

Kations, wurden mit anisotropen Verschiebungsparametern verfeinert, Wasserstoffatome auf idealisierten Lagen. Streufaktoren und Koeffizienten für anomale Dispersion sind im SHELXTL-5.03-Programmpaket (G. M. Sheldrick, Madison, WI) enthalten.

- [17] Die kristallographischen Daten (ohne Strukturfaktoren) der in dieser Veröffentlichung beschriebenen Struktur wurden als „supplementary publication no. CCDC-100501“ beim Cambridge Crystallographic Data Centre hinterlegt. Kopien der Daten können kostenlos bei folgender Adresse in Großbritannien angefordert werden: The Director, CCDC, 12 Union Road, GB-Cambridge CB2 1EZ (Telefax: Int. + 1223/336-033; E-mail: deposit@chemcrys.cam.ac.uk).

Dynamische Fehlerkorrektur in autokatalytischen Peptid-Netzwerken**

Kay Severin, David H. Lee, Jose A. Martinez, Michael Vieth und M. Reza Ghadiri*

Das Leben spielt sich zwischen zwei Extremen ab. Zum einen erfordert Evolution, daß Fehler bei der Selbstreproduktion auftreten, damit neue Information entstehen kann. Zum anderen müssen aber lebende Systeme ihre Information gegen eine exzessive Häufung von Fehlern schützen.^[1] Hier beschreiben wir autokatalytische Peptid-Netzwerke, die Fehler kompensieren, indem mutierte Peptide zur Synthese des Wildtyps herangezogen werden. Die Systeme basieren auf drei oder vier Peptidfragmenten, die in neutraler wäßriger Lösung kompetitive Kondensationsreaktionen eingehen. Dabei entsteht die native Sequenz eines selbstreplizierenden Peptids sowie entsprechende mutierte Peptide. Dieser Prozeß reagiert auf das spontane Auftreten von Fehlern, experimentell simuliert durch Hintergrund-Kondensationsreaktionen, bei denen mutierte Peptide entstehen, indem diese Peptide als selektive Katalysatoren für die native, selbstreplizierende Sequenz genutzt werden. Detaillierte Analysen haben ergeben, daß diese neue Art der Sequenzselektion das Resultat selbstorganisierter Netzwerke ist, die sich aus zwei oder drei (auto)katalytischen Cyclen zusammensetzen. Diese, auf Biopolymeren basierenden Netzwerke gehören zu den ersten Beispielen für nichtlineare chemische Systeme, bei denen katalytische und autokatalytische Prozesse kooperativ gekoppelt sind.^[2]

Wir beschreiben hier eine neuartige Reaktion von selbstreplizierenden Peptidsystemen auf das spontane Auftreten von Mutationen: durch Selbstorganisation entstehen Netzwerke von kooperativ gekoppelten, katalytischen und autokatalytischen Cyclen, die die Produktion der nativen Sequenz begünstigen. Die Systeme basieren auf der kürzlich beschrie-

benen Sequenz eines selbstreplizierenden Peptids^[3] und bestehen aus maximal vier Peptidfragmenten: den nativen elektrophilen und nucleophilen Fragmenten **E** bzw. **N** sowie den entsprechenden Alanin-Mutanten **E**_{9A} und **N**_{26A} (Abb. 1).

E: ArCONH-RMKQLEEKVYELLISKVA-COSBn
E_{9A}: ArCONH-RMKQLEEKAYELLISKVA-COSBn
N: H₂N-CLEYEVARLKKLVGE-CONH₂
N_{26A}: H₂N-CLEYEVARAKKLVGE-CONH₂
T: ArCONH-RMKQLEEKVYELLISKVACLEYEVARLKKLVGE-CONH₂
T_{9A}: ArCONH-RMKQLEEKAYELLISKVACLEYEVARLKKLVGE-CONH₂
T_{26A}: ArCONH-RMKQLEEKVYELLISKVACLEYEVARAKKLVGE-CONH₂
T_{9/26A}: ArCONH-RMKQLEEKAYELLISKVACLEYEVARAKKLVGE-CONH₂

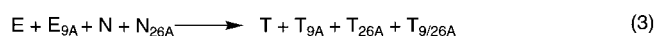
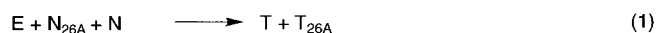


Abb. 1. Die in dieser Studie durchgeführten Kondensationsreaktionen (1)–(10) und die korrespondierenden Peptidsequenzen (oben). Für das Design, die Synthese, die Charakterisierung und die kinetische Analyse siehe Lit. [3].

