

## Expert's view: Proteinbiogenese

# Mechanismen des Proteinimports in das humane endoplasmatische Retikulum

RICHARD ZIMMERMANN

MEDIZINISCHE BIOCHEMIE UND MOLEKULARBIOLOGIE DES SAARLANDES, HOMBURG

**In human cells, one third of all polypeptides enter the secretory pathway at the ER. This process involves N-terminal signal peptides or internal transmembrane helices in the precursors and one hundred cytosolic and ER proteins, which facilitate their ER import or processing. In the past fifty years four pathways for targeting of precursors to the Sec61 channel plus various allosteric channel effectors and supporting or stand alone membrane protein insertases were characterized by the field.**

DOI: 10.1007/s12268-022-1797-3

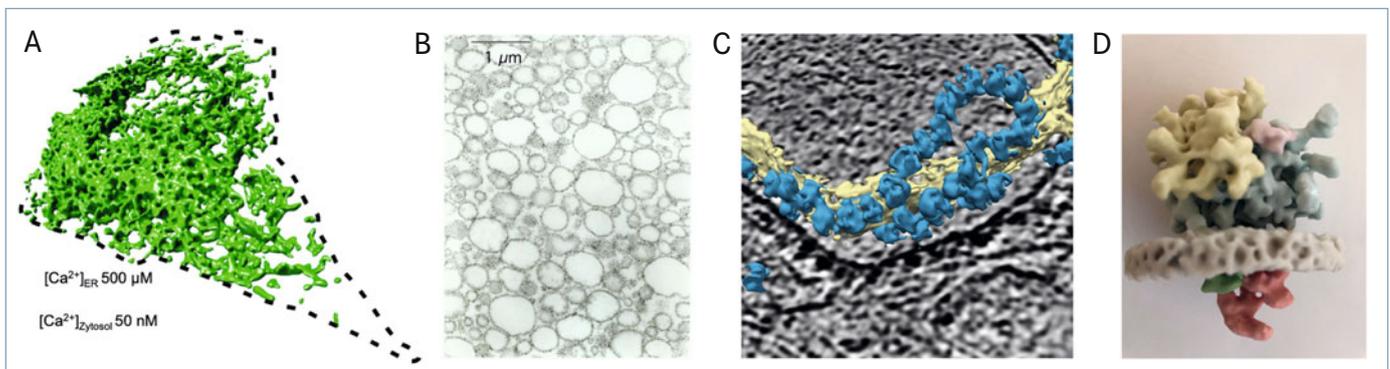
© Der Autor 2022

■ Zellen sind grundsätzlich von mindestens einer Membran, der Plasmamembran umgeben und weisen neben dem Cytosol, das einen Hauptort der Proteinsynthese darstellt, weitere Membranen und wässrige Kompartimente auf. So enthalten Gram-negative Bakterien neben der inneren oder Plasmamembran ein Periplasma sowie eine äußere Membran. Die kernhaltigen humanen Zellen zeichnen sich durch eine weitaus größere Zahl von wässrigen Kompartimenten aus, die von mindestens einer Membran umgeben sind und – in Analogie zur Unterteilung des

menschlichen Körpers in Organe – Zellorganellen genannt werden. Für beide Zelltypen gilt in ähnlicher Weise, dass alle Proteine, die an cytosolischen Ribosomen synthetisiert werden und ihren Wirkort nicht im Cytosol haben, entweder in eine Membran integriert oder durch zumindest eine Membran hindurch transportiert werden müssen, um an ihren jeweiligen Wirkort zu gelangen. Daher stellen sich im Rahmen der Proteinbiogenese für jedes nicht cytosolische Protein die Fragen nach den Mechanismen der Zielsteuerung (Targeting) und der Membranintegra-

tion bzw. des Membrantransports. Aufgrund der höheren Komplexität der humanen gegenüber der Gram-negativen Zelle sind die Fragen nach der Zielsteuerung in der humanen Zelle zwangsläufig ungleich komplexer als in der bakteriellen Zelle.

