

Träger des «Otto Naegeli-Preises» 2018

# Ribosomen der Eukaryonten: molekulare Maschinen mit besonderen Eigenschaften

Prof. Dr. Nenad Ban

Institut für Molekularbiologie und Biophysik, Eidgenössische Technische Hochschule (ETH) Zürich

## Einleitung

Ribosomen sind faszinierende und hochkomplexe zelluläre Maschinen, die in allen Lebewesen für die Biosynthese von Proteinen verantwortlich sind. Sie bilden einen elementaren Teil des Informationsflusses von DNA über RNA zu Protein. Dabei übersetzen sie die in der DNA kodierte genetische Information anhand des mRNA-Botenstranges in die entsprechende Aminosäuresequenz der jeweiligen Proteine. Dieser Prozess wird als Translation bezeichnet und ist für alle Zellen von zentraler Bedeutung, weshalb Ribosomen bereits seit vielen Jahrzehnten im Fokus der Forschung stehen [1].

Auch für die biomedizinische Forschung sind Ribosomen von grossem Interesse: So bilden sie einerseits den Hauptangriffspunkt vieler klinisch bedeutsamer Antibiotika. Andererseits spielt die Regulation der Proteinbiosynthese eine wesentliche Rolle bei zahlreichen fundamentalen Prozessen wie dem Zellwachstum, der Differenzierung, bei Virusinfektionen und vielen anderen Krankheiten, darunter auch Krebserkrankungen.

Ribosomen sind auf der molekularen Skala gemessen regelrechte Kolosse und gehörten zu den ersten Komplexen, die mithilfe der Elektronenmikroskopie von Zellen und Organellen sichtbar gemacht werden konnten, zum Beispiel als körnige Strukturen an der Membranoberfläche des rauen endoplasmatischen Retikulums (ER). Sie besitzen zwei Untereinheiten, die als «grosse» und «kleine» Untereinheiten bezeichnet und historisch anhand ihres Sedimentationskoeffizienten (S) während der Zentrifugation klassifiziert werden (bei Bakterien mit 30S für die kleine und 50S für die grosse Untereinheit, Abb. 1). Beide Untereinheiten sind aus zwei Arten von biologischen Makromolekülen aufgebaut: Sie bestehen aus einer Vielzahl von Proteinen, den sogenannten ribosomalen Proteinen, sowie aus ribosomalen Ribonukleinsäuren, den rRNAs.

Während der Proteinbiosynthese, bei der an Transfer-RNAs (tRNAs) gekoppelte einzelne Aminosäuren zu einer Polypeptidkette verknüpft werden, katalysiert die

## Otto Naegeli-Preis für die medizinische Forschung

otto  
naegeli  
preis  
für die  
medizinische  
forschung

Der «Otto Naegeli-Preis für die medizinische Forschung» wurde 1960 zum Andenken an den 1938 verstorbenen grossen Wissenschaftler und Lehrer für Innere Medizin an der Universität Zürich, Professor Otto Naegeli, geschaffen. Der Preis gilt als einer der bedeutendsten wissenschaftlichen Preise der Schweiz; er geniesst hohe internationale Anerkennung.

Der «Otto Naegeli-Preis» bezweckt die Förderung der medizinischen bzw. biomedizinischen Forschung und wird in der Regel alle zwei Jahre an Forschende in der Schweiz verliehen. Die Preissumme beträgt zurzeit CHF 200 000. Mit dem Preis sollen auch jüngere Forschende zu weiteren Leistungen angeregt werden.

