

## Spontane Bildung von RNA-Strängen, Peptidyl-RNA und Cofaktoren

Mario Jauker, Helmut Griesser und Clemens Richert\*

**Abstract:** Wie sich die heutige biochemische Maschinerie aus einfachen Vorläufern entwickelte, ist eine ungelöste Frage. Wir zeigen nun, dass Ribonukleotide und Aminosäuren in Abwesenheit von Enzymen zu Peptidyl-RNAs kondensieren, und zwar unter Bedingungen, die auch spontanes genetisches Kopieren induzieren. Es treten templatfreie Bildung von RNA-Strängen, die genetische Information codieren können, die Bildung von Peptidyl-RNAs und die Bildung der Cofaktoren NAD<sup>+</sup>, FAD und ATP unter den gleichen Bedingungen auf. In den Peptidyl-RNAs sind die Peptidketten über eine Phosphorsäureamidgruppe an ein Ribonukleotid gebunden. Peptidyl-RNAs mit langen Peptidketten lassen sich aus einem Pool selektieren, wenn eine lipophile Phase angeboten wird, die das Innere von Membranen simuliert. Freie Peptide lassen sich aus Peptidyl-RNA durch Ansäuern freisetzen. Unsere Ergebnisse zeigen, dass Schlüsselmoleküle der Genetik, der Katalyse und des Metabolismus unter denselben Bedingungen entstehen können, ohne dass es mineralische Oberflächen, Enzyme oder eine chemische Voraktivierung bräuchte.

Es ist bekannt, dass sich sowohl Aminosäuren als auch Kernbasen unter potentiell präbiotischen Bedingungen aus einfachen Vorstufen bilden.<sup>[1,2]</sup> Routen zur abiotischen Bildung von Nukleotiden wurden ebenfalls beschrieben.<sup>[3]</sup> Die Entstehung der frühesten Lebensformen aus unbelebter Materie beinhaltete wahrscheinlich eine Phase, in der Biopolymere aus Monomeren gebildet wurden. Die Überlebensfähigkeit des resultierenden chemischen Systems hing dann von der Fähigkeit zur Replikation ab.<sup>[4]</sup> Weiter könnte während der Entstehung der Protein-RNA-Welt<sup>[5,6]</sup> ein molekularer Prozess existiert haben, der bestimmte RNA-Sequenzen mit bestimmten Peptidsequenzen verknüpfte, sodass eine die andere codieren konnte und Letztere Erstere durch Katalyse unterstützen konnten.<sup>[7]</sup> Dieser Prozess könnte zum genetischen Code geführt haben.<sup>[8]</sup> Unseres Wissens wurden bisher noch keine experimentellen Bedingungen beschrieben, die die gleichzeitige Bildung von Schlüsselmolekülen der Genetik, des Metabolismus und einer schlichten Form der Proteinsynthese induzieren.

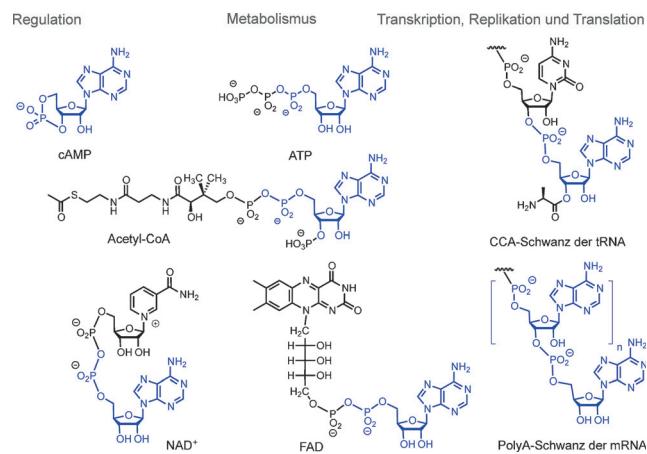


Abbildung 1. Ausgewählte funktionale Biomoleküle, die einen AMP-Rest enthalten (blau hervorgehoben).

Zellen enthalten viele Funktionsmoleküle, die Nukleosidphosphatreste beinhalten.<sup>[9]</sup> Es ist deshalb plausibel, sich bei der Suche nach lebensähnlichen chemischen Systemen auf Nukleotide als Reaktanten zu konzentrieren. Ein auffällig häufig in der Zelle vorkommendes Nukleotid ist Adenosinmonophosphat (AMP). So ist ATP die „Energiewährung der Zelle“.<sup>[10]</sup> Der zentrale Angelpunkt des Metabolismus ist Acetyl-CoA, das ebenfalls AMP enthält. Die universellen Redox-Cofaktoren NAD<sup>+</sup>, NADP<sup>+</sup> und FAD enthalten alle auch Adenosinmonophosphat.<sup>[11]</sup> Unter den sekundären Botenstoffen der Signalübertragung ist cAMP der bekannte.<sup>[12]</sup> Weiter ist AMP einer der Hauptkomponenten der RNA. Die codierte Proteinsynthese beruht auf RNA, sowohl hinsichtlich der ribosomalen Maschinerie,<sup>[13]</sup> als auch bezüglich der Adaptermoleküle (tRNAs) und der Transkripte (mRNAs). Dabei tragen sowohl tRNA als auch mRNA an wenigstens einem Terminus einen AMP-Rest (Abbildung 1). Vermutlich hat AMP entweder eine gegenüber den anderen Ribonukleotiden bevorzugte Struktur oder es spielte bei der Entstehung der biochemischen Maschinerie eine wichtige Rolle. Das wirft die Frage auf, ob eine solche Rolle experimentell beobachtet werden kann.