Das endoplasmatische Retikulum (ER) der kernhaltigen humanen Zellen nimmt in diesem Zusammenhang eine Schlüsselstellung unter den Zellorganellen ein (**Abb. 1A**). Hier beginnt, wie von George Palade in den 1950er-Jahren entdeckt, nicht nur die Biogenese der sekretorischen Proteine, sondern – wie wir heute wissen – auch die Biogenese für etwa ein Drittel des jeweiligen zellulären Proteoms, d. h. circa 10.000 verschiedene Proteine. So werden auch die Proteine der Membranen und des wässrigen Lumens von ER, ER-Golgi-Zwischenkompartiment (ERGIC), Golgi, Endosomen, Lysosomen und sekretorischen Vesikeln sowie manche Proteine der Kernhülle, Peroxisomen, Lipidtropfen (Lipid Droplets) und sogar einige mitochondriale Proteine im Verlauf ihrer Biogenese an die ER-Membran dirigiert und anschließend in diese Membran integriert oder durch diese Membran transportiert. Mit Ausnahme der ER-residenten Proteine gelan-



▲ **Abb. 1:** Struktur des endoplasmatischen Retikulums (ER). **A**, ER nach Import von grün fluoreszierendem Protein in das ER von lebenden adherenten Meerkatzenzellen (fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Peter Lipp, Zellbiologie, Universität des Saarlandes, Homburg). Die Zahlen charakterisieren den Konzentrationsgradienten für freies Calcium zwischen Cytosol und ER-Lumen in einer ruhenden humanen Zelle. **B**, raues ER in Form von vom Autor isolierten und fixierten rauen Mikrosomen aus Hundepankreas (elektronenmikroskopische Aufnahme von Volker Herzog, Zellbiologie, LMU München). **C**, Teilbereich des rauen ER von HeLa-Zellen (Kryoelektronentomogramm von Stefan Pfeffer, MPI für Biochemie, Martinsried). Das ER ist gelb coloriert, 80S-Ribosomen sind blau eingefärbt. **D**, 3D-Ausdruck des Komplexes aus einem 80S-Ribosom mit kleiner (gelb) bzw. großer (blau) Untereinheit, der ER-Membran (grau) und dem Translokator aus Sec61 (verdeckt durch die Membran), TRAP (grün) und Oligosaccharyltransferase (rot) nach Kryoelektronentomografie von rauen Mikrosomen (Stefan Pfeffer, MPI für Biochemie, Martinsried).

gen die neu synthetisierten Proteine durch vesikulären Transport an ihren jeweiligen Wirkort in endo- oder exozytotisch aktiven Organellen oder auf der Zelloberfläche (d. h. in Plasmamembran oder Extrazellularraum) bzw. werden als Bestandteile neu gebildeter Peroxisomen oder Lipidtropfen abgeschnürt oder an die Mitochondrien mittels eines ER-SURF getauften Reaktionswegs weitertransportiert.

Eine der Schlüsselbeobachtungen von George Palade und Keith Porter sowie in der Folge ihrer Kollegen David Sabatini und Günter Blobel war, dass an der ER-Membran Ribosomen gebunden sind, die offensichtlich mit der Synthese von sekretorischen Proteinen beschäftigt sind (**Abb. 1B, C** und **Abb. 2**, [1, 2]). Dies führte nach der Etablierung eines ersten zellfreien Systems zum Studium des ER-Proteinimports im Jahr 1975 durch Günter Blobel und Bernhard Dobberstein (bestehend aus Weizenkeimlysat und Pankreas-mikrosomen) schließlich zur Signalthypothese, die den ER-Proteinimport in ersten Grundzügen beschrieb und Günter Blobel im

