

Enzymfreie Replikation im Labor – ein plausibles Modell für erste Replikationssysteme?

Die Entstehung und Reproduktion von RNA-Molekülen in Abwesenheit von Proteinen werden aktuell von Biogeneseforschern als grundlegende Schritte zur Entstehung des Lebens angenommen. Die dazu erforderlichen chemischen Prozesse stellen jedoch eine große Herausforderung für diese Hypothese dar und werden daher intensiv erforscht. In einer aktuellen Arbeit der Forschungsgruppe um RICHERT wurde ein chemisches System untersucht, das ein Modell für die enzymfreie Replikation unter präbiotischen Bedingungen darstellen soll. Die Ergebnisse bestätigen jedoch die schwerwiegenden Probleme, die bereits in früheren Arbeiten auf diesem Gebiet beschrieben worden sind.

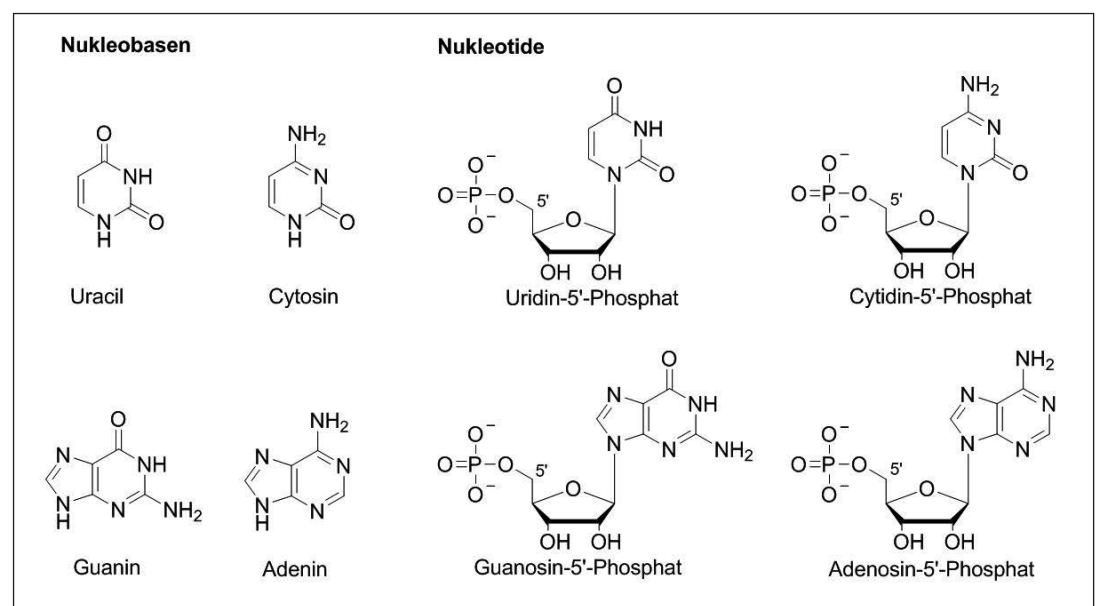
Boris Schmidtgal

Im Rahmen der Evolutionstheorie wird als mögliches Zwischenstadium des Übergangs von einfachen, kleinen Molekülen zu den ersten Organismen die „RNA-Welt“ in Betracht gezogen (GILBERT 1986). Gemäß dieser Hypothese entstanden zuerst RNA-Moleküle*, die sowohl katalytische* als auch genetische* Eigenschaften in sich vereinen. Erst später wurden demnach Proteine rekrutiert, die zu einer größeren Vielfalt der ersten physiologischen Vorgänge und zur Steigerung ihrer Effizienz geführt haben sollen. Schließlich sollen die stabilisierenden DNA-Moleküle das System vervollständigt haben, so dass die molekularen Grundlagen heutiger Zellen entstanden seien. Erste notwendige Schritte in einem solchen Szenario wären die Entstehung und Replikation* von Nukleinsäuren durch chemische Prozesse in Abwesenheit von Proteinen. Sowohl bei der Entstehung als auch der Replikation von Nukleinsäuren handelt es sich um

