

# Zitronensäure und die RNA-Welt\*\*

Ulrich F. Müller\* und Yitzhak Tor\*

Lipidvesikel · Präbiotische Chemie · Ribozyme ·  
Ursprung des Lebens · Zitronensäure

Wie entstand die erste Lebensform? Diese grundsätzliche Frage, die Philosophen und Wissenschaftler gleichermaßen fasziniert, wird höchstwahrscheinlich unbeantwortet bleiben. Die meisten Wissenschaftler nehmen an, dass die heutigen Lebensformen der Erde auf der Erde entstanden sind – aber wie? Um die Chemie der ersten Lebensformen zu bestimmen, könnte man im Prinzip Sedimente untersuchen, die die ersten Anzeichen für Leben vor über 3.4 Milliarden Jahren enthalten könnten.<sup>[1]</sup> Doch nur ein kleiner Teil der Erdoberfläche ist der starken Metamorphose seitdem entgangen, und die meisten der frühen Biomoleküle haben sich zersetzt. Forscher haben deshalb versucht, allgemeine Prinzipien zu ermitteln, die wahrscheinlich die Entstehung des Lebens, wie wir es kennen, lenkten, und sie Bedingungen unterworfen, die vermutlich auf der frühen Erde geherrscht haben. Die erwarteten Ergebnisse könnten einige Fragen beantworten, wie: Gab es nur wenige oder viele unterschiedliche chemische Möglichkeiten für die Entstehung des Lebens? Wäre unter den richtigen Bedingungen die Entstehung des Lebens ein unwahrscheinliches Phänomen oder würde Leben zwangsläufig entstehen?

Was sind die allgemeinen Prinzipien, die die Entstehung des Lebens lenkten, und können sie durch heutige Forschung ermittelt werden? Lebensformen können als selbstreplizierende Molekülsysteme definiert werden, die einer Evolution mit offenem Ausgang zugänglich sind. Dies erfordert ein genetisches Polymer, das während der Evolution Informationen speichern und nützliche Mutationen akkumulieren kann (was heute die DNA macht), im Genom codierte Katalysatoren, die Selbstreplikation ermöglichen (heute tun das die Proteine), und eine Abgrenzung zwischen Selbst und Nichtselbst, um Individuen abzugrenzen und Evolution zu ermöglichen (heute sind das die Zellmembranen). Die Herausforderung liegt darin, chemische Systeme zu finden, die all diese Merkmale aufweisen und die in der frühen Erdumgebung entstanden sein könnten. Allerdings ist relativ wenig über die

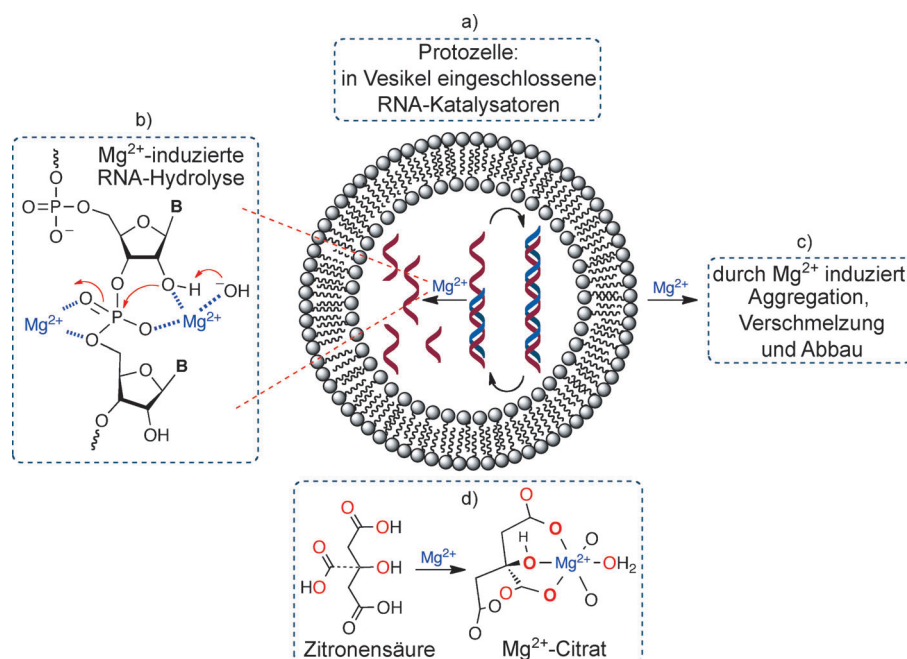
frühe Erdumgebung bekannt. In der Erdatmosphäre dominierte damals Stickstoff, fehlte Sauerstoff und waren viele andere Gase enthalten (z.B. Methan und Ammoniak). Das ermöglichte ganz andere Reaktionen als die heutige sauerstoffreiche Atmosphäre, darunter die Synthese von Aminosäuren.<sup>[2]</sup> Wir wissen außerdem nicht, wo auf der Erde sich die frühesten Lebensformen entwickelten. Chemiker müssen daher nur einige grundsätzliche Grenzen berücksichtigen, wenn sie die Bedingungen bei der Bildung frühen Lebens im Labor zu imitieren versuchen.