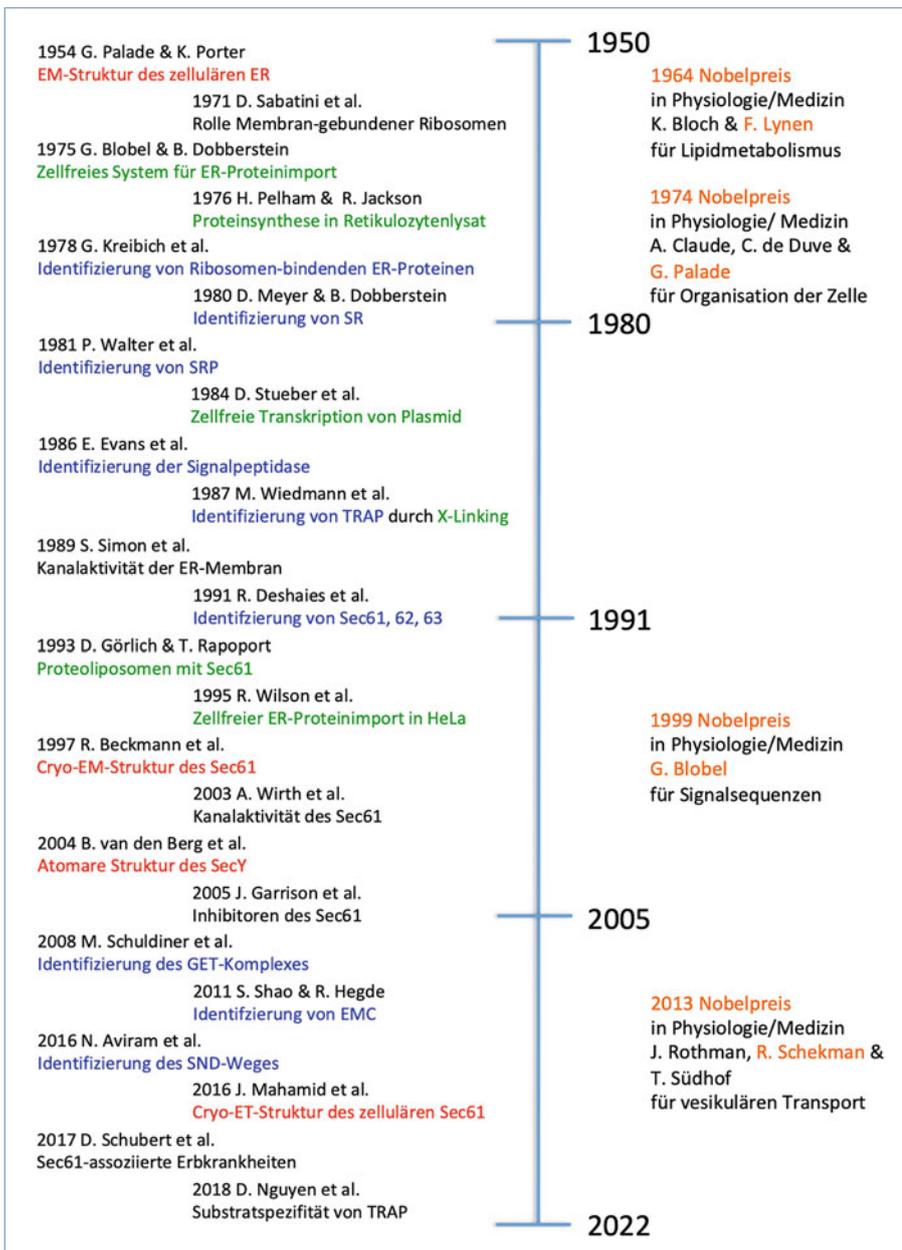
Jahr 1999 den Nobelpreis für Medizin bescherte [3, 4]. Die Signalthypothese beinhaltet, dass N-terminale Signalsequenzen oder Signalpeptide in den naszierenden Vorstufen sekretorischer Proteine enthalten sind, die die Zielsteuerung dieser naszierenden Polypeptidketten zusammen mit den jeweiligen Ribosomen an die ER-Membran und somit auch den an die Translation gekoppelten ER-Import der Polypeptidketten gewährleisten. Entsprechend wurde der Mechanismus als cotranslatinaler Transport definiert, mit dem die proteolytische Abtrennung der jeweiligen Signalsequenz durch eine Signalpeptidase einhergeht. Nachdem Gottfried Schatz und Walter Neupert auf der Basis von Experimenten an Schimmelpilzzellen sowie zellfreier Systeme (bestehend aus Retikulozytenlysate und Mitochondrien aus Pilzzellen) unabhängig von einander beschrieben, dass die Vorstufen mitochondrialer Proteine zunächst im Cytosol akkumulieren, bevor sie in Mitochondrien importiert werden, war der posttranslationale Proteintransport definiert und die erste große Kon-