Bei kompetitiven Kondensationsreaktionen entstehen aus diesen Peptiden vier Produkte: die native Sequenz **T**, die einfach mutierten Peptide **T**_{9A} und **T**_{26A} sowie das doppelt mutierte Peptid **T**_{9/26A}. Die spontane Bildung von Fehlern während der Selbstreproduktion wird durch Addition von mutierten Fragmenten zu der Ausgangsmischung simuliert. In den mutierten Peptiden sind die ursprünglichen Aminosäurereste durch verwandte Reste ersetzt (Alanin an Stelle von Valin 9 und Leucin 26). Durch diesen „konservativen Austausch“ entsteht eine Population von Mutanten mit einem ähnlichen Informationsgehalt,^[4] eine sogenannte Quasi-Spezies.^[5]

Bei Reaktionen mit äquimolaren Mengen **E**, **N**_{26A} und **N** [Gl. (1)] oder **E**, **E**_{9A} und **N** [Gl. (2)] in Guanidinium-Lösungen (4 M, pH 7.5) entstehen in etwa gleichen Anteilen die zu erwartenden Kondensationsprodukte **T** und **T**_{26A} bzw. **T** und **T**_{9A}. Dies zeigt, daß unter denaturierenden Bedingungen kein Produkt kinetisch bevorzugt ist. In wäßriger Lösung ohne denaturierendes Agens zeigen beide Reaktionen jedoch eine deutliche Präferenz für die Produktion der nativen Peptidsequenz **T** (Abb. 2 a, b). A priori kann die bevorzugte Produktion der nativen Sequenz einfach dem bekannten parabolischen Wachstum dieses selbstreplizierenden Peptids zugewiesen werden. In der Tat haben Kontrollversuche mit äquimolaren Mengen an **E** und **N**_{26A} [Gl. (4)] oder **E**_{9A} und **N**

[*] Prof. Dr. M. R. Ghadiri, Dr. K. Severin, D. H. Lee, Dr. J. A. Martinez, Dr. M. Vieth
 Departments of Chemistry and Molecular Biology
 Skaggs Institute for Chemical Biology
 The Scripps Research Institute
 10550 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037 (USA)
 Telefax: Int. + 619/784-2798
 E-mail: ghadiri@scripps.edu

[**] Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für ein Postdoktoranden-Stipendium an K. S., dem kanadischen Medical Research Council für ein Doktoranden-Stipendium an D. H. L. und dem spanischen Ministerium für Erziehung und Wissenschaft für ein Postdoktoranden-Stipendium an J. A. M.