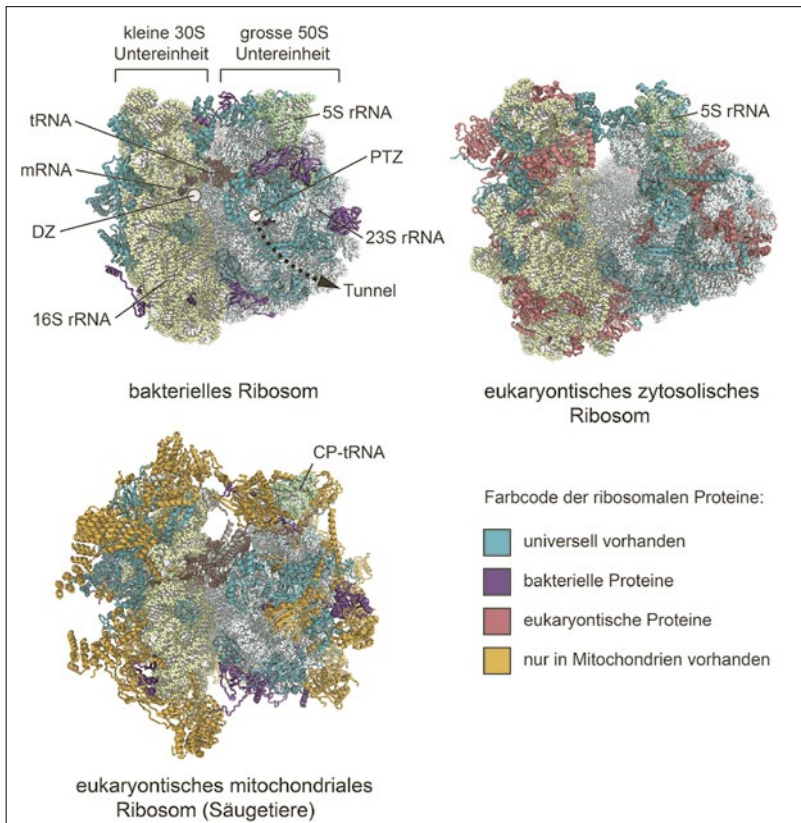
grosse ribosomale Untereinheit die Bildung der Peptidbindung im Peptidyl-Transferase-Zentrum (PTZ) und dient als Plattform für die vorübergehende Bindung assistierender Proteine, den Translationsfaktoren, welche die Reaktion steuern. Die wachsende Polypeptidkette verlässt die grosse ribosomale Untereinheit durch einen Tunnel Richtung Ribosomenoberfläche und faltet sich entweder im Zytosol oder ER-Lumen in ihre dreidimensionale Struktur oder wird direkt in die Zellmembran synthetisiert. Die kleine ribosomale Untereinheit ist verantwortlich für die Dekodierung der mRNA, indem sie in ihrem Dekodierungszentrum (DZ) zu jedem mRNA-Codon aus einem zellulären Pool die tRNA mit passendem Anti-Codon rekrutiert, die ihrerseits mit der kodierten Aminosäure beladen ist.

Die Translation wird in drei Phasen gegliedert, die Initiation, Elongation und Termination. Die Translations-Initiation ist der am stärksten regulierte Abschnitt der Proteinbiosynthese. Dabei bindet die kleine ribosomale Untereinheit an die mRNA und erkennt zusammen mit spezialisierten Translations-Initiations-Faktoren das «Start»-Codon, das für die erste Aminosäure des herzustellenden Proteins, im Regelfall ein Methionin, kodiert. Ist die kleine Untereinheit korrekt an der mRNA positioniert, bindet die grosse ribosomale Un-

Das Editorial zu diesem Artikel finden Sie auf S. 1053 dieser Ausgabe.



Nenad Ban



**Abbildung 1:** Aufbau von bakteriellen, eukaryontischen zytosolischen und mitochondrialen Ribosomen. Die strukturellen Unterschiede widerspiegeln die verschiedenen spezifischen Mechanismen, die während der Translation in Bakterien, Eukaryonten und in Mitochondrienorganellen eine Rolle spielen.

tereinheit, und das zusammengefügte Ribosom geht in das Elongationsstadium der Translation über, bei dem die Polypeptidkette Aminosäure um Aminosäure verlängert wird, während das Ribosom die mRNA entlangwandert und sie Codon um Codon entschlüsselt. Trifft das Ribosom auf ein «Stop»-Codon, das mittels «Release»-Faktoren erkannt wird, wird die Peptidbiosynthese abgebrochen. Bei dieser Termination wird das neu synthetisierte Protein aus dem Ausgangstunnel entlassen, das Ribosom wird in beide Untereinheiten zerlegt und der Zyklus kann von Neuem beginnen.

