn sie das teilweise prozessierte Protein zur Zelloberfläche transportieren. G-Protein bleibt daher im ER, im Golgi und in der Plasmamembran von 15B-Zellen EndoH-sensitiv. Wenn die Homogenate von ^{35}S -Methionin-markierten VSV-infizierten 15B-Zellen inkubiert werden, bleibt das G-Protein in den Membranen immer EndoH-sensitiv, auch wenn es weitertransportiert wird.

Die entscheidende Variation (Abbildung 12) war, einfach die beiden Homogenate gemeinsam zu inkubieren – eines (der „Donor“) von VSV-infizierten 15B-Mutanzellen und das andere (der „Akzeptor“) von nicht infizierten Wildtypzellen. Nun kann EndoH-sensitives G-Protein (aus den Donor-15B-Membranen) von NAGT-I (das in den Zellmembranen des Akzeptor-Wildtyps vorkommt) prozessiert und dadurch EndoH-resistent werden. Wenn also beispielsweise Vesikel, die das G_S -Protein enthalten, von ER-Membranen des Donors abgeschnürt werden und mit Golgi-Membranen des Akzeptorhomogenats fusionieren, wird das transportierte G_S zu G_R umgewandelt. Ein überzeugendes Signal in dieser überarbeiteten zellfreien Reaktion spricht deutlich dafür, dass die Nachbarschaftsbeziehungen in der Zelle für den Transport nicht essentiell sind, denn der Transport würde hier zwischen Organellen aus verschiedenen Zellen stattfinden. Daher würde jedwedes Signal darauf hinweisen, dass eine inhärente chemische Spezifität der Schlüssel für die Sortierung ist, nicht jedoch die intrazelluläre Anatomie.

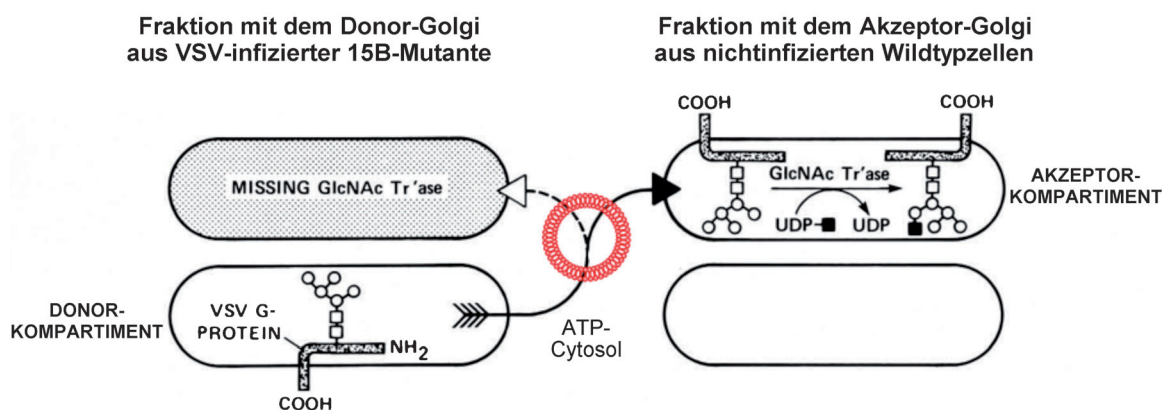


Abbildung 12. Die „Komplementationsmethode“, die schließlich zum Erfolg führte. Getestet wird auf den Transport von VSV-G-Protein in den medialen Golgi. 15B hat keine GlcNAc-Transferase I; daher werden die Proteine in diesen Zellen nie resistent gegen EndoH, obwohl sie über den Sekretionsweg transportiert werden. Um diesen Transport nachzuweisen, wurde die Golgi-Fraktion von (radioaktiv markierten) VSV-infizierten 15B-Zellen mit der Golgi-Fraktion von nicht infizierten Wildtypzellen (plus ATP und Cytosol) inkubiert. Das Entstehen der EndoH-Resistenz durch G-Protein ist ein Maß für den Transfer vom Donor-Kompartiment zum medialen Golgi. Der rotumrandete Kreis zwischen den beiden Golgi-Stapeln markiert das Transportvesikel, von dem wir zur Erklärung unserer Ergebnisse annahmen, dass es sich abschnürt und fusioniert.

Mit diesem neuen Aufbau des „Komplementationstests“ konnten wir Bedingungen für eine In-vivo-Markierung finden, die die zellfreie Prozessierung mit etwa der gleichen Geschwindigkeit und Effizienz ermöglichte wie der Transport in der Zelle (Abbildung 13b). Wie in der Zelle ist die zellfreie „transportgekoppelte Glycosylierung“ ATP-abhängig und läuft zwischen geschlossenen membrangebundenen Kompartimenten ab. Letzteres ließ sich durch die Resistenz der zum Lumen hin orientierten „Spike“-Domäne des G-Proteins gegen proteolytischen Angriff von außen nachweisen.^[5] Die ersten erfolgreichen In-vivo-Markierungsbedingungen umfassten eine kurze „Puls“-Markierung mit ³⁵S-Methionin, gefolgt von einer zwanzigminütigen „Chase“-Phase mit unmarkiertem Methionin in Gegenwart eines Protonenionophors, eines „Entkopplers“, der den Transport durch Hemmung der ATP-Synthese in den Mitochondrien zum Erliegen bringt (Abbildung 13a). Dass ATP (oder ein anderes NTP) für den Transport erforderlich ist, hatten bereits 1968 James Jamieson und George Palade herausgefunden, die mit einem vergleichbaren Versuchsaufbau den Ausgang des ER für seine „Übertragungselemente“ blockierte, spezialisierte Regionen also, in denen die Vesikel aus dem Golgi-Apparat abgeschnürt werden. Vor diesem Hintergrund war die einfachste Arbeitshypothese, dass wir den Transport von Übertragungselementen vom ER (von 15B-Zellen) zum Golgi-Apparat (von Wildtyp-Zellen) rekonstituiert hatten. Wir erkannten aber auch, dass die Identität des Donor-Kompartiments nicht sicher als ER feststand; es hätte auch ein späteres Kompartiment sein können.^[5]

Tatsächlich stellte sich letztere Vermutung als wahr heraus. Wir fanden anschließend,^[4] dass der Transport ohne ATP-Verarmung rekonstituiert werden konnte, einfach, indem man die Chase-Phase so verlängerte (5–10 min), dass das ³⁵S-markierte G-Protein den Golgi-Apparat der 15B-Zellen vor der Homogenisation erreichen konnte. Daraus lässt sich folgern, dass der Donor die Golgi-Membran ist und nicht das ER oder seine Übertragungselemente. Da der Akzeptor ebenfalls eine Golgi-Membran ist, war der Transport

zwischen zwei Golgi-Stapeln, einem von den 15B-Zellen und einer von den Wildtyp-Zellen, rekonstituiert worden.

Diese überraschende Entdeckung widersprach der Lehrmeinung, dass die Golgi-Zisternen durch die Stapel von der unreifen oder Bildungsseite (heute „cis“ genannt) zu der reifen Seite („trans“) fließen. Diese Ansicht stützte sich auf anatomische Beobachtungen und nicht auf funktionale Hinweise. (Nach nun mehr als drei Jahrzehnten wird zunehmend deutlich, dass der Transport über die Golgi-Stapel in Tieren tatsächlich im Wesentlichen auf den Vesikeltransport zurückgeht, obwohl manche noch immer dem Zisternen-Flussmodell anhängen.) Die geradlinige Interpretation unserer Daten war, dass der Transport zwischen den Kompartimenten des Golgi-Apparates über Vesikel vermittelt werden kann und dass wir diesen Prozess rekonstituiert hatten. Unglücklicherweise brachte uns das in die wenig beneidenswerte Lage, einen Prozess rekonstituiert zu haben, der vorher unbekannt war – eine doppelte Belastung, die die Akzeptanz der Bedeutung dieser Ergebnisse über viele Jahre verzögerte, bis wir^[6] schließlich herausfanden, dass eines von Randy Schekmans Sekretionsgenen in Hefe (NSF)^[7] das Protein codierte, das für die Vesikelfusion in zellfreien Extrakten verantwortlich war.

Wir hatten allerdings einige aussagekräftige Ergebnisse dafür, dass eine spezifische Membranfusion für das Testsignal wichtig ist. Wie man Abbildung 13b entnehmen kann, beobachtete man die EndoH-Resistenz in Proben, die in vivo vor der Homogenisierung und der Inkubation mit Akzeptormembranen durch einen 5-Minuten-Puls und einen 5-Minuten-Chase markiert worden waren. Man weiß, dass zu diesem Zeitpunkt viel markiertes VSV-G-Protein im Golgi vorliegt. Dennoch wird in vitro kein EndoH-resistentes G-Protein gebildet, wenn die Zellen direkt nach dem 5-Minuten-Puls (ohne Chase) aufgeschlossen werden. Noch befindet sich das markierte VSV-G-Protein im ER. Wichtig ist, dass mit zunehmender Dauer der Chase-Phase, wenn das G-Protein von dem Aufschluss zunehmend aus dem Donor-Golgi verschwindet und in die Plasmamembran transportiert wird, der

