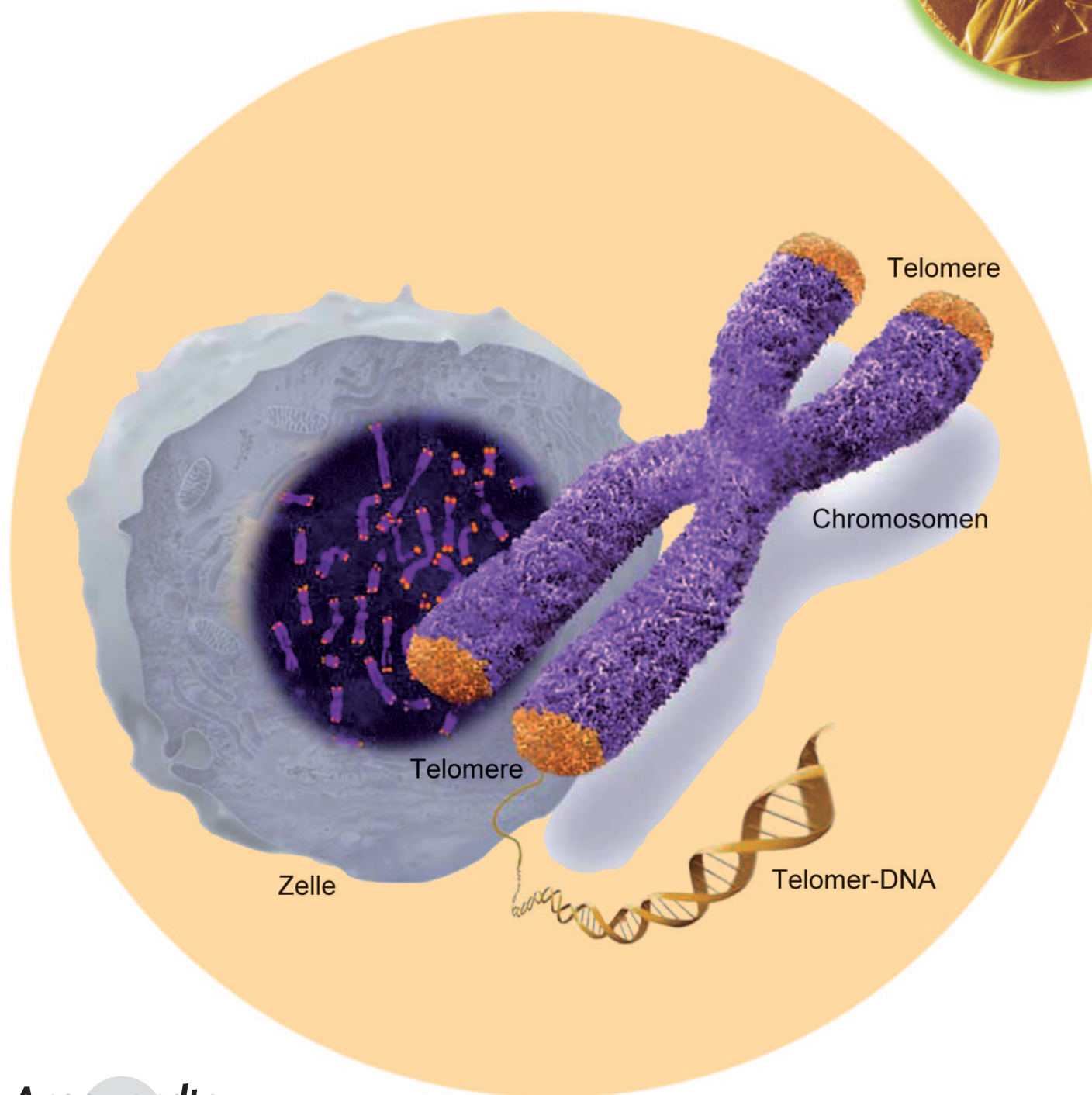


DER NOBEL-PREIS FÜR PHYSIOLOGIE ODER MEDIZIN 2009



DNA-Enden: Nur ein Anfang (Nobel-Aufsatz)**

Jack W. Szostak*

DNA · Nobel-Vortrag · Telomerase · Telomere

1. Wissenschaftliche Autobiographie

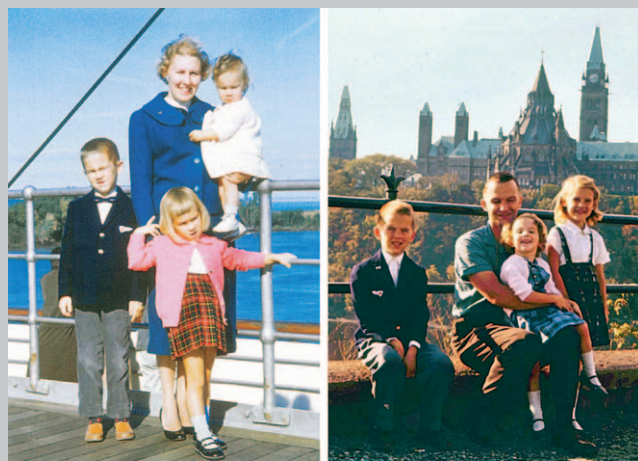
Ich lese gerne Biographien von Wissenschaftlern, nicht zuletzt auch, um das Geheimnis ihres Erfolgs zu erkennen, das aber meist im Verborgenen bleibt. Jetzt, wo ich mich unvermittelt in der Lage sehe, selber eine Biographie zu verfassen, geht es mir ähnlich. Ich kann nicht sagen, warum mich Wissenschaft stets faszinierte oder welches Verlangen mich trieb, meinen eigenen originellen Beitrag zu leisten. Sicher bin ich ein erfolgreicher Forscher gewesen, ein genauer Grund dafür ist aber nicht leicht zu benennen. Trotz allem habe ich versucht, einige Ereignisse und Entscheidungen herauszudeuten, die mir bei verschiedenen Gelegenheiten weiterhalfen oder mich behinderten. Mögen diese Anekdoten denjenigen nutzen, die am Anfang ihrer Laufbahn als Wissenschaftler stehen.

Ich habe stets nach Fragestellungen gesucht, die einerseits interessant und lösbar waren, andererseits aber nicht generell wahrgenommen wurden. Es erscheint mir wenig sinnvoll, Entdeckungen zu machen, auf die andere ohnehin bald stoßen würden. Aus diesem Grund, und weil ich direkte Wettbewerbssituationen lieber meide, fand ich mich in weniger geschäftigen Wissenschaftsfeldern wieder. In diese neuen Gebiete führten mich immer wieder Unterhaltungen mit Menschen, die in ganz anderen Feldern arbeiteten als ich. Eine solche Kombination von Ideen aus einzelnen Gebieten scheint somit „intellektuelle Turbulenzen“ zu erzeugen, die gleichermaßen spannend und produktiv sein können.

Von der Geschichte meiner Familie habe ich nur ein recht vages Bild. Mein Urgroßvater väterlicherseits stammte ursprünglich aus der Gegend um Krakau, emigrierte gegen Ende des 19. Jahrhunderts nach New York City, und landete schließlich in einem Dorf im kanadischen Saskatchewan, wo auch mein Vater geboren wurde. Um der ländlichen Umgebung zu entkommen, ließ sich mein Vater kurz vor dem Ende des 2. Weltkriegs von der RCAF zum Pilot ausbilden, er musste aber glücklicherweise keine Kampfeinsätze mehr fliegen. Anschließend war er in Ottawa stationiert. Die Familie meiner Mutter kam aus England nach Ottawa, wo meine Mutter aufwuchs und meinen Vater traf. Kurz nach der Hochzeit zogen meine Eltern nach England, wo mein Vater sein Studium der Luftfahrttechnik am Imperial College in London fortsetzte. Ich wurde 1952 in London geboren – während des katastrophalen Smogs – überstand die Kohleabgase aber ohne Nachwirkungen und verließ England mit meinen Eltern nach weniger als einem Jahr wieder in Richtung Kanada. Mein Vater arbeitete auch die folgenden 20 Jahre als Luftfahrtingenieur für die RCAF, was sich auch

darin äußerte, dass unser Haus immer von Modellen der Flugzeuge wimmelte, an denen er arbeitete. Nach seiner Verrentung beschäftigte sich mein Vater im öffentlichen Dienst für einige Zeit mit Problemen des Transports in der Arktis; ich erinnere mich noch, wie er mir über die komplizierten Eigenschaften von arktischem Meereis erzählte. Dieses häusliche Umfeld könnte ein Grund dafür sein, dass einige Aspekte meiner Arbeit ingenieurwissenschaftlich angehaucht sind, etwa der Aufbau von Strukturen und die Charakterisierung ihrer Eigenschaften. Ein direkterer Einfluss geht aber darauf zurück, dass mein Vater oft mit seinem Beruf unzufrieden war und gleichermaßen gegen Vorgesetzte wie Untergebene wettete. Sicher war das der Auslöser, dass ich ein akademisches Umfeld mit weniger steifen Hierarchien wählte. Ich hatte nie das Gefühl, für einen Chef zu arbeiten oder selber Angestellte zu beauftragen, sondern eher gemeinschaftlich mit Kollegen die Welt um uns herum zu erforschen.

In meiner Kindheit wurde mein Vater auf verschiedene Luftwaffenstützpunkte in Deutschland, Montreal und Ottawa versetzt. Zu dieser Zeit wurde vielerorts dazu geraten, die



Mit Eltern und Geschwistern in Ottawa.

[*] Prof. J. W. Szostak
Department of Genetics, Harvard Medical School
185 Cambridge Street, CCIB 7215 Simches Research Center, Boston,
MA 02114 (USA)
E-Mail: szostak@molbio.mgh.harvard.edu

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

Schule schnellstmöglich zu absolvieren, und so war ich oft der jüngste in meiner Klasse. Das war zwar unter sozialen Gesichtspunkten problematisch, dafür wurde mir aber vom Lehrstoff her nicht langweilig. Meine frühesten Erinnerungen gehen in den Mathematikunterricht am Gymnasium zurück. Überraschenderweise bleibt mir die Bruchrechnung bis heute im Gedächtnis, ähnlich wie die Lösung quadratischer Gleichungen in der fünften Klasse. An der Riverdale High School, in einem Vorort von Montreal, hatte ich dann einige außergewöhnliche Lehrer: Don Hall bemühte sich um Antworten auf meine merkwürdigen Fragen zu den Naturwissenschaften, und Irene Brun (heute Winston) verdanke ich meine Vorliebe für die Biologie. Zur gleichen Zeit wurde mein Interesse an den Wissenschaften auch zuhause gefördert. Mein Vater richtete mir im Keller ein Chemielabor ein, in dem ich oft genug mit erstaunlich gefährlichen Chemikalien experimentierte, die meine Mutter von der Arbeit mitbrachte. Sie verhalf mir auch zu meinem ersten Ferienjob, in einem chemischen Laboratorium bei derselben Firma. Dies vermittelte mir wohl einen Eindruck von der Bedeutung der quantitativen Analyse, aber die ewig gleichen Arbeitsschritte waren alles andere als interessant – und nicht annähernd so dramatisch wie einige der Experimente, die ich in meinem eigenen Labor ausprobierte. Kurz nach der Brandkatastrophe der Apollo 1 erzeugten mein Vater und ich dort einen Topf voll mit reinem Sauerstoff, in den wir dann vorsichtig eine kleine Menge an brennendem Methanol absenkten. Der Übergang von einer kaum sichtbaren, blassblauen Flamme an Luft in einen Feuerstrahl in Sauerstoff war imposant und erschreckend zugleich, wenn man den Zusammenhang mit dem Feuer in der Raumkapsel bedachte. Weniger sorgsam überwachte Experimente führten nicht selten zu Explosionen, was die Chemie weit spannender erschienen ließ als der Inhalt von Lehrbüchern. Eine Unachtsamkeit bei der Abtrennung von elektrolytisch erzeugtem Wasserstoff und Luft resultierte in einer kräftigen Explosion, bei der ein Glasrohr in einen hölzernen Dachträger hineingetrieben wurde. Zusammen mit meinem Schulfreund Joachim Sparkuhl verfolgte ich auch eher biologisch ausgerichtete Projekte. Im Keller seines Hauses bauten wir einen kleinen Wasserpflanzengarten auf; die Idee hierzu lieferte die Vorstellung, dass Astronauten in zukünftigen Raumstationen eigene Frischnahrung züchten wollten oder müssten.

Im Jahr 1968 begann ich im Alter von 15 Jahren mein Studium an der McGill University. Meine erste Labortätigkeit bestand darin, dass ich einem Chemiedoktoranden bei der Reinigung von Cholesterin assistieren sollte, das als Ausgangsmaterial für die Sterolsynthese dient. Wir nahmen große Säcke voll mit Gallensteinen, lösten diese in einem heißen Lösungsmittel und isolierten die schimmernden Kristalle aus reinem Cholesterin, die sich nach dem Abkühlen der Lösung bildeten. Das war sicherlich eine nützliche Erfahrung, aber nicht interessant genug, um mich in der Chemie zu halten, während die Versuchung, zur Biologie zu wechseln, immer stärker wurde. Ich war überrascht, als ich zu einem Sommerkurs für Studenten in den Jackson Laboratories, einem bekannten Mausgenetik-Institut auf Mt. Desert Island vor der Küste Maines, zugelassen wurde. Auf dem Programm standen neben einem kompakten wissenschaftlichen Teil und

handfester Experimentaltätigkeit auch sportliche Aktivitäten wie die Besteigung von Cadillac Mountain oder die Beobachtung der hübschen Organismen in den nahegelegenen Gezeitentümpeln. Die Tatsache, dass in den Jackson Laboratories Mausgenetik-Forschung betrieben wurde, beeinflusste meine wissenschaftliche Laufbahn auf unerwartete Weise. Ein Teil meines Projekts war es, unter der Anleitung von Dr. Chen K. Chai, die Schilddrüsenhormone in verschiedenen Mutantenstämme zu analysieren. Dazu war es unumgänglich, die Schilddrüsen vieler Mäuse vorsichtig aufzuschneiden. Während es mir nach einiger Übung gelang, die Schilddrüse zu entfernen, ohne eines der zahlreichen Blutgefäße in der Nähe zu verletzen (zumindest meistens), war mir das Töten und Sezieren der Tiere dermaßen zuwider, dass ich mir gelobte, nie wieder einen Tierversuch auszuführen.

Im nächsten Herbst zog ich in das Wohnheim der McGill University, weil meine Eltern nach Ottawa zurückgekehrt waren. Ich verbrachte mehr Zeit in der Bibliothek und weniger Zeit in Vorlesungen, und ich sah mich nach neuen Laboratorien um, in denen ich weitere Erfahrungen sammeln könnte. Ich war immer überrascht, wenn mir Ehrfurcht einflößende Professoren ihre Laboratorien zeigten und mir die Mitarbeit an laufenden Forschungsprojekten anboten. In diesem und dem darauf folgenden Jahr war ich in einigen Arbeitsgruppen am Biology und am Biochemistry Department tätig, wobei ich mich meist mit Pflanzenbiologie befasste. Exkursionen mit Kurt Meier, einem Spezialist auf dem Gebiet der Bryophytenbiologie, prägten meine Vorliebe für einfache Moose und Leberblümchen. Offensichtlich schnitt ich in einem Physiologiekurs von Ron Poole gut genug ab, um als Ferienjob neue Laborexperimente für den Kurs im folgenden Jahr zu testen. Zwar langweilten mich die meisten Lehrveranstaltungen, John Southins Kurs über Molekularbiologie bildete jedoch eine rühmliche Ausnahme. Ich werde den Stapel von Ausdrucken nie vergessen, den er uns in der ersten Sitzung in die Hand drückte – denn dabei handelte es sich nicht etwa um ein paar Veröffentlichungen zur Lektüre, sondern um eine lange Liste von Literaturstellen über aktuelle molekularbiologische Forschungen, deren Inhalt wir uns anzueignen hatten. Die beschriebenen Ergebnisse waren eindrucksvoll: Wir diskutierten über das Meselson-Stahl-Experiment, das damals gerade einmal zehn Jahre zurücklag, und lernten, wie der genetische Code nur ein paar Jahre zuvor aufgeklärt worden war. Erstaunlich fand ich es auch, dass man aus Messungen der Radioaktivität in Fraktionen aus einem Zentrifugenröhrchen die molekularen Details der DNA-Replikation, -Transkription und -Translation ableiten konnte. Eine der größten intellektuellen Herausforderungen in meiner Zeit an der McGill University war die Abschlussprüfung des Kurses. Die Verwendung von Büchern und das Diskutieren waren erlaubt und auch notwendig, denn Antworten auf die kniffligen Fragen waren nur durch intensive Kooperation in Gruppen zu erarbeiten.