Obschon die der Proteinbiosynthese zugrunde liegenden chemischen Reaktionen in allen Domänen des Lebens identisch sind, gibt es wichtige strukturelle und funktionelle Unterschiede zwischen den bakteriellen und den deutlich komplexer aufgebauten eukaryontischen zytosolischen Ribosomen, zum Beispiel denjenigen der Hefe oder des Menschen. Dasselbe gilt für Ribosomen in den Mitochondrien, den eukaryontischen Zellorganellen, in denen die zelluläre Energiewährung ATP produziert wird (Abb. 1).

Für die Translations-Initiation an eukaryontischen Ribosomen im Zytosol wird eine grosse Zahl Initiationsfaktoren benötigt, die nur in Eukaryonten vorkommen

und eine wesentlich umfangreichere Regulation zulassen als dies bei Bakterien der Fall ist. Die eukaryontische Translations-Initiation wird gelegentlich auch durch strukturelle Elemente in zellulären und viralen mRNAs kontrolliert. Diese Elemente erlauben es der Zelle einerseits, in speziellen Fällen die Translation ohne die üblichen Initiationsfaktoren zu beginnen, andererseits gelingt es den Viren auf diese Weise, die Ribosomen des Wirts für die Biosynthese viraler Proteine zu missbrauchen.

Mitochondriale Ribosomen (Mitoribosomen) sind spezialisiert auf die Biosynthese von Membranproteinen. Sie synthetisieren die Elektronentransportkette an der inneren Mitochondrienmembran sowie den Proteinkomplex, der durch chemiosmotische Kopplung ATP generiert. Die Rekrutierung der mRNA und die Positionierung des Start-Codons erfolgen in Mitoribosomen auf eine Art und Weise, die sich grundlegend von der bakteriellen oder eukaryontischen zytosolischen Translations-Initiation unterscheidet.

Die jahrelange intensive Forschungstätigkeit meiner Arbeitsgruppe hat viel zum besseren Verständnis der Ribosomen aus allen Domänen des Lebens beigetragen. Ähnlich wie bei mechanischen Präzisionsmaschinen die Form einzelner Bauelemente und vor allem ihre räumliche Anordnung die Funktion überhaupt erst ermöglichen, verhält es sich auch bei komplexen molekularen Maschinen: Die Struktur ist eng mit der Funktion verknüpft. Gerade bei Komplexen, die aus so vielen Komponenten aufgebaut sind, ist strukturelle Information für das Verständnis unerlässlich. Allerdings waren es gerade auch die Grösse und Komplexität dieser Maschinen, welche die Strukturuntersuchungen der Ribosomen für lange Zeit so erschwert haben. Meine Gruppe nutzt eine Kombination hochmoderner strukturbioologischer Methoden, um die Proteinbiosynthesemaschinerie in ihren verschiedenen Funktionsstadien zu untersuchen. Ich möchte im Folgenden einige unserer wichtigsten Entdeckungen aus dem Gebiet der Ribosomenforschung zusammenfassen.

## Eukaryontische Ribosomen

Im letzten Jahrzehnt sind entscheidende Fortschritte erzielt worden, die zu einem besseren Verständnis der zytosolischen Proteinsynthesemaschinerie der Eukaryonten beigetragen haben. So ist es uns gelungen, die vollständigen atomaren Kristallstrukturen beider ribosomaler Untereinheiten (bei Eukaryonten die 40S und 60S) zu ermitteln [2–4] (Abb. 1). Ausserdem veröffentlichte die Gruppe um Marat Yusupov die Kristallstruktur des gesamten 80S-Ribosoms aus Bäckerhefe [5]. Diese Kristallstrukturen machten es zum ersten

