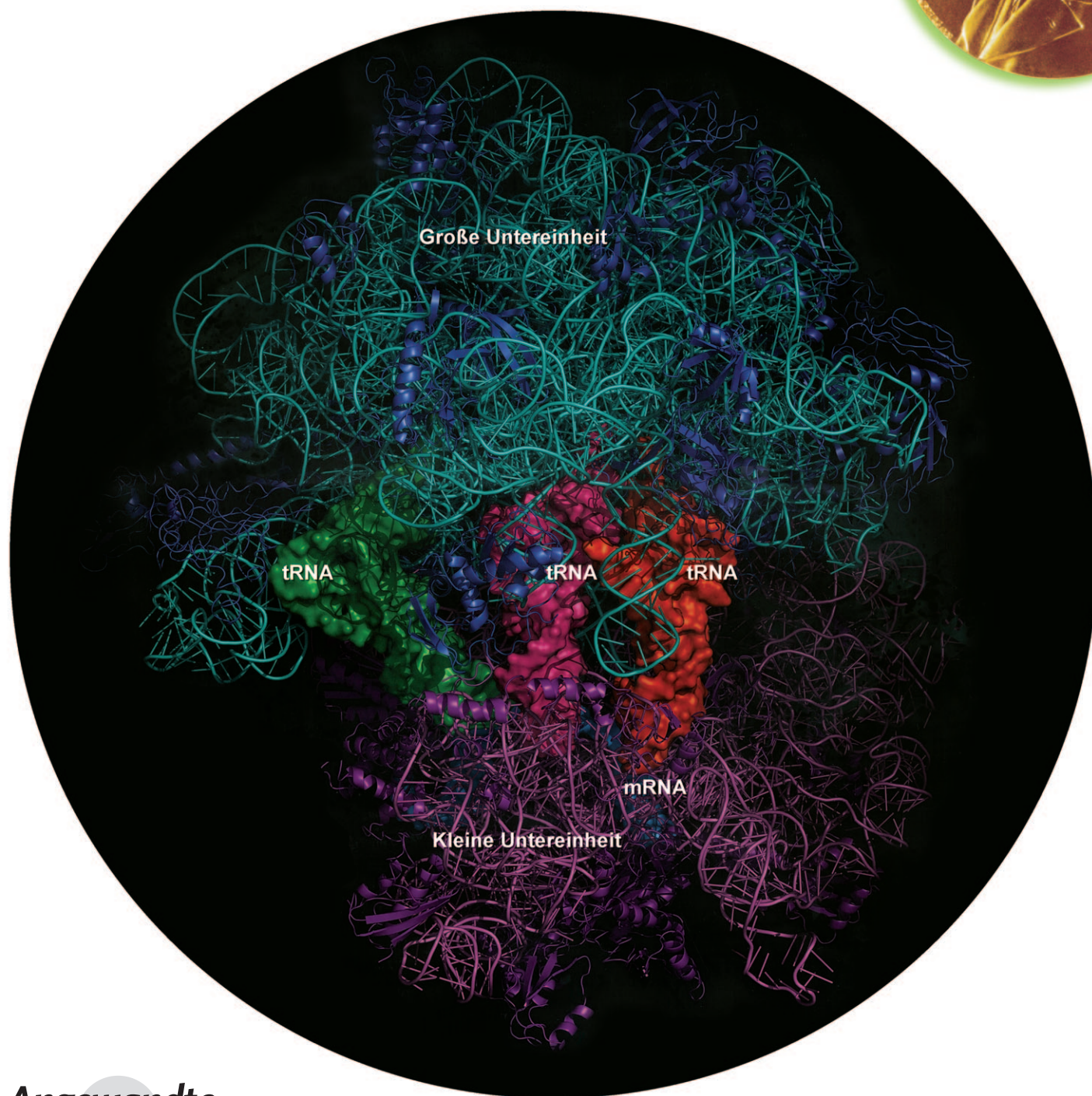
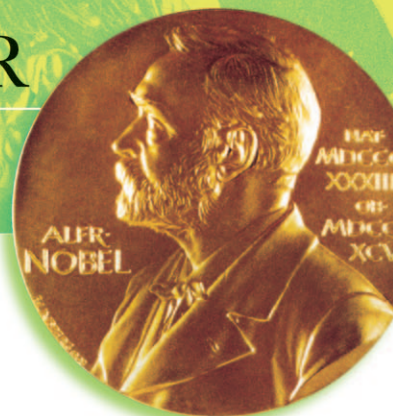


DER NOBELPREIS FÜR CHEMIE 2009



Nobel-Vorträge

Winterschlafende Bären, Antibiotika und die Evolution des Ribosoms (Nobel-Aufsatz)**

Ada Yonath*

Antibiotika · Nobel-Vortrag · Proteinsynthese · Ribosomen

Dank der hochaufgelösten Strukturen von Ribosomen, den zellulären Maschinen, die den genetischen Code in Proteine übersetzen, konnten zahlreiche ribosomale Aktivitäten und Strukturdetails aufgedeckt und erklärt werden: der Mechanismus der DNA-Decodierung, der Prozessierungspfad der mRNA, die Bindungsstellen der tRNA im Ribosom, die Position und Eigenschaften des ribosomalen Austrittstunnels der naszierenden Proteine und die Wechselwirkungen des Ribosoms mit nicht-ribosomalen Faktoren wie den Initiations-, Freisetzungs- und Recyclingfaktoren. Vor allem haben diese Strukturen den Beweis erbracht, dass das Ribosom ein Ribozym ist, dessen aktives Zentrum – d. h. die Stelle, an der die Bildung der Peptidbindungen erfolgt – in einer symmetrischen Region liegt, die in die ansonsten unsymmetrische Ribosomstruktur eingebettet ist. Diese symmetrische Region ist hoch konserviert und enthält bereits alle Komponenten, die für die Bildung der Peptidbindungen und die Polymeraseaktivität des Ribosoms erforderlich sind. Sie könnte daher das Relikt eines Protoribosoms sein, einer dimeren präbiotischen Funktionseinheit, die Peptidbindungen und uncodierte Polypeptidketten bildete. Strukturen von Ribosom-Antibiotika-Komplexen haben die Grundlagen für eine klinische Verwendung dieser Antibiotika geschaffen, Resistenzmechanismen aufgedeckt und Aufschluss darüber gegeben, wie Antibiotika zwischen pathogenen Bakterien und Wirtszellen differenzieren. Damit haben diese Forschungen wertvolle Strukturinformationen für die Verbesserung von Antibiotika und den Entwurf neuartiger Verbindungen, die als Antibiotika dienen könnten, geliefert.

1. Einführung

Der Körper eines Erwachsenen besteht aus ungefähr 10^{14} Zellen. Es gibt ganz beträchtliche Unterschiede was die Zahl der Proteine betrifft, die man in den Zellen verschiedener Säugetiere findet. In typischen eukaryotischen Zellen gibt es über 7000 unterschiedliche Arten von Proteinen; die Gesamtzahl hängt von der Klasse und Funktion der Zelle ab. Leberzellen enthalten bis zu 10 000 unterschiedliche Proteine, deren Häufigkeit weit auseinandergeht: von 20 000 Molekülen der relativ seltenen insulinbindenden Proteine bis hin zum Strukturprotein Aktin, das in Mengen von bis zu 5 Milliarden

Kopien vorkommt. Proteine (Polypeptide) sind aus Aminosäuren aufgebaut, die eine lineare Kette bilden, die sich, je nach Abfolge der Aminosäuren, zu globulären oder fibrillären Formen faltet. Die Aminosäuresequenz eines Proteins wird durch die Sequenz eines Gens festgelegt, das im genetischen Code verschlüsselt ist.

Proteine werden ständig abgebaut und müssen deshalb auch ständig nachproduziert werden. Die Übersetzung

Aus dem Inhalt

1. Einführung	4439
2. Die ersten Schritte: Inspiration durch winterschlafende Bären	4442
3. Wechselwirkung von Antibiotika mit Ribosomen	4444
4. Das Ribosom ist eine Polymerase	4445
5. Beweglichkeit und Bewegungen innerhalb des Peptidyltransferasezentrums	4446
6. Der Ribosomenkern ist ein optimiertes Rudiment einer altertümlichen Struktur	4447
7. Resümee und Ausblick	4449

Kopien vorkommt. Proteine (Polypeptide) sind aus Aminosäuren aufgebaut, die eine lineare Kette bilden, die sich, je nach Abfolge der Aminosäuren, zu globulären oder fibrillären Formen faltet. Die Aminosäuresequenz eines Proteins wird durch die

[*] Prof. Dr. A. Yonath
Department of Structural Biology
Weizmann Institute, 76100 Rehovot (Israel)
E-Mail: ada.yonath@weizmann.ac.il

[**] Copyright© The Nobel Foundation 2009. Wir danken der Nobel-Stiftung, Stockholm, für die Genehmigung zum Abdruck einer deutschen Fassung des Aufsatzes.

(Translation) des genetischen Codes zur Bildung von Proteinen wird durch einen komplexen Apparat bestehend aus dem Ribosom, der Boten-RNA (mRNA; messenger RNA), Transfer-RNAs (tRNAs) und zusätzlichen Proteinfaktoren bewerkstelligt. Das Ribosom, ein universeller dynamischer zellulärer Ribonukleoproteinkomplex, ist die zentrale Komponente in diesem Prozess, und typische Säugetierzellen können über eine Million Ribosomen enthalten. Selbst Bakterienzellen enthalten etwa 100 000 Ribosomen. Viele Ribosomen arbeiten gleichzeitig entlang der mRNA und bilden Überstrukturen, die als Polysomen bezeichnet werden. Die Ribosomen wirken als Polymerasen; sie synthetisieren ein Protein, indem sie Aminosäuren eine nach der anderen an die wachsende Peptidkette anfügen und dabei an der mRNA-Matrize entlangwandern. Ribosomen produzieren Proteine mit einer unglaublichen Geschwindigkeit von 15 Peptidbindungen pro Sekunde.

Ribosomen sind riesige Aggregate, bestehend aus vielen verschiedenen Proteinen (r-Proteine) und langen ribosomalen RNA-Ketten (rRNA). Das Verhältnis von rRNA zu r-Proteinen (ca. 2:1) ist bei praktisch allen Lebewesen gleich, mit der Ausnahme des mitochondrialen Ribosoms in Säugetieren, bei dem fast die Hälfte der bakteriellen rRNA durch r-

Proteine ersetzt ist. Alle Ribosomen bestehen aus zwei Untereinheiten. Bei Prokaryoten besteht die kleine Untereinheit (bezeichnet als 30S) aus einer 1500 Nukleotide langen RNA-Kette (16S) und 20 oder 21 unterschiedlichen Proteinen, während die große Untereinheit (50S) zwei RNA-Ketten (23S- und 5S-RNA) mit insgesamt 3000 Nukleotiden sowie 31 bis 35 unterschiedliche Proteine aufweist. Die beiden Untereinheiten existieren unabhängig voneinander und lagern sich zu den funktionell aktiven Ribosomen zusammen. Die ribosomalen Proteine sind mit der komplexen rRNA-Konformation zu einer verblüffenden dynamischen Architektur verschlungen, die für die Aufgaben des Ribosoms – präzise Decodierung, substratvermittelte Bildung von Peptidbindungen und effiziente Polymeraseaktivität – perfekt geschaffen ist.

Weitere Komponenten sind die mRNA, die den genetischen Code trägt, und tRNA-Moleküle, die kognate Aminosäuren zum Ribosom transferieren. Die dreidimensionalen Strukturen der tRNA-Moleküle sind in allen Organismen und Zellen sehr ähnlich, obwohl jede tRNA für „ihre“ Aminosäure spezifisch ist (Abbildung 1). Sie sind hauptsächlich aus doppelhelicalen L-förmigen Molekülen in Form eines gebeugten Arms aufgebaut und enthalten eine Schleife, die zu den Nukleotid-Triplets auf der mRNA komplementär ist. Rund 70 Å von der Schleife entfernt (am 3'-Ende) befindet sich ein Einzelstrang mit der universellen Sequenz CCA (C Cytosin, A Adenin), an die die kognate Aminosäure über eine Esterbindung geknüpft wird. Die tRNA-Moleküle haben auf beiden Untereinheiten gemeinsame Bindungsstellen, die man als A- (Aminoacyl), P- (Peptidyl) und E-Stelle (Exit) bezeichnet (Abbildung 1). In den A- und P-Stellen wechselwirken die Anticodon-Schleifen der tRNA mit der mRNA. Der Akzeptor-Stamm mit dem aminoacylierten oder peptidylierten 3'-Ende ist auf der großen Untereinheit lokalisiert.

Beim Aufbau der Peptidkette arbeiten die beiden Untereinheiten kooperativ zusammen. Die kleine Untereinheit stellt den Mechanismus für die Kontrolle der Translationsgenauigkeit bereit. Die große Untereinheit enthält das ribosomale katalytische Zentrum für die Polymerisation der Aminosäuren sowie den Austrittstunnel des Proteins (Abbildung 2). Eine höhere Effizienz wird dadurch erzielt, dass eine große Zahl von Ribosomen simultan zusammenarbeitet. Die Ribosomen agieren als Polymerasen, indem sie eine Aminosäure nach der anderen an die wachsende Peptidkette anfügen und dabei an der mRNA-Matrize entlangwandern.

