

Von der Struktur und Funktion des Ribosoms zu neuen Antibiotika (Nobel-Aufsatz)**

Thomas A. Steitz*

Antibiotika · Nobel-Vortrag · Proteinsynthese ·
Ribosomen

Autobiographie

Ich wurde 1940 in Milwaukee geboren, und meine Familie lebte bis 1949 in einer Wohnung über einem Malergeschäft in der Stadtmitte. Mein Vater hatte an der Marquette University in Milwaukee Jura studiert, erhielt dann aber eine Anstellung als Personalchef am Milwaukee County Hospital. Meine Mutter wuchs auf einer Farm im Bezirk Waukesha außerhalb von Milwaukee auf und machte ihren Abschluss am Carol College, einem kleinen College in Waukesha. Ich war der älteste von fünf Geschwistern und hatte zwei jüngere Brüder und Schwestern. Die Eltern meines Vaters lebten ungefähr 20 Blocks entfernt, die Eltern meiner Mutter und die Familie ihres Bruders lebten auf der Familienfarm in Waukesha.

Meine Grundschule war die Elm Street School, ein alter Ziegelbau mit asphaltiertem Schulhof ein paar Blocks von unserer Wohnung entfernt. Ich mochte die Schule nicht besonders und wurde auf dem Schulweg oft von einer Bande älterer Jungen verprügelt. Mein Zeugnis, das ich meinen Eltern am Ende der zweiten Klasse zur Unterschrift nach Hause brachte, reichte gerade noch zur Versetzung. Meine Eltern waren bestürzt und wollten von mir wissen, was ich nun zu tun gedachte; ich antwortete, dass mich Noten nicht wirklich interessierten. Für diese Antwort verabreichte mir meine Mutter (glaube ich) meine erste und letzte Tracht Prügel. Es war sicherlich der Tiefpunkt meiner akademischen Karriere.

In meinem dritten Schuljahr zogen wir nach Wauwatosa um, einer Vorstadt Milwaukees, was nicht nur mein akademisches Leben komplett umgekämpfte. Lehrer, Schulen, Klassenkameraden – alles war großartig, von der Grundschule bis später zur Highschool. Die Roosevelt-Grundschule hatte Tennisplätze und einen Rasenplatz, auf dem jeden Winter eine Eisbahn mit Außenbeleuchtung und einer Hütte zum Aufwärmen aufgebaut wurde. Fast jeden Abend im Winter spielte ich mit Freunden stundenlang auf der Eisfläche.

Die Besuche auf der Farm meines Großvaters während der 40er und 50er Jahre spielten eine wichtige Rolle in dieser Phase meines Lebens. Es war eher eine Gemüsefarm, und hauptsächlich wurden Rettich, Karotten und Zwiebeln angebaut. Während des 2. Weltkriegs hielt er außerdem eine Kuh für Milch, Sahne und Käse. Auf einem Foto, das ungefähr von 1941 datiert, bin ich mit meinem Großvater und seiner

Kuh zu sehen (Abbildung 1). Die Farm war nur eine halbe Autostunde von Wauwatosa entfernt, und wir besuchten die Großeltern oft. Ein Foto aus dem Jahr 1952 zeigt meine Fa-

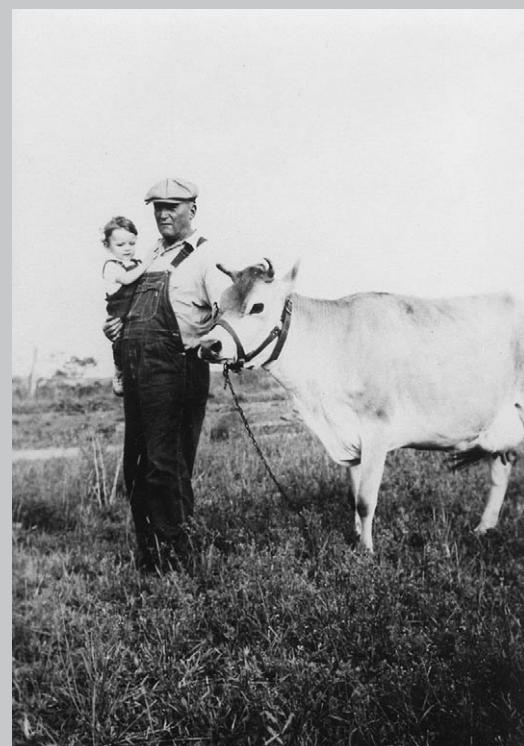


Abbildung 1. Ich auf dem Arm meines Großvaters auf einem Feld seiner Farm, daneben seine Kuh (um 1941).

milie – Vater, Mutter und fünf Geschwister – vor dem grünen Hudson meines Großvaters mit einem abgeernteten Weizenfeld im Hintergrund (Abbildung 2).

[*] Prof. T. A. Steitz

Department of Molecular Biophysics and Biochemistry, Department of Chemistry, Yale University and the Howard Hughes Medical Institute, 266 Whitney Avenue, New Haven, CT 06520-8114 (USA)

[**] Copyright© Nobel-Stiftung 2009. Wir danken der Nobel-Stiftung, Stockholm, für die Genehmigung zum Druck einer deutschen Fassung des Vortrags.

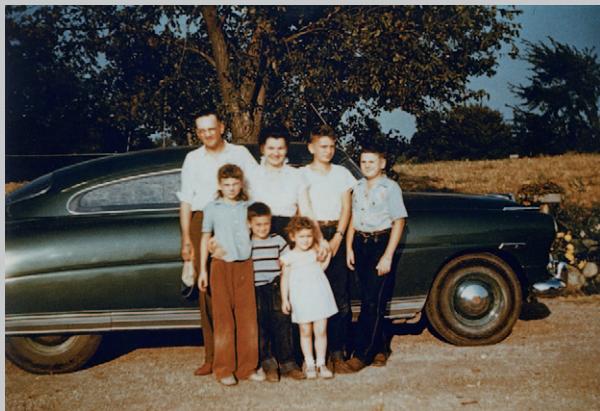


Abbildung 2. Ich zwischen meinen Eltern und meinem Bruder Dick. Vorne stehen Mary, Bill und Sally (von links nach rechts) (um 1952). Im Hintergrund der Hudson meines Großvaters (Baujahr 1951) und einer der Gemüsegärten meiner Großmutter.

In meinen jungen Teenagerjahren arbeitete ich den größten Teil meiner Sommerferien auf den Feldern meines Großvaters und meines Onkels. Zusammen mit vielen anderen Kindern bündelte ich Rettiche und jätete Zwiebeln. Die Arbeit begann täglich kurz nach Sonnenaufgang um 5 Uhr morgens und dauerte bis zum späten Nachmittag – nur an den Samstagen war frei (Sonntag war kein Markttag). Ich bekam 5 Cent pro Dutzend Rettichbündel und schaffte rund 100 Dutzend Bündel am Tag. Mit dem Geld kaufte ich mir ein neues Saxophon, ein Fahrrad, einen Tennisschläger und sparte Geld für das College.

Die Junior High und die Highschool waren in 20 Minuten zu Fuß zu erreichen. Ich lernte neue Klassenkameraden kennen und hatte, was mir sehr wichtig war, neben den akademischen Fächern auch Unterricht in Musik, Kunst und Werken. Der Werkunterricht an der Junior High behandelte auch Elektrizität und Magnetismus, und ich baute z. B. einen elektrischen Motor, wobei ich eigenhändig die Spulen wickelte und die ganze Verkabelung anbrachte. Im Tischlerkurs schreinerte ich einen Kaffeetisch für die Familie. Aus Plastik formte ich Brieföffner und Lampenständer. Was ich mit den Metallen anstellte, weiß ich nicht mehr. Ich denke, dass sich die Grundfertigkeiten im Umgang mit Werkzeug und Materialien, die ich im Werkunterricht erlernte, später sehr wertvoll für mich waren – nicht zuletzt auch im Labor, etwa beim Bau von Proteinmodellen. Es ist schade, dass heute viele Schulen solche Kurse als überflüssig oder zu teuer abgeschafft haben.

An der Junior High entwickelte ich ein ernsthaftes Interesse an der Musik und schloss mich dem Schulorchester und dem Chor an. Zur ersten Orchesterprobe brachte ich das Sopransaxophon meines Vater mit, der Dirigent erklärte mir aber, dass das Orchester ein solches Instrument nicht brauchte und gab mir stattdessen das Altsaxophon der Schule. Ich wurde ein ernstzunehmender Saxophonspieler und spielte in der Highschool Solos, Duette und Quartette. Neben meinem Engagement im Schulorchester stellte ich noch eine Big Band auf. Ich übte ein bis zwei Stunden am Tag und gewann Wettbewerbe in Wisconsin. Ich erwog ernstlich, Musiker zu werden, überlegte mir dann aber, dass ich ja als

Wissenschaftler meinem Hobby Musik nachgehen können, nicht jedoch umgekehrt.

Meine Zensuren an der Longfellow Junior High pendelten sich in den ersten beiden Jahren auf einer Zwei ein – gut, aber nicht herausragend. Nach der Hälfte meines zweiten Jahres kam dann mein Bruder Dick an die Junior High und erreichte durchweg Einsen. Das war wie ein Weckruf für mich, und der Wettkampf war eröffnet. Tatsächlich bekam ich im nächsten Jahr viele Einsen. In der Highschool machte ich meine Sache viel besser und wurde 8. in einer Klassenstufe von über 300 Schülern. Wettbewerb kann in der Schule genauso motivierend sein wie auf dem Tennisplatz.

In der Highschool war es glücklicherweise üblich, die Schüler nach ihren jeweiligen Begabungen in Kurse einzuteilen. So waren die besten 25 bis 30 der insgesamt 300 Schüler in meinen Mathematik-, Naturwissenschafts- und Englisch-Klassen. Dies bedeutete, dass die Lehrer uns auf höherem Niveau als der Durchschnitt unterrichten konnten, und wir lernten voneinander und forderten uns gegenseitig heraus. Ich erinnere mich besonders daran, wie außergewöhnlich gut die Mädchen in meiner Mathematikkasse waren – unter den besten zehn Schülern waren nur zwei oder drei Jungen. Ich habe nie daran gezweifelt, dass Frauen genauso gut oder besser in Mathematik sind als Männer – ganz im Gegensatz zu den Vermutungen eines ehemaligen Präsidenten der Harvard University. Ich halte es für schade, dass viele, wenn nicht sogar die meisten Highschools (wie in meiner Heimatstadt Branford) Schüler nicht länger nach ihren Begabungen aufteilen, denn so werden die besten nicht genügend motiviert und entsprechend gefördert.

Lawrence College

Meine Wahl, auf welches College ich gehen sollte, wurde stark von meinem besten Freund aus der Highschool, Alex Wilde, und vor allem von dessen Mutter beeinflusst. Mein Vater wollte mich auf die Marquette University oder die University of Wisconsin schicken, die mich aber beide nicht sonderlich reizten. Ich hatte die Wildes sehr gut kennengelernt, vor allem Alex' Mutter, deren Vater Alexander Wiley damals Senator in Wisconsin war. Sie schlug mir vor, es am Lawrence College zu versuchen, wo auch Alex hingehen wollte. Weil ich mir das Schulgeld nicht leisten konnte, bewarb ich mich um ein Stipendium, das mir auch bewilligt wurde. Spätestens nach einem ersten Besuch des Lawrence College war dann meine Wahl – eine wichtige Wahl – gefallen.

Die vier Jahre am Lawrence College veränderten mein Leben, meine Weltsicht und meine berufliche Orientierung. Weil Lawrence eine Schule der freien Künste ist, hatte ich als Ergänzung zu meinem Hauptfach, der Chemie, viele geisteswissenschaftliche Kurse zu belegen. Die Kurse begannen mit den so genannten Freshman Studies, einem breit gefächerten Lese-, Diskussions- und Schreibkurs über viele klassische Bücher. Wir lernten Fragen zu stellen und zu beantworten. Bedeutsam war, dass wir neben Englisch, Geschichte und Sprachen auch Philosophie-, Theologie- und Anthropologiekurse zu absolvieren hatten. Ich kam nach Lawrence mit einem stark religiös geprägten Hintergrund und verließ es mit

einem völlig anderen Verständnis der Ursprünge religiösen Glaubens und der Rolle der Religionen in den Kulturen. In Lawrence gibt es auch eine Musikschule, sodass ich meiner Liebe zur Musik weiter nachgehen konnte und in der Band, im Orchester und im Chor aktiv war.

Ich hatte viele wundervolle und anregende Lehrer in Lawrence. Den größten Einfluss auf meine Entscheidung, eine wissenschaftliche Laufbahn, speziell in der Chemie einzuschlagen, hatte Professor Robert Rosenberg – oder Bob, wie ich ihn inzwischen nennen darf (Abbildung 3 A). Ich er-

Untersuchung (Bestimmung von k_{cat} und K_m) der Hydrolyse von Substratanaloga des *para*-Nitrophenylesters durch Chymotrypsin, Trypsin und Thrombin. Auf die Messungen folgten Berechnungen, die mir ermüdend erschienen. Ich beschloss, ein Computerprogramm zu schreiben (mein erstes!), um die Daten auf dem Universitätsrechner, einem IBM 650, auszuwerten. Das Projekt ging so schnell, dass ich zwei Wochen zu früh fertig war und nach einer weiteren Aufgabe fragte. Man wies mir an, die organische Synthese eines neuen Substrats zu versuchen, mit der ich bald begann. Als ich einmal unter dem Abzug bei gezündetem Bunsenbrenner mit organischen Lösungsmitteln hantierte, explodierten diese – was im Nachhinein nicht verwunderlich war, aber zum Glück ohne Verletzte abging –, und dies beendete die organisch-chemische Phase meiner Forscherkarriere.

Am Ende des Sommers 1961, vor meinem Abschlussjahr, durfte ich an einer zweiwöchigen Konferenz am MIT teilnehmen, zu der ausgewählte Studenten kleiner Colleges eingeladen waren. Die Tagung wurde von der American Biophysical Society mit dem Ziel organisiert, Studenten für die Biophysik zu gewinnen (ein Gebiet, von dem ich bis dahin nie gehört hatte). Jeweils vier Studenten von etwa 20 kleinen Colleges waren eingeladen, und alle Kosten wurden übernommen. Es war mein erster Flug und sogar meine erste Reise außerhalb von Wisconsin, abgesehen von Chicago. Das Programm bestand aus Vorträgen zu einem breiten Spektrum biophysikalischer Themen, die hauptsächlich, wenn auch nicht ausschließlich, von Professoren aus Harvard und dem MIT gehalten wurden. Ich erinnere mich gut an einen der Organisatoren, J. Oncley, der mit einem zerknitterten karrierten Jacket, wie man es noch nie gesehen hatte, im Auditorium saß. Am besten in Erinnerung aber blieb mir der Vortrag von Alex Rich, der außerordentlich inspirierend war und von einem Forschungsgebiet handelte, das ich später verfolgen sollte. Eine andere für mich wichtige Vorlesung war die von Paul Doty aus Harvard über biophysikalische Untersuchungen an Nukleinsäuren, und ich kann sagen, dass dieser Vortrag einer der Gründe war, weshalb ich später nach Harvard gehen wollte. Die Konferenz bot außerdem gute Gelegenheit zur Kontaktpflege. Ich denke dabei vor allem an ein Abendessen mit drei Studenten vom Reed College, darunter Don Engelman, Mark Ptashne und einigen anderen, die später mit mir in Harvard studierten. Es könnte gut sein, dass das zweiwöchige Treffen vom Aufruf Kennedys inspiriert war, eine Antwort auf den Sputnik zu geben. Es war ein wirklich bedeutsames Ereignis, das die Karriere vieler von uns beeinflusst hat. Leider wurde die Konferenz später nie wiederholt.