Mal möglich, die über 80 eukaryontischen ribosomalen Proteine zu lokalisieren und ihre individuellen Faltungen sowie die Architektur der rRNAs aufzuklären. Das eröffnete einen vollkommen neuen Blick auf diese Komplexe, indem es erlaubte, existierende biochemische und medizinische Beobachtungen und Daten auf die Struktur abzubilden und ihre molekulare Basis zu erklären. So konnten wir Mutationen ribosomaler Proteine, die bei Erbkrankheiten auftreten, kartieren. Bei der Diamond-Blackfan-Anämie beispielsweise treten Mutationen in verschiedenen Proteinen über die ribosomale Oberfläche verteilt auf, was auf eine generelle Beeinträchtigung der Proteinbiosynthese hindeutet. Bei der kleinen ribosomalen Untereinheit sind einige dieser Mutationen an Stellen im Ribosom lokalisiert, wo die rRNA prozessiert wird, was darauf hindeutet, dass diese Veränderungen bereits die Ribosomenreifung stören. In einem anderen Fall wird die Verankerung des Proteins RACK1 in der kleinen ribosomalen Untereinheit beeinträchtigt. RACK1 ist Teil verschiedener Signalkaskaden und steuert beim Menschen die Translation durch Rekrutierung eines Enzyms zur Phosphorylierung des Elongationsfaktors eIF6.

Die Ergebnisse dieser Strukturstudien haben uns und anderen Arbeitsgruppen den Weg gebahnt für weiterführende strukturelle Untersuchungen und struktur-basierte Analysen (siehe auch Übersichtsartikel von Hinnebusch [6], Hashem und Frank [7]), da mithilfe der hochauflösenden Strukturen nun auch funktionelle Komplexe mit zusätzlichen Faktoren bei niedrigerer Auflösung interpretiert werden konnten. Wir haben uns dabei vor allem auf die Translations-Initiation konzentriert, die am stärksten regulierte Phase der Translation. Bei der eukaryontischen Translations-Initiation handelt es sich um einen komplexen Prozess, an dem mindestens 25 verschiedene akzessorische Proteine beteiligt sind, die sich wiederum zu acht eukaryontischen Initiationsfaktoren (eIFs) zusammenlagern [6]. Von diesen eIFs ist der eukaryontische Initiationsfaktor 3 (eIF3) der grösste und komplizierteste: In Hefe besteht er aus sechs Untereinheiten, die auch bei allen anderen Eukaryonten vorhanden sind. Bei höheren Eukaryonten können ausserdem noch weitere Proteine dazukommen, insgesamt kann eIF3 aus bis zu 13 Untereinheiten bestehen. eIF3 spielt eine zentrale Rolle bei der Initiation, indem er weitere Initiationsfaktoren rekrutiert und deren Zusammenlagerung zusammen mit der mRNA zu einem grossen Initiationskomplex koordiniert sowie an der Erkennung des korrekten Start-Codons (dem «Scanning») beteiligt ist.

Unsere Gruppe hat einen wesentlichen Beitrag zum besseren Verständnis der eukaryontischen Translations-Ini-

tiation geleistet, indem wir ermittelt haben, wie verschiedene Initiationsfaktoren, darunter auch eIF3, an die kleine 40S-Untereinheit des eukaryontischen Ribosoms binden und so ihre Funktion ausüben können. Unsere Untersuchungen haben gezeigt, dass die Komponenten von eIF3 die 40S-Untereinheit komplett umgreifen, um so an beiden Enden des mRNA-Kanals die Bindung weiterer Initiationsfaktoren zu koordinieren [8, 9]. Diese räumlich-zeitliche Koordination bildet die Basis der regulatorischen Mechanismen der Translation während des Zellwachstums und der Differenzierung.

