

Methoden der Proteinforschung

Ko-translationale Assemblierung von Proteinkomplexen

KAI FENZL, GÜNTER KRAMER, BERND BUKAU

ZENTRUM FÜR MOLEKULARE BIOLOGIE DER UNIVERSITÄT HEIDELBERG (ZMBH) UND DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM (DKFZ), DKFZ-ZMBH ALLIANZ, HEIDELBERG

The majority of cellular proteins exerts their biological activity as oligomeric complexes. The general view was that complexes form by random collision of folded subunits in the cytosol. Recent studies question this view by demonstrating that a surprisingly high number of complexes are formed during translation. Co-translational assembly occurs by interaction either of fully synthesized subunits with nascent partner subunits, or of two nascent polypeptides exposed by proximal ribosomes.

DOI: 10.1007/s12268-021-1682-5

© Die Autoren 2021

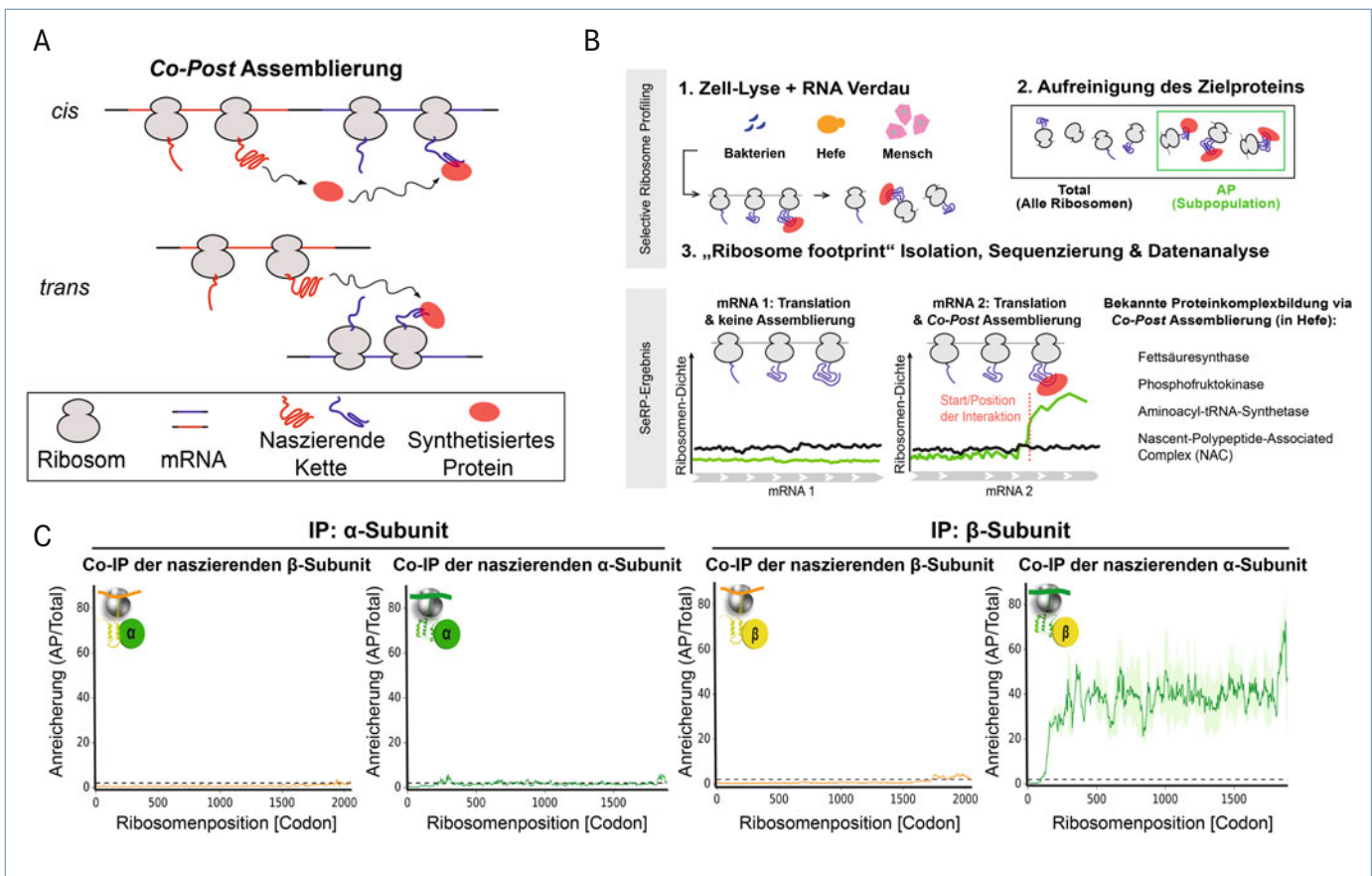
■ Schon während der Translation beginnt die Faltung neu synthetisierter Proteine in native dreidimensionale Tertiärstrukturen, wobei einzelne Proteindomänen, oft durch Chaperone assistiert, sukzessive falten. Die Mehrheit der gefalteten Proteine muss jedoch noch zu Quartärstrukturen assemblieren, die aus homomeren oder heteromeren Untereinheiten bestehen. Es wurde generell angenommen, dass sich die beteiligten Untereinheiten über freie Diffusion und zufällige Kollisionen innerhalb der Zelle finden. Während einerseits die Diffusionsgeschwindigkeit von Proteinen in der Zelle hoch genug erscheint, um Proteinkomplexe innerhalb von Sekunden ausbilden zu lassen, exponieren freie Untereinheiten oft hydrophobe Interaktionsflächen, was die Anfälligkeit für Aggregation, proteolytischen Abbau und unspezifische Interaktionen mit anderen Zellproteinen erhöht. Ein Verlust an Effizienz der Protein-assemblierung ist somit höchst problematisch, gerade für wachsende menschliche Zellen, die hunderttausende Proteine pro Minute herstellen. Aktuelle Ergebnisse zeigen, dass die Assemblierung von stabilen Proteinkomplexen in der Regel ko-translationale, also während der Synthese der Untereinheiten durch das Ribosom, stattfindet und damit die freie Diffusion aggregationsanfälliger Untereinheiten minimiert. Die ersten