Für die Oligomerisierung von Peptiden und Oligonukleotiden ist eine Aktivierung nötig, damit die endergonischen Kettenwachstumsreaktionen ablaufen können. Wie in Lit. [14] berichtet wird, stellten wir fest, dass eine Kombination des wasserlöslichen Carbodiimids EDC und alkylierter Heterocyclen, wie 1-Ethylimidazol, bei RNA Kopiervorgänge induziert. Diese erfolgen unter In-situ-Aktivierung der Ribonukleotide, ohne dass ein vorheriger chemischer Schritt notwendig wäre. Carbodiimid ist ein Tautomer des Cyanamids, einer Verbindung, die vermutlich unter präbiotischen Bedingungen gebildet wird.<sup>[15]</sup> Da sowohl templatgesteuertes Strangwachstum als auch Oligomerisierung von Ribonukle-

[\*] Dipl.-Chem. M. Jauker, Dipl.-Chem. H. Griesser, Prof. C. Richert  
Institut für Organische Chemie, Universität Stuttgart  
70569 Stuttgart (Deutschland)

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201506593> zu finden.

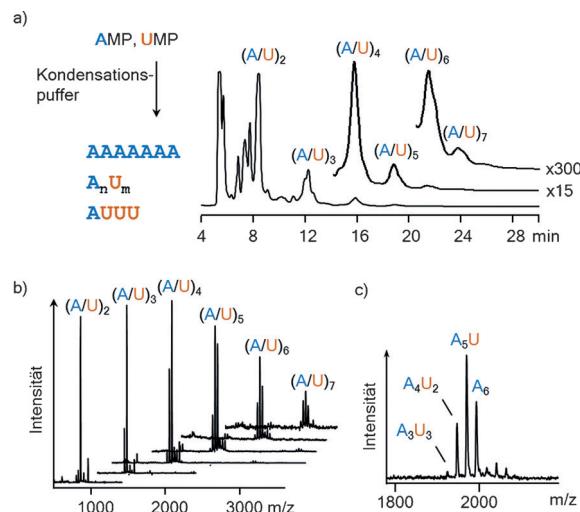
© 2015 Die Autoren. Veröffentlicht von Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Dieser Open Access Beitrag steht unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution Non-Commercial License, die eine Nutzung, Verbreitung und Vervielfältigung in allen Medien gestattet, sofern der ursprüngliche Beitrag ordnungsgemäß zitiert und nicht für kommerzielle Zwecke genutzt wird.

otiden unter Kondensationsbedingungen stattfindet, sahen wir uns veranlasst, diese chemischen Prozesse umfassender zu untersuchen.

In den späten 1950er Jahren wurde berichtet, dass in Ansätzen, bei denen Aminosäuren in organischen Lösungsmitteln mit DCC voraktiviert wurden, in Gegenwart von AMP Peptide entstanden.<sup>[16]</sup> Diese Ergebnisse führten zu Studien über mögliche Ursprünge des genetischen Codes.<sup>[8,17]</sup> Cyanamid-vermittelte Reaktionen von Aminosäuren und ATP ergaben ebenfalls Peptide, wenn auch erneut in niedriger Ausbeute.<sup>[18]</sup> Von der Carbodiimid-vermittelten Bildung von Peptiden wurde angenommen, dass sie über gemischte Anhydride (Adenylate) verläuft. Diese wurden aber nicht isoliert. Ponnampuruma und Banda schrieben 1971: „Attempts at purification of the adenylates only led to their extensive degradation“<sup>[17]</sup> und Lacey et al. schrieben 1992: „So many properties of the ribonucleotides seem to conspire to make peptide synthesis possible and yet we are having trouble forming peptides.“<sup>[19]</sup> Eine detaillierte Untersuchung von Pascal et al. kam zu dem Schluss, dass gemischte Anhydride fragwürdige Zwischenstufen sind.<sup>[20]</sup> Analysen biochemischer Reaktionswege deuteten jedoch auf Spezies aus kovalent verknüpften Oligopeptiden und Nukleotiden als Zwischenstufen in der Evolution der heutigen Translationsmaschinerie hin.<sup>[21,22]</sup> Da sich Peptidyl-RNA in bisherigen Experimenten nicht zeigte, blieb unklar wie auch nur eine primitive Form von RNA-induzierter Proteinsynthese in Abwesenheit einer Translationsmaschinerie entstanden sein könnte. Auch blieb unklar, wie sich gleichzeitig genetisches Material und Co-faktoren hätten bilden können.

Im Folgenden berichten wir, dass sich spontan Peptidyl-RNAs bilden, wenn Aminosäuren und Ribonukleotide in einer wässrigen Lösung reagieren, die ein Kondensationsmittel und einen heterocyclischen Katalysator enthält. Die gleichen Bedingungen induzieren auch das Kopieren genetischer Information.<sup>[14]</sup> Wie die Intermediate der Translation, sind die Peptidyl-RNAs Spezies, in denen der codierten Peptidsynthese zugrundeliegende Biomoleküle kovalent miteinander verknüpft sind. Darüber hinaus entstehen unter den gleichen Reaktionsbedingungen mittels Pyrophosphatbildung auch Cofaktoren. Adenosinmonophosphat ist in allen genannten Prozessen besonders reaktiv, was es erklärt macht, warum es heute in so vielen funktionalen Biomolekülen zu finden ist.

