

## Nicht-enzymatische Synthese von Polysacchariden, Nucleosiden und Nucleinsäuren und die Entstehung selbst-vermehrungsfähiger Systeme

VON PROF. DR. G. SCHRAMM [\*], DR. H. GRÖTSCH UND DIPL.-CHEM. W. POLLMANN

MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR VIRUSFORSCHUNG, TÜBINGEN

*Durch Umsetzung mit Polyphosphorsäureester lassen sich Verbindungen mit freier Amino-, Hydroxyl- oder Carbonylgruppe aktivieren. Enthalten die Verbindungen eine zweite funktionelle Gruppe, so werden Polykondensationen möglich: Aminosäuren → Polypeptide, Zucker → Polysaccharide, Nucleotide → Polynucleotide. Polyadenylsäure beschleunigt die Polykondensation von Uridylsäure auf das mehr als 10-fache. Diese gegenseitige Beeinflussung komplementärer Nucleotidstränge bildet die experimentelle Grundlage für eine Theorie über die Entstehung selbstvermehrungsfähiger Systeme im Lauf der Erdgeschichte.*

Schramm und Wissmann [1] beschrieben eine Synthese von Polypeptiden mit Hilfe von Polyphosphorsäureestern, bei der zunächst die Aminogruppe der einen Komponente durch Bildung eines Phosphamidesters reaktionsfähig gemacht und anschließend mit der Carboxylgruppe der zweiten Komponente umgesetzt wird. Dieses Verfahren eignet sich auch zur Polykondensation. So wurde auf diesem Wege Alanyl-Glycyl-Glycin zu höhermolekularen Peptiden mit bis zu 24 Aminosäuren in der Kette polykondensiert [1]. Aus Arginin konnte ein Polyarginin (Molegewicht: 4000 bis 5000) und aus verschiedenen substituierten und unsubstituierten Aminobenzoesäuren hochmolekulare Polypeptide hergestellt werden. Auf diese Versuche soll an anderer Stelle näher eingegangen werden. Die Vorteile des Verfahrens bestehen darin, daß die Polykondensa-

tion unter sehr milden Bedingungen verläuft und daß keine Racemisierung beobachtet wird. Der Polyphosphorsäureester ist durch Auflösen von  $P_2O_5$  in Äther und anderen alkoxyhaltigen Lösungsmitteln leicht herzustellen. Seine Struktur wurde noch nicht genauer untersucht; wahrscheinlich handelt es sich um ein Gemisch cyclischer und linearer Ester.

### Aktivierung hydroxyl-haltiger Verbindungen

Wir prüften nun, ob sich mit Polyphosphorsäureester auch Hydroxylgruppen aktivieren lassen. Wir wurden zu diesen Versuchen durch die Tatsache angeregt, daß die überwiegende Anzahl der in der Zelle ablaufenden

(1) Glucose-1-diphosphouridin + Fructose	→	Saccharose + Uridindiphosphat
(2) Glucose-1-phosphat	Phosphorylase →	Stärke + Phosphat
(3) Ribose-1-phosphat + Uracil	Uridin-Phosphorylase →	Uridin + Phosphat
(4) 5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphat + Adenin	Nucleotid-Pyrophosphorylase →	Adenylsäure + Pyrophosphat
(5) Nucleosid-diphosphat	Polynucleotid-Phosphorylase →	RNS + Phosphat
(6) Desoxynucleosid-triphosphat	→	DNS + Pyrophosphat
(7) Aminosäure + ATP + s-RNS	→	Aminoacyl-s-RNS
		↓
		Protein

Tabelle 1. Biochemische Synthesen

[\*] Vorläufige Mitteilung: G. Schramm, H. Grötsch u. W. Pollmann, Angew. Chem. 73, 619 (1961).

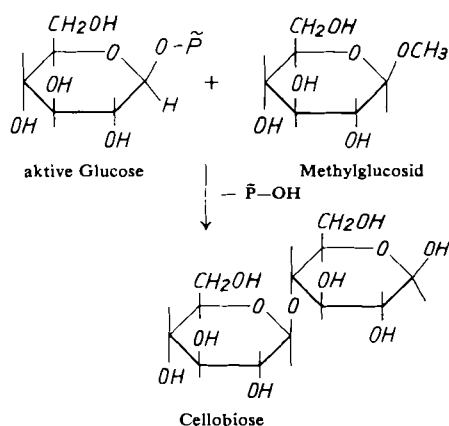
[1] G. Schramm u. H. Wissmann, Chem. Ber. 91, 1073 (1958).

Biosynthesen so vor sich geht, daß zunächst Hydroxyverbindungen durch Adenosintriphosphat oder ähnliche Polyphosphate in reaktionsfähige Phosphorsäureester

umgewandelt werden, die dann unter Abgabe der Phosphatgruppen mit dem Stickstoff oder Sauerstoff einer zweiten Komponente reagieren. Beispiele hierfür sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Bei den Reaktionen (1) bis (4) handelt es sich um die Aktivierung eines acetalischen Hydroxyls, bei (5) und (6) um die Aktivierung einer sekundären Phosphatgruppe, bei (7) um die Aktivierung einer Carboxylgruppe. Wir versuchten daher zunächst, mit Polyphosphorsäureester die Aktivierung von acetalischen Hydroxylgruppen und von Phosphorsäureestern zu erreichen.