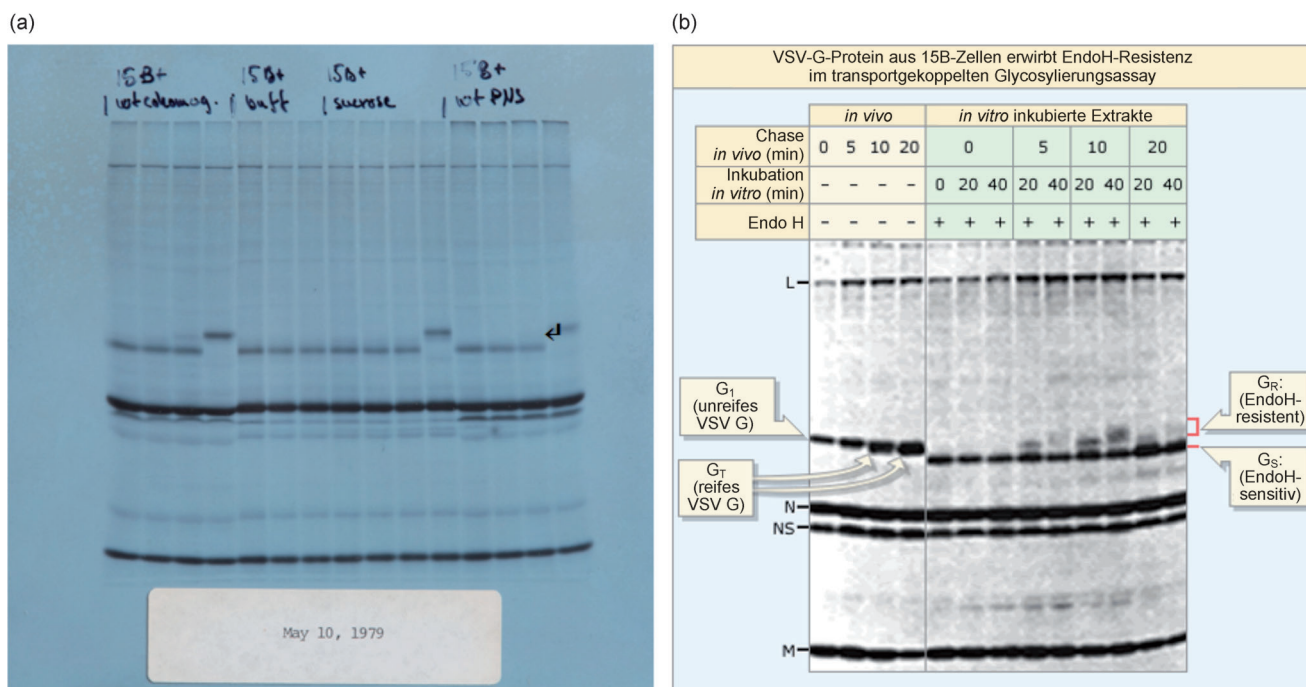


Abbildung 13. a) Die erste erfolgreiche Rekonstitution eines zellfreien Transports. Aus Erik Fries' Laborjournal vom 20. Mai 1979. Die schwache Bande über der Haupt-VSV-G-Bande in der zweiten Spur von rechts (Pfeil) entsteht durch die Reifung des G-Proteins (das aus den Donormembranen stammt) im Akzeptor-Golgi-Kompartiment. b) Weitere Optimierung der Inkubationsbedingungen verbesserte die Ausbeute der signifikanten EndoH-resistenten Bande für die Publikation. Linker Gelabschnitt: VSV-infizierte 15B-Zellen wurden mit ^{35}S -Methionin 5 min pulsmarkiert, dann in Medium mit unmarkiertem Methionin nochmals 0, 5, 10 oder 20 min inkubiert und homogenisiert. Die Extrakte wurden sofort auf das Gel aufgetragen. Man beachte, dass in 15B-Zellen das reife G-Protein ein geringfügig niedrigeres effektives Molekulargewicht hat als das unreife G-Protein. L, N, NS und M sind nicht-sekretierte VSV-Proteine. Rechter Gelabschnitt: VSV-infizierte 15B-Zellen wurden pulsmarkiert, und eine Chase-Phase wurde angeschlossen wie bei den Proben auf der linken Seite. Die Zellen wurden homogenisiert, und die Golgi-Fraktion wurde mit der Golgi-Fraktion der nichtinfizierten, unmarkierten Wildtypzellen 0, 20 oder 40 min lang inkubiert und dann mit EndoH behandelt. Nach 5 min Chase in vivo und 20 min Inkubation in vitro ließ sich EndoH-resistentes G-Protein nachweisen. Abdruck in veränderter Form nach Fries und Rothman.^[4]

zellfreie Transport entsprechend schwächer wird. Eine erneute Betrachtung unserer ersten Experimente bestätigte, dass dies sogar dann nicht schlagartig geschah, wenn die Energieversorgung unterbrochen war; der Transport war während der einige Minuten dauernden Phase, bis die Zelle das gesamte ATP aufgebraucht hatte, weitergelaufen. Diese Zeit reichte aus, dass viel G-Protein den Golgi-Apparat erreichte, sodass die Ergebnisse der beiden Experimente vereinbar waren. (Es stellte sich heraus, dass der Transport nur etwa $10\ \mu\text{M}$ ATP erfordert, während die Zellen ATP normalerweise im niedrigen millimolaren Bereich vorhalten; der Transport kann also weitergehen, bis die Zelle fast das gesamte ATP verbraucht hat.)

Die Effizienz des zellfreien Transports war so stark von der Anwesenheit des VSV-G-Proteins im Golgi-Apparat (im Gegensatz zu anderen zellulären Membranen) abhängig, dass wir sicher waren, dass dies eine funktionierende Rekonstitution war und nicht das Ergebnis einer unspezifischen Membranfusion. Eine genauere Analyse^[8–10] bestätigte dies bald und ermöglichte wichtige Verbesserungen. Gibt man UDP- ^3H -GlcNAc (den GlcNAc-Donor für die Glycosylierung durch NAGT-I) hinzu, wird jedes transportierte G-Protein mit einer festen Menge an Radioaktivität markiert, wenn es im Akzeptor-Golgi-Feld ankommt. Der Transport lässt sich dann einfach anhand des produzierten ^3H -G-Proteins

messen. Diese Variation, die wir zusammen mit dem damaligen Postdoktoranden William Balch^[8] einführten, verbesserte das Signal-Rausch-Verhältnis und den dynamischen Messbereich des Tests enorm und ermöglichte die genaue Bestimmung von Anfangsgeschwindigkeiten. Dies wiederum machte aus dem Test einen praktischen Ausgangspunkt für die Enzymologie, um die Reinigung und Entdeckung der erforderlichen Komponenten zu führen.

Mit der ^3H -Markierung der transportierten G-Proteine konnten wir nun auf Autoradiographien von elektronenmikroskopischen Schnitten die Akzeptorseite, wo sich das markierte Protein befand, lokalisieren (Abbildung 14a). Diese Analyse des Postdoktoranden William Braell^[10] bestätigte, dass das glycosylierte G-Protein sich in morphologisch intakten Golgi-Stapeln aus dem Akzeptor-Homogenat befindet. Die vom Donor und vom Akzeptor stammenden Golgi-Stapel bleiben also zwei unterschiedliche und unveränderte Populationen, und das prozessierte G-Protein befindet sich ausschließlich in der Golgi-Population des Akzeptors (Abbildung 14b), was nachdrücklich darauf hinweist, dass das G-Protein zwischen diesen Populationen in Vesikeln transferiert wird. Elektronenmikroskopisch entdeckten wir dann, dass sich 70–90 nm große Vesikel mit G-Protein an den Golgi-Stapeln des Donors bilden (Abbildung 14c).^[9] Spätere Arbeiten mit Lelio Orci von der Universität Genf bewiesen

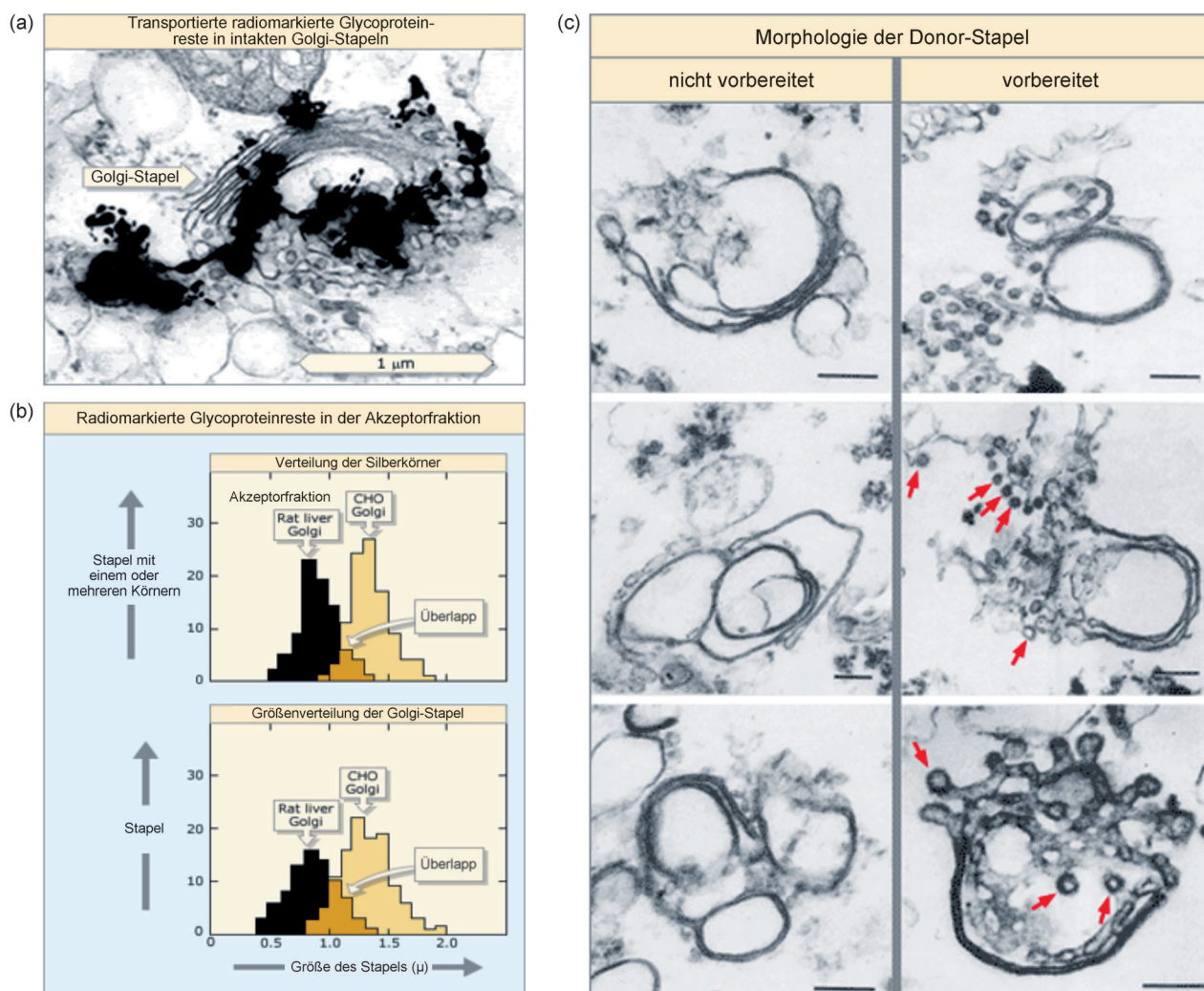


Abbildung 14. a) Die elektronenmikroskopische Autoradiographie zeigt, dass ^3H -GlcNAc enthaltendes Protein mit den Golgi-Stapeln assoziiert ist. Die Golgi-Fraktion von VSV-infizierten 15B-Zellen wurde mit der Golgi-Fraktion von Wildtypzellen inkubiert, die UDP- ^3H -GlcNAc aufgenommen hatten, und die Mischung wurde für die Elektronenmikroskopie-Autoradiographie präpariert. Abdruck in veränderter Form nach Braell et al.^[10]

direkt, dass diese Vesikel (heute als COPI-beschichtete Vesikel bezeichnet) VSV-G-Protein enthalten und von den Akzeptor-Stapeln eingefangen werden, wodurch sie sich zwischen den beiden Populationen äquilibrieren.^[11]

Das Grundprinzip der Vesikelknospung

Nachdem wir erstmals den Prozess der Vesikelknospung rekonstituiert hatten, konnten wir nun mit den Methoden der Enzymologie die beteiligten Proteine identifizieren und ihren Wirkungsmechanismus aufklären. Dazu wiederum mussten wir das Zwischenstadium der Knospung sichtbar machen, um so den Wirkort der zuständigen Proteine aufzuklären.

