

Strukturelle Grundlage der Regulation der 2'-O-Methylierung ribosomaler RNA**

Martin Hengesbach und Harald Schwalbe*

Kleinwinkelneutronenbeugung · 2'-O-Methylierung ·
NMR-Spektroskopie · Ribosomenbiogenese ·
RNA-Modifizierung

Ribosomen gehören zu den komplexesten makromolekularen Maschinerien der Zelle. Sie katalysieren die Bildung von Peptidbindungen und ermöglichen die zelluläre Proteinbiosynthese. In Eukaryonten bestehen sie aus 4 RNAs und etwa 80 Proteinen, gehören also zu den Ribonucleoproteinen (RNPs); hinzu kommen zahlreiche weitere Proteine wie Initiations-, Elongations- und Recyclingfaktoren, die die Funktion der Ribosomen sicherstellen.^[1] Die Regulierung der Biogenese von Ribosomen ist eine unabdingbare Voraussetzung für die zelluläre Homöostase. Der komplexe Aufbau und die große Zahl einzelner Komponenten entlang des Rückgrats der ribosomalen RNA (rRNA) machen die geordnete Biogenese von Ribosomen jedoch zu einem schwierigen Unterfangen.

Interessanterweise wird die rRNA nach der Transkription stark modifiziert. Während dieser Reifung wird sie gespalten und auf ihre korrekte Länge gekürzt.^[2] Darüber hinaus, und das steht nicht in allen Lehrbüchern, wird sie auch gezielt posttranskriptionell modifiziert (Abbildung 1). Die häufigsten dieser rund hundert verschiedenen Modifizierungen sind Methylierungen und Pseudouridin-Modifizierungen,^[3] die – wie auch die vor kurzem entdeckten DNA-Modifizierungen –

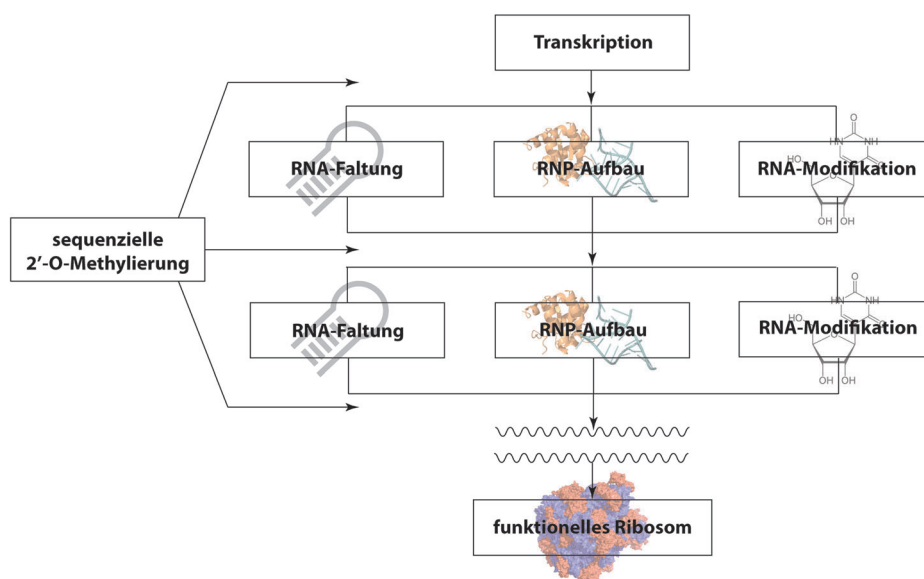


Abbildung 1. Zwischen der Transkription und dem Einbau in das funktionelle Ribosom wird die rRNA in einer Vielzahl von Schritten gefaltet und assembliert. Jeder dieser Schritte kann grundsätzlich durch die sequenzielle 2'-O-Methylierung beeinflusst werden.

als eine weitere Ebene des zellulären Informationsaustauschs angesehen werden können.

