

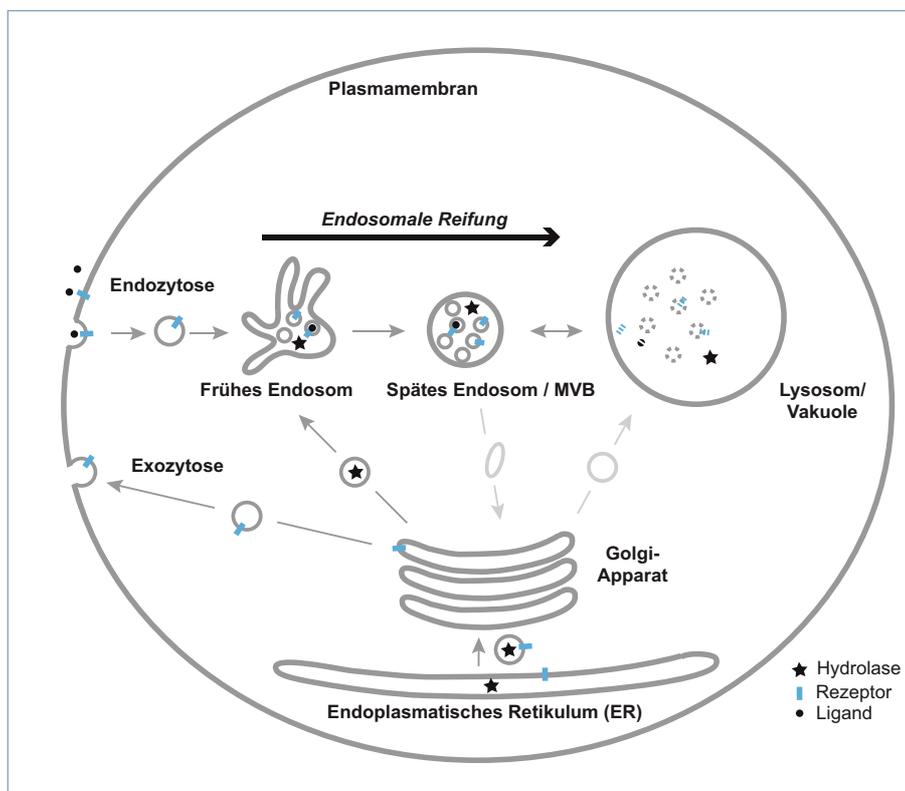
Zellkompartimente

Regulation der endosomalen und lysosomalen Biogenese

LARS LANGEMEYER, CHRISTIAN UNGERMANN
FACHBEREICH BIOLOGIE, UNIVERSITÄT OSNABRÜCK

Eukaryotic cells use the endocytic pathway to downregulate cell surface receptors or to take up nutrients from the outside, which are finally degraded in the lysosome. The machinery to degrade these components is also transported to lysosomes. Both pathways merge at the endosome, an organelle that undergoes massive membrane remodelling to remove proteins from its surface. Within this review, we will summarize our insights and approaches to unravel molecular mechanism of endosomal and lysosomal biogenesis.

DOI: 10.1007/s12268-015-0620-9
© Springer-Verlag 2015



▲ **Abb. 1:** Überblick über das Endomembransystem. Vesikulärer Transport verbindet Organellen des sekretorischen und endozytischen Systems. Abgebildet ist der Weg eines Rezeptors (blau) und einer Hydrolase (schwarzer Stern) vom Ort der Synthese im endoplasmatischen Retikulum (ER) zur Plasmamembran oder zum Lysosom. Ligandenbindung induziert Endozytose des Rezeptors in die Zelle. Der Abbau erfolgt nach Sortierung in das endosomale Lumen und Fusion der späten Endosomen mit der Vakuole. Dabei durchlaufen Endosomen einen Reifungsprozess. Der Rezeptor wird mithilfe von Hydrolasen im Lysosom abgebaut.