Hinweise auf ko-translationale Assemblierung von Proteinkomplexen stammen bereits aus den 1960er-Jahren, die belegen, dass das Tetramer der bakteriellen β -Galactosidase seine enzymatische Aktivität erlangt, bevor die Synthese abgeschlossen ist [1]. In den letzten fünf Jahren wurde dieser Prozess mehrfach für Proteine in Bakterien, Bäckerhefe und humane Zellen nachgewiesen [2–7]. Dabei zeigte sich, dass zwei mechanistische Varianten der ko-translationalen Assemblierung von Proteinkomplexen existieren.

Mechanismus 1: Co-Post-Assemblierung

Bei der Co-Post-Assemblierung genannten Variante assoziiert ein vollständig synthetisiertes, gefaltetes Protein mit einer naszierenden Partneruntereinheit und bildet am translatierenden Ribosom einen dimeren Komplex aus (Abb. 1A). Der Durchbruch zum experimentellen Nachweis dieses Prozesses war die Entwicklung einer Hochdurchsatzmethode, dem *selective ribosome profiling* (SeRP) [8–10]. SeRP ermöglicht es, Interaktionen eines ausgewählten Proteins, z. B. der Untereinheit eines Proteinkomplexes oder eines Chaperons, mit translatierenden Ribosomen genomweit zu detektieren [8–10]. Dabei werden zunächst alle Ribosomen einer Zelle isoliert, die sich als Polysomen auf

