

imb

J E N A

**Institut für
Molekulare Biotechnologie**

Antrittsvorlesungen 1994

an der Friedrich-Schiller-Universität Jena

Vorwort	Se
Einführung des Dekans	
Vorstellung des IMB durch Prof. Schuster	
Peter Schuster, Biophysikalische Chemie: Was können die molekularen Wissenschaften zur Evolutionsbiologie beitragen? Antrittsvorlesung am 31. Mai 1994	1
John McCaskill, Theoretische Biochemie: Ursprünge der molekularen Kooperation: Theorie und Experiment Antrittsvorlesung am 31. Mai 1994	2
Larry R. Brown, Molekulare Biophysik: Betrachtung der Struktur, Dynamik und Funktion biologischer Makromoleküle mittels kernmagnetischer Resonanzspektroskopie Antrittsvorlesung am 6. Juni 1994	4
Rolf Hilgenfeld, Biochemische Strukturforschung: Vom Proteinkristall zum Arzneimittel Antrittsvorlesung am 6. Juni 1994	5
Stephan Diekmann, Biophysikalische Chemie: Struktur-Funktions-Beziehung von Biomolekülen Antrittsvorlesung am 7. Juni 1994	7
Frank Große, Biophysik: Genauigkeit der DNA-Replikation Antrittsvorlesung am 7. Juni 1994	7
Karl-Otto Greulich, Biophysik: Laser-Mikrobearbeitung biologischer Objekte Antrittsvorlesung am 16. Juni 1994	8
André Rosenthal, Molekularbiologie: Vom Gen zur Krankheit Antrittsvorlesung am 16. Juni 1994	9

Vorwort

Die acht Abteilungsleiter des Instituts für Molekulare Biotechnologie auf dem Beutenberg in Jena sind gleichzeitig Professoren an der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena. Sie wurden in der ersten Hälfte des Jahres 1992 von einer gemeinsamen Kommission beider Einrichtungen, bestehend aus Vertretern der FSU, dem Gründungskomitee und dem Gründungsdirektor des IMB, ausgewählt und von Fakultätsrat und Senat der Universität zur Berufung vorgeschlagen. Die Berufungsverfahren konnten in den Jahren 1992 und 1993 mit unterschiedlicher Geschwindigkeit zu einem positiven Ende geführt werden. Im Jahre 1994 stand dann die Leitungsmannschaft des IMB im wesentlichen fest. Es war damit auch der Zeitpunkt gekommen, das Institut mit seinen Forscherpersönlichkeiten und ihren mannigfaltigen wissenschaftlichen Interessen und Aktivitäten der Fakultät, der Universität und darüber hinaus allen Interessierten vorzustellen. Um einerseits die Zuhörer nicht zu sehr zu ermüden, andererseits aber auch das Institut als ein zusammengehöriges Ganzes erscheinen zu lassen, wurden die acht Antrittsvorlesungen an vier Nachmittagen, am 31.05., 06.06., 07.06. und 16.06.1994 angesetzt. In dem vorliegenden Büchlein legen wir diese vier Veranstaltungen in zusammenfassender Form vor.

Die Fertigstellung dieser Broschüre ist für mich auch ein willkommener Anlaß, der Friedrich-Schiller-Universität, ihren beiden Rektoren Ernst Schmutzer und Georg Machnik, den beiden für unsere Angelegenheiten zuständigen Prorektoren Gerd Wechsung und Lutz Wenke, aber auch unserer Fakultät, dem Fakultätsrat und allen voran unserem Dekan Eberhard Müller, dem Kanzler Klaus Kübel und den anderen beteiligten Institutionen und Personen, insbesondere den beiden Zuwendungsgebern, dem Thüringer Minister für Wissenschaft und Kunst und dem Bundesminister für Forschung und Technologie, und allen ihren so einsatzfreudigen Beamten recht herzlich zu danken. Sie haben durch ihre Unterstützung und ihren Einsatz den erfolgreichen Abschluß der Berufungsverfahren ermöglicht und darüber hinaus zu einem vorbildlichen wunderbaren Klima der Zusammenarbeit zwischen den Ministerien, der Universität und der außeruniversitären Forschung beigetragen.

Jena, 20.10.1995

Peter Schuster

Impressum**Herausgeber:**

Peter Schuster
Institut für Molekulare Biotechnologie e.V.

Beutenbergstraße 11,
D-07745 Jena, Deutschland

Postanschrift:
Postfach 100 813
D-07708 Jena, Deutschland

Tel. 49 (36 41) 65 64 44
Fax 49 (36 41) 65 64 46

Layout, Satz und Litho:
mediaart studio koch & partner, Jena
Druck: Liebeskind Druck, Apolda

Vorstellung von Herrn Professor Dr. John Simpson M^cCaskill

Ich habe nun die besonders freudige Aufgabe, Ihnen nach der Antrittsvorlesung des ältesten Abteilungsleiters unseres Instituts den jüngsten Professor vorzustellen. Herr John M^cCaskill wurde am 07.06.1957 in Sydney, Australien, geboren, hat dort die High-School besucht und im Jahre 1977 einen Konservatoriumsabschluß für Klavier erworben. An der Sydney University studierte er Chemie und erwarb dort den Bachelor of Science with Honors. Dann wechselte er nach England an die hochberühmte und traditionsreiche Oxford University, wo er im Jahre 1983, also im Alter von nur 26 Jahren, den Dr.phil. mit einer Doktorarbeit auf dem Gebiet der Theoretischen Chemie erwarb. Zahlreiche Preise und Auszeichnungen begleiteten sein Studium. Herr M^cCaskill wechselte dann, schon gegen Ende seiner Doktorarbeit, in die Abteilung des Nobelpreisträgers Manfred Eigen, wo er seine Post-Doc-Jahre verbrachte. Wir haben uns dort kennengelernt, und ich war von Anfang an zutiefst beeindruckt von seiner Kreativität, seinen unkonventionellen Problemlösungsmethoden und seinem scharfen analytischen Geist. In diesem ersten Jahr führte er wichtige Arbeiten im Rahmen des Eigenschen Quasispieziesmodells durch.

Als Otto-Hahn-Preisträger verbrachte Herr M^cCaskill ein halbes Jahr bei Professor Zimm an der University of California San Diego und widmete sich dort dem RNA-Faltungsproblem. Nach zwei anschließenden Jahren als Queen Elizabeth Research Fellow an der University of Sydney kehrte er wieder nach Göttingen zurück, wo er dann in den Jahren 1987 bis 1992 eine Nachwuchsgruppe für Theoretische Biologie am Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie leitete.

In seinen etwa dreißig Publikationen befaßt sich Herr M^cCaskill mit Fragen der Struktur und der Evolution von RNA-Molekülen. Besonders hervorzuheben sind seine theoretischen und experimentellen Untersuchungen über die Evolution von RNA-Molekülen in wandernden Wellen, in welchen er der molekularen Evolution eine neue Dimension, die Dimension des Raumes erschloß.

Diese Arbeiten haben ihm unter anderem im Jahre 1992 auch die hohe Auszeichnung der Verleihung des Haber-Preises der Deutschen Bunsengesellschaft eingetragen.



John Simpson M^cCaskill, Theoretische Biochemie

Ursprünge der molekularen Kooperation: Theorie und Experiment

Antrittsvorlesung am 31. Mai 1994

Inhalt

1. Molekulare Kooperation
2. Räumliche Kooperationsmodelle
3. Räumlich aufgelöste Evolutionsexperimente in vitro
4. Künstliche molekulare Kooperation
5. Zusammenfassung und Ausblick

Eine der großen Blütezeiten des Geistes in Jena, die Zeit unseres Universitätspatrons Schiller in seinem Austausch mit Goethe, war auch das Zeitalter, in dem der Botaniker Joseph Banks mit Captain Cook um die Welt segelte bis hin ins *Terra Australis*, um die Diversität der Blüten zu erforschen¹. Die wunderbare Vielfalt des Lebens und seine inneren Gesetzmäßigkeiten haben seitdem acht Generationen von Naturwissenschaftlern immer aufs neue begeistert. Der ideale Bezug zur Natur der Romantik scheint jedoch dem heutigen Biologen fern. Dazwischen liegen Monods „Zufall und Notwendigkeit“² und Dawkins „Selfish Gene“³ als Interpretationen der Darwinischen Theorie. Wiederum acht Generationen vor Darwin hat Hobbes⁴ (wie Axelrod bemerkte⁵) die berühmt gewordene Ansicht vertreten, daß ohne eine zentrale Autorität das Menschenleben „solitary, poor, nasty, brutish and short“ sei. Diese Beschreibung trifft in den Augen vieler Molekularbiologen besonders auf das molekulare Niveau zu, wo kurze RNA-Moleküle⁶ oder sogar Proteine (Prionen⁷) ihre Wirtszellen scheinbar rücksichtslos ausnutzen können. Nichtsdestotrotz ist die Kooperation ein wesentliches Merkmal der Biosphäre. Die Spannung zwischen Kooperation und Ausnutzung prägt scheinbar alle Organismen und Populationen.

In dieser Vorlesung möchte ich versuchen, die neuen theoretischen und experimentellen Möglichkeiten in der Gestaltung und Analyse kooperativer Molekülsysteme vorzustellen. Ich möchte dabei die Gelegenheit nutzen, einige der vielen interdisziplinären Verknüpfungen der neuen Arbeitsgruppe „Molekulare Informationsverarbeitung“ zu beschreiben. Diese Interdisziplinarität hat sowohl technologische als auch konzeptionelle Aspekte, wobei ich die technologischen Aspekte noch einen Moment zurückstellen möchte.