Die RNA-vermittelte RNA-Modifizierung zur Reifung der rRNA ist ein essenzieller Schritt in der eukaryontischen Ribosomenbiogenese. Ein Beispiel hierfür ist die *S*-Adenosylmethionin(SAM)-abhängige Methylierung der 2'-Hydroxygruppe von RNA-Nucleotiden durch den Box-C/D-RNP-Komplex in Eukaryonten. Dieser Komplex dient als molekulare Plattform zur Erkennung des Substrats und zur Katalyse der chemischen Modifizierung.^[4] Hierfür wird eine kleine nucleoläre RNA (snoRNA) benötigt, die zwei augenscheinlich unabhängige „Guide“-Sequenzen (D und D') enthält. Diese geben durch Bildung kanonischer Watson-Crick-Basenpaarung vor, welche Sequenz die Substrat-RNA aufweisen muss. In Archaeen bilden zusätzlich zur RNA drei Proteine, L7Ae, Nop5 und die Methyltransferase Fibrillarin, den Kern dieses Komplexes.

Trotz zahlreicher Versuche, die Struktur dieses Komplexes zu bestimmen,^[5] gibt es bis dato keine verlässlichen Aussagen über die genaue Orientierung der Untereinheiten

[*] Dr. M. Hengesbach, Prof. Dr. H. Schwalbe
Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie
Biomolekulares Magnetresonanz-Zentrum (BMZ)
Goethe-Universität Frankfurt
Max-von-Laue-Straße 7, 60438 Frankfurt am Main (Deutschland)
E-Mail: schwalbe@nmr.uni-frankfurt.de

[**] H.S. und M.H. werden durch die DFG (SFB902) unterstützt. H.S. ist Mitglied im DFG-geförderten Exzellenzcluster „Makromolekulare Komplexe“. Das BMZ wird vom Land Hessen gefördert.

oder deren Stöchiometrie im Komplex. Tatsächlich war die Datenlage strittig, und Ergebnisse schienen von der Analysemethode, der Art der Guide-RNA und der An- oder Abwesenheit der Substrat-RNA abhängig zu sein.

Um genau diese Fragen anzugehen, kombinierte die Gruppe um Teresa Carlomagno zwei strukturblogische Methoden: NMR-Spektroskopie sowie Kleinwinkelröntgen- und -neutronenstreuung (SAXS bzw. SANS).^[6] Mithilfe der atomar aufgelösten Strukturdaten aus verschiedenen NMR-Experimenten und der Informationen über Größe und Form des Komplexes aus den SAXS- und SANS-Messungen stellten sie ein Strukturmodell des fast nativen Box-C/D-RNP-Komplexes aus *Pyrococcus furiosus* vor, sowohl im Apo- wie im Holo-Zustand (Abbildung 2).^[7]

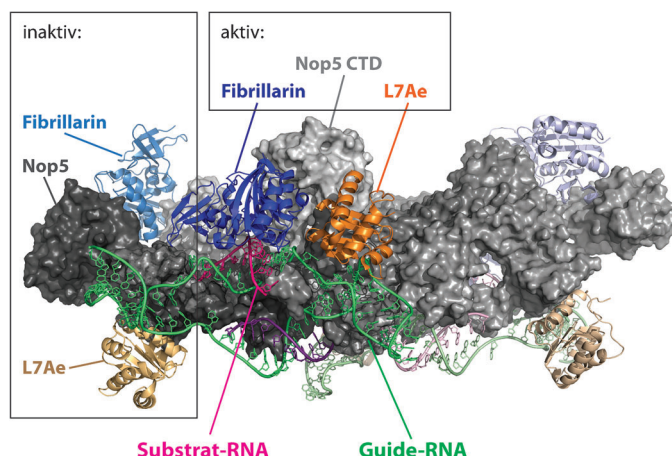


Abbildung 2. Struktur des Holo-Komplexes des Box-C/D-RNP. Die aktiven Untereinheiten sind an den RNA-Protein-Wechselwirkungen beteiligt, wohingegen die inaktiven Teile die Substrat-RNA nicht erreichen können.