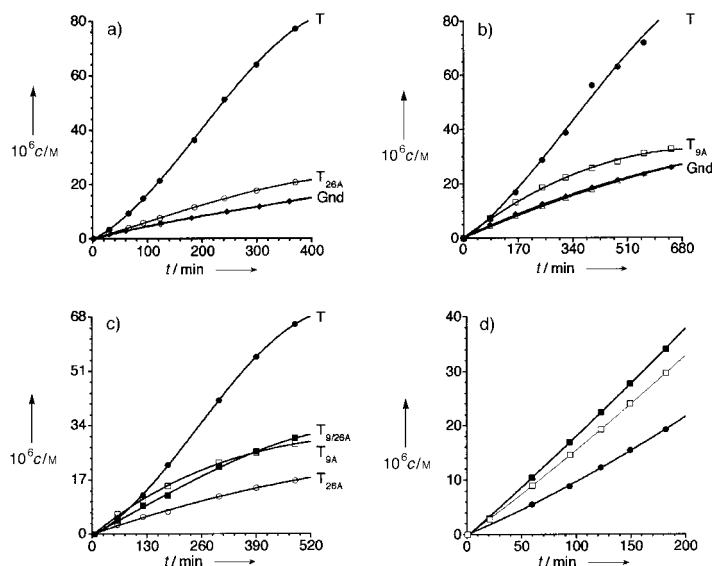


Abb. 2. Die Konzentration der Produkte c_p als eine Funktion der Zeit. a) Reaktion (1): T (●) und T_{26A} (○) sowie in Gegenwart von 4 M Gnd T (◆) und T_{9A} (△); b) Reaktion (2): T (●) und T_{9A} (□) sowie in Gegenwart von 4 M Gnd T (▲) und T_{9A} (△); c) Reaktion (3): T (●), T_{26A} (○), T_{9A} (□) und $T_{9/26A}$ (■); d) Reaktion (8) und (9): T in Gegenwart von 40 μM T_{26A} (□), 57 μM T_{9A} (■) oder ohne Zusatz von Templaten (●). Es ist zu beachten, daß die Kondensation der nativen Fragmente N und E von den beiden einfach mutierten Peptiden T_{26A} und T_{9A} katalysiert wird [Reaktion (8) und (9) in d)]. Dies führt zu der deutlichen Selektivität für die native Sequenz T [Reaktion (1)–(3), Abb. a)–c)].

[Gl. (5)] ergeben, daß sowohl T_{9A} als auch T_{26A} nicht ihre eigene Synthese katalysieren. Daher ist ein signifikanter Anteil der beobachteten hohen Selektivität bei kompetitiven Kondensationsreaktionen dem nichtlinearen Wachstum des selbstreplizierenden Peptids zuzurechnen;^[6] die linearen Hintergrundreaktionen der mutierten Peptide sind entsprechend zu berücksichtigen.

Wenn man ternäre Komplexe als die katalytisch aktiven Intermediate betrachtet,^[3] dann gibt es für die Reaktionen (1) und (2) jeweils zwei mögliche autokatalytische und zwei katalytische Reaktionswege (Abb. 3). Aus den oben beschriebenen Experimenten ergibt sich, daß die Komplexe b und b' an der autokatalytischen Produktion der einfach mutierten Peptide T_{9A} und T_{26A} nicht beteiligt sind und das Intermediat a für die Selbstreproduktion der nativen Sequenz T verantwortlich ist. Die Rolle der verbleibenden katalytischen Intermediate c und c' sowie d und d' wurde in weiteren Experimenten überprüft. Reaktionen mit äquimolaren Mengen E und N_{26A} [Gl. (6)] oder E_{9A} und N [Gl. (7)] zeigen keine erhöhte Reaktionsgeschwindigkeit, wenn das native Peptid T zugesetzt wird. Daher katalysiert T nicht die Bildung der mutierten Peptide und die Komplexe d und d' tragen nicht zur Bildung von Produkten bei. Die einfach mutierten Peptide T_{9A} und T_{26A} katalysieren die Bildung der nativen Sequenz T [Gl. (8) bzw. (9) und Abb. 2d). Die katalytische Effizienz der mutierten Peptide beträgt dabei etwa 75% der Effizienz der nativen selbstreplizierenden Sequenz T . Dies hat ein Vergleich der Anfangsgeschwindigkeiten in Gegenwart gleicher Mengen Katalysator ergeben. Die beobachtete Selektivität bei den Reaktionen (1) und (2) ist daher das