## Darstellung von O-Glykosiden

In der Tat fanden wir, daß bei der Einwirkung von Polyphosphorsäureester auf Aldosen und Ketosen das acetalische Hydroxyl angegriffen wird und die entstehende reaktionsfähige Zwischenverbindung glatt mit anderen hydroxyl-haltigen Verbindungen weiterreagiert. Läßt man z. B. Glucose in einer Lösung von Dimethylformamid und in Gegenwart von Polyphosphorsäureester auf Methylglucose einwirken, so erhält man nach Abspaltung der Methylgruppe in guter Ausbeute ein einheitliches Disaccharid, das sich chromatographisch von Maltose und Gentiobiose unterscheidet und als Cellobiose identifiziert wurde. (Formelschema 1). Es entsteht also in diesem Falle eine  $\beta$  1  $\rightarrow$  4-glucosidische Bindung. Der sterisch einheitliche Verlauf der Reaktion ist auffallend und wurde später an vielen weiteren Beispielen bestätigt.



Formelschema 1

Die primär aus Glucose und Polyphosphorsäureester entstehende aktive Zwischenverbindung (Glucose-1- $\tilde{P}$ ) konnte noch nicht in reiner Form isoliert werden. Zweifellos handelt es sich beim ersten Reaktionsschritt jedoch um eine Phosphorylierung der acetalischen Hydroxylgruppe, da bereits wenige Minuten nach Zugabe des Polyphosphorsäureesters in der Kälte die Aldehydgruppe der Glucose nicht mehr mit Jod zu titrieren ist und bei der Aufarbeitung des Reaktionsgemisches Glucose-1-phosphat gefaßt wurde. Die aktive Zwischenverbindung ist jedoch mit Glucose-1-phosphat nicht identisch, da dieses unter den angegebenen Bedingungen

nicht zu Glucosiden reagiert. Möglicherweise handelt es sich bei der Zwischenverbindung um einen Äthylester des Glucose-1-phosphates oder -polyphosphates.

## Darstellung von Polysacchariden

Die Polykondensation von Zuckern in saurer Lösung wurde wiederholt beobachtet. *Micheel* und Mitarbeiter [2] konnten beim Behandeln von Glucose und anderen Zuckern in Dimethylsulfoxyd mit Chlorwasserstoff in guter Ausbeute Polyglykoside isolieren, wenn das während der Reaktion gebildete Wasser abdestilliert wurde. Diese Polysaccharide waren jedoch stark verzweigt.

Läßt man Zucker mit freier Carbonylfunktion in einem inerten Lösungsmittel in Gegenwart von Polyphosphorsäureester aufeinander einwirken, so erhält man hochmolekulare Polyglykoside, in denen die Zuckerreste überwiegend einheitlich und linear miteinander verknüpft sind. Wir erhielten aus Glucose in Dimethylformamid ein Polykondensat, aus dem wir durch Dialyse die niedermolekularen Oligosaccharide abtrennten. In Ausbeuten von etwa 30–50% verblieb ein Polyglucosid mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 50000. Die Eigenviskosität  $[\eta] = 100$  entsprach der Viskositätszahl von Cellulose gleichen Molgewichts. Dies deutet darauf hin, daß überwiegend langgestreckte, geradkettige Moleküle entstanden sind. Die optische Drehung von  $+38^\circ$  und das IR-Spektrum sprechen für  $\beta$ -glykosidische Verknüpfungen. Das Polyglucosid enthielt jedoch noch mehrere Prozent Phosphor, was darauf zurückzuführen ist, daß auch ein Teil der nicht-acetalischen Hydroxylgruppen während der Reaktion phosphoryliert wurde. Diese nicht-acetalischen Phosphorsäureester sind jedoch offenbar nicht energiereich genug, um weitere Kondensationen einzugehen. Die Phosphorylierung läßt sich unterdrücken, wenn man in Formamid-Lösung arbeitet. Polyphosphorsäureester dehydratisiert Säureamide zu den entsprechenden Nitrilen, beim Arbeiten in Formamid entsteht Blausäure, und Acetamid wird quantitativ in Acetonitril umgewandelt. Diese Reaktion wurde inzwischen auch von anderer Seite [3] beschrieben. Formamid stumpft die phosphorylierende Wirkung des Polyphosphorsäureesters soweit ab, daß ein Gemisch aus phosphat-freien und phosphat-haltigen Glykosiden entsteht, das an einem basischen Austauscher leicht getrennt werden kann. Aus Glucose entstand in einer Gesamtausbeute von 10–20% ein phosphatfreies Polyglucosid mit einem Molgewicht von etwa 50000 und einem Drehwert von  $+16^\circ$ . Die genaue Konstitutionsermittlung dieses Polyglucosids ist noch im Gange. Beim Abbau mit Perjodat verbraucht es ein Mol  $\text{NaJO}_4$ , wie es zu erwarten ist, wenn nur 1  $\rightarrow$  4-glucosidische Verknüpfungen vorliegen.

[2] F. *Micheel* u. A. *Böckmann*, *Angew. Chem.* 72, 209 (1960).  
F. *Micheel*, A. *Böckmann* u. W. *Meckstroth*, *Makromolekulare Chem.* 48, 1 (1961).

[3] T. *Mukaiyama* u. T. *Hata*, *Bull. chem. Soc. Jap.* 34, 99 (1961); zitiert nach *Angew. Chem.* 73, 414 (1961).

Auf gleiche Weise lassen sich mit Polyphosphorsäureester Ketosen, z. B. Fructose, und Pentosen polykondensieren (siehe Tabelle 2). Genauer untersucht wurde

Monosaccharid	Polysaccharid	Molekulargewicht
Glucose	Polyglucosid ( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4)	50000
Ribose	Polyribosid ( $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 5)	40000
Fructose	Polyfructosid	40000

Tabelle 2. Synthese von Polysacchariden mit Polyphosphorsäureester

das Polyribosid. In gleicher Weise wie bei der Glucose erhielten wir ein phosphat-freies Polyribosid, für das sich aus Viscositäts- und Sedimentationsmessungen ein Molegewicht von 40 000 ergab. Die optische Drehung betrug  $+35^\circ$ . Drehwert und Abbauprobe mit Perjodat sowie die hohe Viscosität sprechen für das Vorliegen eines sterisch einheitlichen Produkts mit zumindest überwiegend  $\alpha$  1  $\rightarrow$  5-glykosidischer Verknüpfung. Wie andere Furanosidverbindungen zerfällt das Polyribosid schon in schwach saurer Lösung wieder zu Ribose.