sehr anspruchsvolle chemische Vorgänge, deren Realisierbarkeit unter präbiotischen* Bedingungen eine entscheidende Herausforderung für die RNA-Welt-Hypothese darstellt. Schon die Bildung der kanonischen Nukleobasen Adenin, Guanin, Cytosin und Uracil sowie der entsprechenden Nukleotide (Abb. 1) durch Reaktion der Nukleobasen mit dem Zucker Ribose und nachfolgender Einführung der Phosphatgruppe ist kein trivialer Vorgang und gilt nach bisherigem Kenntnisstand der Biogeneseforschung als ungeklärt (POWNER et al. 2009, BINDER 2009, SCHMIDTGALL 2012).

Dennoch sind zahlreiche Versuche unternommen worden, um hypothetische präbiotische Bedingungen zu finden, unter denen aus einzelnen Nukleotiden (Monomere) kettenförmige Nukleinsäuren (Polymere) gebildet und repliziert werden können. Vor 14 Jahren konstatierte ESCHENMOSER, dass nach wie vor

Abb. 1 Strukturformeln der vier kanonischen Nukleobasen und mit Ribose-5'-Phosphat gebildeter Ribonukleotide.



der experimentelle Beleg für die Möglichkeit einer spontanen Entstehung und Replikation von Nukleinsäuren fehlt (ESCHENMOSER 1999). In einer aktuellen Publikation der Forschungsgruppe um RICHERT wurde hingegen basierend auf deren Untersuchungen die kühne Behauptung aufgestellt, „dass Oligoribonukleotide* in einer präbiotischen Welt gebildet und repliziert werden konnten“ (DECK et al. 2011).

Bisherige Probleme der enzymfreien Nukleinsäure-Synthese

Ein zentrales Problem stellt zunächst die chemische Aktivierung der Nukleotide dar. Organismen realisieren diesen Schritt unter Verbrauch von chemischen Energieäquivalenten (Adenosintriphosphat, ATP) durch Enzyme (Kinasen). Bei diesem Vorgang werden unreaktive Nukleosid-Monophosphate (NMP) **1** zu reaktionsfähigen Nukleosid-Triphosphaten (NTP) **2** (Abb. 2) umgesetzt. Diese Bausteine können anschließend durch Enzyme (Polymerasen) zur Synthese langer Kettenmoleküle (DNA, RNA) unter Bildung von Phosphatdiesterbindungen verwendet werden. Die Enzyme verhindern Nebenreaktionen, z. B. durch Ausschluss von Wasser und anderer Moleküle aus dem reaktiven Zentrum* und sorgen zudem dafür, dass die Nukleosid-Triphosphate eine für die Reaktion geeignete räumliche Anordnung einnehmen. Aufgrund ihrer hohen Reaktivität weisen aktivierte Moleküle, die für den Einbau in Polymere bereitgestellt werden, eine kurze Lebensdauer auf. So haben sich die Nukleosid-Triphosphate in Abwesenheit von Enzymen als ungeeignet für die Bildung von langen Kettenmolekülen erwiesen (PRABAHAR & FERRIS 1997). Der Grund hierfür ist deren schnellere Konkurrenzreaktion mit dem natürlichen Lösungsmittel Wasser (Hydrolyse) (WIEMANN et al. 1968).

Aufgrund ihrer hohen Reaktivität weisen aktivierte Moleküle, die für den Einbau in Polymere bereitgestellt werden, eine kurze Lebensdauer auf.