In meinem Abschlussjahr übernahm ich zusammen mit meinem Freund Joachim Sparkuhl ein Projekt in Mel Goldsteins Gruppe. Unsere Studie drehte sich um die Grünalge *Eudorina elegans*, eine kleine Ausgabe des üblicheren *Volvox*. Während des Studienjahrs und im darauf folgenden Sommer sammelten wir Beweise dafür, dass diese Algen unter güns-

tigen Bedingungen ein Peptidhormon absondern, das die Spermatogenese auslösen kann. Diese Arbeit führte zu unserer ersten wissenschaftlichen Veröffentlichung, die im folgenden Jahr erschien.^[1]

Ab Herbst 1972 setzte ich meine Studien an der Cornell University in Ithaca, New York, fort. Meine Wahl fiel aus zwei Gründen auf Cornell: Dort konnte ich ein A. D. White Fellowship ganz in Anspruch nehmen, und ich wäre in der Lage, im Department of Plant Physiology weiter an *Eudorina* zu arbeiten. Zu dieser Zeit verfolgte ich das Ziel, *Eudorina* als einfaches Modellsystem für entwicklungsgenetische Studien einzuführen. Dieser Plan misslang aus verschiedenen Gründen, vor allem aber deswegen, weil ein so ehrgeiziges Projekt unmöglich von einem einzelnen unerfahrenen Studenten ausgeführt werden kann. Ohne genetisches Fachwissen und entweder nicht in der Lage oder nicht gewillt, die nötige Hilfe einzuholen, versackte mein Projekt in technischen Problemen.

Während ich darauf wartete, dass meine *Eudorina*-Kulturen wuchsen hatte ich ausreichend Zeit für Gespräche mit meinem Kollegen John Stiles. John stand kurz vor der Promotion, und er machte sich Gedanken, wie es danach weitergehen sollte, während ich mich von *Eudorina* zu verabschieden begann und von einem produktiveren Projekt träumte. Wir redeten viel über neue molekularbiologische Methoden, die es sicher ermöglichen würden, die Struktur und Aktivität einzelner Gene auf molekularer Ebene zu erforschen; Klonier- und Sequenzieretechniken steckten damals noch in den Kinderschuhen. John und ich vereinbarten schließlich ein gemeinsames Experiment. Die Idee war es, ein DNA-Oligonucleotid chemisch zu synthetisieren, das ausreichend lang war, um an eine einzelne Sequenz im Hefegenom zu binden, und dieses Oligonucleotid dann als mRNA- und genspezifische Sonde zu verwenden. Das Konzept war einfach, aus technischer Sicht war die Idee aber eine Herausforderung. Zu dieser Zeit war die DNA-Sequenz nur für ein kurzes Stück des Hefegenoms bekannt, nämlich für die Region, die für den N-Terminus des Proteins Iso-1-Cytochrom c kodiert, das Fred Sherman viele Jahre lang intensiv studiert hatte. Seine Arbeitsgruppe hatte alle Register von Genetik und Proteinchemie gezogen, um Mutanten mit doppelter Leserasterverschiebung zu isolieren, in denen die N-terminale Region des Proteins durch Codons außerhalb des Leserasters translatiert wurde. Durch Ermittlung der Proteinsequenz des Wildtyps und der Mutanten konnten sie 44 Nucleotide in der DNA-Sequenz ableiten. John und ich dachten, dass wir mithilfe eines synthetischen Oligonucleotids, das komplementär zu der kodierenden Sequenz ist, die mRNA und das Gen für Cytochrom c erkennen könnten. Damals wurden so gut wie alle Experimente an mRNA mit der gesamten Zell-mRNA ausgeführt, sodass es annähernd unmöglich war, die Expressierung einzelner Gene zu verfolgen.

John und ich hatten genug Vertrauen in unsere Idee, dass wir bei Laboratorien anfragten, in denen wir das Projekt verfolgen könnten – ich den chemischen Aspekt und John den biologischen Teil an Hefe. An der Cornell University bot sich für ein solches Experiment die Arbeitsgruppe von Ray Wu im Department of Biochemistry geradezu an. Ray war bekannt

für die erste DNA-Sequenzierung überhaupt (an den „sticky ends“ des Phagen Lambda), und ein Schwerpunkt seiner Gruppe lag auf der Untersuchung von Enzymen, mit deren Hilfe DNA effizienter manipuliert und sequenziert werden könnte. Wir wandten uns an Prof. Wu, der unsere Idee für interessant und eines Versuchs wert erachtete. Er wollte aber nicht den Anschein erwecken, einer anderen Gruppe die Doktoranden auszuspannen; als weitere Bedingung kam hinzu, dass die Arbeit eine Kollaboration mit Fred Shermans Gruppe erforderlich machte. John bewarb sich bei Fred im nahen Rochester, New York, als Postdoc und wurde eingestellt, während ich Ray an der Cornell University davon überzeugte, mich in seine Gruppe aufzunehmen. Das Projekt konnte beginnen.

Zwischen dem Abschluss meiner Arbeiten am Department of Plant Physiology und der Aufnahme meiner neuen Tätigkeit am Department of Biochemistry blieb mir reichlich Zeit, die ich für meine erste eigene Europareise nutzte. Meine erste Station war die University of Cambridge, wo Prof. Poole, für den ich an der McGill University gearbeitet hatte, gerade ein Forschungssemester nahm. Ich war beeindruckt von der Stadt, vor allem von der Kapelle des King's College und den ätherischen Klängen darin, noch mehr aber vom berühmten Laboratorium für Molekularbiologie an der MRC, wo ich in Sydney Brenner eine der Ikonen der Molekularbiologie als Gesprächspartner hatte. Als ich in seinem Büro wartete, fiel mir auf, dass zwei Schreibtische im Raum standen, beide überhäuft mit Papierstapeln. Sydney erzählte mir über ein bemerkenswertes neues Projekt mit dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* als entwicklungsbioologisches Modellsystem. Ich hörte zu und lernte, wie man ein solch ambitioniertes Projekt richtig angeht. Auch die Ursache für den zweiten Tisch klärte sich in unserem Gespräch: Sydney teilte das kleine Büro mit einem Kollegen namens Francis Crick!

Ich verbrachte noch einen Monat mit Kunst, Architektur und Musik in Paris, bevor ich nach Ithaca zurückkehrte und mich in meinem neuen Labor an das neue Projekt begab. Das Ziel war klar – die chemische Synthese des Oligonucleotids, das wir für unser Gendetektionsverfahren benötigten –, doch damals war dies für einen Studenten, der kaum Erfahrung in chemischer Synthese hatte, eine ernstzunehmende Herausforderung. Ray hatte ein gemeinsames Projekt mit Saran Narang laufen, der einen Ansatz zur Oligonucleotidsynthese in Lösung mit Phosphotriestern entwickelte. Wir nutzten diesen Ansatz, um große Mengen von fünf Trimerbausteinen herzustellen, die wir dann zu Hexameren, einem Nonamer und schließlich zu einem 15-mer zusammensetzen wollten. Anfangs stand mit dabei Chander Bahl zu Seite, ein Postdoc, der einige Erfahrung mit dieser Technik hatte. Unser Labor war allerdings leider für Enzymologie besser ausgerüstet als für Synthesen, und uns fehlten erfahrene Chemiker. Nach einem Jahr war ich immer noch weit von meinem Ziel entfernt und entsprechend frustriert. Ray Wu erkannte meine Malaise und arrangierte einen Besuch in Saran Narangs Arbeitsgruppe in Ottawa, wo mich Keichi Itakura, der später durch die Synthese des Insulins berühmt wurde, unterwies. Nach zwei Wochen intensiven Trainings kehrte ich nach Ithaca zurück, um mich mit neuer Energie auf meine Synthese zu stürzen, und wenige Monate später hatte ich einige

Milligramm des gesuchten 15-mers isoliert. In Zusammenarbeit mit John Stiles und Fred Sherman, die uns RNA- und DNA-Proben geeigneter Hefestämme zusendeten, konnten wir nachweisen, dass das markierte 15-mer als Sonde für die *cyc1*-mRNA und (später) auch für das Gen selbst wirkt. Der Umstand, dass wir einen Bericht über diese aufregende Beobachtung in *Nature*^[2] veröffentlichen konnten, stärkte mein Selbstvertrauen nach so vielen Jahren ergebnisloser Arbeit. Außerdem lernte ich eine wichtige Lektion über effiziente Forschungsstrategie: Wenn Probleme auftreten, lohnt es sich, Fachleute um Rat zu fragen. Und es gibt glücklicherweise so viele gutwillige Menschen, die einem Kollegen oder Studenten gerne dadurch weiterhelfen, dass sie ihm eine Technik beibringen oder mit ihm über ein Problem diskutieren.

Nach meiner Promotion im Jahr 1977 entschloss ich mich entgegen aller Ratschläge, als Postdoc in Rays Gruppe zu bleiben – allerdings für Arbeiten auf einem ganz anderen Forschungsgebiet. Die Entscheidung wurde dadurch bedingt, dass Rays Gruppe durch Rodney Rothstein aus Fred Shermans Gruppe in Rochester verstärkt wurde. Rod kam als Postdoc und war ein ausgebildeter Hefegenetiker, er hatte aber nur wenig Erfahrung mit Molekularbiologie; bei mir verhielt es sich genau umgekehrt. Wir arbeiteten an einem Hefetransformationsprojekt zusammen und brachten uns dabei gegenseitig die jeweils fehlenden Kenntnisse bei. Dabei diskutierten wir häufig – und oft auch laut –, was wiederholt zu Ermahnungen von Rays Seite führte, weil er sich in seinem Büro nicht konzentrieren konnte. Dank der Molekularbiologie, die ich in Rays Gruppe lernte, und der Genetik, die mir Rod beibrachte, war ich für die nächsten zehn Jahre gerüstet, in denen mich meine Arbeiten über Hefe zunächst zu Rekombinationsstudien und später dann zu den Telomeren und anderen biologischen Aspekten der Hefen führten. Ray war ein vorbildlicher Chef,^[3] von dem ich nicht nur in wissenschaftlicher Hinsicht etwas gelernt habe, sondern auch in Hinblick darauf, wie man eine Arbeitsgruppe führt: Da sein, wenn Rat gefragt ist, ansonsten aber kreative Studenten und Postdocs ihre eigenen Ideen verfolgen lassen.

Die Rekombinationsstudien in Hefe aus meiner Postdoc-Zeit wurden dadurch ermöglicht, dass Gerry Finks Gruppe an der Cornell University einen Weg entdeckt hatte, fremde DNA in Hefe einzubringen.^[4] Diese bahnbrechenden Studien zeigten, dass zirkuläre Plasmid-DNA durch homologe Rekombination gelegentlich in die chromosomale DNA der Hefe eingebaut werden kann. Rod und ich suchten nach

Möglichkeiten, die Entstehung solcher Transformanten zu begünstigen. Eine Vergrößerung des Zielgebiets für die Rekombination erschien uns als eine gute Idee. Als ich Hefe mit Plasmiden transformierte, die Fragmente von rDNA enthielten, erhielt ich tatsächlich mehr Transformanten, und in diesen war die Plasmid-DNA an der Stelle der rDNA eingebaut. Diese Stämme ermöglichten es mir, die Chromatidaustausch-Studien an der Stelle der rDNA auszuführen, die meiner ersten Veröffentlichung auf dem Gebiet der Rekombination zugrundelagen.^[5] Gegen Ende meiner Zeit in Rays Gruppe stießen Rod und ich auf Hinweise für eine Rekombination in Hefe als Folge eines Doppelstrangbruchs. Unsere ersten Experimente deuteten an, dass ein Schnitt der Plasmid-DNA in der Homologieregion für die chromosomale DNA der Hefe zu mehr Transformanten führt, was vermutlich auf eine verstärkte Rekombination der eingeführten DNA mit den homologen Chromosomenstellen hinwies. Die Vorstellung, das Auftreten einer Transformation könne durch einen Schnitt in der eingeführten DNA begünstigt werden, entzog sich einer intuitiven Erklärung und weckte daher unser Interesse.

Meine erste eigenständige Forscherstelle, am Sidney Farber Cancer Institute (heute Dana-Farber Cancer Institute), hatte ich zu einem großen Teil Prof. Ruth Sager zu verdanken, die sich sehr für meine Einstellung stark machte. Sie versammelte eine Gruppe aufstrebender Forscher um sich, unter anderem auch Richard Kolodner und Gerry Rubin. Viele Jahre später erfuhr ich, dass sich Ruth bei meiner Einstellung über einige Kollegen aus dem klinischen Bereich hinwegsetzen musste, die ironischerweise keinen Bezug zwischen meinen Studien an Hefe und ihrem Krebsforschungszentrum sahen. Heute genießen Modellsysteme ein deutlich höheres Ansehen als zu dieser Zeit. Dank der tatkräftigen Hilfe meiner Doktoranden von der Harvard Medical School, an deren Department of Biological Chemistry ich einen Lehrauftrag hatte, war schnell ein produktives Hefegenetik-Labor auf die Beine gestellt.

Zunächst befassten wir uns vorrangig mit Doppelstrangbrüchen in DNA und ihrer Reparatur durch Rekombination. Diese Arbeiten begann meine erste Doktorandin, Terry Orr-Weaver, die heute Professorin am Whitehead Institute und am MIT ist. Terrys Studien und die fortgesetzte Zusammenarbeit mit Rod Rothstein führten dazu, dass wir uns intensiv damit beschäftigten, welche Reaktionen an DNA-Enden ablaufen könnten.^[6] Unterschiedliche Modelle zur Rekombination und DNA-Reparatur wurden kontrovers diskutiert, wobei Seminaren und Konferenzen besondere Bedeutung beim Austausch der aktuellsten Informationen zukam. Lange Jahre fand die wichtigste internationale Rekombinationskonferenz im schottischen Aviemore statt, wo man außerdem die Gelegenheit hatte, die Diskussionen über Feinheiten des Genaustauschs angenehm mit der Verkostung erlesener Whiskeys zu verknüpfen. Nach einem besonders gelungenen Abend hatte ich morgens einige Probleme, meinen Vortrag über die Bühne zu bringen.

Ich genoss auch die kleineren, intensiveren Gordon- und Cold-Spring-Harbor-Konferenzen, bei denen Nachwuchswissenschaftler ihre Arbeiten präsentieren und mit den Größen des Fachgebiets diskutieren konnten. Im Sommer



Die Arbeitsgruppe Wu an der Cornell University.

1980 nahm ich an einer Gordon-Konferenz über Nucleinsäuren teil, um mich über aktuelle Fortschritte bei der Synthese, Sequenzierung und Reparatur von DNA zu informieren. Der Höhepunkt dieser Tagung bestand für mich aber im Vortrag von Liz Blackburn über ihre Arbeiten zu den Telomeren in *Tetrahymena*. Aus unserer Diskussion nach dem Vortrag entstand ein gemeinsames Projekt; wir wollten prüfen, ob *Tetrahymena*-Telomere auch in Hefe ihre Aufgabe erfüllen. Diese Experimente sind ausführlich in meinem Vortrag beschrieben; hier möchte ich nicht mehr sagen, als dass es eine sehr aufregende Zeit für mich war. Weil ich die Experimente selber ausführte, wusste ich auch als erster, dass unsere Idee tatsächlich funktioniert hatte. In diesem Moment war mir klar, dass wir durch weitere Studien an Hefe vieles mehr über die Telomerefunktion würden lernen können. Bald konnte ich Hefetelomere angemessen klonieren, und in Zusammenarbeit mit Liz Blackburns Gruppe erhielten wir die Sequenzinformationen, auf deren Grundlage wir die Existenz des Schlüsselenzyms Telomerase postulierten.

Nach den erfolgreichen Rekombinations- und Telomerprojekten wuchs meine Arbeitsgruppe. Mein zweiter Doktorand Andrew Murray, jetzt Professor in Harvard, begann mit der Entwicklung künstlicher Chromosome. Andrew war ein brillanter Student mit viel Tatendrang, mit dem man jedes erdenkliche Experiment diskutieren konnte, und eine schillernde Persönlichkeit, was sich auch in seinen Kleidungsgehnheiten auszudrücken pflegte. Der Kollaboration mit Rod und Terry schloss sich auch Frank Stahl an, der führende Experte für die Genetik der meiotischen Rekombination, mit dem wir die genetischen Implikationen physikalischer Modelle bis ins Detail diskutierten. Ich erinnere mich da besonders an einen Nachmittag als Gast bei Frank und Mary Stahl in Eugene, Oregon, an dem Frank und ich verschiedene Versionen der Doppelstrangbruch-Reparaturmodells für ein Manuskript^[7] durchexerzierten.

Nach fünf hoch produktiven Jahren am Farber Institute bekam ich die Gelegenheit, an das noch junge Department of Molecular Biology des Massachusetts General Hospital (MGH) zu wechseln. Howard Goodman, der Gründer des Department und ein Vorreiter der Biotechnologie, hatte dort eine innovative Kollaboration zwischen Hochschule und Industrie arrangiert. Der Pharmariese Hoechst AG hatte zugestimmt, für alle Forschungsaktivitäten im Department of Molecular Biology des MGH über zehn Jahre aufzukommen und sicherte sich dafür eingeschränkte Rechte am intellektuellen Eigentum. Mir gefiel diese Absprache im Besonderen, weil ich in jede erdenkliche Richtung forschen konnte, ohne auf die Anwerbung herkömmlicher Fördermittel für neue, unversuchte Ideen angewiesen zu sein. Im Sommer 1984 verlegte ich mein Labor also vom Farber Institute an das MGH (das die Kollegen vom Whitehead Institute des MIT gerne als „eines der besten Forschungsinstitute in Bostons Stadtzentrum“ verniedlichten).