translatierten mRNAs aufreihen, gefolgt von einem Nukleaseverdau der mRNA. Dabei schützt jedes Ribosom ein kurzes mRNA Segment vor dem Verdau (*ribosome footprint*). Anschließend wird die zu untersuchende Untereinheit eines Proteinkomplexes zusammen mit der assoziierten naszierenden Partneruntereinheit und dem translatierenden Ribosom affinitätsgereinigt. Durch das Sequenzieren der *ribosome footprints* kann ausgelesen werden, mit welcher naszierenden Polypeptidkette die affinitätsgereinigte Proteinuntereinheit ko-translationale interagiert. Dadurch kann bestimmt werden, wann die Assemblierung während der Translation beginnt, und somit auch die Länge der naszierenden Polypeptidkette, bei der die Assemblierung anfängt (Abb. 1B). Die ko-translationale Komplexbildung konnte für mehrere heteromere Proteinkomplexe nachgewiesen werden, z. B. für die Fettsäuresynthase der Bäckerhefe [4] und für Transkriptionsfaktoren in menschlichen Zellen [7]. Von zwölf untersuchten Proteinkomplexen der Hefe folgten neun einem ko-translationalen Assemblierungsprozess, und für die drei Fälle, in denen dies nicht beobachtet wurde, war bekannt, dass die Assemblierung durch spezielle Faktoren posttranslational reguliert wird [4]. Die ko-translationale Assemblierung zeigte meist einen gerichteten Verlauf, d. h. ein vollständig synthetisiertes „Protein A“ interagiert mit der naszierenden Kette des „Partnerproteins B“, aber nicht umgekehrt (Abb. 1C). Diese gerichtete Assemblierung korreliert mit dem Grad der Aggregations- und Degradationsanfälligkeit der naszierenden Polypeptidketten. In allen untersuchten Fällen unterdrückt die Bindung der Partneruntereinheiten die Aggregation und Degradation der ko-translationale assemblierenden Proteinuntereinheiten. Die Partneruntereinheiten, die als vollständig gefaltete Proteine binden, neigen dagegen nicht zur Aggregation oder Degradation [4]. Daher liegt es nahe anzunehmen, dass dieser Assemblierungsmodus instabile Untereinheiten während der Synthese stabilisiert und damit die Evolution komplex gefalteter Pro-



▲ Abb. 1: Detektion von *Co-Post*-Assemblierung. **A**, *Co-Post*-Assemblierung kann zwischen zwei Ribosomen auf derselben mRNA (*cis*-Assemblierung, häufig in Prokaryoten) oder auf zwei unterschiedlichen mRNAs (*trans*-Assemblierung, häufig in Eukaryoten) auftreten. **B**, SeRP-Methode: Ribosomen werden nach Zelllyse und Ribonukleaseverdau (1) direkt oder nach einer Affinitätsaufreinigung eines Zielproteins (z. B. einer Untereinheit) isoliert (2). Die *ribosome footprints* beider Fraktionen werden sequenziert und der translatierten Sequenz eines Gens zugeordnet (3). Ein Anstieg spezifischer *ribosome footprints* in der aufgereinigten Fraktion einer codierenden Sequenz weist auf eine *Co-Post*-Assemblierung hin. **C**, SeRP-Analyse des Fettsäuresynthasekomplexes aus Hefe [4]: Die Assemblierung beruht auf der gerichteten Interaktion einer vollständig synthetisierten β -Untereinheit mit einer naszierenden α -Untereinheit. Abbildung in Anlehnung an [4].

teine ermöglicht. Im Einklang mit dieser protektiven Funktion ist der Befund, dass in allen untersuchten Fällen die Bindung der Partneruntereinheit sofort nach dem Ausreten der Interaktionsdomäne aus dem Exit-Tunnel des Ribosoms während der Translation stattfindet. Ko-translational agierende Enzyme und Chaperone müssen daher räumlich und funktional darauf abgestimmt und vermutlich zum Zeitpunkt der Partnerbindung bereits von der naszierenden Peptidkette dissoziiert sein. Dies konnte für das ribosomenassoziierte Hsp70 Chaperon der Hefe, Ssb, nachgewiesen werden [4,11].

