



# In-vitro-Rekonstitution eines zellulären Phasenübergangs unter Beteiligung der mRNA-Decapping-Maschinerie\*\*

Simon A. Fromm, Julia Kamenz, Erik R. Nöldeke, Ancilla Neu, Georg Zocher und Remco Sprangers\*

**Abstract:** In eukaryotischen Zellen können die Komponenten des 5'-3'-Abbaumechanismus der Boten-RNA (mRNA) einen schnellen Phasenübergang durchlaufen. Die resultierenden zytoplasmatischen Zentren werden Processing Bodys (P-bodys) genannt. Allerdings sind die zugrundeliegenden molekularen Details dieser Selbstaggregation weitgehend unbestimmt. Wir wenden hier eine Bottom-up-Methode an, um zu testen, ob mRNA-Abbaufaktoren Phasenübergänge *in vitro* durchlaufen können. Dieser Ansatz umfasst NMR-Spektroskopie, isotherme Titrationskalometrie, Röntgenkristallographie und Fluoreszenzmikroskopie. Wir zeigen, dass das Dcp2-Decapping-Enzym der Spalthefe *Schizosaccharomyces pombe*, sein Hauptaktivator Dcp1 sowie die Gerüstproteine Edc3 und Pdc1 ausreichen, um einen Phasenübergangsprozess einzuleiten. Zwischenmolekulare Wechselwirkungen zwischen der Edc3-LSm-Domäne und mindestens zehn helikalen, leucinreichen Motiven in Dcp2 und Pdc1 bilden den Kern des Wechselwirkungsnetzwerks. Wir zeigen, dass die Blockade dieser Wechselwirkungen das Clusteringverhalten *in vitro* und *in vivo* behindert.

**P**rocessing Bodys (P-bodys) sind zytoplasmatische Zentren in der Größenordnung von Mikrometern und sind aus Ribonukleoproteinen (RNPs) zusammengesetzt. Ursprünglich wurden sie in Säugerzellen beschrieben,<sup>[1]</sup> sind aber inzwischen auch in entfernteren Eukaryoten entdeckt worden. Die Liste der Proteine, die in diesen mRNP-Granula gefunden wurden, ist erheblich gewachsen<sup>[2]</sup> und enthält allgemeine mRNA-Abbaufaktoren wie das Dcp2-Decapping-Enzym und die Decapping-Verstärker Dcp1, Edc3, Pat1 und Lsm1–7.<sup>[1c,3]</sup> Als Funktionen der Anhäufung des Decapping-Enzyms in einem begrenzten zellulären Raum wurden vorgeschlagen: erhöhte Substratbindung,<sup>[4]</sup> Konzentrationspufferung von translatierten mRNAs,<sup>[5]</sup> Regulation der Konzentration von freien zytoplasmatischen Proteinen<sup>[6]</sup> sowie eine Möglichkeit, um auf zellulären Stress zu antworten.<sup>[7]</sup>

Die Details der Wechselwirkungen, die der Selbstorganisation von Proteinen und RNA zu P-bodys zugrunde liegen, sind größtenteils unbekannt. Genetische Studien haben den Fokus auf die Bedeutung einzelner Proteine gelegt<sup>[8]</sup> und zwei Hauptmerkmale aufgezeigt: 1) Die Details der intermolekularen Wechselwirkungen unterscheiden sich zwischen verschiedenen Spezies; z. B. können Edc3 und der Q/N-reiche C-terminale Bereich von LSm4 als Gerüst für die P-body-Aggregation in *S. cerevisiae* fungieren,<sup>[3c,9]</sup> wohingegen in *S. pombe* das Pdc1-Protein wichtig ist.<sup>[10]</sup> 2) Die P-body-Selbstorganisation ist in hohem Maße redundant, und die Deletion eines einzelnen Proteins hebt den Aggregationsprozess nicht komplett auf.<sup>[8]</sup> Diese Redundanz erschwert genetische Vorgehensweisen, die beabsichtigen, die Wechselwirkungen zu identifizieren, die den Selbstorganisationsprozess regulieren.

Es wurde gezeigt, dass aufgereinigte Nck- und N-WASP-Proteine *in vitro* einen Phasenübergang durchlaufen können.<sup>[11]</sup> Diese Experimente stützen die Idee, dass die Bildung von zellulären Granula auf multivalenten schwachen Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Komponenten basiert.<sup>[6,12]</sup> Wir erproben hier die Möglichkeit, mit Proteinen, die erwiesenermaßen in P-bodys lokalisiert sind, einen Phasenübergangsprozess einzuleiten. Dabei legen wir den Schwerpunkt auf das aufgereinigte Dcp2-mRNA-Decapping-Enzym, seinen Hauptaktivator Dcp1 sowie die Gerüstproteine Edc3 und Pdc1 aus *S. pombe* und zeigen, dass sich diese Proteine von selbst zu ölartigen Tröpfchen organisieren.

Es wurde nachgewiesen, dass die Proteine Edc3 und Dcp2 (Abbildung 1A) über die Edc3-LSm-Domäne sowie kurze helikale, leucinreiche Motive (HLMs) von Dcp2 miteinander wechselwirken.<sup>[13]</sup> Wir wenden NMR-Titrationsexperimente an und zeigen, dass Dcp2 mindestens sieben verschiedene HLMs enthält, die gezielt durch die Edc3-LSm-Domäne er-