Zu dieser Zeit erwog ich es ernsthaft, auf anderen Forschungsgebieten aktiv zu werden. 1984 hatte ich den Eindruck gewonnen, dass die experimentelle Arbeit zu Hefen, die wir zu dieser Zeit ausführten, unweigerlich binnen Monaten oder Jahren auch anderen gelingen würde. Um mich auf anderen Gebieten weiterzubilden und ein neues Aufgabenfeld auszu-

wählen, besuchte ich einige Lehrveranstaltungen an der Harvard University. Besonders interessant war ein Kurs zu kognitiver Psychologie, in dem Steve Kosslyn die faszinierenden Zusammenhänge zwischen lokalen Hirnverletzungen und geistigen Behinderungen herausstellte und neue Bildgebungstechniken vorstellte, die das Studium der Gehirnfunktionen weit voranbringen könnten. Den Kurs in angewandter Mathematik nahm ich, um mir die erforderlichen Grundkenntnisse anzueignen, sollte ich mich wirklich mit Strukturbiochemie befassen wollen. Und ein hervorragender Kurs über Enzymologie und Katalysemechanismen von Jeremy Knowles weckte mein Interesse an der Katalyse. Als Jeremy später Dekan der Fakultät für Naturwissenschaften und Kunst an der Harvard University wurde, „vermachte“ er mir einen seiner Doktoranden, Jon Lorsch, der dann in meiner Arbeitsgruppe herausragende Arbeiten über Ribozymselektion und mechanistische Enzymologie ausführte.

Die Kombination aus Jeremys Enzymologiekurs und der Entdeckung der Ribozyme durch Tom Cech und Sid Altman (die sich dafür 1989 den Nobel-Preis für Chemie teilten) führte mich schließlich auf dieses Fachgebiet. Dies erschien mir als kein allzu gewagter Schritt, weil auch Ribozyme hauptsächlich mit molekularbiologischen und chemischen Methoden untersucht werden. Was mich überraschte war die geringe Zahl an Forschern, die das neue Gebiet betraten, zumal ich davon ausging, dass hier die Antworten auf wichtige Fragen zum Ursprung der biologischen Katalyse in einer hypothetischen RNA-Welt vor der Evolution der Proteinsynthese lagen.

Ich begann selbst mit der Arbeit an RNA, spielte ein wenig mit Cechs *Tetrahymena*-Ribozym herum, das ich aus dem gleichen DNA-Stück erhielt wie die *Tetrahymena*-Telomere, mit denen ich mich nur wenige Jahre zuvor befasst hatte. Meine erste Studentin auf diesem neuen Gebiet war Jennifer Doudna. Sie hatte eigentlich vorgehabt, Hefegenetik zu betreiben, ließ sich aber davon überzeugen, dass RNA-Studien aussichtsreicher waren. Jennifer trieb unsere Versuche, selbstsplicinge Introne in eine RNA-Replikase einzufügen, energisch voran. Bald bekamen wir Verstärkung durch Rachel Green und weitere Studenten, Laboranten und Postdoktoranden sowie durch Francois Michel, der uns für ein Forschungssemester besuchte und alle mit seiner Arbeitsmoral, seiner erstaunlichen Fähigkeit, Strukturen aus der Phylogenese abzuleiten, und seiner gleichzeitigen Forschung über die Evolution von Schmetterlingen beeindruckte.

Auch als wir unseren Schwerpunkt auf RNA verlegten, blieben wir auf dem Gebiet der Hefegenetik noch für bis ans Ende der 80er Jahre aktiv. Mein Interesse an Rekombination und Telomeren war noch nicht erloschen, und ich wollte unsere früheren Arbeiten zu einem würdigen Abschluss bringen. Rekombinationsstudien wurden von Doug Treco, Alain Nicolas, Neil Schultes und Hong Sun verfolgt, die sich auch weiterhin auf die Rolle von Doppelstrangbrüchen bei der meiotischen Rekombination konzentrierten. Am wichtigsten auf dem Gebiet der Telomere waren Vicki Lundblads bahnbrechende Ergebnisse zur Telomergenetik in Hefen, die einen Zusammenhang zwischen Telomererhaltung und Alterungsprozessen offenbarten.^[8] Barbara Dunn verknüpfte die beiden Gebiete mit ihrer Studie zur Übertragung von Telo-

mer-Wiederholungseinheiten zwischen Chromosomen durch Rekombination.

Am Ende der 80er Jahre stellten wir unsere Arbeiten über Hefen praktisch ein und konzentrierten uns auf RNA. Auf diesem Gebiet gelang uns der Durchbruch mit Andy Ellingtons Studien zur In-vitro-Selektion,^[9] die eine neues Kapitel der gerichteten In-vitro-Evolution funktioneller Moleküle einleiteten. Uns wurde mit der Zeit klar, dass wir mit jedweder Nucleinsäure Bindungsstellen für so gut wie jedes Zielmolekül durch Evolution erhalten konnten. Zuversichtlich versuchten wir also, neue Katalysatoren zu entwickeln. Mit der Vorstellung einer RNA-Welt im Hinterkopf gingen wir außerdem die chemischen Aspekte der Nucleinsäurepolymerisation an.^[10] Dabei legten wir den Grundstein für Dave Bartels erfolgreiche Versuche zur Selektion von Ribozym-ligasen, auf die er anschließend (in seiner eigenen Gruppe am Whitehead Institute und MIT) die Entwicklung eines RNA-Moleküls mit echter RNA-Polymeraseaktivität aufbaute. Durch unsere Fortschritte interessierte ich mich zunehmend für die Rolle von RNA in den frühen Stadien der Evolution; es schien, als sei die Erschaffung einer RNA-Welt fast in Reichweite. Unsere Erfolge bei der Evolution neuer Aptamere und Ribozyme führten dazu, dass meine Arbeitsgruppe fast die gesamten 90er Jahre damit verbrachte, die Grenzen des mit RNA Machbaren auszuloten. Diese Erfolge blieben nicht unbemerkt: Sie brachten mir einen Platz in der National Academy of Sciences und eine Ernennung zum Howard Hughes Investigator im Jahr 1998 ein. Gleichzeitig lief die Förderung meines Instituts durch Hoechst aus, doch dank meiner Berufung an das HHMI war der äußere Rahmen für meinen Drang in neue Forschungsgebiete einmal mehr abgesichert.

Nachdem auch andere Arbeitsgruppen erfolgreich neue, interessante Ribozyme entwickelt hatten, erschien die De-novo-Evolution von Proteinen und Peptiden als die größere Herausforderung. Unsere ersten Schritte auf diesem Gebiet machte mein Postdoc Richard W. Roberts, der den Translationsapparat dazu bringen konnte, ein neu translatiertes Protein unter Einwirkung des Antibiotikums Puromycin kovalent an seine eigene mRNA zu knüpfen.^[11] Nach diesem Erfolg ermutigte ich einige neue Mitarbeiter, mithilfe dieser mRNA-Display-Technik grundlegende Fragen zum Ursprung der Proteinstruktur anzugehen. Tony Keefe nutzte das Verfahren, um ein neuartiges ATP-bindendes Protein in einer großen Zufallsbibliothek von Polypeptidsequenzen zu identifizieren.^[12] Dieses Protein nichtbiologischen Ursprungs lässt sich erstaunlicherweise nicht von kleinen normalen, biologischen Proteindomänen unterscheiden. Die Postdocs John Chaput und Sheref Mansy entwickelten dieses Protein in den folgenden Jahren weiter und untersuchten seine Struktur.

Nach der Entdeckung dieser Proteinevolutionstechnik gründete ich zusammen mit Rich und meinem Kollegen Brian Seed ein Biotechnologie-Unternehmen, was zwar nicht zu wirtschaftlichem Erfolg aber zu einem Zuwachs an Erfahrung führte. Die Zusammenarbeit unter Wissenschaftlern, von Protein-Biophysikern bis hin zu Fachleuten der klinischen Wirkstoffentwicklung, resultierte in der Entwicklung einer kleinen Proteindomäne mit Therapiepotenzial; dieses künstliche Protein befindet sich zurzeit in der klinischen Testphase.

Während die Ausrichtung meiner Arbeitsgruppe stets auf der Grundlagenforschung blieb, bin ich der Meinung, dass solche kleinen Firmen sich bestens dafür eignen, Forschungsergebnisse zu therapeutischen Anwendungen weiterzuentwickeln.

Seit 2000 habe ich mich zunehmend mit grundlegenden Fragen zum Ursprung des Lebens beschäftigt. Mein Interesse an der Rolle von Kompartimentierung und Zellstrukturen in diesem Zusammenhang wurde durch Diskussionen mit Pier Luigi Luisi und David Bartel angestoßen. Nach einem Jahr voller Debattieren hatten wir unsere Ansichten zum Beitrag von Genetik, Kompartimentierung und Evolution soweit abgestimmt, dass wir im Jahr 2001 in *Nature* unter dem Titel „Synthesizing Life“ darüber berichten konnten.^[13] Diese Veröffentlichung führte mich ins Feld der Membranbiophysik, denn nachdem ich ein Modell für frühe Zellen vorgeschlagen hatte, in dem Doppelschichtmembranen von entscheidender Bedeutung waren, fühlte ich mich verpflichtet nachzuweisen, dass dieses Modell auch physikalisch plausibel war. Irgendwie war ich selbst davon überrascht, mich auf dem Gebiet der Lipide und Membranen wiederzufinden, die viel verschwommener und schlechter definiert sind als Nucleinsäuren. Doch zumindest in einer Hinsicht passte diese Untersuchung von Membranen aus präbiotischen Bestandteilen wie Fettsäuren perfekt zu mir, weil auf diesem Gebiet zahlreiche wichtige Fragen warteten, deren Beantwortung aus technischer Sicht möglich erschien. Mit der Unterstützung des Postdocs Marty Hanczyc und der Doktorandin Shelly Fujikawa wurden rasch Fortschritte erzielt, und binnen weniger Jahre konnten wir Beweise für ein Wachstum und Teilen von Vesikeln vorlegen, das rein auf physikalischen Prozessen beruht. Ich wurde optimistisch, dass es möglich sein sollte, für wenigstens einige der noch rätselhaften Schritte bei der Entstehung des Lebens plausible Erklärungen anbieten zu können. Darin bestärkten mich Erfolge meiner brillanten Biophysik-Doktorandin Irene Chen, die einen Weg für die Konkurrenz zwischen Protozellen erkannte. Wir waren nicht sicher, ob unsere Modellprotozellen Nährstoffe wie Nucleotide (für die Replikation des Genmaterials) aufnehmen konnten, doch Sheref Mansy zeigte, dass dies kein Problem ist. Später stellte dann Ting Zhu, ein weiterer Doktorand, einen plausiblen Weg für das spontane gekoppelte Wachstum und Teilen vor, sodass der Aufbau und die Replikation von Protozellmembranen nicht so schwer erschienen, wie wir anfangs dachten.

Die großen Fortschritte bei der Identifizierung von Wegen der Selbstreplikation von Protozellmembranen ermutigten uns, das schwierigste verbleibende Problem, die Replikation des Genmaterials, in Angriff zu nehmen. Hier stellt sich die entscheidende Frage, ob RNA wirklich das erste genetische Polymer war oder ob sie einen einfacheren, leichter zugänglichen oder robusteren Vorläufer hatte. Um diese Frage beantworten zu können, ließ ich mein Laboratorium aufs Neue umrüsten, diesmal mit organischer Synthese im Blick. Wir synthetisieren jetzt Aminonucleotide, weil diese als Bausteine für Phosphoramidat-Polymere reaktiver sind als normale Nucleotide. Der Postdoc Alonso Ricardo und der Doktorand Jason Schrum haben kürzlich signifikante Fortschritte bei der templatgesteuerten Synthese 2',5'-verknüpfter Phosphoramidat-DNA erzielt,^[14] und wir erforschen zurzeit eine Reihe



Meine Arbeitsgruppe nach Bekanntgabe des Nobel-Preises.

verwandter Polymere auf der Suche nach noch besseren selbstreplizierenden Genmaterialien. Wegen ihrer Komplexität und mangelnden Stabilität galt RNA als erstes Genmaterial lange als unwahrscheinlich, aber brillante Arbeiten von John Sutherlands Gruppe in Manchester brachten sie wieder ins Gespräch.^[15] Mit der Hilfe von Johns früherem Doktoranden Matt Powner, der jetzt als Postdoc in meiner Gruppe arbeitet, untersuchen wir nun neue Wege der chemischen RNA-Replikation. Ich verfolge stets interessiert, wie meine Mitarbeiter neue Syntheseansätze für modifizierte Nucleinsäure entwickeln, aber momentan ist die Spannung geradezu unerträglich, da wir auf die Ergebnisse der Experimente zur templatgesteuerten Polymerisation warten.

Aus jetziger Sicht ist nicht klar, ob es zu dem Problem einer chemischen Replikation von genetischen Polymeren viele Lösungen geben wird – oder nur eine oder auch gar keine –, in jedem Fall ist es ein aufregendes Forschungsgebiet. Unsere kleinen Fortschritte leiten uns aber auf dem Weg hin zum angestrebten Ziel: dem Aufbau replizierender und evolutionisierender chemischer Systeme.

2. Nobel-Vortrag

Die Beiträge meiner Arbeitsgruppe zum Verständnis der Telomerfunktion und -erhaltung durch die Telomerase entstanden in einer Phase zwischen 1980 bis 1989 zu Beginn dieser Entwicklung. Hier möchte ich über einige der Probleme berichten, die wir überwinden mussten, vor allem darüber, wie schwer es war, uns von unseren ursprünglichen Modellen zur Telomerfunktion zu lösen. Zum Glück waren die Indizien, die wir fanden, überzeugend genug, um uns zu den richtigen Schlussfolgerungen zu führen! Weil ich mich aber schon ziemlich bald wieder von der Telomerforschung abwandte, möchte ich die Gelegenheit auch nutzen, kurz einige der Arbeiten zusammenzufassen, die wir seitdem gemacht haben, vor allem, um Studenten zu verdeutlichen, dass es nicht nur möglich ist, sondern auch Spaß macht, sich während seiner wissenschaftlichen Laufbahn mit sehr unterschiedlichen Fragen auf verschiedenen Feldern zu befassen.

Mit der Natur der Chromosomenenden bei Eukaryoten, der Telomere, waren lange Zeit zwei ungelöste Rätsel verknüpft: das Problem der Stabilität der Chromosomenenden

und das Problem der vollständigen Replikation. Ich kam mit diesen Fragen zum ersten Mal in den ersten Semestern meines Studiums an der McGill University in Montreal in Berührung. Das erste Problem, die Reaktivität der Chromosomenenden, gab schon viele Jahrzehnte lang Rätsel auf, nämlich seit den bahnbrechenden Arbeiten von Hermann Muller^[16] und Barbara McClintock^[17] in den 1930er Jahren. Muller erzeugte mit Röntgenstrahlen Strangbrüche in der DNA, während McClintock dazu cytogenetische Tricks anwendete. Beide kamen allerdings zu der gleichen Schlussfolgerung, dass die Enden gebrochener Chromosomen sehr reaktiv sind und Dinge tun, die normale Chromosomenenden niemals tun. Dies wird eindrücklich durch den berühmten Zyklus aus Strangbruch, Fusion und Brückenbildung verdeutlicht, der von McClintock erforscht wurde (Abbildung 1).

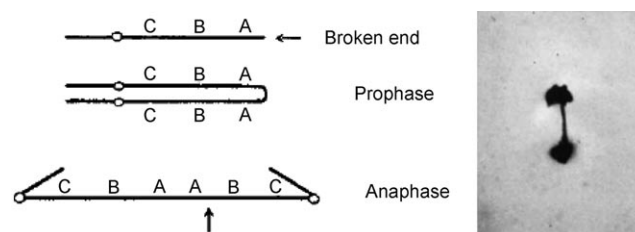


Abbildung 1. Der Zyklus aus Bruch, Fusion und Brückenbildung bei Chromosomen nach Barbara McClintock. Links: Nach der Replikation des gebrochenen Chromosoms binden die beiden Bruchstellen aneinander und bilden ein dizenstrisches Chromosom. Wenn die beiden Centromere zu entgegengesetzten Polen der sich teilenden Zelle gezogen werden, bricht das Chromosom erneut, und die neuen Bruchstücke setzen den Zyklus fort (*Genetics*, 1941, 26, 234–282). Rechts: Mikroskopaufnahme eines dizenstrischen Chromosoms, das die beiden Pole der Kernspindel überbrückt (*Genetics*, 1938, 23, 315–376).