troverse im Bereich des intrazellulären Proteintransports formuliert. Daran war ich als Diplomand im Neupert-Labor beteiligt. In den folgenden Jahren drehte sich die Frage nach der Biogenese aller möglicher Proteine vor allem darum, ob der Mechanismus des Transports in das jeweilige Zellorganell co- oder posttranslational erfolgt. Wobei es sich durchaus nicht um eine semantische, sondern um eine mechanistische Frage handelt, nämlich nach der treibenden Kraft des Transports.

In den 1980er-Jahren wurden durch biochemische Untersuchungen in den Labors von Günter Blobel und Bernhard Dobberstein erste Komponenten des ER-Proteinimports in Mammalia entdeckt. Dabei handelte es sich um das cytosolische Signalerkennungspartikel oder SRP und seinen Rezeptor in der ER-Membran (SR), die eine cotranslationale und GTP-abhängige Zielsteuerung von naszierenden Polypeptidketten mit N-terminalen Signalpeptiden und den translatierenden Ribosomen gewährleisten (**Abb. 3A, B** links, [5]). Etwa zur selben Zeit begann Randy

# Hier steht eine Anzeige.

 Springer



▲ **Abb. 2:** Zeitstrahl für das Gebiet des ER-Proteinimports und das Berufsleben des Autors. Im Verlauf des Studiums wurde der Autor von Nobelpreisträger Feodor Lynen für die Biochemie begeistert und im Diplom geprüft. Während seines Berufslebens wurde er u. a. von weiteren Nobelpreisträgern inspiriert, die essenzielle Beiträge für das Verständnis des ER sowie den intrazellulären Proteintransport geleistet haben. Darüber hinaus haben viele weitere Kolleg:innen zum aktuellen Kenntnisstand beigetragen und sind mit subjektiv ausgewählten Veröffentlichungen mit besonderen methodischen Aspekten (grün) oder Entdeckungen (blau bzw. rot) vertreten.

Schekman mit seinen Mitarbeitern damit, Hefemutanten zu isolieren, die in der Proteinsekretion gestört sind und entsprechend SEC-Mutanten genannt wurden [6]. Manche der entsprechenden Komplementationgruppen codierten für Komponenten des ER-Proteinimports in Hefe, z. B. für Orthologe von Untereinheiten des SRP und SR. Andere Komplementationgruppen codierten für Komponenten des vesikulären Transports,

was Randy Schekman gemeinsam mit James Rothman und Thomas Südhof im Jahr 2013 den Nobelpreis für Medizin einbrachte. Die Arbeiten in der Hefe führten in den 1980er-Jahren auch zu der Erkenntnis, dass es auch posttranslationalen ER-Proteinimport gibt, was mehr oder weniger zeitgleich in meinem eigenen Labor zunächst für kleine sekretorische Proteine im etablierten zellfreien System aus Säugetierzellen nachgewiesen wur-

de. In beiden Systemen wurde in der Folge entdeckt, dass molekulare Chaperone der damals gerade erst durch Hugh Pelham in den Fokus gerückten HSP70-Proteinfamilie sowohl im Cytosol (Hsc70) als auch im ER Lumen (BiP) an diesem posttranslationalen und ATP-abhängigen Transport beteiligt sind.