Daher wurden alternative „aktivierte“ Nukleotide wie Methylimidazolid-Nukleotide (2MeImpN) oder 1-Methyladeninium-Nukleotide (1-MeadpN) (Abb. 3) konzipiert und experimentell auf die Eignung zur Polymerisation unter potentiell präbiotischen Bedingungen untersucht (INOUE & ORGEL 1983, FERRIS et al. 1996; FERRIS & HUANG 2006). Diese haben sich aber auch wie alle anderen aktivierten Nukleotide, die bisher vorgeschlagen worden sind, in

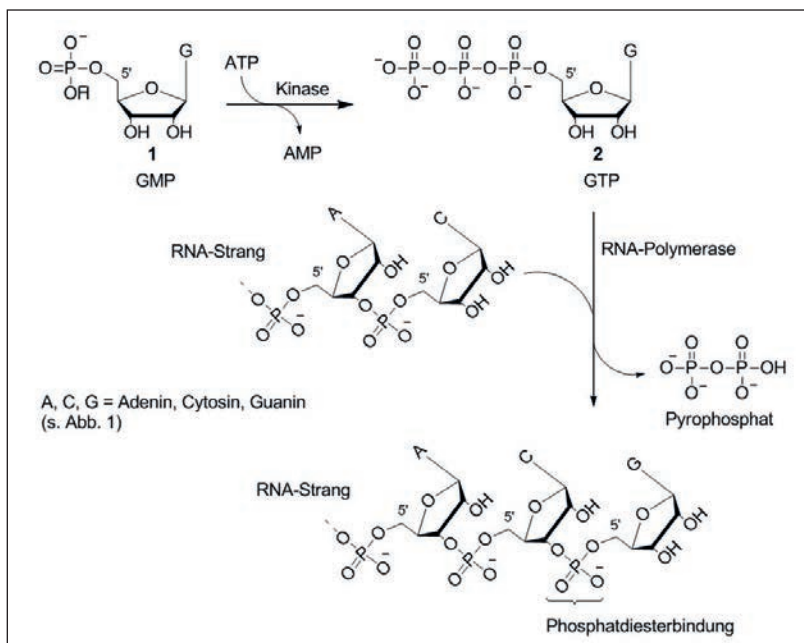


Abb. 2 Chemische Aktivierung und RNA-Synthese in Organismen am Beispiel der Addition von GMP an einen RNA-Strang mit Adenosin und Cytosin an den letzten Positionen.

wässriger Lösung als instabil erwiesen. Lediglich in der Geschwindigkeit des hydrolytischen Zerfalls unterscheiden sie sich. Es überrascht also nicht, dass in bisherigen wissenschaftlichen Arbeiten auf diesem Gebiet oft nach aktivierten Nukleotiden gesucht wurde, die einen Kompromiss zwischen genügend hoher Reaktivität zur Bildung von Oligonukleotiden auf der einen Seite und ausreichender Beständigkeit unter „natürlichen“ Bedingungen, d. h. in wässrigem Milieu auf der anderen darstellen. Des Weiteren zeigt die Erfahrung früherer Arbeiten, insbesondere von ORGEL, dass die Zusammensetzung der

Glossar

genetische Eigenschaft: Fähigkeit zur Speicherung und Übertragung biologischer Information. Diese wird, ähnlich wie im Fall der Wortbildung, durch die Zeichenabfolge der vier Einzelbausteine festgelegt. Diese Funktion ist grundlegend für die Vererbung biologischer Eigenschaften.

katalytische Eigenschaft: Fähigkeit eines Moleküls, chemische Reaktionen zu beschleunigen, ohne bei der Reaktion verbraucht zu werden.

molekularer Linker: Verknüpfende Einheit zwischen der Oberfläche der Eisenoxid-Partikel und dem RNA-Molekül. In der Arbeit von RICHERT wurden Biotin-Linker verwendet.

Oligoribonukleotide: Aus einigen (wenigen), d. h. ca. 3-30 Ribonukleotiden bestehendes Kettenmolekül

präbiotisch: Vor dem Vorhandensein von Organismen.