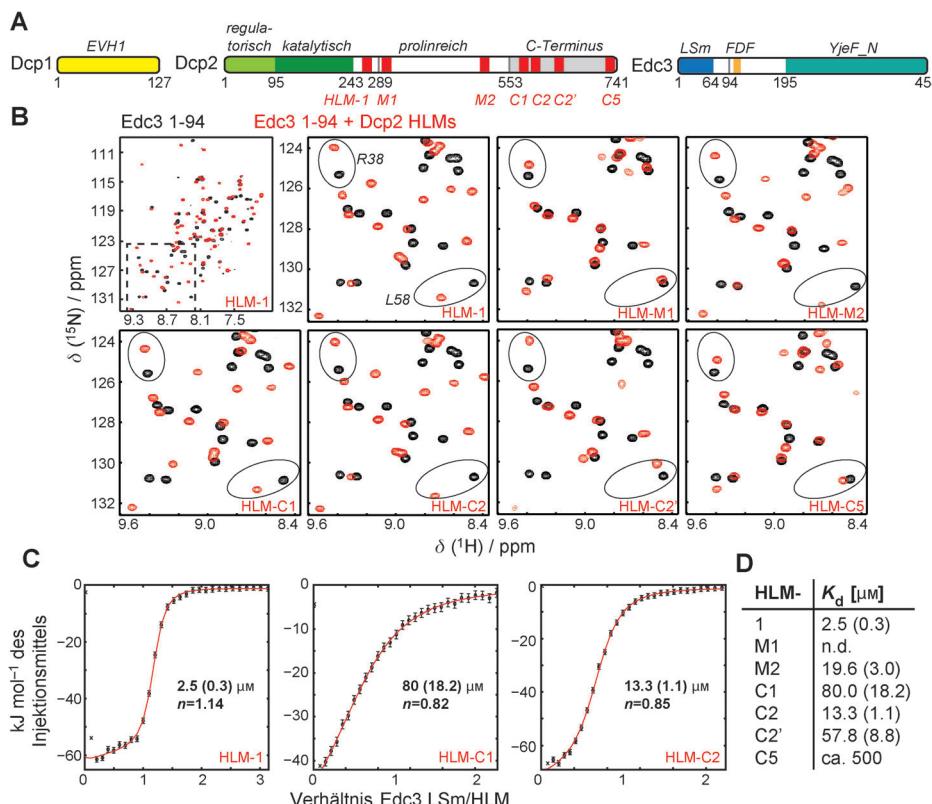
[\*] S. A. Fromm, E. R. Nöldeke, A. Neu, Dr. R. Sprangers  
Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie  
Spemannstraße 35, 72076 Tübingen (Deutschland)  
E-Mail: remco.sprangers@tuebingen.mpg.de

J. Kamenz  
Friedrich-Miescher-Laboratorium der  
Max-Planck-Gesellschaft, Tübingen (Deutschland)  
G. Zocher  
Interfakultäres Institut für Biochemie  
Universität Tübingen (Deutschland)

[\*\*] Wir danken Janina Ullmann für die ausgezeichnete technische Unterstützung, Dr. Michael Rosen (Universität Texas Southwestern) für Erkenntnisse in der Anfangsphase des Projekts, Andrew Renault für die Bereitstellung des Fluoreszenzmikroskops, Silke Wiesner und Silke Hauf für konstruktive Diskussionen, Lisa Gasse für Hilfe bei der Übersetzung und Dr. Jule für Unterstützung. J.K. dankt dem Boehringer Ingelheim Fonds für ein PhD-Stipendium. Diese Arbeit wurde von der Max-Planck-Gesellschaft unterstützt. Dieses Projekt hat finanzielle Mittel des Europäischen Forschungsrats durch das Siebte Rahmenprogramm (FP7/2007–2013) der Europäischen Union (ERC grant agreement no. 616052) erhalten.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201402885> zu finden.

© 2014 Die Autoren. Veröffentlicht von Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Dieser Open Access Beitrag steht unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution Non-Commercial NoDerivs License, die eine Nutzung und Verbreitung in allen Medien gestattet, sofern der ursprüngliche Beitrag ordnungsgemäß zitiert und nicht für kommerzielle Zwecke genutzt wird und keine Änderungen und Anpassungen vorgenommen werden.



**Abbildung 1.** Die sieben HLMs aus Dcp2 binden die Edc3-LSm-Domäne mit einer großen Spanne von Affinitäten. A) Schematische Darstellung von *S. pombe*-Dcp1 (EVH1-Domäne, gelb), Dcp2 (regulatorische: hellgrün, katalytische: dunkelgrün, HLMs: rot, prolinreiche mittlere Domäne: weiß, C-Terminus: grau) und Edc3 (LSm: dunkelblau, FDF-Motiv: orange, YjeF\_N: hellblau). Alle verwendeten Proteinvarianten sind in Tabelle S1 A der Hintergrundinformationen aufgelistet. B)  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -Korrelationsspektren, die Aufschluss über die Bindung zwischen der monomeren Edc3-LSm-Domäne und den sieben einzelnen Dcp2-HLMs geben. Schwarz: freie  $^{15}\text{N}$ -markierte Edc3-LSm-Domäne, rot: die Edc3-LSm-Domäne in Gegenwart eines 5-fachen Überschusses der einzelnen Dcp2-HLMs. Der im linken Feld oben gezeigte Bereich wird in allen anderen Feldern gezeigt. Reste R38 und L58 sind durch Ovale hervorgehoben, um darauf hinzuweisen, dass die HLMs Veränderungen der chemischen Verschiebung unterschiedlichen Ausmaßes verursachen. C) Beispielhafte ITC-Diagramme für die Bindung der Edc3-LSm-Domäne an die Dcp2-HLM-1-, HLM-C1- und HLM-C2-Sequenzen. Die beste Anpassung ist durch eine rote Linie dargestellt, und die daraus erhaltenen  $K_d$ -Werte mitsamt des Fehlers (Standardabweichung) sind angegeben. Abweichungen von  $n=1.0$ , wobei  $n$  die Stöchiometrie angibt, resultieren aus geringen Abweichungen bei der Bestimmung der Proteinkonzentrationen. D) Übersicht der bestimmten  $K_d$ -Werte (Fehler in Klammern) für die Dcp2-HLM:Edc3-Wechselwirkungen (n.d.: nicht durch ITC bestimbar).