■ Eukaryotische Zellen verfügen über eine Vielzahl von membranumschlossenen Kompartimenten, in denen unterschiedliche zelluläre Reaktionen wie beispielsweise ATP-Synthese (in Mitochondrien), Abbau von Lipiden (in Peroxisomen) oder die Synthese von Proteinen (am Endoplasmatischen Retikulum, ER) ablaufen. Um ihre Funktion zu erfüllen, benötigt jedes Kompartiment einen spezifischen Satz an Proteinen, der vom Ort der Synthese zum Zielorganell transportiert werden muss. Im Endomembransystem, das beginnend mit dem ER über den Golgi-Apparat bis hin zu Endosomen und Lysosomen eine Reihe von Organellen umfasst, wird der Transport von Frachtproteinen über Vesikel bewerkstelligt (**Abb. 1**). Vesikel bilden sich an der Ursprungsmembran durch Ausstülpung, werden danach abgeschnürt und zur Zielmembran transportiert, mit der sie schließlich verschmelzen und so dort ihre Fracht abgeben. Die transportierten Proteine verbleiben auf ihrem Weg im Vesikellumen. Auch Hormone werden auf diese Weise von Zellen sekretiert, und ebenso werden Rezeptoren zur Zelloberfläche transportiert.

Unsere Forschung konzentriert sich auf den endozytischen Weg. In der Endozytose erfolgt die Aufnahme von Stoffen oder Rezeptoren in die Zelle ebenfalls mithilfe von Vesikeln. Beispielsweise werden Rezeptoren spezifisch von der Zelloberfläche entfernt, nachdem sie Liganden gebunden haben. Ebenso entfernt die Zelle überschüssige oder defekte Stofftransporter (für spezifische Aminosäuren, Kohlenhydrate oder Ionen) über diesen Weg von ihrer Oberfläche. Die endozytischen Vesikel verschmelzen mit dem frühen Endosom, einer Art Sortierungsorganell: Rezeptoren werden nach Dissoziation des Liganden wieder an die Zelloberfläche gebracht, andere Membranproteine in der Regel abgebaut. Dazu werden sie in das Lumen der Endosomen durch die Ausbildung von Einstülpungen geschleust. Dieser Prozess verändert die Morphologie der Endosomen, in deren Lumen sich intakte Vesikel anreichern. Wenn diese späten Endosomen (*multivesicular bodies*, MVB) den Sortierungsprozess beendet haben,

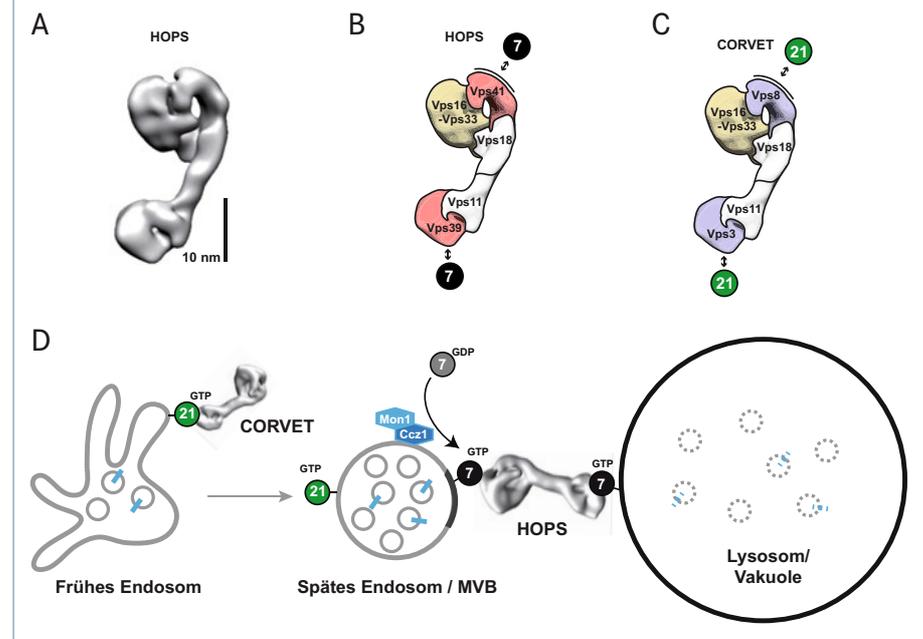
verschmelzen sie mit dem Lysosom. Dieses enthält eine Vielzahl von Hydrolasen, die alle eingebrachten Makromoleküle in ihre Grundbestandteile zerlegen. Diese werden vom Lysosom zur weiteren Nutzung ins Zytosol freigesetzt – ein durchaus bemerkenswertes Recycling auf molekularer Ebene!