Unter milden Bedingungen lassen sich aus den Zuckern mit Polyphosphorsäureester auch Oligosaccharide mit niederem Kondensationsgrad herstellen, die chromatographisch leicht zu trennen sind. Neben der Einheitlichkeit der Produkte bietet das Verfahren noch den Vorteil, daß sich auch empfindliche Polyglykoside herstellen lassen, und daß geringe Mengen Wasser die Reaktion nicht stören. So kann z. B. ohne weiteres die übliche kristallwasser-haltige Glucose als Ausgangsmaterial verwendet werden.

#### Beispiel: Darstellung des Polyphosphorsäureesters

150 g analysenreines  $P_2O_5$  werden in einer Mischung aus 150 ml Chloroform und 300 ml Äther unter Rückfluß gekocht, bis eine klare Lösung entstanden ist. Dies erfordert etwa 12 Stunden. Anschließend wird das Lösungsmittel abgedampft und der zähflüssige, farblose Rückstand unmittelbar zur Synthese verwendet.

#### Beispiel: Darstellung des phosphat-freien Polyglucosids

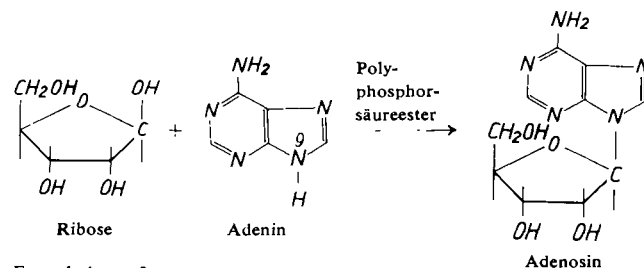
5 g Glucose: $H_2O$  und 10 g Polyphosphorsäureester werden in 50 ml Formamid gelöst und 6 Stunden unter Rühren auf  $50-60^\circ C$  erwärmt. Nach dem Erkalten wird die Lösung mit dem gleichen Volumen Wasser versetzt und 48 Stunden dialysiert. Die im Dialysierschlauch befindliche Flüssigkeit wird im Rotationsverdampfer zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird mit Methanol verrieben und mit Äther gewaschen. Der pulverförmige Rückstand wird in wenig Wasser aufgenommen und auf eine mit Ameisensäure vorbehandelte Säule des basischen Austauschers Dowex 1 X 10 gegeben. Durch Elution mit Wasser läßt sich in einer Ausbeute von etwa 15 % ein phosphat-freies Polyglucosid gewinnen.

## Darstellung von Nucleosiden

Zucker bilden mit primären oder sekundären Aminen in saurer Lösung leicht die entsprechenden N-Glykoside. Diese werden allerdings auch leicht wieder gespalten. Schwierig ist es, die Zucker mit heterocyclischen Basen

zu N-Glykosiden zu verbinden, wie sie in der Natur als Nucleoside vorkommen. Um solche Nucleoside zu synthetisieren, stellt man zunächst die Hg- oder Ag-Salze der Basen her. Diese sind zum Teil schwer zugänglich. So muß man z. B. Adenin zunächst chlorieren, um das Proton am Stickstoff-Atom 9 soweit zu lockern, daß Salzbildung möglich ist. Die Halogenatome müssen nach der Glykosidierung durch katalytische Reduktion wieder entfernt werden. Die Zucker reagieren nicht in freier Form mit den Schwermetallsalzen, sondern müssen unter Acylierung aller Hydroxygruppen in die 1-Halogenide umgewandelt werden. Diese sind häufig recht unbeständig. Am Schluß der Reaktion müssen die Acylschutzgruppen wieder entfernt werden. Entsprechend der großen Zahl von Schritten sind die Ausbeuten häufig gering [4].

Infolge der selektiven Wirkung des Polyphosphorsäureesters auf die Aldehydgruppen können freie Zucker in einem einzigen Schritt mit den Purin- und Pyrimidinbasen umgesetzt werden. So erhielten wir aus Desoxyribose und Adenin in einer Ausbeute von etwa 30 % (bezogen auf den eingesetzten Zucker) 2'-Desoxyadenosin, das in allen seinen Eigenschaften (wie z. B. UV-Absorption, Rf-Werte in verschiedenen Lösungsmittelsystemen) mit dem natürlichen Produkt identisch war.



Formelschema 2

Aus Ribose und Adenin erhielten wir nach Formelschema 2 in guter Ausbeute Adenosin, das sich im UV- und IR-Spektrum sowie im chromatographischen Verhalten vom Naturprodukt nicht unterschied. Es ist hier also ausschließlich N-9 substituiert worden. Bemerkenswert ist, daß die 6-ständige Aminogruppe bei der Reaktion frei bleibt. Wenn sie überhaupt reagiert, wird sie bei der Aufarbeitung sofort wieder freigesetzt. Als Nebenprodukte treten lediglich geringe Mengen an 2'- bzw. 3'-Adenylsäure auf, die ebenfalls mit den Naturprodukten identisch sind. Ähnlich wurde Adenin mit Fructose oder mit Acetylglucosamin zu den entsprechenden Nucleosiden verbunden (siehe Tabelle 3). Um eine Kondensation der Zucker untereinander zu vermeiden, leiteten wir die Reaktion so, daß stets ein Überschuß an Base vorhanden war. Die Ausbeuten lagen zwischen 20-60 %, bezogen auf den eingesetzten Zucker. Für die Reaktion ist ein gewisser Wasser-Gehalt des Lösungs-

Ribose + Adenin	--->	Adenosin (+ 2',3'-Adenosinphosphat)
Desoxyribose + Adenin	--->	Desoxyadenosin
Fructose + Adenin	--->	Fructosyladenin
N-Acetylglucosamin + Adenin	--->	N-Acetylglucosaminyladenin

Tabelle 3. Synthese von Nucleosiden mit Polyphosphorsäureester

[4] Zusammenfassung: A. M. Michelson, Ann. Rev. Biochem. 1961, 133.

mittels vorteilhaft, da sonst eine Zersetzung der Zucker eintritt. Die Bildungsweise entspricht weitgehend der Biosynthese dieser Nucleoside. Dies mag der Grund dafür sein, daß bevorzugt die in der Natur vorkommenden Isomeren entstehen.