Wir haben auch untersucht, wie die einzelsträngige genomische RNA des Hepatitis-C-Virus (HCV), die für alle viralen Proteine kodiert, an das Ribosom bindet, um die Translation ohne die üblichen Translationsfaktoren zu initiieren [10]. So bindet strukturierte virale RNA über spezifische Kontakte an die rRNA, um das Start-Codon der mRNA sehr präzise in der sogenannten «P»-Stelle des Ribosoms, wo Initiator-tRNA für den Start der Translation angeliefert wird, zu positionieren. Unsere Resultate liefern damit einerseits einen prinzipiellen Einblick, wie strukturierte mRNA die Initiation der Translation steuern kann. Andererseits kann unsere Struktur als Ausgangspunkt verwendet werden, um antivirale Substanzen zu entwickeln und damit HCV zu bekämpfen.

## Mitochondriale Ribosomen aus Säugetieren

Mitochondrien sind Zellorganellen bakteriellen Ursprungs. Sie wurden vor Urzeiten von eukaryontischen Vorläuferzellen als Endosymbionten aufgenommen und haben sich im Verlaufe der Evolution in der Form von Organellen auf die Zellatmung spezialisiert. Mitochondrien besitzen noch immer ein eigenes Genom, auf dem vorwiegend die Membranproteine der Atmungskette kodiert sind. Diese sind in der Zellmembran eingebettet und können dort ihre spezifische Funktion wahrnehmen für die Energieumwandlung und ATP-Herstellung während des aeroben Stoffwechsels in eukaryontischen Zellen [11]. Um diese Atmungskettenproteine herzustellen und direkt in die Zellmembran einzulagern, benötigen die Mitochondrien eine dafür spezialisierte Translationsmaschinerie, die mitochondrialen Ribosomen oder «Mitoribosomen». Obschon diese Mitoribosomen aufgrund des endosymbiontischen Ursprungs der Mitochondrien eng verwandt sind mit bakteriellen Ribosomen, fand bei den Mitoribosomen von Säugetieren in Laufe der Evolution ein dramatischer struktureller Wandel statt [12, 13]. Die ribosomale rRNA erlitt eine drastische Reduktion, während zahlreiche neue ribosomale Proteine rekrutiert wurden. Dadurch wurde das Massever-

hältnis zwischen rRNA und Protein im Vergleich zu bakteriellen oder eukaryontischen zytosolischen Ribosomen umgekehrt: Die rRNA entspricht nur noch einem Drittel der ribosomalen Masse, während die Proteine nun zwei Drittel ausmachen [12, 14].

Unser Team und die Gruppe um Venki Ramakrishnan haben kürzlich die atomaren Strukturen des kompletten Mitoribosoms aus Säugetieren in einem aktiven Zustand beschrieben [15–17] (Abb. 1). Diese Strukturen gehören zu den ersten, die mittels neuartiger elektronenmikroskopischer Technik bei einer Auflösung dargestellt werden konnten, die das «Bauen» einer atomaren Struktur vorher unbekannter Proteine und rRNA-Abschnitte erlaubte. Dabei werden die Messdaten, die einer je nach Auflösung mehr oder weniger präzise definierten Hülle um die Atome der Proteine oder rRNAs entsprechen, mithilfe des Computers interpretiert und die Aminosäure- und Nucleotidbausteine anhand der Hülle in chemisch sinnvoller Weise miteinander verknüpft. Die auf diese Weise ermittelten Strukturen offenbarten erstmalig die Lage aller mitoribosomalen Proteine sowie deren Faltung und auch die Andersartigkeit der reduzierten mitoribosomalen rRNA. Zusätzlich entdeckten wir, dass bei Mitoribosomen aus Säugetieren anstelle einer evolutionär hoch konservierten 5S rRNA, wie sie üblicherweise in der grossen Untereinheit von zytosolischen und bakteriellen Ribosomen vorkommt, eine tRNA eingebaut ist (CP-tRNA), welche die wichtige strukturgebende Funktion der 5S rRNA übernimmt [15].