Das Ribosom stellt den strukturellen Rahmen für die richtige Positionierung aller an der Peptidsynthese beteiligten Spezies bereit. Es sorgt für die Decodierung der genetischen Information, die sukzessive Bildung der Peptidbindungen und den Schutz der naszierenden Proteinketten. Seit der Jahrtausendwende wurden mehrere dreidimensionale Strukturen des Ribosoms gelöst, sodass viele der beteiligten Mechanismen gut verstanden sind, einschließlich des Decodierungsmechanismus (siehe Übersicht in Lit. [1]), der mRNA-Progression,^[2] der Positionierung der A-, P- und E-tRNAs,^[3] der Wirkung der Initiations-,^[4,5] Freisetzungs-^[6,7] und Recyclingfaktoren,^[8,9] der Bildung der Peptidbindungen und der Funktion der für die Aminosäurepolymerisation zuständigen Komponenten.^[10,11]



Ada Yonath wurde in Jerusalem (Israel) geboren. Sie studierte an der Hebrew University, promovierte am Weizmann Institute of Science (WIS) und absolvierte ein Postdoktorat am Massachusetts Institute of Technology (USA). Ihre Forschungen gelten den strukturellen Grundlagen der Proteinbiosynthese und deren Inhibierung durch Antibiotika oder ähnliche Verbindungen, einschließlich den Mechanismen der Resistenzentwicklung und der Diskriminierung von Antibiotika zwischen Pathogenen und Eukaryoten.

Für ihre Studien – mit dem Schwerpunkt auf Untersuchungen des Ribosoms – nutzt sie die Röntgenkristallographie in Verbindung mit molekularbiologischen Methoden, Mutagenesetechniken und anderen biophysikalischen Methoden. In diesem Zusammenhang gründete sie im Jahr 1970 das erste Laboratorium für Proteinkristallographie in Israel, das für mehr als ein Jahrzehnt die einzige Einrichtung dieser Art im Land bleiben sollte.

Gegenwärtig ist sie Professorin für Strukturbiochemie am WIS, Inhaberin des Kimmel Professorial-Lehrstuhls und Direktorin des Kimmelman Center for Biomolecular Structure and Assembly. Zwischen 1986 und 2004 war sie Leiterin der Max-Planck-Forschungsstelle in Hamburg.

Sie ist Mitglied der US National Academy of Sciences (NAS), der American Academy of Arts and Sciences, der Israel Academy of Sciences and Humanities, der European Academy of Sciences and Art, der European Molecular Biology Organization und der International Academy of Astronautics. Sie ist Ehrendoktor der Universität von Tel Aviv, der Ben Gurion-Universität und der Oxford University.

Zu ihren Auszeichnungen gehören der 1st European Crystallography Prize (2000), der Israel Prize (2002), der Harvey Prize (2002), die Cotton Medal der ACS (2002), der Anfinsen Prize of the Protein Society (USA, 2003), der Massry Award (USA, 2004), die Paul-Karrer-Medaille in Gold (Zürich, 2004), der Louisa Gross Horwitz Prize der Columbia University (2005), der EMET-Preis (2006), der Paul-Ehrlich-und-Ludwig-Darmstaedter-Preis (2007), der Wolf Prize (2007), der UNESCO Award for Women in Science Prize (2008), die Palade-Medaille in Gold (2008), der Albert Einstein World Award of Science (2008), der Erice Science for Peace Prize (Rom, 2009) und der Nobelpreis für Chemie (Stockholm, 2009).

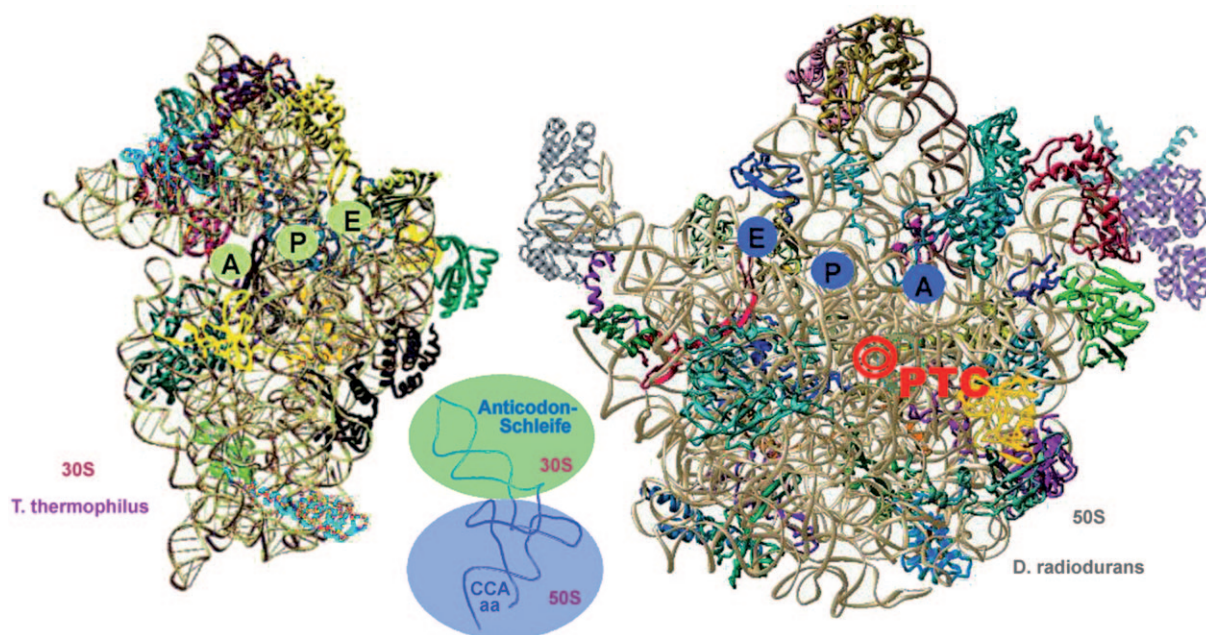


Abbildung 1. Dreidimensionale Strukturen der ribosomalen Untereinheiten in Eubakterien mit einem dazwischen befindlichen tRNA-Molekül als Substrat. Gezeigt sind die Schnittstellen der 30S-Untereinheit von *T. thermophilus* und der 50S-Untereinheit von *D. radiodurans* in 3 Å Auflösung. Die rRNA ist in Brauntönen dargestellt; jedes der r-Proteine hat eine eigene Farbe. Man beachte, dass die Schnittstellen RNA-reiche Regionen sind. Einschub: tRNA-Molekül; die Kreise kennzeichnen die mit den angegebenen Untereinheiten wechselwirkenden Regionen. Die ungefähre Lage des Peptidyltransferasezentrums (PTC) ist angegeben.

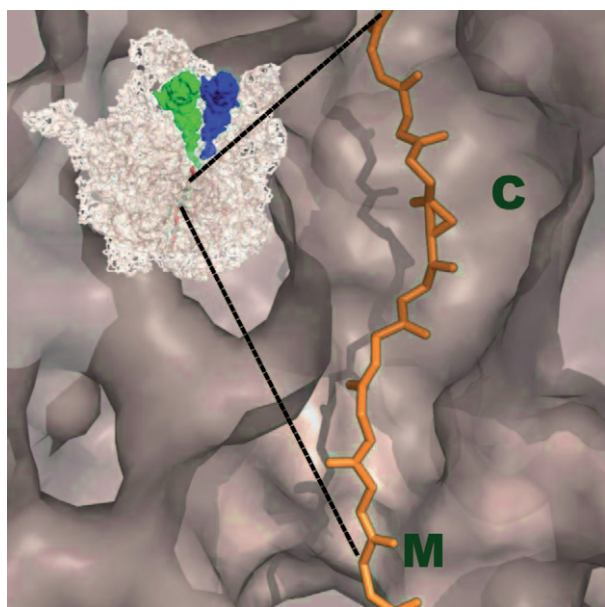


Abbildung 2. Vergrößerter Ausschnitt des oberen Endes des eubakteriellen ribosomalen Tunnels mit hineingerechneter Polyalaninkette (orange). C bezeichnet eine Spalte („crevice“), in der die anfängliche cotranslationale Faltung stattfinden könnte; M ist die Bindetasche für die Bindung von Macrolid-Antibiotika, die den Tunnel verengen. Einschub oben links: vollständige große Untereinheit mit den A- und P-tRNAs (blau bzw. grün).

Die Beteiligung von RNA-reichen Partikeln an der Genexpression wurde schon vor über 50 Jahren vorgeschlagen. Man sprach damals von „Palade-Partikeln“, die in RNA-

reichen Regionen in enger Verbindung mit der Membran des endoplasmatischen Retikulums eingebettet sein sollten^[12,13] – in Einklang mit der Vorstellung, dass das Ribosom eine evolutionäre Vorstufe hatte, die ausschließlich aus RNA aufgebaut war.^[14] Die Lokalisierung des zellulären Translationszentrums und die anschließende intensive biochemische Forschung erbrachten recht klare Erkenntnisse über die Funktion des Ribosoms. Details blieben in Anbetracht fehlender dreidimensionaler Strukturen jedoch verborgen. Nicht wenige Hypothesen wurden später deutlich revidiert, sobald solche Strukturen verfügbar waren. Beispiele für Konzepte, die in späteren Arbeiten umgewälzt wurden (siehe Übersicht in Lit. [15]), betreffen den funktionellen Beitrag der verschiedenen ribosomalen Komponenten und den Biosynthesepfad der naszierenden Peptidketten. Ursprünglich wurde angenommen, dass die Entschlüsselung des genetischen Codes und die Bildung der Peptidbindungen durch r-Proteine bewerkstelligt wird und die rRNA das Strukturgerüst des Ribosoms bereitstellt.^[16] Diese Annahme wurde skeptisch betrachtet,^[17] zumal damals immer mehr Hinweise aufkamen, dass RNA-Moleküle bei verschiedenen biologischen Vorgängen eine wichtige Rolle spielen. Zehn Jahre später hatte es sich als richtig erwiesen, das Augenmerk von den r-Proteinen hin auf die rRNA zu richten, denn die nun verfügbaren, hochaufgelösten Strukturen zeigten, dass sowohl das Decodierungs- als auch das Peptidbildungszentrum (das Peptidyltransferasezentrum, PTC) in einer rRNA-reichen Umgebung liegen.

Eine andere Annahme war, dass ein naszierendes Protein bis zu seiner Reifung auf der Oberfläche des Ribosoms gebunden bleibt. Selbst nachdem biochemische Experimente

Hinweise geliefert hatten, dass die naszierende Peptidkette durch das Ribosom geschützt wird^[18,19] und man diesen Austrittstunnel durch elektronenmikroskopische Rekonstruktion von 2D-Schichten bei relativ niedriger Auflösung (60 und 25 Å) sichtbar gemacht hatte,^[20,21] wurden öffentlich Zweifel angemeldet.^[22] Des Weiteren wiesen Experimente darauf hin, dass die naszierenden Proteine während ihres Wachstums keinem Abbau unterliegen, weil sie die Konformation einer α -Helix einnehmen, sobald die erste Peptidbindung gebildet wird.^[23] Tatsächlich wurde die bloße Existenz des ribosomalen Tunnels über einen langen Zeitraum angezweifelt (fast noch ein Jahrzehnt lang seit der erstmaligen Visualisierung), bis dann schließlich durch Kryoelektronenmikroskopie der endgültige Beweis erbracht wurde.^[24,25] Bemerkenswerterweise wurde dem Tunnel, als man ihn erstmals in hochaufgelösten Kristallstrukturen beobachtete, ein „Teflon-artiger“ Charakter zugeschrieben – d.h. ohne chemische Gruppierungen, die seine Wechselwirkung mit den naszierenden Peptidketten ermöglichen würden^[26,27] –, obwohl diese Beschreibung früheren Beobachtungen widersprach (z.B. Lit. [28–30]). Später zeigten weitere Ergebnisse biochemischer, mikroskopischer und computergestützter Experimente klar auf, dass dieser Tunnel aktiv am Aufbau, der Arretierung und der zellulären Signalgebung der naszierenden Peptidketten teilnimmt (z.B. Lit. [31–50]) und dass die Proteine in diesem Tunnel voranwachsen und direkt in eine Chaperon-Hülle geschoben werden, die Aggregation und Fehlfaltungen verhindert.^[51,52]

Dieser Aufsatz gibt einen chronologischen Überblick über wichtige Geschehnisse im Bereich der Ribosomenkristallographie und über die zugrunde liegenden technischen Fortschritte, wie die Kryokristallographie und die Verwendung von Schweratomclustern (siehe Übersichten in Lit. [53]). Das Hauptaugenmerk gilt den strukturellen und dynamischen Eigenschaften des Ribosoms und der Wirkung von Antibiotika auf die Ribosomenfunktion. Nicht zuletzt sollen auch Fragen zum evolutionären Ursprung des Ribosoms untersucht werden.

2. Die ersten Schritte: Inspiration durch winterschlafende Bären

Über zwei Jahrzehnte hinweg wurden große Anstrengungen zur Kristallisation ribosomaler Partikel unternommen, die aber alle erfolglos blieben. Die Probleme, die bei den Kristallisationsversuchen auftraten, konnten unmittelbar auf die charakteristischen Eigenschaften des Ribosoms zurückgeführt werden: hohe interne Beweglichkeit und Flexibilität, funktionelle Heterogenität, chemische Komplexität, die schiere Größe, die unsymmetrische Natur und nicht zuletzt die ausgeprägte Zersetzungsneigung der Kristalle. Ein wichtiger Fingerzeig war jedoch die Beobachtung, dass bei Polarbären im Winterschlaf große Mengen von Ribosomen eine geordnete Packung auf der Innenseite der Zellmembran bilden. Dies bedeutete, dass Ribosomen im Prinzip periodische Anordnungen in vivo einnehmen können. Ähnliche Beobachtungen wurden auch an schockgefrosteten befruchteten Eiern gemacht (z.B. Lit. [20]). Das Phänomen

wurde mit Kälte- oder anderen Schockzuständen in Verbindung gebracht, und man stellte die Vermutung auf, dass Organismen auf diese Weise funktionell aktive Ribosomen speichern, wenn sie unter Stressbedingungen stehen, um sie bei Wegfall der Stressbedingungen unmittelbar wieder nutzen zu können. Tatsächlich führten Strukturstudien an Proben aus schockgefrosteten befruchteten Eiern später zur Visualisierung der inneren Struktur von Ribosomen (siehe unten und Lit. [20]).