Wie bereits erwähnt, wurden bei Versuchen zum enzymfreien Kopieren genetischer Information unter In-situ-Aktivierung Oligoadenylate beobachtet.<sup>[14]</sup> Es fand also De-novo-Strangbildung statt, ohne dass mineralische Oberflächen als Template für die Oligomerisierung<sup>[23–25]</sup> anwesend waren. Alle Ribonukleotide zeigten eine gewisse Reaktivität, aber nur AMP hatte nach 7 d bei 0°C vollständig zu Oligomeren reagiert.<sup>[14]</sup> Dies veranlasste uns nun dazu, Mischungen aus AMP und anderen Nukleotiden zu untersuchen. Wir erzeugten Lösungen freier Ribonukleotide im „generalisierten Kondensationspuffer“<sup>[14]</sup> (0.8 M EDC, 0.15 M 1-Ethylimidazol, 0.08 M MgCl<sub>2</sub>, 0.5 M HEPES, pH 7.5) und verwendeten eine Kombination aus Ionentauscher-HPLC und MALDI-Massenspektrometrie zur Analyse der Produkte. Abbildung 2 zeigt Ergebnisse eines Ansatzes mit AMP und UMP. In den

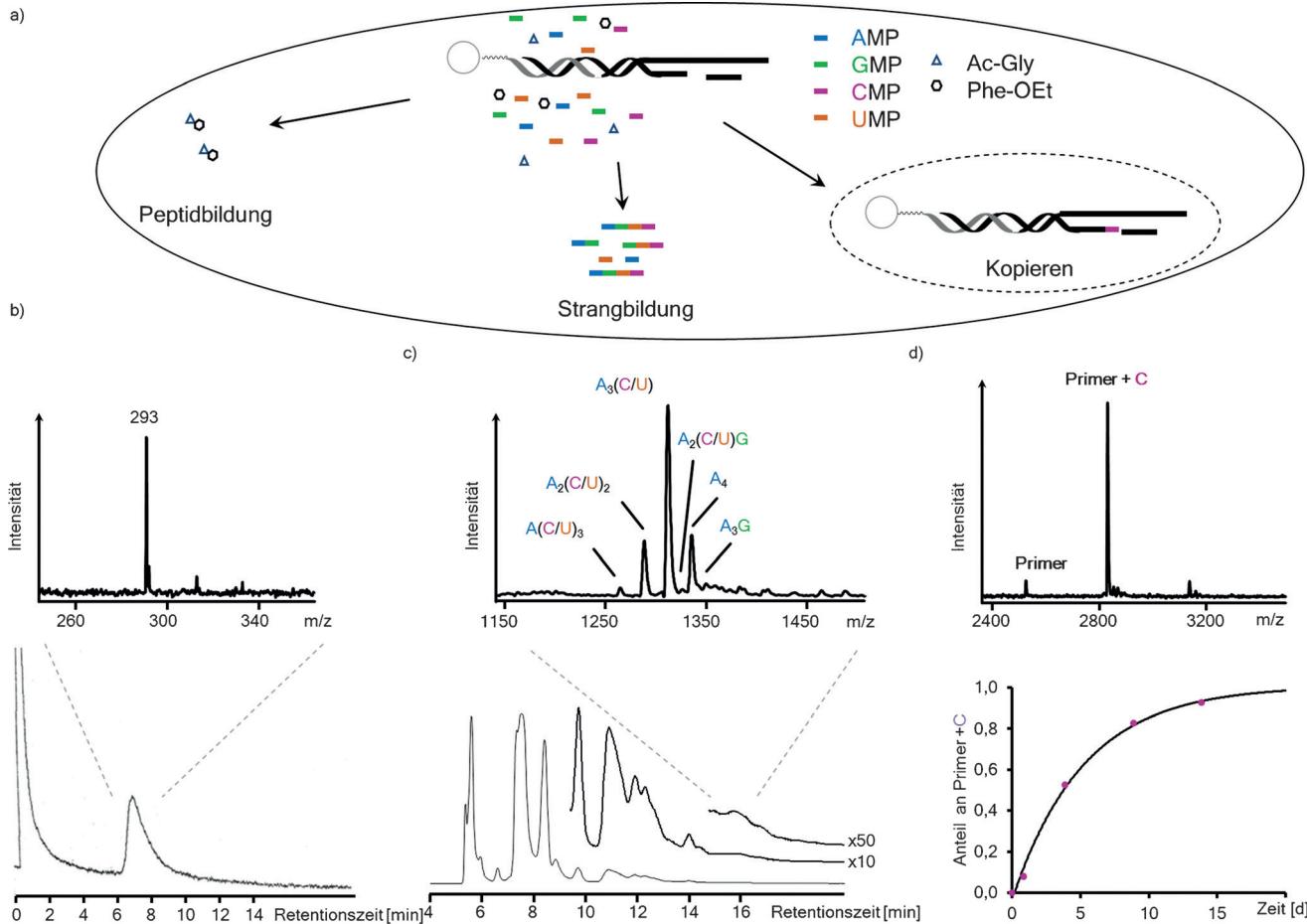


**Abbildung 2.** Oligomerisierung von AMP und UMP ergibt gemischte Sequenzen. a) Reaktionsgleichung und IE-HPLC-Chromatogramm nach 30 d bei 0°C,  $\lambda_{det}$  260 nm. b) Gestaffelte Darstellung von MALDI-TOF-Massenspektren der HPLC Fraktionen. c) Vergrößerung der Peaks der Hexanukleotid-Fraktion, die den Grad des Einbaus von UMP zeigt. Weitere Details siehe Abbildung S1.

Produkten überwiegen die Adenosinreste, aber ein signifikanter Einbau von Uridineinheiten ist klar zu erkennen. Aus solchen Massenspektren lässt sich die Sequenz nicht ablesen, doch selbst für ein sehr einfaches gemischtes Oligomer (A<sub>5</sub>U) sind schon sechs unterschiedliche Sequenzen möglich. Das zeigt, dass genetisches Material spontan aus einer Mischung von Ribonukleotiden in homogener wässriger Lösung entstehen kann.

Wir testeten nun ob die Kondensationsbedingungen für Ribonukleotide auch die Bildung von Peptiden induzieren. Dafür untersuchten wir zunächst einzelne Kopplungsschritte, die nur eine neue Amidbindung ergeben. Als eine N-acetylierte Aminosäure mit einem Aminosäureester umgesetzt wurde, bildete sich innerhalb von Tagen bei 0°C ein Dipeptid (siehe Abbildung S2 und S3 in den Hintergrundinformationen für ein repräsentatives Beispiel). Im Fall von Acetylglycin und Phenylalaninethylester wurden auch Kontrollversuche in Gegenwart von AMP bzw. in Gegenwart von Dipalmitoylphosphatidylchinolin (DPPC, 0.125 M) durchgeführt, die zeigten, dass weder das Nukleotid, noch das membranbildende Phospholipid die Peptidbildung verhindern.<sup>[26]</sup> Beim Auswerten von Massenspektren der Versuche zur Peptidbildung fiel jedoch die gleichzeitige Bildung eines Phosphorsäureamids des Phenylalaninesters auf (siehe Abbildung S4).