Alle beschriebenen Fusionsprozesse, bei denen Vesikel mit einer Zielmembran verschmelzen, beruhen auf einer konservierten Maschinerie, die aus peripheren und integralen Membranproteinen besteht. Zu den peripheren Membranproteinen gehören Rab-GTPasen (Rabs), die ausschließlich in der aktiven, GTP-gebundenen Form an spezifische Effektorproteine, u.a. Anbindungsfaktoren (*Tether*), binden. Beide gemeinsam, Rabs und *Tether*, vermitteln spezifische Membrankontakte und beschleunigen so die Membranfusion erheblich [1]. Letztere benötigt außerdem vier SNAREs, (meist) integrale Membranproteine, die sowohl auf der Vesikel- als auch auf der Zielmembran vorhanden sind. Durch Ausbildung eines helikalen SNARE-Komplexes werden beide Membranen aneinandergezogen und verschmelzen. Der SNARE-Komplex wird nach der Fusion entwunden und steht für weitere Fusionen erneut zur Verfügung.

Bei der Reifung von frühen zu späten Endosomen ändert sich nicht nur ihre Morphologie, sondern auch ihr Oberflächenbesatz sowie die benötigte Fusionsmaschinerie – und hier beginnt der Forschungsfokus unserer Gruppe. Wir interessieren uns für die genauen Abläufe der endosomalen Reifung und Fusion, basierend auf Erkenntnissen zur Fusion von Vakuolen in der Bier- und Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*. Hefevakuolen entsprechen den Lysosomen höherer Zellen, die mit reifen Endosomen (und anderen Organellen) spezifisch fusionieren. In den letzten Jahren haben wir eine Reihe von Regulatoren und fehlende Komponenten der endosomalen und vakuolären Fusionsmaschinerie identifiziert und sowohl im zellulären Kontext als auch in Rekonstitutionsansätzen charakterisiert [2]. Ausgehend von der Beschreibung der an der Vakuolenfusion beteiligten SNAREs haben wir zwei zentrale *Tethering*-Komplexe, den endosomalen CORVET- und den vakuolären HOPS-Komplex, genauer analysiert.

Einblicke in die Funktionsweise von *Tethering*-Faktoren

Der hexamere HOPS-Komplex bindet die Rab7-ähnliche GTPase Ypt7 auf Vakuolen und erleichtert, wie wir heute wissen, die Ausbil-



▲ **Abb. 2:** Rab und *Tether* im endosomalen System. **A**, Struktur des HOPS-Komplexes, basierend auf elektronenmikroskopischen Analysen [3]. **B**, Aufbau des HOPS-Komplexes. Die relative Verteilung der Untereinheiten ist markiert. Bindestellen für Ypt7 (7) sind angedeutet. Reproduziert nach [2]. **C**, Verteilung der Untereinheiten im CORVET-Komplex. Die Homologiestruktur basiert auf dem HOPS-Modell. Die Bindestellen für das Rab-Vps21 (21) sind angezeigt. **D**, endosomale Reifung. Vps21-gebundener CORVET-Komplex vermittelt die Fusion im frühen endosomalen Weg. Aktivierung von Ypt7 mithilfe des GEF-Komplexes Mon1-Ccz1 erlaubt die Bindung an den HOPS-Komplex und Fusion mit der Vakuole bzw. dem Lysosom.