Welche Moleküle könnten zu den frühesten Urlebensformen geführt haben? Anders gesagt, wie könnten heutige Organismen aus einer präbiotischen Suppe entstanden sein, wenn die Replikation der jetzigen DNA von Protein-Enzymen abhängt und die jetzigen Proteine für ihre Genominformation von der DNA abhängen? Dieses Huhn-Ei-Problem wurde bekanntlich durch die Annahme einer RNA-Welt gelöst,<sup>[3]</sup> die sich auf RNA-Moleküle stützt, die nicht nur genetische Information speichern (durch die Anordnung der Nucleotide in Polymerform), sondern auch Reaktionen katalysieren. Auch wenn möglicherweise der RNA ein anderes Polymer vorausging, das ihre Funktion erfüllte,<sup>[4]</sup> wird die RNA-Welt-Hypothese an sich durch mehrere unabhängige Beobachtungen bei heutigen Organismen gestützt (z.B. RNA-Katalyse und RNA-katalysierte Proteinsynthese, auf Nucleotiden basierende Protein-Cofaktoren, Biosynthese von Desoxynucleotiden aus Ribonucleotiden)<sup>[5]</sup> und durch in vitro selektionierte katalytische RNAs, die viele chemische Reaktionen, die einen Metabolismus tragen könnten, katalysieren.<sup>[6]</sup>

Um einen Organismus der RNA-Welt im Reagenzglas nachzubilden, ist das Ziel, ein selbstreplizierendes und evolvierendes Set katalytischer RNAs (Ribozyme) zu finden, die in Lipidvesikel eingekapselt sind (Abbildung 1a). Die Einkapselung ist aus zwei Gründen erforderlich: 1) Sie bildet eine Abgrenzung zwischen Selbst und Nichtselbst, die notwendig ist, um parasitäre Moleküle fernzuhalten und um die Darwinsche Evolution zu ermöglichen. 2) Sie ermöglicht, dass der Organismus der RNA-Welt kleine Moleküle enthält und die Früchte seiner Stoffwechselprozesse erntet. Fettsäuren, die sich zu Lipidvesikeln mit Doppellipidmembran zusammenfügen können, könnten in einer präbiotischen Umgebung durch Fischer-Tropsch-Synthese in hydrothermalen Schloten erzeugt worden sein und gelangten wahrscheinlich auch durch Meteorite auf die präbiotische Erde.<sup>[7]</sup> Es wurde nachgewiesen, dass Fettsäurevesikel im Labor unter präbiotisch plausiblen Bedingungen wachsen und sich teilen<sup>[8]</sup> –

[\*] Prof. U. F. Müller, Prof. Y. Tor  
Chemistry and Biochemistry  
University of California San Diego  
La Jolla, CA 92093 (USA)  
E-Mail: ufmuller@ucsd.edu  
ytor@ucsd.edu

[\*\*] Wir danken der National Aeronautics and Space Administration (ROSES-Stipendium NNX13AJ09G für U.M.) und den National Institutes of Health (GM069773 für Y.T.) für die Unterstützung sowie Dr. Andro C. Rios für die kritischen Anmerkungen zu diesem Manuskript.