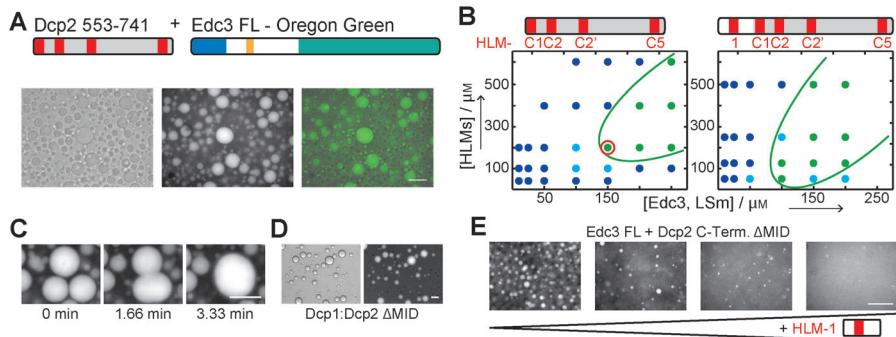
kannt werden (Abbildung 1B). Das Ausmaß der Veränderung der chemischen Verschiebung schwankt, was auf erhebliche Unterschiede der HLM-Affinitäten schließen lässt. Um diese zu beziffern, verwenden wir Isotherme-Titrationskalorimetrie(ITC)-Analysen und stellen fest, dass sich die Edc3/HLM-Affinitäten von  $(2.5 \pm 0.3) \mu\text{M}$  bis in den mm Bereich erstrecken (Abbildung 1C,D).

Eine Voraussetzung für Proteinphasetrennung ist die Fähigkeit zur Bildung unbegrenzter löslicher Ansammlungen. Allgemein ist diese Bedingung bei multivalennten Proteinen mit unabhängigen Bindungsstellen erfüllt. Theoretisch können Edc3 und Dcp2 ein solches unbegrenztes, stark verzweigtes Wechselwirkungsnetzwerk bilden, da Edc3 ein Dimer ist (und die biologische Einheit somit zwei LSm-Domänen enthält) und Dcp2 sieben Edc3-Bindungsstellen enthält (Abbildung S1 A der Hintergrundinformationen (SI)).

Zusätzlich erstrecken sich die Bindungsaffinitäten des Edc3:Dcp2-Systems vom niedrigen  $\mu\text{M}$  Bereich bis in den mm Bereich, was für die Erzeugung von Phasenübergängen als vorteilhaft angesehen wird.<sup>[6]</sup> Zur Erörterung der Frage, ob das Edc3:Dcp2-Netzwerk geeignet ist, In-vitro-Phasenübergänge zu generieren, haben wir den rekombinant exprimierten und aufgereinigten C-terminalen Bereich von Dcp2, der vier HLMs enthält (Dcp2-Reste 553–741; Tabelle 1 A (SI)), mit Volllängen-Edc3 gemischt. Durch Hellfeldmikroskopie lässt sich eine eindeutige Phasentrennung beobachten (Abbildung 2 A, links). Sowohl Edc3 als auch Dcp2 sind in den tröpfchenartigen Strukturen erheblich angereichert, was durch die Bewertung des resultierenden Fluoreszenzsignals der mit Oregon Green markierten Proteine ersichtlich wird (Abbildung 2 A und Abbildung S1 B,C (SI)). Folglich zeigen unsere Daten, dass das Wechselwirkungsnetzwerk zwischen Edc3 und Dcp2 ausreicht, um Phasentrennungen zu erzeugen.

Um Erkenntnisse über die zur Phasentrennung führenden Bedingungen zu erhalten, variierten wir die Konzentrationen von Edc3 und dem Teil von Dcp2, der vier HLMs enthält (Abbildung 2 B, links). Wir stellen fest, dass Phasentrennung auftritt, wenn eine Reihe von Bedingungen erfüllt ist: Zu-

nächst muss die absolute Konzentration der einzelnen Proteine ausreichend hoch sein. Für den Fall, dass eine bestimmte Schwellenkonzentration nicht überschritten ist, tritt keine Phasentrennung auf, und die Proteine verbleiben gleichmäßig verteilt in Lösung. Außerdem muss das molare Verhältnis der beiden Proteine innerhalb bestimmter Grenzen liegen. Für den Fall, dass der Überschuss eines der beiden Proteine zu groß ist, wird die Phasentrennung aufgehoben. Dies kann durch die Tatsache erklärt werden, dass ein großer Überschuss an Edc3 zu einer Situation führen würde, in der jedes HLM jeweils an einem dimeren Edc3-Protein gebunden wäre, was den Verlust der Verflechtung der verschiedenen Dcp2-Ketten zur Folge hätte. Auf der anderen Seite würde ein großer Überschuss des Dcp2-Proteins zu einer Situation führen, in der die Zahl an verfügbaren Edc3-Dimeren nicht ausreicht, um die Dcp2-Ketten miteinander zu verknüpfen.



**Abbildung 2.** In-vitro-Phasenübergänge von aufgereinigtem Edc3 und Dcp2. A) Phasenübergang von 50 µm Dcp2 553-741 und 150 µm Edc3 (1:100 mit Edc3-Oregon Green dotiert). Links: Hellfeld(BF)-Kanal, Mitte: Oregon-Green(OG)-Kanal, rechts: kombiniert. B) Phasendiagramme des Phasenübergangs von Edc3 zusammen mit Dcp2 553-741 (enthält vier HLM-Sequenzen; links) oder Dcp2 242-741ΔMID (enthält fünf HLM-Sequenzen). Die angegebenen Konzentrationen sind modulare Konzentrationen; 50 µm von Dcp2 553-741 entsprechen z. B. 200 µm HLM, da in der Dcp2 553-741-Variante vier HLMs enthalten sind. Die modulare LSm-Konzentration ist identisch mit der gesamten Edc3-Konzentration, da ein Edc3-Monomer eine LSm-Domäne enthält. Das Auftreten eines Phasenübergangs bei gegebenen Bedingungen ist farbcodiert – blau: kein Phasenübergang, hellblau: beginnender Phasenübergang, grün: eindeutiger Phasenübergang. Die grünen Linien zeigen den Verlauf der Phasengrenzen auf. Die rot eingekreiste Bedingung ist in (A) und (C) gezeigt. C) Die In-vitro-Tröpfchen sind hochdynamisch und verschmelzen mit der Zeit. Die Zeitskala ist unter den OG-Kanal-Bildern angegeben. D) Tröpfchen, gebildet durch 25 µm Dcp1:Dcp2ΔMID und 100 µm Edc3 (1:100 mit Edc3-OG dotiert). Links: BF-Kanal, rechts: OG-Kanal. E) Tröpfchen, gebildet durch 25 µm Dcp2 242-741ΔMID und 100 µm Edc3, verschwinden durch die vermehrte Zugabe von Dcp2 242-291 (enthält HLM-1) (5 µm, 10 µm, 25 µm, 50 µm). Maßstabsbalken: 50 µm.