Die grundlegende Beobachtung war, dass bei der Replikation eines Chromosoms mit einer Bruchstelle zwei Enden entstehen, die sich vereinigen können und so ein Chromosom mit zwei Centromeren bilden. Wenn diese Centromere während der Zellteilung zu gegenüberliegenden Polen der Kernspindel gezogen werden, bricht das Chromosom erneut und bildet wiederum Chromosomen mit Bruchstellen. Das führt zu andauernden Zyklen von Fusion und Bruch. Als Folge verlieren die Zellen wichtige Teile der Chromosomen, und es verwundert nicht, dass dadurch viele nicht lebensfähige Zellen entstehen. Es war klar, dass dieser Prozess an den Enden normaler Chromosomen nicht ablaufen kann; die Verknüpfung ihrer Enden musste in irgendeiner Weise verhindert sein. Zu dieser Zeit war allerdings nicht einmal bekannt, dass DNA das Genmaterial war, und man konnte über diese Vorgänge noch nicht in molekularen Begriffen nachdenken.

Erst lange nachdem DNA als genetisches Material in den Chromosomen erkannt worden war, fanden Watson^[18] und Olovnikov^[19] dass die Replikation der Enden von DNA-Molekülen ein besonderes Problem darstellt (Abbildung 2). Wenn die Replikationsgabel am Ende des Chromosoms ankommt, kann der Leitstrang die Reaktion bis zum Ende der Matrize fortsetzen. Nicht so der Folgestrang, da dieser durch die Verlängerung eines RNA-Primers durch die DNA-Poly-

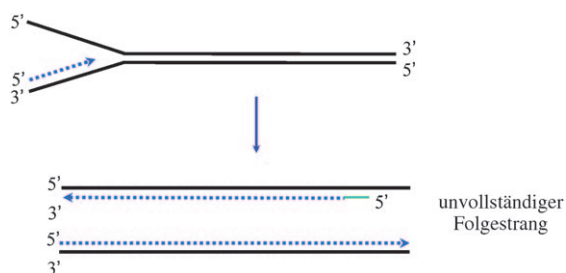


Abbildung 2. Das Problem der Replikation der Chromosomenenden aus der Sicht von Watson^[18] und Olovnikov.^[19] Wenn eine Replikationsgabel das Ende eines Chromosoms erreicht, bleibt der Folgestrang notwendigerweise unvollständig, weil der letzte Primer von der Primase entfernt wird und möglicherweise nicht bis zum Strangende reicht.

merase erzeugt wird. Wird dieser RNA-Primer an einer Stelle im Inneren des Matrizenstrangs erzeugt, bleibt die distal liegende DNA unrepliziert. Und auch wenn der RNA-Primer am äußersten Ende des DNA-Strangs bindet, bleibt nach Abbau dieses Primers ein kurzes DNA-Stück unrepliziert. Ohne einen Ausgleichsmechanismus würden die Enden immer kürzer werden. Da dies aber nicht passiert, muss ein Prozess die notwendigerweise unvollständige Replikation kompensieren. Dieser Prozess war aber damals noch unbekannt.

Als Student beeindruckte mich das alles nicht sonderlich, das änderte sich aber, als ich mich Jahre später mit den molekularen Reaktionen an DNA-Bruchstellen zu beschäftigen begann. Ich war damals als Postdoc in Cornell bei Ray Wu zusammen mit meinem Freund und Kollegen Rodney Rothstein. Ebenfalls in Cornell, im Labor von Gerry Fink, waren kurz zuvor Methoden entdeckt worden, um DNA-Moleküle in Hefezellen einzuführen (später als Hefetransformation bezeichnet),^[20] die sehr viele interessante Experimente ermöglichten. Rod und ich untersuchten zunächst einige Variationen des ursprünglichen Verfahrens, z.B. indem wir ringförmige DNA-Moleküle aufschnitten, bevor wir sie in Hefe einbrachten. Nachdem ich am Sidney Farber Cancer Institute in Boston meine eigene Arbeitsgruppe eingerichtet hatte, setzten wir diese Zusammenarbeit unter Beteiligung meiner ersten Diplomandin, Terry Orr-Weaver, fort.^[21,22]

Während unserer Experimente über Transformation und Rekombination beobachteten wir einen Vorgang, der analog zu den Fusionsereignissen war, die McClintock Jahrzehnte zuvor in Mais untersucht hatte (Abbildung 3). Wir gingen von einem ringförmigen DNA-Molekül aus, das sich als zirkuläres DNA-Plasmid in Hefe replizieren konnte, weil es einen Replikationsursprung für Hefe-DNA trug.^[23,24] Mit dem intakten ringförmigen DNA-Plasmid entstanden zahlreiche Hefetransformanten, da für die Weitergabe des Plasmids keine Integration ins Chromosom erforderlich war. Wenn wir mit einem Restriktionsenzym in einer DNA-Region, die in keinem Hefechromosom gefunden worden war, einen Schnitt setzten, erhielten wir viel weniger Transformanten. Als wir diese wenigen Transformanten analysierten, fanden wir, dass sich die Schnittstellen, vermutlich unter Einwirkung einer DNA-Ligase, wieder verbunden hatten.^[22] In vielen Fällen war ein Teil der DNA verlorengegangen, weil die Enden

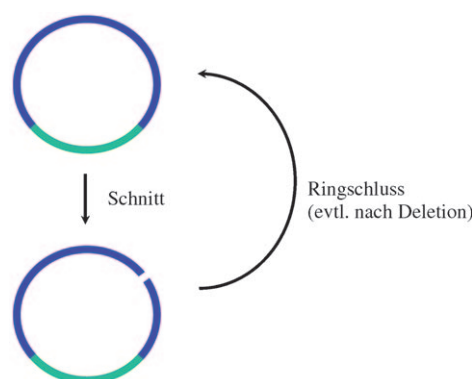


Abbildung 3. Nichthomologe Verbindung von Strangenden in Hefe. Ein ringförmiges Plasmid wurde mit einem Restriktionsenzym in einer DNA-Region geschnitten, die mit keiner Region der chromosomalen Hefe-DNA homolog ist. Es kann in Hefe nur überleben und sich replizieren, wenn die geschnittenen Enden durch eine Ligase wieder verbunden werden. Stücke der dem Schnitt benachbarten DNA können vor der Ligation der Enden abgebaut werden.

durch Exonucleasen angedaut worden waren, bevor durch die Ligase wieder ein Ringschluss erfolgte. Wie in McClintocks Experimenten unterschieden sich auch diese DNA-Reaktionen grundsätzlich von allem, was man an den Enden natürlicher Chromosomen beobachten konnte.

Terry, Rod und ich verbrachten die meiste Zeit damit, zu untersuchen was geschieht, wenn wir die Plasmid-DNA in Regionen schnitten, die homolog zu einem Abschnitt des Hefe-Chromosoms waren (Abbildung 4). Wenn man Hefe mit einem kreisförmigen DNA-Molekül mit einer solchen homologen Region transformierte, kam es gelegentlich zu einer Rekombination und somit zum Einbau des Plasmids in das Hefe-Chromosom. Diesen Weg hatten Fink und Mitarbeiter in ihren Transformationsstudien zuvor entdeckt. Wir fanden heraus, dass ein Schnitt in der homologen DNA-Region zu einem deutlich verstärkten Auftreten solcher Rekombinationsereignisse führt.^[21] Wir betrachteten daraufhin die Reaktionen an DNA-Bruchstellen (Abbildung 5). In der Zelle können die Enden eines DNA-Moleküls nach einem Schnitt durch ein Restriktionsenzym durch Nucleasen abgebaut werden, und Exonucleasen können überhängende Ein-

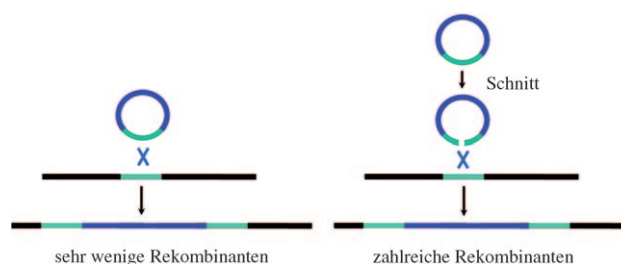


Abbildung 4. Doppelstrangbrüche in der DNA regen Rekombinationen an. Mit intakter ringförmiger DNA ohne Replikationsursprung erhält man nur wenige Transformanten, weil Rekombinationsereignisse, die zu einer Integration ins Chromosom führen, selten sind. Wird das gleiche Plasmid innerhalb einer Region, die mit dem Hefechromosom homolog ist, geschnitten, erhält man viel mehr Transformanten mit integriertem Plasmid.

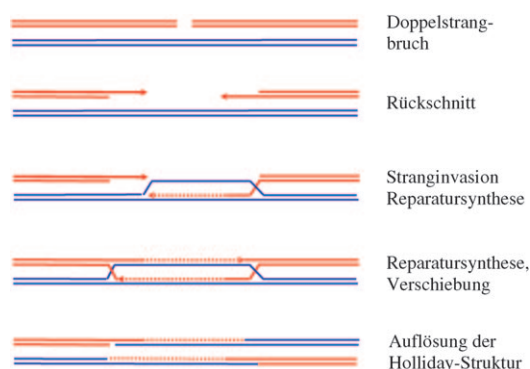


Abbildung 5. Das Rekombinationsmodell der Reparatur von Doppelstrangbrüchen. Zwei homologe Chromosomen (rot und blau) rekombinieren, wenn eines gebrochen ist. Der anfängliche Bruch wird von Nucleasen angegriffen, wodurch einsträngige DNA exponiert wird, die in die homologe Duplex eindringt. Durch Reparatursynthese und Wanderung der Verzweigung entstehen Holliday-Strukturen, deren Auflösung rekombinante DNA-Produkte ergibt.

zelstränge erzeugen, die homologe Sequenzen verdrängen können. Diese Stranginvasion ermöglicht die Reparatursynthese durch DNA-Polymerasen, sodass Holliday-Strukturen entstehen, in denen die Überschneidungsstellen wandern können. Nach der Reparatursynthese können die Holliday-Strukturen durch bestimmte Enzyme, die Resolvasen, aufgelöst werden, sodass gekreuzte oder nichtgekreuzte Konfigurationen erhalten werden können. Nach dieser Arbeit postulierten wir, zusammen mit Frank Stahl, dass es in Zellen bei Eintritt in die Meiose zu einem programmierten Bruch der Chromosomen-DNA kommt, um die meiotische Rekombination durch einen Doppelstrangbruch mit anschließender Reparatur auszulösen.^[25] An DNA-Bruchstellen laufen also eine Menge Prozesse ab, aber alle diese Prozesse sind an gewöhnlichen Chromosomenenden normalerweise nicht zu beobachten. Ich erwähne dies, weil ich solche Reaktionen im Hinterkopf hatte, als ich begann, mich mit Telomeren zu befassen.

Auf der Gordon-Konferenz über Nucleinsäuren im Sommer 1980 hörte ich zum ersten Mal von Elizabeth Blackburns erstaunlichen Arbeiten über die stabilen DNA-Enden von *Tetrahymena thermophila*.^[26] Dieser Einzeller unterscheidet sich stark von Metazoen, denn er hat einen Mikronucleus mit normalen Chromosomen und einen Makronucleus, in dem die chromosomale DNA in Tausende kleiner Fragmente geteilt ist, von denen viele hoch amplifiziert sind. Liz erklärte, sie habe an den Enden dieser sehr häufigen kurzen DNA-Moleküle im großen Makronucleus von *Tetrahymena* ganz einfache GGGGTT-Wiederholungssequenzen gefunden (Abbildung 6). Es war unglaublich, dass diese kleinen Stücke stabile DNA-Enden darstellten und dass sie vollständig repliziert wurden. Sie verhielten sich offenbar wie ganz normale chromosomale Telomere und ganz anders als die DNA-Enden in Hefezellen, die wir in meinem Labor untersuchten. Ich sprach Liz nach ihrem Vortrag darauf an, und wir erkannten, dass wir durch ein sehr einfaches Experiment herauszufinden konnten, ob die telomerähnlichen Enden aus *Tetrahymena* als stabile Telomere in Hefe wirken.

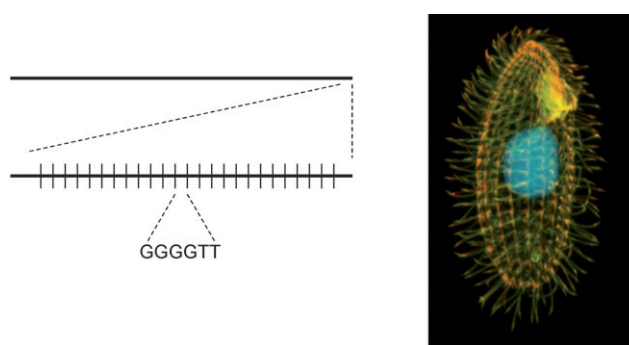


Abbildung 6. Telomere von *Tetrahymena*. Links: DNA von den Fragmenten des Makronucleus enden in einer Reihe von Wiederholungen des Hexanucleotids GGGGTT. Solche DNA-Enden sind stabil und werden vollständig repliziert. Rechts: Bild von *Tetrahymena* mit dem großen Makronucleus (blau).

Keiner von uns rechnete damit, dass das Experiment gelingen würde, weil *Tetrahymena* und Hefe nur sehr weitläufig miteinander verwandt sind. Da wir aber über alles Notwendige verfügten und das Experiment technisch ziemlich einfach war, beschlossen wir, es auszuprobieren. Liz schickte mir eine DNA-Probe, die sie in mühevoller Arbeit gereinigt hatte, und ich führte dieses kleine Restriktionsfragment vom Ende der ribosomalen DNA von *Tetrahymena* in Hefezellen ein.

Bevor ich das Hefeexperiment beschreibe (Abbildung 7), möchte ich noch einen bemerkenswerten Aspekt zu diesem Stückchen DNA aus *Tetrahymena* erwähnen: Nur wenige

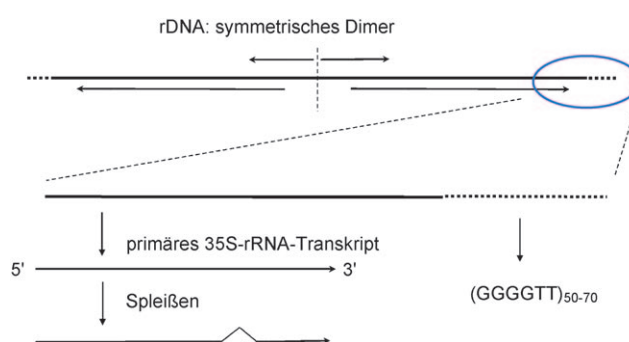


Abbildung 7. Ein ganz besonderes Stück DNA: Das ribosomale *Tetrahymena*-DNA-Fragment aus dem Makronucleus ist ein symmetrisches Dimer. Die Enden sind Telomere und bestehen aus GGGGTT-Wiederholungen. Nahe bei den Enden liegt eine Region der rRNA-Gene, die für ein selbstspleißendes Intron kodiert.

Kilobasen von der Telomersequenz entfernt liegt das primäre ribosomale RNA-Transkript von *Tetrahymena*. Dieses Transkript enthält ein kleines, gut 400 Basen langes Intron – das erste selbstspleißende Intron, das je entdeckt wurde.^[27] Für diese Arbeit wurde Tom Cech 1989 mit dem Chemie-Nobelpreis geehrt. Wahrhaftig ein sehr hübsches DNA-Stück!