Als nächstes untersuchten wir Mischungen aus Aminosäurebausteinen, allen vier Ribonukleotiden und immobilisierten Primer-Templat-Duplexen.<sup>[14]</sup> Es zeigte sich, dass die Anwesenheit der anderen Ribonukleotide die Löslichkeit von GMP im Puffer verbesserte. Auch verhinderte keine der Komponenten ein Kettenwachstum in den anderen Reaktionskanälen dieser komplexen Reaktionsmischung. Organische Extrakte zeigten die Bildung des Dipeptids. Chromatographische Analysen der wässrigen Phase zeigten RNA-Stränge, die alle vier Ribonukleotide enthielten (siehe Abbildung 3 und Abbildung S5). Darüber hinaus fand, trotz der Konkurrenz um das Kondensationsmittel, eine sequenzspe-



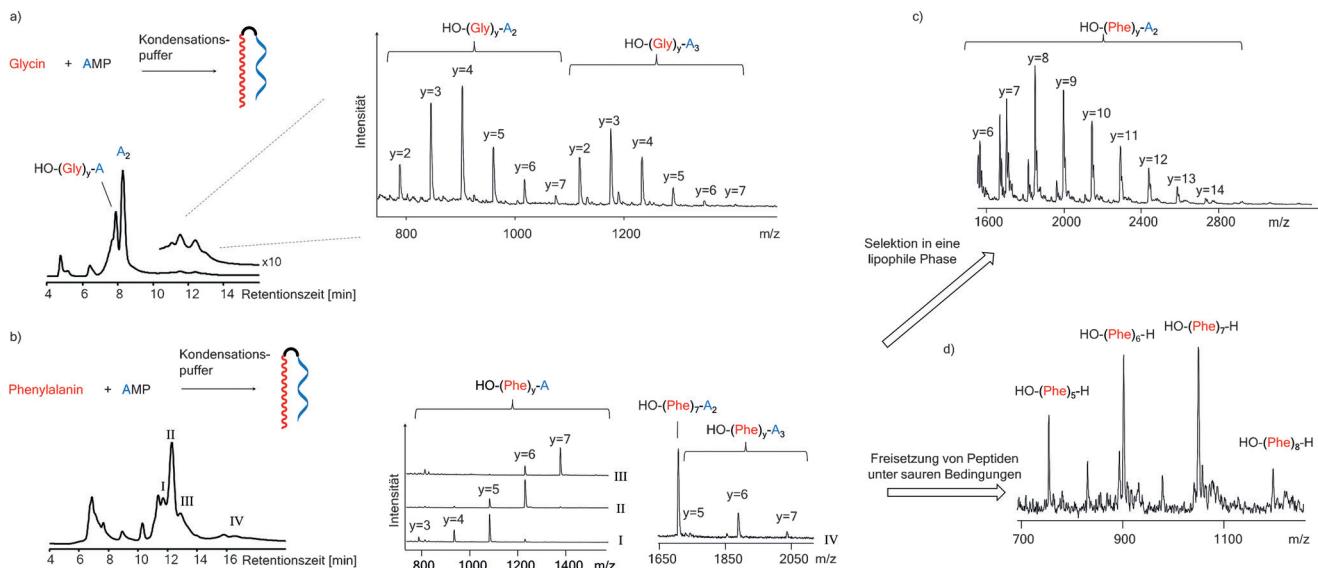
**Abbildung 3.** Gleichzeitige Bildung eines Peptids, verschiedener Oligoribonukleotide und eines sequenzspezifisch verlängerten Primers im selben Reaktionsvolumen. a) Reaktionsmischung und -prozesse. b) HPLC-Chromatogramm ( $\lambda_{det}$  260 nm) und MALDI-Massenspektrum eines des Dipeptid enthaltenden organischen Extrakts nach 5 d. c) De novo gebildete RNA-Stränge: IE HPLC nach 5 d und Massenspektrum einer der Fraktionen. d) Sequenzspezifische Verlängerung des Primers um CMP, nachgewiesen mit MALDI-MS nach Freisetzung von den Partikeln; unten rechts: kinetisches Profil der templatgesteuerten Verlängerung. Bedingungen: 0.15 M Ribonukleotide (jeweils) und 0.125 M Aminosäurebaustein (jeweils), Kondensationspuffer, 0°C.

zifische Verlängerung des Primers statt (Abbildung 3), wobei die Reaktionsgeschwindigkeit nur moderat langsamer war als in Abwesenheit der anderen Komponenten.<sup>[14]</sup>

Als nächstes untersuchten wir eine Mischung aus AMP und einer freien Aminosäure im Kondensationspuffer bei 0°C. Wir entschieden uns für Glycin, der am stärksten vertretenen Aminosäure im Produktgemisch von Miller.<sup>[1,27]</sup> Eine unerwartete Kombination von Oligomerisierungsreaktionen trat auf. Abbildung 4a zeigt ein Chromatogramm der Reaktionsmischung nach 10 d. Zu diesem Zeitpunkt war der intensivste Peak der von Oligoglycinen, die an einen AMP-Rest gebunden sind. Später eluierende Fraktionen ergaben Massenspektren von Oligoglycyloligoribonukletiden. Unter anderem waren Signale für Ketten mit sieben Aminosäureresten und drei AMP-Resten zu erkennen. Kontrollversuche mit Glycin im gleichen Kondensationspuffer, aber ohne AMP, zeigten im <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum unvollständigen Umsatz von Glycin sowie Peaks für Nebenprodukte (siehe Abbildung S6). Offensichtlich fördert AMP die effiziente Bildung von Peptidylketten. Mechanistisch könnte die Blockierung des Aminoterminus zu einer Unterdrückung von Ringschlussreaktionen und anderen Nebenreaktionen sowie zur Modulation

der Reaktivität der Carboxylgruppe durch induktive Effekte führen. Die Phosphorsäureamidbindung zum Nukleotid kann auch andere Reaktionspfade über cyclische Intermediate ermöglichen, ähnlich denen, die für *N*-Acylaminosäuren beschrieben wurden.<sup>[28]</sup>