In einer zweiten Versuchsreihe bestimmten wir den Einfluss der Anzahl an zwischenmolekularen Wechselwirkungen zwischen den Bestandteilen auf den Phasentrennsprozess. Da Vollängen-Dcp2 mit sieben enthaltenen HLMs nicht stabil exprimiert werden konnte, entwarfen wir eine Variante, die den kompletten, ungefalteten C-terminalen Bereich umfasst, allerdings ohne einen Teil der prolinreichen Region. Dieses Dcp2-C-Term.-ΔMid-Protein (Dcp2-Reste 242–289 + 553–741; Tabelle 1 A (SI)) enthält fünf HLMs und durchläuft Phasenübergänge bei Konzentrationen, die erheblich geringer sind als die für die Dcp2-Variante mit vier HLMs benötigten. Zum Beispiel findet in der Gegenwart von 150 µm Edc3 Phasentrennung statt, wenn die Dcp2-C-Term.-ΔMid-Konzentration 25 µm (125 µm modulare HLM-Konzentration) beträgt, wobei die doppelte Konzentration der Dcp2-Variante mit vier HLMs (50 µm; 200 µm modulare HLM-Konzentration) benötigt wird. Übereinstimmend mit vorherigen Beobachtungen<sup>[11]</sup> können wir daher folgern, dass die Valenz und die Affinitäten der Wechselwirkungspartner darüber bestimmen, ob Phasentrennung bei einer bestimmten Konzentration eintritt. Zur Kontrolle führten wir Experimente mit entweder einer monomeren Variante von Edc3 oder einer Dcp2-Sequenz, die nur ein einzelnes HLM enthält, durch (Abbildung S1 D,E (SI)). In keinem der Kontrollexperimente konnten wir Phasentrennung feststellen (Abbildung S1 D,E (SI)), da die Valenz bei einem der Bestandteile auf eins reduziert ist.

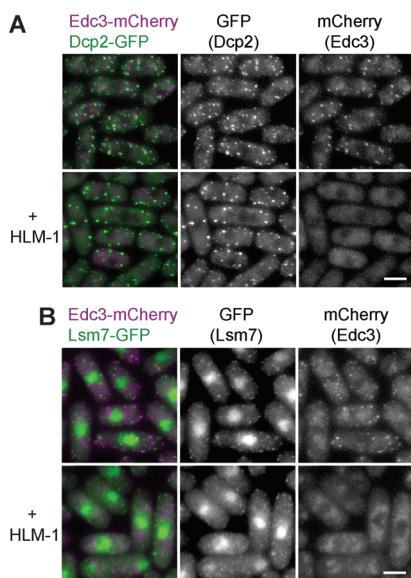
Wie gezeigt wurde, sind zelluläre Zentren, einschließlich P-bodys, sehr dynamisch.<sup>[14]</sup> Um zu bestimmen, ob die Edc3:Dcp2-in-vitro-Phasentrennungen, die wir aus aufgereinigten Bestandteilen hergestellt hatten, ein ähnliches Ver-

halten aufwiesen, verfolgten wir die Tröpfchen über eine längere Zeitspanne. Wir beobachteten eine Vielzahl von Fusionsvorgängen, die das flüssigkeitsartige Verhalten der In-vitro-Tröpfchen bestätigten (Abbildung 2 C). Dieser Befund verdeutlicht, dass das In-vitro-System der Situation in vivo bezüglich dieses Aspektes ähnelt.

Auf zellulärer Ebene finden sich in den Zentren, die Dcp2 und Edc3 enthalten, zahlreiche weitere Proteine. Um zu testen, ob es möglich ist, die zusammengesetzten In-vitro-Tröpfchen durch weitere Proteine zu ergänzen, verlängerten wir die Dcp2-C-Term.-ΔMid-Variante so, dass sie auch die katalytische und regulatorische Domäne von Dcp2 enthält (Dcp2 ΔMid, Reste 1–289 + 553–741; Tabelle 1 A (SI)). Für die regulatorische Domäne wurde gezeigt, dass sie mit Dep1 wechselwirkt.<sup>[15]</sup> Daraufhin mischten wir aufgereinigte Dcp1:Dcp2-Komplexe, die fünf HLMs enthielten, mit Edc3 und stellten eindeutige Phasentrennung

fest, was darauf schließen lässt, dass die Edc3:Dcp2-Tröpfchen zusätzliche Faktoren aufnehmen können (Abbildung 2D). Es sollte beachtet werden, dass Dep1 die Bindungsstelle für Xrn1 enthält,<sup>[16]</sup> wodurch ein Mechanismus ermöglicht wird, durch den die Exonuklease in die Dcp1:Dcp2:Edc3-Ansammlungen aufgenommen werden kann. Zusätzlich enthält Edc3 ein FDF-Motiv, durch das die Helikase DDX6/Dhh1 aufgenommen werden kann.<sup>[17]</sup> Die katalytische Domäne von Dcp2<sup>[18]</sup> und die Helikase ermöglichen dann die Bindung von mRNA-Substraten.