#### Beispiel: Darstellung des Adenosins

##### (N(9)- [1'- $\beta$ -Ribosyl]-adenin)

1 g Adenin wird mit 0,5 ml konz. HCl in 100 ml Dimethylformamid (Wassergehalt ca. 0,2 %) unter magnetischem Rühren gelöst und 3-4 g Polyphosphorsäureester hinzugegeben. Hierauf läßt man langsam unter Rühren 200 mg D-Ribose, gelöst in 50 ml Dimethylformamid, zutropfen. Nach einer Reaktionszeit von etwa 22 h im Glycerinbad von 50 °C wird das Dimethylformamid im Wasserstrahlvakuum abdestilliert, der noch feuchte Rückstand in wenig Wasser aufgenommen und auf  $pH = 7$  eingestellt. Nach etwa 3 h im Eisschrank fällt meistens schon ein Teil des nicht umgesetzten Adenins aus. Die Lösung wird filtriert, mit Ammoniak auf  $pH = 11,0$  eingestellt und auf eine Dowex-1-formiat-X-10 Säule gegeben. Adenosin, Adenin und Adenylsäure werden nach der Vorschrift von W. E. Cohn [5] getrennt.

#### Darstellung von Nucleinsäuren aus Apurinsäuren

Bekanntlich lassen sich in der Desoxyribonucleinsäure (DNS) die N-glykosidischen Bindungen zwischen der Desoxyribose und Adenin bzw. Guanin durch vorsichtige Säurebehandlung lösen, ohne daß die Phosphatbrücken zwischen den Nucleotiden in größerem Umfang gespalten werden. Diese entpurinisierten Nucleinsäuren wurden besonders von *Chargaff* und Mitarbeitern näher untersucht und als Apurinsäuren bezeichnet [6]. Um quantitative Unterlagen für die Darstellung der Apurinsäuren zu gewinnen, verglichen *Schramm* und *Pollmann* [7] die Spaltungsgeschwindigkeit der Phosphatbrücken zwischen den Zuckerresten mit der Spaltungsgeschwindigkeit der N-glykosidischen Bindungen. Für die Messung der Spaltung der Phosphorsäurediester zu sekundären Phosphaten wurde eine potentiometrische Methode ausgearbeitet. Die Abspaltung der Purinreste wurde chromatographisch bestimmt. Die Hydrolysegeschwindigkeit der Phosphatgruppen wie auch die der glykosidischen Bindungen war der H-Ionenkonzentration proportional, das Verhältnis dieser Geschwindigkeiten also vom  $pH$  unabhängig. In Tabelle 4 sind die bei  $pH = 2,4$  gefundenen Hydrolysegeschwindigkeiten für Desoxyribonucleinsäure (DNS) und Ribonucleinsäure (RNS)

	$k_{Pu} \cdot 10^6 \{min^{-1}\}$	$k_{Phosphat} \cdot 10^6 \{min^{-1}\}$
RNS	1,2	6,4
DNS	780	6,6

Tabelle 4. Geschwindigkeitskonstanten für die Hydrolyse bei  $pH = 2,4$ ;  $T = 37^\circ C$

angegeben. Danach verläuft die Phosphathydrolyse bei beiden Nucleinsäuretypen gleich schnell, die glykosidischen Bindungen werden jedoch bei der DNS 650 mal

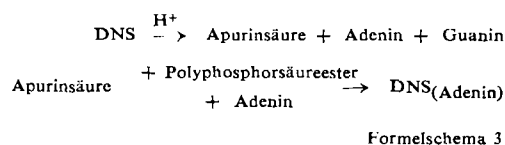
[5] W. E. Cohn, J. Amer. chem. Soc. 72, 1471 (1950).

[6] Ch. Tamm, M. E. Hodes u. E. Chargaff, J. biol. Chemistry 195, 49 (1952).

[7] W. Pollmann u. G. Schramm, Z. Naturforsch. 16b, 673 (1961).

schneller gelöst als bei der RNS. Der stabilisierende Einfluß des 2'-Hydroxyls wirkt sich bei der RNS überraschend stark aus. Bei der DNS können also durch saure Hydrolyse eine große Anzahl der Purinreste entfernt werden, ohne daß es zu einem Kettenbruch kommt. Bei der RNS muß man hingegen mit 6 Kettenbrüchen rechnen, ehe ein Purinrest entfernt wird.

Im Hinblick auf die genetische Funktion der DNS war der Versuch interessant, die durch Entfernung von Adenin und Guanin entstandenen Fehlstellen mit anderen Purinen oder Pyrimidinen aufzufüllen. Die freien Aldehydgruppen der Apurinsäure wurden mit Polyphosphorsäureester aktiviert und mit den entsprechenden Basen umgesetzt. Bei einer DNS aus Thymus, aus der über 90 % der Purinbasen abgespalten waren, konnten die Lücken quantitativ mit Adenin besetzt werden (Formelschema 3). Die neue Nucleinsäure zeigte im Gegensatz zur Apurinsäure keine Aldehydfunktion mehr,



und nach der Hydrolyse ließen sich chromatographisch die theoretisch zu erwartenden Mengen an Desoxyadenosin nachweisen. Für die natürliche Konfiguration des Syntheseprodukts spricht ferner, daß es durch Desoxyribonuclease und Schlangengift-Diesterase hydrolysiert wird.