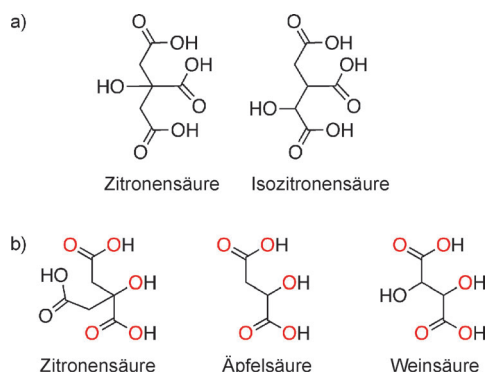
**Abbildung 1.** a) Protozelle, schematisch dargestellt als Set selbstreplizierender RNAs, die in ein Lipidvesikel eingekapselt sind. b)  $Mg^{2+}$ -Ionen können den RNA-Abbau über verschiedene Mechanismen katalysieren, darunter Aktivierung der Phosphatgruppe und der 2'-Hydroxygruppe. Die Endprodukte dieser Reaktion sind ein 2',3'-cyclisches Phosphat und eine freigesetzte 5'-Hydroxygruppe; es erfolgt Strangspaltung. c)  $Mg^{2+}$ -Ionen können durch Wechselwirkung mit den Carboxylatgruppen auch Vesikel zerstören. d) Struktur von Zitronensäure und Struktur der inneren  $Mg^{2+}$ -Koordinationssphäre in der Kristallstruktur von Magnesiumcitrat. In dieser hochvernetzten Struktur wechselwirken alle Carboxylatgruppen mit dem  $Mg^{2+}$ -Ion; es bleibt ein potenziell labiles koordinierendes Wassermolekül übrig (Lit. [11]).

womit ein entscheidendes Puzzlestück gefunden war. Dagegen sind die präbiotischen Synthesen von Ribonucleotiden und Oligoribonucleotiden aus einem präbiotisch plausiblen Gemisch von Verbindungen viel schwieriger und leiden unter begrenzter Regio- und Stereoselektivität und schädlichen Nebenreaktionen.<sup>[9]</sup> In den letzten Jahren wurden hier Fortschritte erzielt, z. B. in Richtung einer präbiotisch plausiblen Synthese von Nucleotiden, einer ribozymkatalysierten Umwandlung der 5'-Hydroxygruppen von RNA in 5'-Triphosphate und der ribozymkatalysierten Polymerisation von Nucleosidtriphosphaten zu RNA.<sup>[10]</sup> Es ist jedoch anzumerken, dass es neben der Ermittlung geeigneter Lipidvesikel und Sets selbstreplizierender RNA schwierig bleibt, Bedingungen herauszufinden, unter denen beide Systeme nebeneinander bestehen und zusammenwirken.

Ein großes Dilemma und ein Hindernis auf dem Weg zur Nachbildung eines Organismus der RNA-Welt sind zweiwertige Metallionen (z. B.  $Mg^{2+}$ ). Einerseits sind sie für die meisten Ribozyme in hoher Konzentration erforderlich. Andererseits können zweiwertige Metallionen zur Fragmentierung von RNA und zur Aggregation von Lipiden führen, wodurch beide in der RNA-Welt funktionsunfähig werden (Abbildung 1b,c). Eine neuere Studie von Adamala and Szostak<sup>[11]</sup> zeigte, dass beide Probleme durch Zitronensäure behoben werden könnten: Citrat bildet mit  $Mg^{2+}$ -Ionen Chelate mit einer genügend hohen Affinität, um den RNA-Abbau und die Lipidaggregation erheblich zu verringern, während freie Koordinationsstellen verbleiben, die für produktive Wechselwirkungen mit RNA notwendig sind (Abbildung 1d). In der Studie wurde konkret die templatge-

steuerte nichtenzymatische Polymerisation von Nucleotiden untersucht, die als 5'-(2-Methylimidazolid) in Vesikeln auf Lipidbasis aktiviert waren. Konzentrationen der  $Mg^{2+}$ -Ionen von 50 mM, die normalerweise für Lipidvesikel schädlich sind, wurden von ihnen toleriert, wenn das Citrat in einer Konzentration von 200 mM vorlag. Die gleichen Bedingungen ermöglichten auch die nichtenzymatische RNA-Polymerisation im Innern der Vesikel. Faszinierend war, dass Isocitrat die Vesikel weniger wirksam schützte als Citrat. Andere Chelatbildner wie Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) oder Nitrilotriessigsäure (NTA) schützten zwar die Vesikel, ermöglichten jedoch keine RNA-Polymerisation. Darüber hinaus verringerte Citrat die Geschwindigkeit der magnesiuminduzierten RNA-Fragmentierung pro Nucleotid um den Faktor 10. Citrat scheint somit unter den Chelatbildnern eine günstige Kombination von Stabilitätskonstanten und Koordinationseigenschaften aufzuweisen, was es im Hinblick auf Organismen der RNA-Welt besonders geeignet macht.