Ich bin der Ansicht, daß molekulare Kooperation und die damit verknüpfte funktionale Differenzierung Hauptthema einer theoretischen Biochemie sein sollte. Wo befindet sich die theoretische Biochemie in der Landschaft von verwandten Fächern? Dem Namen nach liegt sie zwischen theoretischer Biologie und theoretischer Chemie, so wie die Biochemie zwischen Biologie und Chemie

angesiedelt ist. Es wäre irreführend anzunehmen, daß sie ausschließlich die Theorie der Struktur von Biochemikalien und die Kinetik ihrer Reaktionen zum Gegenstand habe. Die Biochemie kann nicht ohne einen Bezug zu Organisationsformen, in denen sich diese Reaktionen abspielen, verstanden werden. Biophysik, Molekularbiologie und Molekulargenetik erfassen jeweils unterschiedliche Aspekte dieser Beziehung. Hier möchte ich jedoch vor allem die Rolle der theoretischen Physik und Informatik bei der Schaffung eines Ansatzes für die theoretische Biochemie hervorheben.

Während seit Haldane, Fisher und Wright die theoretische Populationsbiologie bereits über kohärente Konzeptgerüste und ausbaufähige mathematische Modelle verfügt^{8,9}, hat die Komplexität der zellulären Biochemie lange der Theoriebildung widerstanden. Es war von Neumann, der Vater der seriell programmierbaren Rechner, der vor der Entdeckung der Doppelhelixstruktur von DNA als Physiker die abstrakte Rolle der Informationsverarbeitung für das Leben erkannt hatte. Von Neumann hat ein abstraktes Modell der instruierten Reproduktion mit Hilfe zellulärer Automaten realisiert¹⁰. Im vierten Abschnitt werde ich einen neuen Parallelrechner vorstellen, den wir gebaut haben, um in elektronischer Hardware unterschiedliche Modelle biologischer Informationsverarbeitung zu untersuchen. Die Erkenntnis, daß Information am Kern des Lebens liegt, ließe sich vergleichen mit der Erkenntnis des Neusteinzeitalters, daß der Mensch getöptert wurde; sie sind beide Widerspiegelungen des bedeutendsten Artefaktes der Zeit, des Chips (sei er nun aus Ton oder aus Silizium). Von Neumanns Entwicklung der Spieltheorie¹¹ hat weitere Brücken zwischen Wirtschaftslehre und Ökologie geschlagen, die für die Theorie der Kooperation von Bedeutung sind. Ein treffendes Beispiel hierfür stellt das Gefangenendilemmaspiel dar, das durch die Rechnerturniere von Axelrod⁵ berühmt geworden ist. In den Spielregeln lohnt sich eine Schuldzuweisung besonders im Falle der Kooperation des Mitgefangenen, ist aber auch im Falle einer Beschuldigung des anderen günstiger. Der Gefangene wird jedoch in diesem letzten Fall mehr gestraft als im Falle einer Kooperation von beiden. Die Auszahlungen (z.B. Jahre Gefängnis) für die Strategien Kooperation und „Defektion“ können in einer Matrix erfaßt werden, z.B.

Spieler/Gegner	K	D
K	1/1	5/0
D	0/5	3/3

Das Dilemma besteht darin, daß, obwohl es sich nie lohnt, in einem Zug zu kooperieren, es sich schon lohnt, den Gegner zur Kooperation zu ermutigen. Wenn das zukünftige Verhalten des Mitgefangenen von der Entscheidung des ersten abhängt, kann der erste durch Kooperation einen Vorteil erzielen. Optimale Strategien hängen davon ab, wie oft man mit demselben Gegner konfrontiert wird und ob man in der Lage ist, einen bereits konfrontierten Gegner zu erkennen und sich an sein vorheriges Verhalten zu erinnern.

Auf molekularer Ebene sind wiederholte Begegnungen abhängig von „Random Walks“ oder räumlicher Diffusion. Wichtig für das Nachfolgende ist die Reaktionsdiffusionstheorie, womit Turing in scheinbarem Kontrast zu seiner sonstigen Forschung über die Grundlagen der Berechenbarkeit das biologische Phänomen von räumlicher Musterbildung untersuchte¹² und dabei Mitbegründer des rasch zusammenwachsenden Gebietes der Selbstorganisationstheorie wurde. Das Wechselspiel zwischen zwei diffundierenden chemischen Verbindungen kann in einem chemisch offenen, räumlich ausgedehnten Reaktionsmix zu stationärer und dynamischer Musterbildung führen. Das System partieller Differentialgleichungen:

$$\begin{aligned} \frac{\partial u}{\partial t} &= D_u \nabla^2 u + f(u, v) \\ \frac{\partial v}{\partial t} &= D_v \nabla^2 v + g(u, v) \end{aligned} \quad (1)$$

beschreibt die Raumzeitentwicklung der Konzentrationen $u(x,t)$ und $v(x,t)$ von zwei Spezies U und V mit den Diffusionskoeffizienten D_u und D_v . Wenn die homogene Lösung dieser Gleichungen gegen inhomogene Perturbationen instabil ist, kann es zu einer stationären räumlichen Musterbildung kommen. Die Bedingungen dafür sind über eine lineare Stabilitätsanalyse der stationären Zustände z.B. von Murray¹³ allgemein ausgearbeitet worden.

Ein solches Turing-Muster ist in Abb. 1 gezeigt. Erst in den vergangenen Jahren sind im Labor von de Kepper¹⁴ Turingmuster in einem chemischen System festgestellt worden, obwohl chemische Oszillationen und Wellen sowohl in der Chemie (Belousov-Zhabotinsky-Reaktion¹⁵) als auch in der Biochemie (Glykolyse-Zyklus¹⁶) schon länger bekannt sind. Eine Rückverknüpfung zur Informatik und mit Turings eigenen universalen Maschinen, die auf der Arbeit

von Rössler¹⁷ über chemische Schaltelemente beruht, wurde kürzlich von Hjelmfeldt¹⁸ vorgeschlagen. In meiner Arbeit lege ich im Gegensatz dazu als autokatalytische Reaktion die matrizen-gesteuerte Polymerisation spezifischer RNA- und DNA-Moleküle zugrunde. Diese besondere Reaktion befindet sich an der Grenze zwischen Biologie und Chemie. Die genetischen Eigenschaften der Replikation, Mutation und Selektion sind durch die physikalisch-chemischen Eigenschaften autokatalytischer Polymerisation, Bindungskonstanten und Fließgleichgewichte auf molekularem Niveau verwirklicht. Die Bedingungen für darwinsche Selektion können im Reagenzglas (*in vitro*) erfüllt werden.

Es bestehen immer noch Zweifel an der Lebendigkeit der Viren, weil sie wesentliche Informationen einer Wirtszelle für ihre Replikation benötigen. Spiegelmann hat als erster die autokatalytische Vervielfältigung eines Biopolymers *in vitro* verfolgt¹⁹. Die etwa

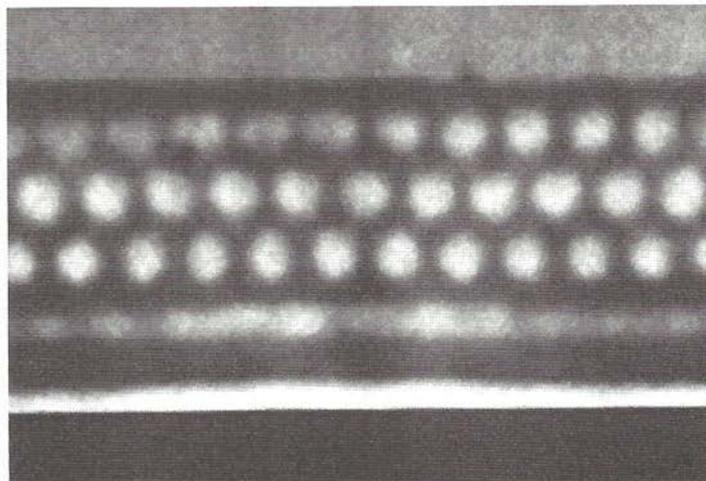


Abb. 1
Turing-Muster in der Chlorid-Jodid-Malonsäure-Reaktion (mit freundlicher Genehmigung von P. de Kepper, vergleiche auch: V. Castets et al. (1990) Phys. Rev. Lett. 64 2953, siehe auch ¹⁴). Die erste experimentelle Bestätigung eines stationären Turing-Musters in einem chemischen System wurde mit Hilfe eines Gelscheibenreaktors erzielt. Dunkle Regionen entsprechen reduziertem Jod, helle Zonen entsprechen oxidiertem Jod.

4000 Basen langen, einzelsträngigen RNA-Genome des *E. coli* anfallenden Q β Virus und der teilweise viral kodierte Polymerase-Enzym-Komplex wurden von infizierten Zellen getrennt isoliert. In Anwesenheit dieser Enzyme und der energiereichen Form der Bausteine des RNA-Polymers (NTPs) beobachtete Spiegelmann ein exponentielles Wachstum der RNA *in vitro*. Durch serielle Transfers eines Teils dieses Reaktionsgemisches in neue Röhren mit frischer Reaktionslösung (ohne RNA) konnte eine Fortpflanzung dieses Wachstums erzielt werden. Im Verlauf von sieben Verdopplungen wurde das ursprüngliche RNA-Molekül auf etwa ein Zwanzigstel verkürzt. Weitere Experimente haben die Anpassung dieser RNA an unterschiedliche chemische Bedingungen (zum Beispiel an den Interkalator Ethidium-Bromid²⁰) gezeigt. Spezifische Replikation und Evolution wurden damit für RNA mit Hilfe eines isolierten Enzyms *in vitro* demonstriert.