In den 1990er-Jahren wurde wiederum in beiden experimentellen Systemen der heterotrimeren Sec61-Komplex entdeckt und vor allem von Tom Rapoport und seinen Mitarbeitern funktionell charakterisiert, wobei die gelungene Rekonstitution des cotranslationalen ER-Imports von bovinem Präprolactin in Proteoliposomen mit gereinigtem Sec61-Komplex und SR zweifellos ein methodischer Meilenstein war (**Abb. 3**, [7]). In der Hefe wurden zu dieser Zeit die ER-Membranproteine Sec62 und Sec63 als Interaktionspartner des Sec61-Komplexes entdeckt, die diesen in Zusammenarbeit mit BiP in seiner Transporttätigkeit unterstützen, was viel später u. a. auch für kleine sekretorische Proteine in humanen Zellen beobachtet wurde [8]. Darüber hinaus rückten in diesem Jahrzehnt auch Membranproteine in den Mittelpunkt des Interesses, deren einzige Membranhelix C-terminal gelegen ist, was diesen Proteinen den Namen *tail anchored*-Membranproteine bescherte [9]. Somit war nach den kleinen sekretorischen Proteinen eine weitere Proteinklasse entdeckt, deren Vertreter nicht cotranslational mittels SRP und SR ins ER gelangen konnten.

Im ersten Jahrzehnt des neuen Jahrhunderts gelang es Roland Beckmann und Christian Spahn in den Labors von Günter Blobel und Joachim Frank, die Architektur des Sec61-Komplexes aus der Hefe mittels Einzelpartikelanalyse nach Kryoelektronenmikroskopie aufzuklären, was fast bis zum heutigen Tag eine Vielzahl weiterer Strukturanalysen mit immer höherer Auflösung nach sich zog. Die hochauflösenden Analysen des Sec61-Komplexes wurden durch die Tatsache ermöglicht, dass es Tom Rapoport und seinen Mitarbeitern noch in den 2000er-Jahren gelang, einen orthologen Komplex aus Archaeen zu kristallisieren und seine Struktur mittels Röntgenstrukturanalyse aufzuklären [10]. Die strukturbioologischen Arbeiten wurden aus meiner Sicht in den letzten Jahren dadurch gekrönt, dass es Stefan Pfeffer und Friedrich Förster in Zusammenarbeit mit Wolfgang Baumeister inzwischen sogar gelang, die Architektur des Sec61-Komplexes und seiner Interaktionspartner TRAP-Kom-

plex, Oligosaccharyltransferase und Signalpeptidase in humanen Zellen mittels Kryoelektronentomografie sichtbar zu machen [11]. Es fällt schwer in Worte zu fassen, wie begeistert es für mich war, den 3D-Ausdruck des Translokons in Händen halten zu können (**Abb. 1D**). Bei den zuletzt genannten Arbeiten kamen u. a. auch humane Zellen zum Einsatz, in denen einzelne Komponenten mittels siRNA oder CRISPR-Cas9 depletiert worden waren, wodurch einzelne Elektronendichten durch differenzielle Analyse zugeordnet werden konnten. Interessanterweise kann man derartig manipulierte Zellen auch für funktionelle Analysen benutzen, da man daraus nach einem Protokoll von Neil Bulleid und Stephen High semipermeabilisierte Zellen gewinnen und im etablierten zellfreien System anstelle von Mikrosomen für das Studium des ER-Proteinimports verwenden kann. Dieser weitere methodische Meilenstein ist vor allem auch deshalb interessant, weil damit mutierte Formen des Sec61-Komplexes aber auch anderer Transportkomponenten, wie Sec62, Sec63 und TRAP (**Abb. 3C**), die mit humanen Erbkrankheiten (den Sec61-Channelopathien) assoziiert sind, funktionell charakterisiert werden können [8, 12].