Da in einer Peptidyl-RNA die Peptidkette kovalent mit der Nukleinsäure verbunden ist, handelt es sich um einen „selektierbaren Komplex“, in dem RNA und Peptid nicht durch Diffusion getrennt werden können. Als wir Phenylalanin und AMP oligomerisierten ließen, entstanden Oligophenylalanin-RNAs (Abbildung 4), die mit der Zeit einen Niederschlag bildeten. Beim Extrahieren des Produktgemisches mit *n*-Octanol, das den lipophilen Teils einer Membranwandporschicht simulieren sollte, erhielten wir Peptidyl-RNAs mit langen Peptidketten (Abbildung 4c). Bei mehr als zehn Resten entstanden Ketten, die die Fähigkeit zur Faltung in eine definierte dreidimensionale Struktur haben sollten. Lange Phenylalaninstrände in Kombination mit AMP-Resten sind auch deshalb interessant, da es sich um lipophile Nukleotide und sehr lipophile Aminosäurereste handelt. Die Entstehung solcher Kombinationen war auf der Basis der „anticodonischen Beziehung“ bezüglich physikalisch-chemi-



**Abbildung 4.** Enzymfreie Kondensation von Aminosäuren und AMP zu Peptidyl-RNAs. a) Kondensation von Glycin und AMP: Reaktionsgleichung, IE-HPLC (260 nm) nach 10 d bei 0°C und MALDI-MS von Fraktionen mit Peptidyl-RNAs. b) Kondensation von Phenylalanin und AMP, Chromatogramm der ausgefallenen Produkte nach 21 d bei 0°C und Massenspektren ausgewählter Fraktionen. c) Selektion langkettiger Peptidyl-RNAs nach Extraktion mit *n*-Octanol: Massenspektrum von Peptidyl-RNAs aus bis zu 14 Phenylalanineinheiten und dem Dinukleotid A<sub>2</sub>. d) Freisetzung von Peptiden aus Peptidyl-RNAs: Massenspektrum (positiver Messmodus) einer Probe der Produktmischung nach Behandlung mit wässriger Essigsäure (80%) über 5 d bei 20°C, gefolgt von Extraktion mit *n*-Octanol.

scher Eigenschaften, die sich im genetischen Code findet, zu erwarten.<sup>[19]</sup> Das Triplet UUU codiert für Phe und das Anticodon einer frühen tRNA (AAA) könnte anziehende Wechselwirkungen mit der von ihr codierten Aminosäure (Phe) eingegangen sein.

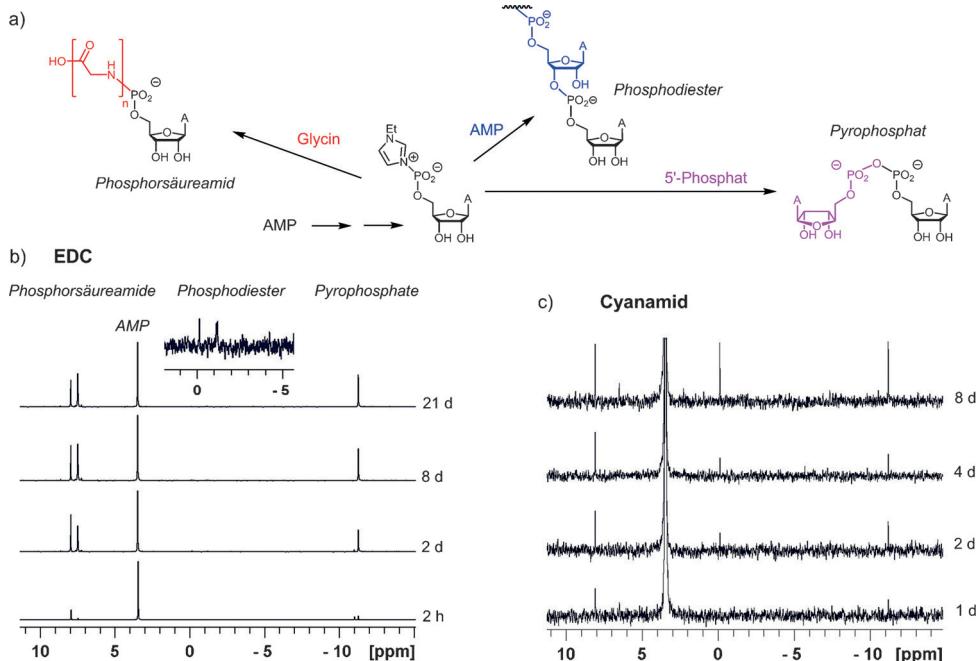
Wenn das ursprüngliche Produktgemisch der Kondensation von Phenylalanin und AMP mit wässriger Essigsäure behandelt wurde, entstanden freie Peptide (Abbildung 4d). Wie bei der heutigen Translation, bei der tRNAs mit der wachsenden Peptidkette als Intermediate auftreten, können Peptidyl-RNAs also Peptide freisetzen, hier allerdings nach einer Senkung des pH-Werts. Als eine Mischung aus Glycin, Phenylalanin und AMP unter Kondensationsbedingungen umgesetzt wurde, wurde eine Verteilung von Peptidyl-RNAs gemischter Sequenz mit bis zu sieben Aminosäureresten und bis zu fünf AMP-Resten gefunden (Abbildung S7). Wenn die Oligomerisierungsmischung UMP, AMP, Phenylalanin und Glycin enthielt, ließen sich Peptidyl-RNAs mit gemischter Sequenz aus vier Aminosäureresten und bis zu fünf Nukleotidresten nachweisen (Abbildung S8). Alle vier Ausgangsverbindungen wurden in die Produkte eingebaut, was bedeutet, dass die Kondensation ein breites Spektrum an Peptidyl-RNAs erzeugt. Dies ist vorteilhaft für eine Evolution durch „Survival of the Fittest“.<sup>[29]</sup>