Seitdem sind eine Reihe von *in vitro* Amplifikationsreaktionen von DNA und RNA entdeckt worden. Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)²¹ ist wahrscheinlich schon außerhalb der Molekularbiologie in der klinischen Diagnostik für ihre Fähigkeit bekannt, einzelne DNA-Moleküle hochzuverstärken. Mit Hilfe der thermostabilen Taq-Polymerase wird die DNA durch kurze komplementär bindende DNA-„Primers“ initiiert und durch zyklische Änderungen der Temperatur amplifiziert. Für räumlich ausgedehnte Experimente sind jedoch die extremen Temperaturänderungen der PCR (über 60°C) störend, da Vermischung durch Ausdehnung und Kontraktion geschieht. Daher, und um unabhängig von einer externen, zeitlichen Steuerung der Temperatur zu sein, wären isothermale Amplifikationsreaktionen von Interesse. Außer der von Walker entdeckten SDA-Reaktion²², die mit modifizierten Nukleotid-Bausteinen abläuft, sind als Nebenprodukt der AIDS-Forschung die 2SR und 3SR isothermale Amplifikationen²³ entdeckt worden. Hier stehen drei Enzyme, HIV Reverse Transkriptase, T7 RNA Polymerase und wahlweise der RNA-DNA Hybrid Nuklease (Schneideenzym) RNase H, im Wechselspiel bei der Amplifikation von RNA und DNA. Das Schema ist in Abb. 2 gezeigt. Wir werden später dieses Schema für die experimentelle Untersuchung molekularer Kooperation zugrunde legen. Seit der Entdeckung der katalytischen Aktivität gewisser RNA-Moleküle hat Joyce gezeigt²⁴, daß diese Systeme auch eine Evolution von Katalysatoren ermöglichen. Die Erweiterung zur kodierten Amplifikation von Proteinen, und sogar die Kopplung von RNA Amplifikation und Proteinüberset-

zung *in vitro*, ist vor allem durch die Arbeit von Spirin²⁵ in Aussicht gestellt worden. Obwohl man es dann mit hunderten von Bestandteilen des Reaktionsgemisches zu tun hat, wird diese Kopplung letztendlich die Evolution von Polymerasen und einer Vielzahl anderer funktionaler Katalysatoren erlauben.

Worin besteht nun das Problem mit der Kooperation auf molekularem Niveau? Die Funktionalität jedes Moleküls in einem gekoppelten Vervielfältigungsmechanismus ist evolutiv zerlegbar, d.h. die kombinatorische Vielfalt von Varianten und Reaktionsmöglichkeiten machen Kurzschlußmutanten häufig, die zu Gunsten ihrer eigenen Verstärkung auf Kosten des Beitrags zur gesamten Vermehrung wirken. Dies geschieht unter Ausnutzung der übrigen Moleküle des Amplifikationskreises, die letztendlich ausster-

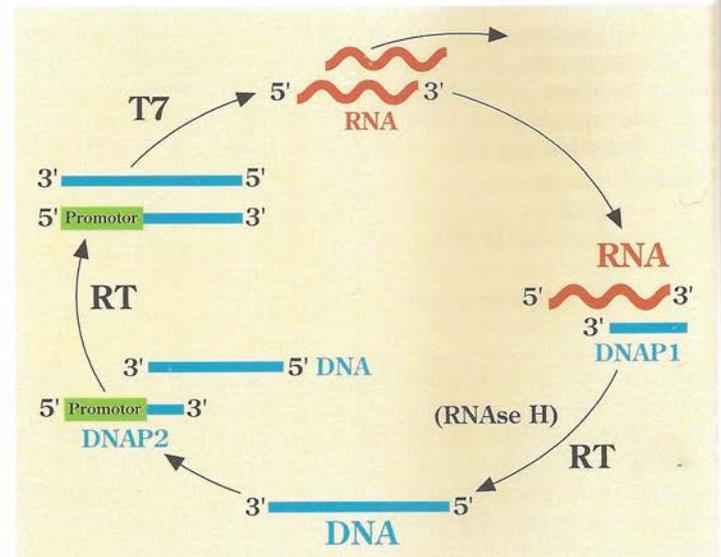


Abb. 2

Schematische Darstellung des 3SR-Reaktionszyklus.

RT = Reverse Transkriptase, T7 = DNA-abhängige RNA-Polymerase von T7-Phagen, — = einzelsträngige DNA, P1 und P2 = Primersequenzen, ~ = RNA.

Transkription von RNA mit Hilfe der T7-Polymerase geschieht hinter einer Promotorsequenz.

ben werden. Wie können größere Bögen der Kooperation im Hinblick auf solcher Kurzschlußmutationen aufrechterhalten werden? Dies ist eine der Hauptfragen auf dem Gebiet der molekularen Kooperation, und, obwohl sie besonders brisant ist im Hinblick auf die Frage nach dem Ursprung des Lebens, macht sie sich heutzutage auf fast allen Ebenen der Biologie bemerkbar.

In den folgenden Abschnitten werde ich versuchen, die verschiedenen Forschungsfäden dieser Einleitung in einer ersten Antwort zusammenzuziehen. In Sektion 2 schauen wir einige Modelluntersuchungen dieser Problematik auf verschiedenen Ebenen der Biologie an. In Sektion 3 zeige ich, wie auf der Basis von isothermalen *in vitro* Amplifikationsschemata eine physikalisch-chemisch charakterisierte experimentelle Prüfung dieser Modelle gestaltet werden kann. In Sektion 4 komme ich zurück auf die Verknüpfung zur Informatik und beschreibe die parallele Entwicklung von Simulationen und elektronischer Hardware. Zum Schluß werde ich versuchen, einige Konsequenzen und Aussichten dieser Untersuchungen zu erörtern.

2. Räumliche Kooperationsmodelle

Das Quasispeziesmodell von Eigen^{26,27} bildet eine physikalisch-chemische Grundlage der *in vitro* Evolutionstheorie. Verdünnung bildet das chemische Äquivalent eines Selektionsdrucks, matrizen-gesteuerte Polymerisation ist das Äquivalent der Replikation und Inkorporationsfehler während der Polymerisation sind das Äquivalent von Mutationen. Ich möchte nur einen Aspekt dieser Theorie hier betonen: unabhängige Vervielfältigung von Molekülen in Kombination mit Verdünnungsfluß führt direkt zum Wettbewerb und zur Selektion derjenigen Biopolymere, die sich am schnellsten replizieren. Aufgrund der endlichen Kopiergenauigkeit ist der eigentliche Gegenstand der Selektion eine Verteilung von verwandten Biopolymersequenzen. Dies verbirgt sich hinter dem Begriff der Quasispezies. Je nach Fehlerrate und statistischer Abhängigkeit der Replikationsrate von der Sequenz wird diese Verteilung sich mehr oder weniger lokalisiert um eine einzige Sequenz bilden²⁸. Die Genauigkeit der chemischen Erkennung von Nukleotiden setzt eine Grenze der Kopiergenauigkeit fest, was wiederum eine Maximalgrenze von etwa 100 Nukleotiden für die Länge von Biopolymeren festsetzt, die enzymfrei kopiert werden können. Diese Menge ist zu klein, um z.B. eine Übersetzungsapparatur für Proteine zu etablieren²⁶.

Bei höheren Konzentrationen können Bindungsreaktionen, deren Raten proportional zu dem Produkt der Konzentrationen der beteiligten chemischen Spezies sind, eine Rolle spielen. Zum Beispiel die spezifische Haftung von komplementären Sequenzen wird beim Q β -System bei höheren Konzentrationen wichtig²⁹. Solche konzentrationsabhängigen Effekte führen zur Koexistenz unterschiedlicher Sequenzen. Epstein hat dieses Phänomen ausführlich studiert³⁰. Anderson und Stein haben Selbstunterdrückung als wesentlichen Bestandteil ihres Modells³¹ für den Ursprung des Lebens vorgeschlagen. Außer einfacher Selbstinhibition durch Haftung hat Epstein Replikationsvorgänge untersucht, die durch eine Vielzahl von unterschiedlichen Enzymen katalysiert sind. Bei höherer Konzentration ist die Durchsatzrate von jedem Enzym begrenzt (Michaelis-Menten-Kinetik), und die verschiedenen Enzyme bilden unterschiedliche Nischen für die sich replizierenden Spezies. Epstein und vor ihm Tyson³² haben zuerst die Verbindung von Eigens Theorie mit der theoretischen Ökologie forciert.

Daß Konzentrationseffekte für die Koexistenz wichtig sind, ist am besten im Rahmen der Räuber-Beute Modelle der Populationsökologie bekannt. Bei niedriger Konzentration der Beute kann das Raubtier seine Beute nur schwer finden. Lotka und Volterra³³ haben für diesen Vorgang dieselbe Kinetik wie beim Massenwirkungsgesetz gewählt:

$$\begin{aligned} \frac{\partial u}{\partial t} &= -auv + ku(1-u) && \text{Beute} \\ \frac{\partial v}{\partial t} &= buv - \gamma v && \text{Räuber} \end{aligned} \quad (2)$$

wo a, b, k, γ Ratenkoeffizienten für die verschiedenen Vorgänge der Vermehrung und Zerstörung sind. Das System zeigt Oszillationen, die ohne die eingeführte logistische Selbstbegrenzung der Beutepopulation divergieren. Diese Kinetik gilt auch in dem einfachsten Modell der Wirt-Parasit-Populationen. Weil Diffusion eine der einfachsten Annahmen für die Bewegung von Individuen ist, wurde auch dieses Modell in Form der Reaktions-Diffusions-Gleichungen von Turing untersucht:

$$\begin{aligned} \frac{\partial u}{\partial t} &= D_u \nabla^2 u - auv + ku(1-u) && \text{Beute} \\ \frac{\partial v}{\partial t} &= D_v \nabla^2 v + buv - \gamma v && \text{Räuber} \end{aligned} \quad (3)$$

Diese Gleichungen weisen ein Parameterregime auf, in dem dynamische Clusterbildung die Koexistenz der beiden Spezies ermöglicht³⁴. Was passiert, wenn die Spezies evolvieren können? Die Frage ist interessant, weil diese Systeme als Vorstufe zu eigentlicher Kooperation betrachtet werden können. Eine gezielte Reduktion der Pathogenität oder des Ausrottungspotentials eines Räubers wirkt altruistisch im Kontext der Konkurrenz unter Zeitgenossen. Im folgenden werden wir Systeme beschreiben, die dieses Verhalten *in vitro* auf molekularer Ebene zeigen.