Der Weg von geordneten membrangestützten zweidimensionalen Monolagen, wie sie in vivo beobachtet wurden, hin zur Züchtung dreidimensionaler Kristalle war nicht leicht, aber gangbar. Als Grundlage betrachtete man den Lebenszyklus von winterschlafenden Bären, die das Packen und Entpacken der Ribosomen jedes Jahr aufs Neue bewerkstelligen. Die Tatsache, dass diese Vorgänge in lebenden Organismen stattfinden, die nach dem Erwachen aus dem Winterschlaf sofort funktionell aktive Ribosomen benötigen, führte zu dem Schluss, dass hoch aktive Ribosomen aus jeder Quelle über einen relativ langen Zeitraum stabil bleiben und somit auch in Form dreidimensionaler Kristalle gezüchtet werden konnten.

Die ersten dreidimensionalen Mikrokristalle (Abbildung 3) von ribosomalen Partikeln wurden Anfang der 80er Jahre mit einer relativ hohen Auflösung von 3.5 Å erhalten.^[54] Bei diesen Experimenten, die einen echten Durchbruch bedeuteten, war man davon ausgegangen, dass die Qualität der Kristalle umso besser sein wird, je homogener die Probe ist, und dass die bevorzugte Konformation diejenige des funktionell aktiven Ribosoms sein musste. Infolgedessen wurden für die Kristallisationsversuche hoch aktive Ribosomen von Bakterienspezies gewählt, die sich unter sehr robusten Bedingungen fortpflanzen. Die Bedingungen, unter denen eine optimale ribosomale Aktivität aufrechterhalten blieb,^[55,56] wurden während der Aufreinigung und Kristallisation durchgehend beibehalten. Parallel dazu wurde die Keimbildung der Kristalle sorgfältig aufgezeichnet,^[57] und man suchte systematisch nach Parametern, die für die Kristallisation förderlich waren.^[58] Die ersten Mikrokristalle wurden von der großen ribosomalen Untereinheit aus *Bacillus stearothermophilus* (B50S) erhalten, einer Quelle, die Anfang der 80er Jahre fast als extremophile Spezies galt. Einige Jahre später wurden Kristalle der großen ribosomalen Untereinheit des extremen halophilen Bakteriums *H. marismortui* aus dem Toten Meer erhalten.^[59] 1987, sieben Jahre nach der erstmaligen Kristallisation von ribosomalen Partikeln, gelang die Herstellung von Kristallen der kleinen ribosomalen Untereinheit^[60] und des gesamten Ribosoms^[61] des extremen thermophilen Bakteriums *Thermus thermophilus*.

Zur damaligen Zeit war die Meinung verbreitet, dass die Struktur des Ribosoms niemals gelöst werden könnte, selbst wenn Kristalle verfügbar wären. Es war klar, dass nicht nur die Qualität der Kristalle verbessert werden musste, sondern auch völlig neue kristallographische Methoden erforderlich waren. In Anbetracht des schwachen Beugungsvermögens der Ribosomenkristalle waren selbst die fortschrittlichsten Anodengeneratoren nicht leistungsfähig genug, um geeignete Beugungsmuster zu liefern, und Synchrotrontechniken befanden sich noch in ihren Anfängen. Mit den verfügbaren

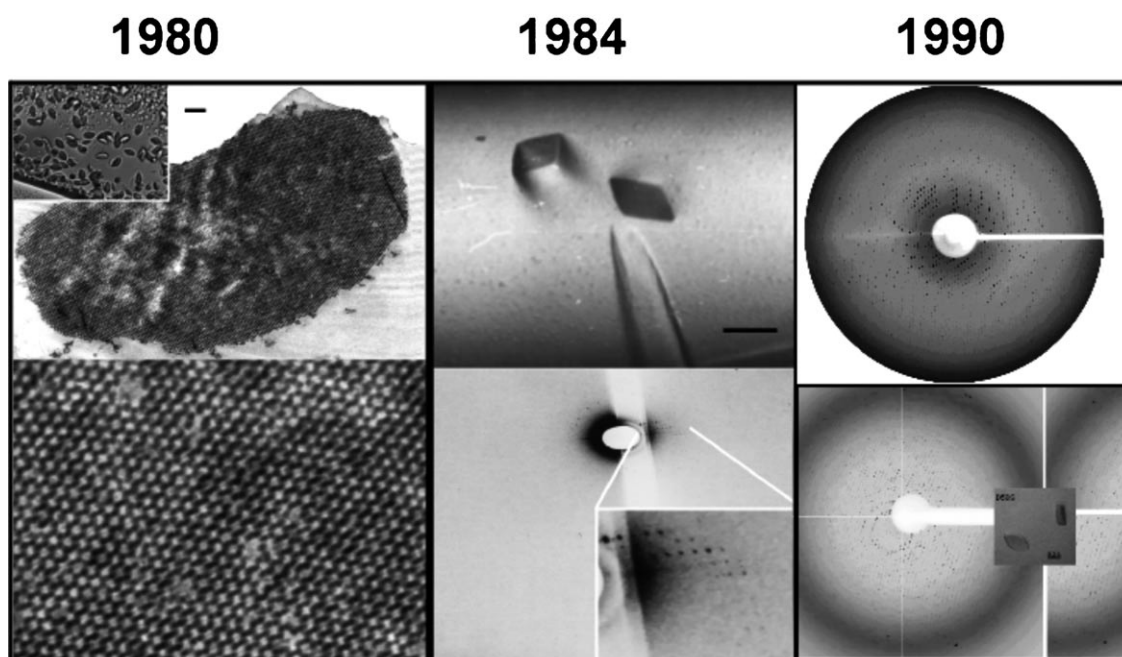


Abbildung 3. Von Mikrokristallen geringer Güte hin zu dreidimensionalen, beugungsfähigen ribosomalen Kristallen. Links: elektronenmikroskopische Aufnahme von Mikrokristallen von B50S aus dem Jahr 1980, einschließlich eines negativ angefärbten Ausschnitts (unten). Skalenbalken 0.01 mm. Mitte: die Spitze eines ca. 2 mm langen Kristalls von B50S mit Beugungsmuster (unten), aufgenommen 1984 bei 4 °C an der EMBL-Beamline am DESY in Hamburg. Skalenbalken 0.3 mm. Rechts: Beugungsmuster von H50S-Kristallen, aufgenommen bei –180 °C an der Beamline ID13 des ESRF. Man beachte, dass die Beugung bis 2.8 Å hinabreicht (oben) und der Kristall, selbst bei Gefrieretemperatur, nach Sammlung von knapp 3 % der Daten zerfallen ist.

Techniken konnten selbst bei Bestrahlung extrem großer Kristalle (von etwa 2 mm Länge) nur einige wenige Beugungspunkte aufgezeichnet werden (Abbildung 3).^[62]

Als später die ersten Synchrotroneinrichtungen zur Verfügung standen, stellte sich heraus, dass die Ribosomenkristalle, die mittlerweile in verschiedensten Formen gezüchtet werden konnten (Abbildung 4), sehr empfindlich gegen Röntgenbestrahlung waren und extrem schnell zerstört wurden. Die Datensammlung wurde daher bei Kryotemperaturen vorgenommen.^[63] Mit dieser Vorgehensweise konnten selbst von extrem dünnen Kristallen gut interpretierbare Beugungsmuster mit hoher Auflösung erhalten werden, wenngleich auch bei diesen tiefen Temperaturen noch eine gewisse Kristallzersetzung zu beobachten war (Abbildung 3).

Neben der Kryotechnik wurde auch die Verwendung von Schweratomclustern eingeführt.^[64] Hierbei zeigte sich, dass einer dieser Cluster, der zunächst nur zur Verstärkung der Phasierung dienen sollte, bei der Strukturbestimmung der kleinen ribosomalen Untereinheit aus *Thermus thermophilus* (T30S) einen weiteren Vorteil erbrachte: Behandelte man den gezüchteten Ribosomenkristall mit den Clustern, so resultierte eine drastische Erhöhung der Auflösung von ursprünglich 7–9 Å auf 3 Å.^[65] Der Effekt wurde darauf zurückgeführt, dass der Cluster die interne Flexibilität des Ribosoms (die es für die Bindung und Progression der mRNA braucht) minimiert.^[66]

In der Folge wurden große Anstrengungen zur Verbesserung der Kristallqualitäten unternommen. Unter anderem wurde der Einfluss der relativen Anteile ein- und zweiwerti-

ger Ionen^[67] auf die Kristalleigenschaften untersucht, und diese Studien brachten enorm verbesserte Kristalle der großen ribosomalen Untereinheit aus *H. marismortui* (H50S) hervor. Auch die Bakterienzüchtung wurde ständig verfeinert.^[68] Eine sorgfältige Studie offenbarte eine bemerkenswerte Korrelation zwischen den Kristallisationsbedingungen und der Qualität der resultierenden Kristalle.^[69] In Elektrendichtekarten wurden flexible Regionen beobachtet, wenn die Kristalle unter annähernd physiologischen Bedingungen gezüchtet wurden,^[70] während die gleichen Regionen hochgradig ungeordnet erschienen, wenn die Kristalle in einer Umgebung weit weg von physiologischen Bedingungen gezüchtet wurden.^[26] Verbesserte Kristalle konnten auch dadurch erhalten werden, dass man Komplexe von Ribosomen mit Substraten, Inhibitoren und/oder Faktoren kristallisierte, die das Ribosom in bevorzugten Orientierungen abfangen können. Tatsächlich zeigten die ersten Kristalle des vollständigen Ribosoms aus *T. thermophilus* (T70S) im Komplex mit mRNA- und tRNA-Molekülen eine relativ niedrige Auflösung.^[71] Die Einführung der Synchrotron-Röntgenstrahlung (hohe Helligkeit und starke Bündelung), von hochentwickelten Detektoren und von kryobiokristallographischen Techniken^[72] führte zu eindrucksvoll verbesserten Auflösungen bei der Kristallographie funktioneller, vollständiger Ribosomenkomplexe.^[2,3,73–75] Darüber hinaus ermöglichten diese Techniken auch Momentaufnahmen von Ribosomen in spezifischen, wenn auch nicht notwendigerweise funktionellen Konformationen.^[76]

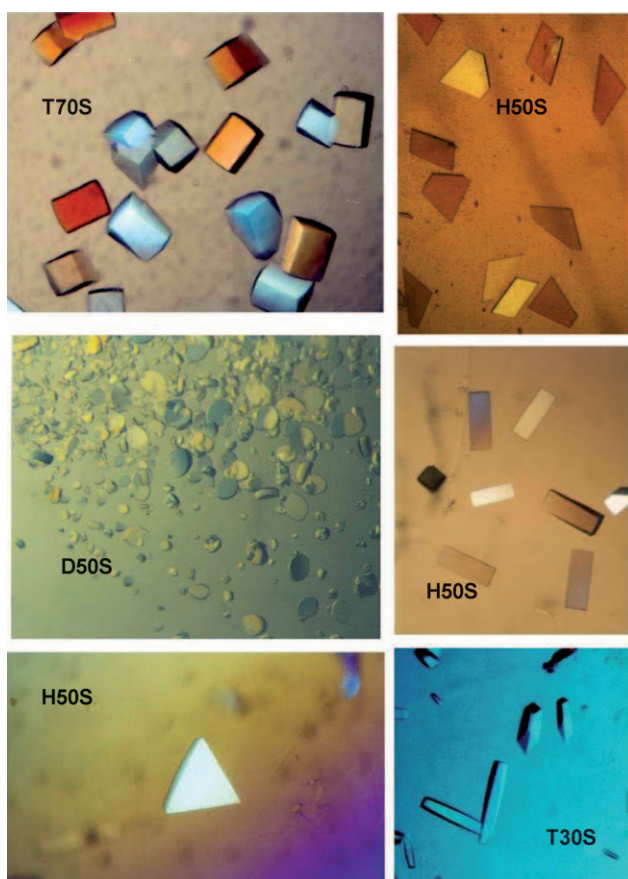


Abbildung 4. Kristallformen ribosomaler Partikel in für Röntgenstrukturanalysen geeigneter Qualität. Die mittlere Größe der Kristalle beträgt zwischen 0.15 und 0.4 nm.

3. Wechselwirkung von Antibiotika mit Ribosomen

Viele der an Ribosomen angreifenden Antibiotika sind klinisch relevant (siehe z.B. die Übersichten in Lit. [43,77–80]). Da es bislang keine Kristalle von Ribosomen aus pathogenen Organismen gibt, geht man normalerweise so vor, dass man die relevanten Strukturinformationen aus eubakteriellen Ribosomen bezieht (von denen Kristalle verfügbar sind) und mithilfe dieser Daten direkt (siehe unten) oder indirekt (z.B. Lit. [81–84]) auf die Wirkungsweise von Antibiotika gegen Pathogene schließt.

Die kristallographischen Analysen haben gezeigt, dass gegen Ribosomen gerichtete Antibiotika diverse Strategien nutzen, die aber allesamt auf einer gemeinsamen Grundlage basieren. So wurde gefunden, dass Antibiotika Ribosomen an spezifischen Stellen innerhalb funktionell relevanter Zentren angreifen, die zumeist ausschließlich aus rRNA-Molekülen aufgebaut sind. Ihre inhibierende Wirkung entwickeln sie über verschiedene Mechanismen, z.B. durch konkurrierende Blockierung der Substratbindung, Störung der ribosomalen Dynamik, Einschränkung der ribosomalen Beweglichkeit, Fehlcodierung, Arretierung der mRNA-Kette und Blockieren des Proteinaustrittstunnels.