Die Apurinsäuren können nach Aktivierung mit Polyphosphorsäureester auch mit anderen Basen umgesetzt werden. Um den Einbau quantitativ messen zu können, wurden radioaktiv markierte Basen verwendet. Als Kontrolle diente jeweils ein Ansatz, der statt des Polyphosphorsäureesters eine äquivalente Menge Phosphorsäure enthielt. Die erzielten Einbauraten sind in Tabelle 5 zusammengestellt. Pyrimidine werden danach langsamer eingebaut als Purine. Durch Verlängerung der Reaktionszeiten ließen sich die eingebauten Mengen erhöhen.

Base	Einbau [%]	Reaktionszeit [Std.]
Adenin	96	24
Guanin	40	24
Orotsäure	40	24
Thymin	5	48
Uracil	8	48

Tabelle 5. Einbau von  $^{14}C$ -Basen in Apurinsäure mit Polyphosphorsäureester bei  $37^\circ C$  in Dimethylformamid

Bemerkenswert ist, daß die Einführung der Basen nicht nur in Dimethylformamid, sondern auch in wäßriger Lösung gelingt, wenn auch die Ausbeute hier geringer ist. Damit ergibt sich die Möglichkeit, die DNS auch in der Zelle in definierter Weise zu verändern und die Auswirkung der Änderung des Basenmusters auf die Genfunktion zu untersuchen. Entsprechende Versuche sind im Gange. Neben der sauren Hydrolyse sind andere Verfahren bekannt, um selektiv bestimmte Basen aus DNS und RNS abzuspalten. In unserem Institut wurde

von Schuster [8] die Abspaltung von Uracil aus RNS mit Hydroxylamin untersucht. Durch Aktivierung der freigesetzten Aldehydgruppen mit Polyphosphorsäureester und Umsetzung mit natürlichen und unnatürlichen Basen kann ein breites Spektrum verschiedener Nucleinsäuren hergestellt werden.

### Darstellung von Nucleinsäuren durch Polykondensation von Nucleotiden

Das eben beschriebene Verfahren kann als eine partielle Synthese von Nucleinsäuren angesehen werden. Schließlich gelang uns auch die vollständige Synthese von Nucleinsäuren aus den Nucleotiden ohne Benutzung von Enzymen. Das Problem der Polykondensation von Nucleotiden zu Nucleinsäuren hat schon viele Laboratorien beschäftigt.

Khorana [9] und Mitarbeiter setzten Thymidylsäure mit Dicyclohexyl-carbodiimid um und kondensierten die aktivierten Phosphate zu Oligonucleotiden. Hierbei wurde nur ein mittlerer Polymerisationsgrad von 3 bis 4 erzielt. Michelson [10] konnte Nucleotide mit Tetraphenylpyrophosphat oder Diphenylphosphorchloridat in wasserfreiem Dioxan unter Zusatz von Tri-n-butylamin in die cyclischen 2'.3'-Phosphate umwandeln. Wurden Ammoniumsalze dieser cyclischen Phosphate mit weiterem Tetraphenylpyrophosphat behandelt, so bildeten sich Oligonucleotide, die allerdings nur eine Kettenlänge von maximal 12 Nucleotiden aufwiesen. Cramer [11] beschrieb eine Methode zur Kondensation von Nucleotiden, bei der die Nucleotide scharf getrocknet und dann in absolutem Dimethylformamid und Tri-n-butylamin mit dem Enolphosphat des Malonesters umgesetzt werden. Cramer erhielt auf diesem Wege einen Adenosin-diäthylpyrophosphorsäureester, der sich zur Polyadenylsäure kondensieren ließ. Mit einer Ausbeute von nur 3 % wurde eine Polythymidylsäure hergestellt, die maximal 5 Nucleotideinheiten aufwies.

Die bisherigen Verfahren haben also nur zu Oligonucleotiden mit geringem Polymerisationsgrad geführt. Eine der Hauptschwierigkeiten besteht darin, daß bei derartigen Polymerisationen die Oligonucleotide intramolekular cyclisiert werden, womit eine weitere Kettenverlängerung unmöglich wird. Eine einfache Überlegung zeigt, daß hohe Polymerisationsgrade nur zu verwirklichen sind, wenn man mit sehr konzentrierten Nucleotidlösungen arbeitet. Durch Umkehrung des Ziegler'schen Verdünnungsprinzips gelang es uns, eine Bevorzugung der intermolekularen Kondensation vor der intramolekularen Cyclisierung zu erreichen. Um möglichst hohe Konzentrationen zu erzielen, vermischten wir die zu kondensierenden Nucleotide direkt mit dem zähflüssigen Polyphosphorsäureester und ließen die Masse bei 50–60°C rotieren. Als günstig hat sich der Zusatz von Pyridin erwiesen, das infolge seiner nucleophilen Eigenschaften als Katalysator für ähnliche Reaktionen bekannt ist. Die Eigenschaften der hochmolekularen, nichtdialysablen Polynucleotide, die aus verschiedenen Nucleotiden hergestellt wurden, findet man in Tabelle 6.

[8] H. Schuster, J. mol. Biology 3, 447 (1961).

[9] G. M. Tener, H. G. Khorana, R. Markham u. E. H. Pol, J. Amer. chem. Soc. 80, 6223 (1958).

[10] A. M. Michelson, J. chem. Soc. (London) 1959, 1371, 3655.

[11] F. Cramer, Angew. Chem. 73, 49 (1961).