Im Herbst meines Abschlussjahres nahm ich an einem Forschungsprogramm am Argonne National Laboratory teil, das von den kleinen Midwestern Colleges finanziert wurde. Ich wohnte auf dem Institutsgelände und arbeitete an einem Chemieprojekt, das ich nicht mochte und an das ich mich auch nicht mehr erinnere. Meine einzige Erinnerung an dieses trübe Semester ist, dass ich das Moskauer Bolschoi-Ballett zu sehen bekam und es ganz erstaunlich fand, wie die männlichen Tänzer über die Bühne sprangen. Im darauffolgenden Sommer, vor meinem Wechsel nach Harvard, arbeitete ich für die Firma Dupont an einem anderen wenig erinnerungswür-

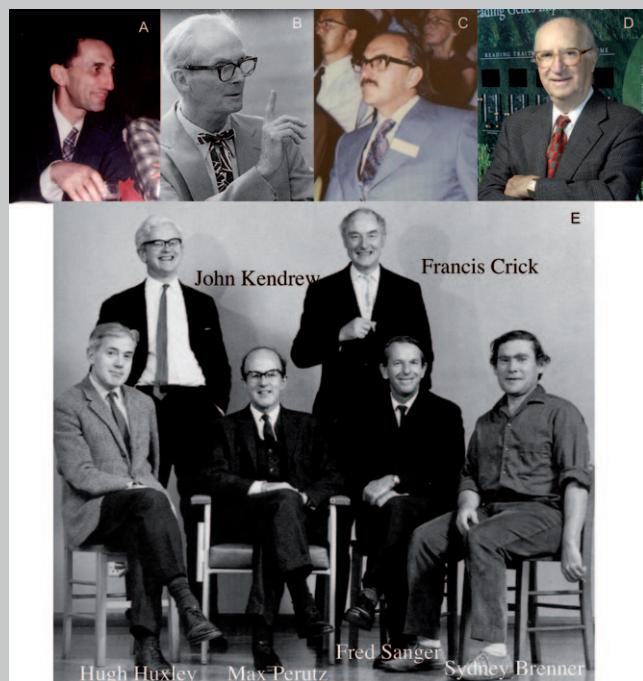


Abbildung 3. Einige der wichtigen Mentoren während meiner frühen Laufbahn: A) Bob Rosenberg, mein Chemieprofessor am Lawrence College, B) William Lipscomb, mein Doktorvater in Harvard, C) Brian Hartley, mein Scout in Sachen Hexokinase am MRC Laboratory of Molecular Biology in Cambridge (England), D) Dan Koshland, E) der Vorstand des LMB Mitte der 60er Jahre: John Kendrew und Francis Crick (stehend), Hugh Huxley, Max Perutz, Fred Sanger und, mit Zigarette, Sydney Brenner (sitzend).

innere mich noch gut an die ersten Vorlesungen seines Einführungskurses in Chemie, in denen er uns mit den Konzepten der Atomorbitale und der chemischen Bindung vertraut machte und uns beibrachte, wie das Studium der Chemie auf der physikalisch-chemischen, atomaren Ebene es einem ermöglicht, die Eigenschaften chemischer Verbindungen, etwa ihre Farbe, zu verstehen. Es war für mich eine Offenbarung, die Welt um mich herum verstehen zu können.

Ich konnte bei verschiedenen Gelegenheiten an Forschungsprojekten in Laboratorien außerhalb von Lawrence mitarbeiten. Mein erster Ausflug in die Forschung, den mir Bob Rosenberg organisiert hatte, war ein Sommerkurs im biochemischen Laboratorium von Lorazo Lorand an der Northwestern University. Mein Projekt war eine kinetische

digen Projekt; ich sollte den dynamischen Elastizitätsmodul synthetischer Stoffe messen, die für die Herstellung von Büstenhaltern vorgesehen waren. Dummerweise war ich nicht in das Team eingeladen, das die Anprobe des fertigen Produkts in Augenschein nahm.

Harvard

Für mein Hauptstudium wechselte ich nach Harvard, wo ich eigentlich biophysikalische Untersuchungen an Nukleinsäuren vornehmen sollte, aber dann, glücklicherweise, eine andere Richtung einschlug. Im Frühjahr 1963, in meinem ersten Jahr in Harvard, war ich bei drei Dunham-Vorlesungen von Max Perutz (Abbildung 3E), in denen er die erste Kristallstruktur eines Proteins, Myoglobin, in atomarer Auflösung präsentierte. Er zeigte Stereobilder und ich war überwältigt, als die Atomstruktur von Myoglobin dreidimensional über Max' Kopf erschien; dies musste der richtige Weg sein, um zu verstehen, wie Makromoleküle ihre biologischen Funktionen ausführen. Kurz später machte ich beim Tennisspiel mit Peter Boer, einem Studenten von Bill Lipscomb, die Bemerkung, wie bedauerlich es sei, dass in Harvard niemand Protein-kristallographie betrieb. Er widersprach: Der „Colonel“, wie Bill Lipscomb (Abbildung 3B) von seinen Studenten und Postdocs genannt wurde (denn er kam aus Kentucky), hatte ein Team, das an der Kristallstruktur der Rindercarboxypeptidase A (CPA) arbeitete. Wenig später machte ich mich ein wenig nervös auf den Weg zum Büro des Colonels, um einen Termin mit ihm auszumachen. Er stand im Büro seiner Sekretärin, die gerade nicht da war, und als ich nach einem Termin fragte, bat er mich sogleich zu sich herein. Nachdem er mir das CPA-Projekt beschrieben hatte, fragte ich ganz aufgereggt, ob ich mich anschließen könne, und er sagte ja. So erhielt ich die wunderbare Gelegenheit, der Armee des Colonels beizutreten – der Rest ist Geschichte.

Das CPA-Team bestand damals aus fünf Postdocs, von denen Martha Ludwig für meine Ausbildung am wichtigsten war. Ich arbeitete mit ihr an Strukturuntersuchungen von Substrat- und Inhibitorkomplexen der CPA und mit dem ganzen Team an der Bestimmung der Kristallstruktur des Apoproteins. Ich erinnere mich an die Aufregung, als es uns gelang, binnen einer Woche 5000 Reflexe mit einem Hilger-Watts-Linearrefraktometer aufzunehmen. Heute sind wir in der Lage, von Ribosomenkristallen 5 000 000 Reflexe in einer Stunde aufzunehmen, was 10^5 -mal schneller bei einem 80-mal größeren Komplex ist. Alle Computerprogramme waren in Fortran für einen IBM 7094 ohne Festplatte mit 32 K Speicher auf Lochkarten geschrieben. Der Vorteil der Lochkarten war, dass wir sie sammeln und als Altpapier verkaufen konnten, um damit alle paar Monate Laborpartys zu finanzieren. (Ich habe immer überlegt, dass wir ein Programm mit Namen GENCARD hätten schreiben sollen, um öfter Partys feiern zu können.)

Mit dem tollen Team, das der Colonel versammelt hatte, und bei seinem aufmunternden Führungsstil kam das Projekt gut voran. 1966 publizierten wir eine Elektronendichtekarte mit 6 Å Auflösung, die ein Modell des Polypeptid-Rückgrats beinhaltete, das ich etwas überoptimistisch gebaut hatte, das

aber schon viele der Struktureigenschaften richtig wiedergab. Martha und ich publizierten zusammen mit Flo Quiocco eine niedrig aufgelöste Elektronendichtekarte eines Inhibitorkomplexes, der das erste Beispiel für eine substratinduzierte Konformationsänderung darstellte. 1967 erhielten wir eine Elektronendichtekarte des Apo-CPA mit 2.0 Å Auflösung – was ich im Rückblick als ausgezeichnet einschätze –, die es uns selbst ohne Aminosäuresequenz erlaubte, die korrekte Position jeder Aminosäure im Polypeptidrückgrat abzuleiten. Damit war CPA nach Myoglobin und Lysozym die dritte hochauflöste Proteinstruktur, die gelöst werden konnte (zusammen mit drei anderen Proteinen, RNase A, RNase S und Chymotrypsin, die ebenfalls 1967 bestimmt wurden).

Anders als heutige Arbeitsgruppenleiter war der Colonel fast nie weg vom Institut, um an Konferenzen teilzunehmen oder Seminare zu geben. Allerdings verbrachte er einmal ein Freisemester in England, und während dieser Zeit kam ich auf die Idee, die Differenzkoeffizienten $F_{\text{derivative}} - F_{\text{native}}$ mit direkten Methoden zu phasieren, um so eine Fourier-Differenzkarte zu berechnen, die die Positionen der Schweratome deutlich anzeigen sollte. Nach seiner Rückkehr zeigte ich ihm das Paper, das ich über diese Arbeit geschrieben hatte, und er erlaubte mir, es in den *Acta Crystallographica* zu veröffentlichen, ohne ihn als Mitautor zu nennen (was unter heutigen Arbeitsgruppenleitern ebenfalls unüblich ist).

Der Colonel verschaffte mir die Gelegenheit, einen Vortrag auf der Protein Gordon Conference zu halten (die im Sommer 1966 unter dem Vorsitz von Fred Richards stattfand), was sich als sehr wichtig für meine weitere Laufbahn herausstellten sollte. Ich sprach über die CPA-Struktur und die durch Substrat- und Inhibitorkombination hervorgerufene Konformationsänderung nach dem Konzept der induzierten Passform. Dan Koshland war unter den Zuhörern, und er war hocherfreut über diese erneute experimentelle Bestätigung seiner Hypothese der substratinduzierten Konformationsänderungen. Ich nehme an, dass mein Vortrag und unser anschließendes Treffen ihn mit dazu bewog, sich beim Berkeley Biochemistry Department für mich einzusetzen. Man bot mir eine Stelle an der dortigen Fakultät an, und ich gab meine Zusage im späten Frühjahr 1967. Weil sich das Department 1970 gegen die Aufnahme einer Frau (Joan) in die Fakultät wehrte, gab ich meine Anstellung in Berkeley nach zwei Monaten wieder auf und nahm eine Stelle in Yale an, die mir Fred Richards angeboten hatte.

Das Laboratory of Molecular Biology in Cambridge

Zwischen meinen Anstellungen in Harvard und Berkeley verbrachte ich von 1967 bis 1970 drei Jahre am MRC Laboratory of Molecular Biology in Cambridge in der Gruppe von David Blow. Er war mir von Hilary Muirhead empfohlen worden, die beim Colonel Postdoktorandin und davor Studentin bei Max Perutz gewesen war. In Davids Labor arbeitete ich gemeinsam mit Richard Henderson an der Struktur von Chymotrypsinkomplexen mit diversen Substraten.

Das Cambridge Laboratory of Molecular Biology war ein ganz besonderes und herausragendes Institut. Viele Postdocs aus den USA erhielten dort ihre Ausbildung in Molekular-

und Strukturbioologie und sollten später diese Forschungsfelder in den USA prägen. Eine besonders einzigartige Einrichtung war die Kantine im Erdgeschoss, wo man am Morgen Kaffee, später Mittagessen und am Nachmittag Tee bekommen konnte. Die eigentliche Attraktion waren aber sicher nicht die diversen Würstchen und andere Köstlichkeiten. Das Besondere war vielmehr, dass Laborleiter, Postdocs und Doktoranden an zufälligen Tischen zusammensitzen konnten, um sich über Wissenschaft auszutauschen. Die Kantine war von Max gegründet worden und wurde von seiner Frau Gisela betrieben. Als ich in Cambridge anfing, war die Kantine so klein, dass immer nur ein paar Plätze frei waren. Es konnte deshalb gut vorkommen, dass ich an einem Tisch zu sitzen kam, an dem vielleicht Max, Francis Crick und Sydney Brenner (Abbildung 3E) mit Postdocs und Studenten saßen. Innerhalb von zwei Monaten hatte ich fast jeden im ganzen Institut getroffen. In den Gesprächen ging es stets um Wissenschaft und Experimente und nie um den Film, den jemand am Abend vorher gesehen hatte. Jeder trug Vorschläge und/oder Kritik bei. Anfangs fragte ich mich, wie irgendwer überhaupt Experimente machen konnte, wo doch alle soviel Zeit in der Kantine verbrachten. Doch mit der Zeit begriff ich, dass die vielen Debatten in der Kantine dazu führten, dass weniger unnütze Experimente gemacht wurden.

Es gab keine wöchentlichen Gruppentreffen, aber jedes Jahr fand ein einwöchiges Seminar statt – die „Crick-Week“ –, an dem praktisch das gesamte LMB teilnahm. Francis saß stets in der ersten Reihe und stellte häufig viele Fragen. Einmal erinnere ich mich, dass Francis mitten während eines Vortrags von Fred Sanger aufsprang: „*Fred, wenn du (dies) und (dies) und (dies) tun würdest, könntest du (das) und (das) herausfinden.*“ Fred drehte sich ohne die Tafel zu verlassen zu Francis um, sagte „*So ist es, Francis, so ist es. Du hast es begriffen*“, und fuhr dann fort. Da es bei der Crick-Week um viele molekular- und strukturbiologische Themen ging, war es sehr hilfreich, dass die Chefs in der ersten Reihe Fragen stellten, die viele von uns nicht zu stellen wagten. Bei einem Vortrag, in dem ein in Eukaryoten und Prokaryoten vor kommender Prozess verglichen wurde, fragte Max: „*Was ist ein Eukaryot und was ein Prokaryot?*“, denn es waren Begriffe, die gerade erst aufkamen. Ich war froh, dass Max diese Frage gestellt hatte, weil ich keine Ahnung hatte, was diese Begriffe bedeuteten. Sydney Brenner hatte Samstags morgens in der Instituküche immer Kaffee bereit, und er war immer da mit den Postdocs und Studenten seines Biologie-Teams und den anderen von uns, die vorbeischauen wollten. Sydney würde sich unvermeidlich über irgendein interessantes Thema auslassen und mit witzigen Geschichten aufzukern.

Auf diese Weise erfuhr ich von allen wichtigen Forschungsprojekten am LMB – dank Crick-Week, Kantine, Samstagskaffee, zufälligen Gesprächen auf dem Korridor und außerdem noch abendlichen Besuchen im Pub, was eine Sache der amerikanischen Postdocs war (die Briten waren abends meist nicht dabei). In dieser Zeit entwickelte ich mein Interesse für die strukturelle Basis der Mechanismen, nach denen die vielen Proteine und Nucleinsäuren, die in Cricks „Zentralem Dogma“ involviert waren, ihre Funktionen wahrnehmen: Wie DNA zu DNA kopiert wird, wie DNA zu

RNA transkribiert wird und wie schließlich RNA in ein Protein übersetzt wird.

Computer waren in Cambridge nur sehr schwer zugänglich. Das LMB benutzte den Computer des Astronomischen Instituts. Wir durften nur zwei Eingaben am Tag machen, und morgens durfte die Berechnung nicht länger als zwei Minuten dauern. Ich überprüfte meine Lochkarten wieder und wieder, um möglichst wenige Fehler zu haben; eine von nur zehn Gelegenheiten die Woche wäre sonst vertan. Zurückblickend ist es erstaunlich, dass wir überhaupt vorankamen. Gewiss dauerte alles viel länger als heute.