Es war ein Glücksfall, dass mich der bekannte Elektronenmikroskopiker Lelio Orci (Abbildung 15) nach der Lektüre unserer drei direkt hintereinander abgedruckten Publikationen in *Cell* (Dezember 1984), in denen die biochemischen Zwischenstadien beschrieben und die ersten Bilder von in zellfreien Extrakten gebildeten Vesikeln gezeigt waren,

über die Weihnachtsfeiertage anrief. Damit begann eine lange und außergewöhnlich produktive Zusammenarbeit, in der mithilfe der elektronenmikroskopischen Immunocytochemie Art und Zusammensetzung der Zwischenstadien des Transportes genauer aufgeklärt werden konnten. Schon bald bestätigten wir zusammen mit einem Diplomanden, Benjamin Glick, dass die knospenden Transportvesikel VSV-G-Protein in ihren Membranen enthielten und entdeckten, dass sie auf der Cytoplasma-Oberfläche eine Beschichtung trugen, die sich von der damals schon bekannten Clathrin-Schicht unterschied.^[12]

Der entscheidende Schritt zur Etablierung des Knospungsmechanismus ging auf meinen Befund zurück (den ich während eines kurzen Sabbaticals bei William Balch, damals in Yale, machte), dass der Transport durch ein nicht hydrolysierbares Analogon von GTP, GTP γ S, gehemmt wurde (Abbildung 16). Lelio und ich fanden dann gemeinsam mit dem Postdoktoranden Paul Melancon heraus,^[13] dass GTP γ S die Ablösung der Beschichtung blockiert, sodass die „COP-beschichteten“ Transportvesikel (wie wir sie damals nannten;

Lelio Orci
moderner Meister
der Morphologie



James
Rothman

“Golgi”

“Buffer”

Abbildung 15. Mein langjähriger Kooperationspartner und Freund Lelio Orci, der moderne Meister der Morphologie. Zwischen 1985 und 1993 kombinierten wir Morphologie und Enzymologie, als wir mit dem zellfreien System einen Zyklus des Vesikeltransports in seine Einzelschritte auflösten und dabei die COPI-beschichteten Vesikel und den GTPase-Schaltmechanismus entdeckten, der die Abschnürung der Transportvesikel und die Ablösung der Beschichtung für die Fusion steuert. Sogar unseren Hunden gaben wir die Namen Buffer und Golgi.

Inkubation	Einbau von [³ H] GlcNAc in VSV-G-Protein
vollständig	3500 cpm
- ATP	50
- Cytosol	75
- Golgi-Membranen	95
+ GTPγS (10 μM)	420
NEM-Membranen	225

Abbildung 16. Die Erfordernisse für zellfreien Transport von VSV-G-Protein zwischen Golgi-Stapeln mit dem vereinfachten Testsystem, das wir mit Bill Balch entwickelt hatten.^[8,9] In späteren Arbeiten mit Lelio Orci fanden wir zwei spezifische Transportinhibitoren (GTPγS und NEM), welche die Transportvesikel in verschiedenen Reifestadien akkumulierten.

inzwischen nennt man sie COPI, um sie von den COPII-Vesikeln, die von Randy Schekman entdeckt wurden,^[14] zu unterscheiden) sich massiv anhäuferten und eine Aufreinigung, durch Vevek Malhotra und Tito Serafini, möglich wurde (Abbildung 17).^[15] Aus den isolierten Vesikeln entstammen zwei zentrale Befunde: das aus sieben Untereinheiten zusammengesetzte „Coatomer“,^[16] das sich zu der Beschichtung anordnet, und die Entdeckung, dass die GTPase ADP-Ribosylierungsfaktor (ARF) gemeinsam mit dem Coatomer in stöchiometrischem Verhältnis vorliegt, was die ursprünglich rätselhaften Effekte von GTPγS erklärt. Diese letztere Beobachtung wies auch den Weg zu dem Grundprinzip, das dem Knospungsmechanismus zugrundeliegt:^[17–19] GTP-gebunde-

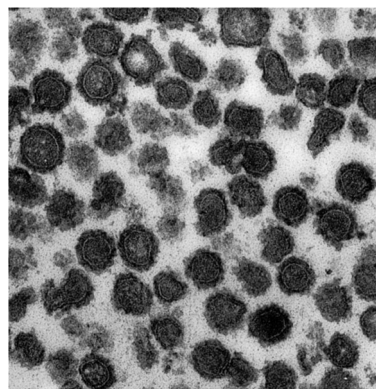


Abbildung 17. Bei Hemmung des Transportes mit GTPγS akkumulieren Zwischenstadien der Transportvesikel von ca. 70 nm Durchmesser, die in eine Proteinschicht eingehüllt waren (ursprünglich wurden sie als COP-beschichtete Vesikel, jetzt als COPI bezeichnet). Sie enthielten als Fracht das VSV-G-Protein. Eine reine Fraktion von COPI-beschichteten Vesikeln, die in zellfreien Inkubationen von Golgi-Membranen produziert worden waren,^[15] konnte durch die Blockade der Schichtablösung durch nichthydrolysierbare GTP-Analoga erhalten werden. Diese entscheidende Entwicklung ermöglichte die Entdeckung der Untereinheiten des Hüllproteins (Coatomer) und der Rolle des GTPase-Schalters des ARF-Proteins bei der sequentiellen Assoziation und Dissoziation der Beschichtung (Abbildung 18 < xfigr18).

nes ARF verankert das Coatomer im Golgi-Apparat (und löst den Aufbau der Beschichtung und die Vesikelknospung aus) und gibt es nach GTP-Hydrolyse wieder ins Cytoplasma frei (Ablösung der Beschichtung).

Bis 1993 war dieser einfache und intuitive Mechanismus durch den Einsatz reiner Proteine validiert.^[20] ARF wird mit GTP an der Golgi-Oberfläche aufgeladen und startet das Knospen, indem es Coatomer aus dem Cytosol einfängt. Das Coatomer, das nun lokal konzentriert und auf der Membranoberfläche orientiert vorliegt, organisiert sich spontan durch Polymerisation in eine Beschichtung unter Einschluss von ARF [GTP]. Die wachsende Schicht wirkt als mechanische Vorrichtung, um die darunterliegende Membran in die Form eines Vesikels zu bringen, dessen Größe durch den Innendurchmesser der Beschichtung bestimmt wird. Diese Schicht bildet nun ein Exoskelett, das abgelöst werden muss, damit das eingeschlossene Vesikel fusionieren kann; dies geschieht, wenn ARF das GTP hydrolysiert (Abbildung 18).

Nach dem gleichen Prinzip knospen auch Clathrin-beschichtete Vesikel^[21] und COPII-beschichtete Vesikel vom ER, was von Orci und Schekman nachgewiesen wurde.^[14] Die jeweiligen Vertreter der ARF-GTPase-Familie und das spezifische Coatomer variieren und ermöglichen so unterschiedliche physiologische Regulation (durch GTP-Austausch bzw. -Hydrolyse) und Beladung (durch Bindung an die Untereinheiten der Beschichtung). In allen Fällen aber treiben die Zyklen der GTP-Bindung und anschließenden Hydrolyse unidirektionale (vektorielle) Zyklen des Vesikelknospens und der Ablösung der Beschichtung für die Fusion mit einer Membran voran.

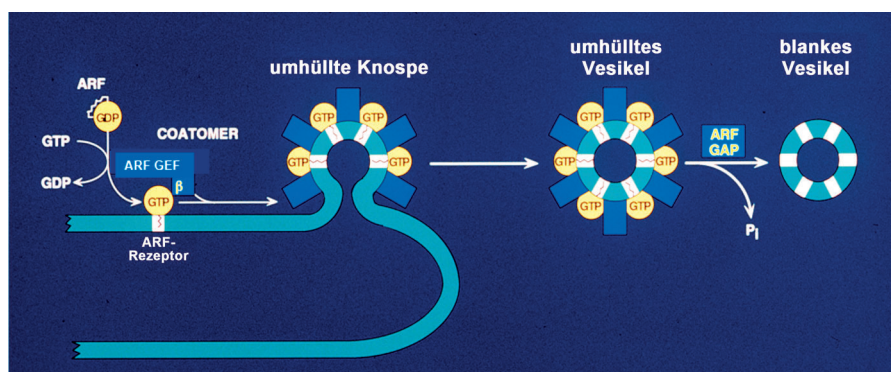


Abbildung 18. Der GTP-Schaltermechanismus für die sequentielle Knospung und Ablösung der Beschichtung von den Transportvesikeln für die Membranfusion. Rothman, Orci und Mitarbeiter 1991–1993. Details im Text.

Die cytosolischen Proteine für die Energieversorgung bei der Membranfusion

Die Identifizierung der ersten für die Membranfusion erforderlichen Proteine geht direkt auf die zellfreie Rekonstitution des Proteintransports zurück. Dieser Teil der Geschichte beginnt im Jahr 1987 mit dem Befund meines Diplomanden Benjamin Glick,^[22] dass der zellfreie Transport durch geringe Konzentrationen des sulfhydrylalkylierenden Reagens *N*-Ethylmaleimid (NEM) blockiert wird (Abbildung 16). Felix Wieland (zu dieser Zeit bei einem Sabbatical aus Regensburg) und ein Postdoktorand, Mark Block, reinigten daher den *N*-Ethylmaleimid-sensitiven Faktor (NSF) aus dem Cytosol von CHO-Zellen anhand der Fähigkeit, den Transport nach NEM-Inaktivierung wieder zu restituieren.^[23] Elektronenmikroskopie und andere Tests ergaben, dass NSF für die Fusion erforderlich ist, denn die Vesikel häufen sich nach NEM-Hemmung an (Abbildung 19).^[24] Wir nahmen bald an, dass NSF eine ATPase ist, NSF und die ATP-Hydrolyse für die Vesikelfusion in vielen Kompartimenten der Zelle notwendig sind und der Mechanismus in der Evolution stark konserviert ist. Wie bereits erwähnt, war die Identifi-

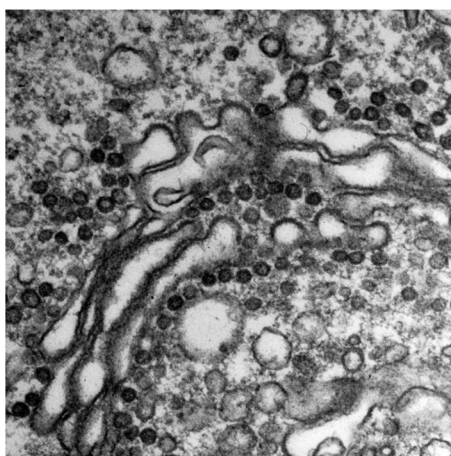


Abbildung 19. Durch NEM-Hemmung akkumulieren ca. 70 nm große unbeschichtete Vesikel, die VSV-G-Protein enthalten, die nicht fusionieren können. Nach Malhotra et al.^[24]

kation von NSF als tierisches Äquivalent zu Schekmans Hefe-Gen Sec18 entscheidend, weil es die physiologische Relevanz der mechanistischen Ergebnisse aus dem zellfreien System stützte und die Allgemeingültigkeit des Fusionsmechanismus voraussetzen ließ.^[6]

Weil NSF ein lösliches cytoplasmatisches Protein ist, muss es, um an dem Fusionsprozess beteiligt zu sein, an die Membran binden. Wie dies geschieht, wurde mit der Identifizierung des löslichen NSF-Anheftungsproteins (SNAP; soluble NSF attachment protein) klar, das anhand der Fähigkeit gereinigt wurde, NSF an die Golgi-Membranen zu binden (Abbildung 20). Die Arbeiten wurden von meinem Diplomanden Douglas Clary durchgeführt.^[25]

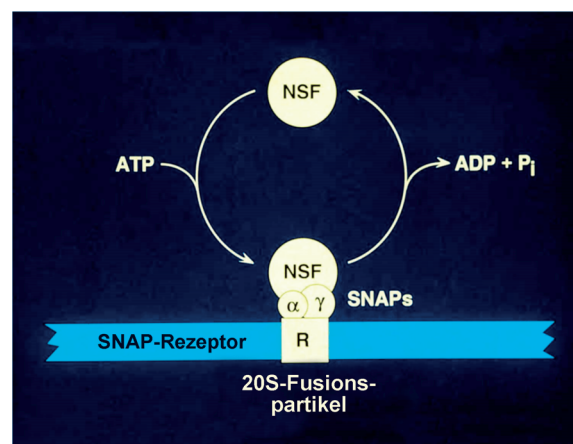


Abbildung 20. Zyklus der Assoziation und Dissoziation der 20S-Partikel. NSF, SNAPs und SNAREs bilden heterooligomere Komplexe, die als 20S-Partikel bezeichnet werden. Nach ATP-Hydrolyse durch NSF dissoziieren die 20S-Partikel und regenerieren die Einzelbestandteile für eine weitere Runde der Membranfusion.