Wenn zwei Beutespezies, die miteinander um die Reproduktion konkurrieren, von einem Räuber verfolgt werden, kann es in räumlich aufgeteilten Systemen dazu führen, daß beide Beutespezies mit dem Räuber in unterschiedlichen Bereichen koexistieren³⁵. Dies ist ein ökologisches Beispiel für ein Turingmuster und kann als Schaffung einer zusätzlichen Nische durch die Beute verstanden werden. Wenn die Parameter frei evolvieren, kann es zu einer Verminderung der negativen Effekte der Wechselwirkung kommen (der Parameter a sinkt relativ zu b in (3)). Bei Wirt-Viren-Systemen zum Beispiel wirkt das als Verringerung der Virulenz – ein durchaus kooperativer Effekt. Hillis, bereits der dritte Rechnerarchitekt, der in dieser Vorlesung Erwähnung findet, hat bereits eine koevolutionäre Eskalation ausgenutzt, um effiziente Sortierprogramme mit Hilfe der schnelleren Vermehrung von schwer sortierbaren Zeichenketten zu evolvieren³⁶.

Spezifische, positive Kopplungen wurden von Eigen und Schuster³⁷ untersucht. Es wurde gezeigt, daß allein zyklische, katalytische Beschleunigungen eines Kreises von Replikationsreaktionen, die Informationsgrenze unter Beibehaltung des Selektionsdrucks auf die einzelnen gekoppelten Spezies erhöhen können. Das Problem liegt darin, daß solche Hyperzyklen keine evolutionär stabile Kopplung darstellen. Jede katalytische Kopplung ist einfacher auszunutzen als aufrechtzuerhalten. In Abb. 3 sehen wir eine Darstellung dieser Problematik.

Die Lösung ist, laut Eigen und Schuster, klar: der Hyperzyklus muß in ein Kompartiment gesetzt werden, so daß Selektion auf der Ebene der Kompartimente die Kooperation aufrechterhalten kann. Das Problem ist dann, wie Maynard Smith u.a. betont hat³⁸, daß die Erhaltung aller notwendigen Moleküle in den kleinen Zahlen, die für eine effektive Gruppenselektion notwendig sind, sogar die spezielle Zellmaschinerie der Spindel zu erfordern scheint.

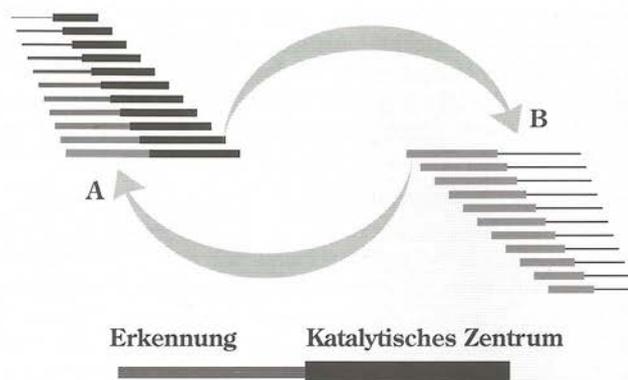


Abb. 3 Kooperationsproblem.

Moleküle A und B sind konzeptuell in zwei Teile zerlegbar, die für Erkennung und katalytische Funktion verantwortlich sind und getrennt evolvieren können. Moleküle mit besserer Erkennung der katalytischen Funktionalität des anderen Moleküls und mit selbst schlechterer katalytischer Funktion werden sich durchsetzen und die Kooperation dabei zerstören.

Dieses Problem kann durch die Kooperation zwischen Verwandten etwas abgeschwächt werden. Haldane³⁹ und Hamilton⁴⁰ zeigten, wie dieser Effekt (Kin Selektion genannt) zur Erhaltung von altruistischem Verhalten beitragen kann. Weil die Verwandten eines Individuums in ihren Genen eine höhere Homologie als die übrige Population aufweisen, können Individuen durch ein Opfer zugunsten ihrer Verwandten ihr eigenes Erbgut fortpflanzen. Die genauen Bedingungen hierfür im molekularen Falle (ausgehend vom Quasispeziesmodell) habe ich ausgearbeitet, aber die spezifische Erkennung von Verwandten, die dazu notwendig ist, kann nicht biochemisch verwirklicht werden.

Wir müssen auf die Rolle des Raums in der Forcierung von Kooperation zurückkommen. Dyson hat in seinem sehr abstrakten Modell für den Ursprung des Lebens⁴¹ explizit eine Inselstruktur benutzt, um eine kooperative Evolution eines Katalyse-Systems zu ermöglichen. Obwohl das Modell sonst viel zu einfach ist – die wesentliche Variable enthält lediglich die Anzahl von richtig gesetzten Bausteine für eine genaue Reproduktionsysteme – hat er die Wichtigkeit dieses räumlichen Selektionsargumentes in ein solches

Modell umgewandelt. Reine Diffusion, ohne Kompartimente oder sonstige Gruppen, kann aber auch die notwendigen Korrelationen für Kooperation hervorrufen.

Wesentliche Fortschritte wurden durch Boerlijsts und Hogewegs Entdeckung von Spiralen in Hyperzyklenmodellen mit Diffusion erzielt⁴². Diese Spiralen bilden sich, wenn mehr als vier Mitglieder im Hyperzyklus sind. Die Unterdrückung von parasitären Kurzschlußmutanten ist die wichtigste Eigenschaft der Spiralen, die dadurch einen Gegenstand für Selektion bilden, daß die am schnellsten drehenden anderen gegenüber an Raum gewinnen. Selektion auf der Ebene von Spiralen und die Etablierung einer Art Keimlinie im Kern der Spiralen, schützen das System vor unkooperativen Mutanten, die sich auf Kosten der Spiraldrehgeschwindigkeit schneller replizieren.

Man findet jedoch bis jetzt keine sich vermehrenden spiralisch organisierten Organismen sondern Zellen. Natürlich mag das mit den besonderen Eigenschaften von Membranen zusammenhängen. Ich glaube aber, daß replikationsfähige und kompakte Kooperationszentren in einfachen Reaktions-Diffusionssystemen zu finden sind, die für das Etablieren von molekularer Kooperation von entscheidender Wichtigkeit sein könnten. Kürzlich wurde diese Meinung durch einen Bericht über selbst-replizierende Muster in Reaktions-Diffusions-Systemen bestätigt⁴³.

Ein solches System, das Scott-Gray-Modell, ist hier gezeigt:

$$\begin{aligned} \frac{\partial u}{\partial t} &= D_u \nabla^2 u - uv^2 + A(1 - u) && \text{Ressource} \\ \frac{\partial v}{\partial t} &= D_v \nabla^2 v + uv^2 - Bv && \text{Replikator} \end{aligned} \quad (4)$$

wo A und B Ratenkoeffizienten sind.

Dieses Modell zeigt in einer Dimension eine Vermehrung von Flecken durch Teilung auf dem Weg zu einem stationären Turingmuster. Die höhere Ordnung in der Reaktion (uv^2) ermöglicht stationäre räumliche Inhomogenität mit weniger Spezies als im Hyperzyklusmodell. In zwei Dimensionen kann diese Teilung zur einem hexagonalen Gitter von stationären Flecken führen, aber für andere Parameterwerte kann es auch eine ständige Teilung von Flecken bewirken. Ich schlage vor, daß diese Flecken als Demes (ein Begriff aus der Populationsbiologie, der Subpopulationen bezeichnet, die effektiv durchmischt sind, so daß die Paarung zufällig ist) fungieren

können und den Aufbau von Kooperation durch die unterschiedlichen Teilungsraten von Flecken ermöglichen. Dieses wird in zukünftigen Arbeiten untersucht. Der Raum bietet eine symmetrische Korrelation zwischen Herkunft und Funktion kooperierender Spezies, die Parasiten nicht unbegrenzt ausnutzen können. Im nächsten Abschnitt werde ich ein *in vitro* Evolutionssystem vorstellen, wodurch dieses Phänomen auch experimentell untersucht werden kann.

Raum wird jetzt zunehmend von Physikern und Biologen in Evolutions-Modellen untersucht. Ich brauche vielleicht nur die parallele Entwicklung von *Coupled Map Lattices*⁴⁴ in der Physik und *Interacting Particle Systems* wie Daffodil⁴⁵ in der Ökologie zu erwähnen. Entwicklungen wie die *Lattice Gas Automata* von Kapral⁴⁶ ermöglichen auch eine mesoskopische Modellierung der stochastischen Reaktionskinetik auf der Ebene der individuellen Moleküle. Es ist höchste Zeit, daß die Chemiker ihre Kenntnisse über Reaktions-Diffusions-Systeme auch auf solche Probleme anwenden.

3. Räumlich aufgelöste Evolutionsexperimente *in vitro*

Selektion und Evolution in Kapillaren

1984 schlug ich vor, die *in vitro* Amplifikation von Q β räumlich aufgelöst zu studieren. Ich war an dieser Stelle hauptsächlich von der Möglichkeit gebannt, geographische Isolierung zu realisieren. Das erste Experiment zeigte nur homogenes Wachstum, ein Hinweis darauf, daß besondere Vorsichtsmaßnahmen gegen Kontaminationen unternommen werden mußten. Die Replikation von RNA ist wie ein Verbrennungsprozeß, der von einzelnen Molekülen ausgelöst werden kann. Brennstoffe sind die NTP-Monomeren. Erst bei meiner Rückkehr ins Labor von Eigen 1987 gelang es, chemische Wellen mit Hilfe der Q β -Replikase zu beobachten⁴⁷. Hier konnte im Gegensatz zu Fisher's Modell für die Ausbreitung einer vorteilhaften Variante (populationsgenetisch) mit der Dichte $u(x,t)$:

$$\begin{aligned} \frac{\partial u}{\partial t} &= D \nabla^2 u + f(v) \\ f(u) &= k u (1 - u) \end{aligned} \quad (5)$$

die Diffusion als präziser physikalische Vorgang und die Fortpflanzung als chemische Reaktionen erfaßt werden. Die Funktion $f(u)$ beschreibt die Konzentrationsabhängigkeit der Vermehrung, z.B mit der gezeigten logistischen Form. Das heißt, ein quantitativer Test der Theorie wurde ermöglicht. Kolmogorov *et al.* haben gezeigt⁴⁹, daß die Frontgeschwindigkeit der Wanderwellenlösung un-

verändert bleibt, solange $f(u)$ nicht schneller als linear mit u steigt. Das Verhalten ist nur abhängig von der wachsenden Spitze der Front – die Wellen werden gezogen. Die Wanderwellenlösung, $u=u(x-ct)$ mit Geschwindigkeit c , entlang einer Dimension (Koordinate x), läßt sich dann direkt durch eine Linearisierung der Gleichung für u berechnen. Es gibt eine minimale Geschwindigkeit

$$c = 2\sqrt{f'(0)D} = 2\sqrt{kD} \quad (6)$$

und Konvergenz zu dieser langsamsten und steilsten Welle von jeder Anfangsbedingung aus, in welcher die Moleküle nur in einem endlichen, begrenzten Bereich vorliegen.