Als nächstes wollten wir klären, ob es sich bei den gefundenen Peptidyl-RNAs um gemischte Anhydride („Adenylate“) handelt.<sup>[16]</sup> Die Strukturaufklärung mittels ein- und zweidimensionaler NMR-Spektroskopie zeigte, dass dies nicht der Fall ist. Zuerst wurde die Kondensation von AMP allein mit <sup>31</sup>P-NMR-Spektroskopie analysiert. In Abwesenheit von Aminosäuren erschien ein Peak mit einer chemischen Verschiebung im Bereich, der für Pyrophosphat typisch ist. Zusätzlich zeigten sich, wie für Oligomerisierung zu erwarten, mehrere kleinere Peaks im ppm-Bereich von

Phosphodiester. Dagegen zeigten sich bei der Kondensation in Gegenwart von Glycin Peaks im ppm-Bereich für Phosphorsäureamide, was bedeutet, dass die Peptidyl-RNAs N-verknüpft sind. Die <sup>31</sup>P-NMR-Signale gemischter Anhydride würden etwa 10 ppm höher liegen.<sup>[30]</sup> Die Struktur der Phosphorsäureamid-verknüpften Oligoglycin-RNAs wurde durch <sup>31</sup>P-<sup>1</sup>H-HMBC-NMR-Spektroskopie bestätigt (siehe Abbildung S9). Interessanterweise sind Phosphorsäureamide bestimmter Aminosäuren alternative Substrate für virale Polymerasen,<sup>[31,32]</sup> was sich in das Muster der gegenseitigen molekularen Verwendbarkeit einfügt.

Sodann prüften wir, ob die beobachteten Kondensationsprozesse zwingend ein organisches Carbodiimid als Aktivierungsmittel benötigten. Dazu wurde die Kondensation von AMP und Glycin mit einem organischen Carbodiimid, dem „anorganischen“ Aktivierungsmittel Cyanamid oder dem Oxyazabenzotriazolid des AMPs als einziger aktivierender Spezies angesetzt. Die Produktverteilung wurde <sup>31</sup>P-NMR-spektroskopisch analysiert (siehe Abbildung 5 und Abbildung S10). Die Kondensationsreaktion war mit Cyanamid langsamer, sodass hier bei 20°C oder 50°C gearbeitet wurde. Jedoch resultierte in allen drei Fällen eine Mischung aus Phosphorsäureamiden, Pyrophosphat sowie kleinen Mengen an Phosphodiester. Unabhängig davon, welches Kondensationsmittel die reaktive Spezies erzeugt, treten somit alle drei in Abbildung 5a gezeigten Reaktionstypen auf.

Mechanistisch wird wohl nach anfänglicher Aktivierung, z.B. durch Bildung eines Carbodiimid-Addukts, eine hochreaktive Spezies mit dem Organokatalysator (hier Ethylimidazol) gebildet. Diese kann dann mit Aminen, Phosphaten oder Alkoholen reagieren, um Phosphorsäureamide, Pyrophosphate oder Phosphodiester zu bilden. Die Phosphodiesterbildung scheint die langsamste dieser Reaktionen zu sein. Eine Erhöhung der Geschwindigkeit und Genauigkeit der



**Abbildung 5.** Das Reaktionsverhalten von AMP in Gegenwart von Glycin für zwei verschiedene Aktivierungsmittel ist ähnlich, wie  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren (125 MHz) zeigen. a) Reaktionsgleichung und mechanistischer Vorschlag. b) Spektren eines Ansatzes mit EDC als Kondensationsmittel. c) Spektren eines Ansatzes mit Cyanamid als Aktivierungsmittel. Reaktionszeiten sind rechts der Spektren angegeben. Mit EDC zeigt sich eine höhere Reaktivität als mit Cyanamid, so dass sich Monoglycyl (8 ppm) und Oligoglycyl-Spezies (7.5 ppm) bilden. Es treten jedoch in beiden Fällen gleichzeitig Peaks für Phosphorsäureamide, Phosphodiester und Pyrophosphate auf. Reaktionsbedingungen: Kondensationspuffer in  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (4:1) mit 0.3 M AMP und 0.3 M Glycin bei 0°C oder 50°C bei (c). Die Vergrößerung in (b) zeigt Signale im Phosphodiesterbereich.

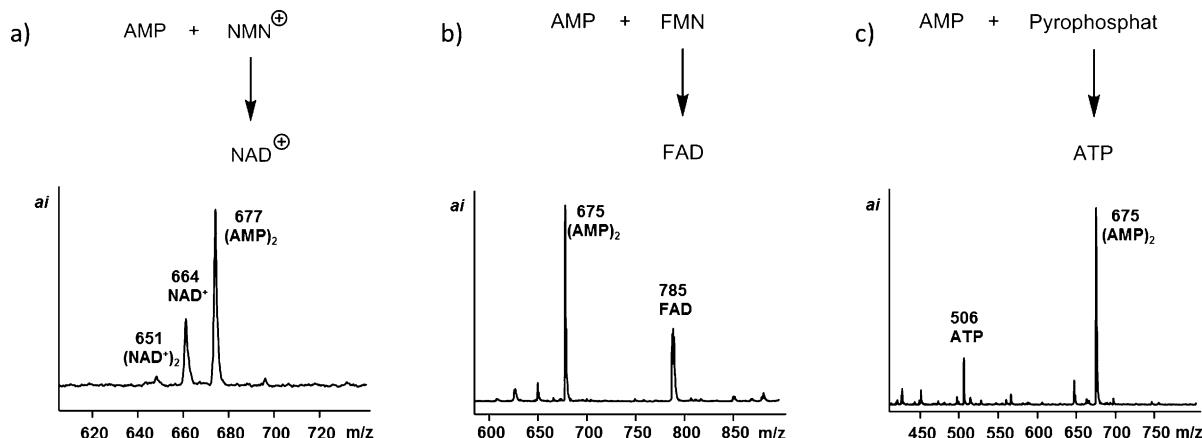
darauf beruhenden RNA-Replikation könnte das Überleben sich selbst replizierender Systeme erleichtert haben.<sup>[29]</sup>