Die Entdeckung des SNARE-Komplexes

Wie allerdings bindet SNAP – ebenfalls ein cytosolisches Protein – an die Membranen? SNAP bindet an einen oder mehrere sättigbare hochaffine „SNAP-Rezeptoren“ (die wir „SNAREs“ nannten) auf der Golgi-Membran, bevor es die ATP-tragende Form von NSF bindet. Dieser Komplex aus NSF, SNAP und SNAREs sedimentiert als 20S-Partikel nach Extraktion aus der Membran mit milden Detergentien. Wenn NSF das ATP hydrolysiert, löst es sich selbst aus dem Komplex.^[26]

Wahrscheinlich sind SNAREs direkt in die Membran integriert, denn die SNAP-Rezeptoren behalten ihre Fähigkeit SNAP zu binden auch nach stark alkalischer Extraktion der Membranen, einer groben Behandlung, die alles mit Aus-

nahme integraler Membranproteine entfernt.^[27] Daher rückte die Reinigung dieses Membranproteins ganz nach oben auf unserer Liste, weil wir erwarteten, dass die Fusion von Lipiddoppelschichten auf membranverankerte Proteine angewiesen sei. Die SNARE-Proteine wurden daher die heißesten Kandidaten für die Fusionsproteine.

An dieser kritischen Stelle unseres Weges kam 1991 Thomas Söllner zu uns (Abbildung 21 rechts), ein begabter Wissenschaftler, der gerade in New York City am Sloan-Kettering ankam, als ich ebenfalls dorthin gewechselt war, um das Cellular Biochemistry and Biophysics Department aufzubauen. Thomas hatte soeben grundlegende Arbeiten abgeschlossen, in denen er Schlüsselproteine für den Proteinimport aus der äußeren Mitochondrienmembran isoliert hatte. Er hatte bei Walter Neubert in München in Biochemie promoviert. Das war ein weiteres glückliches Ereignis und der Anfang einer sehr produktiven, etwa zehn Jahre dauernden Zusammenarbeit, während der wir die Thesen der SNARE-Hypothese aufstellten und testeten.

Die Bedeutung des scheinbar sinnlosen Zyklus (Abbildung 20) aus Membranbindung und ATPase-getriebener Ablösung von NSF war zur der Zeit, als Söllner zu meinem Labor stieß, unklar. Wir hatten uns zunächst vorgestellt, dass die Energie aus der ATP-Hydrolyse irgendwie die membranverankerten SNAREs aktivieren und so die Fusion vortreiben würde. Die Existenz eines Binden/Freisetzen-Zyklus hatte einen großen Einfluss auf unsere Strategie, die SNAREs zu identifizieren. Die Assoziation und Dissoziation der 20S-Partikel, an der auch Bindung und Freisetzung des NSF von SNAP beteiligt war, konnte als sequenzieller Affinitätsreinigungsschritt ausgenutzt werden, um die SNAREs

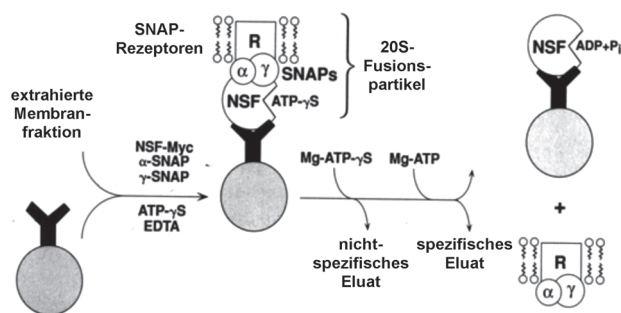
zu isolieren (Abbildung 21 links). Frühere Experimente hatten ergeben, dass chromatographische Standardverfahren und ein einzelner Affinitätsschritt nicht ausreichten, um die SNAREs zu isolieren; der 20S-ATPase-Zyklus würde aber eine zweite Ebene biologischer Spezifität hinzufügen.

Die SNARE- (also SNAP-bindende) Aktivität ließ sich in ungereinigten Membranfraktionen der Homogenate verschiedener Zelllinien und tierischer Gewebe nachweisen, außerdem in den gereinigten Golgi-Membranen, in denen sie ursprünglich entdeckt worden waren. Gehirn-Homogenate erwiesen sich von den getesteten Quellen als die mit der höchsten spezifischen SNARE-Aktivität, und große Mengen an SNAREs konnten einfach gewonnen werden. Dies sind natürlich die klassischen Kriterien, um eine Quelle für die Proteinreinigung auszuwählen. In unserem Fall sollte sich die Wahl des Gehirns aber aus unerwarteten Gründen als besonders glücklich herausstellen. Die graue Substanz wurde homogenisiert, die Gesamtmembranfraktion durch Zentrifugation isoliert, und dann wurde ein „löslicher“ Proteinextrakt hergestellt, indem das Membransediment mit einem Detergens behandelt wurde. Dieser Detergensextrakt enthielt die SNARE-Aktivität und den Großteil der integralen Membranproteine, die nun „solubilisiert“, also in Detergensemellen verteilt waren.

Der Assoziationsarm des NSF-Zyklus wurde dann in präparativem Maßstab als erster von zwei biologisch spezifischen Schritten genutzt (siehe Abbildung 20). Die Idee war, dass SNAREs aus der Masse des Membranproteins durch den Einbau in die 20S-Komplexe abgetrennt würden, die sich durch die Zugabe von gereinigten rekombinanten (in Bakterien exprimierten) NSF- und SNAP-Proteinen bildeten.

Diese Inkubation sollte in Gegenwart von ATP γ S (einem nichthydrolysierbaren ATP-Analogon) ohne freie Magnesiumionen (Mg^{2+} ist für die Hydrolyse von ATP durch NSF erforderlich) ablaufen, um die Bildung der 20S-Partikel zu begünstigen. Das rekombinante NSF wurde mit einem kurzen Peptidepitop von myc exprimiert, um die 20S-Partikel mit monoklonalen Antikörpern (immobilisiert auf Harzkügelchen) gegen dieses myc-Epitop isolieren zu können.

Der zweite biologisch spezifische Schritt rekapitulierte die Dissoziation des 20S-Partikels. Wie in Abbildung 21 (links) dargestellt, sollten die SNAREs freigesetzt werden, wenn die Kügelchen mit Magnesiumionen und ATP inkubiert wurden, damit NSF das ATP hydrolysieren kann. Das rekombinante, mit myc markierte NSF würde an den Kügelchen über den Anti-



Thomas Söllner
um 1993

Abbildung 21. Reinigung der SNARE-Proteine. Oben: Rekombinantes SNAP und epitopmarkiertes NSF wurden zusammen mit SNAREs aus solubilisierten Membranfraktionen in Gegenwart des nichthydrolysierbaren ATP-Analogons ATP γ S zu 20S-Partikeln assoziiert. Die 20S-Partikel wurden dann über einen Antikörper gegen das epitopmarkierte NSF auf Kügelchen immobilisiert, in Gegenwart von MgATP γ S gewaschen („unspezifisches Eluat“) und dann in Gegenwart von MgATP dissoziiert, wobei SNAPs und SNAREs freigesetzt werden („spezifisches Eluat“). NSF bleibt über den Antikörper an die Kügelchen gebunden. Aus Lit. [28]. Unten: Thomas H. Söllner (um 1993), der bei mir am Sloan-Kettering arbeitete und mit dem ich den SNARE-Komplex entdeckte und eine produktive Zusammenarbeit über das folgende Jahrzehnt hin hatte, in der die SNARE-Hypothese für die spezifische Membranfusion entwickelt wurde. Thomas ist heute Professor für Biochemie an der Universität Heidelberg. Es war mir ein Vergnügen, dass er bei meinem Nobelvortrag zugegen war und ich ihn bei dieser Gelegenheit vorstellen konnte.

körper gebunden verbleiben, während die rekombinanten SNAP-Proteine gemeinsam mit den SNAP-bindenden Proteinen aus den Gehirnmembranen eluiert wurden.

Weil die Vesikelfusion in vielen Membrankompartimenten abläuft, hatten wir vermutet, dass Zellen eine große Familie von SNARE-Proteinen mit kognaten Sequenzen besitzen würden, die unterschiedlich lokalisiert wären. Wir waren daher überrascht, als die SNAREs aus dem gesamten Gehirn ein bemerkenswert einfaches Proteinmuster ergaben (Abbildung 22, rechts), das aus nur vier Proteinen bestand, von denen jedes in dem spezifischen MgATP-Eluat vorkam, nicht aber in dem unspezifischen MgATP γ S-Eluat.^[28]

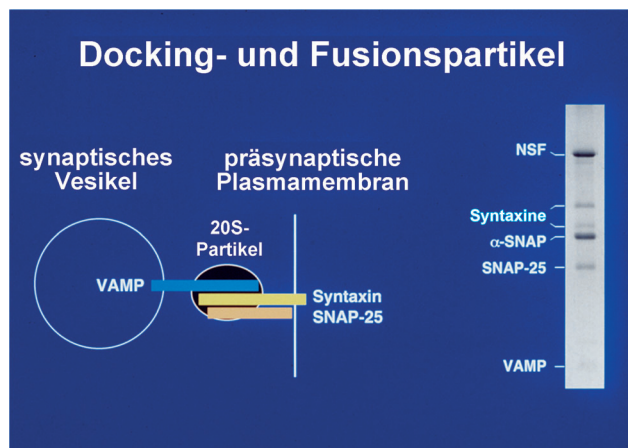


Abbildung 22. Der SNARE-Komplex, zur Zeit der Entdeckung Andock- und Fusionspartikel genannt. Rechts: das spezifische MgATP-Eluat wurde durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert. Die Proteine wurden durch Färbung mit Coomassie-Blue sichtbar gemacht und dann durch Aminosäure-Sequenzierung und Massenspektroskopie identifiziert. Die Banden im oberen Teil des Gels wurden auch im unspezifischen Eluat gefunden. Links: Unsere Interpretation, nach der ein Komplex der SNARE-Proteine das synaptische Vesikel mit der Plasmamembran verbindet und an dem angedockten Vesikel die Fusion initiiert. Aus Lit. [28].