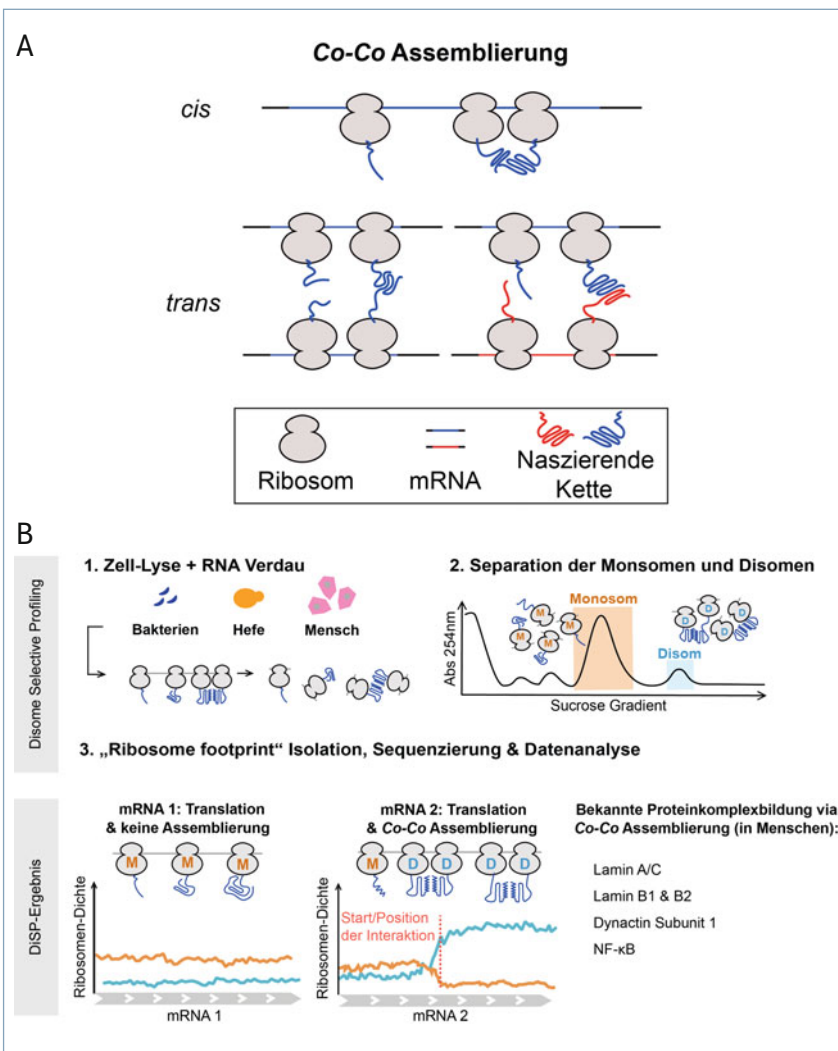
Für die ko-translationale Assemblierung von Heterodimeren in Bakterien konnte gezeigt werden, dass die benachbarte Synthese der Interaktionspartner von einer polycistronischen mRNA die Effizienz der Assemblierung erhöht. Die Anordnung der Gene im Operon zeigt, dass das Promoter-proximale (erste) Gen für die Untereinheit codiert, die vollständig synthetisiert und gefaltet die

zweite naszierende Partneruntereinheit bindet, die vom Promoter-distalen (zweiten) Gen codiert wird [3]. Es besteht also eine Direktionalität nicht nur bei der Assemblierung, sondern auch beim genetischen Aufbau der codierenden Operons. Wie *Co-Post*-Assemblierung in Eukaryoten räumlich organisiert ist, in denen Operons selten und die mRNAs stattdessen getrennte Einheiten sind, ist Gegenstand aktueller Forschung. Erste Studien zu einzelnen Komplexen zeigen, dass es in eukaryotischen Zellen zur Ko-Lokalisation der codierenden mRNAs kommen kann, wodurch die freie Diffusion beteiligter Untereinheiten minimiert wird [6,7].

Mechanismus 2: *Co-Co*-Assemblierung

Die Erkenntnis, dass Komplexbildung schon während der Translation direkt am Ribosom stattfinden kann, führt zu der Frage, ob auch zwei naszierende Polypeptidketten miteinander interagieren können (*Co-Co*-Assem-

blierung, **Abb. 2A**). Zwar existierten erste Hinweise für diese Art der Komplexbildung [5–7,12, 13], aber bis vor kurzem fehlten direkte Beweise für die Existenz und Häufigkeit eines solchen Mechanismus. Um diese Fragen zu beantworten wurde *disome selective profiling* (DiSP) entwickelt, eine proteomweite Detektionsmethode speziell für *Co-Co*-Assemblierung [5]. Dabei werden Ribosomenpaare (Disomen) isoliert, die durch die Interaktion der naszierenden Polypeptidketten auch nach einem Nukleaseverdau zusammengehalten werden. Danach werden die *ribosome footprints* der Disomen sequenziert und jedem Gen sequenzspezifisch zugeordnet (**Abb. 2B**). Damit kann bestimmt werden, welche mRNAs von Ribosomen translatiert werden, die während der Translation durch *Co-Co*-Assemblierung der naszierenden Protein Disomen bilden. Darüber hinaus kann bestimmt werden wann während der Translation die Dimerbildung erfolgt. Die Daten