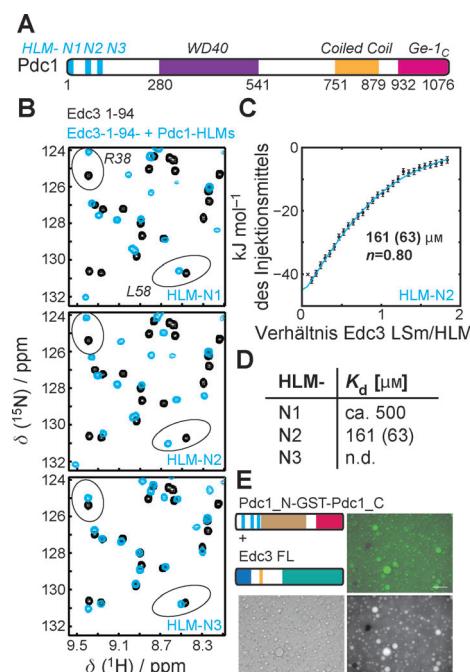
Die Edc3:HLM-Wechselwirkungen bilden den Kern der hier hergestellten In-vitro-Tröpfchen, weshalb eine Beeinflussung dieser Wechselwirkung voraussichtlich zu einem Verlust der Phasentrennung führt. Zur Überprüfung dieser Hypothese titrierten wir ein HLM-1-Dcp2-Peptid in die Lösung mit Edc3:Dcp2-Tröpfchen (Abbildung 1 D). Mit steigenden Mengen des HLM-1-Dcp2-Peptids stellten wir ein Verschwinden der In-vitro-Phasentrennung fest (Abbildung 2E). Um die Folgen der gezielten Beeinflussung der Edc3:HLM-Wechselwirkung auf die P-body-Bildung in vivo beurteilen zu können, überexprimierten wir das HLM-1-Peptid in *S. pombe*. Für die Beobachtung der Aufnahme von Edc3 in P-bodys ersetzten wir das *edc3*+-Gen an seinem endogenen Locus durch ein *edc3*+-*mCherry*-Hybridkonstrukt. Um gleichzeitig die Integrität der P-bodys bewerten zu können, verknüpften wir zusätzlich Dcp2 oder Lsm7 an ihrem endogenen Locus mit GFP. In Zellen, die das Peptid, das die Edc3:HLM-Wechselwirkung beeinflusst, nicht exprimieren, beobachteten wir P-bodys, die Edc3-mCherry und Dcp2-GFP bzw. Lsm7-GFP enthalten (Abbildung 3 A,B, obere Reihen). Andererseits wurde Edc3-mCherry in Zellen, die das HLM-



**Abbildung 3.** Auswirkung der HLM-1-Überexpression auf die Edc3-Lokalisierung in vivo. A,B) Fluoreszenzbilder von *S. pombe*, die mCherry- und GFP-markierte Varianten von Edc3 und Dcp2 (A) bzw. Lsm7 (B) exprimiert. Ohne HLM-1-Überexpression sind Edc3 und Dcp2 in P-bodys angereichert (obere Reihe). Bei Überexpression (adh1-Promotor) von HLM-1 ist Edc3 nicht mehr in P-bodys lokalisiert, sondern diffus in der Zelle verteilt (untere Reihe). Dcp2-GFP (A) und Lsm7-GFP (B) sind bei Überexpression von HLM-1 immer noch in P-bodys lokalisiert, was andeutet, dass die Beeinträchtigung der Edc3:HLM-Wechselwirkung nicht allgemein die P-body-Bildung stört. Maßstabsbalken: 5 µm.

Peptid überexprimieren, nicht mehr in P-bodys aufgenommen (Abbildung 3 A,B, untere Reihen). Dass Edc3 nicht mehr in P-bodys aufgenommen wird, ist höchstwahrscheinlich eine Folge der Sättigung der Edc3-LSm-Domänen mit dem überexprimierten monovalenten Peptid. Diese In-vivo-Beobachtungen sind in Einklang mit denen unserer In-vitro-Phasentrennung. Wichtig zu erwähnen ist, dass die Überexpression des HLM-Peptids nicht in einem allgemeinen Verlust von P-bodys resultiert, da sowohl Dcp2-GFP als auch Lsm7-GFP weiterhin in eindeutigen, zellulären Zentren gefunden werden (Abbildung 3 A,B, mittlere Spalten, untere Reihen). Diese Beobachtung bestätigt, dass die In-vivo-Bildung von P-bodys ein hoch redundant Prozess ist, bei dem der Verlust eines Bestandteils nicht in einem allgemeinen Verlust dieser Zentren resultiert.

Um Einblicke in die Redundanz der P-body-Bildung zu erhalten, wendeten wir uns dem Pdc1-Protein zu, für das zuletzt eine Rolle bei der P-body-Integrität in *S. pombe* nachgewiesen wurde.<sup>[10]</sup> Pdc1 ist mit dem Protein Edc4 (Ge-1, Hedls) der Metazoen verwandt.<sup>[19]</sup> Beide Proteine enthalten eine N-terminale WD-40-Domäne und einen zentralen Coiled-Coil-Bereich (Abbildung 4 A). Eine genaue Untersuchung der N-terminalen Proteinsequenz von Pdc1 aus *S. pombe* lässt auf das Vorhandensein mehrerer HLMs schließen (Abbildung 4 A). Durch NMR-Titrationsexperimente (Abbildung 4 B) bestätigten wir, dass der N-terminale Bereich von Pdc1 mindestens drei HLM-Sequenzen enthält, die mit der Edc3-LSm-Domäne wechselwirken können. Wie auch schon bei den sieben Dcp2-HLMs beobachtet,