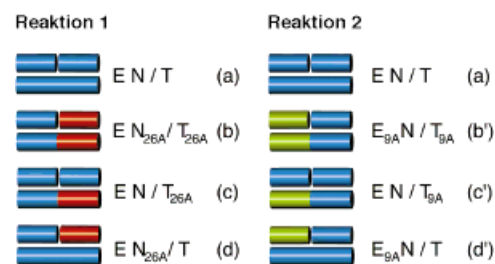


Abb. 3. Schematische Darstellung plausibler ternärer Intermediate der autokatalytischen (a, b und b') und katalytischen (c, c' und d') Produktion von Kondensationsprodukten bei Reaktion (1) und (2). Die ternären Komplexe setzen sich aus einem elektrophilen Peptidfragment (E oder E_{9A}), einem nucleophilen Peptidfragment (N oder N_{26A}) und dem Katalysator (T , T_{9A} oder T_{26A}) zusammen. Die unterschiedlichen α -helicalen Peptide werden durch farbige Zylinder repräsentiert (native Sequenz: blau; E_{9A} und das korrespondierende T_{9A} -Segment: grün; N_{26A} und das korrespondierende T_{26A} -Segment: rot).

Resultat selbstorganisierter, autokatalytischer und katalytischer Cyclen, die zusammen die Produktion der nativen Sequenz T unterstützen (Abb. 4). Bemerkenswert ist die Asymmetrie der katalytischen Komponente: Die mutierten

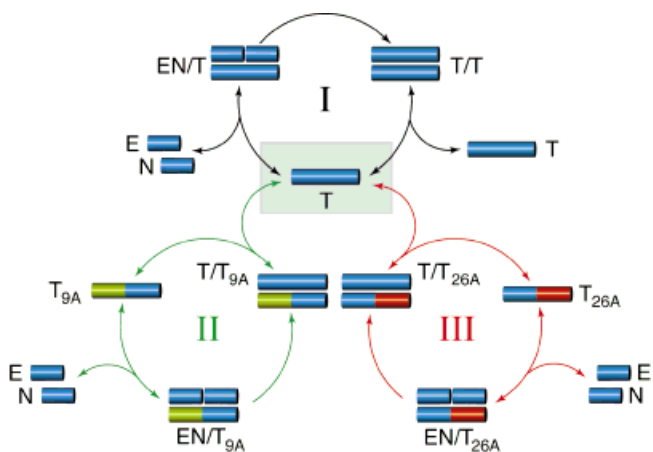


Abb. 4. Peptidfragment-Kondensationen führen zu selbstorganisierten Netzwerken, bestehend aus zwei [Cyclen I und III oder I und II für die Reaktionen (1) und (2)] oder drei [Reaktion (3)] gekoppelten (auto-)katalytischen Cyclen. Diese Netzwerke zeigen einen dynamischen Fehlerkorrektur-Mechanismus: die mutierten Produkte T_{9A} (grün-blau) und T_{26A} (rot-blau) sind zwar „unfruchtbar“, katalysieren aber die Bildung der nativen, selbstreplizierenden Sequenz T (blau).

Peptide T_{9A} und T_{26A} sind in der Lage, die Bildung der nativen Sequenz T zu katalysieren, T hingegen ist „egoistisch“ und beschleunigt nicht die Kondensation der mutierten Fragmente. Dieser ungewöhnliche Effekt kann erklärt werden, wenn man die Stabilität der ternären Komplexe mit der Stabilität der entsprechenden dimeren (selbst-inhibierten) Katalysatoren vergleicht. Bei den Reaktionen (6) und (7) ist der ternäre Komplex wegen Mutationen im hydrophoben Bereich destabilisiert. Daher ist die Konzentration des Intermediates gering und Katalyse wird nicht beobachtet. Bei den Reaktionen (8) und (9) wirkt sich die Mutation jedoch sowohl auf den ternären Komplex als auch auf den dimeren Katalysator

aus. Die daraus resultierende höhere Katalysatorkonzentration kompensiert die geringere Stabilität der katalytisch aktiven Spezies.