Irgendwann in meinem zweiten Jahr kam Brian Hartley (Abbildung 3C) auf mich zu (Brian arbeitete gemeinsam mit David Blow über Chymotrypsin) und wollte wissen, welches Forschungsprojekt ich plante, wenn ich das LMB verlassen und nach Berkeley gehen würde. Ich sagte, ich wollte die Struktur einer Aminoacyl-tRNA-Synthetase aufklären, letztlich auch im Komplex mit Substraten einschließlich tRNA. Das ist der Schritt, bei dem eine spezifische Aminosäure an die tRNA mit dem zugehörigen korrekten Anticodon angehängt wird. Brian klopfte mir auf die Schulter und sagte: „*Schön, schön, mein Junge. Das ist ein interessantes Problem, aber du musst an etwas arbeiten, das du erfolgreich abschließen kannst. Ich schlage vor, du kümmert dich um die Struktur der Hexokinase.*“ Ich dankte ihm für den Ratschlag und lief in die Bibliothek, um herauszufinden, was Hexokinase ist. Aus den Arbeiten von Dan Koshland (Abbildung 3D) erfuhr ich, dass er die Hexokinasereaktion als sein fundamentales Beispiel dafür verwendete, warum manche Enzyme eine substratinduzierte Konformationsänderung durchlaufen müssen. Seine Überlegung war die folgende: Wenn das Enzym starr wäre und damit alle katalytischen Gruppen exakt ausgerichtet sind, um den nucleophilen Angriff der OH-Gruppe in Position 6 der Glucose auf die α -Phosphatgruppe von ATP zu katalysieren, warum würde dann Wasser das ATP nicht in Abwesenheit von Glucose hydrolysieren? Die 6-OH-Gruppe ist ja letztenendes ein Wassermolekül mit anhängenden Kohlenstoffatomen. Er vermutete, dass die Bindung von Glucose eine Konformationsänderung im Enzym hervorrufen muss, die für die Katalyse notwendig ist. Also begann ich in Cambridge, Hexokinasekristalle zu züchten und verbrachte die nächsten zehn Jahre mit dem Studium dieses Enzyms. Mentorschaft, und nicht nur durch den direkten Vorgesetzten, ist unentbehrlich.

Meinen ersten Projektantrag bei den National Institutes of Health (NIH) reichte ich 1969 ein. Ich brachte darin vor, die Struktur der Hexokinase aus Hefe bestimmen zu wollen, von der ich bereits geeignete Kristalle für die Röntgenstrukturanalyse gezüchtet hatte. Ich musste nach Berkeley kommen, um mich dort einem NIH-Gremium vorzustellen, und einer der Gutachter fragte mich, wie ich die Röntgendiffraktometerdaten sammeln wolle. Ich sagte mit einem Diffraktometer, worauf man mir erzählte, dies würde nicht funktionieren, weil die Elementarzelle meiner Hexokinasekristalle zu groß wären (200 Å in einer Raumrichtung). Das war natürlich ein alberner Einwand, weil man einfach den Detektor weiter weg vom Kristall platzieren musste. Doch der Gutachter blieb unerschütterlich, und so wurde mein erster Antrag schließlich abgelehnt. (Jahrzehnte später traf ich ebendiesen Gutachter

in einem Aufzug, und er fragte mich, wie wir die Struktur der Hexokinase gelöst hätten. Meine Antwort war: „*Mit einem Diffraktometer*“.)

Ende 1969 oder Anfang 1970 besuchte Fred Richards (Abbildung 4) das LMB, und ich hatte die Gelegenheit mit ihm zu sprechen. Ich machte mir Sorgen über meine Finan-



Abbildung 4. Dozenten am Yale Center of Structural Biology im Jahr 1995, als wir unsere Arbeiten über das Ribosom begannen. Oben die HHMI-Gruppe: Jennifer Doudna, Paul Sigler und Axel Brünger (von links nach rechts); unten die WERMS-Gruppe im Jahr 2001: Hal Wyckoff, Fred Richards, ich und Peter Moore (hinten von links nach rechts) sowie vorne Don Engelmann.

zierung in Berkeley und fragte ihn, ob für mich eine Anstellung in Yale in Frage käme. Er wollte sich darum kümmern und mir Bescheid geben. Jahre später erfuhr ich von Sydney Brenner bei einem Mittagessen am King's College, dass Fred nach dem Gespräch mit mir in sein Büro kam und ihn bat, einen seiner amerikanischen Postdocs, der offenbar ein Angebot aus Yale hatte, auf eine schnelle Entscheidung zu drängen. Sydney rief den Postdoc sogleich in sein Büro, schloss die Tür, legte ein Stück Papier auf den Tisch und sagte ihm, er dürfe den Raum nicht eher verlassen, bis er einen Brief an Fred geschrieben und unterzeichnet hatte, in dem er das Angebot von Yale entweder akzeptierte oder ablehnte. Er lehnte ab, und Sydney gab den Brief an Fred weiter, der nun Cambridge mit zwei vakanten Stellen in der Tasche verließ. Fred wollte aus dem Grund zwei freie Stellen haben, weil Fakultätsmitglieder in Berkeley Joan anwerben wollten. Seine Idee war, Yale ins Vordertreffen gegenüber Berkeley zu bringen, indem man uns beiden eine Stelle anbot. Und tatsächlich ging sein Plan auf.

Yale

Ich wechselte nach Yale im Spätherbst 1970 und begann dort mit unseren Strukturuntersuchungen an der Hexokinase aus Hefe mit und ohne das gebundene Substrat Glucose. Dies sollte das Hauptprojekt unseres Labors während der ganzen 70er Jahre werden. Es war ein großer Glücksfall, dass Robert Fletterick schon bald als mein erster Postdoc in meine Gruppe kam und an der Hexokinase mitarbeitete. Bob war ursprünglich für ein Postdoktorat bei Hal Wyckoff nach Yale gekommen, wollte aber gerne die Gruppe wechseln. Hal war in dieser Hinsicht sehr entgegenkommend. Unsere Hexokinasestrukturen mit und ohne gebundene Glucose zeigten, dass die größten Konformationsunterschiede in einer bestimmten Untereinheit vorlagen, und untermauerten eindrucksvoll, dass Koshlands Hypothese der induzierten Passform die Spezifität der Hexokinase richtig erklärte. Die Abbildungen unserer Hexokinasestrukturen mit und ohne Glucose wurden in mehr Lehrbüchern publiziert als jede andere Arbeit aus meiner Gruppe. Brian Hartley hatte ohne Frage einen guten Vorschlag für meine weitere Forschung gemacht. Ich frage mich manchmal, was ich in den 70ern erreicht hätte ohne die Hexokinase-Diskussion mit Hartley auf dem Flur.

Ein vielleicht entscheidender Grund, weshalb die Strukturbiologie in Yale Anfang der 70er Jahre eine so exzellente Qualität hatte, war das gemeinsame Rechen- und Röntgenzentrum – das „Kernlabor“. Als ich 1970 anfing, teilten sich Fred Richards und Hal Wyckoff, die die Struktur der RNase S 1967 aufgeklärt hatten, ein Röntgen- und Rechnerlabor, dem ich mich anschloss und noch weitere Ausrüstung hinzufügte. 1975 schlug ich Fred vor, wir sollten über einen Förderantrag für unsere Strukturbiologearbeiten im Rahmen eines NIH-Programms nachdenken, von dem ich kurz vorher erfahren hatte. Fred übernahm den Vorsitz einer Fünfergruppe – der WERMS-Gruppe bestehend aus Wyckoff, Engelmann, Richards, Moore und mir –, und der Antrag wurde 1976 bewilligt. Das WERMS-Projekt, wie wir es nannten, läuft inzwischen im 34. Jahr, allerdings bin ich der einzige „WERM“, der noch dabei ist. In den späten 80ern erhielten wir vom Howard Hughes Medical Institute (HHMI) zusätzliche Fördermittel für das zentrale Röntgen- und Rechnerlabor, darunter zwei Stellen für technische Mitarbeiter und weitere Ausrüstung. Daneben wurden eine Stelle für einen Wissenschaftler bei mir und außerdem weitere Dozenten- oder Forscherstellen für das MB&B-Department bewilligt. Mitte der 90er Jahre gehörten auch Paul Sigler, Axel Brünger und Jennifer Doudna zur WERMS-Gruppe (Abbildung 4).

Diese Gruppe aus sieben Labors bildete das Yale Center for Structural Biology (CSB), und Fred Richards wurde vom Präsidenten der Yale University zum ersten Direktor des CSB ernannt. Im Kernlabor ging es zu wie im Bienenstock mit Studenten, Postdocs und Technikern, die zusammenarbeiteten und sich gegenseitig halfen. Mitte der 90er arbeiteten sechs Techniker im Kernlabor und rund 100 Postdocs, Studenten und Techniker insgesamt in den CSB-Labors. Alle sieben Fakultätsmitglieder des CSB von 1995 (als wir mit der Arbeit am Ribosom begannen) waren oder sind auch Mitglieder der US National Academy of Sciences. In dieser Zeit boten die sieben Labors und ihre intensive und kollegiale

Zusammenarbeit die vielleicht beste Umgebung der Welt, um Strukturbiologie im Allgemeinen und die Strukturbestimmung des Ribosoms im Besonderen zu betreiben.

Unser Sohn Jon

Unser Sohn Jon wurde 1980 geboren. Er begegnete seinem ersten Nobelpreisträger, Fred Sanger, im Alter von 4 Wochen bei einer Feierstunde des LMB zu Freds zweitem Chemienobelpreis. Wir waren zufällig an diesem Tag in Cambridge, nachdem wir Konferenzen in der Schweiz, Deutschland und London besucht hatten. Jon war während der nächsten fünfzehn Jahre bei vielen Konferenzen auf der ganzen Welt dabei, bis Baseball Besitz von ihm ergriß.

Ich begann mit Jon Tennis und Baseball zu spielen, als er in der Grundschule war, und ich brachte einen Basketballkorb an der Garage an. Jedes Wochenende im Sommer gingen wir zu einem Baseballplatz in unserem Heimatort Stony Creek und trainierten Werfen, Fangen und Schlagen. Das ging so lange gut, bis er begann, den Ball aus dem Park ins Gras der Salzmarsch zu schlagen. In der Highschool war er vier Jahre lang Quarterback im Football-Team, Deckungsspieler im Basketball-Team und Werfer im Baseball-Team. Am Ende seines Abschlussjahres schaffte er es in die Nachwuchssichtung der Major League, entschied sich aber klugerweise für ein Studium in Yale, wo er, zusammen mit seinen zwei Klassen- und Mannschaftskameraden Craig Breslow und Matt McCarthy, molekulare Biophysik und Biochemie als Hauptfächer belegte – und natürlich Baseball. Am Ende des ersten Jahres wurde Jon von den Milwaukee Brewers angeworben und erhielt ein Handgeld, das höher war als mein Anteil am Nobelpreis 2009. Nachdem eine Schulterverletzung die Baseballkarriere beendet hatte, studierte er an der Yale Law School, und heute arbeitet er als Unternehmensberater bei McKinsey. Breslow, der Student in Joans Arbeitsgruppe war und auf die Medical School wollte, wurde ebenfalls von den Brewers angeworben und ist heute Werfer bei den Oakland Athletics.

Jon lernte Skifahren bei unseren „Riboski“-Trips, wie wir sie später nannten. Ab Ende der 80er gingen wir mit „RNA-fixierten“ Freunden und deren Familien alljährlich in Skituraub: Tom und Carol Cech (+2), Jim und Elsbet Dahlberg (+2), John Abelson (+1) und Olke und Lori Uhlenbeck. Die Kinder kamen in die Skischule, und Jon machte schnell Fortschritte. Mit 12 konnte er mich auf Skier umkreiseln. Vielleicht am besten im Gedächtnis geblieben sind die beiden Viergestouren mit Jon nach Snowbird in Utah, beide Male an Thanksgiving in seinen ersten und letzten Jahren in der Highschool (Abbildung 5). Er fuhr die schwarzen Abfahrten, ich die blauen, und an der Talstation des Skilifts trafen wir uns wieder.

Die strukturelle Grundlage von Cricks zentralem Dogma der Molekularbiologie

Unsere Jahrzehnte dauernde Suche nach einem strukturellen Verständnis der Mechanismen, nach denen Makro-



Abbildung 5. Thanksgiving November 1997: Mein Sohn Jon und ich bei unserer Skitour nahe Snowbird in Utah.

moleküle den Prozess von der DNA zur RNA, weiter zur RNA und schließlich zum Protein ausführen – Cricks zentrales Dogma der Molekularbiologie –, begann 1981 mit der Strukturaufklärung des Katabolitaktivatorproteins (CAP) im Komplex mit cAMP. Es war die erste Struktur eines DNA-bindenden Proteins, in dem Fall eines Transkriptionsaktivators. Unsere nächste Struktur des CAP im Komplex mit DNA (1991) zeigte eine bemerkenswerte Biegung des DNA-Rückgrats, und das gebundene CAP wies im Vergleich zum ligandenfreien CAP eine sehr große Umorientierung in der Konformation der DNA-bindenden Domänen auf. Dies erklärte, wie die Bindung von cAMP das CAP aktiviert und die DNA-Bindung ermöglicht.

In den 80er Jahren bestimmten wir auch die erste Struktur einer DNA-Polymerase, des Klenow-Fragments der DNA-Polymerase I (für dessen Entdeckung Arthur Kornberg seinen Nobelpreis erhielt) sowie von einem Komplex mit einem DNA-Substrat im aktiven Zentrum der 3',5'-Exonucleasedomäne. Ausgehend von der Struktur des Substratkomplexes entwickelten wir den Zwei-Metallionen-Mechanismus einer Phosphorylübertragungsreaktion sowie auch unseren späteren Vorschlag, dass dieser Mechanismus sich in vielen Ribozymen wiederfindet (wie es in jüngerer Zeit für mehrere Beispiele gezeigt wurde). Wir veröffentlichten auch unsere erste Struktur eines Fragments des ortsspezifischen Rekombinationsenzymes (der $\gamma\delta$ -Resolvase), dem die sequenzspezifische DNA-Bindedomäne fehlte. Die für mich aufregendste Entdeckung in den späten 80er Jahren war die Strukturaufklärung der Glutaminyl-tRNA-Synthetase im Komplex mit tRNA^{Gln} und ATP. Das war das Problem, an dem ich schon vor 20 Jahren hatte arbeiten wollen, als Brian Hartley mir den klugen Rat gab, dass es dafür noch zu früh sei. Offensichtlich hatte er recht. Diese erste Struktur eines Synthetase-tRNA-Komplexes zeigte, wie die Synthetase die korrekte tRNA mit dem Glutamin-Anticodon erkennt und von allen anderen tRNAs unterscheidet. Dies ist der erste entscheidende Schritt bei der Übersetzung des genetischen Codes in Proteine.

In der ersten Hälfte der 90er Jahre machten wir viele aufregende Fortschritte bei der Bearbeitung des Crickschen Dogmas. Wir lösten die erste Struktur der reversen Transkriptase von HIV im Komplex mit einem nicht-nukleotidischen Inhibitor, einem der seinerzeit wenigen Wirkstoffe zur Behandlung von AIDS. Wir bestimmten auch die erste der vielen T7-RNA-Polymerasestrukturen, die wir seither in vielen funktionellen Zuständen eingefroren erhalten. Dies war der Anfang unserer Untersuchungen zum Transkriptionsmechanismus der DNA in RNA – ausgehend vom Initiationskomplex der T7-RNA-Polymerase mit ihrem Promotor und dann weiter zu den Elongations- und Terminationsstufen. Beträchtliche Fortschritte gab es auch bei unseren Untersuchungen zur DNA-Rekombination. Wir klärten die erste Struktur eines an der homologen Rekombination beteiligten Enzyms auf (RecA), ebenso wie die Struktur der ortsspezifischen Rekombinase (der $\gamma\delta$ -Resolvase) im Komplex mit ihrer spezifischen DNA-Struktur. Während die letztere Struktur erklären konnte, wie die Resolvase ihre DNA-Sequenz erkennt, blieb noch offen, wie das Protein die beiden DNA-Doppelstränge zueinander bringt und einen synaptischen Komplex bildet oder wie der Strangtausch vonstatten geht. Die Klärung dieser Fragen sollte uns weitere 10 Jahre kosten. Wir erhielten auch die Struktur des ersten binären Komplexes einer DNA-Polymerase (des Klenow-Fragments) mit einem DNA-Doppelstrang als Substrat im aktiven Zentrum der Polymerase, allerdings ohne das eintretende dNTP.