Unter den Kondensationsreaktionen beobachteten wir auch Pyrophosphatbildung. Einige der wichtigsten Coenzyme des heutigen Primärmetabolismus enthalten pyrophosphatverknüpfte AMP-Reste (Abbildung 1). Eine Mischung aus AMP und Nicotinamidmononukleotid ( $\text{NMN}^+$ ) reagierte in Kondensationspuffer bei 0°C unter Bildung von  $\text{NAD}^+$ . Zusätzlich zeigten sich auch die erwarteten symmetrischen Pyrophosphate

(siehe Abbildung 6 und Abbildungen S11, S12). Eine Mischung von Flavinmononukleotid (FMN) und AMP ergab den Cofaktor FAD, wobei die übliche Cyclisierung von FMN verringert auftrat.<sup>[33]</sup> In einer Mischung von AMP und dem Tetranatriumsalz von Pyrophosphat bildeten sich signifikante Mengen an ATP. Damit war gezeigt, dass die Reaktionsbedingungen, die Ablesevorgänge und Oligomerisierung induzieren, auch zur spontanen Bildung zentraler Moleküle des Primärmetabolismus führen.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass AMP unter „generalisierten Kondensationsbedingungen“ Eigenschaften besitzt, die die Entstehung funktioneller Biomoleküle begünstigen. So oligomerisiert AMP unter den vier Ribonukleotiden am leichtesten in Abwesenheit von Mineraloberflächen.<sup>[14]</sup> Vermutlich hat es besondere Fähigkeiten zur Selbstorganisation. Die schnelle Oligomerisierung

von AMP kompensiert möglicherweise das langsame Kopieren von A-reichen Sequenzen<sup>[34,35]</sup> bei einer enzymfreien Replikation. Weiterhin bildet AMP unter Kondensationsbedingungen mit anderen Phosphaten spontan Cofaktormoleküle, was die Entstehung eines simplen Metabolismus erleichtert. Drittens bildet AMP Peptidyl-RNAs, ohne dass eine Maschinerie zur Proteinsynthese nötig wäre. Die Vorgänge finden unter Bedingungen statt, die typisch für eutektische Eisphasen sind.<sup>[36]</sup>



**Abbildung 6.** Nachweis der Bildung von Pyrophosphat-verknüpften Cofaktoren und ATP in Kondensationspuffer bei 0°C mittels MALDI-MS. a) Lösung von AMP und  $\text{NMN}^+$  (jeweils 0.15 M) nach 4 d; Spektrum im positiven Messmodus. b) AMP und FMN nach 4 d. c) AMP und Pyrophosphat (0.15 M) nach 20 d.

Peptidylsubstituenten am 5'-Terminus von Oligonukleotiden können die Stabilität von Duplexen mit RNA erhöhen.<sup>[37]</sup> Doppelsträngige RNA wird langsamer zersetzt als einzelsträngige RNA. Komplementäre Stränge zur RNA-Kette der Peptidyl-RNAs könnten diese gegen Zersetzung stabilisiert haben und könnten zu Vorläufern der heutigen mRNAs geführt haben. Weiter könnten lipophile Peptidylketten die Peptidyl-RNAs in einer Membran verankert haben, um sie in einer Protozelle zu halten.<sup>[38]</sup> Darüber hinaus könnten spezifische RNA-Sequenzen der Peptidyl-RNAs dem Peptidwachstum als Templat gedient haben (oder umgekehrt) und intramolekulare Wechselwirkungen beim Kettenwachstum (die entropisch gegenüber intermolekularen Wechselwirkungen bevorzugt sind) zur Entstehung eines ersten genetischen Codes geführt haben.<sup>[19]</sup> Unabhängig von zu klärenden Details stützen unsere Ergebnisse jedenfalls Eigens Vorschlag von primitiven tRNAs als frühesten Komponenten der Translationsmaschinerie.<sup>[39]</sup> Insgesamt kommen wir zu dem Schluss, dass ribonukleotidabhängige Kondensationsreaktionen mehr funktionelle Biomoleküle hervorbringen als bisher gedacht.

## Experimentelles

**Kondensationsreaktion:** Eine wässrige Lösung von HEPES (0.5 M), MgCl<sub>2</sub> (0.08 M), 1-Ethylimidazol (0.15 M) und den jeweiligen Ausgangsverbindungen [NMP (0.02–0.15 M), Aminosäure (0.1–0.3 M) und/oder weiteres Phosphat (0.15 M)] wurde mit NaOH-Lösung auf pH 7.5 eingestellt. Von der resultierenden Lösung wurden 65 µL genutzt, um EDC-Hydrochlorid (10 mg, 52 µmol) aufzunehmen, was eine EDC-Konzentration von ca. 0.8 M ergab. Für Primerverlängerung mit immobilisierten Strängen wurden 5 µL der Lösung zu 25 µg magnetischen Partikeln gegeben, die mit dem Primer-Templat-Duplex beladen waren,<sup>[14]</sup> und dann zu 5 nmol des Hilfsstrangs gegeben. Die Mischung wurde bei 0 °C gehalten, und die Reaktionen wurden entweder *in situ* mit NMR-Spektroskopie oder durch Probennahme und Analyse mit HPLC und MS verfolgt. Vorschriften und zusätzliche Daten finden sich in den Hintergrundinformationen.