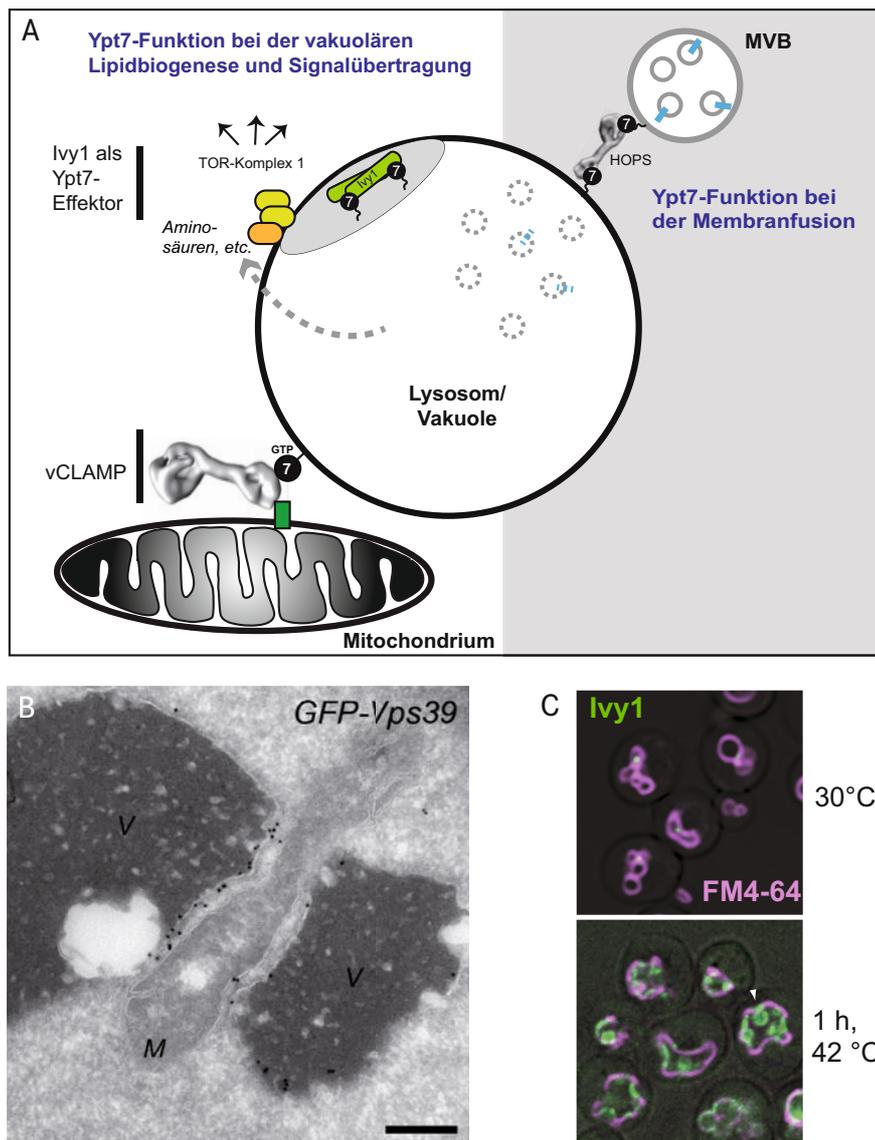
dung des SNARE-Komplexes zwischen fusionierenden Membranen. Es wurde lange spekuliert, wie HOPS die Fusion beschleunigt. Mithilfe des gereinigten Komplexes und detaillierter Analysen der Interaktionen seiner Untereinheiten gelang uns gemeinsam mit der Gruppe um Stefan Raunser, Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, Dortmund, die Klärung der molekularen Architektur des Komplexes mittels Elektronenmikroskopie (**Abb. 2A**, [3]). Der HOPS-Komplex enthält demnach an beiden Enden je eine Bindestelle für Ypt7-GTP (**Abb. 2B**) und kann Ypt7-dekorierte Membranen vor der Fusion miteinander verbrücken. Die Bindestellen für SNAREs und Ypt7 waren elektronenmikroskopisch direkt nachweisbar. Die sehr aufwendige Klärung der Struktur lieferte eindeutige mechanistische Erkenntnisse, auf die wir in weiteren Projekten zurückgreifen können.