Bis etwa 1995 hatten wir viele mechanistische Einblicke in alle Schritte des zentralen Dogmas gewonnen, mit Ausnahme des letzten: der Proteinsynthese am Ribosom. Zu gerade dieser Zeit, im Herbst 1995, kam Nenad Ban in meine Gruppe, um an der Struktur des Ribosoms zu arbeiten; es war die richtige Person zur richtigen Zeit. Wir hatten damals eine Zusammenarbeit mit Peter Moore, und zu Ban gesellten sich später noch Poul Nissen und Jeff Hansen hinzu. Zwischen 1995 und 2000 widmeten sich alle drei intensiv dem Ziel, die ribosomale 50S-Untereinheit und einen Komplex mit einem Übergangszustandsintermediat zu erhalten (Abbildung 6). Jeff Hansen bestimmte außerdem die Strukturen vieler Komplexe der 50S-Untereinheit von *Haloarcula marismortui* mit Antibiotika (die an das Peptidyltransferasezentrum banden). Vor allem diese Forschungen bildeten auch die Grundlage für unsere Gründung der Rib-X Pharmaceuticals Inc. Die Strukturaufklärung von Substratkomplexen wurde dann in den frühen 2000er Jahren von meinem Doktoranden Martin Schmeing weiterverfolgt (Abbildung 6). Unser kleines Ribosomenteam fand sich zu täglichen Diskussionsrunden zusammen, um Fortschritte zu berichten und Ideen auszutauschen. Die Berechnung der Elektronendichtekarte mit 2.4 Å Auflösung Anfang 2000 und die Monate bei der Konstruktion des Ribosomenmodells waren die aufregendsten Forschungszeiten, die ich je erlebt habe. Wir hatten keine Ahnung, wie die Struktur des Ribosoms und insbesondere der RNA aussehen würde, und in ihr Inneres zu schauen, war einfach spannend.

Wenn ich auf meine wissenschaftliche Laufbahn zurückblickte, steht mir klar vor Augen, wie überaus wichtig eine gute Betreuung in den frühen Stadien einer Karriere ist – ebenso



Abbildung 6. Einige der Hauptprotagonisten des Ribosomenprojekts beim Empfang der Nobelstiftung im Nordic Museum, Stockholm, am 9. Dezember 2009. Von links nach rechts Poul Nissen, ich, Peggy Eaterton, Peter Moore, Nenad Ban, Martin Schmeing und Jeff Hansen. Peter ist mein langjähriger Kollege an der Fakultät, Freund und Mitarbeiter am Ribosomenprojekt. Poul und Nenad sind ehemalige Postdocs in meinem Labor, die in erster Linie für die Strukturaufklärung der 50S-Untereinheit verantwortlich waren. Jeff ist ein ehemaliger Postdoc, zu dessen wichtigsten Leistungen die Strukturaufklärung der Komplexe der 50S-Untereinheit mit Antibiotika und Substratintermediatanaologen gehörten. Martin ist ein ehemaliger Doktorand, dessen zahlreiche Strukturen von Substratanaologenkomplexen es möglich machen, einen Videofilm der Knüpfung der Peptidbindung an der 50S-Untereinheit zu erstellen. Peggy war 25 Jahre lang meine Sekretärin und war Drehscheibe und Gedächtnis der Arbeitsgruppe.

wichtig, und dies in jeder Phase einer Laufbahn, wie die persönlichen Gespräche, Diskussionen und Debatten mit Kollegen. Außergewöhnliche Entdeckungen, Einsichten und Entwicklungen ereignen sich nicht im luftleeren Raum. Das hervorragende Umfeld in Yale in den 90er Jahren und die langfristige Unterstützung risikoreicher Projekte durch das Howard Hughes Medical Research Institute hat unsere Forschungen über die Struktur der großen Untereinheit des Ribosoms enorm beflogt. Wenn ich beobachte, wie mehr und mehr meiner Fakultätskollegen, Studenten und Postdocs fast nur noch per E-Mail miteinander kommunizieren anstatt die Ideen am Mittagstisch zu diskutieren (wie ich es in Cambridge und in den ersten Jahrzehnten in Yale erlebt hatte), so stelle ich mir die Frage, ob sie so kreativ sind und soviel Spaß an der Wissenschaft haben, wie es in Angesicht zu Angesicht sein könnte.

Nobelvortrag

Meine Leidenschaft für das Studium biologischer Makromoleküle wurde durch eine Dunham-Vorlesung geweckt, die Max Perutz an der Harvard Medical School im Frühjahr 1963 hielt – ein Jahr nach seinem gemeinsamen Nobelpreis mit John Kendrew für die erste Strukturbestimmung eines Proteins. Er zeigte einem großen Auditorium etwas, das niemand von uns bisher gesehen hatte, nämlich das erste Stereobild der atomaren Struktur eines Proteins, des Myoglo-

bins. Als die Myoglobinstruktur dreidimensional über seinem Kopf erschien, kam ein lautes „Oh“ aus den Zuschauerreihen, und ich wusste von da an, auf welche Weise ich die Chemie biologischer Strukturen und Prozesse verstehen wollte.

Ich begann meine Doktorarbeit in Harvard bei William N. Lipscomb – einem der Chemienobelpreisträger des Jahres 1976 – über die Struktur der Carboxypeptidase A. Danach ging ich als Postdoc zu David Blow am MRC Laboratory of Molecular Biology in Cambridge, wo ich mich mit Chymotrypsin befasste. Meine Zusammenarbeit mit Jim Watson und Wally Gilbert in Harvard und auch die Kontakte zu Francis Crick und Sydney Brenner während meiner Zeit in Cambridge trugen ganz entscheidend dazu bei, dass ich die folgenden 30 Jahre die strukturelle Basis von Cricks zentralem Dogma der Molekularbiologie („DNA macht DNA macht RNA macht Protein“) zu ergründen versuchte. Dieser Weg führte uns am Ende zur atomaren Struktur der großen Untereinheit des Ribosoms, die die Knüpfung der Peptidbindung katalysiert, und zahlreichen Strukturen von Komplexen dieser Untereinheit mit Substratanaloga und Antibiotika.

In den frühen 60er Jahren, als ich noch Student war, publizierte Watson eine Abbildung, die den damaligen Kenntnisstand über die Ribosomenstruktur zusammenfasste.^[1] Sie zeigte die A-Stelle für die Positionierung der Aminoacyl-tRNA, obwohl nichts über die Struktur der tRNA bekannt war. Die P-Stelle, die neben der A-Stelle lag, trug die Peptidyl-tRNA, doch der Reaktionspfad, den das Polypeptid durchlief, war unbekannt. Auch die Existenz der E-Stelle, der Austrittsstelle, war unbekannt. 1976 gelangen Jim Lake elektronenmikroskopische Aufnahmen der großen und kleinen Untereinheit des Ribosoms sowie des 70S-Ribosoms, die einen erstmaligen Blick auf die äußere Gestalt des Ribosoms und seiner Untereinheiten gewährten.^[2] Im Jahr 1995 bestimmten Joachim Frank und Mitarbeiter unter Anwendung der in selbigem Arbeitskreis entwickelten Einzelpartikel-Kryoelektronenmikroskopie die Kristallstruktur des 70S-Ribosoms mit drei gebundenen tRNA-Molekülen in einer Auflösung von 25 Å.^[3]

Bis 1995 hatten wir strukturelle Einblicke in die meisten Schritte des „zentralen Dogmas“ gewonnen, mit Ausnahme des letzten Schrittes, der Proteinsynthese durch das Ribosom. Mitte der 90er Jahre schien die Zeit reif, auch diese Herausforderung anzugehen, denn die Rechnerleistungen und röntgenkristallographischen Methoden – einschließlich Synchrotron-Röntgenquellen und CCD-Detektoren – hatten ein hinreichend hohes Niveau erreicht, um Röntgendiffraktionsdaten von Kristallen solch großer Komplexe sammeln zu können. Schon 1985 hatten Ada Yonath und Wittmann gezeigt, dass die 50S-Untereinheit des Ribosoms kristallisiert werden kann,^[4] und 1991 wurden Kristalle der ribosomalen 50S-Untereinheit aus *Haloarcula marismortui* (Hma) gewonnen, die eine Auflösung von 3.0 Å zuließen.^[5] Die Bildung dieser hochauflösenden Kristalle versprach, dass prinzipiell auch die atomare Struktur des Ribosoms bestimmt werden konnte. Die Herstellung von Kristallen allein reichte indes nicht, denn eine große Herausforderung verblieb: das Phasenproblem. Die auf 7 Å aufgelöste Elektronendichtekarte der 50S-Untereinheit aus Hma, die 1995 veröffentlicht wurde,^[6] ließ mich (und andere) vermuten, dass die Herausforderung noch nicht ge-

meistert war, denn die Karte sah nicht nach RNA aus. Ein anderer Ansatz war nötig.

Im Herbst 1995 kam Nenad Ban in meine Gruppe, der daran interessiert war, die Struktur des Ribosoms oder der großen Untereinheit zu erforschen – der richtige Mann zur richtigen Zeit. Ich schlug ihm vor, sich die Struktur der großen Untereinheit aus Hma vorzunehmen, was er auch tat. Ich entschied auch, dass wir mit Peter Moore zusammenarbeiten sollten, einem engen Freund und Kollegen, der als eine der Säulen der Ribosomenforschung galt. Peter ist ein passionierter Angler und fängt gern große Fische – und das Ribosom war in der Tat ein großer Fisch. Mit Unterstützung von Peters Technikerin Betty Freeborn präparierte Nenad die 50S-Untereinheit des Hma-Ribosoms und machte sich an die Strukturaufklärung. Zur gleichen Zeit versuchte einer von Peters Studenten, die 30S-Untereinheit oder einzelne Domänen zu kristallisieren. Bis Anfang 1997 hatte Nenad alle Vorarbeiten für die Ermittlung einer hochauflösten Struktur erledigt, einschließlich der korrekten Lokalisierung der Schwerelemente in mehreren markierten Derivaten. Poul Nissen schloss sich ihm nun an, und im Laufe der folgenden drei Jahre führten beide die Strukturbestimmung der 50S-Untereinheit des Hma-Ribosoms durch.

Die Kristalle, die mit den bekannten Verfahren erhalten wurden,^[5] erreichten eine Auflösung von 3 Å, waren aber extrem dünn und oft polykristallin. Die auftretenden Kristalldefekte – unter anderem fehlende Isomorphie, hohe Strahlungsanfälligkeit, ungleichförmige Mosaikstrukturen, ungleichmäßige Reflexionsmuster, hohe Fragilität, widriger Kristallhabitus – wurden von Yonath und Franceschi (1998)^[7] sowie Harms et al. (1999)^[8] ausführlich beschrieben. Nissen führte ein Rückextraktionsverfahren ein, das isometrische und einheitliche Kristalle lieferte, die gelegentlich Auflösungen von 2.4 Å zeigten.^[9,10] Martin Schmeing entwickelte später einen Ansatz, der Kristalle mit reproduzierbaren Auflösungen zwischen 2.4 Å und 2.2 Å lieferte.^[11,12] Bei dieser Auflösung können die Strukturen Aufschluss über die chemischen Mechanismen der an der Proteinsynthese beteiligten Prozesse geben.

Was war nun die große Herausforderung, die es zu überwinden galt? Warum galt die Bestimmung der atomaren Struktur des Ribosoms als eine so große Hürde? Das Haupthindernis bei der Bestimmung von Kristallstrukturen ist das sogenannte „Phasenproblem“. Jeder Röntgenreflex hat eine Intensität, die direkt gemessen werden kann, und eine Phase, die nicht direkt messbar ist. Max Perutz erhielt 1962 den Nobelpreis unter anderem für die Entwicklung der Methode des isomorphen Schweratomesatzes, mit der sich das Phasenproblem bei der Strukturbestimmung von Makromolekülen umgehen lässt. Bei diesem Verfahren werden Schweratome spezifisch an den Kristall gebunden, und ihre Positionen im Kristall werden bestimmt. Aus diesen Informationen erhält man die Phasenwinkel, die zusammen mit den Beugungsamplituden die Berechnung einer Elektronendichtekarte ermöglichen.

Das Phasenproblem bei Ribosomen röhrt von der schieren Größe des Moleküls her. Ein einzelnes Schweratom liefert ein zu schwaches Beugungssignal, sodass z. B. 100 Schweratome nur schwer, wenn überhaupt lokalisierbar

wären. Es ist ungefähr so, als würde man das Gewicht eines Schiffskapitäns dadurch bestimmen, dass man das Gewicht des Schiffs vom Gewicht des Schiffs plus Kapitän abzieht. Mit einem kleinen Segelboot wäre das möglich, mit der Queen Mary würde man ein sehr kleines Signal erhalten – und das Ribosom ist die Queen Mary der Makromoleküle. Es ist gut hundertmal schwerer als ein Lysozym.

Um einen superschweren Kapitän zu haben, verwendete Ban verschiedene Schweratomcluster. Einer der wichtigsten enthielt 18 Wolframatome (W_{18}), die zusammen mit den übrigen Atomen des Clusters etwa 2000 Elektronen beisteuerten. Bei sehr niedriger Auflösung – 20 Å oder weniger – streut der Cluster annähernd wie ein einzelnes Schweratom. Da die Röntgenstreuung proportional zum Quadrat der Elektronenzahl ist, ist das Streuungssignal des W_{18} -Clusters über 600-mal stärker als das eines einzelnen Wolframatoms mit 78 Elektronen. So ist die Streuung bei niedriger Auflösung auch sehr viel größer als die von 100 gebundenen Osmiumhexamin-Komplexen (Abbildung 7).

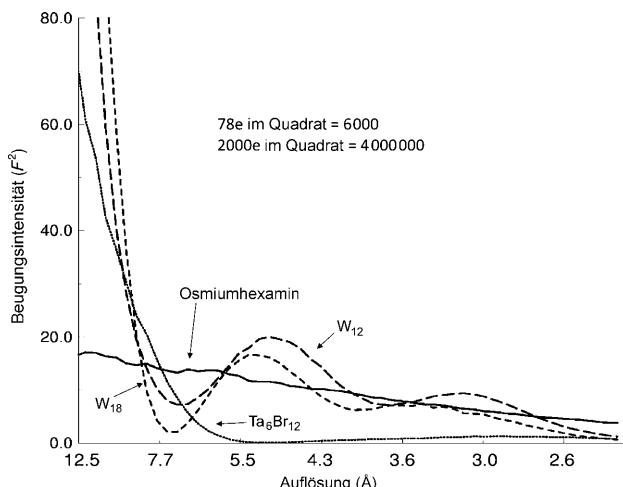


Abbildung 7. Die berechnete radiale Verteilung der Beugungsintensitäten, wie sie von vier der zur Phasenbestimmung eingesetzten Schweratomderivate erzeugt wurden, als Funktion der Auflösung. Bei sehr niedriger Auflösung ist die Beugung an den Clustern, z. B. dem W_{18} -Cluster mit ca. 2000 Elektronen, sehr groß im Vergleich zur Beugung an mehr als 100 gebundenen Osmiumhexaminen.