Ein selbstorganisiertes Netzwerk dieser Art tritt auch bei Reaktionen mit äquimolaren Mengen aller vier Peptid-Fragmente auf [Gl. (3)]. In diesem Fall ist das doppelt mutierte Peptid $T_{9/26A}$ nicht nur „unfruchtbar“, sondern auch katalytisch inaktiv [Gl. (10)]. Das System bildet hier ein Netzwerk aus drei gekoppelten katalytischen Cyclen und zeigt einen ähnlichen Mechanismus zur Fehlerkorrektur: Jedes Mal, wenn ein mutiertes Peptid gebildet wird, wirkt es als effizienter Katalysator für die Produktion mehrerer Kopien der nativen Sequenz. Da aber die katalytischen Cyclen mit dem autokatalytischen Cyclen gekoppelt sind, bewirkt jedes auf diese Art synthetisierte Templat eine zusätzliche Verstärkung des autokatalytischen Reaktionswegs (Abb. 4). Der Gesamteffekt ist eine signifikant schnellere Produktion des nativen Peptids **T**. Dies führt zu der bei den Reaktionen (1)–(3) beobachteten Selektivität (Abb. 2a–c).

Die hier beschriebenen, auf Peptiden basierenden Systeme, sind erste Beispiele für selbstorganisierte chemische Netzwerke mit Charakteristika, die essentiell für Evolution sind: sequenzselektive Reproduktion und dynamische Fehlerkorrektur. Darüber hinaus zeigen diese Resultate, daß kurze Peptide vielversprechende Bausteine für komplexe, nicht-lineare Systeme sind. Dies könnte letztlich zur Konstruktion und zum Verständnis von molekularen Ökosystemen führen.^[7]

Experimentelles

Alle Peptide wurden durch standardisierte Festphasen-Peptidsynthese mit *tert*-Butyloxycarbonyl(Boc)-Aminosäuren hergestellt. Die Synthese der elektrophilen Peptidfragmente erfolgte nach einem bereits beschriebenen Verfahren.^[3] Alle Reaktionen wurden in 0.6 mL-Eppendorf-Gefäßen unter Kontrolle der Temperatur ($21.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$) durchgeführt. Eine entgaste, mit Benzylthiol gesättigte Lösung mit 3-(*N*-Morpholino)-propansulfonsäure (MOPS)-Puffer (pH 7.5), dem nucleophilen Peptidfragment N_x und dem internen Standard 4-Acetamidobenzoessäure (ABS) wurde 15 min inkubiert. Reaktionen wurden dann durch Zugabe einer Lösung des elektrophilen Peptidfragments E_y gestartet. Das Gesamtvolumen betrug 500 μL . Typischerweise wurden folgende Konzentrationen erhalten: $N_x = E_y = 180\text{--}200\ \mu\text{M}$, MOPS = 140 mM, ABS = 100 μM . Peptidfragment-Kondensationen in Gegenwart von Guanidinium(Gnd) wurden wie oben beschrieben durchgeführt, nur daß der MOPS-Puffer mit Gnd verwendet wurde. Um die Beiträge (auto)katalytischer Reaktionswege zu ermitteln wurden Kontrollexperimente mit 15–40% Katalysator durchgeführt. Alle Versuche wurden zweimal wiederholt. Proben (35 μL) wurden dem Reaktionsgefäß zu verschiedenen Zeiten entnommen, sofort mit 2proz. Trifluoressigsäure gequench und bis zur HPLC-Analyse bei -78°C gelagert. Die Konzentrationen der Peptide wurden relativ zum internen Standard ermittelt.

Eingegangen am 6. Juni 1997 [Z10517]

Stichwörter: Autokatalyse • Fehlerkorrektur • Netzwerke • Peptide • Selbstreplikation

[1] a) M. Eigen, P. Schuster, *Naturwissenschaften* **1971**, 58, 465; b) B.-O. Küppers, *Information and the Origin of Life*, MIT Press, Cambridge, MA, USA, **1990**; c) S. A. Kauffman, *The Origins of Order*, Oxford Univ. Press, New York, **1993**.

[2] a) Ein hypercyclisches Peptid-Netzwerk mit Symbiose zwischen ansonsten konkurrierenden selbstreplizierenden Peptiden: D. H. Lee, K.

Severin, Y. Yokobayashi, M. R. Ghadiri, *Nature* **1997**, 390, 591–594; b) Nucleotid-Oligomere mit kreuzkatalytischem Verhalten: D. Sievers, G. von Kiedrowski, *ibid.* **1994**, 369, 221–224; c) synthetische Strukturen mit kooperativem Verhalten: J.-I. Hong, Q. Feng, V. Rotello, J. Rebek, Jr., *Science* **1992**, 255, 848–850.