Je nach Strukturmodell und Bindungsstöchiometrie beträgt die Molmasse dieses Komplexes zwischen 250 und 500 kDa; daher ist die Rekonstitution eine große technische Herausforderung. Bei minimalen Änderungen an der RNA und den Proteinuntereinheiten konnte ein Komplex rekonstituiert werden, der aus einer RNA (sR26) und drei rekombinant exprimierten Proteinen besteht. Untersuchungen mittels Größenausschlusschromatographie (SEC), Gelelektrophorese und SAXS gaben erste Hinweise auf die Zusammensetzung des Komplexes: Der Trägheitsradius und die Molmasse (390 kDa) deuten darauf hin, dass es sich um einen Di-RNP handelt, der Komplex also aus vier Proteintrimeren und zwei Guide-RNAs besteht.

Zwischen den hochaufgelösten Daten einzelner Kristallstrukturen, die bisher bekannt waren, und der globalen Struktur eines asymmetrischen Komplexes aus 14 Untereinheiten klafft jedoch eine große Lücke. Einblicke in die genaue Positionierung der Untereinheiten gab dann eine Kombination aus zwei NMR-Methoden: Zunächst wurden Proteine individuell mit den Aminosäuren $^{13}\text{CH}_3$ -Ile, $^{13}\text{CH}_3$ -Leu und $^{13}\text{CH}_3$ -Val markiert und die Auswirkungen auf die induzierten chemischen Verschiebungen der Teilkomplexe verglichen.^[8]

Informationen über größere räumliche Entfernungen hinweg lieferten danach mit TEMPO-Spin-Markierungen (TEMPO = Tetramethylpiperidinoxyl) versehene Komplexe anhand der paramagnetischen Relaxationsverstärkung (PRE).^[9] Während SAXS globale Strukturdaten über gesamte Komplexe liefert, gibt SANS diese Daten über Untereinheiten innerhalb des Komplexes. Voraussetzung dafür ist, dass diese Untereinheiten selektiv deuteriert sind. In der vorgestellten Arbeit wurden so weitere Informationen über die Struktur und die Stöchiometrie der Untereinheiten gesammelt. Zusammengenommen erlaubten es all diese Daten, mithilfe von Strukturberechnungs-Software eine Modellstruktur zu generieren, die eine in Anbetracht der Größe des Komplexes beeindruckende Auflösung von 4.8 Å aufweist (Abbildung 2).

Dieses Modell verbindet zum ersten Mal bereits bekannte Einzelergebnisse. So war postuliert worden, dass die „Coiled-Coil“-Struktur von Nop5 eine Plattform für die Wechselwirkungen innerhalb der RNP-Untereinheiten bildet.^[5a] Die Carlomagno-Gruppe zeigte nun, dass es keine unmittelbare Zuordnung zwischen den Proteintrimeren und der jeweiligen Substrat-RNA gibt, sondern die einzelnen Komplextile unterschiedlich dazu beitragen, die Methyltransferase relativ zur Substrat-RNA korrekt zu positionieren. Die Art, wie die Fibrillarin-Untereinheiten von der C-terminalen Domäne von Nop5 auf der einen und L7Ae auf der anderen Seite in die Zange genommen werden, ist nur in exakt dieser tetrameren Anordnung überhaupt möglich.

Was sagt nun dieses sehr detailreiche Strukturmodell über die Funktion des Komplexes aus? Überraschenderweise ist im Apo-Komplex keines der vier aktiven Methyltransferase-Zentren in der Nähe der Substrat-RNA positioniert. Weiterhin zeigt die Struktur, dass immer nur jeweils die zwei diagonal gegenüberliegenden Fibrillarine gleichzeitig aktiv sein können. Diese aus der Struktur abgeleitete These konnte durch Zutitrieren der Substrat-RNA bestätigt werden, was zeigt, dass nur zwei und nicht vier Fibrillarine mit der Substrat-RNA interagieren. Damit können stets nur zwei der vier Substrat-RNAs, also entweder D oder D', innerhalb eines Holo-Komplexes gleichzeitig methyliert werden. Da diese Sequenzen jedoch asymmetrisch sind, stellt sich die Frage, ob die Methylierungen sequenziell erfolgen.