Weiter konnten wir in der grossen mitoribosomalen Untereinheit das katalytische Zentrum und den Pfad der naszierenden Polypeptidkette im Ausgangstunnel analysieren. Am Ende des Tunnels entdeckten wir ein Protein, das höchstwahrscheinlich verantwortlich ist für die permanente Verankerung der Mitoribosomen an der inneren mitochondrialen Zellmembran [14]. Damit können die Mitoribosomen ihre spezialisierte Funktion in optimaler Weise wahrnehmen und die Membranproteine an Ort und Stelle synthetisieren.

Die anhand unserer Struktur gewonnenen Erkenntnisse haben auch umfangreiche medizinische und funktionelle Konsequenzen: Sie erlauben, bei Patienten, die unter Mutationserkrankungen in Zusammenhang mit mitoribosomalen Proteinen leiden, die zugrunde liegende Pathologie besser zu verstehen. Zusätzlich veranschaulichen die Strukturdaten den Mechanismus der Toxizität von Aminoglykosid-Antibiotika, die bei einem signifikanten Teil behandelter Patienten zu einer tem-

porären Beeinträchtigung des Hörvermögens und bei 0,2% aller Patienten zu permanentem Hörverlust führen [18]. Ausserdem konnten wir das spezifisch in Mitoribosomen vorkommende Protein mS29 erstmals genauer untersuchen: Dieses Guanin-Nukleotid-bindende Protein spielt eine regulatorische Rolle bei der Apoptose (dem programmierten Zelltod) und wird mit Krebserkrankungen in Verbindung gebracht [19]. Interessanterweise kann mS29 phosphoryliert werden, wobei die Phosphorylierungsstellen in der Struktur an einem Kontakt zur grossen ribosomalen Untereinheit liegen und mS29 somit eine regulatorische Rolle bei der Proteinbiosynthese spielen könnte.

## Schlussfolgerungen und Ausblick

In den letzten Jahren hat sich die strukturblogische Ribosomenforschung immer mehr verschoben von bakteriellen Ribosomen in Richtung eukaryontischer und mitochondrialer Ribosomen sowie deren funktioneller Komplexe. Da diese Ribosomen und Komplexe deutlich komplizierter aufgebaut sind als in Bakterien und es schwieriger ist, sie in reiner und stabiler Form biochemisch zu isolieren, können sie erst seit Kurzem mittels strukturblogischer Methoden im nötigen Detail untersucht werden. Dies wurde erst möglich mit der Entwicklung neuer Elektronenmikroskope sowie immer leistungsstärkerer Computertechnologie zur Strukturbestimmung. Dieser technische Fortschritt bietet spannende neue Ansätze, um bisher schwer fassbare dynamische zelluläre Prozesse während der Translation und beim Zusammenbau der ribosomalen Maschinerie zu untersuchen.

### Verdankung

Ich danke dem Schweizerischen Nationalfonds (SNF), dem Nationalen Forschungsschwerpunkt (NFS) Strukturblogie, dem NFS RNA & Disease und dem «European Research Council» für die langjährige grosszügige Unterstützung. Ausserdem danke ich Dr. Marc Leibundgut und Dr. Daniel Boehringer, Institut für Molekularbiologie und Biophysik, The Ban Lab, ETH Zürich, für die Mithilfe beim Verfassen dieses Textes und der Illustrationen.

### Disclosure statement

NB reports grants from Swiss National Science Foundation, grants from European Research Foundation, during the conduct of the study. In addition, Dr. Ban has patents (US Patent 7,504,486; US Patent 6,952,650; US Patent 6,947,845; US Patent 6,947,844, and US Patent 6,939,848, all with royalties paid to Rib-X) on using the prokaryotic ribosomal structure for development of antibiotics.

### Literatur

Die vollständige Literaturliste finden Sie in der Online-Version des Artikels unter <https://doi.org/10.4414/smfm.2018.03429>.

Korrespondenz:  
Prof. Dr. Nenad Ban  
Institut für Molekular-  
biologie und Biophysik  
Eidgenössische Technische  
Hochschule (ETH) Zürich  
Otto-Stern-Weg 5  
CH-8093 Zürich  
[ban\[at\]mol.biol.ethz.ch](mailto:ban[at]mol.biol.ethz.ch)