Für eine Biochemie der Amplifikation ist diese exakte Linearisierung besonders günstig. Es bedeutet, daß die Kinetik von der komplizierten und nicht gut charakterisierten Hemmung des Wachstums bei höheren Konzentrationen unabhängig ist. Mit der Q β Replikase scheint sowohl Doppelstrangbildung als auch Bindung dieser Doppelstränge ans Enzym die Reaktion letztendlich zu inhibieren. Es bedeutet auch, daß für die komplexeren Multikomponentenmodelle der Replikation, die notwendig sind, um die Enzymabhängigkeit der Replikation wiederzugeben, eine im wesentlichen lineare Theorie entwickelt werden kann. Mit Hilfe dieser Theorie könnten die entscheidenden Parameter für die Selektion berechnet werden⁴⁷. Die Wellenfront bildet einen idealen, eingriffsfreien Serielltransferreaktor. Inhomogene *in vitro* Amplifikation ist in vielerlei Hinsicht einfacher in der Handhabung als homogene Amplifikation. Die konstanten Frontgeschwindigkeiten bieten genaue Meßgrößen für die Untersuchung von Evolution. Inzwischen sind solche Wanderwellen auch mit 3SR und SDA Reaktionen (siehe oben) von uns beobachtet worden.

Ein Kapillarreaktor ist gebaut worden und in Abb. 4 schematisiert. Er besteht aus 30m langen durchsichtigen Kunststoffkapillaren (Polyethylen) mit einem Innendurchmesser von 0,4 mm. In der Regel werden nur einige hundert einzelne RNA Moleküle in die Lösung gemischt, um Replikationskolonien an diskreten Stellen entlang der Kapillare zu initiieren. Ein Zeitausschnitt zeigt die vielen Wellenfrontpaare, die dann entstehen. Die Grundlage der Detektion wird im nächsten Teilabschnitt beschrieben. Die Zeitentwicklung entlang einer einzelnen Kapillare (siehe Abb. 5) zeigt die Genauigkeit, mit der die Frontgeschwindigkeit und deshalb auch Selektionsparameter gemessen werden können. Mit Generations-

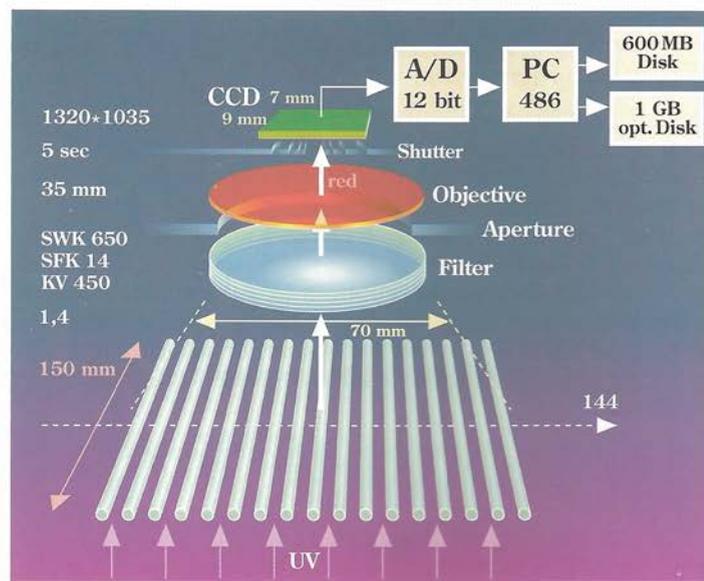


Abb. 4 Kapillarreaktor.

Polyethylenkapillaren mit einem Durchmesser von 0,4 mm werden in einer Gesamtlänge von ca. 20 m mäanderförmig auf ein Gestell gespannt und mit einem Replikationsmix gefüllt. Einzelne Wellenpaare wachsen von einzelnen Templaten oder angeimpften Stellen und werden mittels Interkalatoren wie Ethidiumbromid mit Hilfe einer CCD-slow-scan-Kamera detektiert. Die Bilder werden in Zeitreihen für jedes Kapillarsegment verarbeitet.

zeiten in der Größenordnung von nur einer Minute und mit großen Populationen ($>10^{11}$) ist Evolution durchaus schnell möglich. In Abb. 5 ist auch ein Beispiel von Evolution in der Frontgeschwindigkeit gezeigt. Ich werde hier nicht darauf eingehen, wie man über Paralleldetektion die vielen interessanten Fragen der stochastischen Evolution und Reaktionskinetik untersuchen kann.

Online Detektion

Für die Detektion dieser Wanderwellen, die aus submikromolaren Konzentrationen von RNA oder DNA bestehen, ist Fluoreszenz am besten geeignet. Warum Fluoreszenz? Manche Moleküle absorbieren Licht, so daß eine Anregung ihrer Elektronen in relativ langlebi-

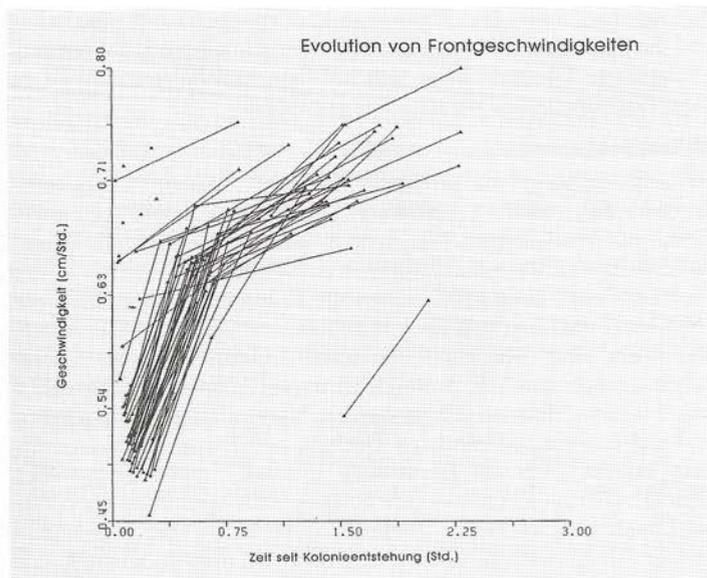


Abb. 5 Evolution im Kapillarreaktor. Der zeitliche Verlauf von einzelnen Wanderwellenfronten mit dem QB Replikationssystem wird aus den Bildern mittels Regression und Bildrekonstruktion extrahiert. Die Kurven werden automatisch stückweise linear segmentiert (auf optimale Weise nach einem T-Test). Die linearen Segmente werden dann auf aneinanderfolgende Geschwindigkeits-(Steigungs-)Änderungen geprüft. Aufgetragen werden die Geschwindigkeit der Segmente gegen ihre Anfangszeiten relativ zur Entstehungszeit der Kolonie. Die Anstiege der Geschwindigkeit sind auf molekulare Änderungen der RNA im Laufe der Reaktion zurückzuführen.

ge elektronische Zustände geschieht. Das Licht wird erst nach einigen Nanosekunden wieder emittiert, und es besteht eine Rotverschiebung (Stokesshift) in der Wellenlänge des Lichtes. Diese Verschiebung, und die zeitliche Verzögerung erlauben es, mit Hilfe von Filtern und empfindlichen Detektoren die kleinen Lichtmengen (weniger als 10^{-5} des Anregungslichts), die von unseren dünnen biochemischen Lösungen emittiert werden, zu messen. RNA und DNA fluoreszieren so schwach, daß stärker fluoreszierende Hilfsmoleküle benutzt werden müssen. Diese sind z.B. Inter-

kalatoren, die stark an den doppelsträngigen Regionen der RNA und DNA haften. Die Fluoreszenz des Interkalators in diesem relativ immobil gehaltenen Zustand ist stärker und langlebiger, weil der Farbstoff vor dem sonst konkurrierenden Prozeß der strahlungslosen Fluoreszenzlöschung geschützt wird. Ethidiumbromid zum Beispiel ist ein oft verwendeter Interkalator, der bei 300 oder 500 nm Licht absorbiert und bei 600 nm fluoresziert. Die Fluoreszenz ist etwa um ein Vierzehnfaches stärker, wenn das Molekül in RNA interkaliert als wenn es frei in Lösung ist, und es hat dann eine Lebensdauer von 22 statt 1 ns.

Detektion von Fluoreszenzlicht ist inzwischen mit Hilfe von CCD (Charged Coupled Device) Kameras mit hoher räumlicher Auflösung möglich. Die Kopplung dieser Detektoren mit gepulster Laseranregung und synchron geschalteten Bildverstärkern ermöglicht die Benutzung von Lebensdauerverschiebungen, um den Fluoreszenzhintergrund weiter zu unterdrücken. Es laufen derzeit Untersuchungen⁵¹, um eine weitere Senkung der Detektionsgrenze in Richtung Einzelmoleküldetektion zu ermöglichen.