Nenad Ban lokalisierte die Position eines spezifisch gebundenen W_{18} -Clusters mithilfe einer Patterson-Differenzkarte in 20 Å Auflösung.^[13] Danach verifizierte er die Lokalisierung, indem er eine Elektronendichtheendifferenzkarte mit Informationen aus den Schweratomersatzphasen berechnete, die er aus Joachim Franks Kryoelektronenmikroskopiekarte der 50S-Untereinheit aus Hma ableitete (Abbildung 8, oben links). Ban löste dann die Strukturen weiterer Derivate mit Schweratomclustern, wobei er die Phaseninformationen aus dem W_{18} -Derivat verwendete. Gegen Ende des Jahres 2007 hatte er nur aus Röntgenbeugungsdaten eine schöne 9-Å-Karte der 50S-Untereinheit erhalten (Abbildung 9, oben rechts), die die erwarteten RNA-Doppelhelices zeigte und die gleiche allgemeine Form hatte, die man auch in der Kryo-EM-Karte sah.^[13]

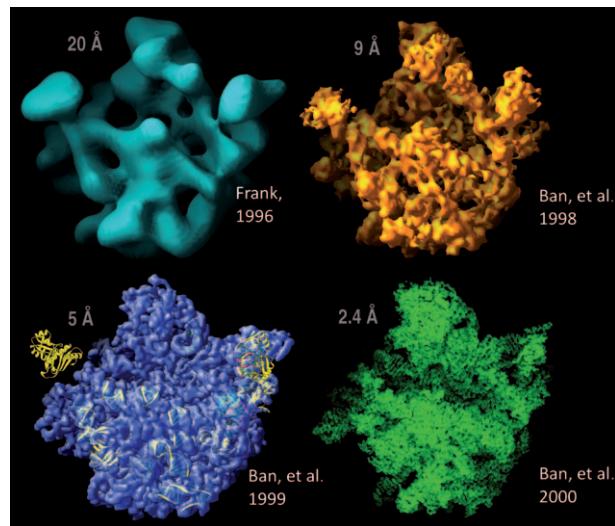


Abbildung 8. Verbesserung der Auflösung von Elektronendichtheekarten der ribosomalen 50S-Untereinheit, beginnend mit der Kryo-EM-Karte mit 20 Å Auflösung von Joachim Frank (1996) über unsere 9-Å-Karte,^[13] auf der erstmals die RNA-Helices zu sehen waren, und die 5-Å-Karte,^[9] in die bekannte Proteinstrukturen eingepasst werden konnten, bis hin zu einer 2.4-Å-Karte,^[10] mit der sich ein vollständiges Atommodell aufbauen ließ.

Unsere Strategie in den ersten vier Jahren kristallographischer Studien an der 50S-Untereinheit war, bei niedrigerer Auflösung als 4.5 Å zu arbeiten, was wir mit dem Synchrotronstrahl X12C (mit Ablenkagnet) des Brookhaven National Laboratory auf Long Island, New York, tun konnten. Unsere eigene Röntgenquelle mit rotierender Elektrode war zu schwach, doch die X12C-Quelle war für niedrige Auflösungen gut geeignet, außerdem war die Einrichtung sehr gut zugänglich für uns. Nachdem wir schließlich alle unsere Schweratomderivate hergestellt und die Schweratome korrekt lokalisiert hatten, machten wir uns Ende 1999 erstmals auf den Weg nach Brookhaven, wo wir binnen 4 Tagen die Daten sammelten, die uns die Berechnung einer 3.0-Å-Karte ermöglichten und mit der wir begannen, ein atomares Modell aufzubauen.

Die Auflösung unserer Karten wurde ausgehend von der ursprünglichen 9-Å-Auflösung (Abbildung 8) allmählich besser. 1999 publizierten wir eine 5-Å-Karte der 50S-Untereinheit aus Hma, in die bekannte r-Proteinstrukturen eingepasst werden konnten.^[9] Im Jahr 2000 publizierten wir die atomare Struktur der ribosomalen 50S-Untereinheit aus einer 2.4-Å-Karte. Für die Berechnung verwendeten wir Daten, die wir am Argonne National Laboratory gemessen hatten (Abbildung 8, unten rechts).^[10] Außerdem lösten wir die Struktur eines Komplexes mit einem Substratanalogen des Übergangszustands der Peptidyltransferasereaktion.^[14] Zur gleichen Zeit, zu der wir 1999 unsere 5-Å-Karte veröffentlichten, publizierten Ramakrishnan et al. eine 5.5-Å-Karte der 30S-Untereinheit^[15] und Noller et al. eine 7-Å-Karte des 70S-Ribosoms.^[16] Beide hatten die Phaseninformationen mit einem ähnlichen Ansatz erhalten wie wir mit unserem 1998 veröffentlichten Cluster-Verfahren. Kurz nachdem unsere Artikel mit der 2.4-Å-Struktur der 50S-Untereinheit er-

schienen waren, wurden auch zwei Modelle der 30S-Untereinheit veröffentlicht.^[17,18] Ein Jahr später lösten Noller und Mitarbeiter ein Modell eines 70S-Ribosoms mit drei gebundenen tRNA-Molekülen mithilfe einer 5.5 Å-Karte, in die die atomaren Modelle der 30S-Untereinheit von Ramakrishnan et al. und die 50S-Untereinheit aus Hma eingepasst waren. Letzteres Modell war modifiziert, um die Unterschiede zu den Eubakterien zu berücksichtigen.^[19]

Die 3000 RNA-Nukleotide in der 50S-Untereinheit aus Hma sind kompakt gefaltet, und die globulären Domänen der r-Proteine sind weitgehend in die Oberfläche eingebettet. Lediglich die tiefe Spalte, in die das Substratanalogon bindet, bleibt offen. Spaltet man die Untereinheit in der Mitte wie einen Apfel und öffnet sie, stößt man auf einen 100 Å langen Polypeptidtunnel, der ausgehend vom Peptidyltransferazentrum (PTC) nach außen läuft. Er bietet Platz für eine α -Helix,^[14,20] nicht aber für die Bildung einer Tertiärstruktur, wie ursprünglich vermutet.^[21] Die Packung der 23S-rRNA ist relativ kompakt, und es kommt noch hinzu, dass Peptid-Enden vieler ribosomaler Proteine die Spalten zwischen den RNA-Helices ausfüllen (Abbildung 9). Betrachtet man die

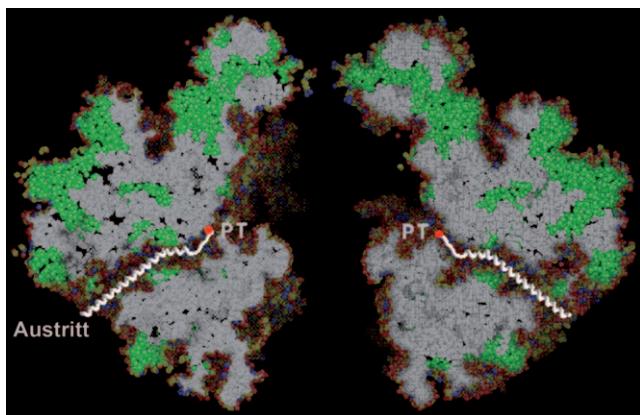


Abbildung 9. Raumfüllendes Modell der ribosomalen 50S-Untereinheit aus Hma; die Struktur ist entlang dem Austrittstunnel der Polypeptide aufgeschnitten und wie ein Buch geöffnet. PT = PTC = Peptidyltransferazentrum. Die dicht gepackte RNA im Inneren ist grau, die hindurchlaufenden Proteinschleifen sind grün gezeigt. Das weiße Band ist ein hypothetisches Modell des bestehenden Polypeptids im Austrittstunnel.^[14]

Strukturen isolierter r-Proteine, so erkennt man globuläre Domänen und idiosynkratisch gefaltete Schleifen und Stränge, die viele Lys- und Arg-Reste enthalten. Zwei besonders auffällige Beispiele für weit hervorstehende Ketten, die tief ins Innere der RNA eindringen, finden sich bei den r-Proteinen L2 und L3, die auf das PTC zulaufen (Abbildung 10).

Unsere anschließenden Analysen der strukturellen Eigenschaften der rRNA der großen Untereinheit offenbarten eine neuartige Wechselwirkung einer RNA-Tertiärstruktur – des A-Minor-Motivs – mit einem bis dahin unbekannten Sekundärstrukturmotiv, dem Kink-Turn.^[22,23] Beim A-Minor-Motiv schiebt sich die Kante der glatten kleinen Furche (C2–N3) von Adeninbasen in einzelsträngigen Regionen in die kleinen Furchen benachbarter Helices, vornehmlich zwischen

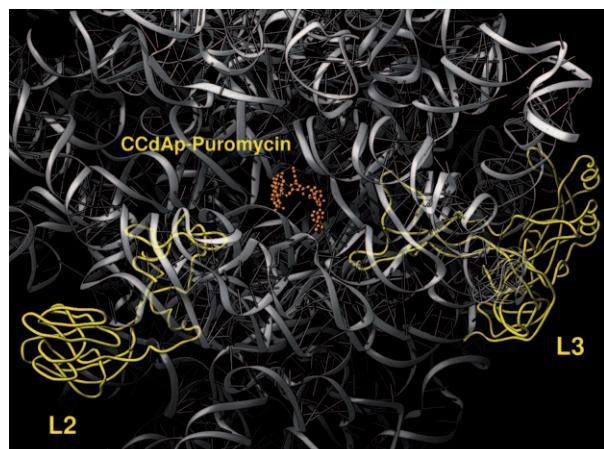


Abbildung 10. Bändermodell der 23S-rRNA (grau) und der Proteine L2 und L3 (gelb). Die Struktur zeigt, wie die ausgedehnten Peptidketten ins Innere des Ribosoms zum PTC hin vordringen, das gebundene Substratanalogon (orange) aber nicht erreichen.

C-G-Basenpaaren. Es gibt 186 Adenine in der großen Untereinheit, die solche A-Minor-Wechselwirkungen eingehen und auf diese Weise Helix-Helix- und Helix-Schleifen-Wechselwirkungen sowie Überkreuzungen stabilisieren. Ramakrishnan et al. beobachteten, dass A-Minor-Wechselwirkungen eine wichtige Rolle bei der Translation spielen, indem sie die korrekten Codon-Anticodon-Wechselwirkungen stabilisieren.^[24] Die Kink-Turns (K-Turns) sind asymmetrische innere Schleifen, die in RNA-Doppelhelices eingebettet sind. Die sechs K-Turns in der 50S-Untereinheit aus Hma haben einen Knick im Phosphodiester-Rückgrat, der eine scharfe Kehre in der RNA-Helix verursacht. Sie überlagern sich mit einem rmsd-Wert (root mean square deviation, mittlere quadratische Abweichung) von 1.7 Å.

Francis Crick hatte schon 1968 vermutet, dass das katalytische „Herz“ des Ribosoms ganz aus RNA besteht. Er erkannte ein klassisches „Henne-Ei-Problem“ (was kam zuerst?) – die erste Spezies, die ein Protein herstellte, konnte kein Protein sein –, und schrieb: „*Die Frage drängt sich auf, ob das erste Ribosom gänzlich aus RNA aufgebaut war*“.^[25] Noller und Mitarbeiter versuchten nachzuweisen, dass die ribosomale RNA tatsächlich für die katalytische Aktivität verantwortlich war, indem sie in Gegenwart von Proteasen die r-Proteine verdauen wollten.^[26] Es blieben allerdings viele Peptide im Molgewichtsbereich von 10000 sowie die intakten Proteine L2 und L3 zurück. Somit konnte das Experiment die Hypothese, dass die Katalyse allein durch den RNA-Anteil des Ribosoms ausgeführt wird, nicht bestätigen.

Wir untersuchten die Positionen der Proteine, die mit Teilen ihrer Kette auf das PTC zulaufen (Abbildung 11), und fanden, dass kein Protein näher als 18 Å an das PTC heranreicht.^[14] Selbst wenn man berücksichtigt, dass in diesem Kristall eine Schleife des Proteins L10e fehlgeordnet war und eigentlich in der Nähe des PTC liegt, kann diese noch nicht einmal hypothetisch bis ins PTC ausgestreckt werden. Daher kamen wir zu der Schlussfolgerung, dass „das Ribosom ein Ribozym ist“. Es war die erste experimentelle Bestätigung

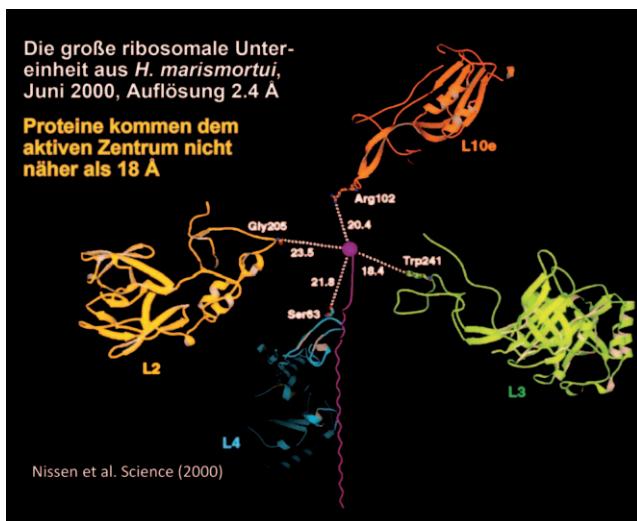


Abbildung 11. Vier Proteine, deren nichtglobuläre Ausstülpungen ins Innere des Ribosoms am dichtesten an das PTC heranreichen. Das PTC ist als lila Kugel dargestellt, die Abstände zum PTC sind in Å angegeben.^[14]

einer Hypothese, die schon von vielen in früheren Jahren vertreten wurde.

Der Mechanismus der Bildung der Peptidbindung

Wie bei jedem Enzym stellt sich auch beim Ribosom die wichtige Frage, wie die Katalyse im Detail abläuft. Vor allem war interessant, auf welche Weise die RNA an diesem Prozess teilnimmt. Eine der Hauptaufgaben jedes Enzyms besteht darin, die Substrate korrekt auszurichten,^[27] und dies wurde auch für die ribosomale Katalyse gezeigt (z.B. Sievers et al.^[28]). Aber welche anderen spezifischen chemischen Mechanismen sind beteiligt?

Um diese Frage zu lösen, wurden viele Strukturen der großen Untereinheit des Hma-Ribosoms im Komplex mit Substrat-, Intermediat- und Produktanaloga zunächst von Jeff Hansen^[14,29] und dann von Max Schmeing bestimmt.^[11,12] Die zu katalysierende Reaktion ist der Angriff der α -Aminogruppe der Aminoacyl-tRNA in der A-Stelle am Carbonylkohlenstoff der Peptidyl-tRNA in der P-Stelle. Dabei wird ein tetraedrisch substituierter Kohlenstoff mit einem Oxyanion gebildet. Dieses Zwischenprodukt zerfällt und bildet das Produkt Peptidyl-tRNA (nun in der A-Stelle) und eine deacylierte tRNA in der P-Stelle. Weil es nicht möglich war, Vollängen-tRNA-Substrate an existierende Kristalle der 50S-Untereinheit zu binden, stellten wir Komplexe mit Fragmenten des tRNA-3'-Endes mit A, CA oder CCA her, die an die Aminosäure, das Peptid oder das Analogon des tetraedrischen Übergangszustands gebunden waren. Biochemiker haben viele Jahre lang diese Art von Substratanaloga verwendet, um mit sogenannten „Fragment-Assays“ die Reaktionen zu untersuchen.