Die Identifizierung der verschiedenen Wirkungsweisen von ribosomspezifischen Antibiotika und eine sorgfältige

Analyse der ribosomalen Komponenten, die die Bindungstasche für das betreffende Wirkstoffmolekül bilden, bestätigt, dass sich eubakterielle Pathogene und Säugetier-Ribosomen vor allem durch Strukturfeinheiten innerhalb der Antibiotika-Bindungstasche unterscheiden und dass eine Feinabstimmung der Bindungstasche die Bindungsweise ändern kann.^[77,79,85] Diese feinen Sequenz- und/oder Konformationsvariationen bilden die Grundlage für eine selektive Wirkung von Antibiotika als eine wichtige Voraussetzung für ihren klinischen Gebrauch.

Vergleiche zwischen den verschiedenen Kristallstrukturen von ribosomalen Partikeln in Komplexen mit den jeweils gleichen Antibiotikamolekülen haben zu bemerkenswerten Ergebnissen geführt. Zum Beispiel wurde eine vergleichende Studie von hochaufgelösten Strukturen ribosomaler Partikel aus Eubakterien (als Modell für Pathogene), aus *D. radiodurans* und aus einem Archaeon (das bestimmte Eigenschaften von Eukaryoten besitzt) im Komplex mit Antibiotika angestellt. Die Studien zeigten klar auf, dass zwischen der bloßen Bindung eines Antibiotikums und seiner etwaigen inhibierenden Wirkung zu unterscheiden ist. Insbesondere wurde gefunden, dass für die Bindung des Antibiotikums die Identität eines einzelnen Nukleotids entscheidend ist, während seine Ausrichtung in der Bindungstasche und damit seine therapeutische Wirksamkeit von der proximalen Stereochemie gesteuert wird.^[77,79] Dies ist im Einklang mit jüngsten Mutagenesestudien, die gezeigt haben, dass die Wirkung von Erythromycin in *Saccharomyces cerevisiae* nicht beeinträchtigt wird, wenn man in der 25S-rRNA Guanin durch Adenin an einer zu A2058 aus *E. coli* äquivalenten Position ersetzt.^[86] Somit wurde klar demonstriert, dass minimale Änderungen in den chemischen Gruppen der Antibiotika zu deutlich verschiedenen Bindungsweisen führen können und dass die bloße Bindung eines Antibiotikums nicht ausreicht, um eine therapeutische Wirkung zu erzielen.

Die Strukturaufklärung von Ribosom-Antibiotika-Komplexen hat auch einige unerwartete Inhibitionsmechanismen zum Vorschein gebracht. Zum Beispiel wurde eine synergistische Wirkung zwischen Antibiotika und der inhärenten Flexibilität des Ribosoms gefunden (Abbildung 5),^[79,87,88] ebenso wie ein Mechanismus der induzierten Passform.^[89] Unter den ribosomspezifischen Antibiotika sind die Pleuromutiline von besonderem Interesse, weil sie an das fast vollständig konservierte PTC binden und dabei trotzdem zwischen eubakteriellen und Säugetier-Ribosomen unterscheiden. Um die hohe Konservierung des PTC zu überwinden, nutzen die Pleuromutiline die inhärente Beweglichkeit des PTC. Sie setzen einen neuartigen Mechanismus der induzierten Passform in Gang, der ein Netzwerk von peripheren Wechselwirkungen zwischen flexiblen PTC-Nukleotiden und gering konservierten Nukleotiden in der Umgebung des PTC hinzunimmt. Diese Wechselwirkungen passen die Kontur des PTC an das gebundene Wirkstoffmolekül an.^[89] Die spezielle Bindungsweise der Pleuromutiline erbrachte neue Einblicke in das flexible Bewegungsverhalten von Ribosomen; insbesondere lieferten diese Studien Hinweise auf das Vorliegen eines allosterischen Netzwerks in der Umgebung des aktiven Zentrums des Ribosoms. Tatsächlich geht der Wert dieser Befunde weit über mögliche klinische

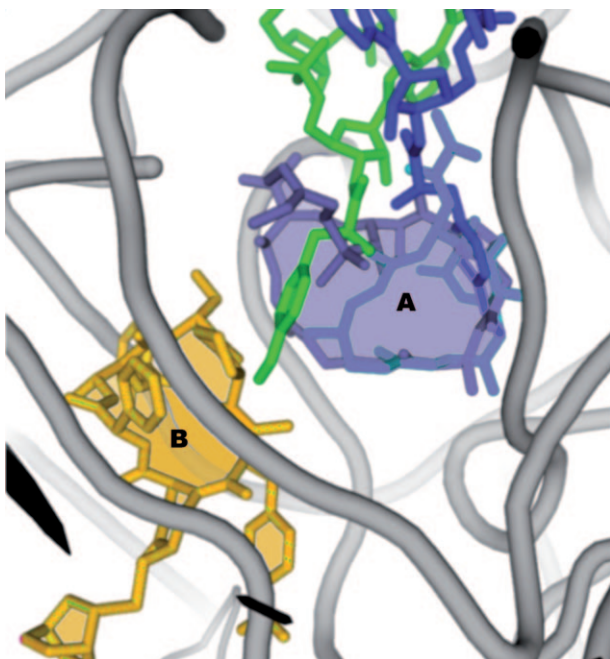


Abbildung 5. Ein Beispiel für die synergistische Wirkung von Antibiotika: Synercid, ein Vertreter der Streptogramine, greift am ribosomalen Peptidyltransferasezentrum und am Austrittstunnel an. Das RNA-Rückgrat ist silberfarben dargestellt, die aminoacylierten 3'-Enden der A- und P-tRNAs sind blau bzw. grün. Die SA-Verbindung Dalfopristin ist blau dargestellt, die zugehörige SB-Verbindung, Chinupristin, orange. A und B bezeichnen SA bzw. SB.

Anwendungen hinaus, indem sie grundlegende Prinzipien aufzeigen, wie etwa die Möglichkeit der Anpassung von Bindungstaschen und die Fähigkeit von Inhibitoren, die Strukturflexibilität des Ribosoms zu nutzen.

Ähnlich wie der Befund, dass sich die Bindungsweisen der Antibiotika trotz sehr ähnlicher Gesamtstrukturen unterscheiden, treten auch bei den scheinbar identischen Wirkstoffresistenzmechanismen sehr diffizile Unterschiede in Abhängigkeit von den chemischen Eigenschaften der Antibiotika auf, die entweder direkt oder durch zelluläre Effekte bestimmt werden.^[89,90] Dieses sehr unterschiedliche Verhalten von Antibiotikamolekülen bezüglich Koordination und Inhibitionsmechanismus bietet Perspektiven für die strukturbasierte, gezielte Eigenschaftsverbesserung existierender Verbindungen und für die Entwicklung neuartiger Wirkstoffklassen. Detaillierte Ausführungen finden sich in mehreren Übersichtsartikeln, z.B. Lit. [43, 77, 79, 80, 91–93].

Zusammenfassend: Mehr als zwei dutzend gelöste Strukturen von Ribosom-Antibiotika-Komplexen haben die Grundlagen für den klinischen Einsatz ribosomaler Antibiotika geschaffen. Sie haben Resistenzmechanismen aufgedeckt und Aufschluss darüber gegeben, wie Antibiotika zwischen Pathogenen und Wirtszellen differenzieren. Die Aufklärung der Funktionsprinzipien ribosomaler Antibiotika in Kombination mit der Verschiedenheit ihrer Bindungsweisen sowie die Entdeckung, dass periphere Wechselwirkungen Mechanismen der induzierten Passform in Gang setzen können, die die Diskriminierung selbst hoch konservierter Regionen ermöglichen, bietet Perspektiven für die Verbesserung existie-

render Antibiotika und für die Entwicklung neuartiger Wirkstoffe.

4. Das Ribosom ist eine Polymerase

Die Verfügbarkeit von Kristallstrukturen bakterieller Ribosomen und ihrer Komplexe, die in erster Linie der Anwendung von Synchrotrontechniken zu verdanken war, ermöglichte einen Quantensprung im Verständnis der Proteinbiosynthese. So wurde z.B. erkannt, dass die Schnittstellen der beiden ribosomalen Untereinheiten außerordentlich viele RNA-Strukturen aufweisen und dass die beiden aktiven Zentren – die Decodierungsregion und das PTC – ausschließlich aus RNA-Komponenten bestehen. Das Ribosom ist somit ein Ribozym. Das PTC befindet sich innerhalb einer hoch konservierten universellen symmetrischen Region, die in einer ansonsten unsymmetrischen Struktur eingebettet ist. Diese Region stellt die für die Bildung der Peptidbindungen und die ribosomale Polymeraseaktivität benötigte Maschinerie bereit. Als Substrate für die Proteinsynthese dienen aminoacylierte oder peptidylierte tRNA-Moleküle, für die drei Bindungszentren zur Verfügung stehen (Abbildung 1). Die Translokation der tRNA von der A- zur P-Stelle ist mit mindestens zwei hoch korrelierten Bewegungen verbunden: einer seitwärts gerichteten Verschiebung (die mit internen Umlagerungen einhergehen kann) und einer ribosomal gesteuerten Drehbewegung,^[10,11,94–98] während der die Bildung von Peptidbindungen erfolgt.^[99] Der gesamte Prozess umfasst die Translokation des 3'-Endes der tRNA von der A- zur P-Stelle, die Abspaltung der tRNA in der P-Stelle von der wachsenden Polypeptidkette, die Wanderung des deacylierten tRNA-Moleküls zur E-Stelle und seine anschließende Freisetzung.

Anstelle der natürlichen Substrate der Ribosomen – aminoacylierten tRNA-Molekülen – werden in biochemischen Anwendungen häufig „Minimalsubstrate“ als Analoga eingesetzt, die befähigt sind, einzelne Peptidbindungen zu bilden. Man nimmt von diesen Substraten an, dass sie aufgrund ihrer geringen Molekülgröße leicht zu den aktiven Zentren im Ribosom wandern können, allerdings sind ihre Reaktionen deutlich langsamer als die von vollständigen tRNA-Molekülen. Wie kürzlich aufgeklärt werden konnte, ist dieser erhöhte Zeitaufwand, den die Analoga benötigen, auf konformative Umlagerungen der Substrate sowie spezifischer PTC-Komponenten zurückzuführen.^[73,100]

In Einklang damit wurde gefunden, dass die Peptidyltransferreaktion durch Konformationswechsel im aktiven Zentrum moduliert wird,^[101–104] und dieser Prozess braucht Zeit. Die Minimalsubstrate sind Derivate von Puromycin. Obwohl sie nur in der Lage sind, einzelne Peptidbindungen zu bilden, wurden sie als geeignete Mimetika für die Untersuchung der natürlichen Ribosomenfunktion herangezogen. Die Kristallstrukturen von Komplexen von H50S mit Minimalsubstraten, die unter weitgehend unfunktionellen Bedingungen erhalten wurden, führten zu dem Vorschlag, dass drei spezifische rRNA-Nukleotide die Bildung von Peptidbindungen über einen allgemeinen Säure/Base-Mechanismus katalysieren.^[27] Dieser Mechanismus wurde in der Folge in

zahlreichen biochemischen und Mutationsstudien in Frage gestellt (z. B. Lit. [78,105–108]), ebenso wie durch Strukturvergleiche, die zeigten, dass Schlüsselkomponenten des PTC von H50S deutlich anders orientiert sind als in funktionellen Komplexen des T70S-Ribosoms.^[73,74] Es sollte bedacht werden, dass einzelne Peptidbindungen zwar allein durch die Wirkung einer RNA erzeugt werden können, dass aber die Polymeraseaktivität des Ribosoms (namentlich der Peptidyltransfer durch eine rRNA) nicht schlüssig demonstriert wurde.^[109] Es ist vorstellbar, dass das r-Protein L2 an der Elongation der naszierenden Proteinkette beteiligt ist.^[110]

Es scheint, dass die Wahl der Substratanaloga der Grund für die Fehlinterpretation sein könnte. Die Struktur der großen ribosomalen Untereinheit aus *Deinococcus radiodurans* (D50S) im Komplex mit einem Substratanalogon, das den mit der A-Stelle der großen Untereinheit wechselwirkenden tRNA-Teil nachahmt, erbrachte wichtige Erkenntnisse zur Bildung von Peptidbindungen. Diese Struktur zeigte, dass Ribosomen ihre Substrate in einer für die Bildung von Peptidbindungen geeigneten stereochemischen Konfiguration positionieren und damit die Maschinerie für die Bildung von Peptidbindungen und für die tRNA-Translokation bereitstellen.^[10,95] Des Weiteren fördert die ribosomale Architektur eine positionsspezifische Katalyse und unterstützt die tRNA beim schnellen und reibungslosen Aufbau der Peptidbindungen, wie durch chemische,^[104,111,112] kinetische,^[102,103,115,116] Mutagenese-^[98] und Computerstudien^[99,113,114] nachgewiesen wurde. Man ist sich weithin einig darüber, dass die genaue Positionierung der Substrate im Ribosomengerüst von großer Bedeutung ist (z. B. Lit. [11,102,103]); diese Meinung wird inzwischen auch von Wissenschaftlern geteilt, die ursprünglich vorgeschlagen hatten, dass das Ribosom die Bildung der Peptidbindungen durch einen Säure/Base-Mechanismus katalysiert.^[117]