Die Identität und Reinheit dieser Membranproteine wurde durch Mikrosequenzierung und durch Massenspektroskopie von Peptiden gesichert, die aus der winzigen Materialmenge stammten, die wir isoliert hatten. Möglich machte dies Paul Tempst, der Experte für Proteinchemie am Sloan-Kettering. Überraschend war auch, dass alle vier SNAREs Proteine sind, die in Synapsen vorkommen (Abbildung 22 rechts). Sie waren zwar alle schon vorher kloniert und sequenziert worden, doch ihre Funktion war noch unbekannt. Zwei davon sind Isoformen des Syntaxins, eines Plasmamembranproteins, das unabhängig von Richard Scheller^[29] und Kimio Akagawa^[30] identifiziert worden war. Das dritte SNARE-Protein ist SNAP-25 (Synaptosom-assoziiertes Protein von 25 kDa), kloniert von Michael Wilson.^[31] SNAP-25 findet sich hauptsächlich in der Plasmamembran und wurde ursprünglich aufgrund seiner hohen Konzentration in den Synapsen identifiziert. Seine Verbindung mit Syntaxin und der Membranfusion war eine Überraschung, ebenso wie die zufällige Ähnlichkeit des Akronyms mit der Bezeichnung SNAP für „soluble NSF attachment protein“.

VAMP/Synaptobrevin-2 war das letzte SNARE-Protein, das auftauchte. Es war unabhängig von Pietro DeCamilli und Reinhard Jahn und von Scheller kloniert worden.^[32,33] Im Gegensatz zu SNAP-25 und Syntaxin kommt VAMP hauptsächlich in den synaptischen Vesikeln vor.

Die Entdeckung von VAMP in dem Komplex war die ausschlaggebende Beobachtung, denn sie machte sofort klar, wie der Komplex der SNARE-Proteine (vielleicht mit NSF und SNAP) für die Membranfusionen wichtig werden könnte. Da VAMP aus der Vesikelmembran ins Cytosol hinausragt und Syntaxin und SNAP-25 in ähnlicher Weise aus der Plasmamembran ragen, könnte ein Komplex aus allen drei integralen Membranproteinen das Vesikel an die Plasmamembran heranbringen und ihre Lipiddoppelschichten bis zur molekularen Kontaktdistanz annähern (Abbildung 22 links).

Die SNARE-Hypothese und die Grundprinzipien der Membranfusion

Anstatt uns auf den Spezialfall der Exocytose synaptischer Vesikel zu beschränken, beschlossen wir, den SNARE-Komplex spekulativer unter einem sehr breiten Blickwinkel zu betrachten.^[28]

Erstens ist prinzipiell erforderlich, dass Vesikel und Zielmembran irgendwie markiert werden, um anzuzeigen, welche Vesikel wo fusionieren sollen. Dies erfordert wiederum, dass Vesikel- und Zielmembran-Markierungen paarweise zueinander passen müssen. Wir vermuteten als einfachsten Mechanismus für dieses Zusammenpassen eine Selbstorganisation, bei der nur passende Paare kognater Vesikel- („v“) und Zielmembran-Markierungen („t“ für „target“) zwischen den Membranen aneinander binden und dabei als Voraussetzung für die Membranfusion einen „v-t“-Komplex bilden.

Basierend auf unserem Konzept kognater Vesikel- und Zielmembranmarkierungen formulierten wir die „SNARE-Hypothese“, nach der die SNAREs die Markierungen von Vesikeln und Zielmembranen sind; wir nannten sie v-SNARE und t-SNARE (Abbildung 23). VAMP ist das v-SNARE des synaptischen Vesikels; Syntaxin und SNAP-25 sind die Untereinheiten des zugehörigen t-SNARE in der Plasmamembran. Die SNARE-Hypothese bildete den konzeptionellen Rahmen, um unsere Ergebnisse zu verallgemeinern. Wir schlugen vor, dass jeder Vesikeltyp in der Zelle sein eigenes charakteristisches v-SNARE, ein Homologes von VAMP, tragen sollte und dass jede Zielmembran in der Zelle mit einem charakteristischen t-SNARE mit Untereinheiten analog zu Syntaxin und SNAP-25 markiert sein sollte. Wir schlugen außerdem vor, dass im einfachsten Fall, d. h. wenn es keine andere Quelle für Spezifität gibt, nur dann ein produktives Fusionsereignis initiiert wird, wenn komplementäre v-SNARE- und t-SNARE-Paare zusammenfinden.^[28]

In Übereinstimmung mit unserem einfachen Modell sind VAMP und Syntaxin membranverankerte Proteine mit cytoplasmatischen Domänen, und SNAP-25 ist an der Cytoplasmaseite der Plasmamembran über kovalent gebundene Fettsäuren verankert. Etwa äquimolare Mengen von VAMP, Syntaxin (die beiden Isoformen zusammengefasst) und SNAP-25 wurden in den isolierten Komplexen gefunden.

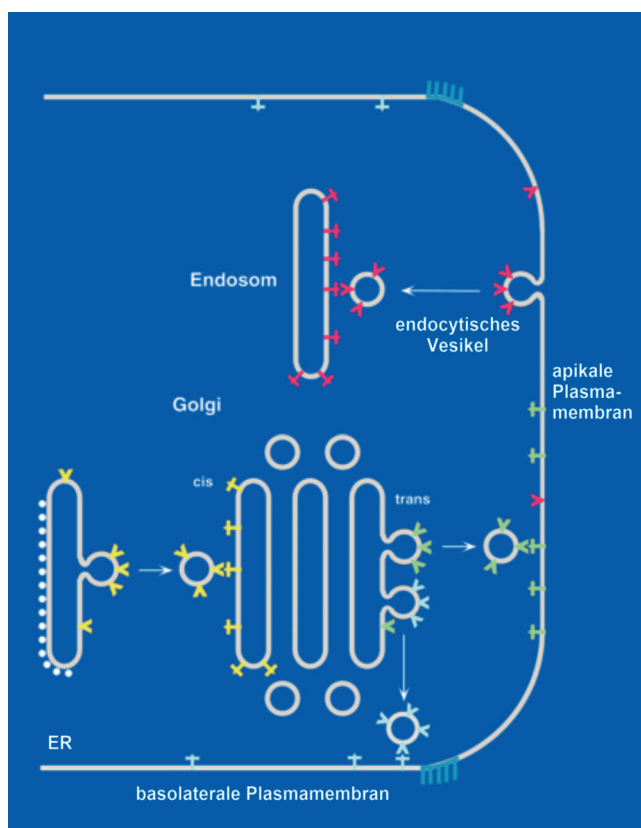


Abbildung 23. Die SNARE-Hypothese, wie sie ursprünglich vorgeschlagen wurde; Erklärungen im Text. Aus Lit. [28].

Außerdem ließen sich die SNARE-Proteine isolieren, weil sie an NSF und SNAPs (deren Rolle bei der Membranfusion bekannt war) binden und mit ihnen ein 20S-Partikel bilden. Dies deutet darauf hin, dass auch SNAREs an der Fusion beteiligt sind. Der SNARE-Komplex schaffte es in nur fünf Wochen von der ersten Entdeckung bis zur Publikation.

Zur Zeit dieses Experiments erschien die Membranfusion komplex und verwirrend, weil ein konzeptioneller Rahmen fehlte, in dem man die ständig wachsende Liste von Genen und Sequenzen organisieren konnte. Viele Gene und Proteine aus Hefe und tierischen Zellen, darunter Neuronen, schienen irgendwie an dem Gesamtprozess des Vesikeltransports oder der Fusion oder ihrer Regulation beteiligt zu sein. Man verstand schnell, dass viele dieser Gene und Proteine zu evolutionär konservierten Familien gehören, die verschiedene Transportschritte betreffen (dazu gibt es einen Übersichtsartikel von Bennet und Scheller).^[34] Allein aus dem synaptischen Vesikel waren ein Dutzend oder mehr Proteine bekannt. Es war aber ein Ratespiel, welche Proteine die Fusion katalysieren oder die Spezifität sichern könnten, abgesehen von indirekten Einflüssen auf die Fusion auf der Ebene der zellulären Regulation. Viele Proteine wurden als Kandidaten für die Fusion angesehen, dazu zu manchen Zeiten Synaptophysin, Synaptoporin und SV2. Obwohl aber VAMP und Syntaxin als wichtige Komponenten angesehen wurden, wurden sie in diesem Zusammenhang nicht beachtet und nicht für eine Komplexbildung vorgeschlagen, und SNAP-25 wurde nicht mit der Exocytose in Verbindung gebracht.

Die enorme Wirkung unserer Veröffentlichung rührte von der Kombination aus einer unerwarteten Entdeckung – dem SNARE-Komplex – und einem klaren und allgemeinen Konzept – der SNARE-Hypothese. Sie wurde noch verstärkt, weil die Entdeckung des SNARE-Komplexes eng mit drei Gebieten [Zellbiologie (Vesikeltransport), Physiologie (endokrine und exokrine Sekretion) und Neurobiologie (synaptische Übertragung)] und drei Disziplinen (zellfreie Biochemie, Hefegenetik und Elektrophysiologie) verknüpft war. Als Ergebnis unserer Publikation änderte sich die Schwerpunktsetzung in der Zellbiologie, weg von Unterschieden in der Physiologie und Regulation und hin zur Kernmaschinerie und zu generellen Mechanismen.

In nachfolgenden Arbeiten fanden wir heraus, dass NSF und SNAP den SNARE-Komplex auflösen und dabei die Energie aus der ATP-Hydrolyse verwenden;^[35] später zeigte William Wickner, dass SNAP und NSF nicht direkt an der Fusion der Doppelschicht beteiligt sind.^[36] Dies richtete die Aufmerksamkeit auf die einfachste verbleibende Möglichkeit, dass nämlich der SNARE-Komplex ausreicht, um die Fusion zu vermitteln. NSF und SNARE spielen allerdings eine entscheidende Rolle dabei, den Fortgang der Fusion aufrechtzuerhalten. Sie trennen nach der Fusion die v-SNAREs von den t-SNAREs (d.h., wenn sie sich in der gleichen Doppelschicht befinden), nicht aber während der Fusion (d.h., wenn sie zwischen den Doppelschichten gepaart sind).^[37] Dadurch können NSF und SNAP die SNARE-Komplexe nach der Fusion rezyklisieren, wohingegen sie während der Fusion erhalten bleiben.

Der SNARE-Komplex ist außergewöhnlich stabil; er widersteht einer Hitzedenaturierung bis 90 °C. Die stäbchenförmige Struktur des SNARE-Komplexes mit seinen Membranankern an einem Ende impliziert, dass er zwei Membranen in engen Kontakt zueinander bringen kann. Man vermutete, dass die Bindungsenergie aus der Zusammenlagerung von SNARE die Fusion der Doppelschichten vorantreiben könnte.^[39]

Ein direkter Test, ob der SNARE-Komplex tatsächlich das aktive Prinzip der Fusion ist, ist nur möglich, wenn man diese Funktion in Abwesenheit aller anderen Proteine untersucht. Die Rekonstitution rekombinanter exocytischer/neuronaler SNAREs in Liposomen bestätigte, dass die Paarung kognater SNAREs zwischen Lipiddoppelschichten tatsächlich eine spontane Membranfusion auslöst (Abbildung 24).^[40] Wenn sich komplementäre v-SNARE- und t-SNARE-Paare zusammenlagern, wird eine produktive Membranfusion nicht nur initiiert – wie wir zunächst geglaubt haben – sondern auch abgeschlossen.