Molekulare Räuber-Beute-Systeme

Um einen ersten Schritt in Richtung *in vitro* Kooperation zu wagen, haben meine Mitarbeiter Wlotzka, Foerster, Köllner und ich an einer einfachen Erweiterung der im ersten Abschnitt beschriebenen 2SR Reaktion gearbeitet. Räuber-Beute-Systeme, wie oben angeführt, beschreiben auch den Zerfall der Kooperation in der Ausbeutung eines Wirtes durch einen Kurzschlußparasiten. Viren sind von dieser Art, weil sie die Investition des Wirtes vor allem in Proteinübersetzung ausnutzen.

In der 2SR Reaktion benötigt man für die Amplifikation zwei Primersequenzen. Die erste bildet mit der RNA-Matrize am 3'Ende einen Doppelstrang, der die Polymerisation durch HIV-RT (Reverse Transkriptase) initiiert. RT transkribiert den RNA-Strang zurück in DNA, und verdaut das ursprüngliche RNA-Teil dieses Hybrids. Danach bindet der zweite Primer am 3'Ende des komplementären DNA-Transkriptes und bildet einen doppelsträngigen Bereich der DNA, der für die Transkription in RNA durch die T7 Polymerase eine Promotorsequenz enthält. Von dem ursprünglichen RNA können so in einer Runde mehrere Kopien erzeugt werden.

Das einzelsträngige DNA-Transkript bietet eine Kopplungsmöglichkeit als Primer für eine zweite 2SR Reaktion, die als Räuber für die

erste interpretiert werden kann. Das gekoppelte Schema ist in Abb. 6 gezeigt. Am Anfang wird der DNA-Strang der Beute in zu geringer Konzentration vorhanden sein, um mit der ebenfalls kleinen Konzentration des Räuber-DNA merklich zu hybridisieren. Stattdessen bindet es sich mit dem Primer 2 des Beutezyklus. Wenn aber die Beutekonzentration größer wird, ist die Bindung ihrer einzelsträngigen DNA an die des Räubers signifikant für den Räuber, und die Räuberpopulation nimmt schnell zu. Wenn sich das ganze in einem offenen Reaktor mit einem ständigen Abfluß befindet, führt es zu Oszillationen, die für ein klassisches Räuber-Beute System typisch sind. Der Vorteil dieses Systems liegt in der Möglichkeit, Evolutionsexperimente mit solchen ökologischen Fragestellungen innerhalb kurzer

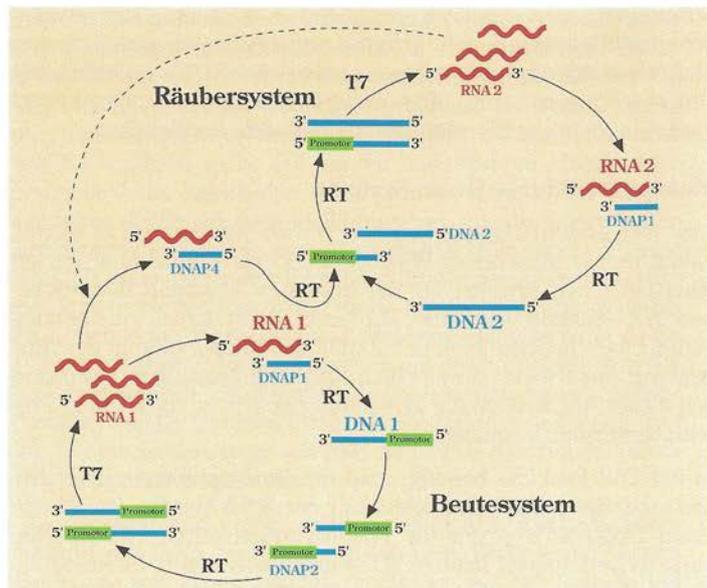


Abb. 6 Räuber-Beute-System auf molekularer Ebene. Zwei 3SR-Amplifikationszyklen können miteinander über die einzelsträngige RNA gekoppelt werden. Die RNA der Beute wird in ein einzelsträngiges DNA-Molekül umgewandelt, das wiederum als Primer für den Räuberzyklus dient. Unterschiedliche Varianten einer solchen Kopplung werden in meiner Gruppe zur Zeit von B. Wlotzka experimentell untersucht.

Zeit durchzuführen. Die Ergebnisse können genauestens analysiert und die Sequenzen der beteiligten Spezies schnell bestimmt werden. Evolutionäre Ökologie kann sich auf dem molekularen Niveau zu einer experimentellen Wissenschaft entwickeln.

Mikroreaktoren

Derartige Experimente in offenen Reaktoren stellen extrem hohe Anforderungen an die Technologie. Um räumlich aufgelöste Experimente mit kostspieligen Enzymen zu ermöglichen, ist eine Miniaturisierung des Reaktionsvolumens notwendig. Fortschritte in der Fluoreszenzdetektion ermöglichen die Bestimmung submikromolarer Konzentrationen von RNA-Molekülen in Schichten, die dünner als 40 µm sind. Mit Hilfe der Mikrostrukturierung, in unserer Arbeitsgruppe durch K. Schmidt vertreten, können Kapillarreaktoren in diesem Maßstab gebaut werden. Sie werden in Silizium geätzt und mit anodisch gebondeten Deckeln aus Pyrex abgeschlossen. Dies erlaubt auch die Herstellung von mit Stegen gekoppelten „Inseln“. Hiermit ist eine weitere geometrische Steuerung kooperativer Effekte möglich (vergl. „Stepping Stone Model“ der Populationsbiologie⁵²). Eine Reihe von biotechnologischen Anwendungen sind damit auch durchführbar. Wichtig für die Untersuchungen sind hier auch die Möglichkeiten zur mikrostrukturierten Probenentnahme, z.B. mit Mikroventilen. Mit Hilfe der Mikrostrukturierung und Fluoreszenzdetektion kann die Untersuchung und gezielte Lenkung der Evolution bis hin zum Einzelmolekülniveau etabliert werden.

Molekulare Kooperation

Von größtem Interesse sind natürlich jene Kooperationsformen, die sich mit katalytischer Aktivität der beteiligten Spezies befassen. Hier gibt es zwei bisher identifizierte Möglichkeiten: katalytische RNA (ribozyme)⁵³ oder konventionelle Enzyme. Weil Proteine sich wegen mangelnder linearer Erkennung nicht replizieren können, ist für Evolutionsexperimente mit Proteinen ein *in vitro* Übersetzungssystem nötig. Wir wollen in den nächsten Jahren auch auf diese Möglichkeit eingehen. Ribozyme bieten aber zunächst einfachere Systemen mit weniger Komponenten.

Joyce hat ein Selektionssystem für Ribozymfunktion erfolgreich für die Evolution eines RNA-Enzyms verwendet²⁴. Das Prinzip besteht in der Notwendigkeit (für die Vervielfältigung) einer selbst katalysierten Ligation (Trans-Esterifizierungsreaktion) mit einer Primersequenz. Wäre diese Reaktion auf anderen Molekülen katalysiert, wäre wieder eine Ausnutzung der Funktion möglich. Joyce konnte

jedoch die Selektion nur in getrennten Runden von Amplifikation und Selektion führen.

Mit den Dünnschichtreaktoren wäre es möglich, die Anzahl der Moleküle, die sich im Laufe einer Generation begegnet sind, stark zu reduzieren. Damit sinkt die effektive Gruppengröße und kooperative Wechselwirkungen werden begünstigt. Es gibt in der 2SR Reaktion eine Vielzahl von Möglichkeiten, enzymatische Aktivitäten von RNA-Molekülen spezifisch an die Vervielfältigung zu koppeln. Für die Biotechnologie sind natürlich solche Kopplungen von Interesse. Die Entwicklung alternativer Kopplungsschemata ist eine aktive Nebenforschungsrichtung in unserer Gruppe. Die Praxis wird zeigen, wie effektiv Diffusion in der kooperativen Gestaltung von Evolution *in vitro* ist.

4. Künstliche molekulare Kooperation

Dieser Abschnitt bietet lediglich einen kurzen Überblick über die Entwicklung eines massiv-parallelen Rechners zur Untersuchung von Evolution auf der „interacting particle system“ Ebene. Für uns ist die Durchführung langzeitiger Simulationen von besonderer Bedeutung. Viele Evolutionsmodelle z.B. der spieltheoretische Ansatz von Lindgren⁵⁴, zeigen lange Stasis-Perioden und dann deutliche Veränderungen. Gleichermäßen ist es wichtig für das Verständnis, sich mit dem algorithmischen Aspekt der Informationsgestaltung in der Biologie auseinanderzusetzen. Das neue Gebiet zur Erforschung von künstlichem Leben⁵⁵ (Artificial Life) hat sich von der sklavischen Neigung zum Roboterbau in den letzten zwei Jahren weitgehend befreit. Wie sein Vetter, die Künstliche Intelligenz, widmet es sich zunehmend dem grundsätzlichen Verständnis des Phänomens. Die Entwicklung von Rechnerarchitekturen, die Eigenschaften des evolvierenden Lebens übernehmen, wird zunehmend als notwendig für ein volles Verständnis betrachtet.

Wir haben einen Rechner entwickelt, der in seiner feinkörnigen Prozessorarchitektur vom Benutzer in hohem Maße definierbar ist⁵⁶. Dieser Rechner wurde in unserer Arbeitsgruppe gebaut und im Frühjahr dieses Jahres fertiggestellt. Er unterscheidet sich grundsätzlich von bisherigen Parallelrechnern, indem die Prozessoren und ihre Verbindungsarchitektur umkonfigurierbar sind. Statt ein Programm für eine fertige Maschine zu schreiben, schreibt der Benutzer eine Maschine, die sein Problem berechnet.