5. Beweglichkeit und Bewegungen innerhalb des Peptidyltransferasezentrums

Die beiden Hauptaufgaben des Ribosoms – die Bildung von Peptidbindungen und die Prozession dieser Reaktion (die Polymerisation von Aminosäuren) – werden von der ribosomalen Architektur dirigiert, die eine hochgradig konservierte Region von 180 Nukleotiden enthält, die über eine pseudo-zweifache Symmetrie der rRNA-Faltung miteinander in Beziehung stehen (nicht aber über die Sequenzen). Diese relativ große symmetrische Region ist innerhalb des ansonsten unsymmetrischen Ribosoms lokalisiert und wurde in allen bekannten Ribosomstrukturen identifiziert.^[10,94,118,119] Insbesondere wurde diese Unterstruktur gleichermaßen in den Ribosomen von mesophilen, thermophilen, radiophilen und halophilen Bakterien aus Eubakterien und Archaea gefunden, und zwar sowohl in aggregierten leeren Ribosomen wie auch in Komplexen mit Substraten wie ribosomalen Antibiotika und nichtribosomalen Faktoren, die an der Proteinbiosynthese beteiligt sind.^[95,96] Trotz der Größenunterschiede zwischen den Ribosomen aus verschiedenen Spezies sind die funktionellen Regionen also gut konserviert. Der höchste Konservierungsgrad findet sich im zentralen Kern, die größ-

ten Strukturunterschiede beobachtet man an der Peripherie.^[120,121] Obwohl es keine Sequenzsymmetrie gibt, sind die Sequenzen der Nukleotide, die die symmetrische Region aufbauen, in der gesamten Evolution hoch konserviert.^[96,97,122] Dies deutet darauf hin, dass diese Sequenzen von Umweltbedingungen kaum beeinflusst werden. Die symmetrische Region schließt das PTC und dessen Umgebung ein und „verschaltet“ die funktionellen Regionen des Ribosoms, die an der Polymerisation der Aminosäuren beteiligt sind; dies sind die Ein- und Austrittsschleusen für die tRNA, das PTC, der Austrittstunnel des naszierenden Proteins und die Brückenstruktur, die die Höhlung des PTC mit der Umgebung des Decodierungszentrums in der kleinen Untereinheit verbindet. Indem die symmetrische Region im Zentrum des Ribosoms liegt, kann sie als Schaltstation für die Signalweiterleitung zwischen den an der Proteinbiosynthese beteiligten Regionen fungieren, die sich bis zu 200 Å entfernt zueinander befinden, aber während des Elongationszyklus miteinander kommunizieren müssen.^[123]

Das PTC befindet sich in der Mitte dieser symmetrischen Region (Abbildung 6) am Boden einer V-förmigen Höhlung; es hat die Form einer gewölbten Spalte. Der Akzeptor-Stamm der tRNA geht eine innige Wechselwirkung mit den Wänden des Hohlraums ein, wie z. B. beim Komplex aus D50S und ASM beobachtet wurde.^[10] Obwohl das PTC einen beträchtlichen Spielraum bezüglich der Positionierung von Minimalsubstraten hat, scheinen die Wechselwirkungen des Akzeptor-Stamms der tRNA entscheidend dafür zu sein, dass die Substrate in der für die Peptidsynthese richtigen Konfiguration im PTC positioniert werden.^[100] Dies ist im Einklang mit dem Befund, dass die Kernregion der tRNA von maßgeblicher Bedeutung für die dynamischen Wechselwirkungen der tRNA mit dem Ribosom ist.^[124] Die Kopplung zwischen der ausgeklügelten Architektur der symmetrischen Region und der Position der A-tRNA weist darauf hin, dass die Translokation des 3'-Endes der tRNA über eine Kombination von unabhängigen, aber dennoch synchronisierten Bewegungen abläuft: eine Seitwärtsverschiebung, die als ein Bestandteil der globalen mRNA/tRNA-Translokation ausgeführt wird, und eine Drehbewegung des 3'-Endes der A-tRNA entlang einem von den Wänden des PTC festgelegten Pfad.

Diese Drehbewegung wird von der ribosomalen Architektur geführt, vor allem von der Rückwand des PTC, die den Pfad der Drehbewegung räumlich einschränkt, und zwei flexiblen Nukleotiden, die die Drehung verankern und anzutreiben scheinen. Mit ihrer Beweglichkeit stellt die ribosomale Architektur somit alle Strukturelemente bereit, die das Ribosom für seine Funktion als Aminosäurepolymerase braucht, einschließlich der Bildung von zwei symmetrischen universellen Basenpaaren zwischen den tRNAs und dem PTC^[10,95] als eine Voraussetzung für die substratvermittelte Reaktionsbeschleunigung^[112] und die Ausrichtung des naszierenden Proteins in den Austrittstunnel. Bedeutsam ist, dass alle an dieser Drehbewegung beteiligten Nukleotide in einer Genselektionsanalyse als essenziell klassifiziert wurden.^[98] Darüber hinaus platziert die Drehbewegung die proximale 2'-Hydroxygruppe der Aminosäure A76 der P-tRNA in einer Position und Orientierung (wie sie in Kristallen des kompletten Ribosoms mit mRNA und tRNAs gefunden

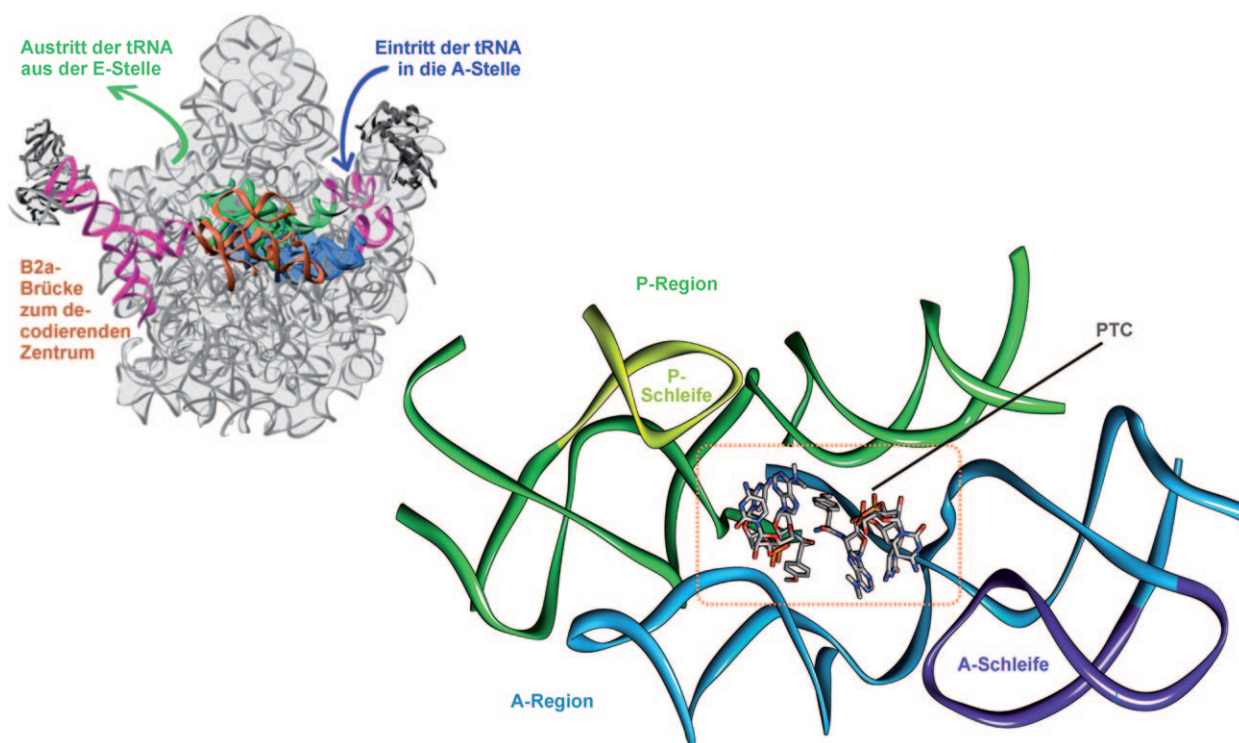


Abbildung 6. Oben links: Symmetrische Region des Ribosoms mit Strukturdetails. Die A-Region ist blau, die P-Region grün dargestellt; die nicht-symmetrischen Fortsätze sind magentafarben. Unten rechts: vergrößerter Ausschnitt der symmetrischen Region; hervorgehoben sind die wesentlichen Strukturteile, die die reaktive Tasche bilden können, und die Schleifen, die die Aminosäure C74 der A- und P-tRNA aufnehmen. Die Brücke zur kleinen Untereinheit ist hellbraun dargestellt.

wurde),^[73,74] die die chemische Katalyse der Peptidbildung durch A76 der P-tRNA ermöglicht.^[112]

Computersimulationen haben gezeigt, dass die sich drehende Gruppierung mit ribosomalen Komponenten wechselwirkt, die den Pfad der Drehbewegung entlang der Rückwand des PTC festlegen.^[95,96] In Einklang damit ergaben quantenchemische Rechnungen, die auf der Grundlage von Strukturdaten von D50S angestellt wurden, dass der Übergangszustand dieser Reaktion (d.h. der Bildung der Peptidbindung) während der Drehbewegung gebildet und durch Wasserstoffbrücken zu rRNA-Nukleotiden stabilisiert wird.^[99] Den Rechnungen zufolge wird der Übergangszustand zwischen den A- und P-Stellen in einer Position lokalisiert, wie sie ähnlich in der Kristallstruktur eines Komplexes aus der großen Untereinheit eines Ribosoms aus einer anderen Quelle (H50S) mit einem synthetischen Übergangszustandsanalogon gefunden wurde.^[125] Die Korrelation zwischen der Drehbewegung und der Aminosäurepolymerisation erklärt den scheinbaren Widerspruch bezüglich der Lokalisierung der wachsenden Proteinkette. Bei den klassischen biochemischen Methoden zum Nachweis ribosomaler Aktivität wurden die Reaktionen von Substratanaloga untersucht, die eine einzelne Peptidbindung eingehen konnten, aber nicht an der A-P-Translokation teilnahmen. Bei Substraten dagegen, die die A-P-Translokation ausführen können, findet die Proteinelongation nahe der P-Stelle in einer ungefähren Position statt, in der sich geeignet entworfene Übergangszustandsanaloge finden lassen.^[125]

6. Der Ribosomenkern ist ein optimiertes Rudiment einer altertümlichen Struktur

Die symmetrische Region der Ribosomen ist bemerkenswert hoch konserviert – selbst in mitochondrialen Ribosomen, in denen die Hälfte der rRNA durch Proteine ersetzt ist. Diese hohe Konservierung macht deutlich, dass die symmetrische Region alle Strukturelemente enthält, die für die Elongation der Polypeptidkette benötigt werden. Wir schlagen deshalb vor, dass das moderne Ribosom durch Genfusion oder Genverdopplung aus einer einfacheren Struktur hervorgegangen ist (Abbildung 7), die als ein Präribosom beschrieben werden kann.^[119] Die Tatsache, dass die dreidimensionalen Strukturen der beiden Untereinheiten im Laufe der Evolution praktisch unverändert geblieben sind, unterstreicht, dass die Beibehaltung ihrer Funktion von größerer Bedeutung war als eine etwaige Sequenzkonservierung und dass das Peptidyltransferasezentrum durch Genfusion entstanden ist. Insbesondere zeigt dies, dass die symmetrische Region die strikte Anforderung einer genauen Substratpositionierung in der für die Bildung von Peptidbindungen richtigen Konfiguration erfüllen muss. Dies, zusammen mit dem universellen Vorkommen der symmetrischen Region, führte zu der Annahme, dass das altertümliche Ribosom aus einer von zwei RNA-Ketten erzeugten Tasche bestand, die im modernen Ribosom in Form der symmetrischen Region beibehalten ist (Abbildung 6).

Auf der Grundlage dieser Beobachtung haben wir vorgeschlagen,^[96,122,126] dass die altertümliche Maschinerie, die

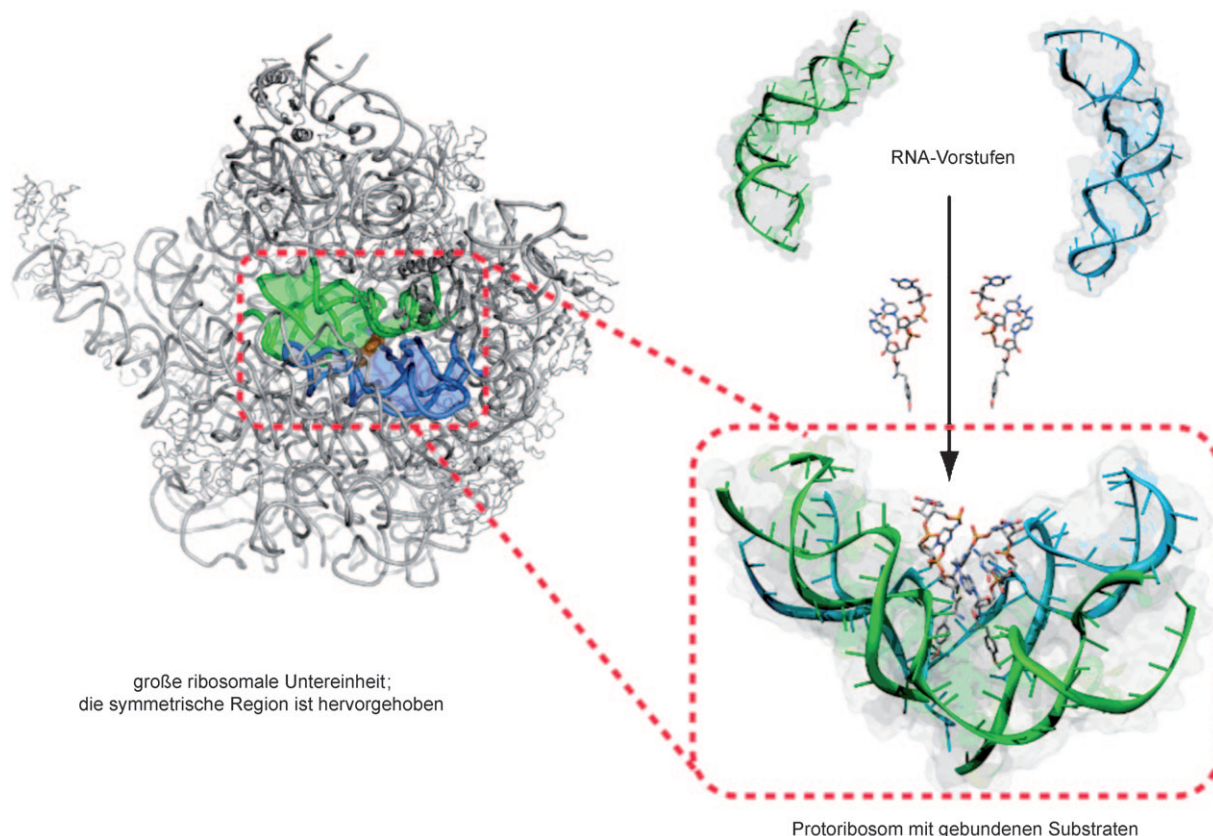


Abbildung 7. Das postulierte Protoribosom: Die Regionen, die die A- und P-tRNA beherbergen, sind blau bzw. grün dargestellt. Das Mimetikum der A-tRNA^[10] ist blau, die (durch die Drehbewegung) abgeleitete P-tRNA ist grün dargestellt.