Primer: kurzer RNA-Strang, der bereits am Templat anliegt und für den Beginn der Oligonukleotid-Synthese notwendig ist.

reaktives Zentrum: Raum innerhalb eines Enzyms, in dem die chemische Reaktion stattfindet.

Replikation: Bildung von Nukleinsäuren durch Anlagerung und Verknüpfung von Nukleotiden an einem bereits vorhandenen Nukleinsäure-Strang. Die Anlagerung geschieht durch attraktive Wasserstoffbrücken-Kräfte zwischen komplementären Nukleotiden. Cytosin bindet an Guanosin (3 Wasserstoffbrücken), Adenosin an Uridin (2 Wasserstoffbrücken).

RNA (ribo nucleic acid): Kettenförmiges Molekül aus vier Nukleotiden. Diese Moleküle übernehmen zentrale Aufgaben in den Zellen aller heute bekannten Organismen.

stromabwärts: in Richtung des Wachstums einer Nukleinsäure-Sequenz, d. h. in 3'-5'-Richtung des Templats.

Templat: bereits vorhandenes Nukleinsäure-Oligomer, an welchem durch sukzessives Binden und Verknüpfen ein neues Nukleinsäure-Oligomer entstehen kann.

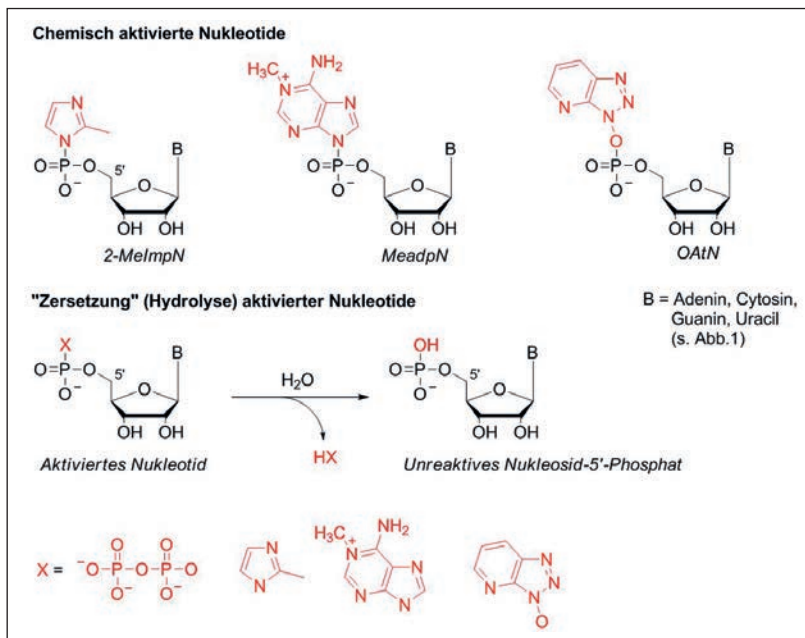
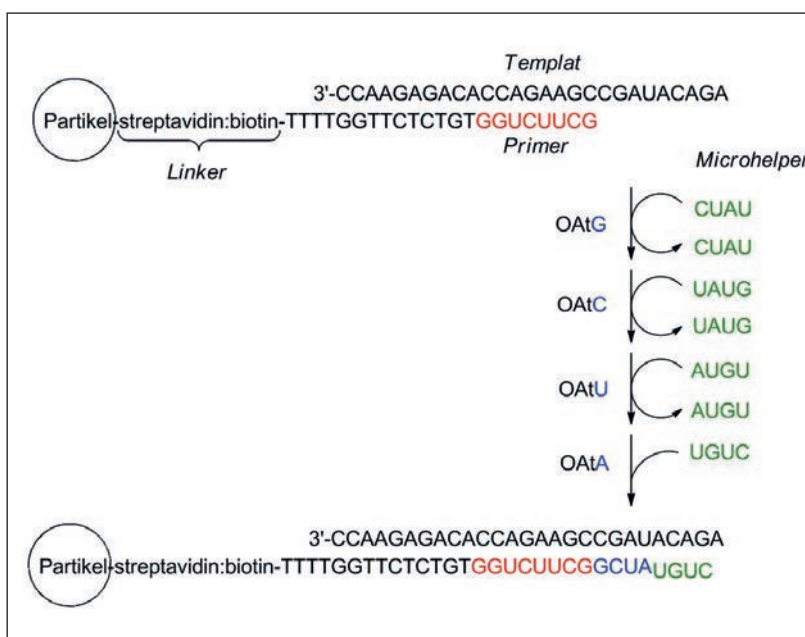