Die Möglichkeit, die Fusion mit isolierten SNAREs zu beobachten, ermöglichte einen direkten Test der zentralen Stütze der SNARE-Hypothese, dass nämlich die Spezifität der Membranfusion in den physikalisch-chemischen Eigenschaften der isolierten SNARE-Proteine codiert ist.^[41–45] Insgesamt 275 Kombinationen der potenziellen v-SNAREs und t-SNAREs, die im Genom der Hefe codiert waren, wurden auf Fusionen getestet; sie repräsentieren ER, Golgi, Plasmamembran, Endosomen und Vakuolen (Lysosomen). Davon lösten nur 9 Kombinationen ($\approx 3\%$) eine Fusion aus, und alle mit einer Ausnahme ($\approx 0.4\%$) entsprechen be-

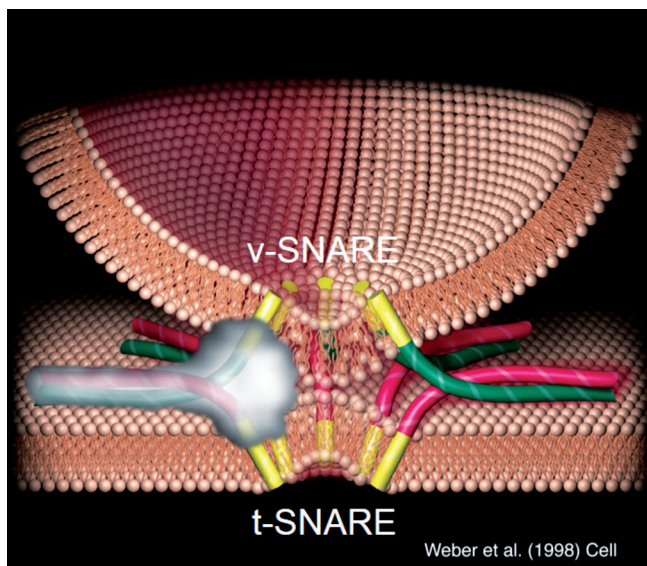


Abbildung 24. v-SNAREs (grün) auf einem Vesikel binden an die kognaten t-SNAREs (rot) auf der Zielmembran, bilden spezifische SNAREpins, die dann die beiden Membranen fusionieren. Zur Vereinfachung ist das t-SNARE als einzelnes längliches Stäbchen dargestellt, auch wenn inzwischen bekannt ist, dass drei α -Helices zu einem Vier-Helix-v-t-SNARE-Bündel beitragen. Andere Proteine regulieren die Assoziation und Dissoziation der SNAREpins und kontrollieren so die Membranfusion.

kannten Transportwegen (Abbildung 25). Praktisch ohne Ausnahme findet die Fusion nur mit den seltenen Kombinationen von v- und t-SNAREs statt, die aus Kompartimenten stammen, die auch in lebenden Zellen Vesikel austauschen. Anders ausgedrückt könnte ein physikalischer Chemiker, nur ausgerüstet mit der DNA-Sequenz von Hefe und der SNARE-Hypothese die isolierten SNAREs testen, um das

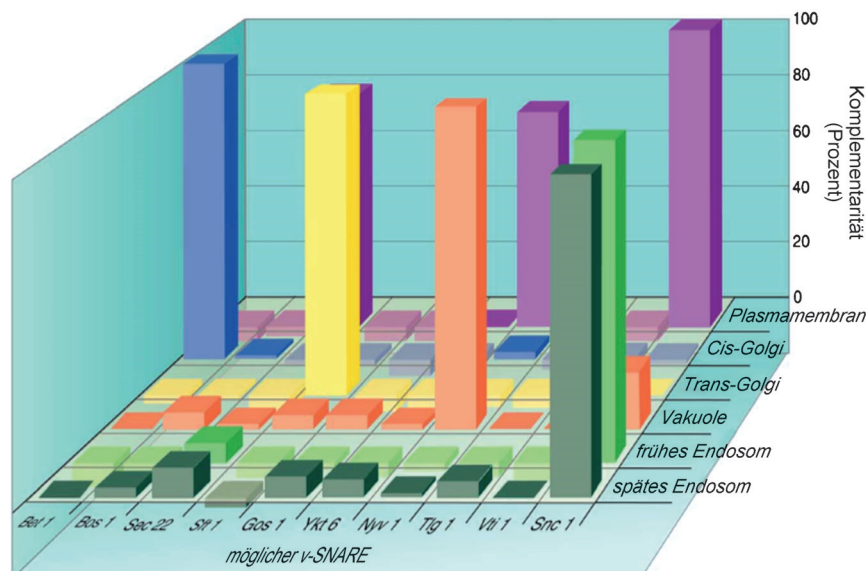


Abbildung 25. Der Nachweis, dass SNAREs die Transportspezifität zwischen den Kompartimenten sicherstellen, wurde in einem groß angelegten Experiment (2000–2002) geführt, in dem die Gegenstücke der SNAREs aus dem Hefegenom auf ihr Fusionspotential in vielen Kombinationen in rekonstituierten Lipidvesikeln getestet wurden. Weitere Details im Text.

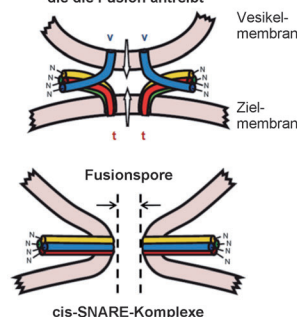
Fusionspotenzial und mögliche Transportwege der Zelle mit mindestens 99.6% Genauigkeit auszulesen.

Der Mechanismus der Lipiddoppelschicht-Fusion durch SNAREpins

Der physikalisch-chemische Fusionsmechanismus wurde hauptsächlich aufgrund der Röntgenkristallstruktur des SNARE-Komplexes vorgeschlagen, die von Axel Brunger und Reinhard Jahn gelöst wurde.^[46] Sie zeigte ein Bündel aus vier parallelen α -Helices, die zu einem Stäbchen angeordnet sind. Dieses zwingt die beiden Doppelschichten zusammen, wenn sich der Komplex wie ein Reißverschluss zusammenschiebt und die Fusion erzwingt (Abbildung 26). Wir nannten diese Stäbchen „SNAREpins“. Jüngst haben wir in Zusam-

Die Fusion ist mit der Faltung von SNARE-Proteinen zwischen Membranen thermodynamisch gekoppelt

Die Komplexierung der SNAREpins erzeugt eine Kraft, die die Fusion antreibt



- Die SNARE-vermittelte Fusion zwischen Vesikel und Doppelschicht ist schnell (10–100 ms nach dem Andocken) und spontan
- SNARE-Proteine falten während der Fusion zu einem stabilen Vier-Helix-Bündel
- Ein einzelnes SNAREpin genügt für die Doppelschichtfusion; eine optimale Fusion erfordert mehrere pins
- Die bei der Faltung von SNARE freigesetzte Energie fließt in die Doppelschicht
- SNAREs werden durch die NSF-ATPase wieder entfaltet und rezykliert

Abbildung 26. Zusammenfassung des aktuellen Kenntnisstandes zum Fusionsmechanismus. Abdruck in veränderter Form nach Südhof und Rothman.^[47]

menarbeit mit dem Kollegen Yongli Zhang aus Yale direkt in Einzelmolekülexperimenten die Kraft gemessen, die die Doppelschichten fusioniert (Abbildung 27). In diesen wird ein SNARE-Komplex buchstäblich auseinandergezogen und darf dann wieder zusammenschnurren – die Kraftquelle der Fusion –, was in zwei diskreten Schritten abläuft.^[48]

Das halb zusammengelagerte Zwischenprodukt stellt einen natürlichen Unterbrechungspunkt dar, der durch die Bindung anderer Proteine stabilisiert werden kann, was eine Regulation der Membranfusion nach dem Andocken der Vesikel möglich macht. Ein wichtiges Beispiel ist das Protein Complexin,^[49] das von Thomas Südhof (zusammen mit dem Calciumionen-Sensor Synaptotagmin)^[50] als Schlüsselement der Regulation der Neurotransmitter-

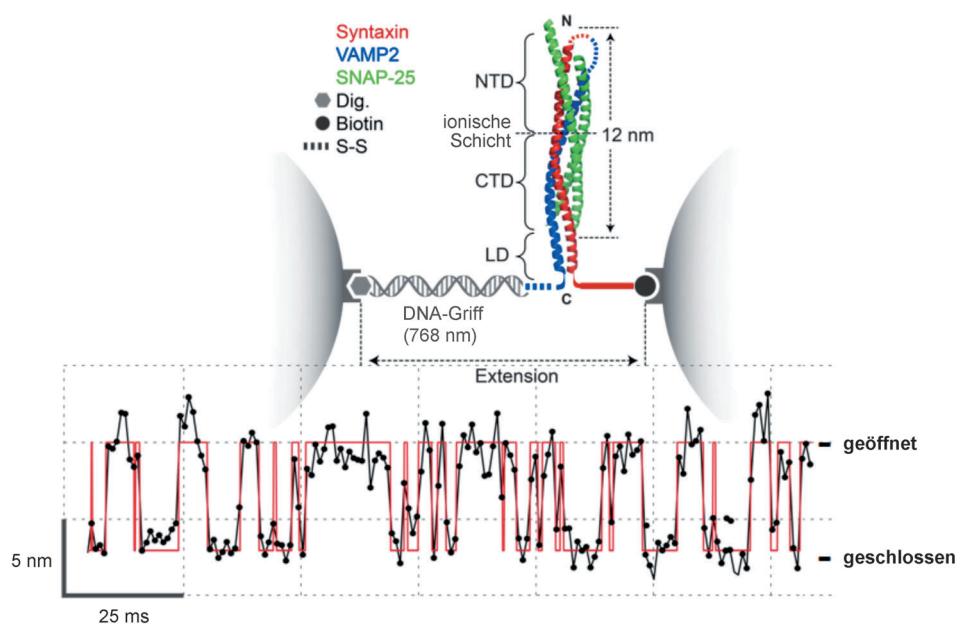


Abbildung 27. Die modulare Struktur des SNARE-Komplexes. Wenn die C-terminale (proximal zur Membran liegende) Hälfte des Vier-Helix-Bündels (CTD) mit einer optischen Pinzette auseinandergezogen wird, entfaltet und faltet sie sich in einer „Alles-oder-nichts“-Reaktion; in der SNARE-abhängigen Fusion gibt es also ein halbgefaltetes Zwischenstadium. Abdruck nach Gao et al.^[48]

freisetzung bei der synaptischen Übertragung entdeckt wurde. In einer aktuellen Zusammenarbeit mit Karin Reinisch^[51] fanden wir heraus, dass Complexin genau diesen halbgeschlossenen Zwischenzustand stabilisiert (Abbildung 28), was erklärt, wie synaptische Vesikel bereitstehen können, um Neurotransmitter in < 1 ms freisetzen zu können,

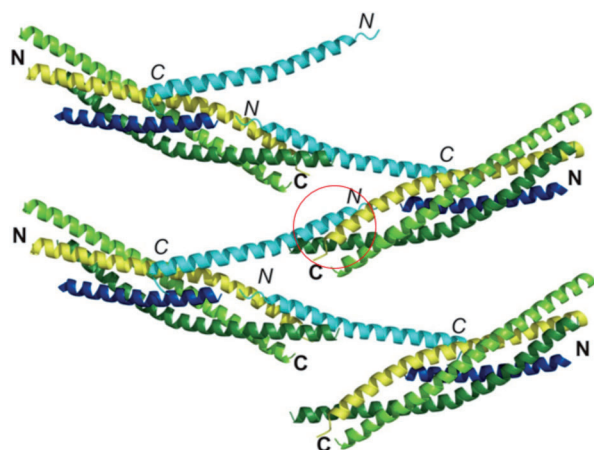


Abbildung 28. Complexin (magentafarbene Helices) verbindet halbgefaltete SNARE-Epines, um so die Freisetzung von Neurotransmittern zu synchronisieren und eine schnelle synaptische Signalweitergabe zu sichern. Die Hilfhelix von Complexin reicht von einem SNARE-Epin in die membranliegende Hälfte eines anderen (roter Kreis). Hier bindet die Hilfhelix an der gleichen Stelle an t-SNARE (grüne und gelbe Helices), an der sonst v-SNARE (blau) binden würde, um die Membranfusion abzuschließen. So stabilisiert Complexin die im anderen Falle nur übergangsweise vorkommende halbgefaltete Zwischenstufe, die mit den optischen Pinzetten sichtbar wurden (Abbildung 27). Abdruck nach Kümmel et al.^[51]

viel schneller also als die Zeit (50–100 ms), die für den Gesamtprozess der Fusion durch isolierte SNAREs nach der einleitenden Bindung durch den SNAREpin erforderlich ist.^[52]

Mit meinen jetzigen Labor-kollegen im Department of Cell Biology in Yale (Abbildung 29) hoffe ich hauptsächlich, aufzuklären, wie SNARE-Proteine bei der Exocytose reguliert werden; außerdem interessieren wir uns für noch offene Details der Dynamik der Proteinsortierung im Golgistapel.