Peptidbindungen zu bilden vermochte, ausschließlich aus RNA-Molekülen aufgebaut war, wobei gerade verfügbare Substituenten aus der prähistorischen Brühe herangezogen wurden (z. B. kurze RNA-Ketten), die stabile Konformationen einnehmen konnten und ausreichend stabil waren, um den Evolutionsdruck zu überleben. Diese überlebenden altertümlichen RNA-Ketten könnten sich spontan gefaltet und dimerisiert haben. Die Produkte der Dimerisierung ergaben dann dreidimensionale Strukturen mit einer symmetrischen Tasche, die zwei kleine Substrate aufnehmen konnte (z. B. Aminosäuren, konjugiert an Mono- oder Oligo-RNA-Nukleotide in einer für die spontane Bildung von Peptidbindungen geeigneten Konfiguration). Dies könnten die Vorstufen der RNA-Ketten gewesen sein, die die symmetrische Region moderner Ribosomen aufbauen. Die für diese Reaktion am besten geeigneten Taschen haben überlebt. Indem RNA-Ketten ihre eigene Reproduktion codieren können,^[127] fungierten die primitiven Taschen als Matrizen für das altertümliche Ribosom. In einer späteren Phase wurden diese primitiven RNA-Gene durch natürliche Auslese optimiert, und es entstanden besser definierte, relativ stabile Taschen. Nachdem die Korrelation zwischen der Aminosäure und den wachsenden Peptidylzentren eingerichtet war, wurde jede der beiden Hälften weiter auf ihre spezifische Aufgabe hin optimiert, sodass ihre Sequenzen in unterschiedlicher Weise evolvierten. Das gesamte Ribosom konnte sich letztlich in der Peripherie der symmetrischen Region weiter entwickeln, bis es seine endgültige Form angenommen hatte.^[128]

Die Substrate der altertümlichen Ribosomen – anfänglich spontan produzierte Aminosäuren, die mit einzelnen oder kurzen Oligonukleotiden konjugiert waren^[129,130] –, könnten sich parallel dazu entwickelt haben und wurden dann später in größere, vielfältigere Verbindungen umgewandelt, deren Molekülform die innere Oberfläche der Reaktionstasche komplementiert. Um die Spezifität zu erhöhen, wurden diese kurzen RNA-Segmente durch Fusion mit zusätzlichen RNA-Fragmenten zu größeren Strukturen verlängert, um so die altertümliche tRNA zu bilden, die vermutlich befähigt war, Anweisungen für die Produktion von Proteinen zu speichern, zu selektieren und zu transferieren. Anschließend wurde der Decodierungsprozess mit der Bildung von Peptidbindungen verknüpft. Durch Hinzufügen eines Strukturelements ähnlich der modernen Anticodon-Schleife konnte eine gewisse genetische Kontrolle erreicht werden, vermutlich nach der Erschaffung von Polypeptiden mit enzymatischer Funktion. Die Analyse von Substratbindungsweisen an inaktive und aktive Ribosomen führte zu ähnlichen Schlussfolgerungen.^[131]

Zusammengefasst scheint es, dass das altertümliche Ribosom – das Protoribosom – ein dimeres Ribozym war, das durch Dimerisierung selbstfaltender RNA-Ketten gebildet wurde (Abbildung 6). Diese bildeten eine Tasche, in der chemische Reaktionen ablaufen und sporadisch Peptidbindungen produziert werden konnten. Da die Produkte dieser Reaktion als deren Substrate agieren können, konnte es passieren, dass die Dipeptidkette verlängert wurde. Sobald diese Polypeptide erst einmal die Fähigkeit erlangt hatten,

enzymatische Aufgaben wahrzunehmen, wurde die Information über ihre erwünschte Struktur in Genen gespeichert. Folgerichtig entwickelten sich auch Moleküle – die tRNAs –, die diese Information gleichzeitig mit dem Transport der kognaten Substrate zu decodieren vermochten. Das Proto-ribosom wuchs und wurde immer komplexer, bis es die richtige Größe und Form erreicht hatte, um neu erzeugte tRNA-Moleküle aufzunehmen und genetische Information in die Bildung von Proteinen zu translatieren.

7. Resümee und Ausblick

Die Ribosomenforschung hat in den vergangenen Jahren eine erstaunliche Entwicklung genommen. Die hochaufgelösten Strukturen von Ribosomen, die heute verfügbar sind, geben Einblick in viele der funktionellen Eigenschaften der Translationsmaschinerie und offenbaren die verblüffende Architektur des Ribosoms, die auf geniale Weise auf seine spezifischen Aufgaben hin zugeschnitten ist: genaue Decodierung, substratvermittelte Bildung von Peptidbindungen und effiziente Polymeraseaktivität. Diese Strukturen haben klar aufgezeigt, dass alle Aufgaben des Ribosoms durch die ribosomale RNA ausgeführt und durch die ribosomalen Proteine unterstützt werden.

Aus den hochaufgelösten Strukturen konnten viele neue Befunde und Eigenschaften abgeleitet werden, darunter der komplexe Mechanismus der Decodierung, die Beweglichkeit der meisten der funktionellen ribosomalen Strukturelemente, die symmetrische Region im Kern des Ribosoms, die dynamischen Eigenschaften des ribosomalen Tunnels, die Wechselwirkungen des Ribosoms mit den naszierenden Ketten, die mögliche Signalgebung zwischen dem Ribosom und zellulären Komponenten und der Schutz der naszierenden Ketten vor Aggregation und Fehlfaltung durch Chaperone. Diese Ergebnisse führten unter anderem zu der Einsicht, dass an der Translokation der tRNA wohl mindestens zwei konzertierte Aktionen beteiligt sind, nämlich eine Seitwärtsverschiebung (die in einem hybriden Modus ausgeführt werden könnte) und eine ribosomal gelenkte Drehbewegung.

Die Kristallstrukturen von Ribosomen mit über zwei dutzend Arten von Antibiotika haben vielfältige Bindungs- und Wirkungsweisen sowie Resistenzmechanismen dieser Wirkstoffe zum Vorschein gebracht. Die Prinzipien, nach denen Antibiotika trotz der hohen Konservierung zwischen pathogenen und eukaryotischen Ribosomen diskriminieren, wurden ebenso aufgedeckt wie das synergistische Verhalten von Antibiotika (Abbildung 5). Des Weiteren erbrachten diese Studien Zusammenhänge zwischen der Antibiotikaempfindlichkeit und den „Fitness-Kosten“ und deckten neuartige Mechanismen der induzierten Passform auf, bei denen die ribosomale Flexibilität zur Umformung der Bindungstasche genutzt wird. Die hochaufgelösten Strukturen der Ribosom-Antibiotika-Komplexe können somit Schlüsselfragen zu den strukturellen Grundlagen der Resistenz, des Synergismus und der Selektivität von Antibiotika beantworten und strukturbezogene Ansätze zur Verbesserung von Wirkstoffen aufzeigen.

Die Verfügbarkeit der hochaufgelösten Strukturen hat zu einer unvorhersehbaren Entfaltung der Ribosomenforschung geführt und damit auch neue Einblicke in den Translationsprozess gewährt. Trotz der intensiven Forschung auf diesem Gebiet gibt es aber noch immer offene Fragen, von denen einige oben beschrieben wurden. Deshalb ist klar, dass die Ribosomenforschung, einschließlich ihrer anwendungsbezogenen Aspekte, auch für die Zukunft viel Spannendes bieten wird.

Mein Dank geht an die Mitarbeiter der Ribosomen-Gruppen am Weizmann-Institut, an der Abteilung für Ribosomenforschung der Max-Planck-Gesellschaft am DESY in Hamburg und am Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik in Berlin für ihre experimentellen Beiträge und für aufschlussreiche Diskussionen. Ich danke den National Institutes of Health (GM34360), dem Deutschen Ministerium für Wissenschaft und Technologie (BMBF 05-641EA), GIF 853-2004, dem Human Frontier Science Program (HFSP) RGP0076/2003 und dem Kimmelman Center for Macromolecular Assemblies. A.Y. ist Inhaberin des Martin and Helen Kimmel-Lehrstuhls. Die Röntgenbeugungsdaten wurden an folgenden Messanlagen aufgenommen: EMBL und MPG am DESY, FI/CHESS an der Cornell University, SSRL an der Stanford University, ESRF/EMBL in Grenoble, BL26/PF/KEK in Japan und APS am Argonne National Laboratory.

Eingegangen am 3. März 2010

Online veröffentlicht am 29. April 2010

- [1] „Insights into the decoding mechanism from recent ribosome structures“: J. M. Ogle, A. P. Carter, V. Ramakrishnan, *Trends Biochem. Sci.* **2003**, 28, 259–266.
- [2] „Structural basis for messenger RNA movement on the ribosome“: G. Yusupova, L. Jenner, B. Rees, D. Moras, M. Yusupov, *Nature* **2006**, 444, 391–394.
- [3] „Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution“: M. M. Yusupov, G. Z. Yusupova, A. Baucom, K. Lieberman, T. N. Earnest, J. H. Cate, H. F. Noller, *Science* **2001**, 292, 883–896.
- [4] „Crystal structure of an initiation factor bound to the 30S ribosomal subunit“: A. P. Carter, W. M. Clemons, Jr., D. E. Brodersen, R. J. Morgan-Warren, T. Hartsch, B. T. Wimberly, V. Ramakrishnan, *Science* **2001**, 291, 498–501.
- [5] „Crystal structures of complexes of the small ribosomal subunit with tetracycline, edeine and IF3“: M. Pioletti, F. Schlünzen, J. Harms, R. Zarivach, M. Glühmann, H. Avila, A. Bashan, H. Bartels, T. Auerbach, C. Jacobi, T. Hartsch, A. Yonath, F. Franceschi, *EMBO J.* **2001**, 20, 1829–1839.
- [6] „Structural basis for translation termination on the 70S ribosome“: M. Laurberg, H. Asahara, A. Korostelev, J. Zhu, S. Trakhanov, H. F. Noller, *Nature* **2008**, 454, 852–857.
- [7] „Insights into translational termination from the structure of RF2 bound to the ribosome“: A. Weixlbaumer, H. Jin, C. Neubauer, R. M. Voorhees, S. Petry, A. C. Kelley, V. Ramakrishnan, *Science* **2008**, 322, 953–956.
- [8] „X-ray crystallography study on ribosome recycling: the mechanism of binding and action of RRF on the 50S ribosomal subunit“: D. N. Wilson, F. Schlunzen, J. M. Harms, T. Yoshida, T. Ohkubo, R. Albrecht, J. Buerger, Y. Kobayashi, P. Fucini, *EMBO J.* **2005**, 24, 251–260.
- [9] „Structural basis for aminoglycoside inhibition of bacterial ribosome recycling“: M. A. Borovinskaya, R. D. Pai, W. Zhang,