Im Zuge der näheren Charakterisierung der endosomalen Regulatoren konnten wir zusätzlich den CORVET-Komplex identifizieren [4], ebenso wie HOPS ein konservierter Komplex mit Homologen in höheren Zellen. Auch CORVET bindet an eine Rab-GTPase, das Rab5-ähnliche Vps21. Diese Interaktion erfolgt ebenfalls über zwei CORVET-spezifische Untereinheiten (die verbleibenden vier Untereinheiten sind identisch mit denen des HOPS-Komplexes) (**Abb. 2C**). Auch CORVET

beschleunigt die Verbrückung von Membranen und damit die Fusion von Endosomen [5]. Die große Ähnlichkeit zu HOPS deutet auch auf einen ähnlichen Fusionsmechanismus hin.

Regulation der Rab-GTPasen an Endosomen

Ein weiterer Fokus der Arbeitsgruppe ist die Regulation der Rab-GTPasen an Endosomen. Während ein Aktivator (*guanine nucleotide exchange factor*, GEF) für Vps21 lange bekannt war, lieferte die Literatur bezüglich der Aktivierung von Ypt7 widersprüchliche Daten. Verschiedene Arbeiten deuteten auf eine Beteiligung des Mon1-Ccz1-Proteinkomplexes, der sich in der Tat als der gesuchte GEF für Ypt7 erwies [6]. Dies wurde anschließend auch für höhere Zellen nachgewiesen [7]. Das ist umso wichtiger, als die Aktivierung der homologen Rab7-GTPase für die Regulation verschiedener Signalkaskaden bei der Embryonalentwicklung von Mäusen bedeutsam ist. Im Zuge dieser Arbeiten haben wir darüber hinaus die beteiligten Rab-Inaktivatoren (*GTPase activating protein*, GAP) und deren Regulatoren charakterisiert [8, 9]. Auch wenn wir die genaue Regulation und Funktion der GEFs und GAPs noch nicht im Detail verstehen, ergeben sich hier spannende Perspektiven, da erstmals die Möglichkeit besteht, die endosomale Reifung mittels Ver-



▲ Abb. 3: Funktion von Ypt7 (7) in Fusion und Signalübertragung. **A,** Modell der Aufteilung von Ypt7-Funktionen. Links sind mögliche Funktionen in der Lipidbiogenese und bei der Signalübertragung gezeigt. Iy1 als Ypt7-Effektor ist neben dem TOR-Komplex auf Vakuolen zu finden [14]. Eine weitere Funktion von Ypt7 ist die Bildung von vCLAMPs, einer Kontaktstelle zu Mitochondrien. Rechts ist die Funktion von Ypt7 bei der HOPS-vermittelten Fusion gezeigt. MVB: *multivesicular body*. **B,** Ausbildung von vCLAMPs. Elektronenmikroskopisches Bild des Kontaktes zwischen Vakuolen (V) und Mitochondrien (M). Goldkörner (schwarze Punkte) zeigen die Lokalisierung der GFP-markierten HOPS-Untereinheit Vps39 an Mitochondrien [13]. **C,** Änderung der Verteilung von Iy1 in normal wachsenden Zellen (oben) und nach Hitzeschock (unten). Die veränderte Verteilung von Iy1 auf der Oberfläche von Vakuolen ist wahrscheinlich eine Konsequenz der Umverteilung von Lipiden [14].

folgung der beteiligten Komponenten im molekularen Detail zu klären.