Abb. 3 Strukturformeln einiger „alternativ“ chemisch aktivierter Nukleotide und die Zersetzung aktivierter Nukleotide in wässriger Lösung (Hydrolyse).

Template* (Matrizen) große Unterschiede in der Effizienz der Kupplungsreaktion der aktivierten Nukleotide verursacht (INOUE & ORGEL 1983). Demnach erweisen sich Cytidin-arme Template für die Vermittlung der chemischen Replikation als ungeeignet. Dies würde jedoch die systematische Replikation eines Pools aus RNA-Sequenzen, die aus vier verschiedenen Bausteinen bestehen, unmöglich machen, denn: „Für die chemische Selbstreplikation stellt dies ein ernsthaftes Hindernis dar, weil es bedeutet, dass Cytidin-reiche Polynukleotide, welche als gute Template dienen können, Cytidin-arme, komplementäre Sequenzen erzeugen, die ihrerseits ungeeignet sind, weitere Syntheseyklen zu vermitteln“ (JOYCE et al. 1984). Es stellt sich folglich die Frage, welche Verbesserungen von RICHERT et al. eingeführt worden sind und ob die gewählten Reaktionsbedingungen wirklich als präbiotisch gewertet werden können.

Abb. 4 Schematische Darstellung der enzymfreien Replikation nach RICHERT et al. In vier Schritten wurde an einen Primer eine Sequenz der vier kanonischen Nukleotide geknüpft. Der gesamte Vorgang dauerte 17 Tage.



Die Ergebnisse von RICHERT et al.

Der Forschungsgruppe von RICHERT ist es tatsächlich gelungen, Oligonukleotide, die alle vier kanonischen Ribonukleotide (A/C/G/U) enthalten, unter wässrigen Bedingungen und in Abwesenheit von Enzymen mit sehr hoher Effizienz (quantitative Umsetzung) zu replizieren („enzyme-free primer extension“, Abb. 4). Dies ist ein bisher unerreichter Erfolg und kann vor allem im Hinblick auf die Experimentiertechnik als beachtliche Arbeit angesehen werden. RICHERT et al. haben die Template mitsamt Primer* über einen molekularen Linker* an Eisenoxid-Partikeln verankert. Diese wurden mit periodisch ausgetauschten Lösungen aktivierter Nukleotide in Kontakt gebracht. Der regelmäßige Austausch der Nukleotid-Lösung war erforderlich, da die durch Reaktion mit Wasser zersetzten Monomere das Templat blockierten und dadurch geringere Ausbeuten an Oligonukleotiden verursachten. Die Austauschrate der Lösung war abhängig von der Hydrolysegeschwindigkeit der aktivierten Nukleotide; selbst bei -20°C wurde die Lösung einmal täglich gewechselt. Zusätzlich wurden sogenannte „microhelper“ den Reaktionslösungen zugesetzt. Es handelt sich dabei um Tri- oder Tetranukleotide, die stromabwärts* am Templat binden und die Ausbeute der Addition erhöhten (s. Abb. 4). Sie gelten jedoch nicht als unverzichtbar für Replikationen mit hoher Ausbeute. Sämtliche Reaktionen wurden bei 20°C , 0°C oder -20°C durchgeführt. Die niedrigste Temperatur war für die vollständige Addition von aktivierten Uridin-Bausteinen notwendig, die insgesamt schlechtere Resultate bei der Kupplungsreaktion aufwiesen als die anderen Nukleotide. Die maximalen Ausbeuten der Kupplungsreaktionen lagen je nach Bedingungen bei 80–100%. Als aktivierte Bausteine wurden zum einen Methylimidazolid-Nukleotide (2MeImpN, s. Abb. 3) und zum anderen die bisher noch nicht für diese Art von Experimenten verwendeten 7-Azabenzotriazolid-Nukleotide (OAtN, s. Abb. 3) eingesetzt. Die ersteren wurden bereits von ORGEL untersucht und im Hinblick auf die chemische Evolution als nicht relevant beurteilt: „Während die Entstehung von 2-Methylimidazol unter Bedingungen der primitiven Erde möglich war, glauben wir nicht, dass die Oligomerisation von 2-MeImpG und 2-MeImpA auf poly(C, U)-Templaten ein geschichtlich relevantes System darstellt.“¹² Die 7-Azabenzolide weisen allerdings in wässriger Lösung eine sehr geringe Beständigkeit auf. Ihre Halbwertszeiten liegen je nach aktiviertem Nukleotid bei 5–8 Stunden bei 20°C , 28–40 Stunden bei 0°C und 51–86 Stunden bei -20°C . Die längsten Halbwertszeiten der aktivierten Monomere weist das Cytidin-OAt auf, die kürzesten das Guanidin-OAt.