- B. S. Schuwirth, J. M. Holton, G. Hirokawa, H. Kaji, A. Kaji, J. H. Cate, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2007**, *14*, 727–732.
- [10] „Structural basis of the ribosomal machinery for peptide bond formation, translocation, and nascent chain progression“: A. Bashan, I. Agmon, R. Zarivach, F. Schlutzen, J. Harms, R. Berisio, H. Bartels, F. Franceschi, T. Auerbach, H. A. S. Hansen, E. Kossoy, M. Kessler, A. Yonath, *Mol. Cell* **2003**, *11*, 91–102.
- [11] „Correlating ribosome function with high-resolution structures“: A. Bashan, A. Yonath, *Trends Microbiol.* **2008**, *16*, 326–335.
- [12] „A small particulate component of the cytoplasm“: G. E. Palade, *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **1955**, *1*, 59–68.
- [13] „Involvement of RNA in the synthesis of proteins“: J. D. Watson, *Science* **1963**, *140*, 17–26.
- [14] „The origin of the genetic code“: F. H. Crick, *J. Mol. Biol.* **1968**, *38*, 367–379.
- [15] „Ribosome’s mode of function: myths, facts and recent results“: I. Wekselman, C. Davidovich, I. Agmon, E. Zimmerman, H. Rozenberg, A. Bashan, R. Berisio, A. Yonath, *J. Pept. Sci.* **2009**, *15*, 122–130.
- [16] „Structure of bacterial ribosomes“: R. A. Garrett, H. G. Wittmann, *Adv. Protein Chem.* **1973**, *27*, 277–347.
- [17] „Unusual resistance of peptidyl transferase to protein extraction procedures“: H. F. Noller, V. Hoffarth, L. Zimniak, *Science* **1992**, *256*, 1416–1419.
- [18] „Partial resistance of nascent polypeptide chains to proteolytic digestion due to ribosomal shielding“: L. I. Malkin, A. Rich, *J. Mol. Biol.* **1967**, *26*, 329–346.
- [19] „Controlled proteolysis of nascent polypeptides in rat liver cell fractions. II. Location of the polypeptides in rough microsomes“: D. D. Sabatini, G. Blobel, *J. Cell Biol.* **1970**, *45*, 146–157.
- [20] „Location of exit channel for nascent protein in 80S ribosome“: R. A. Milligan, P. N. Unwin, *Nature* **1986**, *319*, 693–695.
- [21] „A tunnel in the large ribosomal subunit revealed by three-dimensional image reconstruction“: A. Yonath, K. R. Leonard, H. G. Wittmann, *Science* **1987**, *236*, 813–816.
- [22] „The ribosome returns“: P. B. Moore, *Nature* **1988**, *331*, 223–227.
- [23] „Does the channel for nascent peptide exist inside the ribosome? Immune electron microscopy study“: L. A. Ryabova, O. M. Selivanova, V. I. Baranov, V. D. Vasiliev, A. S. Spirin, *FEBS Lett.* **1988**, *226*, 255–260.
- [24] „A model of protein synthesis based on cryo-electron microscopy of the *E. coli* ribosome“: J. Frank, J. Zhu, P. Penczek, Y. Li, S. Srivastava, A. Verschoor, M. Radermacher, R. Grassucci, R. K. Lata, R. K. Agrawal, *Nature* **1995**, *376*, 441–444.
- [25] „The 70S *Escherichia coli* ribosome at 23 Å resolution: fitting the ribosomal RNA“: H. Stark, F. Mueller, E. V. Orlova, M. Schatz, P. Dube, T. Erdemir, F. Zemlin, R. Brimacombe, M. van Heel, *Structure* **1995**, *3*, 815–821.
- [26] „The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution“: N. Ban, P. Nissen, J. Hansen, P. B. Moore, T. A. Steitz, *Science* **2000**, *289*, 905–920.
- [27] „The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis“: P. Nissen, J. Hansen, N. Ban, P. B. Moore, T. A. Steitz, *Science* **2000**, *289*, 920–930.
- [28] „The signal sequence moves through a ribosomal tunnel into a noncytoplasmic aqueous environment at the ER membrane early in translocation“: K. S. Crowley, G. D. Reinhart, A. E. Johnson, *Cell* **1993**, *73*, 1101–1115.
- [29] „Signal sequence recognition and protein targeting to the endoplasmic reticulum membrane“: P. Walter, A. E. Johnson, *Annu. Rev. Cell Biol.* **1994**, *10*, 87–119.
- [30] „The side-by-side model of two tRNA molecules allowing the alpha-helical conformation of the nascent polypeptide during the ribosomal transpeptidation“: K. Nagano, H. Takagi, M. Harel, *Biochimie* **1991**, *73*, 947–960.
- [31] „The polypeptide tunnel system in the ribosome and its gating in erythromycin resistance mutants of L4 and L22“: I. S. Gabashvili, S. T. Gregory, M. Valle, R. Grassucci, M. Worbs, M. C. Wahl, A. E. Dahlberg, J. Frank, *Mol. Cell* **2001**, *8*, 181–188.
- [32] „The ribosomal exit tunnel functions as a discriminating gate“: H. Nakatogawa, K. Ito, *Cell* **2002**, *108*, 629–636.
- [33] „Instruction of translating ribosome by nascent Peptide“: F. Gong, C. Yanofsky, *Science* **2002**, *297*, 1864–1867.
- [34] „Structural insight into the role of the ribosomal tunnel in cellular regulation“: R. Berisio, F. Schlutzen, J. Harms, A. Bashan, T. Auerbach, D. Baram, A. Yonath, *Nat. Struct. Biol.* **2003**, *10*, 366–370.
- [35] „23S rRNA 2058 A→G alteration mediates ketolide resistance in combination with deletion in L22“: R. Berisio, N. Corti, P. Pfister, A. Yonath, E. C. Boettger, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, *50*, 3816–3823.
- [36] „Nascent membrane and secretory proteins differ in FRET-detected folding far inside the ribosome and in their exposure to ribosomal proteins“: C. A. Woolhead, P. J. McCormick, A. E. Johnson, *Cell* **2004**, *116*, 725–736.
- [37] „Translation Arrest Requires Two-Way Communication between a Nascent Polypeptide and the Ribosome“: C. A. Woolhead, A. E. Johnson, H. D. Bernstein, *Mol. Cell* **2006**, *22*, 587–598.
- [38] „Three-Dimensional Structures of Translating Ribosomes by Cryo-EM“: R. J. Gilbert, P. Fucini, S. Connell, S. D. Fuller, K. H. Nierhaus, C. V. Robinson, C. M. Dobson, D. I. Stuart, *Mol. Cell* **2004**, *14*, 57–66.
- [39] „Barreling through the membrane“: A. E. Johnson, R. E. Jensen, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2004**, *11*, 113–114.
- [40] „Ribosome exit tunnel can entropically stabilize α -helices“: G. Ziv, G. Haran, D. Thirumalai, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 18956–18961.
- [41] „A crevice adjoining the ribosome tunnel: hints for cotranslational folding“: M. Amit, R. Berisio, D. Baram, J. Harms, A. Bashan, A. Yonath, *FEBS Lett.* **2005**, *579*, 3207–3213.
- [42] „Antibiotic blocks mRNA path on the ribosome“: A. Mankin, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2006**, *13*, 858–860.
- [43] „Antibiotics and the ribosome“: T. Tenson, A. Mankin, *Mol. Microbiol.* **2006**, *59*, 1664–1677.
- [44] „Changes produced by bound tryptophan in the ribosome peptidyl transferase center in response to TnaC, a nascent leader peptide“: L. R. Cruz-Vera, M. Gong, C. Yanofsky, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 3598–3603.
- [45] „Real-time observation of trigger factor function on translating ribosomes“: C. M. Kaiser, H. C. Chang, V. R. Agashe, S. K. Lakshminpathy, S. A. Etchells, M. Hayer-Hartl, F. U. Hartl, J. M. Barral, *Nature* **2006**, *444*, 455–460.
- [46] „Cotranslational protein folding—fact or fiction?“: C. M. Deane, M. Dong, F. P. Huard, B. K. Lance, G. R. Wood, *Bioinformatics* **2007**, *23*, 142–148.
- [47] „Side-chain recognition and gating in the ribosome exit tunnel“: P. M. Petrone, C. D. Snow, D. Lucent, V. S. Pande, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 16549–16554.
- [48] „Elongation arrest by SecM via a cascade of ribosomal RNA rearrangements“: K. Mitra, C. Schaffitzel, F. Fabiola, M. S. Chapman, N. Ban, J. Frank, *Mol. Cell* **2006**, *22*, 533–543.
- [49] „The geometry of the ribosomal polypeptide exit tunnel“: N. R. Voss, M. Gerstein, T. A. Steitz, P. B. Moore, *J. Mol. Biol.* **2006**, *360*, 893–906.
- [50] „Generation of ribosome nascent chain complexes for structural and functional studies“: C. Schaffitzel, N. Ban, *J. Struct. Biol.* **2007**, *158*, 463–471.
- [51] „Structure of trigger factor binding domain in biologically homologous complex with eubacterial ribosome reveals its cha-

- perone action": D. Baram, E. Pyetan, A. Sittner, T. Auerbach-Nevo, A. Bashan, A. Yonath, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 12017–12022.
- [52] „The Binding Mode of the Trigger Factor on the Ribosome: Implications for Protein Folding and SRP Interaction": F. Schlutzenzen, D. N. Wilson, P. Tian, J. M. Harms, S. J. McInnes, H. A. Hansen, R. Albrecht, J. Buerger, S. M. Wilbanks, P. Fucini, *Structure* **2005**, *13*, 1685–1694.
- [53] „Ribosomal crystallography: from poorly diffracting microcrystals to high-resolution structures": M. Gluehmann, R. Zarivach, A. Bashan, J. Harms, F. Schlutzenzen, H. Bartels, I. Agmon, G. Rosenblum, M. Pioletti, T. Auerbach, H. Avila, H. A. Hansen, F. Franceschi, A. Yonath, *Methods* **2001**, *25*, 292–302.
- [54] „Crystallization of the large ribosomal subunit from *B. stearothermophilus*": A. Yonath, J. Muessig, B. Tesche, S. Lorenz, V. A. Erdmann, H. G. Wittmann, *Biochem. Int.* **1980**, *1*, 315–428.
- [55] „Ribosome activation and the binding of dihydrostreptomycin: effect of polynucleotides and temperature on activation": Z. Vogel, T. Vogel, A. Zamir, D. Elson, *J. Mol. Biol.* **1971**, *60*, 339–346.
- [56] „Inactivation and reactivation of ribosomal subunits: amino acyl-transfer RNA binding activity of the 30S subunit of *Escherichia coli*": A. Zamir, R. Miskin, D. Elson, *J. Mol. Biol.* **1971**, *60*, 347–364.
- [57] „The nucleation of crystals of large ribosomal subunits from *B. stearothermophilus*": A. Yonath, G. Khavitch, B. Tesche, J. Muessig, J. Lorenz, V. A. Erdmann, H. G. Wittmann, *Biochem. Int.* **1982**, *5*, 629–636.
- [58] „Parameters for crystal growth of ribosomal subunits": A. Yonath, J. Muessig, H. G. Wittmann, *J. Cell. Biochem.* **1982**, *19*, 145–155.
- [59] „Characterization and crystallization of ribosomal particles from *Halobacterium marismortui*": A. Shevack, Gewitz, H. S. B. Hennemann, A. Yonath, H. G. Wittmann, *FEBS Lett.* **1985**, *184*, 68–71.
- [60] „Crystallization of the 30S subunits of *Thermus thermophilus* ribosomes": M. M. Yusupov, S. D. Trakhanov, V. V. Barinin, B. D. Borovagin, M. B. Garber, S. E. Sedelnikova, O. M. Selivanova, S. V. Tischenko, V. A. Shirokov, M. M. Edintsov, *Dokl. Acad. Nauk.* **1987**, *292*, 1271–1274.
- [61] „Crystallization of 70S ribosome and 30S ribosomal subunits from *Thermus thermophilus*": S. D. Trakhanov, M. M. Yusupov, S. C. Agalarov, M. B. Garber, S. N. Riazantsev, S. V. Tischenko, V. A. Shirokov, *FEBS Lett.* **1987**, *220*, 319–322.
- [62] „Some X-ray diffraction patterns from single crystals of the large ribosomal subunit from *B. stearothermophilus*": A. Yonath, H. D. Bartunik, K. S. Bartels, H. G. Wittmann, *J. Mol. Biol.* **1984**, *177*, 201–206.
- [63] „Cryocrystallography of ribosomal particles": H. Hope, F. Frolov, K. von Bohlen, I. Makowski, C. Kratky, Y. Halfon, H. Danz, P. Webster, K. S. Bartels, H. G. Wittmann, A. Yonath, *Acta Crystallogr. Sect. B* **1989**, *45*, 190–199.
- [64] „The suitability of multi-metal clusters for phasing in crystallography of large macromolecular assemblies": J. Thygesen, S. Weinstein, F. Franceschi, A. Yonath, *Structure* **1996**, *4*, 513–518.
- [65] „Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 angstroms resolution": F. Schlutzenzen, A. Tocilj, R. Zarivach, J. Harms, M. Gluehmann, D. Janell, A. Bashan, H. Bartels, I. Agmon, F. Franceschi, A. Yonath, *Cell* **2000**, *102*, 615–623.
- [66] „The linkage between ribosomal crystallography, metal ions, heteropolytungstates and functional flexibility": A. Bashan, A. Yonath, *J. Mol. Struct.* **2008**, *890*, 289–294.
- [67] „Characterization and preliminary attempts for derivatization of crystals of large ribosomal subunits from *Haloarcula marismortui* diffracting to 3 Å resolution": K. von Bohlen, I. Makowski, H. A. Hansen, H. Bartels, Z. Berkovitch-Yellin, A. Zaytzev-Bashan, S. Meyer, C. Paulke, F. Franceschi, A. Yonath, *J. Mol. Biol.* **1991**, *222*, 11–15.
- [68] „Reproducible growth of well diffracting ribosomal crystals": T. Auerbach-Nevo, R. Zarivach, M. Peretz, A. Yonath, *Acta Crystallogr. Sect. D* **2005**, *61*, 713–719.
- [69] „Biological Implications of the Ribosome's Stunning Stereochemistry": E. Zimmerman, A. Yonath, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 63–72.
- [70] „High resolution structure of the large ribosomal subunit from a mesophilic eubacterium": J. Harms, F. Schlutzenzen, R. Zarivach, A. Bashan, S. Gat, I. Agmon, H. Bartels, F. Franceschi, A. Yonath, *Cell* **2001**, *107*, 679–688.
- [71] „Crystals of complexes mimicking protein biosynthesis are suitable for crystallographic studies": H. A. Hansen, N. Volkmann, J. Piefke, C. Glotz, S. Weinstein, I. Makowski, S. Meyer, H. G. Wittmann, A. Yonath, *Biochim. Biophys. Acta Lipids Lipid Metab.* **1990**, *1050*, 1–7.
- [72] „Cryocrystallography of ribosomal particles": H. Hope, F. Frolov, K. von Bohlen, I. Makowski, C. Kratky, Y. Halfon, H. Danz, P. Webster, K. S. Bartels, H. G. Wittmann, A. Yonath, *Acta Crystallogr. B* **1989**, *45*, 190–199.
- [73] „Structure of the 70S Ribosome Complexed with mRNA and tRNA": M. Selmer, C. M. Dunham, F. V. Murphy IV, A. Weixlbaumer, S. Petry, A. C. Kelley, J. R. Weir, V. Ramakrishnan, *Science* **2006**, *313*, 1935–1942.
- [74] „Crystal Structure of a 70S Ribosome-tRNA Complex Reveals Functional Interactions and Rearrangements": A. Korostelev, S. Trakhanov, M. Laurberg, H. F. Noller, *Cell* **2006**, *126*, 1065–1077.
- [75] „Insights into substrate stabilization from snapshots of the peptidyl transferase center of the intact 70S ribosome": R. M. Voorhees, A. Weixlbaumer, D. Loakes, A. C. Kelley, V. Ramakrishnan, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2009**, *16*, 528–533.
- [76] „Structures of the Bacterial Ribosome at 3.5 Å Resolution": B. S. Schuwirth, M. A. Borovinskaya, C. W. Hau, W. Zhang, A. Vila-Sanjurjo, J. M. Holton, J. H. D. Cate, *Science* **2005**, *310*, 827–834.
- [77] „Ribosomal Crystallography: Initiation, Peptide Bond Formation, and Amino Acid Polymerization are Hampered by Antibiotics": A. Yonath, A. Bashan, *Annu. Rev. Microbiol.* **2004**, *58*, 233–251.
- [78] „The ribosomal peptidyl transferase center: structure, function, evolution, inhibition": N. Polacek, A. S. Mankin, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2005**, *40*, 285–311.
- [79] „Antibiotics targeting ribosomes: resistance, selectivity, synergism, and cellular regulation": A. Yonath, *Annu. Rev. Biochem.* **2005**, *74*, 649–679.
- [80] „Antimicrobial agents targeting the ribosome: the issue of selectivity and toxicity—lessons to be learned": E. C. Boettger, *Cell. Mol. Life Sci.* **2007**, *64*, 791–795.
- [81] „23S rRNA base pair 2057–2611 determines ketolide susceptibility and fitness cost of the macrolide resistance mutation 2058 A → G": P. Pfister, N. Corti, S. Hobbie, C. Bruell, R. Zarivach, A. Yonath, E. C. Boettger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 5180–5185.
- [82] „Structures of MLSBK Antibiotics Bound to Mutated Large Ribosomal Subunits Provide a Structural Explanation for Resistance": D. Tu, G. Blaha, P. B. Moore, T. A. Steitz, *Cell* **2005**, *121*, 257–270.
- [83] „Mitochondrial deafness alleles confer misreading of the genetic code": S. N. Hobbie, C. M. Bruell, S. Akshay, S. K. Kalapala, D. Shcherbakov, E. C. Boettger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 3244–3249.
- [84] „Mutation from guanine to adenine in 25S rRNA at the position equivalent to *E. coli* A2058 does not confer erythromycin