Wir wollen diesen Rechner zuerst als parallelen genetischen Prozessor konfigurieren. Lokal aufgebauter Pseudozufall ermöglicht

einen effizienten Aufbau eines parallelen Diffusionsprozesses für individuelle Informationsträger (Moleküle) in eine, zwei oder drei Dimensionen oder exotischeren hyperkubischen Geometrien. Dieser Vorgang kann als deterministisches Chaos verstanden werden. Die Moleküle, als binäre Zeichenketten kodiert, unterliegen damit einem Mischvorgang, in dem sich jeder mit jedem treffen kann. Überall im Rechner führen Kollisionen zwischen Molekülen zu möglichen Reaktionen. Diese Reaktionen können auf der mikroskopischen oder mesoskopischen Ebene beschrieben werden. In erster Linie werden binäre Reaktionen studiert. Ein einfaches Element, genetischer Schalter genannt und in Abb. 7 gezeigt, ermöglicht zum Beispiel die Simulation von Kopier- und Mutationsvorgängen und Diffusion bei minimaler Belastung der Rechenressourcen. Da diese Konfigurierung in Hardware geschieht, laufen solche Vorgänge sehr schnell ab.

Field Programmable Gate Arrays (FPGAs) bilden die technologische Basis für die Hardware dieses Rechners⁵⁷. Die grundlegende funktionale Einheit digitaler Signalverarbeitung besteht in dem sogenann-

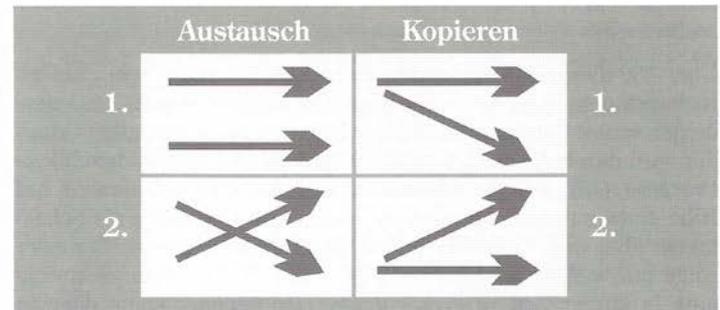


Abb. 7 Genetischer Schalter

Die Grundprozesse von Mischung, Vermehrung, Rekombination, Mutation und Selektion können zu einem simplen Datenflußschema vereinfacht werden. Zwei Biopolymere laufen bitweise seriell in den Schalter, und zwei Sequenzen verlassen ihn. Veränderungen des Schalters zwischen den vier möglichen Zuständen, entweder innerhalb eines Polymers oder zwischen aufeinanderfolgenden Biopolymeren, ergeben die oben genannten Prozesse. Mit einer einfachen Erweiterung sind auch Insertionen und Deletionen prinzipiell möglich. Ein Gitter solcher Schaltelemente kann dann eine sich evolvierende Population von Biopolymeren simulieren.

ten „Gate“, in dem eine Anzahl binärer Signaleingaben entsprechend einer vorgegebenen logischen Funktion in eine binäre Ausgabe umgewandelt wird. Jede rekursive Funktion (oder äquivalent dazu ein universeller (Turing) Computer) kann aus den grundlegenden Gates AND, OR und NOT gebaut werden, dies ist auch bei ausschließlicher Verwendung von NAND (not AND) Gates möglich. Die nötigen Speicherzellen in Form von einfachen Flip-Flops können auch aus NAND Gates allein konstruiert werden. Durch eine gezielte Beseitigung der Verbindungen von einem regelmäßigen Array eng verbundener NAND Gates, dem sogenannten *Sea of NAND Gates*, kann die gleiche grundlegende Hardware zur Schaffung sehr unterschiedlicher digitaler Designs verwendet werden. GATE Array Logic Devices (GALs) sind heutzutage eine billige und allgegenwärtige Komponente in der Hardwareimplementierung digitaler Designs. Die Field Programmable Gate Arrays ermöglichen es dem Benutzer, das Gerät wiederholt zu programmieren, um verschiedene Funktionen auszuführen: zum Beispiel können die Verbindungen zwischen den Komponenten in Abhängigkeit von lokalen elektrischen Feldern geöffnet und geschlossen werden. Diese Felder werden lokal durch Flip-Flops aufrechterhalten.

Über 150 dieser FPGAs sind in einer neuen Gattung von Parallelrechnern untereinander verbunden und für jede Simulationsaufgabe neu intern konfiguriert. Diese sonst sehr zeitaufwendige Prozedur wird durch ein modulares Konzept beschleunigt, in dem lokale Prozesse (z.B. auf der Ebene der einzelnen Bioreaktionen) mit Hilfe eines zu entwickelnden automatischen Compilers als Schaltkreise über den Chiparray vervielfältigt werden. Dieser Compiler sollte nur wenige Minuten benötigen, um eine Programmentwicklung in kurzer Zeit zu ermöglichen. Der Rechner sollte dann in etwa einer Stunde Rechenzeit Populationen von bis zu 10^9 beliebig in Zeichenketten unterteilten Monomeren für bis zu 10^9 Generationen verfolgen können. Die Untersuchung kooperativer Effekte mit Hilfe dieses Rechners steht uns größtenteils noch bevor. Hiermit sollte es nicht nur möglich sein, bis jetzt unerreichte Simulationen kooperativer Effekte auf individuellem molekularem Niveau zu verwirklichen, sondern auch ein Konzeptionsgerüst für evolutive Konfigurierbarkeit zu entwickeln. Obwohl in diesem Falle nur skizzenhaft geschildert, wollte ich Ihnen ein abgerundetes Bild unserer Forschung geben, um ihre interdisziplinäre Natur zu verdeutlichen.

5. Zusammenfassung

Ich habe Ihnen in dieser Vorlesung geschildert, wie interdisziplinäre Forschung zu einem neuen Verständnis der Wichtigkeit räumlicher Effekte für die molekulare Kooperation geführt hat. In homogen gemischten Lösungen läßt sich zwar Koexistenz, jedoch keine funktionale Kooperation zwischen Molekülen aufrechterhalten. Die klassische Lösung für dieses Problem bestünde in der Kompartimentierung, um durch eine Verschiebung der Selektion auf die nächsthöhere Ebene die Kooperation zu stabilisieren. Der erste Schritt zu einer funktionalen Kooperation scheint fast so komplex wie die Erzeugung der ersten Zelle. Ich wollte zeigen, wie räumliche Diffusionsbegrenzung die Möglichkeit eines stabilen Zusammenwirkens von Molekülen und den Weg zum Ursprung selbstreplizierender Zellen bahnt. Diese Ergebnisse beruhen auf einem Zusammenkommen neuer Erkenntnisse aus der Theorie der Turing-Muster und chemischen Wellen mit denen aus der Populationsbiologie und evolutionären Ökologie. Mit Hilfe neuentwickelter isothermaler *in vitro* Amplifikationsreaktion können in räumlich ausgedehnten Dünnschichtreaktoren diese Ideen experimentell getestet werden. Ebenso habe ich dargestellt, wie die Entwicklung eines in Hardware an die Modelle anpaßbaren Parallelrechners das Langzeitstudium dieses Phänomens auf der Zeitskala der Evolution (auf der Erde) ermöglicht. Zum Abschluß bin ich auf die Konsequenzen für eine effektive Nutzung der Evolution in der Biotechnologie eingegangen. Kooperation ist eines der Kernphänomene des Lebens, und die Erforschung von Kooperation fordert ein bisher unbekanntes Maß an interdisziplinärer Zusammenarbeit. Ich würde mich freuen, wenn der oder die eine oder andere Kollege oder Kollegin durch diese Präsentation Berührungspunkte und Interessen für das eigene Engagement sehen würde.

Laut Hobbes liegt die Ursache für jenen Kriegszustand, in dem jeder gegen jeden kämpft, in der Unsicherheit des Erfolges einer jeden Unternehmung des einzelnen ohne eine gemeinsame Autorität. Es ist also kein Wunder, daß der Politik- und Sozialwissenschaftler Axelrod ein Zitat von Hobbes gewählt hat⁵. Die Spannung in der Biologie liegt darin, daß durch eine dezentrale Dynamik so viele einzelne Funktionen miteinander kooperieren.

DANK

Ich möchte Prof. Eigen meine Dankbarkeit für sein wissenschaftliches und persönliches Beispiel aussprechen. Ich möchte mich auch bei Dr. Bauer für meinen Lehrgang in der experimentellen Biochemie bedanken. Meine Mitarbeiter am IMB Jena und MPI Göttingen wissen, wie viel ich ihnen schulde. Prof. Schuster danke ich für die Lösung vieler Probleme während meiner Anfangszeit in Jena. An der Universität gilt mein besonderer Dank Prof. Müller für seine freundliche Aufnahme in die biologische Fakultät. Daß viele noch ausstehen, dürfte keinen in Jena erstaunen. Ich möchte zum Schluß vor allem meiner Frau Sigrid an dieser Stelle für ihre große Hilfe und Unterstützung danken. Das Schöne am Leben ist nicht so sehr Kooperation, sondern Liebe. Das ist etwas anderes!