Zurück zu unserem experimentellen Test der Funktion des *Tetrahymena*-Telomers in Hefe. Wir wollten damit die Hypothese überprüfen, dass die biochemische Maschinerie, auf der die Telomerfunktion beruht, hoch konserviert ist. Wenn sich dies bestätigte, wären die Mechanismen, die wir in

Tetrahymena aufklärten, vielleicht breit auf eukaryotische Organismen übertragbar, was den ganzen Prozess viel bedeutender machen würde. Dies war die Motivation für das Experiment, bei dem Liz Blackburn und ich zusammenarbeiteten. In meinem Labor standen uns ringförmige DNA-Plasmide mit Hefegenen zur Verfügung,^[28,29] sodass wir Hefetransformanten – also Zellen, die die DNA aufgenommen hatten – selektieren konnten. Die Plasmide enthielten auch einen Replikationsursprung (damals autonome Replikationssequenzen oder ARS-Elemente genannt^[23,24]), sodass sie unabhängig von einer Integration ins Chromosom repliziert werden konnten. Wenn diese intakte ringförmige Plasmid-DNA eingesetzt wird, um Hefezellen zu transformieren, findet man viele Transformanten, und fast alle enthalten replizierende ringförmige DNA-Moleküle. Wird aber die Plasmid-DNA mit einem Restriktionsenzym in einer Region geschnitten, die zu Hefe-DNA nicht homolog ist, und damit quasi-lineare DNA mit Bruchstellen erzeugt wird, fungieren diese nicht als stabile Telomerenden; daher erhält man nur wenige Transformanten. Das entscheidende Experiment war, die kleinen Stücke *Tetrahymena*-Telomer-DNA mit G₄T₂-Wiederholungseinheiten an jedes Ende von aufgeschnittener, linearer Plasmid-DNA zu ligieren (Abbildung 8). Ich reinigte

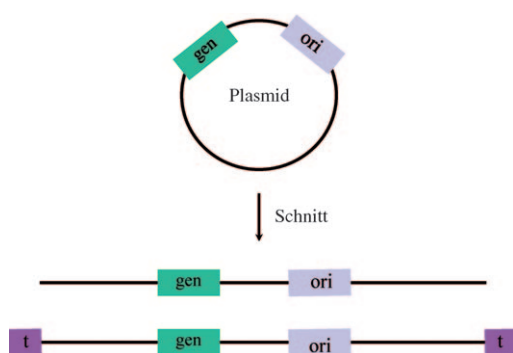


Abbildung 8. Die Übertragung von *Tetrahymena*-Telomeren in Hefe. Ein Hefepiasmid als Vektor mit Selektionsmarker (gen) und einem Replikationsursprung (ori) wurde durch Schnitt mit einem Restriktionsenzym linearisiert. An beide Enden wurden *Tetrahymena*-Telomere ligiert, und die ligierte DNA wurde gereinigt und in Hefe transformiert. So entstanden Transformanten mit replizierenden linearen Plasmiden.

die ligierte DNA sorgfältig, transformierte sie in Hefe und erhielt Transformanten. Jetzt konnte ich der Frage nachgehen, ob die Plasmid-DNA als lineares Molekül replizierte, was das Funktionieren der Telomere bestätigen würde, oder ob ich nur normale replizierende ringförmige Plasmide erhalten hatte. Ich unterschied zwischen linearer und zirkulärer DNA, indem ich DNA-Isolate aus etwa einem Dutzend Transformanten gelelektrophoretisch analysierte. Wenn DNA-Moleküle gelelektrophoretisch getrennt werden, erzeugen Ringe eine ganze Schar von Banden für Monomere und Multimere, entspannte und überspiralisierte Formen; insgesamt erhält man ein kompliziertes Muster. Lineare DNA-Moleküle nehmen keine dieser verschiedenen Formen ein, sondern sie wandern einheitlich und erzeugen eine einzelne Bande. Die beiden möglichen Ergebnisse der DNA-

Analyse unterschieden sich daher deutlich voneinander. Als ich die DNA aus den Transformanten, die ich isoliert hatte, analysierte, fand ich bei etwa der Hälfte Plasmid-DNA, die als Einzelbande im Gel wanderte. Dies war wohl das eindeutigste Experiment, das ich je durchgeführt habe, und offensichtlich war es gelungen: Die *Tetrahymena*-DNA-Enden erfüllten in Hefe die Funktion der Telomere.^[30] Wir wussten daher sofort, dass die zugrundeliegende biochemische Maschinerie weit konserviert sein muss, weil diese beiden Organismen nur so entfernt miteinander verwandt sind. Folglich konnten wir nun alle Methoden von Hefegenetik und Molekularbiologie einsetzen, um die Telomere in Hefe zu untersuchen.

In einem der ersten Experimente wollte ich das neue lineare Plasmid mit den beiden *Tetrahymena*-Enden als Vektor verwenden, um natürliche Telomere von den Enden von Hefechromosomen zu klonieren. Das Konzept dieses Experiments war denkbar einfach (Abbildung 9): Ich ging von

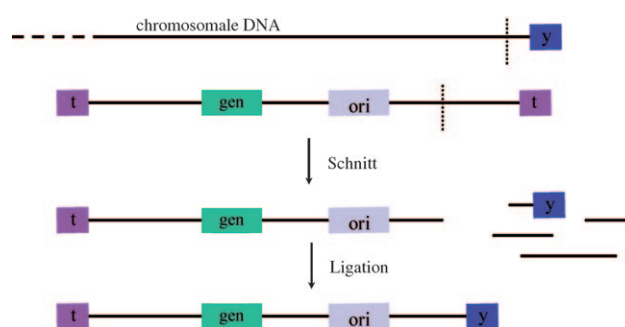


Abbildung 9. Klonierung der Hefe-Telomere. Chromosomale Hefe-DNA wurde mit einem Restriktionsenzym geschnitten, ebenso das lineare Plasmid mit den beiden *Tetrahymena*-Telomeren. Das gereinigte Vektorfragment wurde mit den Hefe-DNA-Fragmenten ligiert, und die Mischung wurde anschließend in Hefe transformiert. Einige lineare Plasmide wurden gewonnen, in denen ein Ende des linearen Vektors durch ein Hefe-Telomer ersetzt war.

chromosomaler Hefe-DNA aus, die ich mit Restriktionsenzymen in viele Stücke zerlegte. Die meisten stammten aus dem Inneren der Chromosomen, doch die wenigen Fragmente vom Ende eines Chromosoms sollten ein Ende als Ergebnis des enzymatischen Schnitts und ein Ende mit einem Telomer tragen. Dann nahm ich unsere Vektor-DNA, also das lineare Plasmid mit den beiden *Tetrahymena*-Enden, schnitt ein Ende ab und reinigte die so erhaltene DNA sorgfältig. Dieses DNA-Molekül mit einem funktionalen Telomerende und einer nichtfunktionalen Bruchstelle als Ende konnte sich in Hefezellen nicht dauerhaft etablieren. Zur Klonierung der Hefe-Telomere wurden dann einfach die Hefe-DNA-Fragmente unter Einwirkung einer DNA-Ligase mit gereinigter Vektor-DNA verbunden, wobei einige wenige Moleküle mit einem *Tetrahymena*-Telomer an einem und einem normalen Hefe-Telomer am anderen Ende entstanden. Diese seltenen Moleküle sollten in der Lage sein, sich als lineare Moleküle in Hefezellen zu replizieren. Ich gewann einige Transformanten mit der erwarteten linearen Struktur,^[30] und ich konnte mit einer Reihe von Tests bestätigen, dass ein Ende tatsächlich ein Telomerfragment aus Hefe-DNA war. Dies ermöglichte

uns, die DNA-Sequenzen von normalen Hefe-Telomeren zu charakterisieren. Wir hatten nicht erwartet, dass die Wiederholungssequenzen die gleichen seien, denn die *Tetrahymena*-Sequenzen zeigten keine Kreuzhybridisierung mit Hefe-DNA. Weitere Hybridisierungsversuche in Zusammenarbeit mit Tom Petes^[31] ergaben, dass Hefe-Telomere längere Sequenzen aus GT-Wiederholungen enthalten. Als Janis Shampay, eine Doktorandin aus Liz' Gruppe allerdings die Hefe-Telomere sequenzierte, die ich kloniert hatte, fand sie überraschenderweise eine unregelmäßige Sequenz aus G₁₋₃T-Wiederholungen.^[32] Dies wurde in den Labors von Tye und Petes unabhängig voneinander bestätigt, indem die Telomerenden durch Hybridisierung mit (GT)_n-Sonden kloniert wurden.^[33] Während Hefe in das allgemeine Bild von einem GT-reichen 3'-terminalen Stang passte, schien sich das Fehlen einfacher Wiederholungen nicht in die vorherrschenden Modelle der Telomer-Replikation auf der Basis von Rekombinationsereignissen einzufügen.^[34] Die Lösung dieses Rätsels sollte uns schließlich zur Telomerase führen.

An dieser Stelle möchte ich in einem kleinen Diskurs beschreiben, wie wir diese neuen Telomer-DNA-Fragmente als Werkzeuge einsetzten, um die Voraussetzungen für eine korrekte Chromosomenfunktion in Hefe zu untersuchen. Dies war die Arbeit von Andrew Murray, meinem zweiten Diplomanden. Mit einem gentechnischen Ansatz wollten wir sehen, ob wir die Elemente der Chromosomenstruktur wirklich verstehen. Nach der Entdeckung der Telomere glaubten wir, alle Teile verfügbar zu haben, um ein vollständiges funktionierendes Chromosom zusammenzusetzen: Wir hatten Centromer-DNA, die erstmals bei John Carbon kloniert worden war,^[35] wir hatten verschiedene Gene wie LEU2 und HIS3,^[28,29] und wir hatten Replikationsursprünge, die zuerst von Kevin Struhl und Dan Stinchcomb bei Ron Davis kloniert worden waren.^[23,24] Das waren alle Elemente, von denen damals bekannt war, dass sie für die Chromosomenfunktion wichtig waren. Wir wollten sie nun zusammenfügen und sehen, ob wir etwas aufbauen könnten, das sich wie ein natürliches Chromosom verhält. Dazu konstruierten wir ein ringförmiges Plasmid, das alle bekannten Chromosomenelemente enthielt (Abbildung 10), schnitten es, sodass es zwei Telomerenden hatte, und transformierten es in Hefe. Doch obwohl dieses DNA-Molekül einen Replikationsursprung, ein Centromer, Gene und Telomere enthielt, verhielt es sich nach der Transformation in Hefe nicht wie ein richtiges Chromosom. Während der Mitose kam es zu zahlreichen Fehlern bei der Trennung, sodass unser Konstrukt nicht über viele Zellzyklen hinweg erhalten blieb, sondern häufig verloren ging.^[36] Offensichtlich lief hier etwas ab, das wir nicht verstanden. Was könnte fehlen? Welche Probleme könnten die korrekte Vererbung dieses Minichromosoms verhindern? Wir testeten viele mögliche Erklärungen, bis schließlich Andrew herausfand, dass nichts weiter fehlte als mehr DNA.^[36,37] Indem er genug DNA des Phagen Lambda (also keine Hefe-DNA) in unser kleines künstliches Chromosom einfügte, erzeugte er viel größere DNA-Moleküle, die nun stabil vererbt wurden und sich viel eher wie natürliche Hefechromosomen verhielten (Abbildung 11). Wir stellten mehrere Modelle dafür auf, und ausgehend von der Beobachtung, dass das lineare centromerhaltige Plasmid in der

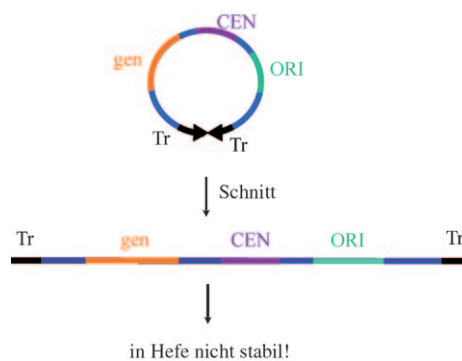


Abbildung 10. Unser erster Versuch, ein künstliches Chromosom herzustellen. Wir konstruierten ein ringförmiges Plasmid aus Hefegenen, einem Replikationsursprung, einem Centromer und Telomer-DNA. Dieses Konstrukt wurde durch einen Schnitt zwischen den Telomersequenzen linearisiert und dann in Hefe transformiert, wo die DNA als lineares Plasmid erhalten wurde. Entgegen den Erwartungen verhielt sich das DNA-Molekül nicht wie ein normales Chromosom – bedingt durch eine große Zahl an Trennungsfehlern war es bei der Mitose instabil.

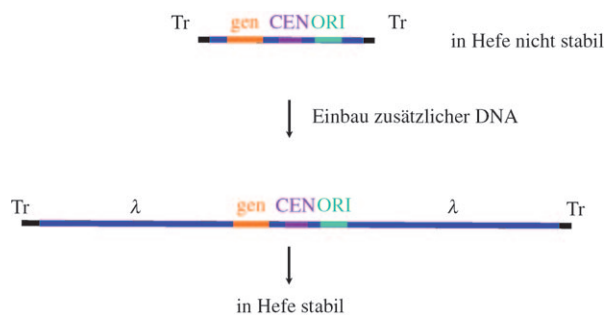


Abbildung 11. Erfolgreiche Konstruktion eines künstlichen Hefechromosoms. Der Einbau von 50 bis 150 kb einer DNA, die nicht aus Hefe, sondern vom Phagen Lambda stammte, verbesserte die Stabilität des DNA-Moleküls bei der Zellteilung erheblich und verlieh ihm chromosomenähnliches Verhalten.

Mitose viel weniger stabil war als ein ähnliches ringförmiges Plasmid mit einem Centromer, schlugen wir vor, dass die Verflechtung der DNA nach Vervollständigung der Replikation^[38] eine Rolle dabei spielte, die Schwesterchromatide zusammenzuhalten. Dies war lange bevor man etwas von Cohäsin und Separase^[39] und der komplexen Biochemie der Adhärenz und Trennung der Schwesterchromatide nach der Replikation wusste. Unsere künstlichen Chromosomen waren auch technisch hilfreich, wenigstens für eine kurze Zeit, denn in der Anfangszeit der Genomsequenzierung waren sie sehr praktische Vektoren, um extrem große DNA-Stücke von 1–2 Megabasen Länge zu klonieren.^[40]

Doch zurück zu den Telomeren und wie sie vollständig repliziert werden. All unsere frühen Modelle gingen von einem Rekombinationsmechanismus aus und beruhten auf den verschiedenen Reaktionen, die an DNA-Enden nach damaliger Kenntnis ablaufen konnten. Nachdem Liz Blackburn die kurzen Wiederholungssequenzen der *Tetrahymena*-Telomere entdeckt hatte, erschien ein sehr einfaches Modell naheliegend: Die Rekombination zwischen verschiedenen

Enden, vielleicht auf irgendeine Art gelenkt, könnte Enden erzeugen, die länger wären als jedes der ursprünglichen DNA-Enden (Abbildung 12).^[41] Alternativ könnte die

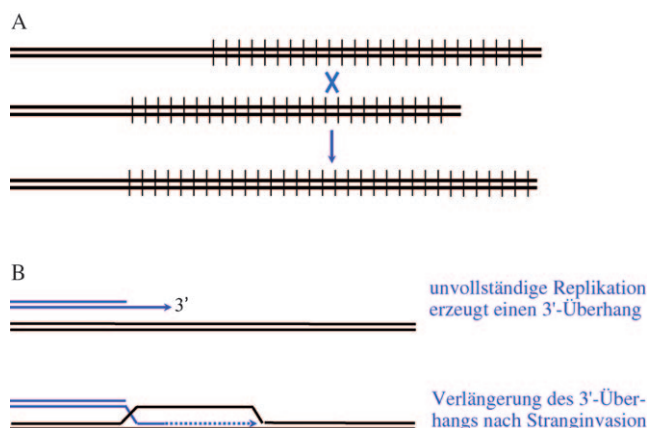


Abbildung 12. A) Telomerverlängerung durch Rekombination. B) Telomerverlängerung durch Reparatursynthese.

Stranginvasion durch das 3'-Ende des einen Telomers in die Wiederholungssequenzen eines anderen Telomers eine Reparatursynthese einleiten, die die Verlängerung dieses Endes nach sich ziehen würde (Abbildung 12). Ein anderes Modell, das wir diskutierten, ging von der Auflösung der Holliday-Struktur aus. Dieses Modell beruhte auf der Vorstellung, dass das äußerste Ende der Telomer-DNA eine Haarnadelschleife sei, dass der Strang sich am Ende also umbiegt. Diese Erklärung war verlockend, weil es dann kein wirkliches DNA-Ende gäbe, sondern eine Haarnadelschleife als relativ inertes DNA-Ende wirken würde. Durch Replikation würde eine Palindromstruktur entstehen, die in eine zentrale Holliday-Struktur isomerisieren könnte. Bei deren Auflösung durch das entsprechende Rekombinationsenzym würden sich zwei neue Telomere in Form von Haarnadelschleifen bilden (Abbildung 13). Eine kompliziertere Variante dieses Modells wurde in Piet Borsts Gruppe ausgearbeitet:^[42] An Einzelstrangbrüchen innerhalb der Wiederholungssequenzen sollte die Basenpaarung aufgelöst werden, und durch anschließende Synthese über diese Lücke hinweg sollten neue Wiederholungseinheiten entstehen. Das war die Art von Modellen auf Basis der Rekombination, die wir in den ersten Jahren als Mechanismen für die Telomer-Replikation diskutierten. Wie aber kamen wir letztlich davon los und zur richtigen Erklärung? Dieser Schritt gelang uns, als wir die Sequenzen der *Tetrahymena*-Telomere nach ihrer Replikation in Hefe analysierten.

Um zu verstehen, warum die Replikation der *Tetrahymena*-Telomere in Hefe so wichtig war, betrachten wir nochmals das lineare Plasmid mit den *Tetrahymena*-Enden. Diese Telomeren begannen als Restriktionsfragmente einer bestimmten Größe, aber wir beobachteten, dass sie nach ihrer Überführung in Hefe verlängert worden waren – und zwar um einige hundert Basenpaare. Außerdem unterschieden sie sich in ihrer Größe. Wir wussten nicht, woher diese zusätzliche DNA stammte, aber es gab mehrere mögliche

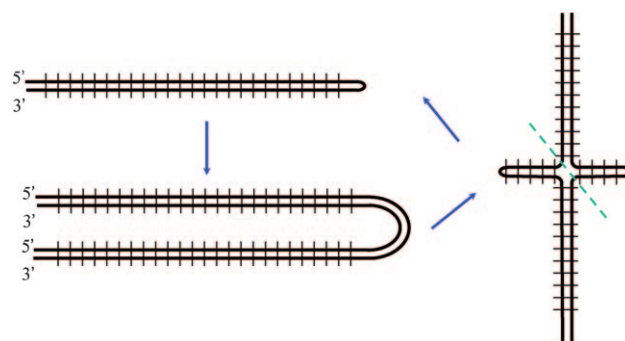


Abbildung 13. Replikation der Telomere durch Auflösen von Holliday-Strukturen. Frühe Modelle der Telomer-DNA gingen von einer terminalen Haarnadelschleife aus. Die Replikation würde ein Palindrom erzeugen, das zu einer Holliday-Struktur isomerisieren kann, die sich unter Rückbildung der Ausgangsstruktur auflösen ließe.