Zunächst bestimmten wir die Strukturen der Substratkomplexe mit CC-Puromycin an der A-Stelle oder mit CCA-Phe-Capronsäure-Biotin an der P-Stelle, das dort durch die

gleichzeitige Bindung von Sparsomycin stabilisiert wurde.^[29] Um ein Strukturmodell eines Komplexes mit Aminoacyl-tRNA in der A-Stelle und Peptidyl-tRNA in der P-Stelle zu konstruieren, wurden die Komplexe mit den beiden Substratanaloga auf dasselbe Modell der großen Untereinheit aufmontiert. Die tRNAs in den A- und P-Stellen des 70S-Komplexes wurden mit tRNAs aus dem Modell von Noller et al.^[19] überlagert und in die Fragmentstrukturen mit einbezogen (Abbildung 12). Wie bereits länger bekannt,^[14] stehen

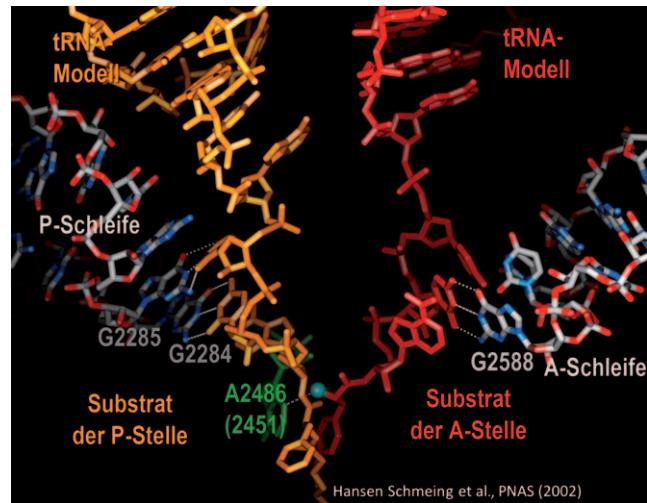


Abbildung 12. Modell für die Bindung der A- und P-Substrate in das PTC, erstellt auf Basis der Strukturen von CCA-Phe-Cap-Bio in der P-Stelle (mit Sparsomycin, nicht gezeigt) und C-Puromycin in der A-Stelle. Das CCA in der P-Stelle geht zwei Basenpaarungen mit G2285 und G2284 der P-Schleife ein, und C-Puromycin bildet ein Basenpaar mit der A-Schleife. Die Modelle der tRNA-Akzeptorstämme in der A- und P-Stelle sind der Struktur des 70S-Ribosoms mit A- und P-tRNAs von Yusopov et al.^[19] entnommen. Die Akzeptorstämme der beiden tRNAs sind translationsverwandt, und die beiden CCAs können durch eine 180°-Drehung ineinander überführt werden.

die beiden tRNA-Moleküle von Rest 1 bis 73 durch eine Verschiebung miteinander in Beziehung, während die CCA-Enden um 180° gegeneinander verdreht sind. An der A-Stelle ist C75 über eine Watson-Crick-Basenpaarung an G2588 der ribosomalen A-Schleife gebunden, während in der P-Stelle C74 und C75 Watson-Crick-Paare mit G2285 und G2284 der P-Schleife bilden. Es wurde vermutet,^[29] dass das zusätzliche Basenpaar zwischen dem CCA und der P-Schleife in der P-Stelle ebenso wie die Stapelbildung zwischen den Basen die Affinität des CCA für die P-Stelle im Vergleich zur A-Stelle steigert und daher die Bewegung des CCA und des peptidgebundenen tRNA von der A- zur P-Stelle erleichtert wird, wenn die deacylierte tRNA von der P- zur E-Stelle verschoben wird. Diese Positionsänderungen der CCA-Enden der tRNA könnten für die Bildung des Übergangszustands verantwortlich sein.

Martin Schmeing bestimmte die Strukturen vieler Komplexe der großen Untereinheit, in denen Substratanaloga der A- und P-Stelle gleichzeitig am PTC gebunden waren. Aus der Zusammenschaus ließ sich der Mechanismus der Peptidbindungsknüpfung ableiten. Außerdem sah man, dass die

vorzeitige Hydrolyse der Peptidyl-tRNA in Abwesenheit eines Substrats in der A-Stelle durch einen Mechanismus der induzierten Passform unterdrückt wird.^[12] Um einen stabilen Komplex des Zustands vor der Reaktion zu erhalten, wurde als Substrat für die A-Stelle CC-Hydroxypuromycin verwendet, bei dem die α -Aminogruppe durch eine weniger reaktive Hydroxygruppe ersetzt war. Fehlt ein Substrat in der A-Stelle, wird der veresterte Carbonylkohlenstoff des Peptids, das mit der tRNA in der P-Stelle verbunden ist, von beiden Seiten durch rRNA-Basen vor einem nucleophilen Angriff durch Wasser geschützt. Die Zugabe von CC-Hydroxypuromycin verursacht jedoch eine Reihe von Konformationsänderungen in der rRNA, die zur Positionsverschiebung der schützenden Base und zur Umorientierung der Carbonylgruppe führt. Dadurch wird letztere dem Angriff durch die α -Aminogruppe ausgesetzt. Die Strukturen dieser Komplexe bestätigen, dass nur N3 von A2486 (2451 in *E. coli*) und 2'-OH von A76 der P-tRNA mit der angreifenden α -Aminogruppe der Aminoacyl-RNA in Kontakt treten und daher mögliche Angriffspunkte für eine allgemeine Base sein könnten, die den nucleophilen Angriff der α -Aminogruppe aktiviert (Abbildung 13). Rachel Green und Mitarbeiter

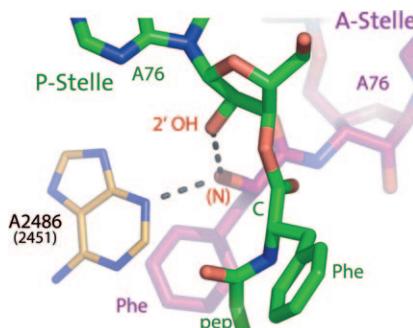


Abbildung 13. Die Ausrichtung zweier Substratfragmente im PTC. Die 2'-OH-Gruppe von A76 des Substrats in der P-Stelle (grün) ist über eine Wasserstoffbrücke mit dem Analogon der α -Aminogruppe des Aminoacyl-CCA (rot) verbunden. Nur das 2'-OH von A76 und das N3 von A2486 (2451) wechselwirken mit der angreifenden α -Aminogruppe.^[12]

zeigten sehr überzeugend, dass die Mutation von A2486 (2451) zu einer beliebigen der anderen drei Basen keine Auswirkung auf die Geschwindigkeit der Peptidbindungs-knüpfung hatte, wenn Vollängensubstrate eingesetzt wurden. Damit wurde bestätigt, dass A2486 (2451) nicht an der Katalyse der Peptidbindungs-knüpfung beteiligt ist.^[30]

Demgegenüber wird die Geschwindigkeit der Peptidyl-transferasereaktion drastisch verringert, wenn die 2'-OH-Gruppe des A76 der P-tRNA entfernt wird. Barta et al. bestimmten mit Substratfragmenten, denen das 2'-OH des A76 des P-Substrats fehlt, dass die Geschwindigkeit der Peptidbindungsbildung um das Mehrhundertfache abnahm.^[31] Ausgehend von dieser Beobachtung sowie anhand von Strukturen der 50S-Untereinheit aus Hma im Komplex mit einem Substratanalogon in der P-Stelle oder einem Analogon in der A-Stelle schlug Barta vor, dass die Bildung der Peptidbindung durch einen Protonenpendelmechanismus erleichtert wird.

Dabei fungiert das 2'-OH von A76 als allgemeine Base, um ein Proton von der α -Aminogruppe der Aminoacyl-tRNA aufzunehmen und so deren nucleophilen Angriff zu verstärken. Gleichzeitig wirkt sie als allgemeine Säure und gibt ein Proton an die austretende 3'-OH-Gruppe des A76 in der P-Stelle bei der Deacylierung ab. Strobel et al. konnten zeigen, dass mit Vollängen-tRNA-Substraten die Geschwindigkeit der Peptidbindungs-knüpfung um einen Faktor von über 10⁶ sinkt, wenn man eine Peptidyl-tRNA mit einem 2'-Desoxy-A76 einsetzt.^[32] Die 2'-OH-Gruppe des A76 der P-tRNA ist demnach entscheidend für die Bildung der Peptidbindung.

Um zu untersuchen, ob die Peptidknüpfung auch durch die Stabilisierung des tetraedrischen Übergangszustands begünstigt wird, löste Schmeing die Struktur eines mit 2.3 Å aufgelösten Komplexes der 50S-Untereinheit aus Hma mit einem Übergangszustandsanalogon, das Kevin Huang aus Scott Strobel's Arbeitsgruppe synthetisiert hatte.^[11,12] Bei diesem Analogon wurde das tetraedrische Kohlenstoffatom durch eine Phosphatgruppe nachgeahmt, bei einer der Sauerstoffatome durch eine Aminosäureseitenkette ersetzt war; ein Schwefelatom zur Nachahmung des Oxyanions ersetzte den zweiten Sauerstoff. Ein Wassermoleköl ist über eine Wasserstoffbrücke mit dem Phosphatsauerstoff verbunden und wird durch zwei rRNA-Basen in Position gehalten (Abbildung 14). Es könnte ebenfalls an der Katalyse beteiligt sein, indem es die negative Ladung des Oxyanions teilweise kompensiert.

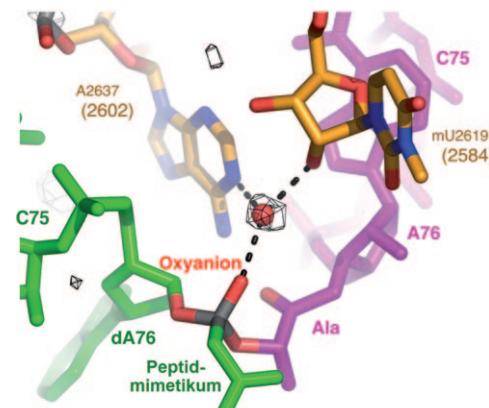


Abbildung 14. Differenzelektronendichthe-karte ($F_o - F_c$) des PTC, die ein mutmaßliches Wassermoleköl zeigt, das über eine H-Brücke an das Oxyanionmimetikum des Übergangszustandsanalogons sowie an das N6 von A2637 (2502) und das 2'-OH von mU2619 (2585) gebunden ist.^[11]

Es lässt sich also folgern, dass mindestens drei Faktoren zur Fähigkeit des Ribosoms beitragen, die Geschwindigkeit der Peptidbildung zu erhöhen. Erstens richtet das Ribosom die beiden Substrate korrekt zueinander aus. Zweitens sorgt es für eine vom Substrat unterstützte Katalyse durch die 2'-OH-Gruppe des A76 der P-tRNA, die als Überträger im Protonenpendel wirkt, indem sie gleichzeitig als allgemeine Base und allgemeine Säure wirkt. Schließlich hilft ein gebundenes Wassermoleköl, das mit dem Oxyanion wechselwirkt, bei der Stabilisierung des Übergangszustands.

Hemmung der ribosomalen 50S-Untereinheit durch Antibiotika

Etwa 50% der pharmazeutisch nutzbaren Antibiotika greifen das Ribosom an, wobei die Mehrheit davon an die große Untereinheit bindet. Wir konnten die Strukturen zahlreicher Komplexe der großen Untereinheit des Hma-Ribosoms mit verschiedenen Antibiotika bestimmen, die im oder nahe dem PTC oder in die E-Stelle binden.^[29,33,34] Da *H. marismortui* zu den Archaeen gehört, ähneln die Antibiotikabindestellen seiner Ribosomen eher denen der Eukaryoten als denen der Eubakterien. Glücklicherweise binden viele Antibiotika, die gegen Eubakterien gerichtet sind, bei millimolaren Konzentrationen auch an die große Hma-Untereinheit, und unsere Kristallstrukturen dieser Komplexe haben die strukturbasierte Synthese weiterer Derivate ermöglicht, die sich als effizient gegen resistente Bakterienstämme erwiesen haben. Außerdem binden diese Antibiotika bei pharmakologisch relevanten Konzentrationen an eubakteriell mutierte Hma-Untereinheiten, wobei die Bindung an einer Position stattfindet, die weniger als 1 Å von der Stelle entfernt ist, die im Hma-Wildtyp besetzt wird. Diese Beobachtungen zusammen mit der hohen Strukturauflösung, die mit den Hma-Kristallen möglich sind, haben die Struktur der großen Hma-Untereinheit zu einem sehr effektiven Werkzeug gemacht, um strukturelle Einsichten für den Entwurf neuer Antibiotika zu gewinnen.

Die Familie der Macrolide umfasst zahlreiche pharmazeutisch relevante Verbindungen; ein Beispiel ist Erythromycin. Die Macrolide bestehen aus 14- bis 16-gliedrigen Lactonringen, an die verschiedene Zuckersubstituenten angeknüpft sind. Wir konnten die Strukturen von Komplexen der Wildtyp-50S-Untereinheit mit verschiedenen 16-gliedrigen und einem 15-gliedrigen Macrolid aufklären.^[29] Die Macrolide binden unterhalb des PTC im Austrittstunnel der Polypeptide. Die hydrophobe Seite des Macrolidrings ist mit zwei herausgedrehten Basen gestapelt, die eine hydrophobe Tasche bilden. Nur bei wenigen Macroliden (z.B. Carbomycin A) überlappen die Oligosaccharid-Substituenten mit der Substratbindestelle. Sie blockieren den Austrittstunnel und verhindern so die Verlängerung des elongierenden Polypeptids (Abbildung 15). Ich nenne diesen Prozess „molekulare Verstopfung“. Die meisten Macrolide wechselwirken nur mit der 23S-rRNA, und die Positionen der Macrolidringe lassen sich in den Strukturen ziemlich gut zur Deckung bringen. Obwohl fast keine Konformationsänderungen in der RNA durch die Macrolidbindung induziert werden, verursachen die 16-gliedrigen Macrolide eine Rotation der Base A2103 (2100) und bilden mit ihr eine kovalente Bindung.