- sensitivity in *Saccharomyces cerevisiae*": A. S. Bommakanti, L. Lindahl, J. M. Zengel, *RNA* **2008**, *14*, 460–464.
- [85] „Chemical parameters influencing fine-tuning in the binding of macrolide antibiotics to the ribosomal tunnel": E. Pyetan, D. Baram, T. Auerbach-Nevo, A. Yonath, *Pure Appl. Chem.* **2007**, *79*, 955–968.
- [86] „Mutation from guanine to adenine in 25S rRNA at the position equivalent to *E. coli* A2058 does not confer erythromycin sensitivity in *Saccharomyces*": A. S. Bommakanti, L. Lindahl, J. M. Zengel, *RNA* **2008**, *14*, 460–464.
- [87] „Alterations at the peptidyl transferase center of the ribosome induced by the synergistic action of the streptogramins dal-fopristin and quinupristin": J. Harms, F. Schlutzen, P. Fucini, H. Bartels, A. Yonath, *BMC Biol.* **2004**, *2*, 1–10.
- [88] „Structural basis for the antibacterial activity of the 12-membered-ring mono-sugar macrolide methymycin": T. Auerbach, I. Mermershtain, A. Bashan, C. Davidovich, H. Rosenberg, D. H. Sherman, A. Yonath, *Biotechnology* **2009**, *84*, 24–35.
- [89] „Induced-fit tightens pleuromutins binding to ribosomes and remote interactions enable their selectivity": C. Davidovich, A. Bashan, T. Auerbach-Nevo, R. D. Yaggie, R. R. Gontarek, A. Yonath, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 4291–4296.
- [90] „Structural basis for cross resistance to ribosomal PTC antibiotics": C. Davidovich, A. Bashan, A. Yonath, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 20665–20670.
- [91] „Ribosomal antibiotics: structural basis for resistance, synergism and selectivity": T. Auerbach, A. Bashan, A. Yonath, *Trends Biotechnol.* **2004**, *22*, 570–576.
- [92] „The bacterial ribosome as a target for antibiotics": J. Poehlsgaard, S. Douthwaite, *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3*, 870–881.
- [93] „The ribosome as a drug target": E. C. Boettger, *Trends Biotechnol.* **2006**, *24*, 145–147.
- [94] „On peptide bond formation, translocation, nascent protein progression and the regulatory properties of ribosomes": I. Agmon, T. Auerbach, D. Baram, H. Bartels, A. Bashan, R. Berisio, P. Fucini, H. A. Hansen, J. Harms, M. Kessler, M. Peretz, F. Schlutzen, A. Yonath, R. Zarivach, *Eur. J. Biochem.* **2003**, *270*, 2543–2556.
- [95] „Symmetry at the active site of the ribosome: structural and functional implications": I. Agmon, A. Bashan, R. Zarivach, A. Yonath, *Biol. Chem.* **2005**, *386*, 833–844.
- [96] „On Ribosome Conservation and Evolution": I. Agmon, A. Bashan, A. Yonath, *Isr. J. Ecol. Evol.* **2006**, *52*, 359–379.
- [97] I. Agmon, C. Davidovich, A. Bashan, A. Yonath: „Identification of the prebiotic translation apparatus within the contemporary ribosome". Available from Nature Precedings <http://hdl.handle.net/10101/npre.2009.2921.1> (2009).
- [98] „Comprehensive genetic selection revealed essential bases in the peptidyl-transferase center": N. S. Sato, N. Hirabayashi, I. Agmon, A. Yonath, T. Suzuki, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 15386–15391.
- [99] „The transition state for formation of the peptide bond in the ribosome": A. Gindulyte, A. Bashan, I. Agmon, L. Massa, A. Yonath, J. Karle, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 13327–13332.
- [100] „Ribosomal tolerance and peptide bond formation": A. Yonath, *Biol. Chem.* **2003**, *384*, 1411–1419.
- [101] „An induced-fit mechanism to promote peptide bond formation and exclude hydrolysis of peptidyl-tRNA": T. M. Schmeing, K. S. Huang, S. A. Strobel, T. A. Steitz, *Nature* **2005**, *438*, 520–524.
- [102] „Essential mechanisms in the catalysis of peptide bond formation on the ribosome": M. Beringer, C. Bruell, L. Xiong, P. Pfister, P. Bieling, V. I. Katunin, A. S. Mankin, E. C. Boettger, M. V. Rodnina, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 36065–36072.
- [103] „The ribosomal peptidyl transferase": M. Beringer, M. V. Rodnina, *Mol. Cell* **2007**, *26*, 311–321.
- [104] „The interaction between C75 of tRNA and the A loop of the ribosome stimulates peptidyl transferase activity": J. L. Brunelle, E. M. Youngman, D. Sharma, R. Green, *RNA* **2006**, *12*, 33–39.
- [105] „Ribosomal peptidyl transferase can withstand mutations at the putative catalytic nucleotide": N. Polacek, M. Gaynor, A. Yassin, A. S. Mankin, *Nature* **2001**, *411*, 498–501.
- [106] „Mechanism of ribosomal peptide bond formation": A. Barta, S. Dorner, N. Polacek, *Science* **2001**, *291*, 203a.
- [107] „Analysis of mutations at residues A2451 and G2447 of 23S rRNA in the peptidyltransferase active site of the 50S ribosomal subunit": J. Thompson, D. F. Kim, M. O'Connor, K. R. Lieberman, M. A. Bayfield, S. T. Gregory, R. Green, H. F. Noller, A. E. Dahlberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 9002–9007.
- [108] „Peptide bond formation does not involve acid-base catalysis by ribosomal residues": P. Bieling, M. Beringer, S. Adio, M. V. Rodnina, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2006**, *13*, 423–428.
- [109] „Toward ribosomal RNA catalytic activity in the absence of protein": R. M. Anderson, M. Kwon, S. A. Strobel, *J. Mol. Evol.* **2007**, *64*, 472–483.
- [110] „Histidine 229 in protein L2 is apparently essential for 50S peptidyl transferase activity": B. S. Cooperman, T. Wooten, D. P. Romero, R. R. Traut, *Biochem. Cell Biol.* **1995**, *73*, 1087–1094.
- [111] „Substrate-assisted catalysis of peptide bond formation by the ribosome": J. S. Weinger, K. M. Parnell, S. Dorner, R. Green, S. A. Strobel, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2004**, *11*, 1101–1106.
- [112] „Participation of the tRNA A76 Hydroxyl Groups throughout Translation": J. S. Weinger, S. A. Strobel, *Biochemistry* **2006**, *45*, 5939–5948.
- [113] „Analysis of predictions for the catalytic mechanism of ribosomal peptidyl transfer": S. Trobro, J. Aqvist, *Biochemistry* **2006**, *45*, 7049–7056.
- [114] „What Are the Roles of Substrate-Assisted Catalysis and Proximity Effects in Peptide Bond Formation by the Ribosome?": P. K. Sharma, Y. Xiang, M. Kato, A. Warshel, *Biochemistry* **2005**, *44*, 11307–11314.
- [115] „Rapid peptide bond formation on isolated 50S ribosomal subunits": I. Wohlgemuth, M. Beringer, M. V. Rodnina, *EMBO Rep.* **2006**, *7*, 699–703.
- [116] „How ribosomes make peptide bonds": M. V. Rodnina, M. Beringer, W. Wintermeyer, *Trends Biochem. Sci.* **2007**, *32*, 20–26.
- [117] „Peptidyl-CCA deacylation on the ribosome promoted by induced fit and the O3'-hydroxyl group of A76 of the unacylated A-site tRNA": M. Simonovic, T. A. Steitz, *RNA* **2008**, *14*, 2372–2378.
- [118] „Functional aspects of ribosomal architecture: symmetry, chirality and regulation": R. Zarivach, A. Bashan, R. Berisio, J. Harms, T. Auerbach, F. Schlutzen, H. Bartels, D. Baram, E. Pyetan, A. Sittner, M. Amit, H. A. S. Hansen, M. Kessler, C. Liebe, A. Wolff, I. Agmon, A. Yonath, *J. Phys. Org. Chem.* **2004**, *17*, 901–912.
- [119] „From peptide-bond formation to cotranslational folding: dynamic, regulatory and evolutionary aspects": D. Baram, A. Yonath, *FEBS Lett.* **2005**, *579*, 948–954.
- [120] „Modeling a minimal ribosome based on comparative sequence analysis": J. A. Mears, J. J. Cannone, S. M. Stagg, R. R. Gutell, R. K. Agrawal, S. C. Harvey, *J. Mol. Biol.* **2002**, *321*, 215–234.
- [121] „Testing the conservation of the translational machinery over evolution in diverse environments: assaying *Thermus thermophilus* ribosomes and initiation factors in a coupled transcription-translation system from *Escherichia coli*": J. Thompson, A. E. Dahlberg, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 5954–5961.
- [122] „The evolving ribosome: from non-coded peptide bond formation to sophisticated translation machinery": C. Davidovich,

- M. Belousoff, A. Bashan, A. Yonath, *Res. Microbiol.* **2009**, *160*, 487–492.
- [123] „Peptide bond formation destabilizes Shine-Dalgarno interaction on the ribosome“: S. Uemura, T. H. Dorywalska, M. Lee, H. D. Kim, J. D. Puglisi, S. Chu, *Nature* **2007**, *446*, 454–457.
- [124] „Rapid ribosomal translocation depends on the conserved 18–55 base pair in P-site transfer RNA“: D. Pan, S. Kirillov, C. M. Zhang, Y. M. Hou, B. S. Cooperman, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2006**, *13*, 354–359.
- [125] „Structural Insights into the Roles of Water and the 2' Hydroxyl of the P Site tRNA in the Peptidyl Transferase Reaction“: T. M. Schmeing, K. S. Huang, D. E. Kitchen, S. A. Strobel, T. A. Steitz, *Mol. Cell* **2005**, *20*, 437–448.
- [126] „Ancient machinery embedded in the contemporary ribosome“: M. J. Belousoff, C. Davidovich, E. Zimmerman, Y. Caspi, I. Wekselman, L. Rozenszajn, T. Shapira, O. Sade-Falk, L. Taha, A. Bashan, M. S. Weiss, A. Yonath, *Biochem. Soc. Trans.* **2010**, im Druck.
- [127] „Self-Sustained Replication of an RNA Enzyme“: T. A. Lincoln, G. F. Joyce, *Science* **2009**, *323*, 1229–1232.
- [128] „A hierarchical model for evolution of 23S ribosomal RNA“: K. Bokov, S. V. Steinberg, *Nature* **2009**, *457*, 977–980.
- [129] „Aminoacyl-RNA Synthesis Catalyzed by an RNA“: M. Illangsekare, G. Sanchez, T. Nickles, M. Yarus, *Science* **1995**, *267*, 643–647.
- [130] „Efficiency of a self-aminoacylating ribozyme: Effect of the length and base-composition of its 3' extension“: J. Lehmann, A. Reichel, A. Buguin, A. Libchaber, *RNA* **2007**, *13*, 1191–1197.
- [131] „The kinetics of ribosomal peptidyl transfer revisited“: M. Johansson, E. Bouakaz, M. Lovmar, M. Ehrenberg, *Mol. Cell* **2008**, *30*, 589–598.
- [132] „Characterization of crystals of small ribosomal subunits“: A. Yonath, C. Glotz, H. S. Gewitz, K. S. Bartels, K. von Bohlen, I. Makowski, H. G. Wittmann, *J. Mol. Biol.* **1988**, *203*, 831–834.
- [133] „The structure of ribosome-lankacidin complex reveals ribosomal sites for synergistic antibiotics“: T. Auerbach, I. Mermershtain, D. Davidovich, A. Bashan, M. Belousoff, I. Wekselman, E. Zimmerman, L. Xiong, D. Klepacki, Kenji K. Arakawa, H. Kinashi, A. Mankin, A. Yonath, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, DOI: 10.1073/pnas.0914100107.