Erklärungen. Sie konnte beispielsweise das Ergebnis einer Rekombination zwischen den *Tetrahymena*-Enden aus verschiedenen Molekülen sein oder die Folge einer Stranginvasion und Reparatursynthese. Schließlich klonierten wir einige dieser verlängerten *Tetrahymena*-Enden und schickten die DNA-Proben zu Liz, die sie in ihrem Labor von Janice Shampay sequenzieren ließ. Zu unserer Überraschung stellten wir fest, dass die Sequenz aus den G₄T₂-Wiederholungseinheiten aus *Tetrahymena* bestand, an die direkt die unregelmäßigen G₁₋₃T-Wiederholungen angrenzten, die für die Hefetelomere charakteristisch waren (Abbildung 14).^[32] Der

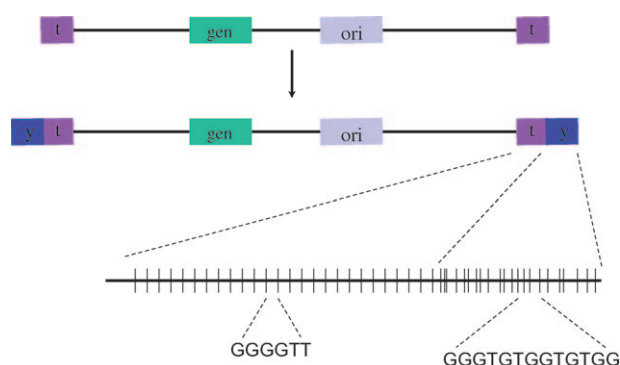


Abbildung 14. Hefe fügt neue DNA zu den *Tetrahymena*-Telomeren hinzu. Klonierung und Sequenzanalyse der *Tetrahymena*-Telomere nach Replikation in Hefe (als Telomere eines linearen Plasmids) machten die zusätzlichen Hefe-Telomersequenzen sichtbar.

Grund für die DNA-Verlängerung war also, dass hefespezifische Sequenzen – quasi aus dem Nichts kommend – an die *Tetrahymena*-Enden angehängt worden waren. Die so unterschiedlichen und unregelmäßigen Sequenzen konnten unmöglich durch einen Rekombinationsvorgang entstanden sein, sodass wir sofort wussten, dass all unsere früheren Modelle falsch waren. Die neuen Sequenzdaten führten zu der Vorstellung, dass es ein spezifisches Enzym geben müsse, das zusätzliche DNA an die Chromosomenenden anfügt. Kurz nach diesen Ergebnissen und unserer Vorhersage dieses neuen Enzyms machte sich Carol Greider daran, die En-

zymaktivität biochemisch nachzuweisen.^[44] Die Charakterisierung des gereinigten Enzyms, das später Telomerase genannt wurde, identifizierte dieses als ein Ribonucleoprotein-Enzym mit einer RNA-Matrize für die Telomer-Wiederholungssequenzen, die von einer Domäne des Enzyms mit Reverse-Transkriptase-Aktivität synthetisiert wurden.^[45] Inzwischen wissen wir, dass die unterschiedlichen Telomer-Wiederholungssequenzen, die in verschiedenen Organismen vorkommen, durch die RNA-Matrizen der spezifischen Telomerasen festgelegt werden. In umfangreichen Arbeiten von Elizabeth Blackburn, Carol Greider, Tom Cech und anderen wurden die Telomerasen von vielen Organismen, darunter *Tetrahymena*, Hefe und Mensch, charakterisiert.

Es ist interessant, das Problem der Replikation der Chromosomenenden im Licht der Telomeraseaktivität erneut zu betrachten. Wie erwähnt ging eines unserer frühen Modelle, das sich als falsch erwies, von einer Haarnadelstruktur am Ende der Chromosomen aus. Die korrekte Struktur, ein 3'-Überhang aus GT-reichen Wiederholungssequenzen (Abbildung 15), wurde erstmals an einem anderen Ciliaten, dem

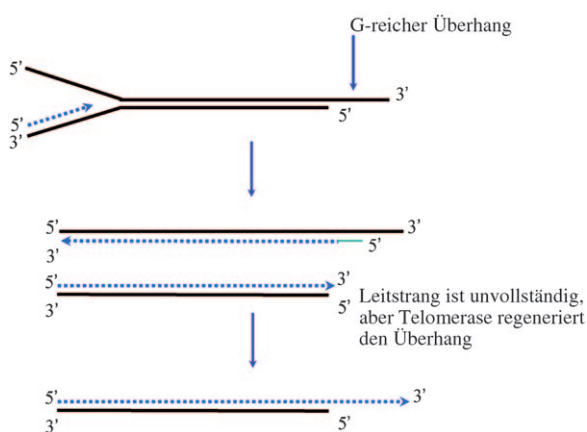


Abbildung 15. Ein neues Modell für die Verkürzung der Telomere und die Rolle der Telomerase bei der Bewahrung der Telomere. Wenn eine Replikationsgabel das Ende einer DNA-Duplex erreicht, kann der Leitstrang den 3'-Überhang nicht wiederherstellen. Dies übernimmt die Telomerase.

Protozoen *Oxytricha*, im Labor von David Prescott herausgefunden.^[43] Später stellte sich diese Struktur als allgemein konservierte Eigenschaft der Telomere heraus. Betrachten wir nun die Replikation des Strangendes mit einem 3'-Überhang, so sieht das Problem etwas anders aus, als es Watson^[18] und Olovnikov^[19] beschrieben haben. Eine Replikationsgabel, die auf ein solches Ende zuläuft, hat nicht nur das zuvor beschriebene Problem der unvollständigen Replikation des 3'-Stranges, sondern ein viel schlimmeres Problem, weil der Leitstrang zwar das Ende erreicht, nicht aber den 3'-Überhang aufbauen kann. Dieser würde daher in jedem Replikationszyklus verlorengehen, gäbe es keinen Ausgleichsmechanismus. Ein solcher Mechanismus wird nun durch die Telomerase sichergestellt, die zusätzliche Wiederholungssequenzen an die Telomerenenden anfügt und daher im Durchschnitt die erforderliche Länge und Struktur des Telomers sicherstellt. Die Regulierung der Telomerlänge und -struktur

hat sich als ausgefeilter Mechanismus erwiesen, und die Biochemie der entsprechenden Protein-DNA-Wechselwirkungen ist bemerkenswert.^[46]

Die Aktivität der Telomerase und des zugehörigen Apparats zur Regulierung der Telomerlänge hat wichtige biologische Konsequenzen. Zellen mit hoher Telomeraseaktivität können sich ohne Einschränkungen teilen, weil sie sich funktionale Telomere erhalten. Dagegen können Zellen mit unzureichender Telomeraseaktivität die Telomerlänge nicht aufrechterhalten und haben daher nur ein begrenztes Teilungspotenzial. Diese Vorhersage wurde erstmals von Vicki Lundblad bestätigt, die als Postdoc in mein Labor kam, um dieser Frage in Hefe genetisch nachzugehen.^[47] Dazu etablierte sie ein umfangreiches und ziemlich schwieriges Suchverfahren nach Mutanten, die die erforderliche Durchschnittslänge der Telomere nicht aufrechterhalten konnten. Sie fand die gesuchten Mutanten, in denen die Telomere über mehrere Teilungszyklen immer kürzer wurden (Abbildung 16A). Die erste Mutation mit dieser Eigenschaft wurde *est-1* („ever shorter telomeres“) genannt. Am Interessantes-

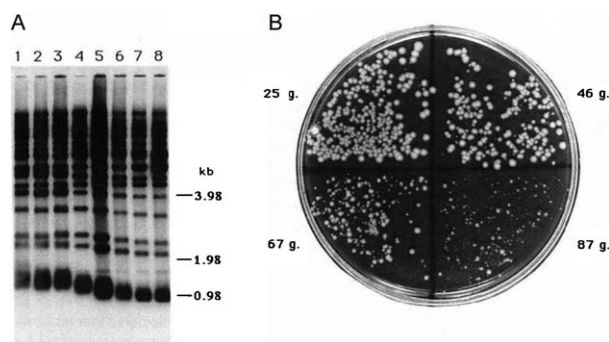


Abbildung 16. Seneszenz von *EST-1*-Hefezellen. A) Fragmente von Hefe-Telomer-DNA aus dem Mutantenstamm *EST-1* lassen sich durch einen Southern-Blot sichtbar machen. Die Spuren 1 bis 8 zeigen Proben aus Zellen nach einer zunehmenden Zahl von Zellteilungen. B) Der Mutantenstamm *EST-1*, auf einer Agarplatte ausgestrichen nach 25, 46, 67 und 87 Generationen.

ten an dieser Mutation (und ähnlichen später entdeckten Mutationen) ist, dass sie, wie erwartet, zu einem Phänotyp mit verzögerter Seneszenz führt (Abbildung 16B). Dieser Phänotyp wird in Kolonien des mutierten Hefestamms nach unterschiedlichen Generationszahlen sichtbar. Nach 25 Generationen sehen die Mutantenkolonien etwa so aus wie Wildtypkolonien. Nach 46 Generationen sind sie ein wenig unregelmäßiger, und es gibt einige kleine Kolonien, nach 60 bis 70 Generationen sind sie ganz klein und unregelmäßig, und nach 80 bis 90 Generationen wachsen die Mutanten fast nicht mehr. Es gibt viele tote Zellen in den kleinen Kolonien und viele Chromosomenverluste. Weil die Telomere kürzer und kürzer werden, bleibt die korrekte Telomerstruktur nicht bestehen. Als Folge binden die Enden aneinander, was zu Chromosomenbrüchen und -verlusten führt, sodass Zellen entstehen, denen große DNA-Stücke fehlen.

Dies war der erste experimentelle Nachweis, dass die Unfähigkeit, eine normale Telomerenlänge sicherzustellen, zu einem Seneszenz-Phänotyp führt und dass diese Eigen-

schaft eine wichtige Rolle bei der Zellalterung in höheren Organismen spielen kann. Ganz ähnliche Versuche mit *Tetrahymena* im Labor von Liz führten etwa zur gleichen Zeit zum gleichen Schluss.^[48] Wir hielten dies für eine mögliche Erklärung für die Seneszenz, die wir wiederholt an Primärzellen in Zellkulturen beobachtet hatten, und – ausgeweitet auf Probleme des Alterns – für ein allmähliches Nachlassen der Gewebeerneuerung infolge einer begrenzten Zellteilungsfähigkeit. Die Verkürzung der Telomere wurde für Fibroblasten wenig später von Carol Greider gezeigt,^[49] und die ursächliche Rolle dieser Verkürzung bei der Zellalterung wurde später bewiesen.^[50] Natürlich war dies ein wichtiger Fortschritt für unser Verständnis von Alterungsprozessen und altersbedingten Erkrankungen.^[51] Der umgekehrte Fall erwies sich als sehr wichtig für unser Verständnis von Krebs. In der überwiegenden Zahl der Krebszellen, die ein unbegrenztes Teilungspotenzial haben, ist das Telomerase-Gen hochreguliert, und die funktionalen Telomere werden unbegrenzt erhalten.^[51,52]

An diesem Punkt wurde mir klar, dass bald viele Leute die Rolle von Telomeren und Telomerase bei Krebs und Altern untersuchen würden. Ich glaubte, dass die wichtigsten Fragen klar gestellt waren und dass sie bearbeitet werden würden, gleich, ob ich auf dem Feld der Telomerbiologie aktiv bleiben würde oder nicht. Ich begann daher nach anderen interessanten Themen zu suchen, die experimentell bearbeitet werden konnten, aber noch nicht so ein breites Interesse gefunden hatten.

Schon als Vicki ihre genetischen Studien über die Telomererhaltung in Hefe durchführte, erwachte mein Interesse an Ribozymen, denn die Entdeckung der selbstspaltenden Introns durch Tom Cech war neu und aufregend.^[27] Ich erwartete dort viele interessante Fragen und wunderte mich, dass nicht mehr Leute sich damit befassten. Ich selbst war fasziniert von der Hypothese der RNA-Welt und von der Idee, dass RNA die eigene Replikation ohne Protein-Enzyme katalysieren könnte.^[53] Da die Experimente hauptsächlich molekularbiologischer Natur waren, dachte ich, wir könnten einige Beiträge zu diesem aufstrebenden Feld leisten. Mehrere Jahre lang untersuchten wir die Introns der Gruppe I und versuchten, sie mit verschiedenen molekularen Techniken zu zwingen, RNA-Replikationsreaktionen zu katalysieren. Mehrere meiner Studenten, darunter Jennifer Doudna^[54] und Rachel Green^[55] arbeiteten mit einigem Erfolg an diesem Problem. Doch schließlich kamen wir zu dem Schluss, dass die natürlichen Ribozyme nicht gut genug waren. Diese Ribozyme erfüllten Aufgaben, für die sie sich in modernen Organismen entwickelt hatten. Wir waren aber in erster Linie daran interessiert, was RNA viel früher getan haben könnte.

In den späten 1980ern begannen wir, neue RNA-Moleküle zu entwickeln, die bestimmte Reaktionen katalysieren. Die Idee war einfach: Man synthetisiere riesige Sammlungen von Zufallssequenzen und isoliere dann die wenigen Moleküle mit der gewünschten Aktivität. Die technischen Aspekte dieser In-vitro-Selektion oder gerichteten Evolution wurden von meinem Postdoc Andy Ellington^[56] und unabhängig von Craig Tuerk in Larry Golds Labor ausgearbeitet.^[57] Wir verbrachten den größten Teil der 90er Jahre damit, diese Selektionstechnik auf die RNA- und DNA-Evolution im Labor

anzuwenden, um Moleküle mit allerlei interessanten Funktionen zu finden. So isolierte Mandana Sassanfar in ihrer Postdoc-Zeit ein RNA-Molekül, das sich zu einer dreidimensionalen Konformation faltet, die eine Bindestelle für ATP enthält (Abbildung 17).^[58] Danach konnten wir und

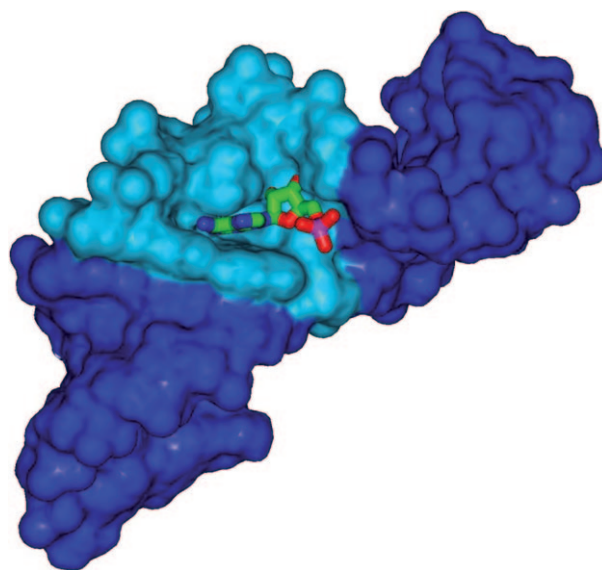


Abbildung 17. Ein ATP-bindendes RNA-Molekül. Diese RNA wurde ausgehend von einer zufälligen Sammlung von Sequenzen entwickelt. Dunkelblau: doppelhelicale Bereiche; hellblau: gefaltete Erkennungsschleife; Stabmodell: gebundenes AMP.

andere zeigen, dass man im Labor RNA- und DNA-Sequenzen entwickeln kann, die sich in definierte Formen falten und fast jedes interessierende Molekül binden können. Verschiedene Arbeitsgruppen und Unternehmen loten nun den möglichen therapeutischen Nutzen spezifisch bindender RNA-Moleküle aus. Vielleicht können diese, inzwischen Aptamere genannten, Moleküle einige der Funktionen übernehmen, für die heute Antikörper verwendet werden.

Nachdem wir Aptamere routinemäßig entwickeln konnten, begannen wir, RNA-Moleküle zu formen, die interessante Reaktionen katalysieren konnten. Als Doktorand in meiner Arbeitsgruppe isolierte Dave Bartel ein überraschend komplexes RNA-Molekül, das zwei benachbarte RNAs auf einer Matrize verknüpfen kann (Abbildung 18).^[59] Es katalysiert die Reaktion nach dem gleichen Mechanismus wie RNA- und DNA-Polymerasen: Die 3'-Hydroxygruppe des einen RNA-Substrats greift das α -Phosphat des Triphosphates des anderen RNA-Substrats an und knüpft eine neue Phosphodiesterbindung. Das Ribozym hat eine komplizierte gefaltete Sekundär-^[60] und Tertiärstruktur.^[61] Nach dem Nachweis, dass RNA die chemischen Prozesse der RNA-Replikation katalysieren kann, entwickelte Dave Bartel das Ribozym in seinem eigenen Labor im Whitehead Institute am MIT zu einer echten RNA-Polymerase weiter, die RNA-Matrizen mit Nucleosidtriphosphaten als Substraten kopieren kann.^[62] Damit wurde glänzend gezeigt, dass die Hypothese einer RNA-Welt plausibel ist. Die aktuellen Versionen dieser RNA-Polymerase sind noch nicht gut genug, um sich selbst zu

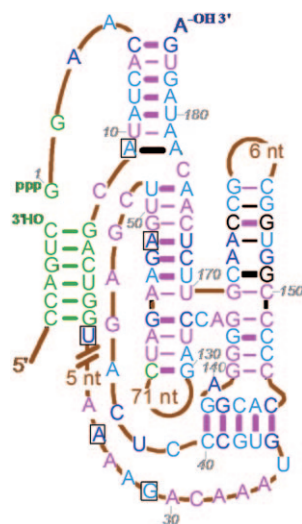


Abbildung 18. Sekundärstruktur von Klasse-I-Ribozymligasen. Das Ribozym katalysiert die matrizengerichtete RNA-RNA-Ligation. Es wurde ausgehend von einer zufälligen Sammlung von RNA-Sequenzen gewonnen.

kopieren und ganze Replikationszyklen zu vollenden, sodass es reichlich Raum für weitere evolutionäre Optimierungen gibt.