[3] a) D. H. Lee, J. R. Granja, J. A. Martinez, K. Severin, M. R. Ghadiri, *Nature* **1996**, 382, 525–528; b) K. Severin, D. H. Lee, J. A. Martinez, M. R. Ghadiri, *Chem. Eur. J.* **1997**, 3, 1017–1024.

[4] Schon früher war gezeigt worden, daß starke Mutationen wie etwa Glutaminsäure im komplementären hydrophoben Bereich eine templatgesteuerte Katalyse verhindert.^[3] Siehe auch: J. C. Hu, E. K. O'Shea, P. S. Kim, R. T. Sauer, *Science* **1990**, 250, 1400–1403.

[5] M. Eigen, P. Schuster, *The Hypercycle. A Principle of Natural Self-Organization*, Springer, Berlin, **1979**.

[6] Ein charakteristisches Zeichen effizienter autokatalytischer Prozesse ist eine sigmoide Wachstumskurve. Dieses Merkmal zeigen die Reaktionen (1)–(3) deutlich (Abb. 1).

[7] D. H. Lee, K. Severin, M. R. Ghadiri, *Curr. Opin. Chem. Biol.* im Druck.

(NH₄)₂Ge₇O₁₅: ein mikroporöser Festkörper mit GeO₄- und GeO₆-Polyedern in Neunerringen**

C. Cascales, E. Gutiérrez-Puebla, M. A. Monge* und C. Ruíz-Valero

Kristalline mikroporöse Festkörper werden in der Katalyse, als Ionenaustauscher und als Adsorbentien häufig verwendet. Seit der Entdeckung der Zeolithe sind viele natürliche und synthetische Zeolithe,^[1–7] Silicapolymermorphie, auf Aluminiumphosphat basierende Molekularsiebe^[8–11] und mikroporöse, aus MO₄-Tetraedern bestehende Verbindungen synthetisiert worden, in denen die Zentren M nicht Aluminium oder Silicium sind.^[12]

Wie Silicium-, so sind auch Germaniumatome von Sauerstoff häufig tetraedrisch koordiniert und die Tetraeder über gemeinsame Ecken zu größeren Einheiten verbunden. Tatsächlich gibt es auch isomorphe Verbindungen der beiden Elemente. In zeolithartigen Germaniumverbindungen kann das Gerüst allerdings aus GeO₄-Tetraedern, GeO₆-Oktaedern und manchmal auch aus trigonalen GeO₅-Bipyramiden bestehen.^[13] Aus diesem Grund ist es überraschend, daß nur wenige mikroporöse Germanate bekannt sind. Unseres Wissens wurden nur Verbindungen des Typs $M_{3+x}H_{1-x}Ge_7O_{16} \cdot nH_2O$ (M = einwertiges Kation), die Pharmacosiderit-artige Strukturen aufweisen, vollständig charakterisiert. Erhalten werden sie aus den Verbindungen $(NH_4)_3HGe_7O_{16} \cdot nH_2O$,^[13–20] $[Ge_6O_{12}(OH)][N(CH_3)_4]^{+2[1]}$ und $[Ge_{18}O_{38}(OH)_4]^{8-}[(C_2N_2H_{10})^{2+}]_4$ durch Ionenaustausch.^[22] Alle haben Zeolith-Gerüste und weisen viele Eigenschaften von Zeolithen auf.

[*] Dr. A. M. Monge, Dr. C. Cascales, Dr. E. Gutiérrez Puebla, Dr. C. Ruíz-Valero
Instituto de Ciencia de Materiales de Madrid, CSIC
Cantoblanco, E-28049 Madrid (Spanien)
Telefax: Int. + 1/3720623
E-mail: nines@immmx1.icmm.csic.es

[**] Diese Arbeit wurde von der spanischen Dirección General de Investigación Científica y Técnica (DGICYT) (Projekt PB94-0031) gefördert.