Was ist so besonders an Citrat im Vergleich zu Isocitrat, seinem Konstitutionsisomer, was das Vermögen zur koordinativen Bindung von  $Mg^{2+}$ -Ionen angeht (Abbildung 2a)? Obwohl die drei  $pK_a$ -Werte, die für diese beiden Tricarbonsäuren veröffentlicht wurden, im Wesentlichen übereinstimmen, deuten Messungen der Stabilitätskonstanten darauf hin, dass Citrat eine viel höhere Affinität zu  $Mg^{2+}$ -Ionen hat als Isocitrat (ca. zehnfache Affinität).<sup>[12]</sup> Das spiegelt wahrscheinlich die ziemlich optimale Koordinationsgeometrie wider, die mit dem *meso*-Citrat, aber nicht mit dem asymmetrischen Isocitrat erreichbar ist (Abbildung 1d, 2a). Vermutlich wegen seines geringeren Chelatisierungsvermögens



**Abbildung 2.** a) Strukturen von Zitronen- und Isozitronensäure. b) Die Struktur von Zitronensäure ist neben den Strukturen von Äpfel- und Weinsäure gezeigt, um deren Ähnlichkeit und das Vorliegen funktionaler Gruppen, die  $Mg^{2+}$ -Ionen koordinativ binden können, deutlich zu machen. Zu beachten sind die unterschiedlichen Darstellungsweisen in (a) und (b) sowie in Abbildung 1.

bindet Isocitrat nur einen Teil der  $Mg^{2+}$ -Ionen, wodurch genügend nichtchelatisierte Ionen verbleiben, um Lipidaggregate abzubauen und den Abbau von RNA zu katalysieren.

Welche Citratquellen könnten für frühe Organismen der RNA-Welt verfügbar gewesen sein? Citrat, seine Vorstufen und verwandte Verbindungen könnten von Meteoriten der Erde zugeführt worden sein.<sup>[13]</sup> Der komplette Zitronensäurezyklus oder ähnliche Zyklen könnten sich herausgebildet haben, bevor die ersten selbstreplizierenden genetischen Systeme existierten, doch diese Hypothese bleibt umstritten.<sup>[14]</sup> Stattdessen könnten verwandte, potenziell  $Mg^{2+}$ -Ionen chelatisierende Verbindungen wie Tartrat (Abbildung 2b) durch einfachere präbiotische Prozesse erzeugt worden sein.<sup>[15]</sup> Ineffiziente präbiotische Synthesen derartiger Verbindungen hätten bei Organismen der RNA-Welt einen Auslesedruck in Richtung katalytisch aktiver RNAs erzeugt, die schwierige Schritte in der Synthese solcher Schutzstoffe katalysierten. Auf diese Weise könnten Teile des Zitronensäurezyklus in Organismen der RNA-Welt gewirkt und sich später zu den heutigen, um Zitronensäure zentrierten Metabolismen entwickelt haben.

Was bleibt noch zu tun, um die ersten mutmaßlichen Schritte bei der Entstehung des Lebens zu rekapitulieren? Der Einfluss von Citrat auf die katalytische Funktion von RNAs ist unklar. Es ist wichtig, diesen Einfluss zu ermitteln, da die meisten katalytisch aktiven RNAs von  $Mg^{2+}$ -Ionen abhängig sind und die katalytische Funktion von RNAs für Organismen der RNA-Welt essenziell ist. Außerdem müssen noch vollständige präbiotisch plausible Synthesen von Nucleosiden demonstriert werden. Die ribozymkatalysierte Polymerisation aktivierter Nucleotide ist für die Selbstreplikation noch lange nicht effektiv genug. Zudem ist noch nicht klar, wie die Produkte der RNA-Polymerisation – äußerst stabile RNA-Doppelstränge – sich trennen und neu falten

könnten, um katalytisch aktive RNAs zu ergeben. Die Beobachtungen von Adamala und Szostak legen nahe, dass die Synthese von Citrat oder verwandten Verbindungen zu einem Fitnessgewinn der Organismen der RNA-Welt geführt haben könnte. Diese Synthese könnte den Kern des heutigen, um Citrat zentrierten Metabolismus gebildet haben. Unerwartete Ergebnisse wie die von Adamala und Szostak werden das Gebiet weiter vorantreiben, und vielleicht können wir bald unsere fernen Vorfahren im Labor begrüßen.