Abschließende Überlegungen

Wie Membranen in der Zelle fließen, war ein fundamentales Problem der Biologie,

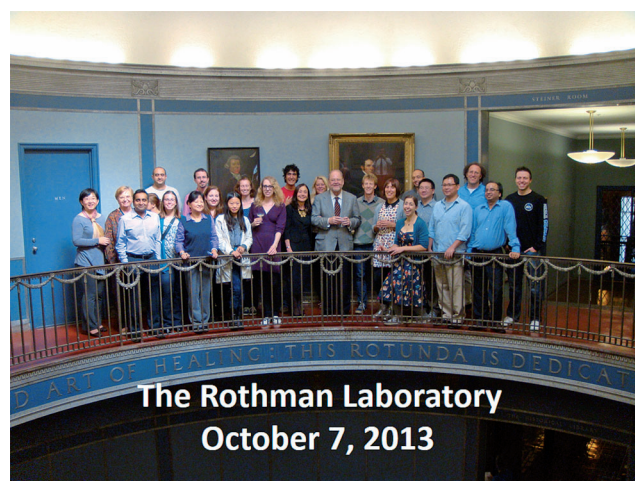


Abbildung 29. Meine Arbeitsgruppe und ich unter der Rotunde über der historischen Bibliothek der Yale Medical School am Morgen der Bekanntgabe des Nobelpreises. Rechts neben mir steht meine Frau, Professor Joy Hirsch.

das vor drei Jahrzehnten noch unlösbar schien. Heute jedoch haben wir eine Vorstellung von den wichtigsten Eigenschaften dieses lebensnotwendigen Prozesses auf der Ebene der physikalischen Chemie. Dies ist ein einfaches Zeugnis für die Kraft der reduktionistischen Methode der Wissenschaft, die so verständlich und so früh beim Aufscheinen der modernen Biochemie vor mehr als einem Jahrhundert von Eduard Buchner vertreten wurde (Abbildung 8).

Beim Verfassen dieses Vortrages, der mir die seltene Gelegenheit bietet, über Jahrzehnte auf die eigenen Beiträge zurückzublicken, konnte ich erkennen, wie das spezielle Ökosystem der Wissenschaftskultur meine Arbeit hat gedei-

hen lassen – oder wie es Sir Hans Krebs (Nobelpreis 1953) ausdrückte: „Scientists are not so much born as made by those who teach them“.^[53] In diesem ausgezeichneten Aufsatz erläutert Krebs seine Abstammung von großen Organikern und Biochemikern, eine Kette, die auf den Farbstoffchemiker von Baeyer zurückreicht, bis auf den heutigen Tag ungebrochen ist und fast nur aus Nobelpreisträgern besteht (Abbildung 30). Es gibt viele ähnliche Genealogien in anderen Disziplinen, wie der Genetik, Physiologie, Mikrobiologie und medizinischen Forschung. Solche außergewöhnlichen Öko-

einem Jahrhundert der Entdeckungen, dass es in der Biologie keinen Prozess gibt, der in seinem Kern nicht physikalisch-chemischer Natur ist. Als direkte Konsequenz können wir erwarten, dass zu gegebener Zeit alles Leben – sogar menschliches Denken und Fühlen – als Ausfluss physikalischer Vorgänge verstanden werden kann, als komplexe, organisch aufgebaute selbstbestimmende Maschinen. Diese Perspektive mag für manche beängstigend sein, doch dies sollte nicht so sein, denn sie bietet unserer Spezies auf lange Sicht die besten Aussichten.

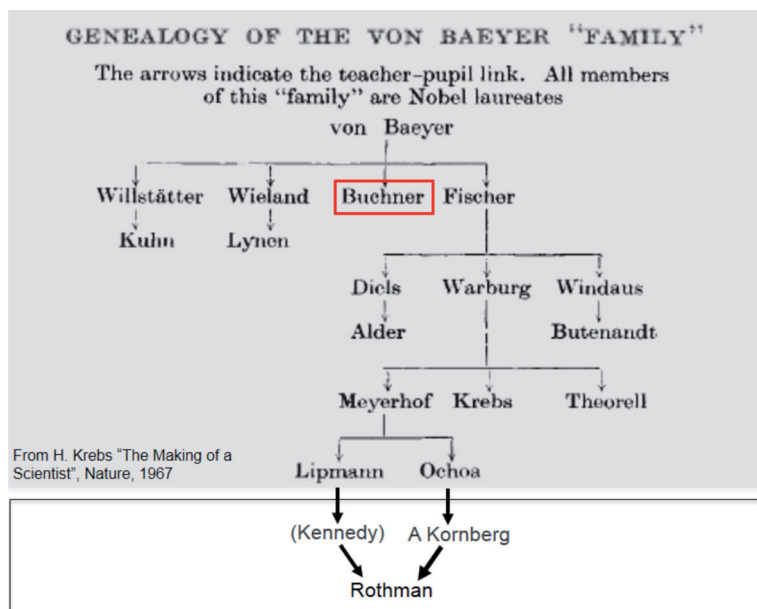


Abbildung 30. Ein Jahrhunderte altes wissenschaftliches Ökosystem — von der Farbchemie zur Enzymologie und zur modernen Zellbiologie. Der unterlegte Teil ist dem Artikel von H. Krebs „The Making of a Scientist“ (Nature, 1967)^[53] entnommen.

systeme haben eine starke zeitliche Komponente, die es schwer macht, sie zu etablieren. Wissenschaftliche Ökosysteme können nur in Gesellschaften gedeihen, die Wissenschaft langfristig pflegen.

Die Einsichten und Errungenschaften dieser Vorläufer machen mich zutiefst demütig. Wie Buchner zu seiner Zeit formulierte (Abbildung 31), teilen wir die tiefe Überzeugung, inzwischen untermauert durch die Ergebnisse von mehr als

“We must never let ourselves fall into thinking *"ignorabimus"* ("We shall never know"), but must have every confidence that the day will dawn when even those processes of life which are still a puzzle today will cease to be inaccessible to us natural scientists.” - E. Buchner

Abbildung 31. Buchners früher Glaube an den Reduktionismus erwies sich als wohlbegründet, und seine Worte klingen bis heute wahr. Aus Buchners Nobelvortrag am 11. Dezember 1907.

Danksagung

Obwohl Grundlagenforschung oft auch frustrierend sein kann, kombiniert sie doch Freude und Entdeckung gleichermaßen (etwas launisch illustriert in Abbildung 32). Ich danke meinem persönlichen „Ökosystem“, das geholfen hat, mein Leben in der Wissenschaft produktiv und freudvoll zu gestalten. Dies schließt eine erhebliche Dankesschuld an die vielen Studenten und Postdoktoranden ein, die zu diesem Gesamtwerk über mehr als dreißig Jahre beigetragen haben, und von denen ich die meisten nicht namentlich erwähnt habe. Es schließt auch die großen Vorbilder und Lehrer ein, bei denen ich ausgebildet wurde, wie im Text geschildert; das wunderbare Umfeld, in dem zu arbeiten ich das Privileg genossen habe, besonders in den frühen Jahren in Stanford und am Sloan-Kettering unter Paul Marks Anleitung; viele enge und langdauernde persönliche und wissenschaftliche Freundschaften, die mein Leben und meine Arbeit bereichert haben; und vor allem meine Frau, Seelenverwandte und intellektuelle Partnerin Hoy Hirsch und meine Kinder Lisa und Matthew.

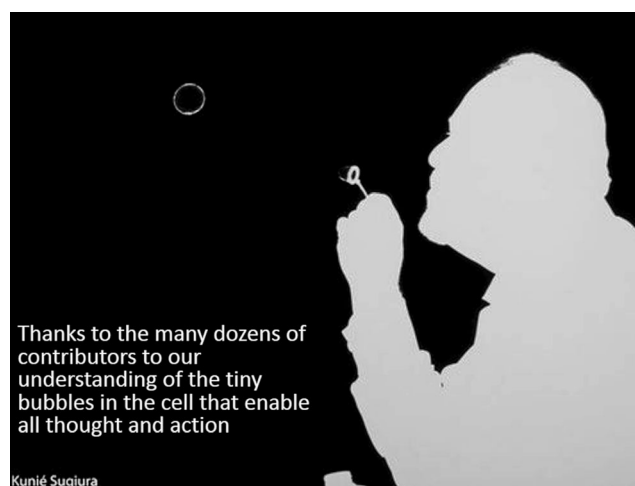


Abbildung 32. Die Blasen symbolisieren Vesikel in der Zelle, aber auch die Freude und Freiheit guter Wissenschaft. Als ich vor etwa zehn Jahren von der japanischen Photographin Sugiura gebeten wurde, für eines ihrer einzigartigen Photogramme zu posieren, während ich etwas tue, das meine wissenschaftliche Arbeit illustriert, entschied ich mich, Seifenblasen zu blasen.

Beim Schreiben dieses Nobelvortrages habe ich mich freigiebig bei eigenen Ausführungen bedient, die ich im Zusammenhang mit früheren Preisen verfasst habe, insbesondere beim Lasker-Award und beim Kavli-Preis, außerdem bei den beiden Publikationen in der Serie über „Berühmte Experimente“, einer Web-basierten Publikation von 2001, die leider nicht mehr verfügbar ist. Schließlich gilt noch ein besonderer Dank meiner Assistentin Willa Bellamy, die nach 22 Jahren in drei akademischen Instituten dieses Jahr in den Ruhestand getreten ist.