In neuerer Zeit haben wir die In-vitro-RNA-Selektion auf die Analyse von Humangenom-Sequenzen angewendet. Diese Arbeiten stammen aus der Postdoc-Zeit vom Kourosh Salehi-Ashtiani und Andrej Luptak (Abbildung 19).^[63] Kourosh begann mit der Erzeugung einer großen Bibliothek aus Stücken menschlicher DNA. Er transkribierte sie in RNA und suchte nach Molekülen, die sich selbst ortsspezifisch schneiden konnten, wobei er vier verschiedene selbstspaltende RNAs oder Ribozyme isolierte. Eine dieser RNAs findet sich im CPEB3-Gen wieder, das mit dem Gedächtnis in Verbindung gebracht wird^[64] und möglicherweise die lokalisierte Proteintranslation an den Synapsen kontrolliert. Es gibt zwei interessante Dinge an diesen selbstspaltenden Ribozymen aus Humangenom-DNA. Zum einen hat das Ribozym exakt dieselbe Struktur wie ein gut bekanntes virales Ribozym, das HDV-Ribozym des Hepatitis-delta-Virus. Die Tatsache, dass es eine Version dieses Ribozyms im Humangenom gibt, lässt vermuten, dass sich das virale Ribozym von dieser Kopie ableiten könnte. Zum anderen ist es möglicherweise sehr interessant, dass es in der Bevölkerung einen Polymorphismus an einer Stelle innerhalb des Ribozyms gibt, der die Aktivität beeinflusst. Eine aktuelle genetische Untersuchung einer schweizerischen Gruppe^[65] ergab eine Assoziation zwischen diesem Polymorphismus und dem Erfolg der Testpersonen bei einem Gedächtnistest, bei dem Wörter behalten werden sollten. Es gibt auf diesem Gebiet noch viel zu tun, doch die

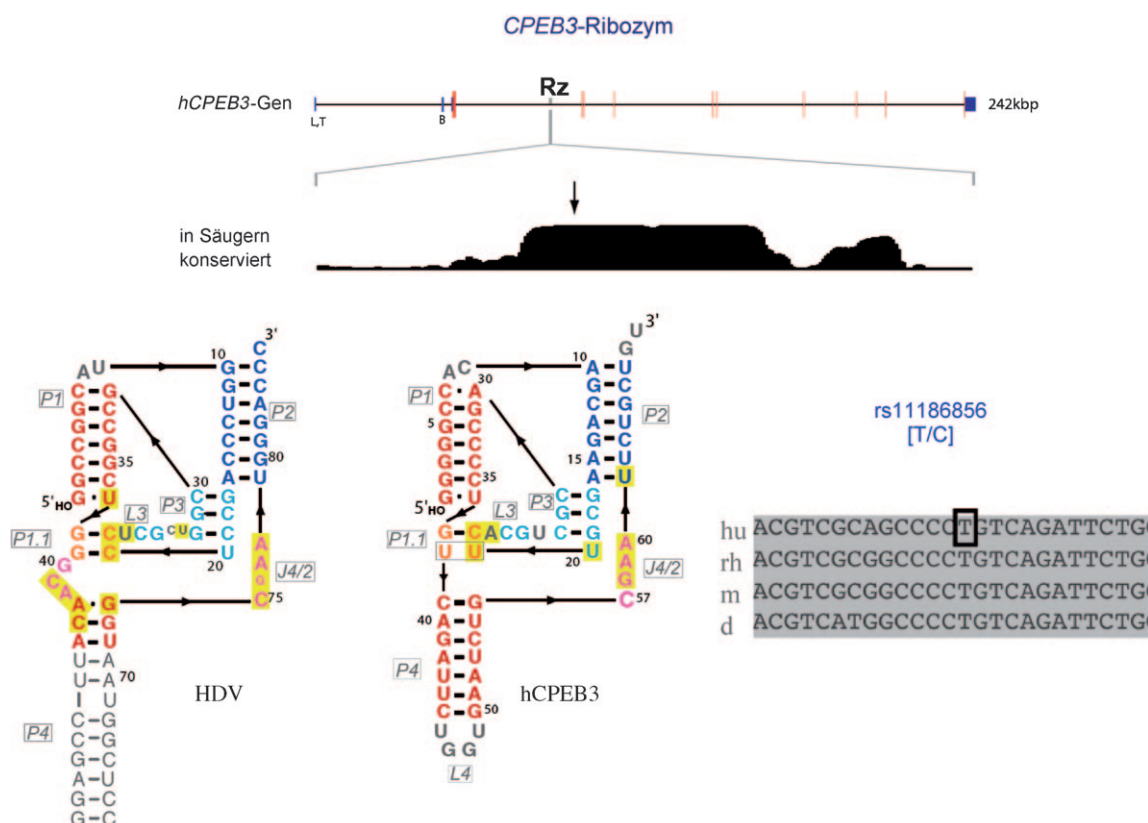


Abbildung 19. Ein HDV-Ribozym im menschlichen Genom. Oben: Das selbstspaltende Ribozym liegt im zweiten Intron des CREB3-Gens. Die Ribozymsequenz ist im Vergleich zu den flankierenden Intronsequenzen hoch konserviert. Unten links: Die Sekundärstrukturen des Ribozyms aus dem Humangenom und des HDV-Ribozyms sind weitgehend identisch. Unten rechts: Ein Polymorphismus in der Ribozymsequenz beeinträchtigt die Ribozymaktivität und könnte das menschliche Gedächtnis beeinflussen.

Aussicht, dass eine selbstspaltende katalytische RNA eine Rolle im menschlichen Gedächtnis spielen könnte, ist faszinierend.

In den 1990ern erweiterten wir unsere Versuche zur gerichteten Evolution von RNA und DNA um Methoden zur Evolution von Proteinen. Rich Roberts entwickelte ein geschicktes Verfahren, um das Ribosom dazu zu bringen, die wachsende Peptid- oder Proteinkette chemisch mit der eigenen mRNA zur verknüpfen,^[66] sodass die Selektion auf ein funktionales Protein gleichzeitig die entsprechende mRNA mit anreichern würde. Mit dem gleichen Ansatz isolierte Tony Keefe später ein kleines ATP-bindendes Protein aus einer Bibliothek von Protein-Zufallssequenzen.^[67] Diese kleine Proteindomäne war von den natürlichen biologischen Proteindomänen nicht zu unterscheiden. Derartige Evolutionsversuche im Labor zeigten, dass es relativ einfach ist, funktionale RNAs, DNAs und sogar Proteine ausgehend von Sammlungen von Zufallssequenzen zu entwickeln.

Mit den zuvor geschilderten Experimenten wurde überzeugend nachgewiesen, dass die Darwinsche Evolution, angewendet auf eine Population von Molekülen, ein leistungsfähiges Instrument zur Erzeugung funktionaler Sequenzen ist. Das führte uns zu tiefergehenden Fragen: Wie begann die Evolution? Wie verlief der Übergang von der Chemie zur Darwinschen Evolution in der Erdfrühzeit? Diese zentralen Fragen zum Ursprung des Lebens wurden zum Forschungsgebiet meiner Arbeitsgruppe. Dabei folgen wir notwendigerweise einem synthetischen oder technischen Ansatz. Wir haben eine einfache Modellvorstellung für frühe Zellen (Abbildung 20),^[68] die zwar nicht in allen Aspekten allgemein anerkannt ist, doch gibt sie unsere Auffassung davon wieder, wie eine sehr primitive Zelle ausgesehen haben könnte. Wir versuchen, solche Systeme zu konstruieren, um mögliche Wege von der Chemie zur Biologie zu definieren. Wir glauben, dass eine primitive Zelle zwei entscheidende Bestandteile haben muss. Einer davon ist die Zellmembran. In unseren Experimenten stellen wir diese Membranen aus einfachen Molekülen her, die auf der frühen Erde vorhanden gewesen sein sollten, z.B. aus Fettsäuren. Die Zellmembran muss spontan wachsen und sich teilen können, um Tochterzellen zu bilden. Der andere wichtige Bestandteil einer pri-

mitiven Zelle ist ein Polymer, das die Vererbung der genetischen Information vermittelt. Hier ist die Frage, ob dies von Anfang an RNA war, oder ob ein einfacheres Vorläufermaterial erst später durch RNA ersetzt wurde. In jedem Fall muss dieses Material sich spontan replizieren können, ohne auf eine hoch komplizierte Maschinerie angewiesen zu sein wie moderne Organismen. Die Schlüsselfrage ist daher: Wie konnten sich Zellmembranen und frühe genetische Materialien replizieren, bevor sich der komplizierte biologische Teilungsapparat entwickelte? Unser Ansatz war es, das Problem möglichst in einfachere Teile zu zerlegen und diese getrennt anzugehen. Ich möchte kurz einige der Experimente beschreiben, die wir in den letzten sechs oder sieben Jahren durchgeführt haben.

Vor etwa sechs Jahren befassten sich der Postdoc Marty Hanczyc und die Doktorandin Shelly Fujikawa mit der Frage, wie Protozellen-ähnliche Komplexe gebildet werden könnten. Sie fanden heraus, dass ein verbreitetes Tonmineral, das aus Vulkanasche in Seewasser entsteht, diesen Prozess überraschend gut unterstützt.^[69] Dieses Tonmineral ist auf dem Forschungsgebiet der präbiotischen Chemie gut bekannt, denn einige Jahre zuvor hatten Jim Ferris und Leslie Orgel nachgewiesen, dass es den Aufbau von RNA aus aktivierten Nucleotiden katalysiert.^[70] Marty und Shelly zeigten nun, dass das gleiche Mineral auch die Bildung von Membranen katalysiert. Außerdem kann es genetische Polymere wie RNA in die Vesikel einschließen, deren Zusammenlagerung es unterstützt (Abbildung 21). So kann ein gewöhnliches Mineral dabei helfen, genetisches Material aufzubauen, Membranen zu organisieren und die Komponenten zusammenzubringen,^[69] also alles Eigenschaften die mit Blick auf die Bildung früher zellulärer Strukturen von Bedeutung sein könnten.

Die Replikation der Protozellen-ähnlichen Strukturen ist viel schwieriger als ihr Zusammenbau. Wachstum und Teilung der Protozellmembran, die noch vor wenigen Jahren wie ein fast unlösbares Problem ausgesehen haben, haben sich inzwischen als relativ einfach herausgestellt. Unser gegenwärtiges Modell für einen frühen Zellzyklus mit Blick auf die Zellmembran beruht auf der Arbeit meines Doktoranden Ting Zhu.^[71] Wir stellen große multilamellare Vesikel her und füttern sie mit neuen Fettsäuren. Diese wachsen dann zu

langen, zerbrechlichen Fasern, die bei leichtem Schütteln, wie es durch Wellen in einem Gewässer passieren könnte, zu Tochterzellen auseinanderbrechen (Abbildung 22). So entwickelt sich ein robuster Kreislauf, der endlos fortgeführt werden kann. Insofern scheinen spontanes Wachstum und Teilung von Membrankomponenten relativ geradlinige Vorgänge zu sein.

Und wie ist der Stand bei der Replikation der genetischen Information? Im Augenblick gibt es hier noch

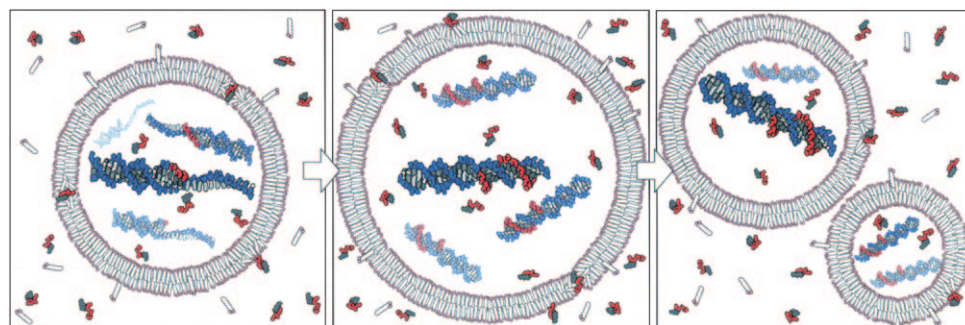


Abbildung 20. Schema einer Protozelle. Eine einfache Zelle könnte aus einem replizierenden Vesikel für die Kompartimentierung und einem replizierenden Genom, um Erbinformationen zu kodieren, aufgebaut sein. Eine komplexe Umgebung liefert Nucleotide, Lipide und verschiedene Arten von Energie: Mechanische Energie (für die Teilung), chemische Energie (für die Nucleotidaktivierung) sowie Energie aus Phasentransfer und osmotischen Gradienten (für das Wachstum) können von dem System genutzt werden.

Schwierigkeiten, weil wir nicht wissen, wie wir diesen Schritt umsetzen sollen. Die Hypothese der RNA-Welt beruht auf der Idee, dass RNA die eigene Replikation katalysiert,^[53] doch das hat sich als schwieriger herausgestellt, als wir zunächst dachten. Könnte die genetische Replikation als ein chemischer, nichtenzymatischer Prozess begonnen haben? Vor etwa zwanzig Jahren prophezeite Leslie Orgel, einer der „Päpste“ der präbiotischen Chemie, dass chemische Verfahren zur Replikation genetischer Polymere ziemlich einfach gefunden werden könnten, womit man bei der Aufklärung der Entstehung des Lebens vorankäme.^[72] Das hat sich nicht bewahrheitet, vielleicht, weil das Problem schwieriger ist als alle glaubten, vielleicht aber auch, weil sich nicht so viele Leute mit dieser Aufgabe auseinandergesetzt haben. Ich halte es für ein perfektes Arbeitsthema, denn es ist wichtig, interessant, und es gibt viele erfolgversprechende experimentelle Ansätze. Wir stellen synthetische Nucleotide her, die modifiziert sind, um sie reaktiver zu machen (Abbildung 23). Ersetzt man

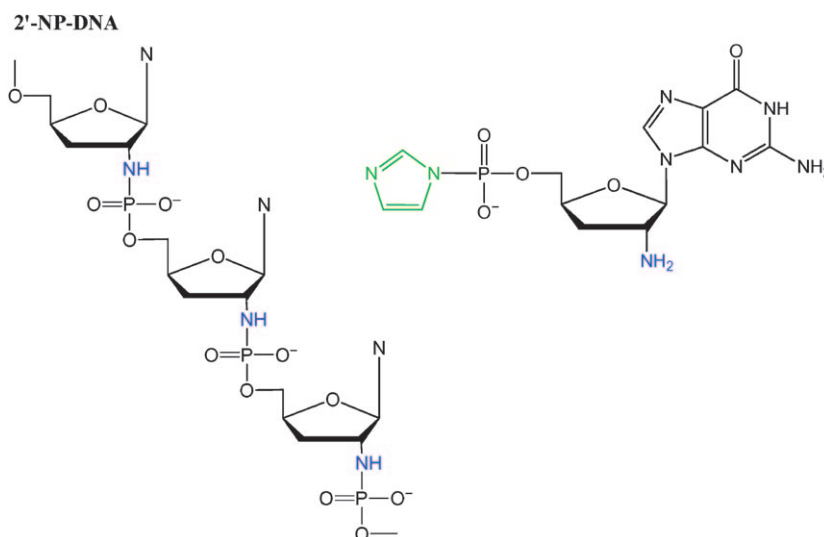


Abbildung 23. Typische Monomere für die spontane Synthese von Nucleinsäuren und das entsprechende Polymer. Links: 2'-5'-gebundene Phosphoramidat-DNA. Rechts: das aktivierte 2'-Amino-Monomer. Man beachte das 2'-Amino-Nucleophil (blau) und die Imidazol-Abgangsgruppe (grün) am 5'-Phosphat. Die Kombination eines guten Nucleophils mit einer guten Abgangsgruppe ermöglicht eine schnelle nichtenzymatische Polymerisation derartiger Monomere, wenn diese auf einer geeigneten Matrice aufgereiht sind.