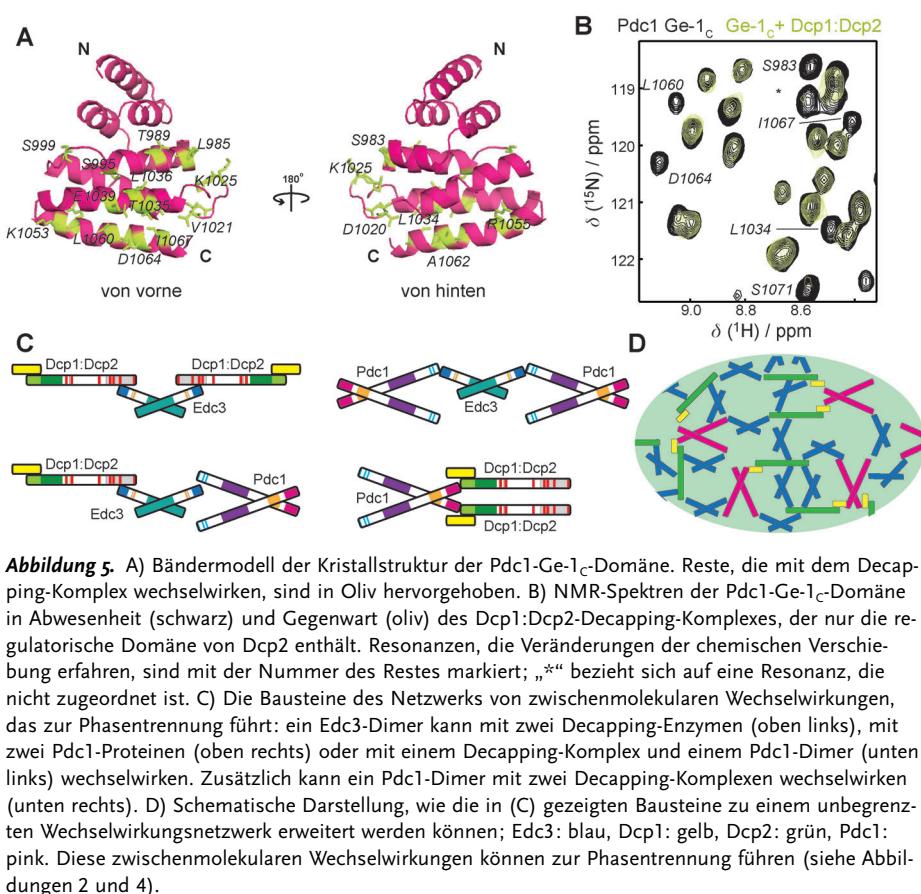
**Abbildung 4.** Pdc1 enthält drei HLMs im N-Terminus, die Edc3 mit unterschiedlichen Affinitäten binden. A) Domänenorganisation des Pdc1-Proteins (N-terminale HLMs: cyan, WD40-Repeats: lila, Coiled Coil: orange, Ge-1<sub>C</sub>-artige Domäne (siehe unten): pink). B) <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N-Korrelationsspektren der monomeren <sup>15</sup>N-markierten Edc3-LSm-Domäne in Abwesenheit (schwarz) und Gegenwart (cyan) der einzelnen Pdc1-HLMs. Der im oberen linken Feld von Abbildung 1 B umrahmte Bereich ist gezeigt, Ovale heben zwei bestimmte Reste (siehe oben) hervor. C) ITC-Diagramm der Bindung der Edc3-LSm-Domäne an HLM-N2 von Pdc1. Die beste Anpassung ist mit einer cyanfarbenen Linie dargestellt, und der daraus erhaltene  $K_d$ -Wert ist angegeben. D) Übersicht über alle bestimmten  $K_d$ -Werte (Fehler in Klammern) für die Bindung zwischen Pdc1-HLMs und Edc3-LSm (n.d.: nicht durch ITC bestimmbar). E) In-vitro-Phasentrennung der entworfenen, dimeren Pdc1-Variante (50 µM), die Vollängen-Pdc1 nachahmt, zusammen mit Edc3 (150 µM; 1:100 mit Edc3-OG dotiert). Maßstabsbalken: 50 µm.

schwankte das Ausmaß der Veränderung der chemischen Verschiebung der Edc3-LSm-Domäne, verursacht durch die verschiedenen Pdc1-HLMs (Abbildungen 1 B und 4 B). Mit ITC-Experimenten bestimmten wir die zugehörigen Affinitäten und fanden heraus, dass die drei Pdc1-HLM-Sequenzen mit Affinitäten zwischen 150 µM und dem niedrigen mM Bereich mit der Edc3-LSm-Domäne wechselwirken (Abbildung 4 C,D). Das Pdc1-Protein enthält einen zentralen Coiled-Coil-Bereich, durch den das Protein oligomerisieren kann und somit die Zahl an HLMs in einer biologischen Einheit des Proteins steigt. Weiter oben haben wir gezeigt, dass eine hohe Zahl an HLMs vorteilhaft für den Phasentrennungsprozess ist (Abbildung 2 B). Um zu testen, ob Edc3 und Pdc1 Phasentrennung hervorrufen können, versuchten wir zunächst das in *E. coli* rekombinant exprimierte Pdc1-Protein aufzureinigen. Allerdings war es uns nicht möglich, ausreichend stabiles Vollängen-Pdc1-Protein für In-vitro-Phasentrennungsexperimente herzustellen. Daraufhin entwarfen wir eine Pdc1-Variante, in der der Coiled-Coil-Bereich durch Glutathion-S-Transferase (GST) ersetzt wurde. In

Lösung ist GST ein Dimer und ahmt dadurch den Oligomerisierungseffekt des Pdc1-Coiled-Coil-Bereichs nach. Wir verwendeten diese entworfene, dimere Pdc1-Variante (die eine HLM-Valenz von sechs aufweist) und das dimere Edc3-Protein (das eine LSm-Valenz von zwei hat), um zu untersuchen, ob Edc3 und Pdc1 In-vitro-Phasenübergänge durchlaufen können. Dabei konnten wir beobachten, dass Pdc1 und Edc3 ein unbegrenztes Netzwerk von zwischenmolekularen Wechselwirkungen eingehen können, was in der Bildung einer ölatigen Tröpfchenphase resultiert (Abbildung 4E), wie auch schon bei Dcp2 und Edc3 gesehen (Abbildung 2A). Deshalb können wir aus unseren In-vitro-Experimenten schließen, dass Pdc1 und Dcp2 bezüglich der Fähigkeit, durch das Mischen mit Edc3 Phasentrennung zu veranlassen, redundante Proteine sind.