	$s_{20}$	$[\eta]_v$	Molekulargewicht	Hyperchromie
Poly-A	2,5	25	21000	37 %
Poly-C	2,0	23	15000	16 %
Poly-G	2,9	28	28000	28 %
Poly-U	4,0	35	50000	20 %
Poly-T	2,3	24	18000	47 %

Tabelle 6. Eigenschaften synthetischer Polynucleotide

Es wurden auch mehrere Mischpolymerisate aus verschiedenen Nucleotiden hergestellt, die in ihren Eigenschaften den einheitlichen Polynucleotiden ähnlich sind. Bemerkenswert ist, daß auch die empfindlichen 2'-Desoxynucleotide polykondensiert werden können. Bei Verwendung von 2-Desoxythymidin-5'-phosphat als Ausgangsmaterial liegt lediglich das 3'-Hydroxyl frei vor. Es ist daher kaum ein Zweifel möglich, daß in der Polythymidylsäure (Poly-T) die Phosphatbrücken vom 5'- zum 3'-Hydroxyl geschlossen werden und damit dieselbe Konfiguration entsteht, die sich in der natürlichen DNS findet. Hierfür spricht auch, daß die synthetisch hergestellte Polydesoxythymidylsäure durch Desoxyribonuclease angegriffen wird. Die aus Sedimentations- und Diffusionsmessungen gefundenen durchschnittlichen Molgewichte liegen zwischen 15000–50000. Sie lassen sich durch Modifikation des Verfahrens vielleicht noch erhöhen. Für die Darstellung der Polyribonucleotide können die 2', 3'- oder 5'-Nucleosidmonophosphate oder die cyclischen 2', 3'-Phosphate benutzt werden. Die Natur der primär entstandenen aktiven Zwischenprodukte wurde noch nicht genauer untersucht. Die Monophosphate werden wahrscheinlich zunächst in die cyclischen Phosphate umgewandelt, diese könnten dann mit Polyphosphorsäureester zu Pyrophosphatestern weiterreagieren. Da für den Angriff der aktivierten Phosphatgruppe auf das benachbarte Molekül zwei Hydroxylgruppen zur Verfügung stehen, besteht keine Gewißheit über den sterisch einheitlichen Bau der synthetischen Polyribonucleotide. Verschiedene Versuche weisen darauf hin, daß zumindest überwiegend die Konfiguration der natürlichen Nucleinsäuren entsteht. So lassen sich die synthetischen Polyribonucleotide, soweit sie Pyrimidin-Nucleotide enthalten, durch Ribonuclease aus Pankreas spalten, was nicht der Fall sein dürfte, wenn sie überwiegend eine unnatürliche 2' → 3'- oder 2' → 5'-Verknüpfung aufwiesen. Die Pankreas-Ribonuclease greift spezifisch am 3'-Phosphat der Pyrimidin-Nucleotide an. Auf den elektronenmikroskopischen Aufnahmen der synthetischen Polyadenylsäure erkennt

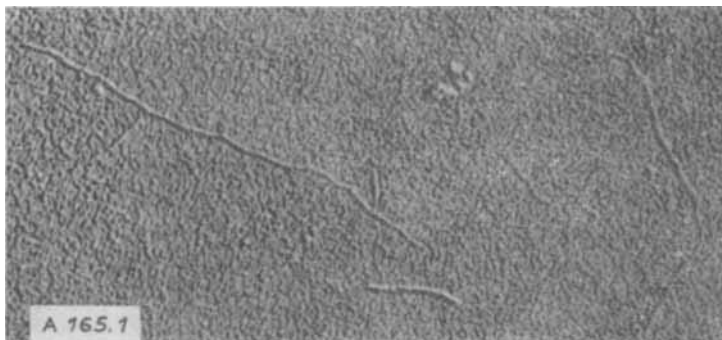


Abb. 1. Elektronenmikroskopische Aufnahme von synthetischer Polyadenylsäure. Vergrößerung: 60000-fach

man lange Fäden, die denen natürlicher, hochmolekularer RNS sehr ähnlich sind (Abb. 1). Danach scheinen Kettenverzweigungen selten zu sein. Aus der Länge der Ketten kann man schließen, daß zum Teil recht hohe Molekulargewichte erreicht werden. Wie die natürlichen Nucleinsäuren zeigen die synthetischen Polynucleotide einen starken hyperchromen Effekt. Bei den hochmolekularen Nucleinsäuren ist die UV-Extinktion durch die Wechselwirkung zwischen den heterocyclischen Basen herabgesetzt und steigt bei der Hydrolyse zu den Mononucleotiden wieder zu dem Wert an, der sich für die Summe der Nucleotide berechnet. *Michelson* [12] zeigte bei verschiedenen Oligonucleotiden, daß die Hyperchromie vom Molekulargewicht abhängt. Die in Tabelle 6 angegebenen hohen hyperchromen Effekte bestätigen den hochmolekularen Charakter der synthetischen Produkte. Aus den Versuchen von *Rich* [13] ist bekannt, daß sich die enzymatisch hergestellte Polyadenylsäure mit der hierzu komplementären Polyuridylsäure unter Erniedrigung der Extinktion zu einer Doppelhelix zusammenfügt. Der gleiche Effekt wurde auch beim Vermischen von synthetischer Polyadenylsäure mit synthetischer Polyuridylsäure beobachtet. Dies dürfte nur möglich sein, wenn beide Verbindungen eine ähnliche schraubenförmige Struktur besitzen, wie die natürlichen Nucleinsäuren.

Die Polynucleotide lassen sich auch direkt aus den Nucleosiden durch Phosphorylierung und anschließende Kondensation in einem Reaktionsschritt herstellen, allerdings ist hierbei die Ausbeute geringer, als wenn man von den Nucleotiden ausgeht. Diese Bildungsweise ist jedoch interessant im Hinblick auf die weiter unten diskutierte Möglichkeit der Entstehung der Polynucleotide im Laufe der Erdgeschichte.