## Danksagung

Diese Arbeit wurde von der DFG (Projekt RI 1063/8-2) und EU COST action CM1304 gefördert. Wir danken M. Sosson für Vergleichsmessungen, T. Sabirov für Experimente, Dr. B. Claasen für die Aufnahme von NMR-Spektren sowie Dr. E. Kervio und S. Kaspari für Diskussionen.

**Stichwörter:** Cofaktoren · Genetischer Code · Peptide · RNA · RNA-Welt

**Zitierweise:** *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 14564–14569  
*Angew. Chem.* **2015**, *127*, 14772–14777

- [1] S. L. Miller, *Science* **1953**, *117*, 528–529.
- [2] J. Oró, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1960**, *2*, 407–412.
- [3] M. W. Powner, B. Gerland, J. D. Sutherland, *Nature* **2009**, *459*, 239–242.
- [4] M. Eigen, P. Schuster, *Naturwissenschaften* **1977**, *64*, 541–565.
- [5] J. A. L. da Silva, *J. Theor. Biol.* **2015**, *370*, 197–201.
- [6] P. Strazewski, *Isr. J. Chem.* **2015**, *55*, 851–864.
- [7] J. D. Sutherland, J. M. Blackburn, *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 481–488.

- [8] F. H. Crick, *J. Mol. Biol.* **1968**, *38*, 367–379.
- [9] F. Westheimer, *Science* **1987**, *235*, 1173–1178.
- [10] F. Lipmann in *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology* (Hrsg.: F. F. Nord, C. Werkman), Wiley, Hoboken, **1941**, S. 99–162.
- [11] S. A. Benner, A. D. Ellington, A. Tauer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 7054–7058.
- [12] J. A. Beavo, L. L. Brunton, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2002**, *3*, 710–718.
- [13] M. M. Yusupov, G. Z. Yusupova, A. Baucom, K. Lieberman, T. N. Earnest, J. H. Cate, H. F. Noller, *Science* **2001**, *292*, 883–896.
- [14] M. Jauker, H. Griesser, C. Richert, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, DOI: 10.1002/anie.201506592; *Angew. Chem.* **2015**, DOI: 10.1002/ange.201506592.
- [15] A. Schimpl, R. M. Lemmon, M. Calvin, *Science* **1965**, *147*, 149–150.
- [16] P. Berg, *J. Biol. Chem.* **1958**, *233*, 608–611.
- [17] P. W. Banda, C. Ponnampuruma, *Space Life Sci.* **1971**, *3*, 54–62.
- [18] D. W. Nooner, E. Sherwood, M. A. More, J. Oró, *J. Mol. Evol.* **1977**, *10*, 211–220.
- [19] J. C. Lacey, N. S. M. D. Wickramasinghe, G. W. Cook, *Origins Life Evol. Biospheres* **1992**, *22*, 243–275.
- [20] R. Pascal, L. Boiteau, A. Commeyras in *Topics in Current Chemistry* (Hrsg.: P. Walde), Springer, Berlin/Heidelberg, **2005**.
- [21] M. Di Giulio, *J. Mol. Evol.* **1997**, *45*, 571–578.
- [22] T. Cavalier-Smith, *J. Mol. Evol.* **2001**, *53*, 555–595.
- [23] J. P. Ferris, G. Ertem, V. Agarwal, *Origins Life Evol. Biospheres* **1989**, *19*, 165–178.
- [24] J. P. Ferris, A. R. Hill, R. H. Liu, L. E. Orgel, *Nature* **1996**, *381*, 59–61.
- [25] B. J. Cafferty, N. V. Hud, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *22*, 146–157.
- [26] Siehe auch P. Strazewski, *Colloids Surf. B* **2009**, *74*, 419–425.
- [27] A. P. Johnson, H. J. Cleaves, J. P. Dworkin, D. P. Glavin, A. Lazcano, J. L. Bada, *Science* **2008**, *322*, 404.
- [28] G. Danger, A. Michaut, M. Bucchi, L. Boiteau, J. Canal, R. Plasson, R. Pascal, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 611–614; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 639–642.
- [29] C. de Duve, *Nature* **2005**, *433*, 581–582.
- [30] T. Moriguchi, T. Yanagi, T. Wada, M. Sekine, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1999**, 1859–1866.
- [31] O. Adelfinskaya, M. Terrazas, M. Froeyen, P. Marlière, K. Nauwelaerts, P. Herdewijn, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 5060–5072.
- [32] M. Terrazas, P. Marlière, P. Herdewijn, *Chem. Biodiversity* **2008**, *5*, 31–39.
- [33] H. S. Forrest, H. S. Mason, A. R. Todd, *J. Chem. Soc.* **1952**, 2530–2534.
- [34] A. R. Hill, L. E. Orgel, T. Wu, *Origins Life Evol. Biospheres* **1993**, *23*, 285–290.
- [35] E. Kervio, A. Hochgesand, U. E. Steiner, C. Richert, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 12074–12079.
- [36] P.-A. Monnard, A. Kanavarioti, D. W. Deamer, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13734–13740.
- [37] D. A. Sarracino, J. A. Steinberg, M. T. Vergo, G. F. Woodworth, C. N. Tetzlaff, C. Richert, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 2511–2516.
- [38] A. L. C. Isaad, P. Carrara, P. Stano, K. S. Krishnakumar, D. Lafont, A. Zamboulis, R. Buchet, D. Bouchu, F. Albrieux, P. Strazewski, *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 6363–6373.
- [39] M. Eigen, R. Winkler-Oswatitsch, *Naturwissenschaften* **1981**, *68*, 282–292.

Eingegangen am 17. Juli 2015,  
veränderte Fassung am 3. September 2015  
Online veröffentlicht am 5. Oktober 2015