Richtet man die Strukturen der Hma-Untereinheit im Komplex mit Azithromycin und der Untereinheit aus *D. radiodurans* im Komplex mit Erythromycin aneinander aus, indem man die homologen rRNAs überlagert, so stehen die Macrolidringe in den beiden Modellen senkrecht zueinander, was bei zwei Verbindungen, die sich chemisch so sehr ähneln, überraschend war.^[29] Zunächst wurden für diesen Unterschied zwei Erklärungen postuliert. Ein Grund könnte in den Unterschieden zwischen den Arten liegen, der zweite, dass die Lage von Erythromycin in der Karte des Dra-Komplexes

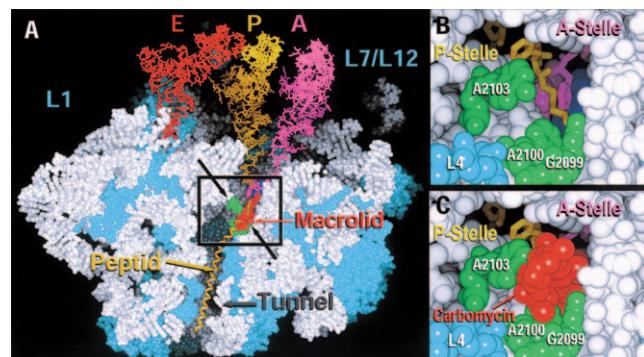


Abbildung 15. A) Die Struktur des Macrolids Carbomycin (rot) in der 50S-Untereinheit (in zwei Hälften geteilt). Die 23S-rRNA ist weiß dargestellt, die penetrierenden Proteinschleifen sind blau.^[29] Die tRNA-Moleküle wurden durch Kombination der tRNA-Fragmentstrukturen im Komplex mit der 50S-Untereinheit mit dem tRNA-Modell in der große Untereinheit abgeleitet.^[19] B) Blick in den Austrittstunnel in Richtung des PTC; die Basen, durch deren Mutation das Ribosom resistent gegen die Hemmung durch Macrolide wird, sind grün dargestellt. C) Der gleiche Blickwinkel wie in (B) mit einem Macrolid (rot) in einer Position, die den Austritt des Polypeptids blockiert.

mit niedrigerer Auflösung (3.5 Å) falsch bestimmt worden war. Die zweite Erklärung wurde in nachfolgenden Untersuchungen bestätigt.^[36]

Der wichtigste Unterschied zwischen den Macrolid-Bindestellen der Eubakterien und der Archaeen ist die Aminosäure A2058 in Eubakterien, die in Archaeen und Eukaryoten die Aminosäure G2099 entspricht. Eine Mutation von A2058 zu G in Eubakterien verringert die Affinität von Ribosomen für Erythromycin etwa um den Faktor 10⁴. Um das Eubakterien-Ribosom besser nachahmen zu können, wurde G2099 in der 23S-rRNA von Hma zu A mutiert.^[36] Während 1 mM Erythromycin nicht an die Untereinheit des Hma-Wildtyps bindet, sättigt es die Bindungsstelle der Mutante bei 0.001 mM ab (Abbildung 16). Tatsächlich binden alle Antibiotika der MLS_B-K-Gruppe, die nicht an die Unterein-

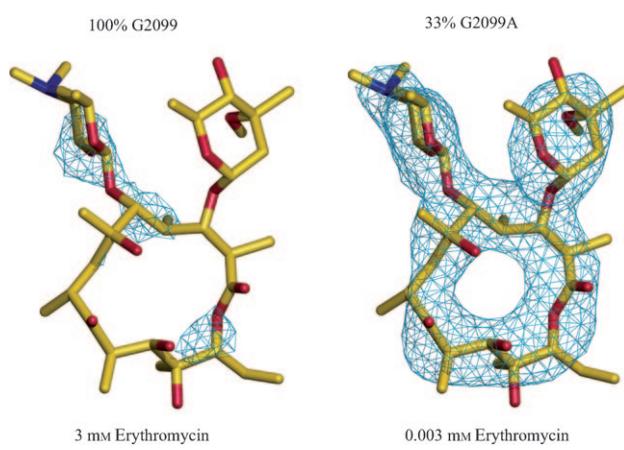


Abbildung 16. Differenzelektronendichtheckarten zwischen der Wildtyp-50S-Untereinheit mit G2099 in Gegenwart von 3 mM Erythromycin und der apo-50S-Untereinheit (links) im Vergleich zur Karte zwischen der G2099A-Mutante der 50S-Untereinheit in Gegenwart von 0.003 mM Erythromycin und der apo-50S-Untereinheit (rechts).^[36]

heit des Hma-Wildtyps oder eine eubakterielle 50S-Untereinheit mit einer A2058G-Mutation binden, stattdessen an die G2099A-mutierte Hma-50S-Untereinheit. Ebenso bindet Azithromycin bei einer niedrigeren, physiologisch relevanten Konzentration. Es ist genauso orientiert wie im Komplex mit der Wildtyp-50S-Untereinheit, liegt jedoch etwa 1 Å näher an A2099 (2058), weil die sterische Hinderung durch das N2 des G-Restes in dieser Position fehlt. Ganz aktuell haben wir die Struktur von Erythromycin im Komplex mit einem 70S-Ribosom von *Thermus thermophilus* mit 3.1 Å Auflösung aufgeklärt und herausgefunden, dass Erythromycin genauso bindet wie an die mutierte Hma-50S-Untereinheit.^[37] Dies bestätigt unsere frühere Schlussfolgerung, dass Erythromycin im ursprünglichen Modell des Komplexes mit der Dra-50S-Untereinheit^[35] falsch orientiert war, vermutlich aufgrund der niedrigeren Auflösung der Elektronendichtekarte, in die das Erythromycinmolekül eingepasst werden musste.

Die Strukturen vieler anderer Komplexe der Hma-50S-Untereinheit mit verschiedenen Antibiotika wurden bestimmt.^[33,36] Viele binden an benachbarte, wenn auch klar unterscheidbare Bindestellen (Abbildung 17), und die meis-

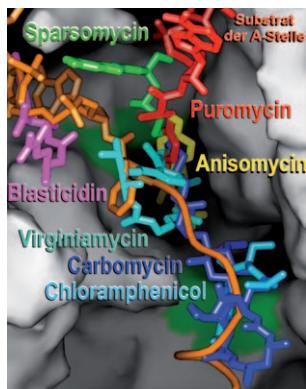


Abbildung 17. Sieben verschiedene Antibiotika, die an benachbarte, aber klar unterscheidbare Positionen im PTC binden. Rot: das Substrat der A-Stelle; orange: Substrat der P-Stelle mit dem Modell eines ausgestreckten Peptids.

ten hemmen die Proteinsynthese, indem sie die Bindung der tRNA in die P- oder A-Stelle verhindern. Die benachbarten Positionen dieser verschiedenen Antibiotika-Bindestellen ermöglichen es, neue Hemmstoffe zu synthetisieren, indem man chemisch einen Teil eines Antibiotikums mit einem Teil eines in der Nähe bindenden Antibiotikums koppelt und so ein Hybridmolekül erhält, das fester bindet und einen Ausgangspunkt für die rechnergestützte Herstellung neuer Antibiotika und für strukturbasierte Struktrentwürfe darstellt.

Die Entwicklung neuer Antibiotika durch Rib-X Pharmaceuticals

Im April 2000 saß ich am Rande einer Tagung in Cambridge (England) mit John Abelson im Eagle Pub bei Fish und Chips. Es wird berichtet, dass in just diesem Pub Francis

Crick erstmals die Entdeckung der Struktur der Doppelhelix und ihre Bedeutung für die Genreplikation verkündete. John war Mitgründer von Agouron Pharmaceuticals, die in den 90er Jahren mit einem strukturbasierten Ansatz einen der ersten HIV-Proteaseinhibitoren entwickelten, der später als Medikament in einer Kombinationstherapie gegen AIDS eingesetzt wurde. Ich fragte John, ob wir nicht eine Firma gründen wollten, um unsere Strukturinformationen über die Antibiotikakomplexe der ribosomalen 50S-Untereinheiten für die Entwicklung neuer Antibiotika gegen resistente Bakterienstämme zu nutzen, und ob er sich an der Gründung eines solchen Unternehmens beteiligen würde. John war begeistert von der Idee. Wir tranken auf die Zukunft und begannen sogleich, unsere Strategie festzulegen.

In den folgenden Monaten schritten wir mit den konkreten Planungen voran. Ich fragte Peter Moore, ob er sich uns anschließen will. Außerdem luden wir Bill Jorgensen ein, der eine große Expertise im Bereich computergestützter Verfahren zur Wirkstoffentwicklung hatte. Susan Froshauer war bereit, die Rolle des CEO zu übernehmen, was sie schon einmal erfolgreich getan hatte. Nachdem wir einige private Investoren gefunden hatten – die meisten Freunde von uns –, starteten wir 2001 das operative Geschäft. Wir verwendeten unsere Strukturen der Komplexe von Antibiotika mit der Hma-50S-Untereinheit zusammen mit Bill Jorgensens Computermethoden, um struktur- und rechnergestützte Wirkstoffentwicklung zu betreiben. Das Unternehmen wurde Rib-X-Pharmaceuticals getauft, in Anlehnung an Ribosomen und X-ray. Nach acht Jahren wurde mit dem ersten Wirkstoffkandidaten, Radezolid, erfolgreich eine klinische Phase-II-Studie gegen Haut- und Weichteilinfektionen und gegen milde bis mittelschwere Lungenentzündung abgeschlossen. Andere Indikationen befinden sich ebenfalls in Phase-II-Studien, und für eine Reihe weiterer Verbindungen sind die vorklinischen Tests weitgehend abgeschlossen.

Die Entwicklungsstrategie, die letztlich zum Radezolid führte, illustriert eindrucksvoll, wie die Strukturen der Antibiotikakomplexe mit der 50S-Untereinheit und rechnergestützte Verfahren effizient mit Methoden der pharmazeutischen Chemie und Mikrobiologie kombiniert werden können, um neue Antibiotika zu entwickeln, die effizient gegen antibiotikaresistente Bakterienstämme wirken.^[38,39] Linezolid, ein Antibiotikum von Pfizer, bindet an das PTC^[34] nahe der Bindestelle des Antibiotikums Sparsomycin,^[33] das nicht zwischen Eubakterien und Eukaryoten unterscheidet (Abbildung 18a). Die Strategie bestand darin, Molekülteile der beiden Antibiotika chemisch miteinander zu koppeln, wodurch fünf neue Verbindungen resultierten, deren intrinsische Affinität, Selektivität für ein Organismenreich und minimale Hemmkonzentrationen (MIC) bestimmt wurden (Abbildung 18b; Tabelle 1). Zwei der fünf Verbindungen waren selektiv für Eubakterien, was zeigte, dass durch einen Ersatz des für die Sparsomycinaffinität entscheidenden Elements die Selektivität verändert werden kann, ohne dass die ribosomale Bindung ganz verloren geht. Darüber hinaus zeigt das untere Verbindungspaar (T3A und T3B) mit dem Biarylelement als zentralem Strukturmotiv nicht nur eine substanzIELL verbesserte intrinsische Affinität, sondern auch eine stark verbesserte antibakterielle Aktivität gegen repräsentative antibioti-

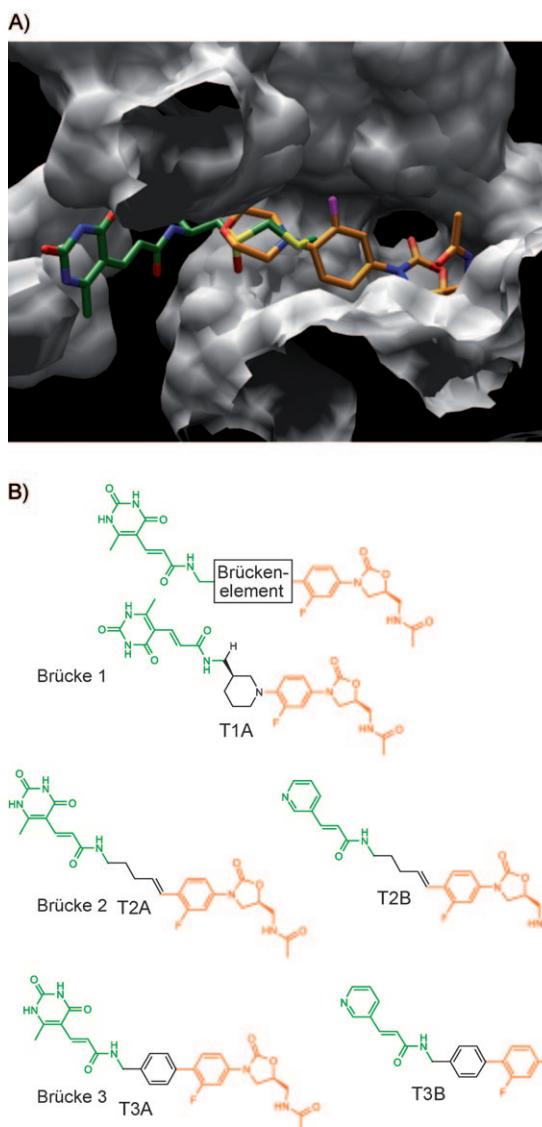


Abbildung 18. A) Entwicklung eines neuartigen Hybridantibiotikums durch die Kombination von Sparsomycin auf der linken Seite (grün) mit Linezolid auf der rechten (orange). Die ribosomale RNA ist in einer Oberflächendarstellung (grau) gezeigt. B) Chemische Verknüpfung der beiden Fragmente mit unterschiedlichen Brückenelementen.

tikaresistente Keime. Nachdem das Wirkprinzip bestätigt war, wurden völlig neue Moleküle mithilfe computergestützter Verfahren entworfen und optimiert, indem die molekularen

Eigenschaften so auszubalanciert wurden, dass Gram-positive und Gram-negative Membranen durchdrungen werden konnten. Löslichkeit und Permeationsvermögen wurden auf orale Bioverfügbarkeit hin maximiert, und Strukturelemente, die sich toxisch auswirken könnten, wurden vermieden. Nach der Synthese von knapp 700 Verbindungen in weniger als einem Jahr erhielten wir zwei Wirkstoffkandidaten, die beide eine über 1000-fach niedrigere Hemmkonzentration für Eu-bakterien im Vergleich zu Eukaryoten aufwiesen, sehr niedrige MIC-Werte (zwischen 0.25 und 2) gegen resistente *S. pneumoniae*- und *H. influenzae*-Stämme hatten und gegen eine Reihe von Infektionsmodellen in der Ratte oral wirksam waren. Die letztlich ausgewählte Verbindung, Radezolid, war gegen viele antibiotikaresistente Stämme deutlich wirksamer als die Ausgangsverbindung Linezolid.

Ein analoger Ansatz führte zur Entwicklung einer Familie verbesserter Macrolide, die benachbarte, validierte Bindungsstellen im Hma-50S-Ribosom besetzen. Diese stellen nicht nur die Aktivität gegen macrolidresistente Bakterienstämme (Streptococci und Staphylococci, darunter nosocomiale und andere MRSA) wieder her, sondern sind auch gegen andere resistente Gram-positive Bakterien wie vancomycinresistente Enterococci aktiv. Die Verbindungen befinden sich in den späten Stadien der präklinischen Entwicklung.

Mit dem Wissen, das aus diesen Programmen gewonnen wurde, begannen wir bei Rib-X mit dem De-novo-Entwurf völlig neuer Antibiotika, die gegen die ribosomale 50S-Untereinheit gerichtet sind. Die Verbindungen wurden dabei auch rechnergestützt optimiert, um Wirkung gegen mehrfachresistente Gram-negative Organismen wie *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Acinetobacter baumannii* zu erzielen. Da diese Verbindungen außerdem neuen chemischen Klassen angehören, sollten sie nicht von bekannten Resistenzmechanismen erfasst werden, wie sie bei anderen Antibiotika auftreten. Es scheint also, dass ausgehend von der Struktur der großen Untereinheit des Hma-Ribosoms und seiner Komplexe mit Antibiotika eine Pipeline für neue potentielle Antibiotika entwickelt werden kann.

Neue Antibiotika gegen Tuberkulose?

Die Tuberkulose (TB) ist nach wie vor eine der bedrohlichsten Krankheiten weltweit, die vor allem in den ärmsten Regionen jährlich über eine Million Todesopfer fordert. Besonders beunruhigend ist das aktuelle Auftreten von so ge-

Tabelle 1: Die minimalen Hemmkonzentrationen (MICs) von fünf Verbindungen aus der chemischen Kombination von Sparsomycin mit Linezolid gegen drei Bakterienstämme.

	Linezolid (Lin)	Sparsomycin (Spa)	RX-154	RX-190	RX-209	RX-212	RX-213
intrinsische Affinität (Hemmung der zellfreien Translation)							
<i>E. coli</i> D10 IC ₅₀ [μM]	4.6	<0.02	0.26	0.03	16	0.03	0.58
Bakterienselektivität	ja	nein	nein	nein	ja	nein	ja
		antibakterielle Aktivität (MIC in μg mL ⁻¹)					
<i>S. pneumoniae</i> O2J1175 (Mac ^R , Efflux)	2	2	4	1	8	<0.25	0.5
<i>S. pyogenes</i> Msr610 (Mac ^R , rRNA-Methylierung)	1	2	4	1	4	<0.25	0.5
<i>E. faecalis</i> P5 (Lin ^R , G2576U)	>32	>128	>128	32	>128	16	16

nannten XDR-Stämmen, die resistent gegen alle Arten von tuberkuloseaktiven Antibiotika sind. Die mögliche Ausbreitung der XDR-Stämme ist eine große Bedrohung auch für den Rest der Welt.