#### *Beispiel: Darstellung der Polyadenylsäure aus 2'- und 3'-Monophosphaten*

350 mg Adenylsäure wurden mit 8 g Polyphosphorsäureester gemischt und 18 Stunden in einem rotierenden Kolben erwärmt, der in ein Ölbad von 55 °C eintauchte. Nach Abkühlen des Gemisches wird dieses in 50 ml Wasser gelöst und zur Entfernung des Orthophosphates und der niedermolekularen Oligonucleotide 4 Tage gegen Wasser, das NaHCO<sub>3</sub> enthält, dialysiert. Beim Gefriertrocknen der im Dialyserschlauch verbleibenden Lösung wurde Polyadenylsäure in einer Ausbeute von etwa 20 % als weißes Pulver erhalten.

### Entstehung selbstvermehrungsfähiger Systeme

Zusammenfassend ergibt sich aus unseren Versuchen, daß sich mit Polyphosphorsäureester in einfacher Weise die biologisch wichtigsten Makromoleküle herstellen lassen. Aus Aminosäuren erhält man protein-ähnliche Polypeptide, aus Zuckern Polysaccharide, aus Zuckern und heterocyclischen Basen Nucleoside, die sich durch weitere Einwirkung von Polyphosphorsäureester in Nucleotide und schließlich in Nucleinsäuren umwan-

deln lassen. Diese einfache Bildungsweise legt den Gedanken nahe, daß Polyphosphorsäureester auch bei der Entstehung dieser Makromoleküle im Lauf der Erdgeschichte eine Rolle spielten. Diese Annahme gewinnt dadurch an Wahrscheinlichkeit, daß Polyphosphate auch für den Stoffwechsel der heutigen Lebewesen von grundlegender Bedeutung sind. Verschiedene primitive Mikroorganismen enthalten große Mengen an anorganischem Polyphosphat, das nach Bedarf in organische Verbindungen eingebaut werden kann. Auf die Mitwirkung des ATP und ähnlicher Polyphosphate am Stoffwechsel wurde bereits eingangs hingewiesen. Es wurde daher bereits früher von *Schramm* [14] die Vermutung geäußert, daß Polyphosphate oder deren Derivate schon bei der Entstehung der Lebewesen oder deren Vorstufen mitgewirkt hätten und daß dieser Mechanismus im Lauf der Entwicklung immer weiter verfeinert wurde.

Eine derartige Annahme würde auch mit den geologischen Gegebenheiten im Einklang stehen. In der sterilen Periode vor der Entstehung der Lebewesen dürfte die Erdoberfläche sehr reich an organischen Substanzen verschiedener Art gewesen sein, die durch elektrische Entladung oder UV-Strahlung erzeugt wurden [15, 16]. In dem organischen Material könnten auch heterocyclische Basen enthalten gewesen sein, denn *Bredereck* [17] fand, daß Adenin in überraschend großer Menge beim Erhitzen bestimmter einfacher Nitrile entsteht. Auch *Oro* [18] stellte die Bildung von Adenin beim Erwärmen von wäßriger Ammoniumcyanid-Lösung fest. Da bei Temperaturen über 300 °C Phosphorsäure nur als Polyphosphat vorliegt, darf nach Abkühlen der Erdrinde ein Vorrat an Polyphosphaten oder reaktionsfähigen Phosphoroxiden angenommen werden, die dann durch Reaktion mit alkoxyl-haltigen Verbindungen in Phosphorsäureester übergehen konnten. Durch Einwirkung der Polyphosphorsäuren auf Aminosäuren, Zucker und heterocyclische Basen konnten diese dann polykondensieren. Aus den Modellversuchen wird bereits zu einem gewissen Grade verständlich, daß die pyranosiden Hexosen bevorzugt zu stabilen Polysacchariden kondensieren, die auch bei den heutigen Lebewesen noch wichtige Strukturelemente, z. B. in Form von Cellulose, darstellen. Die furanosiden Pentosen bilden nur instabile Polysaccharide, reagieren aber besonders leicht mit heterocyclischen Basen zu Nucleosiden.

Allerdings führen alle diese Kondensationen zunächst nur zu einer zufälligen Anordnung der Monomeren in den Makromolekülen, die daher nicht zu spezifischen Leistungen fähig sind. Der zufällige Zusammentritt der Monomeren zu einem noch so primitiven Gebilde mit den Eigenschaften eines Lebewesens ist extrem unwahrscheinlich, so daß er in der begrenzten Zeit der Erd-

[14] *G. Schramm*: Der Ursprung des Lebens auf der Erde. Internationales Symposium, Academy of Sciences of the USSR, Moskau 1957, Seite 216.

[15] *L. Roka*: Vermutungen über die Entstehung des Lebens. Mosbacher Kolloquium über Vergleichend Biochemische Fragen. Springer-Verlag, Heidelberg 1956.

[16] *A. J. Oparin*: Die Entstehung des Lebens auf der Erde. Verlag Volk und Wissen, Berlin/Leipzig 1947.

[17] *H. Bredereck, F. Effenberger u. G. Rainer*, Angew. Chem. 73, 63 (1961).

[18] *J. Oro*, Fed. Proc. 20, 352 (1961).

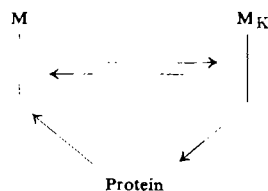
[12] *A. M. Michelson*, J. chem. Soc. (London) 1959, 1371.

[13] *G. Felsenfeld u. A. Rich*, Biochim. biophysica Acta 26, 457 (1957).

geschichte nicht vorgekommen sein kann. Das Zustandekommen ungeordneter Proteine oder Nucleinsäuren erklärt daher noch in keiner Weise die Entstehung des Lebens.