Sequenz-Alignments des C-terminalen Bereichs des *S.pombe*-Pdc1-Proteins mit dem menschlichen, *D.melanogaster*- und *A.thaliana*-Edc4-Protein deuten, trotz der sehr geringen Sequenzübereinstimmung (17%; Abbildung S2 A (SI)), auf das Vorhandensein einer Ge-1<sub>C</sub>-Domäne<sup>[20]</sup> im Pdc1-Protein hin. Um das Vorhandensein einer Ge-1<sub>C</sub>-Domäne im Pdc1-Protein zu bestätigen, lösten wir die Kristallstruktur der Reste 932–1076 mit einer Auflösung von 1.35 Å (PDB-Code: 4Q2S; Tabelle S2 (SI)). Die Struktur stellt ein dicht gepacktes Helixbündel dar, bei dem die drei N-terminalen Helices ungefähr einen 90°-Winkel mit den fünf C-terminalen Helices bilden (Abbildung 5A). Die Domänenstruktur ist der bekannten Struktur der Ge-1<sub>C</sub>-Domäne des *D.melanogaster*-Ge-1-Proteins sehr ähnlich (Abbildung S2 B (SI)).

Zuvor wurde gezeigt, dass die 290 C-terminalen Reste von Pdc1 mit Dcp2 wechselwirken.<sup>[10]</sup> Um zu erforschen, ob diese Wechselwirkung direkter Natur ist, führten wir NMR-Titrationsexperimente mit der <sup>15</sup>N-markierten Pdc1-Ge-1<sub>C</sub>-Domäne und einem Dcp1:Dcp2-Decapping-Komplex (Dcp2-Reste 1–95) durch. Wir beobachteten, dass Resonanzen von Resten der C-terminalen Helices erheblich gestört sind (Abbildung 5B). Dies deutet darauf hin, dass Pdc1 eine Oberfläche am C-Terminus des Proteins verwendet, um direkt mit dem Dcp1:Dcp2-Decapping-Enzym zu wechselwirken. Demnach kann Pdc1 mit Edc3 durch mehrere HLMs im N-terminalen Bereich und mit dem Decapping-Komplex durch die Ge-1<sub>C</sub>-Domäne im C-terminalen Bereich wechselwirken (Abbildung 5C). Diese Befunde heben die Gerüstfunktion von Pdc1 hervor und erklären seine Wichtigkeit für die P-body-Bildung. Es ist demnach anzunehmen, dass die



Zugabe von Pdc1 zu Edc3 und Dcp2 (Abbildung 2B) das Wechselwirkungsnetzwerk stärkt, was für den Phasenübergangsprozess von Vorteil ist.

Zusammenfassend demonstrieren wir hier, dass es möglich ist, das In-vivo-Phasentrennungsverhalten der mRNA-Decapping-Maschinerie in einer klar definierten In-vitro-Umgebung nachzubilden. Diese Bottom-up-Methode liefert Einblicke in das Clusteringverhalten, die wegen der höchst redundanten Beschaffenheit des Clusteringprozesses nicht mithilfe von genetischen Methoden erzielt werden konnten (Abbildung 5C,D).

Zusätzliche Mechanismen, die den Selbsaggregationsprozess der mRNA-Decapping-Maschinerie fördern, werden in der Zelle genutzt. Durch diese zusätzlichen Wechselwirkungen kann die kritische Konzentration, die für Phasentrennung nötig ist, auf ein biologisch relevantes Niveau sinken. In diesem Zusammenhang ist es erwähnenswert, dass kürzlich gezeigt wurde, dass Low-Complexity(LC)-Bereiche im RNA-bindenden Protein FUS zur Erzeugung von Phasenübergängen fähig sind.<sup>[6,12,21]</sup> Mechanistisch betrachtet aggregieren die LC-Bereiche über einen Mechanismus, der die Bildung von amyloidartigen Fasern involviert. Diese Eigenschaft konnten wir bei unseren Studien nicht feststellen. Dies legt nahe, dass beide Vorgänge, die zur Phasentrennung führen, von grundlegend verschiedener Natur sind. Kurze LC-Bereiche sind auch in Dcp2, Pdc1 und anderen P-body-Proteinen aus *S.pombe*, wie LSm4, Pat1p, Sum2 (Scd6), Ste13 (Dhh1) und Exo2 (Xrn1), zu finden.<sup>[22]</sup> Zukünftige Experi-

mente werden Aufschluss darüber geben können, wie diese LC-Bereiche, die HLM:Edc3-Wechselwirkung und andere spezifische zwischenmolekulare Wechselwirkungen (Abbildung 5C) den Phasenübergangsvorgang regulieren, der der P-body-Bildung zugrunde liegt (Abbildung 5D). Es wurde angeregt, dass sich biologische Systeme in einer Weise entwickelt haben, dass sich bestimmte Proteine in Zuständen befinden, die nahe an Phasentrennungsbedingungen sind.<sup>[6]</sup> Geringfügige Veränderungen der Valenz und der Affinität der Wechselwirkungspartner durch posttranskriptionale Modifikationen oder kleine Änderungen der Proteinniveaus können dann zum plötzlichen Auftreten oder Verschwinden von zellulärer Phasentrennung führen.<sup>[23]</sup> Die HLM-reiche Region von Pdc1 enthält eine große Zahl an Phosphorylierungsstellen,<sup>[24]</sup> die möglicherweise die Edc3-Bindung behindern und die Festigkeit des zwischenmolekularen Wechselwirkungsnetzwerks verringern könnten.

Unsere Befunde bilden einen Startpunkt für zukünftige In-vitro-Studien, in denen untersucht werden soll, wie die Aktivität zellulärer Enzyme durch lokales, zelluläres, molekulares Crowding beeinflusst werden kann. Des Weiteren nehmen wir an, dass In-vitro-Ansätze ähnlich zu den hier beschriebenen genutzt werden können, um der Frage nachzugehen, wie andere zelluläre Granula gebildet werden und bestimmte Proteine gezielt in eine bestimmte Klasse von Granula aufgenommen werden.