Wir haben vor kurzem^[40] die Strukturen des 70S-Ribosoms von *Thermus thermophilus* im Komplex mit tRNA-Molekülen in der A-, P- und E-Stelle und mit Capreomycin und Viomycin (zwei cyclischen Tuberactinomycinpeptiden gegen TB) aufgeklärt. Von diesen war bekannt, dass sie nur an das 70S-Ribosom binden, und wir beobachten sie zwischen den beiden Untereinheiten nahe dem decodierenden Zentrum, wo sie mit tRNA und der β -2A-Brücke zwischen den Untereinheiten in Kontakt stehen. Die Brücke wird durch die Berührung zwischen der Helix 69 der großen Untereinheit und der Helix 44 der kleinen Untereinheit gebildet. Die Wirkstoffe wechselwirken mit den Basen A1492 und A1493, die sie in ihrer herausgedrehten Orientierung stabilisieren, wie sie normalerweise bei der mRNA-Decodierung eingenommen wird. Es scheint, dass die Substanzen die tRNA im Stadium vor der Translokation stabilisieren (Abbildung 19).

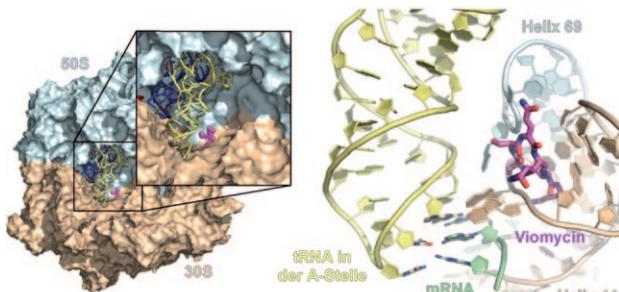


Abbildung 19. Die Bindestelle für Viomycin, das im decodierenden Zentrum des Ribosoms mit RNA beider Untereinheiten wechselwirkt.^[20] Links: Oberflächendarstellung des 70S-Ribosoms mit der 50S-Untereinheit in Blau, der 30S-Untereinheit in Hellbraun, der tRNA in der A-Stelle in Gelb und Viomycin in Lila. Rechts: Vergrößerter Ausschnitt, der die Bindung von Viomycin an die Helix 69 der großen Untereinheit und die Helix 44 der kleinen Untereinheit im Decodierenzentrum zeigt. Die stabilisierenden Basen 1492 und 1493 nehmen die herausgedrehte Konformation ein, in der sie A-Minor-Wechselwirkungen mit dem Codon der mRNA (grün) eingehen, das mit dem Anticodon der tRNA (gelb) gepaart ist.

Wichtig ist, dass die Bindestelle für Capreomycin und Viomycin neben den Bindestellen zweier Antibiotika liegt, die an die kleine Untereinheit binden, nämlich Paromomycin^[41] und Hygromycin B^[42] (Abbildung 20). So lässt sich der gleiche Ansatz verfolgen, den man bei Rib-X zuvor schon zur Entwicklung neuer TB-Antibiotika verwendet hatte, indem man nämlich eine Teilstruktur von Hygromycin B oder von Paromomycin an Capreomycin koppelt. Da der XDR-Stamm durch Mutation einer Ionenpumpe entstanden sein könnte, könnte sich eine größere Verbindung als wirksam erweisen.

Als wir begannen, die Struktur der großen Untereinheit des Ribosoms zu untersuchen, wollten wir herausfinden, wie diese größte der RNA-Maschinen aufgebaut ist und wie sie die Knüpfung der Peptidbindung katalysiert. Diese grundle-

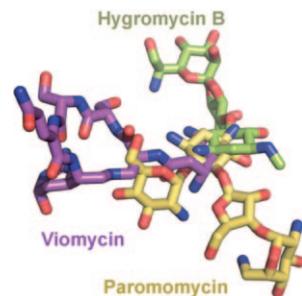


Abbildung 20. Die benachbart liegenden Bindestellen von Viomycin (lila), Hygromycin B (grün) und Paromomycin (gelb) im Decodierenzentrum eröffnen die Möglichkeit eines kombinatorischen Entwurfs neuer Antibiotika gegen TB.^[40]

genden wissenschaftlichen Fragen und Antworten haben zu einem praktischen und anwendungsorientierten Ergebnis geführt, das mithilfe der Leistungsfähigkeit strukturbasierter und rechnergestützter Methoden in den Entwurf neuer potenzieller Antibiotika mündete, die wirksam gegen antibiotikaresistente Bakterienstämme sind. Unsere Arbeit bestärkt mich in meiner Auffassung, dass Förderinstitutionen auch in Zukunft ihren Schwerpunkt auf die Grundlagenforschung legen sollten, anstatt Mittel in den Technologietransfer umzuleiten, der, wie ich glaube, nur ein beschränktes Potenzial für neue Entdeckungen bietet.

Ich danke den Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe und der Gruppe von Peter Moore für ihre Beiträge zu den Strukturuntersuchungen am Ribosom während der letzten 15 Jahre. Außerdem danke ich für die einzigartige Forschungsumgebung, die das Center for Structural Biology (CSB) in Yale zwischen 1995 und 2000 geschaffen hat (Arbeitsgruppen Richards, Engelman, Moore, meine Gruppe, Sigler, Brünger und Doudna). Die langfristige und großzügige Unterstützung meiner Arbeitsgruppe und des CSB durch das Howard Hughes Medical Institute war ganz entscheidend für den Erfolg unserer Studien am Ribosom. Weitere Unterstützung erhielten wir über eine Projektförderung der NIH. Schließlich geht Dank an Erin Duffin, der geholfen hat, den Abschnitt zur Wirkstoffentwicklung bei Rib-X Pharmaceuticals abzufassen.

Eingegangen am 9. Februar 2010
Übersetzt von Dr. Burkard Neuß, Jülich

- [1] „Involvement of RNA in the synthesis of proteins“: J. D. Watson, *Science* **1963**, *140*, 17–26.
- [2] „Ribosome structure determined by electron microscopy of *Escherichia coli* small subunits, large subunits and monomeric ribosomes“: J. A. Lake, *J. Mol. Biol.* **1976**, *105*, 131–159.
- [3] „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. Verschoer, M. Radermacher, R. Grassucci, R. K. Lata, R. K. Agrawal, *Nature* **1995**, *376*, 441–444.
- [4] „Characterization and crystallization of ribosomal particles from *Halobacterium marismortui*“: A. Shevack, H. S. Gewitz, B. Hennemann, A. Yonath, H. G. Wittmann, *FEBS J.* **1985**, *184*, 68–71.

- [5] „Characterization of preliminary attempts for derivatization of crystals of large ribosomal subunits from *Haloarcula marismortui*, diffraction to 3 Å resolution“: K. von Böhlen, L. Makowski, H. A. S. Hansen, H. Bartels, Z. Berkovitch-Yellin, A. Zaytzev-Bashan, S. Meyer, C. Paulke, F. Franceschi, A. Yonath, *J. Mol. Biol.* **1991**, 222, 11–15.
- [6] „A milestone in ribosomal crystallography: the construction of preliminary electron density maps at intermediate resolution“: F. Schlünzen, H. A. S. Hansen, J. Thygesen, W. S. Bennett, N. Volkmann, I. Levin, J. Harms, H. Bartels, A. Zaytzev-Bashan, Z. Berkovitch-Yellin, I. Sai, F. Franceschi, S. Krumbholz, M. Geva, S. Weinstein, I. Agmon, N. Böddeker, S. Morlang, R. Sharon, A. Dribin, E. Maltz, M. Peretz, V. Weinrich, A. Yonath, *Biochem. Cell Biol.* **1995**, 73, 739–749.
- [7] „Functional universality and evolutionary diversity: insights from the structure of the ribosome“: A. Yonath, F. Franceschi, *Structure* **1998**, 6, 679–684.
- [8] „Elucidating the medium-resolution structure of ribosomal particles: an interplay between electron cryo-microscopy and X-ray crystallography“: J. Harms, A. Tocilj, I. Levin, I. Agmon, H. Stark, I. Kölln, M. van Heel, M. Cuff, F. Schlünzen, A. Bashan, F. Franceschi, A. Yonath, *Structure* **1999**, 7, 931–941.
- [9] „Placement of protein and RNA structures into a 5 Å resolution map of the 50S ribosomal subunit“: N. Ban, P. Nissen, J. Hansen, M. Capel, P. B. Moore, T. A. Steitz, *Nature* **1999**, 400, 841–847.
- [10] „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.
- [11] „Structural insights into the roles of water and the 2' hydroxyl of the P-site tRNA in the peptidyl transferase reaction“: T. M. Schmeing, D. Kitchen, S. A. Scaringe, S. A. Strobel, T. A. Steitz, *Mol. Cell* **2005**, 20, 437–448.
- [12] „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.
- [13] „A 9 Å resolution X-ray crystallographic map of the large ribosomal subunit“: N. Ban, B. Freeborn, P. Nissen, P. Penczek, R. A. Grassucci, R. Sweet, J. Frank, P. B. Moore, T. A. Steitz, *Cell* **1998**, 93, 1105–1115.
- [14] „The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis“: P. Nissen, N. Ban, J. Hansen, P. B. Moore, T. A. Steitz, *Science* **2000**, 289, 920–930.
- [15] „Structure of a bacterial 30S ribosomal subunit at 5.5 Å resolution“: W. M. Clemons, J. L. C. May, B. T. Wimberly, J. P. McCutcheon, M. S. Capel, V. Ramakrishnan, *Nature* **1999**, 400, 833–840.
- [16] „X-ray crystal structures of 70S ribosome functional complexes“: J. H. Cate, M. M. Yusupov, G. Z. Yusupova, T. N. Earnest, H. F. Noller, *Science* **1999**, 285, 2095–2104.
- [17] „Structure of the 30S ribosomal subunit“: B. T. Wimberly, D. E. Brodersen, W. M. Clemons, R. J. Morgan-Warren, A. P. Carter, C. Vonrhein, T. Hartsch, V. Ramakrishnan, *Nature* **2000**, 407, 327–339.
- [18] „Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 Å resolution“: F. Schlüzen, 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.
- [19] „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. D. Cate, H. F. Noller, *Science* **2001**, 292, 883–896.
- [20] „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.
- [21] „Three-dimensional structures of translating ribosomes by cryo-EM“: R. J. C. 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.
- [22] „RNA tertiary interactions in the large ribosomal subunit: the A-minor motif“: P. Nissen, J. A. Ippolito, N. Ban, P. B. Moore, T. A. Steitz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, 98, 4899–4903.
- [23] „The kink-turn: a new RNA secondary structure motif“: D. J. Klein, T. M. Schmeing, P. B. Moore, T. A. Steitz, *EMBO J.* **2001**, 20, 4214–4221.
- [24] „Recognition of cognate transfer RNA by the 30S ribosomal subunit“: J. M. Ogle, D. E. Brodersen, W. M. Clemons, M. J. Tarry, A. P. Carter, V. Ramakrishnan, *Science* **2001**, 292, 897–902.
- [25] „The origin of the genetic code“: F. H. C. Crick, *J. Mol. Biol.* **1968**, 38, 367–379.
- [26] „Unusual resistance of peptidyl transferase to protein extraction procedures“: H. F. Noller, V. Hoffarth, L. Zimniak, *Science* **1992**, 256, 1416–1419.
- [27] „Entropic contributions to rate acceleration in enzymatic and intramolecular reactions and the chelate effect“: M. I. Page, W. P. Jencks, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1971**, 68, 1678–1683.
- [28] „The ribosome as an entropy trap“: A. Sievers, M. Beringer, M. V. Rodnina, R. Wolfenden, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, 101, 7897–7901.
- [29] „Structural insights into peptide bond formation“: J. L. Hansen, T. M. Schmeing, P. B. Moore, T. A. Steitz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 11670–11675.
- [30] „The active site of the ribosome is composed of two layers of conserved nucleotides with distinct roles in peptide bond formation and peptide release“: E. M. Youngman, J. L. Brunelle, A. B. Kochaniak, R. Green, *Cell* **2004**, 117, 589–599.
- [31] „Mononucleotide derivatives as ribosomal P-site substrates reveal an important contribution of the 2'-OH activity“: S. Dorner, F. Panuschka, W. Schmid, A. Barta, *Nucleic Acids Res.* **2003**, 31, 6536–6542.
- [32] „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.
- [33] „Structure of five antibiotics bound at the peptidyl transferase center of the large ribosomal subunit“: J. L. Hansen, P. B. Moore, T. A. Steitz, *J. Mol. Biol.* **2003**, 330, 1061–1075.
- [34] „Crystal structure of the oxazolidinone antibiotic linezolid bound to the 50S ribosomal subunit“: J. A. Ippolito, Z. F. Kanyo, D. Wang, F. J. Franceschi, P. B. Moore, T. A. Steitz, E. M. Duffy, *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 3353–3356.
- [35] „Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria“: F. Schlünzen, R. Zarivach, J. Harms, A. Bashan, A. Tocilj, R. Albrecht, A. Yonath, F. Franceschi, *Nature* **2001**, 413, 814–821.
- [36] „Structures of MLSB_K 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.
- [37] D. Bulkley, A. Innis, G. Blaha, T. A. Steitz, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [38] „Structure-based drug design meets the ribosome“: F. Franceschi, E. M. Duffy, *Biochem. Pharmacol.* **2006**, 71, 1016–1025.
- [39] „RP-01, a new family of oxazolidinones that overcome ribosome-based linezolid resistance“: E. Skripkin, T. S. McConnell, J. Devito, L. Lawrence, J. A. Ippolito, E. M. Duffy, J. Sutcliffe, F. Franceschi, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2008**, 52, 3550–3557.
- [40] „The structures of the anti-tuberculosis antibiotics viomycin and capreomycin bound to the 70S ribosome“: R. E. Stanley, G. Blaha, R. L. Grodzicki, M. D. Strickler, T. A. Steitz, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2010**, in press.
- [41] „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.

- [42] „Structural basis of a hygromycin B inhibition of protein biosynthesis“: M. S. Borovinskaya, S. Shoji, K. Fredrick, J. H. Cate, *RNA* **2008**, *14*, 1590–1599.
 - [43] „Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics“: A. P. Carter, W. M. Clemons, D. E. Brodersen, R. J. Morgan-Warren, B. T. Wimberly, V. Ramakrishnan, *Nature* **2000**, *407*, 340–348.
 - [44] „Insights into the formation of the first peptide bond from the structure of EF-P bound to the 70S ribosome“: G. Blaha, R. E. Stanley, T. A. Steitz, *Science* **2009**, *325*, 966–997.
 - [45] D. E. Koshland in *The Enzymes* (Hrsg.: P. D. Boyer, H. Lardy, K. Myrback), Academic Press, New York, **1959**, S. 305–346.
 - [46] „Structure of deacylated tRNA mimics bound to the E site of the large ribosomal subunit“: T. M. Schmeing, P. B. Moore, T. A. Steitz, *RNA* **2003**, *9*, 1345–1352.
 - [47] „The mechanism of action of macrolides, lincosamides and streptogramin B reveals the nascent peptide exit path in the ribosome“: T. Tenson, M. Lovmar, M. Ehrenberg, *J. Mol. Biol.* **2003**, *330*, 1005–1014.
-