▲ **Abb. 2:** Detektion von *Co-Co*-Assemblierung. **A**, *Co-Co*-Assemblierung kann zwischen zwei Ribosomen auf derselben mRNA (*cis*-Assemblierung) oder auf zwei unterschiedlichen mRNAs (*trans*-Assemblierung) auftreten und dabei zu Komplexbildung von Homo- wie auch Heteromeren führen. **B**, DiSP-Methode: Einzelne Ribosomen (Monosomen/M) und gekoppelte Ribosomenpaare (Disomen/D) werden nach der Zellyse und einem RNA-Verdau (1) in einem Sucrose-Gradienten voneinander separiert (2). Die *ribosome footprints* werden von beiden Fraktionen aufgereinigt und sequenziert (3). Ein Wechsel translatierender Ribosomen (und damit der *ribosome footprints*) von der Monosomen-Fraktion (orange) zur Disomen-Fraktion (blau) weist auf *Co-Co*-Assemblierung hin. Abbildung in Anlehnung an [5].

aus menschlichen Zellen zeigen, dass Hunderte Homodimere durch Interaktion naszierender Polypeptidketten gebildet werden, was über 30 Prozent der bekannten humanen Homooligomere ausmacht [5]. Die häufigste Form der Dimerisierung über *Co-Co*-Assemblierung erfolgt über die Bildung von *coiled coils*, bei der sich zwei α -Helices zu einem Dimer verbinden. Erste Befunde weisen darauf hin, dass die *Co-Co*-Assemblierung von Homodimeren wahrscheinlich zwischen benachbarten Ribosomen auf einer mRNA stattfindet (*cis*-Assemblierung), was zu einer diffusionsunabhängigen

Assemblierung führt. Ähnlich wie der *Co-Post*-Assemblierungsmodus ist auch *Co-Co*-Assemblierung in der Lage, Aggregation und Degradation nicht assemblierter Untereinheiten zu reduzieren und damit die Effizienz der Proteinkomplexbildung zu erhöhen. Darüber ermöglicht der *Co-Co*-Mechanismus in *cis* auch die spezifische Assemblierung von isoformspezifischen Homodimeren, da gehäuft Proteine in mehreren Isoformen in der Zelle existieren, die durch alternatives Splicing oder Genduplikation entstehen, sich aber trotz identischer Interaktionsdomänen in Zellen nicht mischen. *Co-Co*-Assembli-

Hier steht
eine Anzeige.

 Springer

rung verhindert damit die Bildung unerwünschter Heterodimere.

Ausblick

Neue Forschungsergebnisse belegen, dass die ko-translationale Assemblierung von Proteinkomplexen von Bakterien bis zu menschlichen Zellen ein weit verbreiteter Mechanismus ist. Die Ergebnisse erklären, wie Zellen die Effizienz der Komplexbildung im dicht gepackten Cytosol aufrechterhalten und Aggregation, Abbau sowie ungewollte Interaktionen zwischen Proteinen verhindern können. Faltung und Assemblierung finden daher koordiniert an der Oberfläche des translatierenden Ribosoms statt. Diese Ergebnisse eröffnen viele neue und faszinierende Fragestellungen, wie z. B.: Findet die Assemblierung größerer Proteinkomplexe, die aus mehr als zwei Untereinheiten bestehen, auch ko-translationale statt? Wie wird eine ausreichende räumliche Nähe zwischen Ribosomen auf einer mRNA bewerkstelligt, und inwieweit wird für die Koordinierung der beteiligten Ribosomen die Translationsgeschwindigkeit lokal verändert? Existiert eine zelluläre Maschinerie, die ko-translationale Prozesse organisiert und reguliert? Bilden sich Heterodimere auch über *Co-Co*-Assemblierung und wie wird die dafür notwendige Kollokalisierung der beteiligten mRNAs im Cytosol eukaryotischer Zellen gewährleistet? Die Verfügbarkeit der notwendigen Technologien erlauben es jetzt, diese grundlegenden Fragen experimentell anzugehen. ■