Eingegangen am 28. Februar 2014  
Online veröffentlicht am 26. Mai 2014

**Stichwörter:** NMR-Spektroskopie · Phasenübergänge · Processing Bodys · Protein-Protein-Wechselwirkungen · Selbstorganisation

- [1] a) T. Eystathioy, E. K. Chan, S. A. Tenenbaum, J. D. Keene, K. Griffith, M. J. Fritzler, *Mol. Biol. Cell* **2002**, *13*, 1338–1351; b) V. I. Bashkirov, H. Scherthan, J. A. Solinger, J. M. Buerstedde, W. D. Heyer, *J. Cell Biol.* **1997**, *136*, 761–773; c) E. van Dijk, N. Cougot, S. Meyer, S. Babajko, E. Wahle, B. Seraphin, *EMBO J.* **2002**, *21*, 6915–6924.
- [2] a) A. Eulalio, I. Behm-Ansmant, E. Izaurralde, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8*, 9–22; b) M. Kulkarni, S. Ozgur, G. Stoecklin, *Biochem. Soc. Trans.* **2010**, *38*, 242–251.
- [3] a) D. Ingelfinger, D. J. Arndt-Jovin, R. Lührmann, T. Achsel, *RNA* **2002**, *8*, 1489–1501; b) U. Sheth, R. Parker, *Science* **2003**, *300*, 805–808; c) C. J. Decker, D. Teixeira, R. Parker, *J. Cell Biol.* **2007**, *179*, 437–449.
- [4] V. Balagopal, R. Parker, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2009**, *21*, 403–408.

- [5] J. Coller, R. Parker, *Annu. Rev. Biochem.* **2004**, *73*, 861–890.
- [6] A. A. Hyman, K. Simons, *Science* **2012**, *337*, 1047–1049.
- [7] D. Teixeira, U. Sheth, M. A. Valencia-Sánchez, M. Brengues, R. Parker, *RNA* **2005**, *11*, 371–382.
- [8] D. Teixeira, R. Parker, *Mol. Biol. Cell* **2007**, *18*, 2274–2287.
- [9] M. A. Reijns, R. D. Alexander, M. P. Spiller, J. D. Beggs, *J. Cell Sci.* **2008**, *121*, 2463–2472.
- [10] C. Y. Wang, W. L. Chen, S. W. Wang, *Mol. Cell. Biol.* **2013**, *33*, 1244–1253.
- [11] P. Li, S. Banjade, H. C. Cheng, S. Kim, B. Chen, L. Guo, M. Llaguno, J. V. Hollingsworth, D. S. King, S. F. Banani, P. S. Russo, Q. X. Jiang, B. T. Nixon, M. K. Rosen, *Nature* **2012**, *483*, 336–340.
- [12] S. C. Weber, C. P. Brangwynne, *Cell* **2012**, *149*, 1188–1191.
- [13] a) C. Gaudon, P. Chambon, R. Losson, *EMBO J.* **1999**, *18*, 2229–2240; b) S. A. Fromm, V. Truffault, J. Kamenz, J. E. Braun, N. A. Hoffmann, E. Izaurralde, R. Sprangers, *EMBO J.* **2012**, *31*, 279–290.
- [14] a) C. P. Brangwynne, C. R. Eckmann, D. S. Courson, A. Rybarska, C. Hoege, J. Gharakhani, F. Julicher, A. A. Hyman, *Science* **2009**, *324*, 1729–1732; b) N. Kedersha, G. Stoecklin, M. Ayoade, P. Yacono, J. Lykke-Andersen, M. J. Fritzler, D. Scheuner, R. J. Kaufman, D. E. Golan, P. Anderson, *J. Cell Biol.* **2005**, *169*, 871–884; c) A. Aizer, P. Kafri, A. Kalo, Y. Shav-Tal, *PLoS One* **2013**, *8*, e69783; d) C. P. Brangwynne, T. J. Mitchison, A. A. Hyman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 4334–4339.
- [15] M. She, C. J. Decker, D. I. Svergun, A. Round, N. Chen, D. Muhlrad, R. Parker, H. Song, *Mol. Cell* **2008**, *29*, 337–349.
- [16] J. E. Braun, V. Truffault, A. Boland, E. Huntzinger, C. T. Chang, G. Haas, O. Weichenrieder, M. Coles, E. Izaurralde, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2012**, *19*, 1324–1331.
- [17] F. Tritschler, J. E. Braun, A. Eulalio, V. Truffault, E. Izaurralde, O. Weichenrieder, *Mol. Cell* **2009**, *33*, 661–668.
- [18] M. V. Deshmukh, B. N. Jones, D. U. Quang-Dang, J. Flinders, S. N. Floor, C. Kim, J. Jemielity, M. Kalek, E. Darzynkiewicz, J. D. Gross, *Mol. Cell* **2008**, *29*, 324–336.
- [19] a) M. Fenger-Grön, C. Fillman, B. Norrild, J. Lykke-Andersen, *Mol. Cell* **2005**, *20*, 905–915; b) J. H. Yu, W. H. Yang, T. Gulick, K. D. Bloch, D. B. Bloch, *RNA* **2005**, *11*, 1795–1802.
- [20] M. Jinek, A. Eulalio, A. Lingel, S. Helms, E. Conti, E. Izaurralde, *RNA* **2008**, *14*, 1991–1998.
- [21] a) T. W. Han, M. Kato, S. Xie, L. C. Wu, H. Mirzaei, J. Pei, M. Chen, Y. Xie, J. Allen, G. Xiao, S. L. McKnight, *Cell* **2012**, *149*, 768–779; b) M. Kato, T. W. Han, S. Xie, K. Shi, X. Du, L. C. Wu, H. Mirzaei, E. J. Goldsmith, J. Longgood, J. Pei, N. V. Grishin, D. E. Frantz, J. W. Schneider, S. Chen, L. Li, M. R. Sawaya, D. Eisenberg, R. Tycko, S. L. McKnight, *Cell* **2012**, *149*, 753–767.
- [22] J. C. Wootton, S. Federhen, *Methods Enzymol.* **1996**, *266*, 554–571.
- [23] C. F. Lee, C. P. Brangwynne, J. Gharakhani, A. A. Hyman, F. Julicher, *Phys. Rev. Lett.* **2013**, *111*, 088101.
- [24] A. Koch, K. Krug, S. Pengelley, B. Macek, S. Hauf, *Sci. Signaling* **2011**, *4*, rs6.