In diesem ersten Jahrzehnt des neuen Jahrtausends konnte dem gereinigten und in Proteoliposomen rekonstituierten Sec61-Komplex aus Säugetierzellen eine Ionenleitfähigkeit zugeordnet werden, die viele Jahre davor schon durch Sandy Simon und Günter Blobel im Zusammenhang mit dem ER-Proteinimport beschrieben worden war. Darüber hinaus konnte der Sec61-Komplex auf zellulärer Ebene als ER-Membran-residenter Calciumausstromkanal charakterisiert werden, dessen Calciumpermeabilität physiologisch durch cytosolisches Calciumcalmodulin und ER-luminales BiP unterdrückt wird. Allerdings kann diese Ionenleitfähigkeit des Sec61-Komplexes offenbar z. B. bei den bereits genannten Sec61-Channelopathien pathophysiologische Bedeutung erlangen [11, 12]. Neben dieser medizinischen Bedeutung der Ionenleitfähigkeit des Sec61-Komplexes hat ihre Beobachtung auch noch zur Verfeinerung des Konzepts des Sec61-Gatings beigetragen, d. h. der Vorstellung, dass der Komplex in mindestens zwei Zuständen vorkommt, nämlich dem offenen und dem geschlossenen Zustand. Der offene Zustand ist für den ER-Proteinimport zuständig, der geschlossene gewährleistet die zelluläre Calciumhomöostase, d. h. den steilen

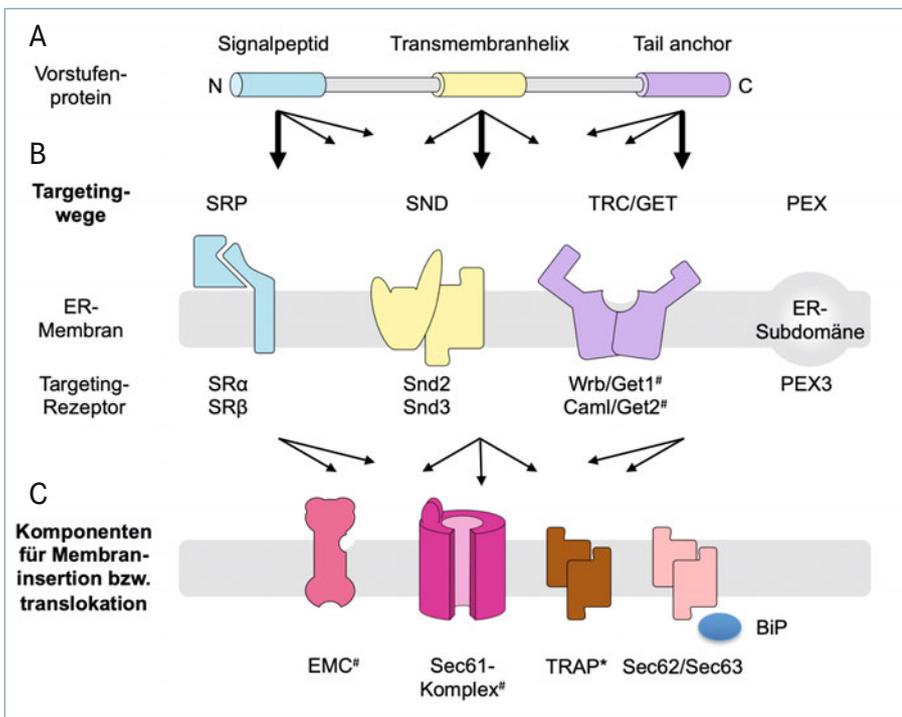
Gradienten in der Calciumkonzentration zwischen Cytosol und ER-Lumen (**Abb. 1A**). Beide Zustände wurden inzwischen auch strukturell biologisch charakterisiert, was die ursprünglichen mechanistischen Vorhersagen eines heterotrimeren Kanalproteins aus zwei ähnlich aufgebauten Hälften bestätigte, das eine zentrale wässrige Pore über die Bewegung eines Scharniers öffnet und schließt (definiert als *rigid body movement*) [11].