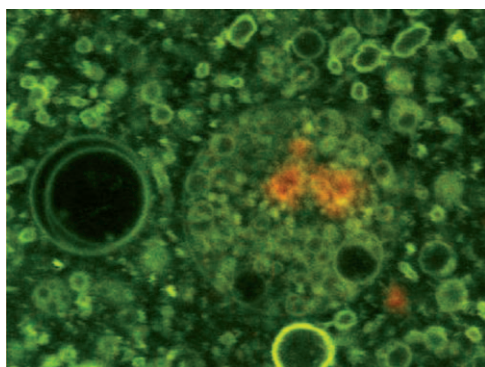


Abbildung 21. Montmorillonit kann RNA in Vesikel einschließen. Fluoreszenzmarkierte RNA (orange) an der Oberfläche eines Tonpartikels ist im Inneren eines großen Vesikels (grün) zusammen mit vielen kleinen Vesikeln eingefangen. Alles wurde durch die katalytische Aktivität des Tonpartikels zusammengefügt.

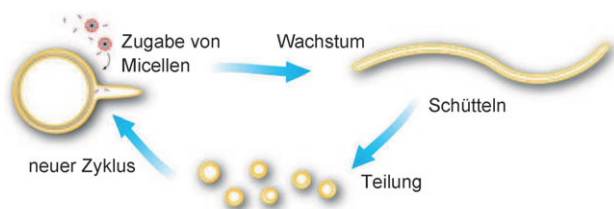


Abbildung 22. Wachstums- und Teilungszyklen einer Protozell-Modellmembran. Große multilamellare Vesikel wachsen zu langen hohlen Vesikeln, indem sie im Überschuss vorliegende Fettsäuren einbauen. Die langgestreckten Vesikel brechen unter milder Scherspannung. Die kleineren Tochtervesikel können wachsen und den Zyklus wiederholen.

zum Beispiel die nucleophile Hydroxygruppe durch eine Aminogruppe, so erhält man Nucleotide, die spontan und ohne Enzymbeteiligung einen Primer an einer Matrice entlang verlängern.^[73] Wir haben noch kein robustes und allgemeines Replikationssystem, doch das ist unser Ziel.

Mit einem interessanten Aspekt der chemischen Replikation beschäftigen wir uns erst seit kurzem, nämlich, wie die äußersten Enden unserer Sequenzen ohne Telomerase kopiert werden können. Dies verspricht sehr spannend zu werden. Die chemische Replikation geschieht durch spontane Verlängerung von Primern an einer Matrice; wenn das Ende der Matrice erreicht ist, verlangsamt sich die Reaktion, aber in vielen Fällen kommt sie nicht vollständig zum Erliegen. Abhängig von den Bedingungen sehen wir manchmal sogar eine chemische Verlängerung über das Ende der Matrice hinaus, sodass ein 3'-Überhang erzeugt wird (Abbildung 24).^[73] Die vollständige Replikation einer Matrice

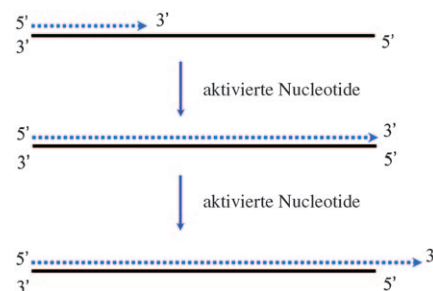


Abbildung 24. Liegt der Ursprung der Telomerase in einer spontanen chemischen Kopierreaktion? Unter bestimmten Bedingungen findet über das Ende der Matrice hinaus eine nichtenzymatische Primerverlängerung statt, die einen 3'-Überhang erzeugt. Die enzymatische Kontrolle und Ausarbeitung dieses chemischen Vorgangs sollte einen Entwicklungspfad hin zur Telomerase vorzeichnen.

scheint also kein Problem zu sein, und tatsächlich entstehen bei diesem Prozess neue Sequenzen. Diese spontane chemische Reaktion könnte etwas zu tun haben mit der Entstehung genetisch kodierter Katalysatoren, die diesen Vorgang kontrollieren und nutzen. Solche Katalysatoren könnten sich schlussendlich zu dem Telomerase-Enzym weiterentwickelt haben, das der Hauptgegenstand meines Vortrags war.

Ich möchte all den brillanten Studenten, Postdocs, Freunden und Mitarbeitern danken, die an den vorgestellten Arbeiten beteiligt waren.

Eingegangen am 1. Februar 2010

Online veröffentlicht am 3. September 2010

Übersetzt von Dr. Burkard Neuß, Jülich

- [1] „Sexual induction in *Eudorina*: effects of light, nutrients and conditioned medium“: J. W. Szostak, J. Sparkuhl, M. E. Goldstein, *J. Phycol.* **1973**, 9, 215–218.
- [2] „Specific binding of a synthetic oligonucleotide to yeast cytochrome c mRNA“: J. W. Szostak, J. I. Stiles, C. P. Bahl, R. Wu, *Nature* **1977**, 265, 61–63.
- [3] „Ray Wu, as remembered by a former student“: J. W. Szostak, *Sci. China C Life Sci.* **2009**, 52, 108–110.
- [4] „Transformation of yeast“: A. Hinnen, J. B. Hicks, G. R. Fink, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1978**, 75, 1929–1933.
- [5] „Unequal crossing over in the ribosomal DNA of *Saccharomyces cerevisiae*“: J. W. Szostak, R. Wu, *Nature* **1980**, 284, 426–430.
- [6] „Yeast transformation: a model system for the study of recombination“: T. L. Orr-Weaver, J. W. Szostak, R. J. Rothstein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, 78, 6354–6358.
- [7] „The double-strand-break repair model for recombination“: J. W. Szostak, T. L. Orr-Weaver, R. J. Rothstein, F. Stahl, *Cell* **1983**, 33, 25–35.
- [8] „A mutant with a defect in telomere elongation leads to senescence in yeast“: V. Lundblad, J. W. Szostak, *Cell* **1989**, 57, 633–643.
- [9] „In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands“: A. E. Ellington, J. W. Szostak, *Nature* **1990**, 346, 818–822.
- [10] „Isolation of new ribozymes from a large pool of random sequences“: D. P. Bartel, J. W. Szostak, *Science* **1993**, 261, 1411–1418.
- [11] „RNA-peptide fusions for the in vitro selection of peptides and proteins“: R. W. Roberts, J. W. Szostak, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, 94, 12297–12302.
- [12] „Functional proteins from a random sequence library“: A. D. Keefe, J. W. Szostak, *Nature* **2001**, 410, 715–718.
- [13] „Synthesizing life“: J. W. Szostak, D. P. Bartel, P. L. Luisi, *Nature* **2001**, 409, 387–390.
- [14] „Efficient and rapid template-directed nucleic acid copying using 2'-amino-2',3'-dideoxyribonucleoside-5'-phosphorimidazolide monomers“: J. Schrum, A. Ricardo, K. Krishnamurthy, J. C. Blain, J. W. Szostak, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 14560–14570.
- [15] „Synthesis of activated pyrimidine ribonucleotides in prebiotically plausible conditions“: M. W. Powner, B. Gerland, J. D. Sutherland, *Nature* **2009**, 459, 239.
- [16] „The remaking of chromosomes“: H. J. Muller, *Collecting Net* **1938**, 13, 181–198.
- [17] „Cytological observations of deficiencies involving known genes, translocations and an inversion in *Zea mays*“: B. McClintock, *Mo. Agr. Exp. Sta. Res. Bull.* **1931**, 163, 4.
- [18] „Origin of concatameric T7 DNA“: J. D. Watson, *Nature New Biol.* **1972**, 239, 197–201.
- [19] „A theory of marginotomy“: A. M. Olovnikov, *J. Theor. Biol.* **1973**, 41, 181–190.
- [20] „Transformation of yeast“: A. Hinnen, J. B. Hicks, G. R. Fink, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1978**, 75, 1929–1933.
- [21] „Yeast transformation: A model system for the study of recombination“: T. L. Orr-Weaver, J. W. Szostak, R. J. Rothstein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, 78, 6354–6358.
- [22] „Yeast recombination: The association between double-strand-gap repair and crossing-over“: T. L. Orr-Weaver, J. W. Szostak, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1983**, 80, 4417–4421.
- [23] „High-frequency transformation of yeast: autonomous replication of hybrid DNA molecules“: K. Struhl, D. T. Stinchcomb, S. Scherer, R. W. Davis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1979**, 76, 1035–1039.
- [24] „Isolation and characterisation of a yeast chromosomal replicator“: D. T. Stinchcomb, K. Struhl, R. W. Davis, *Nature* **1979**, 282, 39–43.
- [25] „The double-strand-break repair model for recombination“: J. W. Szostak, T. L. Orr-Weaver, R. J. Rothstein, F. Stahl, *Cell* **1983**, 33, 25–35.
- [26] „A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*“: E. H. Blackburn, J. G. Gall, *J. Mol. Biol.* **1978**, 120, 33–53.
- [27] „Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of *Tetrahymena*“: K. Kruger, P. J. Grabowski, A. J. Zaug, J. Sands, D. E. Gottschling, T. R. Cech, *Cell* **1982**, 31, 147–157.
- [28] „Functional expression of cloned yeast DNA in *Escherichia coli*“: B. Ratzkin, J. Carbon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1977**, 74, 487–491.
- [29] „Production of a functional eukaryotic enzyme in *Escherichia coli*: cloning and expression of the yeast structural gene for imidazole-glycerolphosphate dehydratase (his3)“: K. Struhl, R. W. Davis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1977**, 74, 5255–5259.
- [30] „Cloning yeast telomeres on linear plasmid vectors“: J. W. Szostak, E. H. Blackburn, *Cell* **1982**, 29, 245–255.
- [31] „Is there left-handed DNA at the ends of yeast chromosomes?“: R. Walmsley, T. D. Petes, J. W. Szostak, *Nature* **1983**, 302, 84–86.
- [32] „DNA sequences of telomeres maintained in yeast“: J. Shampay, J. W. Szostak, E. H. Blackburn, *Nature* **1984**, 310, 154–157.
- [33] „Unusual DNA sequences associated with the ends of yeast chromosomes“: R. W. Walmsley, C. S. M. Chan, B.-K. Tye, T. D. Petes, *Nature* **1984**, 310, 157–160.
- [34] „Replication and Resolution of Telomeres in Yeast“: J. W. Szostak, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **1983**, 47, 1187–1194.
- [35] „Isolation of a yeast centromere and construction of functional small circular chromosomes“: L. Clarke, J. Carbon, *Nature* **1980**, 287, 504–509.
- [36] „Construction of artificial chromosomes in yeast“: A. W. Murray, J. W. Szostak, *Nature* **1983**, 305, 189–193.
- [37] „Chromosome length controls mitotic chromosome segregation in yeast“: A. W. Murray, N. P. Schultes, J. W. Szostak, *Cell* **1986**, 45, 529–536.
- [38] „Arrest of segregation leads to accumulation of highly intertwined catenated dimers: dissection of the final stages of SV40 DNA replication“: O. Sundin, A. Varshavsky, *Cell* **1981**, 25, 659–669.
- [39] „Segregating sister genomes: the molecular biology of chromosome separation“: K. Nasmyth, *Science* **2002**, 297, 559–565.
- [40] „Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors“: D. T. Burke, G. F. Carle, M. V. Olson, *Science* **1987**, 236, 806–812.
- [41] „The molecular structure of centromeres and telomeres“: E. H. Blackburn, J. W. Szostak, *Annu. Rev. Biochem.* **1984**, 53, 163–194.

- [42] „Growth of chromosome ends in multiplying trypanosomes“: A. Bernards, P. A. Michels, C. R. Lincke, P. Borst, *Nature* **1983**, 303, 592–597.
- [43] „All gene-sized DNA molecules in four species of hypotrichs have the same terminal sequence and an unusual 3' terminus“: L. A. Klobutcher, M. T. Swanton, P. Donini, D. M. Prescott, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, 78, 3015–3019.
- [44] „Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts“: C. W. Greider, E. H. Blackburn, *Cell* **1985**, 43, 405–413.
- [45] „The telomere terminal transferase of *Tetrahymena* is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity“: C. W. Greider, E. H. Blackburn, *Cell* **1987**, 51, 887–898.
- [46] „How telomeres solve the end-protection problem“: T. de Lange, *Science* **2009**, 326, 948–952.
- [47] „A mutant with a defect in telomere elongation leads to senescence in yeast“: V. Lundblad, J. W. Szostak, *Cell* **1989**, 57, 633–643.
- [48] „In vivo alteration of telomere sequences and senescence caused by mutated *Tetrahymena* telomerase RNAs“: G. L. Yu, J. D. Bradley, L. D. Attardi, E. H. Blackburn, *Nature* **1990**, 344, 126–132.
- [49] „Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts“: C. B. Harley, A. B. Futcher, C. W. Greider, *Nature* **1990**, 345, 458–460.
- [50] „Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells“: A. G. Bodnar, M. Ouellette, M. Frolkis, S. E. Holt, C. P. Chiu, G. B. Morin, C. B. Harley, J. W. Shay, S. Lichtsteiner, W. E. Wright, *Science* **1998**, 279, 349–352.
- [51] „Telomeres and telomerase: the path from maize, *Tetrahymena* and yeast to human cancer and aging“: E. H. Blackburn, C. W. Greider, J. W. Szostak, *Nat. Med.* **2006**, 12, 1133–1138.
- [52] „Telomerase activation. One step on the road to cancer?“: C. W. Greider, *Trends Genet.* **1999**, 15, 109–112.
- [53] „The RNA World“: W. Gilbert, *Nature* **1986**, 319, 618.
- [54] „RNA catalyzed synthesis of complementary strand RNA“: J. A. Doudna, J. W. Szostak, *Nature* **1989**, 339, 519–522.
- [55] „Selection of a ribozyme that functions as a superior template in a self-copying reaction“: R. Green, J. W. Szostak, *Science* **1992**, 258, 1910–1915.
- [56] „In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands“: A. E. Ellington, J. W. Szostak, *Nature* **1990**, 346, 818–822.
- [57] „Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase“: C. Tuerk, L. Gold, *Science* **1990**, 249, 505–510.
- [58] „An RNA motif that binds ATP“: M. Sassanfar, J. W. Szostak, *Nature* **1993**, 364, 550–553.
- [59] „Isolation of new ribozymes from a large pool of random sequences“: D. P. Bartel, J. W. Szostak, *Science* **1993**, 261, 1411–1418.
- [60] „Structurally complex and highly active RNA ligases derived from random RNA sequences“: E. H. Eklund, J. W. Szostak, D. P. Bartel, *Science* **1995**, 269, 364–370.
- [61] „Crystal structure of the catalytic core of an RNA-polymerase ribozyme“: D. M. Shechner, R. A. Grant, S. C. Bagby, Y. Kolodinskaya, J. A. Piccirilli, D. P. Bartel, *Science* **2009**, 326, 1271–1275.
- [62] „RNA-catalysed RNA polymerization using nucleoside triphosphates“: E. H. Eklund, D. P. Bartel, *Nature* **1996**, 383, 192–198.
- [63] „A genome wide search for ribozymes reveals an HDV-like sequence in the human CPEB3 gene“: K. Salehi-Ashtiani, A. Luptak, S. Litovchick, J. W. Szostak, *Science* **2006**, 313, 1788–1792.
- [64] „Two previously undescribed members of the mouse CPEB family of genes and their inducible expression in the principal cell layers of the hippocampus“: M. Theis, K. Si, E. R. Kandel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 9602–9607.
- [65] „CPEB3 is associated with human episodic memory“: C. Vogler, K. Spalek, A. Aerni, P. Demougin, A. Müller, K.-D. Huynh, A. Papassotiropoulos, D. J.-F. de Quervain, *Front. Behav. Neurosci.* **2009**, 3, 1–5.
- [66] „RNA-peptide fusions for the in vitro selection of peptides and proteins“: R. W. Roberts, J. W. Szostak, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, 94, 12297–12302.
- [67] „Functional proteins from a random sequence library“: A. D. Keefe, J. W. Szostak, *Nature* **2001**, 410, 715–718.
- [68] „Template-directed synthesis of a genetic polymer in a model protocell“: S. S. Mansy, J. P. Schrum, M. Krishnamurthy, S. Tobé, D. Treco, J. W. Szostak, *Nature* **2008**, 454, 122–125.
- [69] „Experimental models of primitive cellular compartments: Encapsulation, growth and division“: M. M. Hanczyc, S. M. Fujikawa, J. W. Szostak, *Science* **2003**, 302, 618–622.
- [70] „Synthesis of long prebiotic oligomers on mineral surfaces“: J. P. Ferris, A. R. Hill, Jr., R. Liu, L. E. Orgel, *Nature* **1996**, 381, 59–61.
- [71] „Coupled growth and division of model protocell membranes“: T. F. Zhu, J. W. Szostak, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 5705–5713.
- [72] „Molecular replication“: L. E. Orgel, *Nature* **1992**, 358, 203–209.
- [73] „Efficient and rapid template-directed nucleic acid copying using 2'-amino-2',3'-dideoxyribonucleoside-5'-phosphorimidazolide monomers“: J. Schrum, A. Ricardo, K. Krishnamurthy, J. C. Blain, J. W. Szostak, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 14560–14570.