

Wie werden Ribosomen zusammengesetzt?

Die Untersuchung der Elongation von Bakterien bis zum Mensch mittels Kryo-Elektronenmikroskopie

T. Hilal, J. Loerke, C.M.T. Spahn, Institut für medizinische Physik und Biophysik, Charité - Universitätsmedizin Berlin

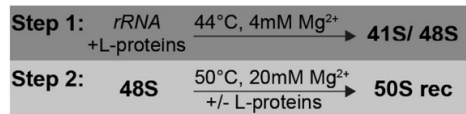
Kurzgefasst

- Kryo-Elektronenmikroskopie ermöglicht die Abbildung von Proteinkomplexen mit hoher Auflösung
- Einzelne biologische Zustände können nachträglich durch Sortieralgorithmen getrennt werden
- Die Abfolge einzelner Zustände, z.B. in der Proteinbiosynthese, kann viel über den Ablauf von Prozessen aussagen

Die Kryo-Elektronenmikroskopie (Kryo-EM; Nobelpreis 2017) ist eine Methode, die Proteinkomplexe in Eis abbildet. Sie hat im Vergleich zu anderen Verfahren den Vorteil, dass die untersuchten Komplexe häufig unter fast physiologischen Bedingungen eingefroren werden und so echte Zustände abgebildet werden können. Die Verbindung von EM und digitaler Bildbearbeitung und eine Revolution auf dem Feld der Detektoren (direct electron detectors) erlauben die Gewinnung von Strukturen, die mit denen der Röntgenstrukturanalyse vergleichbar sind.

Die sog. Einzelpartikelanalyse (single particle method) basiert auf der Annahme, dass Bilder in amorphem Eis zufällig orientierte Bilder identischer Komplexe zeigen und daher gemittelt werden können. Vergleichbar mit der Tomographie erlaubt die Kombination von 2-dimensionalen Bildern die Rekonstruktion der 3-dimensionalen Struktur. Da allerdings anfangs keine Information über die Orientierung und Winkelzuordnung einzelner Bilder vorliegt, muss diese erst in einem rechenintensiven iterativen Prozess durch Vergleich mit einer bekannten Struktur erzeugt werden.

Biologische Proben bestehen meist aus einem Gemisch von Zuständen, da thermodynamisch niemals alle Einzelkomplexe im gleichen Zustand vorkommen können. Durch rechenintensive Klassifizierungsmethoden können nachträglich einzelne Zustände getrennt werden[4], indem Einzelbilder von Partikeln in selbstähnliche Gruppen bzw. 3D Strukturen kombiniert werden. Durch Vergleich der Zustände und zusätzliche biologische oder biochemische Informationen kann die Abfolge der Einzelzustände bestimmt werden. Dadurch ist es oft möglich, aus



1. raw step 1 material → cryo EM
2. purified 48S material → cryo EM
3. purified 41S material → cryo EM
4. purified 48S material → step 2 → cryo EM

Abbildung 1: Reaktionsschema zur Erzeugung von *in vitro* rekonstituierten 50S Untereinheiten. 4 verschiedene Datensätze wurden mit Kryo-EM untersucht: das vollständige Material nach dem ersten Reaktionsschritt, gereinigte 48S Partikel, gereinigte 41S Partikel und aktive 50S Partikel (nach [1]).

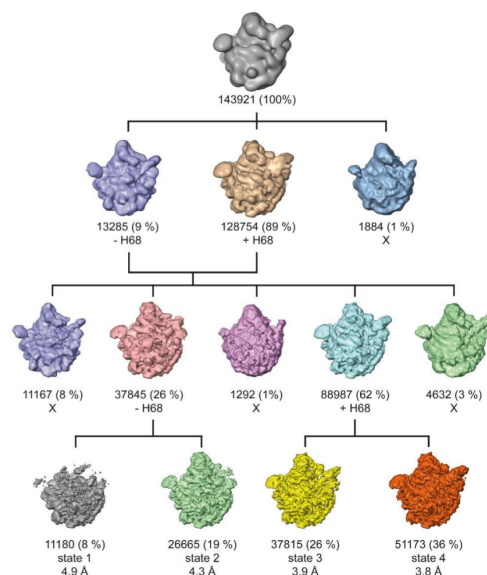


Abbildung 2: Die Sortierung des 48S Teildatensatzes. 144,000 Partikel wurden in mehreren Schritten anhand ihrer Unterschiede in einzelne Zustände aufgetrennt. Zu jedem Zustand sind absolute und relative Partikelzahlen angegeben. Mit X markierte Zustände wurden verworfen (nach [1]).