Probleme früherer Arbeiten werden durch die Ergebnisse von RICHERT et al. bestätigt

Ein besonderes Charakteristikum dieser überaus beeindruckenden Arbeit ist das hohe Maß an *Optimierung*. Nahezu alle für die Reaktion relevanten Parameter wie Zusammensetzung der Pufferlösung, Konzentration der Reaktanden, Temperatur und Reaktionszeit wurden im Hinblick auf die Verbesserung der Reaktionsergebnisse variiert. Dies zeugt von einer hohen Empfindlichkeit dieser Reaktion, die unter unspezifischen Bedingungen auf einer Urerde wohl kaum hätte stattfinden können. Das von RICHERT und Mitarbeitern etablierte Reaktionssystem basiert dagegen auf zielgerichteter Arbeit unter Einsatz von Expertise zur enzymfreien Synthese und Selbstreplikation von RNA-Oligomeren. Weiterhin können die neuen aktivierten Nukleotide (7-Azabenzolide) angesichts ihrer extrem kurzen Halbwertszeiten in wässriger Lösung keinesfalls als präbiotische Reagenzien gelten. Schon ihre Synthese geschieht unter Bedingungen, die nach bisherigem Wissen in der Natur unmöglich sind (VOGEL et al. 2005). Auch der regelmäßige Austausch der Reaktionslösung trägt nichts zur Lösung dieses grundlegenden Problems bei und ist ebenfalls für natürliche Verhältnisse unrealistisch.

Diese Arbeit bestätigt frühere Ergebnisse von ORGEL, indem wiederum die Unterschiedlichkeit in der Reaktivität der aktivierten Monomere aufgezeigt wird. Auch wenn diese Unterschiede in dem von RICHERT etablierten System geringer ausfallen als in früheren Arbeiten, wäre die systematische Replikation langer Oligonukleotide aus den vier kanonischen Nukleotiden über lange Zeiträume nicht möglich. Besonders die geringere Ausbeute bei der Kupplung von Uridin-OAT wirft die Frage auf, wie auf einer solchen molekularen Basis überhaupt eine Sorte genetischer Moleküle aus vier verschiedenen Bausteinen entstanden sein kann, wenn das System über längere Zeiträume evolvierte. Es wäre bei einem solchen Szenario eher zu erwarten, dass die Nukleotide Cytidin und Guanosin, deren Addition mit höheren Ausbeuten verläuft, hauptsächlich zum Aufbau der Oligomeren beitragen und so die weniger gut reagierenden Bausteine Adenosin und Uridin allmählich verdrängt werden.

