

Wie werden Ribosomen zusammengesetzt?

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

J. Loerke, R. Nikolay, 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 Sortierungsalgorithmen 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. Proteinkomplexe können unter Bedingungen eingefroren und abgebildet werden, die denen in der echten Zelle näher kommen als viele andere Messmethoden. Durch digitale Bildverarbeitung und eine neue Generation von digitalen Detektoren lassen sich hochaufgelöste Strukturen gewinnen, die mit denen der Röntgenstrukturanalyse vergleichbar sind.

Die sog. Einzelpartikelanalyse ("single particle method") basiert auf der Mittelung von Bildern des Komplexes in amorphem Eis. Unter der Annahme, dass die Einzelbilder zufällig orientierte Projektionen identischer Komplexe zeigen und daher gemittelt werden können, kann aus den 2-dimensionalen Einzelbildern eine 3-dimensionale (3D) Struktur gewonnen werden. Da allerdings anfangs keine Information über die Orientierung und Winkelzuordnung einzelner Bilder bekannt ist, muss diese erst in einem rechenintensiven iterativen Prozess durch Vergleich mit einer bekannten Struktur ("projection matching") erzeugt werden.

Biologische Proben bestehen allerdings immer aus einem Gemisch von Zuständen, da aus thermodynamischen Gründen selbst in gereinigten Proben nie alle Komplexe im gleichen Zustand vorkommen können. In der Mittelung zur 3D-Struktur wird daher eine Durchschnittsstruktur berechnet, die aus allen vorkommenden Zuständen des Komplexes gleichzeitig besteht. Durch rechenintensive Klassifizierungsmethoden können nachträglich die einzelnen Zustände *in silico* getrennt werden [4], indem Einzelbilder von Partikeln in mehrere selbstähnliche 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 einer

Step 1:	rRNA +L-proteins	44°C, 4mM Mg ²⁺	→ 41S/ 48S
Step 2:	48S	50°C, 20mM Mg ²⁺ +/- L-proteins	→ 50S rec

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 mithilfe von Kryo-EM untersucht: das vollständige Material nach dem ersten Reaktionsschritt, gereinigte 48S Partikel, gereinigte 41S Partikel und aktive 50S Partikel (nach [1]).

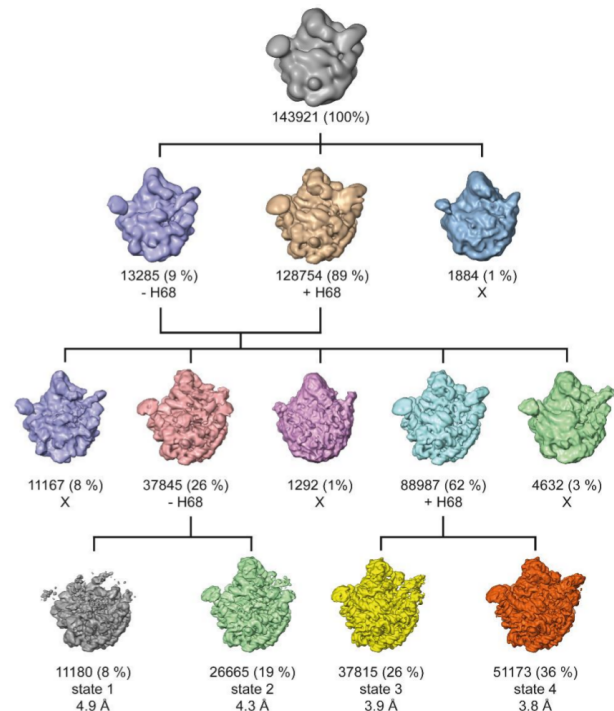


Abbildung 2: Die Sortierung des 48S Teildatensatzes. 144,000 Einzelpartikel wurden in mehreren Schritten anhand ihrer Unterschiede in einzelne Zustände aufgetrennt. Zu jedem Zustand sind absolute und relative Partikelzahlen angegeben. Mit X markierte Zustände wurden verworfen (nach [1]).

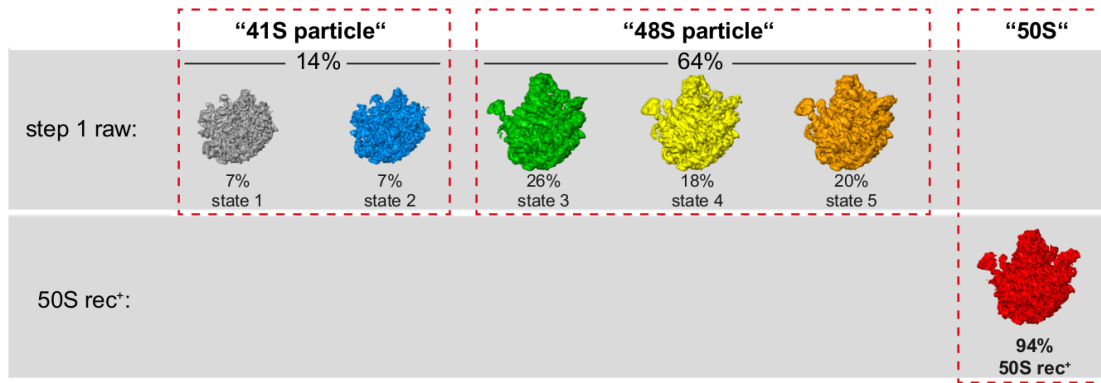


Abbildung 3: Zustandverteilung von 2 untersuchten Datensätzen. Der erste gezeigte Teildatensatz besteht aus dem vollständigen Material nach dem ersten Reaktionsschritt ("step-1 raw") und enthält 5 Teilstrukturen, die verschiedene Vorläuferstadien von 41S zu 48S abbilden. Der zweite Datensatz ("50S rec") 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])

heterogenen Probe alle vorkommenden 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 in der sog. Elongation aus der in Form von mRNA vorliegenden Information Proteine erzeugen. Das Ribosom besteht aus zwei Untereinheiten, die in Bakterien 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 dieser Prozess durch eine Reihe von Proteinkomplexen unterstützt [2]; er kann aber auch in einem Modellsystem (in vitro) durch eine zweistufige Reaktion ohne diese Faktoren stattfinden [3] (siehe 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.

Die zweistufige Reaktion wurde nach dem ersten Schritt unterbrochen und verschiedene Zwischenzustände (siehe Abb. 1) wurden mithilfe der Kryo-EM abgebildet und sortiert (siehe Abb. 2). Dabei zeigt sich, dass nach dem ersten Reaktionsschritt mehrere Zustände auftreten, die der schrittweisen Maturierung vom 41S zum 48S Partikel entsprechen (siehe 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 Protuberanz 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) erst im zweiten

Reaktionsschritt gebildet wird. Mit Ende des zweiten Reaktionsschritts sind 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). doi: 10.1016/j.molcel.2018.05.003
- [2] M. Kaczanowska, M. Ryden-Aulin, *Microbiol Mol Biol Rev* **71** (2007). doi:10.1128/MMBR.00013-07
- [3] K.H. Nierhaus, F. Dohme, F., *Proc Natl Acad Sci* **71** (1974). doi:10.1073/pnas.71.12.4713
- [4] J. Loerke, J. Giesebrecht, C.M. Spahn, *Methods Enzymol* **483** (2010). doi:10.1016/S0076-6879(10)83008-3

Förderung

DFG Sonderforschungsbereich (SFB) 740 TP A3/Z1