Mit ^{13}C -markiertem SAM als Methylgruppendonor wurde ^{13}C -methylierte D'-RNA erhalten, was dafür spricht, dass D'-Substrate auch ohne vorliegendes D-Substrat zumindest teilweise methyliert werden. D-Substrate hingegen werden nur methyliert, wenn gleichzeitig auch D'-Substrat vorliegt, das dann zudem besser methyliert wird. Die Autoren folgern hieraus, dass D-Substrate erst nach der Methylierung von D'-Substraten methyliert werden. Diese strikt sequenzielle Modifizierung bietet eine interessante Möglichkeit, eine solche RNA-Modifizierung zu regulieren. Es wird abzuwarten sein, ob dieser Mechanismus eine funktionelle Bedeutung in der Reifung von rRNA hat. Eine hypothetische Möglichkeit wäre, dass die sequenzielle Methylierung nicht nur die Reihenfolge beeinflusst, in der sich Strukturelemente der rRNA bilden, sondern auch zur zellulären Qualitätskontrolle dient. Es wird auch interessant sein zu sehen, wie die dynamische

Struktur des Holo-Komplexes den sequenziellen Modifizierungen folgt.

Die Arbeit der Carlomagno-Gruppe ist ein beeindruckendes Beispiel, wie sich Methoden verbinden lassen, mit denen unterschiedliche, aber überlappende Strukturgrößenbereiche analysiert und daraus hochaufgelöste Strukturdaten von großen makromolekularen Komplexen abgeleitet werden können. Diese Studie ist außerdem eine der ersten, die – auf der Basis detaillierter Strukturdaten – zeigt, wie RNA-Modifizierungen reguliert werden können.

Eingegangen am 5. November 2013

Online veröffentlicht am 13. Januar 2014

-
- [1] L. Jenner, S. Melnikov, N. Garreau de Loubresse, A. Ben-Shem, M. Iskakova, A. Urzhumtsev, A. Meskauskas, J. Dinman, G. Yusupova, M. Yusupov, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2012**, 22, 759–767.
- [2] S. Granneman, S. J. Baserga, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2005**, 17, 281–286.
- [3] M. A. Machnicka, K. Milanowska, O. Osman Oglou, E. Purta, M. Kurkowska, A. Olchowik, W. Januszewski, S. Kalinowski, S. Dunin-Horkawicz, K. M. Rother, M. Helm, J. M. Bujnicki, H. Grosjean, *Nucleic Acids Res.* **2013**, 41, D262–267.
- [4] N. J. Watkins, M. T. Bohnsack, *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **2012**, 3, 397–414.
- [5] a) J. Lin, S. Lai, R. Jia, A. Xu, L. Zhang, J. Lu, K. Ye, *Nature* **2011**, 469, 559–563; b) S. Xue, R. Wang, F. Yang, R. M. Terns, M. P. Terns, X. Zhang, E. S. Maxwell, H. Li, *Mol. Cell* **2010**, 39, 939–949; c) K. Ye, R. Jia, J. Lin, M. Ju, J. Peng, A. Xu, L. Zhang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, 106, 13808–13813.
- [6] M. Falb, I. Amata, F. Gabel, B. Simon, T. Carlomagno, *Nucleic Acids Res.* **2010**, 38, 6274–6285.
- [7] A. Lapinaite, B. Simon, L. Skjaerven, M. Rakwalska-Bange, F. Gabel, T. Carlomagno, *Nature* **2013**, 502, 519–523.
- [8] V. Tugarinov, L. E. Kay, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 13868–13878.
- [9] J. L. Battiste, G. Wagner, *Biochemistry* **2000**, 39, 5355–5365.
-