Literatur

- [1] Zipser D (1963) Studies on the ribosome-bound β -galactosidase of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 7: 739–751
- [2] Duncan CDS, Mata J (2011) Widespread cotranslational formation of protein complexes. *PLoS Genet* 7: e1002398
- [3] Shieh YW, Minguéz P, Bork P et al. (2015) Operon structure and cotranslational subunit association direct protein assembly in bacteria. *Science* 350: 678–680
- [4] Shiber A, Döring K, Friedrich U et al. (2018) Cotranslational assembly of protein complexes in eukaryotes revealed by ribosome profiling. *Nature* 561: 268–272

- [5] Bertolini M, Fenzl K, Kats I et al. (2021) Interactions between nascent proteins translated by adjacent ribosomes drive homomer assembly. *Science* 371: 57–64
- [6] Panasenko OO, Somasekharan SP, Villanyi Z et al. (2019) Co-translational assembly of proteasome subunits in NOT1-containing assemblyosomes. *Nat Struct Mol Biol* 26: 110–120
- [7] Kamenova I, Mukherjee P, Conic S et al. (2019) Co-translational assembly of mammalian nuclear multisubunit complexes. *Nat Commun* 10: 25–28
- [8] Oh E, Becker AH, Sandikci A et al. (2011) Selective ribosome profiling reveals the cotranslational chaperone action of trigger factor in vivo. *PLoS Biol* 9: 1295–1308
- [9] Becker AH, Oh E, Weissman JS et al. (2013) Selective ribosome profiling as a tool for studying the interaction of chaperones and targeting factors with nascent polypeptide chains and ribosomes. *Nat Protoc* 8: 2212–2239
- [10] Galmozzi CV, Merker D, Friedrich UA et al. (2019) Selective ribosome profiling to study interactions of translating ribosomes in yeast. *Nat Protoc* 14: 2279–2317
- [11] Döring K, Ahmed N, Riemer T et al. (2017) Profiling Ssb-nascent chain interactions reveals principles of Hsp70-assisted folding. *Cell* 170: 298–311
- [12] Nicholls CD, McClure KG, Shields MA, Lee PWK (2002) Biogenesis of p53 involves cotranslational dimerization of monomers and posttranslational dimerization of dimers. *J Biol Chem* 277: 12937–12945
- [13] Lin L, DeMartino GN, Greene WC (2000) Cotranslational dimerization of the Rel homology domain of NF- κ B1 generates p50-p105 heterodimers and is required for effective p50 production. *EMBO J* 19: 4712–4722

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.
Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Bernd Bukau
 Zentrum für Molekulare Biologie der Universität Heidelberg (ZMBH)
 Im Neuenheimer Feld 282
 D-69120 Heidelberg
bukau@zmbh.uni-heidelberg.de

AUTOREN



Kai Fenzl

Jahrgang 1991. Bachelor of Science 2014 an der TU-Darmstadt und Master of Science 2016 an der Universität Heidelberg. 2017–2021 Promotion im Labor von Prof. Dr. B. Bukau am Zentrum für Molekulare Biologie der Universität Heidelberg (ZMBH). Aktuell Postdoc am European Molecular Biology Laboratory (EMBL) im Labor von Prof. Dr. L. Steinmetz.



Günter Kramer

Jahrgang 1968. Biologiestudium in Konstanz. 1999 Promotion. 2000–2003 Postdoc am Institut für Biochemie der Universität Freiburg und dem Zentrum für Molekulare Biologie Heidelberg (ZMBH), Universität Heidelberg. 2003–2005 Postdoc am Whitehead Institute, Massachusetts Institute of Technology in Cambridge, USA. Seit 2005 Projektleiter am ZMBH, Universität Heidelberg.



Bernd Bukau

Biologiestudium und Promotion. 1989–1997 Leiter einer Nachwuchsgruppe am ZMBH. 1997–2002 C4-Professor für Biochemie am Institut für Biochemie der Medizinischen Fakultät der Universität Freiburg und von 1999–2001 Direktor des Instituts. Seit 2002 C4/W3-Professor für Molekulare Biologie am ZMBH der Universität Heidelberg und Direktor des ZMBH von 2005–2018. Seit 2011 Leiter einer Brückenabteilung am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) Heidelberg und seit 2008 Ko-Direktor der DKFZ-ZMBH-Allianz.