Eingegangen am 13. Februar 2014

Online veröffentlicht am 1. August 2014

Übersetzt von Dr. Burkard Neuß, Jülich

- [1] „Intracellular aspects of the process of protein synthesis“: G. Palade, *Science* **1975**, 189, 347–358.
- [2] „Yolk protein uptake in the oocyte of the mosquito *Aedes Aegypti* L.“: T. Roth, K. Porter, *J. Cell Biol.* **1964**, 20, 313–332.
- [3] „Clathrin: A unique protein associated with intracellular transfer of membrane by coated vesicles“: B. Pearse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1976**, 73, 1255–1259.
- [4] „Transient activity of Golgi-like membranes as donors of vesicular stomatitis viral glycoprotein in vitro“: E. Fries, J. Rothman, *J. Cell Biol.* **1981**, 90, 697–704.
- [5] „Transport of vesicular stomatitis virus glycoprotein in a cell-free extract“: E. Fries, J. Rothman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1980**, 77, 3870–3874.
- [6] „A fusion protein required for vesicle-mediated transport in both mammalian cells and yeast“: D. Wilson, C. Wilcox, G. Flynn, E. Chen, W. Kuang, W. Henzel, M. R. Block, A. Ullrich, J. Rothman, *Nature* **1989**, 339, 355–359.
- [7] „The identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway“: P. Novick, C. Field, R. Schekman, *Cell* **1980**, 21, 205–215.
- [8] „Reconstitution of the transport of protein between successive compartments of the Golgi measured by the coupled incorporation of N-acetylglucosamine“: W. Balch, W. Dunphy, W. Braell, J. Rothman, *Cell* **1984**, 39, 405–416.
- [9] „Sequential intermediates in the pathway of intercompartmental transport in a cell-free system“: W. Balch, B. Glick, J. Rothman, *Cell* **1984**, 39, 525–536.
- [10] „The glycoprotein that is transported between successive compartments of the Golgi in a cell-free system resides in stacks of cisternae“: W. Braell, W. Balch, D. Dobberty, J. Rothman, *Cell* **1984**, 39, 511–524.
- [11] „Dissection of a single round of vesicular transport: Sequential intermediates for intercisternal movement in the Golgi stack“: L. Orci, V. Malhotra, M. Amherdt, T. Serafini, J. Rothman, *Cell* **1989**, 56, 357–368.
- [12] „A new type of coated vesicular carrier that appears not to contain clathrin: Its possible role in protein transport within the Golgi stack“: L. Orci, B. Glick, J. Rothman, *Cell* **1986**, 46, 171–184.
- [13] „Involvement of GTP-binding “G” proteins in transport through the Golgi stack“: P. Melançon, B. Glick, V. Malhotra, P. Weidman, T. Serafini, M. Gleason, L. Orci, J. Rothman, *Cell* **1987**, 51, 1053–1062.
- [14] „COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum“: C. Barlowe, L. Orci, T. Yeung, M. Hosobuchi, S. Hamamoto, N. Salama, M. Rexach, M. Ravazzola, M. Amherdt, R. Schekman, *Cell* **1994**, 77, 895–907.
- [15] „Purification of a novel class of coated vesicles mediating biosynthetic protein transport through the Golgi stack“: V. Malhotra, T. Serafini, L. Orci, J. Shepherd, J. Rothman, *Cell* **1989**, 58, 329–336.
- [16] „‘Coatome’: A cytosolic protein complex containing subunits of non-clathrin-coated Golgi transport vesicles“: M. Waters, T. Serafini, J. Rothman, *Nature* **1991**, 349, 248–251.
- [17] „ADP-ribosylation factor is a subunit of the coat of Golgi-derived COP-coated vesicles: A novel role for a GTP-binding protein“: T. Serafini, L. Orci, M. Amherdt, M. Brunner, R. Kahn, J. Rothman, *Cell* **1991**, 67, 239–253.
- [18] „Hydrolysis of bound GTP by ARF protein triggers uncoating of Golgi-derived COP-coated vesicles“: G. Tanigawa, L. Orci, M. Amherdt, M. Ravazzola, J. Helms, J. Rothman, *J. Cell Biol.* **1993**, 123, 1365–1371.
- [19] „Stepwise assembly of functionally active transport vesicles“: J. Ostermann, L. Orci, K. Tani, M. Amherdt, M. Ravazzola, Z. Elazar, J. Rothman, *Cell* **1993**, 75, 1015–1025.
- [20] „Coated vesicle assembly in the Golgi requires only coatome and ARF proteins from the cytosol“: L. Orci, D. Palmer, M. Amherdt, J. Rothman, *Nature* **1993**, 364, 732–734.
- [21] „The binding of AP-1 clathrin adaptor particles to Golgi membranes requires ADP-ribosylation factor, a small GTP-binding protein“: M. Starnes, J. Rothman, *Cell* **1993**, 73, 999–1005.
- [22] „A possible role for acyl-coenzyme A in intracellular protein transport“: B. Glick, J. Rothman, *Nature* **1987**, 326, 309–312.
- [23] „Purification of an N-ethylmaleimide-sensitive protein catalyzing vesicular transport“: M. Block, B. Glick, C. Wilcox, F. Wieland, J. Rothman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, 85, 7852–7856.
- [24] „Role of an N-ethylmaleimide-sensitive transport component in promoting fusion of transport vesicles with cisternae of the Golgi stack“: V. Malhotra, L. Orci, B. Glick, M. Block, J. Rothman, *Cell* **1988**, 54, 221–227.
- [25] „SNAPs, a family of NSF attachment proteins involved in intracellular membrane fusion in animals and yeast“: D. Clary, I. Griff, J. Rothman, *Cell* **1990**, 61, 709–721.
- [26] „A multisubunit particle implicated in membrane fusion“: D. W. Wilson, S. W. Whiteheart, M. Wiedmann, M. Brunner, J. Rothman, *J. Cell. Biol.* **1992**, 117, 531–538.
- [27] „Binding of an N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein to Golgi membranes requires both a soluble protein(s) and an integral membrane receptor“: P. Weidman, P. Melançon, M. Block, J. Rothman, *J. Cell Biol.* **1989**, 108, 1589–1596.
- [28] „SNAP receptors implicated in vesicle targeting, and fusion“: T. Söllner, S. W. Whiteheart, M. Brunner, H. Erdjument-Bromage, S. Geromanos, P. Tempst, J. Rothman, *Nature* **1993**, 362, 318–324.
- [29] „Syntaxin: a synaptic protein implicated in docking of synaptic vesicles at presynaptic active zones“: M. Bennett, N. Calakos, R. Scheller, *Science* **1992**, 257, 255–259.
- [30] „Cloning and sequence analysis of cDNA for a neuronal cell membrane antigen, HPC-1“: A. Inoue, K. Obata, K. Akagawa, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 10613–10619.
- [31] „The identification of a novel synaptosomal-associated protein, SNAP-25, differentially expressed by neuronal subpopulations“: G. Oyler, G. Higgins, R. Hart, E. Battenberg, M. Billingsley, F. Bloom, M. Wilson, *J. Cell Biol.* **1989**, 109, 3039–3052.
- [32] „Synaptobrevin: an integral membrane protein of 18,000 daltons present in small synaptic vesicles of rat brain“: M. Baumert, P. R. Maycox, F. Navone, P. De Camilli, R. Jahn, *EMBO J.* **1989**, 8, 379–384.
- [33] „Two vesicle-associated membrane protein genes are differentially expressed in the rat central nervous system“: L. Elferink, W. Trimble, R. Scheller, *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 11061–11064.
- [34] „The molecular machinery for secretion is conserved from yeast to neurons“: M. Bennett, R. Scheller, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 2559–2563.

- [35] „A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion“: T. Söllner, M. Bennett, S. Whiteheart, R. Scheller, J. Rothman, *Cell* **1993**, 75, 409–418.
- [36] „Sec18p (NSF)-driven release of Sec17p (alpha-SNAP) can precede docking and fusion of yeast vacuoles“: A. Mayer, W. Wickner, A. Haas, *Cell* **1996**, 85, 83–94.
- [37] „SNAREpins are functionally resistant to disruption by NSF and alphaSNAP“: T. Weber, F. Parlati, J. McNew, R. Johnston, B. Westermann, T. Söllner, J. Rothman, *J. Cell Biol.* **2000**, 149, 1063–1072.
- [38] „Synaptic vesicle membrane fusion complex: action of clostridial neurotoxins on assembly“: T. Hayashi, H. McMahon, S. Yamasaki, T. Binz, Y. Hata, T. C. Südhof, H. Niemann, *EMBO J.* **1994**, 13, 5051–5061.
- [39] „Structure and conformational changes in NSF and its membrane receptor complexes visualized by quick-freeze/deep-etch electron microscopy“: P. Hanson, R. Roth, H. Morisaki, R. Jahn, J. Heuser, *Cell* **1997**, 90, 523–535.
- [40] „SNAREpins: Minimal machinery for membrane fusion“: T. Weber, B. Zemelman, J. McNew, B. Westermann, M. Gmachl, F. Parlati, T. Söllner, J. Rothman, *Cell* **1998**, 92, 759–772.
- [41] „Compartmental specificity of cellular membrane fusion encoded in SNARE proteins“: J. McNew, F. Parlati, R. Fukuda, R. Johnston, K. Paz, F. Paumet, T. Söllner, J. Rothman, *Nature* **2000**, 407, 153–159.
- [42] „Topological restriction of SNARE-dependent membrane fusion“: F. Parlati, J. McNew, R. Fukuda, R. Miller, T. Söllner, J. Rothman, *Nature* **2000**, 407, 194–198.
- [43] „Functional architecture of an intracellular membrane t-SNARE“: R. Fukuda, J. McNew, T. Weber, F. Parlati, T. Engel, W. Nickel, J. Rothman, T. Söllner, *Nature* **2000**, 407, 198–202.
- [44] „A t-SNARE of the endocytic pathway must be activated for fusion“: F. Paumet, B. Brügger, F. Parlati, J. McNew, T. Söllner, J. Rothman, *J. Cell Biol.* **2001**, 155, 961–968.
- [45] „Distinct SNARE complexes mediating membrane fusion in Golgi transport based on combinatorial specificity“: F. Parlati, O. Varlamov, K. Paz, J. McNew, D. Hurtado, T. Söllner, J. Rothman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 5424–5429.
- [46] „Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution“: R. Sutton, D. Fasshauer, R. Jahn, A. Brunger, *Nature* **1998**, 395, 347–353.
- [47] „Membrane Fusion: Grappling with SNARE and SM Proteins“: T. Südhof, J. Rothman, *Science* **2009**, 323, 474–477.
- [48] „Single Reconstituted Neuronal SNARE Complexes Zipper in Three Distinct Stages“: Y. Gao, S. Zorman, G. Gunderson, Z. Xi, L. Ma, G. Sirinakis, J. Rothman, Y. Zhang, *Science* **2012**, 337, 1340–1343.
- [49] „Complexins: cytosolic proteins that regulate SNAP receptor function“: H. McMahon, M. Missler, C. Li, T. Südhof, *Cell* **1995**, 83, 111–119.
- [50] „Synaptotagmin I: a major Ca²⁺ sensor for transmitter release at a central synapse“: M. Geppert, Y. Goda, R. Hammer, C. Li, T. Rosahl, C. Stevens, T. Südhof, *Cell* **1994**, 79, 717–727.
- [51] „Complexin Cross-links prefusion SNAREs into a Zig-Zag Array“: D. Kümmel, S. Krishnakumar, D. Radoff, F. Li, C. Giraud, F. Pincet, J. Rothman, K. Reinisch, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2011**, 18, 927–933.
- [52] „A fast, single-vesicle fusion assay mimics physiological SNARE requirements“: E. Karatekin, J. Di Giovanni, C. Iborra, J. Coleman, B. O’Shaughnessy, M. Seagar, J. Rothman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, 107, 3517–3521.
- [53] „The Making of a Scientist“: H. Krebs, *Nature* **1967**, 215, 1441–1445.