Man geht aufgrund verschiedener Studien davon aus, dass die nacheinander an Fusionen beteiligten Rabs sich gegenseitig beeinflussen („Rab-Kaskaden“). Rab5 (Vps21) auf den Membranen früher Endosomen wird auf den gereiften späten Endosomen durch Rab7 (Ypt7) ersetzt [10]. Eine Kaskade könnte so aussehen, dass Rab5/Vps21 zunächst das GEF Mon1-Ccz1 für Rab7 rekrutiert. Anschließend würde das aktive Rab7/Ypt7 das entsprechende Rab5-GAP auf die Membran holen und

damit Rab5/Vps21 inaktivieren (**Abb. 2D**). Es gibt erste Hinweise darauf, dass dieser elegante Ablauf – vielleicht mit ein paar Abwandlungen – auch im endosomalen System der Hefe existiert: Für die Inaktivierung von Vps21 wird Ypt7-GTP benötigt [11]. Die genaue mechanistische Basis dieses Prozesses wollen wir in Zukunft im Detail klären.

Funktionen der Rab-GTPase Ypt7 für die Lipidbiogenese der Vakuole

Manchmal ergeben sich neue Fragestellungen aus unerwarteten Beobachtungen. Es war

längere Zeit bekannt, dass Vakuolen spezifische Kontakte mit dem ER eingehen. Solche Kontaktstellen gelangten in den letzten Jahren mehr und mehr in den Fokus, da sie als mögliche Brücken für die gezielte Verteilung von Membranlipiden dienen könnten [12]. Im Zuge unserer Forschung entdeckten wir eine neue Kontaktstelle zwischen Vakuolen und Mitochondrien, die genau so eine Funktion haben könnte (**Abb. 3A, B**). Unsere Arbeiten deuten darauf hin, dass dieser Kontakt durch den jeweiligen Wachstumsstatus der Zelle reguliert wird [13]. Weiterhin entdeckten wir mit Iy1 ein neues Effektorprotein von Ypt7 auf Vakuolen, das wiederum die Membranbiogenese von Vakuolen zu kontrollieren scheint (**Abb. 3C**, [14]). Vakuolen tragen genau wie menschliche Lysosomen auf ihrer Oberfläche einen zentralen Wachstumsregulator, den TOR1-Komplex. Da Ypt7 und seine Interaktionspartner in räumlicher Nähe zu diesem Regulator auf der Vakuolenoberfläche gefunden werden [14], könnte hier eine direkte Regulation von Metabolismus, Lipidbiogenese und Transport vorliegen (**Abb. 3A**), die wir in Zukunft ebenfalls untersuchen werden.

Ausblick

Beginnend mit der Analyse von relativ einfachen Hefevakuolen haben wir über die letzten Jahre eine Reihe von Faktoren identifiziert und charakterisiert, die an der Biogenese von Endosomen und Vakuolen beteiligt sind. Durch die Kombination von *in vivo*- und *in vitro*-Ansätzen bis hin zur strukturellen Analytik beteiligter Komplexe streben wir über die nächsten Jahre Einblicke in die genaue Regulation dieser wichtigen Prozesse an.

Danksagung

Wir danken Siegfried Engelbrecht-Vandré für die Rückmeldung und allen Mitgliedern der AG Ungermann für ihr Mitwirken sowie unseren Kooperationspartnern Fulvio Reggiori, Udo Heinemann, Jeffrey Gerst, Claudio De Virgilio und Stefan Raunser. Die Forschung in der AG Ungermann wird durch die DFG (u. a. SFB 944), die Fritz-Thyssen-Stiftung, das Land Niedersachsen und die Hans-Mühlenhoff-Stiftung gefördert. ■