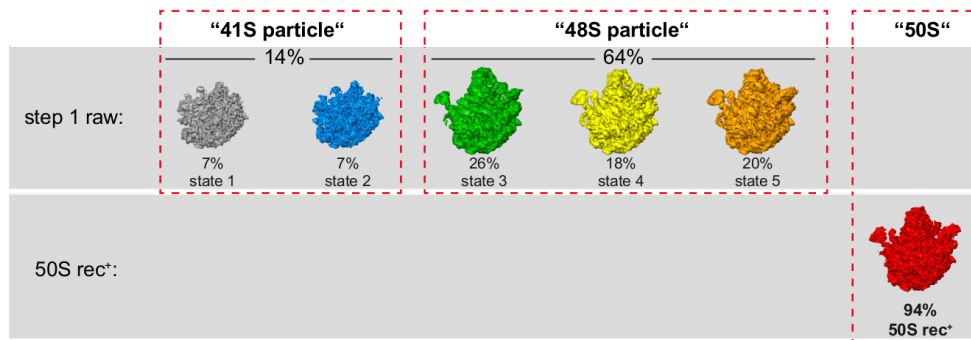


Abbildung 3: Zustandverteilung von 2 untersuchten Datensätzen. Der erste gezeigte Teildatensatz besteht aus dem vollständigen Material nach dem ersten Reaktionsschritt ("step-1 raw") und enthält 5 Teilstrukturen, die verschiedene Vorläuferstadien von 41S zu 48S abbilden. Der zweite Datensatz ("50S rec") enthält gereinigte 48S Partikel die den zweiten Reaktionsschritt durchlaufen haben und zu vollständigen 50S Untereinheiten gereift sind. Es sind keine Vorläuferstadien mehr enthalten, nur noch vollständige und aktive 50S Untereinheiten (nach [1])

einer heterogenen Probe Einzelzustände einer ablaufenden biochemischen Reaktion zu isolieren.

In diesem Projekt untersuchen wir Teile des Elongationszyklus in Bakterien und höheren Organismen. Gezeigt werden soll hier die Selbstassemblierung der 50S Untereinheit des bakteriellen Ribosoms. Ribosomen sind makromolekulare Komplexe, die in der Zelle aus der in Form von mRNA vorliegenden Information Proteine erzeugen. Das Verlängern der Proteinkette am Ribosom in der Proteinbiosynthese wird Elongation genannt. Das Ribosom besteht aus zwei Untereinheiten, die anhand ihrer Größe als 50S (oder große Untereinheit) und 30S (kleine Untereinheit) bezeichnet werden. Beide Untereinheiten bestehen sowohl aus Proteinen als auch aus ribosomaler Ribonukleinsäure (rRNA). Bevor die 50S Untereinheit an der Proteinbiosynthese teilnehmen kann, muß sie aus rRNA und Proteinen zusammengesetzt werden. In der Zelle wird diese Assemblierung der 50S Untereinheit durch eine Reihe von Proteinkomplexen unterstützt [2]. Dieser Prozess kann aber auch in einem Modellsystem (in vitro) durch eine zweistufige Reaktion ohne diese Faktoren stattfinden [3] (Abb. 1). In einem ersten Schritt bilden sich erst kleinere 41S Partikel die durch Anlagerung von Proteinen und rRNA zu den größeren 48S reifen. Diese werden dann in einem zweiten Schritt zum vollständigen und aktiven 50S Partikel, der an der Proteinbiosynthese teilnehmen kann.

Die zweistufige Reaktion wurde nach dem ersten Schritt unterbrochen und verschiedene Zwischenzustände (Abb. 1) wurden mit einem Kryo-EM abgebildet und sortiert (Abb. 2). Dabei zeigt sich, daß nach dem ersten Reaktionsschritt mehrere Zustände auftreten, die der schrittweisen Maturierung vom 41S zum 48S Partikel entsprechen (Abb. 2 und 3). Im 41S Partikel ist die rRNA bereits weitgehend vollständig gebildet, allerdings fehlen noch wichtige Strukturelemente wie der sog. L1-stalk, die zentrale Protube-

ranz und die Stalkbasis. Diese bilden sich in 4 Teilschritten, in denen zusätzliche Proteine inkorporiert werden und die rRNA sich in Teilbereichen umlagert und neu faltet. Allerdings ist festzuhalten, daß das katalytische Zentrum der großen Untereinheit (das Peptidyltransferasezentrum, PTC) in diesen Schritten nicht vollständig gebildet ist. Der Vergleich mit aktiven 50S Untereinheiten zeigt, daß das PTC erst im zweiten Reaktionsschritt gebildet wird. Mit Ende des zweiten Reaktionsschritts sind somit keine Vorläuferpartikel mehr zu finden, sondern nur noch aktive 50S Untereinheiten (Abb. 3).

WWW

https://biophysik.charite.de/forschung/ag_kryo_elektronenmikroskopie

Weitere Informationen

- [1] R. Nikolay, T. Hilal et al., *Mol Cell* **2** (2018)
- [2] M. Kaczanowska, M. Ryden-Aulin, *Microbiol Mol Biol Rev* **71** (2007)
- [3] K.H. Nierhaus, F. Dohme, F., *Proc Natl Acad Sci* **71** (1974)
- [4] J. Loerke, J. Giesebrecht, C.M. Spahn, *Methods Enzymol* **483** (2010)

Förderung

DFG Sonderforschungsbereich (SFB) 740 TP A3/Z1