Literatur

- 1 B.D. Morley und H.R. Toelken (1983) *Flowering Plants in Australia* (Rigby, Sydney-New York-London).
- 2 J. Monod (1970) *Le Hasard et la Nécessité* (Seuil, Paris); Deutsche Ausgabe: *Zufall und Notwendigkeit* (Deutscher Taschenbuch Verlag, München, 1975).
- 3 R. Dawkins (1976) *The Selfish Gene* (Granada, London-Toronto-Sydney-New York).
- 4 T. Hobbes (1651) *Leviathan or the matter, forme and power of a commonwealth ecclesiastical and civil*. (Collier Macmillan, London, 1978).
- 5 R. Axelrod (1984) *The evolution of cooperation*. (Basic Books, New York).
- 6 C. Weissmann, M.A. Billeter, H.M. Goodman, J. Hindley und H. Weber (1973) *Structure and function of phage RNA*. *Ann. Rev. Biochem.* **42** 303-328.
- 7 C. Weissmann (1994) *The prion connection: now in yeast?* *Science* **264** 528-530.
- 8 J. Emlen (1984) *Population Biology — The Coevolution of Population Dynamics and Behaviour*. (MacMillan, NY, Collier, London, 1984).
- 9 J. Hofbauer und K. Sigmund (1988) *The theory of evolution and dynamical systems*. (Camb.Univ.Press, Cambridge UK).
- 10 J. von Neumann (1958) *The theory of self-reproducing automata*. Ed A.W. Burks (Univ. of Illinois Press, Urbana-London, 1966).
- 11 J. von Neumann und O. Morgenstern (1944) *The theory of games and economic behaviour*. (Princeton, 2nd Edition, 1947).
- 12 A.M. Turing (1952) *The chemical basis of morphogenesis*. *Phil. Trans. Roy. Soc. B* **27** 37.
- 13 J.M. Murray (1982) *Parameter Space for Turing instability in reaction-diffusion mechanisms: a comparison of models*. *J. Theor. Biol.* **98** 143.
- 14 P. De Kepper, V. Castels, E. Dulos und J. Boissonade (1991) *Turing-type chemical patterns in the chlorite-iodide-malonic acid reaction*. *Physica D* **49** 161-169.
- 15 O.Gurel und D. Gurel (1983) *Oscillations in Chemical Reactions*. *Topics in Current Chemistry* **118** 1-74.
- 16 E.E. Sel'kov (1968) *Self-oscillations in glycolysis. A simple kinetic model*. *Eur. J. Biochem.* **4** 79-86.
- 17 O.E. Röessler (1976) *Chaotic behaviour in simple reaction systems*. *Z. Naturforschung* **31A** 259-264.
- 18 A. Hjelmfelt, F.W. Schneider und J. Ross (1993) *Pattern recognition in coupled chemical kinetic systems*. *Science* **260** 335-337.
- 19 S. Spiegelmann (1971) *An approach to the experimental analysis of precellular evolution*. *Q.Rev. Biophys.* **4** 213.
- 20 D.R. Mills, R.L. Peterson, S. Spiegelman (1967) *An approach to the experimental analysis of precellular evolution*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **58** 217-224.
- 21 E. Fahy, D.Y. Kwoh und T.R. Gingeras (1991) *PCR Methods and Applications* **1**, 25-33.
- 22 G.T. Walker, M.C. Little, J.G. Nadeau und D.D. Shank, (1992) *Isothermal in vitro amplification of DNA by a restriction enzyme/DNA polymerase system*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89** 392-396.
- 23 J.C. Guatelli, K.M. Whitfield, D.Y.Kwoh, K.J. Barringer, D.D. Richman und T. R. Gingeras, (1990) *Isothermal, in vitro amplification of nucleic acids by a multi-enzyme reaction modeled after retroviral replication*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87** 1874-1878.
- 24 G.F. Joyce, (1992) *Directed Evolution of an RNA enzyme*. *Science* **257** 635-641; N. Lehman und G.F. Joyce, *Evolution in vitro: analysis of a lineage of ribozymes*. (1993) *Current Biology* **3** 723-733.
- 25 A.S. Spirin, V.I. Baranow, L.A. Ryabova, S.Y. Ovadov und Y.B. Alanov (1988) *Science* **242** 1162.
- 26 M. Eigen (1971) *The Quasispecies Model*. *Naturwissenschaften* **58** 465-523.
- 27 M. Eigen, J.S.McCaskill und P.Schuster (1989) *The Molecular Quasispecies*. (1989) *Adv. Chem. Phys.* **75** Kap. 4, 149-263.
- 28 J.S. McCaskill (1984) *A Localization Threshold for Macromolecular Quasispecies from Continuously Distributed Replication Rates*. *J. Chem. Phys.* **80** 5194-5202.
- 29 C.K. Biebricher, M. Eigen und W.C. Gardiner Jr. (1984) *Kinetics of RNA replication: plus-minus asymmetry and double strand formation*. *Biochemistry* **23** 3186-3194.
- 30 I.R. Epstein (1979) *Competitive co-existence of self-reproducing macromolecules*. *J.Theor.Biol.* **78** 271-298.
- 31 P.W. Anderson (1983) *Suggested model for prebiotic evolution: The use of chaos*. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* **80** 3386-3390.
- 32 J.J. Tyson (1974) *Competition, selection and evolution in chemical networks. in: Some Mathematical Questions in Biology* Verf: S.A. Levin (Previdence R.I. Amer. Math. Soc.) 43-69.

- 33 A.J. Lotka (1925) *Elements of physical biology*. (Dover, New York, 1956); V. Volterra (1926) *Fluctuations in the abundance of a species considered mathematically*. *Nature* **118** 558-560.
- 34 W.G. Wilson, A.M. de Roos, and E. McCauley (1993) *Spatial instabilities within the diffusive Lotka-Volterra system: individual based simulation results*. *Theor. Pop. Biol.* **43** 91-127.
- 35 T. Ikeda and M. Mimura (1993) *An interfacial approach to regional segregation of two competing species mediated by a predator*. *J.Math.Biol.* **31** 215-240.
- 36 W.D. Hillis (1990) *Coevolving parasites improve simulated evolution as an optimization procedure*. *Physica* **D42**, 228-234.
- 37 M. Eigen and P. Schuster (1978) *The Hypercycle: A principle of natural self-organization*. *Naturwissenschaften* (1977) **64**, 541-565 *ibid* (1978) **64** 7-41 *ibid* (1978) **65** 341-369.
- 38 J. Maynard Smith (1979) *Hypercycles and the origin of life*. *Nature* **280** 445-446; C. Bresch, U. Niesert, and D. Harnasch (1980) *Hypercycles, Parasites and Packages* *J. Theor. Biol.* **85**, 399-405.
- 39 J.B.S. Haldane (1932) *The Causes of Evolution* (Longmans, Green, NY); *ibid* (1955) *Population Genetics* *New. Biol.* **18**, 34-51.
- 40 W.D. Hamilton (1963) *The evolution of altruistic behaviour*. *Am. Nat.* **97** 354-356; *ibid* (1964) *The genetical evolution of social behaviour*. *J. Theor. Biol.* **7** 1-16.
- 41 F.J. Dyson (1982) *A model for the origin of life*. *J. Mol. Evol.* **118**, 344-350.
- 42 M.C. Boerlijst and P. Hogeweg, (1991) *Spiral Wave structure in pre-biotic evolution: hypercycles stable against parasites*. *Physica* **D48**, 17-28; *ibid* (1993) *Evolutionary consequences of spiral waves in a host-parasitoid system*. *Proc.R.Soc.Lond.* **253** 15-18.
- 43 J.E. Pearson (1993) *Complex patterns in a simple system*. *Science* **261** 189-192; K.-J. Lee, W.D. McCormick, J.E. Pearson and H.L. Swinney *Experimental observation of self-replicating spots in a reaction-diffusion system*. *Nature* **369** 215-218; R. Reynolds, J.E. Pearson, S. Ponce-Dawson (1994) *Dynamics of self-replicating patterns in reaction-diffusion systems*. *Phys.Rev.Lett.* **72** 2797-2800.
- 44 K. Kaneko K. (1989) *Spatiotemporal chaos in one- and two-dimensional coupled map lattices*. *Physica* **D37** 60-82; K. Kaneko and T. Ikegami (1992) *Homeochaos: dynamical stability of a symbiotic network with population dynamics and evolving mutation rates*. *Physica* **D56** 406-429
- 45 Barkham and Hance (1982) ; R. Durrett und S.A. Levin (1994) *Stochastic spatial models: a user's guide to ecological applications*. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **343** 329-350.
- 46 Wu, X. and Kapral, R. (1994) *Effects of molecular fluctuations on chemical oscillations and chaos*. *J.Chem.Phys.* **100** 5936-5948.
- 47 G.J. Bauer, H.J.Otten und J.S. McCaskill (1989) *Travelling waves of in vitro evolving RNA*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86** 7937-7941.
- 48 R.M. Fisher (1937) *The wave of advance of an advantageous allele*. *Ann. Eugenics* **7** 355-369.
- 49 A. Kolmogorov, I. Petrovsky, N. Piscounoff (1937) *Bull. Univ. Moscow. Ser. Int. Sect. A* **1** 1-25.
- 50 J.S. McCaskill and G.J. Bauer, (1993) *Images of Evolution: The Origin of Spontaneous RNA Replication Waves*. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90** 4191-4195.
- 51 M. Köllner, P. Fischer, J.S. McCaskill (1994) *Detector for two-dimensional time-resolved photon counting*. S.P.I.E. Proc. (Int. Tagung in Biomedical Optics, Lille, August 1994).
- 52 M. Kimura und G.H. Weiss (1964) *The stepping stone model of population structure and the decrease of genetic correlation with distance*. *Genetics* **49** 561-576.
- 53 T.R. Cech (1987) *The chemistry of self-splicing RNA and RNA enzymes*. *Spatial* **236** 1532-1539.
- 54 K. Lindgren und M.G. Nordahl (1994) *Cooperation and community structure in artificial ecosystems*. *Artificial Life* **1** 15-38.
- 55 C. Taylor und D. Jefferson (1994) *Artificial life as a tool for biological enquiry*. *J. Artificial Life* **1** 1-14.
- 56 J.S. McCaskill (1993) *Architektur und Verfahren zum Konfigurieren eines Parallelrechners*. Deutsche Patentanmeldung P4302297.9 28 Jan. 1993.
- 57 A. Sangiovanni-Vincentelli (1992) *Some considerations on Field Programmable Gate Arrays and their impact on system design*. in *Field Programmable Gate Arrays*. Second International Workshop on Field Programmable Logic and Applications (Vienna, Austria Aug. 31 -Sep. 2 1992) Verf: H. Grünbacher und R.W. Hartenstein (Springer, Berlin) 26-34.