Literatur

[1] Kümmler D, Ungermann C (2014) Principles of membrane tethering and fusion in endosome and lysosome biogenesis. *Curr Opin Cell Biol* 29C:61–66

- [2] Balderhaar HJK, Ungermann C (2013) CORVET and HOPS tethering complexes – coordinators of endosome and lysosome fusion. *J Cell Sci* 126:1307–1316
- [3] Bröcker C, Kuhlee A, Gatsogiannis C et al. (2012) Molecular architecture of the multisubunit homotypic fusion and vacuole protein sorting (HOPS) tethering complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:1991–1996
- [4] Peplowska K, Markgraf DF, Ostrowicz CW et al. (2007) The CORVET tethering complex interacts with the yeast Rab5 homolog Vps21 and is involved in endolysosomal biogenesis. *Dev Cell* 12:739–750
- [5] Balderhaar HJK, Lachmann J, Yavavli E et al. (2013) The CORVET complex promotes tethering and fusion of Rab5/Vps21-positive membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:3823–3828
- [6] Nordmann M, Cabrera M, Perz A et al. (2010) The Mon1-Ccz1 complex is the GEF of the late endosomal Rab7 homolog Ypt7. *Curr Biol* 20:1654–1659
- [7] Gerondopoulos A, Langemeyer L, Liang J-R et al. (2012) BLOC-3 mutated in Hermansky-Pudlak syndrome is a Rab32/38 guanine nucleotide exchange factor. *Curr Biol* 22:2135–2139
- [8] John Peter AT (2013) Membrane dynamics of peripheral membrane proteins associated with the endosomal/vacuolar system. Dissertation, Universität Osnabrück.
- [9] Lachmann J, Barr FA, Ungermann C (2012) The Msb3/Gyp3 GAP controls the activity of the Rab GTPases Vps21 and Ypt7 at endosomes and vacuoles. *Mol Biol Cell* 23:2516–2526
- [10] Rink J, Ghigo E, Kalaidzidis Y et al. (2005) Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell* 122:735–749
- [11] Rana M, Lachmann J, Ungermann C (2015) Identification of a Rab GAP cascade that controls recycling of the Rab5 GTPase Vps21 from the vacuole. *Mol Biol Cell* 26:2535–2549
- [12] Elbaz Y, Schuldiner M (2011) Staying in touch: the molecular era of organelle contact sites. *Trends Biochem Sci* 36:616–623
- [13] Hönscher C, Mari M, Auffarth K et al. (2014) Cellular metabolism regulates contact sites between vacuoles and mitochondria. *Dev Cell* 30:86–94
- [14] Numrich J, Péli-Gulli M-P, Arlt H et al. (2015) The I-BAR protein Ivy1 is an effector of the Rab7 GTPase Ypt7 involved in vacuole membrane homeostasis. *J Cell Sci* 128:2278–2292

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Christian Ungermann
 Fachbereich Biologie/Chemie
 Universität Osnabrück
 Barbarastraße 13
 D-49076 Osnabrück
 Tel.: 0541-969-2752
 Fax: 0541-969-2884
 cu@uos.de
 www.biochemie.uni-osnabrueck.de

AUTOREN



Christian Ungermann (li.) und Lars Langemeyer

Lars Langemeyer

Jahrgang 1980. Biologiestudium an der Universität Osnabrück. 2010 Promotion. 2010–2014 Postdoc an den Universitäten Liverpool und Oxford, UK. Seit 2014 wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Universität Osnabrück.

Christian Ungermann

Jahrgang 1967. Biochemie- und Biophysikstudium an der Universität Tübingen und Oregon State University, Corvallis, USA. 1997 Promotion. 1997–1999 Postdoc an der Dartmouth Medical School, Hanover, NH, USA. 1999–2005 Nachwuchsgruppe am Biochemie-Zentrum Heidelberg (BZH). 2004 Habilitation im Fach Biochemie an der Universität Heidelberg. Seit 2005 Professor für Biochemie, Universität Osnabrück.