Eingegangen am 26. Januar 2014

- [1] D. Wacey, M. R. Kilburn, M. Saunders, J. Cliff, M. D. Brasier, *Nat. Geosci.* **2011**, 4, 698.
- [2] a) S. D. Domagal-Goldman, J. F. Kasting, D. T. Johnston, J. Farquhar, *Earth Planet. Sci. Lett.* **2008**, 269, 29; b) E. T. Parker, H. J. Cleaves, J. P. Dworkin, D. P. Glavin, M. Callahan, A. Aubrey, A. Lazcano, J. L. Bada, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, 108, 5526.
- [3] a) C. R. Woese, *The Genetic Code the Molecular basis for Genetic Expression. Modern Perspectives in Biology*, Harper & Row, New York, **1967**; b) F. H. C. Crick, *J. Mol. Biol.* **1968**, 38, 367; c) L. E. Orgel, *J. Mol. Biol.* **1968**, 38, 381; d) A. Lazcano, *Hist. Philos. Life Sci.* **2012**, 34, 407.
- [4] a) M. P. Robertson, G. F. Joyce, *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* **2012**, 4, a003608; b) H. Yu, S. Zhang, M. R. Dunn, J. C. Chaput, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 3583.
- [5] a) K. Kruger, P. J. Grabowski, A. J. Zaug, J. Sands, D. E. Gottschling, T. R. Cech, *Cell* **1982**, 31, 147; b) C. Guerrier-Takada, K. Gardiner, T. Marsh, N. Pace, S. Altman, *Cell* **1983**, 35, 849; c) H. F. Noller, V. Hoffarth, L. Zimniak, *Science* **1992**, 256, 1416; d) T. A. Steitz, P. B. Moore, *Trends Biochem. Sci.* **2003**, 28, 411; e) H. B. White III, *J. Mol. Evol.* **1976**, 7, 101; f) G. Sprengel, H. Follmann, *FEBS Lett.* **1981**, 132, 207.
- [6] A. D. Ellington, X. Chen, M. Robertson, A. Syrett, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2009**, 41, 254.
- [7] a) T. M. McCollom, G. Ritter, B. R. Simoneit, *Origins Life Evol. Biospheres* **1999**, 29, 153; b) D. W. Deamer, *Nature* **1985**, 317, 792.
- [8] T. F. Zhu, J. W. Szostak, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 5705.
- [9] a) G. F. Joyce, *Nature* **2002**, 418, 214; b) A. C. Rios, Y. Tor, *Isr. J. Chem.* **2013**, 53, 469.
- [10] a) M. W. Powner, B. Gerland, J. D. Sutherland, *Nature* **2009**, 459, 239; b) M. C. Chen, B. J. Cafferty, I. Mamajanov, I. Gállego, J. Khanam, R. Krishnamurthy, N. V. Hud, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, DOI: 10.1021/ja410124v; c) J. E. Moretti, U. F. Müller, *Nucleic Acids Res.* **2014**, DOI: 10.1093/nar/gkt1405; d) W. K. Johnston, P. J. Unrau, M. S. Lawrence, M. E. Glasner, D. P. Bartel, *Science* **2001**, 292, 1319; e) A. Wochner, J. Attwater, A. Coulson, P. Holliger, *Science* **2011**, 332, 209.
- [11] K. Adamala, J. W. Szostak, *Science* **2013**, 342, 1098.
- [12] J. M. Blair, *Eur. J. Biochem.* **1969**, 8, 287.
- [13] G. Cooper, C. Reed, D. Nguyen, M. Carter, Y. Wang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, 108, 14015.
- [14] a) G. Wächtershäuser, *J. Theor. Biol.* **1997**, 187, 483; b) F. A. Anet, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, 8, 654.
- [15] C. Butch, E. D. Cope, P. Pollet, L. Gelbaum, R. Krishnamurthy, C. L. Liotta, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 13440.