Darüber hinaus wurden im ersten und zweiten Jahrzehnt des neuen Jahrtausends viele neue Komponenten des ER-Proteinimports entdeckt. Hier sind als Erstes die Komponenten zu nennen, die am Targeting sowie auch der Membraninsertion der *tail anchored*-Membranproteine beteiligt sind (**Abb. 3A, B**). Sie wurden mehr oder weniger wiederum zeitgleich u. a. von Maya Schuldiner und Jonathan Weissman in der Hefe und Bernhard Dobberstein, Ramanujan Hegde, Stephen High und Toshiaki Sakisaka in Säugetierzellen entdeckt und können offenbar auch die Zielsteuerung bestimmter Vorstufenproteine zum Sec61 übernehmen [8]. Darüber hinaus wurde von Maya Schuldiner und Kooperationspartnern ein SRP-unabhängiger Zielsteuerungsweg in der Hefe entdeckt und SND-Weg genannt [13]. Dieser Weg bevorzugt offenbar Membranproteine jedweder Couleur als Substrate und existiert offenbar auch in humanen Zellen (**Abb. 3A, B**). Schließlich wurde von Bianca Schrul und Ron Kopito für humane Zellen ein weiterer Zielsteuerungsweg entdeckt, der neben dem cytosolischen Protein PEX19 das eigent-

lich als PEX3 bekannte peroxisomale Membranprotein beinhaltet und offenbar neben peroxisomalen Membranproteinen z. B. auch Hairpinproteine der Lipidtropfen, aber auch der ER-Membran, zu Subdomänen des ER dirigiert (**Abb. 3B** rechts, [14]). Derzeit ist noch unklar, ob PEX3 nicht möglicherweise in Zusammenarbeit mit PEX16 in Analogie zu Wrb/Caml auch als eigenständige Membranproteininsertase arbeiten kann. Von Jonathan Weissman und Ramanujan Hegde wurde wiederum in beiden experimentellen Systemen der ER-Membrankomplex (EMC) als Membranproteininsertase beschrieben, die entweder eigenständig oder in Zusammenarbeit mit dem Sec61-Komplex arbeiten kann (**Abb. 3B, C** links, [15]). Es liegt auf der Hand, dass es vor allem bei der Mehrzahl der zuletzt genannten Komponenten und Reaktionswege noch viele offene Fragen gibt, die es in der Zukunft zu beantworten gilt, wie z. B. die Frage nach den Komponenten und den Substraten des humanen SND-Wegs [16].

# Hier steht eine Anzeige.

 Springer



**▲ Abb. 3:** Komponenten und Mechanismen des ER-Proteinimports. **A**, Der ER-Proteinimport ist abhängig von N-terminalen Signalpeptiden bzw. von äquivalent wirkenden, aber nicht notwendigerweise N-terminalen Transmembranhelices in den jeweiligen Vorstufenproteinen. **B**, Die Signalpeptide bzw. Transmembranhelices werden von cytosolischen Komponenten erkannt, die ihrerseits an Rezeptoren in der ER-Membran binden und somit gemeinsam das Targeting gewährleisten. Dabei haben die cytosolischen Komponenten offenbar überlappende Substratspezifitäten, was ihre Entdeckung offenbar so lange verhindert hat [8, 13, 14, 16]. **C**, Alle Targetingwege können offenbar zum proteinleitenden Sec61-Kanal führen, dessen Gating durch Interaktionspartner wie TRAP oder Sec62/Sec63 unterstützt werden kann [8, 11]. Manche Komponenten sind auch unabhängig von Sec61 als eigenständige Membranproteininsertasen tätig (\*) [9, 15]. \*nicht in Hefe präsent. Die Abbildung entstand unter Mitwirkung von Sven Lang (Medizinische Biochemie und Molekularbiologie, Universität des Saarlandes, Homburg).