Selbst wenn die ungesteuerte Entstehung von Nukleinsäuren möglich wäre, ergäben sich weitere, noch größere Schwierigkeiten.

Doch selbst wenn die Entstehung und erste Replikation von Nukleinsäuren auf diesem Wege

abgelaufen sein könnte, ergeben sich weitere und noch größere Schwierigkeiten. Wie stellte sich das System von unnatürlich aktivierten Nukleotiden auf die natürlichen Triphosphate um? An welcher Stelle könnten die Enzyme ins Spiel gekommen sein, vor oder nach der Einführung von Triphosphaten? Kann die Replikation auch zuverlässig funktionieren, wenn zwei auf verschiedene Weise aktivierte Arten von Nukleotiden vorliegen?

Alle bekannten, natürlichen Systeme, in denen die Replikation stattfindet, bestehen aus zwei Typen unterschiedlicher Biopolymere: Nukleinsäuren *und* Proteine (Enzyme). Selbstreplizierende Systeme auf der Basis von nur einer Sorte von Biopolymer sind jedoch nicht bekannt. Der im Sinne der Evolution erster Organismen erforderliche schrittweise Weg von einfachen Biomolekülen hin zu komplexeren sich selbst erhaltenden (autokatalytischen) molekularen Systemen ist auch anhand bisheriger Modellsysteme nicht nachgewiesen worden. Die bisherigen Erkenntnisse über solche Systeme deuten eher darauf hin, dass eine solche Entwicklung nicht plausibel ist.

Literatur

- BINDER H (2009) Neue Synthese für Nukleinsäure-Bausteine – ein plausibler Weg zu ersten Nukleinsäuren? Stud. Int. J. 16, 111–113.
- DECK C, JAUER M & RICHERT C (2011) Efficient enzyme-free copying of all four nucleobases template by immobilized RNA. Nat. Chem. 3, 603–608.
- ESCHENMOSER A (1999) Chemical Etiology of Nucleic Acid Structure. Science 284, 2118–2124.
- FERRIS JP, HILL AR JR, LIU R & ORGEL LE (1996) Synthesis of long prebiotic oligomers on mineral surfaces. Nature 381, 59–61.
- FERRIS JP & HUANG W (2006) One-Step, Regioselective Synthesis of up to 50-mers of RNA Oligomers by Montmorillonite Catalysis. J. Am. Chem. Soc. 128, 8914–8919.
- GILBERT W (1986) The RNA world. Nature 319, 618.
- INOUE T & ORGEL LE (1983) A Nonenzymatic RNA Polymerase Model. Science 219, 859–861.
- JOYCE GF, INOUE T & ORGEL LE (1984) Non-enzymatic Template-directed Synthesis on RNA Random Copolymers. J. Mol. Biol. 176, 279–306.
- POWNER MW, GERLAND B & SUTHERLAND JD (2009) Synthesis of activated pyrimidine ribonucleotides in prebiotically plausible conditions. Nature 459, 239–242.
- PRABAHAR KJ & FERRIS JP (1997) Adenine Derivatives as Phosphate-Activating Groups for the regioselective Formation of 3',5'-Linked Oligoadenylates on Montmorillonite: Possible Phosphate-Activating Groups for the prebiotic Synthesis of RNA. J. Am. Chem. Soc. 119, 4330–4337.
- SCHMIDTGALL B (2012) Neues zur präbiotischen Entstehung von Stickstoffbasen. Stud. Int. J. 19, 118–119.
- VOGEL SR, DECK C & RICHERT C (2005) Accelerating chemical replication steps of RNA involving activated ribonucleotides and downstream-binding elements. Chem. Comm. 4922–4924.
- WIEMAN BJ, LOHRMANN R, ORGEL LE, SCHNEIDER-BERNLOEHR H & SULSTON JE (1968) Template-Directed Synthesis with Adenosine-5'-Phosphorimidazolid Science 161, 387.