Die Entstehung biologischer Makromoleküle mit einer spezifischen Anordnung der Bausteine wäre denkbar, wenn man eine schrittweise Weiterentwicklung einfacher molekularer Systeme zu immer höheren und vielfältigeren Leistungen annimmt. Eine Entwicklung im biologischen Sinne setzt aber das Vorhandensein selbstvermehrungsfähiger Anordnungen voraus, also von Systemen, die Nachkommen erzeugen. Nach dem *Darwin*-schen Prinzip der Evolution durch Mutation und Selektion würden sich von solchen molekularen selbstvermehrungsfähigen Systemen diejenigen durchsetzen, die sich am schnellsten und sichersten vermehren. Durch kleine Änderungen im Laufe der Vermehrung könnte sich das System immer weiter verbessern.

Welches sind nun die Mindestbedingungen für das Zustandekommen eines selbstvermehrungsfähigen Systems? Diese Frage kann dadurch beantwortet werden, daß wir die molekularen Vorgänge bei der Vermehrung der heutigen Lebewesen betrachten. Bei diesen Vorgängen spielen bekanntlich die Nucleinsäuren eine beherrschende Rolle. Bei äußerster Vereinfachung läßt sich die Selbstvermehrung der Lebewesen auf folgendes Prinzip zurückführen. *Watson* und *Crick* [19] zeigten, daß an einer aus Nucleotiden bestehenden Molekülkette aus räumlichen und chemischen Gründen nur die Anlagerung einer hierzu komplementären Nucleotidkette möglich ist. Die weitere Forschung zeigte, daß ein



Schema 4

Nucleotidstrang als Matrize für die Bildung des komplementären Stranges dient, der seinerseits wieder die Matrize für die Bildung des ursprünglichen Stranges ist. Die Matrize  $M$  katalysiert also die Bildung der Matrize  $M_K$  und diese wieder die Bildung von  $M$  (Schema 4). Diese Matrizen dienen jedoch nicht nur der Selbstvermehrung, sondern bestimmen auch auf einem komplizierteren Wege, der hier nicht näher erörtert werden soll, die Struktur der Proteine, die nun wiederum als Enzyme die Selbstvermehrung der Nucleotidketten beschleunigen und steuern.

Wir fanden nun, daß das Prinzip sich gegenseitig katalytisch beeinflussender Matrizen auch bei der nicht-enzymatischen Synthese der Nucleinsäuren nachzuweisen

[19] *J. D. Watson* u. *F. H. C. Crick*, *Nature* (London) 171, 737, 964 (1953).

ist. Wir verfolgten die Polykondensation von Uridylsäure in Gegenwart und in Abwesenheit der komplementären Polyadenylsäure (Poly-A). Abb. 2 zeigt, daß

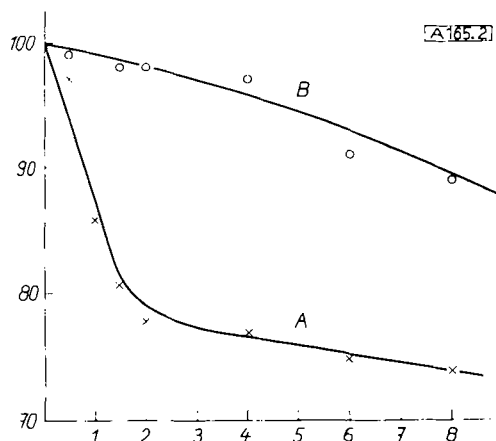


Abb. 2. Polykondensation von Uridin-monophosphat (A) in Gegenwart und (B) in Abwesenheit von Polyadenylsäure. Die Abnahme von freiem Uridin-monophosphat wurde chromatographisch gemessen. Abszisse: Zeit [Stunden]. Ordinate: % freies Uridin-monophosphat (bezogen auf die Ausgangsmenge)

durch die Gegenwart von Poly-A die Kondensation von Uridylsäure auf das mehr als 10-fache beschleunigt wird, dagegen hat Polyuridylsäure (Poly-U) keine beschleunigende Wirkung. Das bedeutet, daß die Kondensation zu Nucleotidketten jeweils durch den komplementären Strang begünstigt wird. Wenn also im Lauf der Erdgeschichte gewisse Selektionsvorteile bei der Bildung eines Nucleotidstranges erzielt wurden, so wirkten diese sich günstig auf die Bildung des hierzu komplementären Stranges aus, der nun wiederum die Bildung des ursprünglichen Stranges beschleunigt. Es wird so verständlich, daß sich ein solches System zu immer höherer Vollkommenheit aufschaukeln kann. Wir stellten weiterhin fest, daß die Zugabe eines synthetisch gewonnenen Polypeptids, nämlich von Polyarginin, sich günstig auf Bildung von Polyuridylsäure auswirkt. Es bleibt zu prüfen, wie weit Nucleotidmatrizen die nicht-enzymatische Synthese derartiger Polypeptide beschleunigen können. Wenn dies der Fall ist, wäre der Kreis der sich gegenseitig erzeugenden und bedingenden Katalysatoren geschlossen und gedanklich der Weg zu einem Regelkreis frei, der sich durch zufällige kleine Veränderungen immer weiter verbessern kann. Der Grundgedanke ist also, daß durch zufällige kleine Änderungen des einen Katalysators die Bildung des anderen, davon abhängigen Katalysators beeinflusst wird und dieser wiederum die Bildung des ersten verbesserten Katalysators beeinflusst. Wieweit der Weg von derartigen molekularen Systemen zu den Lebewesen ist, soll hier nicht näher erörtert werden. Wichtig erscheint uns zunächst, die hier vorgelegte Hypothese durch weitere Modellexperimente und sorgfältige kinetische Messungen zu festigen.

Eingegangen am 20. Juli 1961

[A 165]