In der Rückschau treten einige Aspekte besonders hervor, nämlich welchen ungeheuren Einfluss technische Entwicklungen, wie z. B. die direkten Elektronendetektoren in der Kryoelektronenmikroskopie, die Hochdurchsatzscreens in der Hefegenetik und die quantitative Massenspektrometrie auf den wissenschaftlichen Erkenntnisgewinn hatten, welches Alleinstellungsmerkmal die Förderung der Grundlagenforschung in Deutschland durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft besitzt und welches Privileg es ist, als Wissenschaftler:in mit Kolleg:innen auf der ganzen Welt zusammen zu arbeiten. ■

### Literatur

- [1] Palade GE, Porter KR (1954) Studies on the endoplasmic reticulum. *J Exp Med* 100: 641–656
- [2] Palade GE (1975) Intracellular aspects of protein synthesis. *Science* 189: 347–358
- [3] Blobel G, Dobberstein B (1975) Transfer of proteins across membranes: I. presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. *J Cell Biol* 67: 835–851
- [4] Blobel G (1980) Intracellular protein topogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 1496–1500
- [5] Egea PF, Stroud RM, Walter P (2005) Targeting proteins to membranes: structure of the signal recognition particle. *Curr Opin Struct Biol* 15: 213–220
- [6] Schekman R, Novick P (2004) 23 genes, 23 years later. *Cell* 116: 13–15
- [7] Görlich D, Rapoport TA (1993) Protein translocation into proteoliposomes reconstituted from purified components of the endoplasmic reticulum. *Cell* 75: 615–630
- [8] Haßdenteufel S, Johnson N, Paton A W et al. (2018) Chaperone-mediated Sec61 channel gating during ER

import of small precursor proteins overcomes Sec61 inhibitor-reinforced energy barrier. *Cell Rep* 23: 1373–1386

[9] Borgese N, Coy-Vergara J, Colombo SF, Schwappach B (2019) The ways of tails: the GET pathway and more. *Proteins* 38: 289–305

- [10] Van den Berg B, Clemons WM Jr, Collinson I et al. (2004) X-ray structure of a protein-conducting channel. *Nature* 427: 36–44
- [11] <https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/P61619>
- [12] Sicking M, Lang S, Bochen F et al. (2021) Complexity and specificity of Sec61 channelopathies: human diseases affecting gating of the Sec61 complex. *Cells* 10: 1036
- [13] Aviram N, Ast T, Costa EA et al. (2016) The SND proteins constitute an alternative targeting route to the endoplasmic reticulum. *Nature* 540: 134–138
- [14] Schrul B, Kopito RR (2016) Peroxin-dependent targeting of a lipid-droplet-destined membrane protein to ER subdomains. *Nat Cell Biol* 18: 740–751
- [15] Hegde RS, Keenan RJ (2022) The mechanism of integral membrane protein biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 23: 107–124
- [16] Tirincsi A, O’Keefe S, Nguyen D et al. (2022) Proteomics identifies substrates and a novel component in hSND2-dependent ER protein targeting. *bioRxiv*, doi: <https://doi.org/10.1101/2022.04.27.489649>

**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. Richard Zimmermann  
Kompetenzzentrum für Molekulare Medizin  
Universität des Saarlandes  
D-66421 Homburg  
[richard.zimmermann@uks.eu](mailto:richard.zimmermann@uks.eu)

### AUTOR



#### Richard Zimmermann

Jahrgang 1951. 1971–1977 Biologiestudium, LMU München. 1980 Promotion bei Prof. Dr. W. Neupert, Universität Göttingen. 1981–1982 Postdoc bei Prof. Dr. B. Wickner, University of California, Los Angeles, USA. 1986 Habilitation in Physiologischer Chemie, anschließend C2-Professor, LMU München. 1991 C3-Professor, Universität Göttingen. 1995–2020 C4-Professor, Universität des Saarlandes, Homburg.