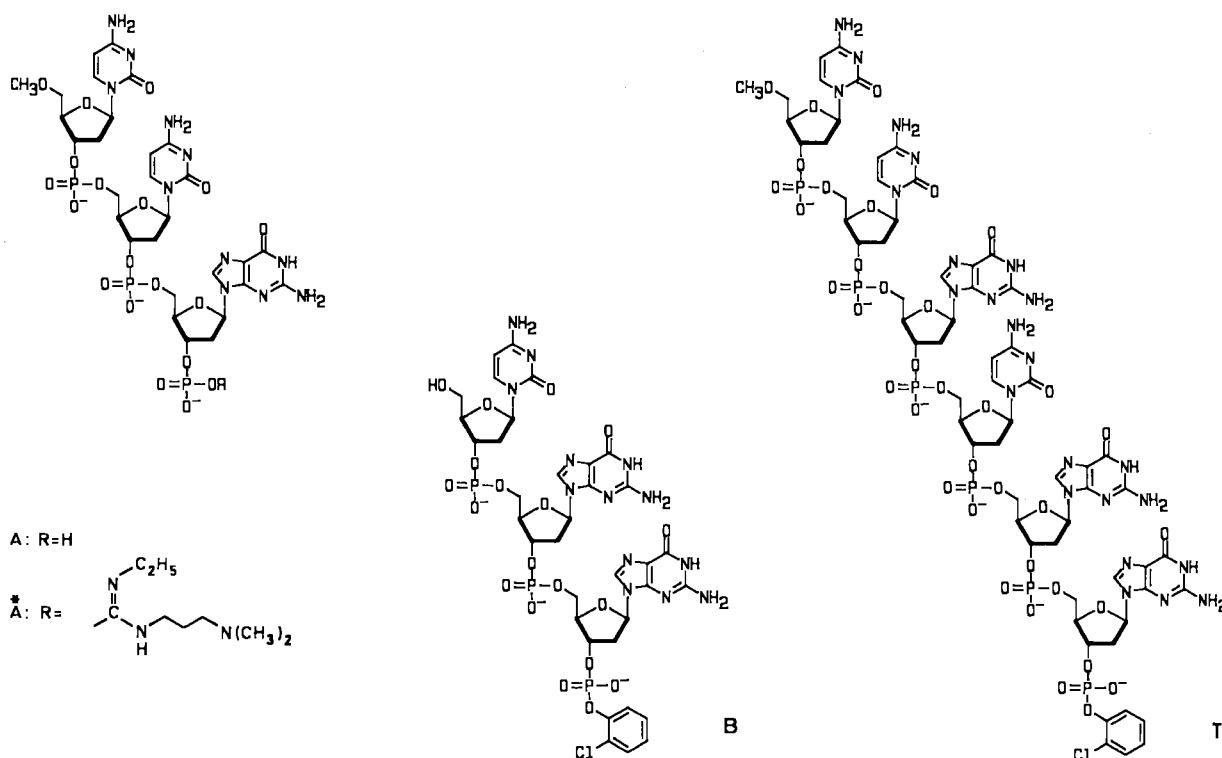


## Ein selbstreplizierendes Hexadesoxynucleotid\*\*

Von *Günter von Kiedrowski\**

Nichtenzymatische, matrizengesteuerte Synthesen von Oligonucleotiden, erstmals 1966 durch *Naylor* und *Gilham* beschrieben<sup>[1]</sup>, sind im Rahmen von Studien zur Chemie präbiotischer Kondensationsreaktionen von monomeren Purin-ribonucleosid-5'-phosphoimidazoliden an oligomeren und polymeren Ribonucleotiden und Desoxyribonucleotiden als Matrizen von *Orgel* et al. intensiv untersucht worden<sup>[2]</sup>. *Inoue* et al. haben bei der Cooligokondensation der 5'-Phospho-2-methylimidazolidine des Cytidins und Guanosins an der Matrize C-C-G-C-C nachweisen können, daß der vollkomplementäre (–)-Strang pG-G-C-G-G in Ausbeuten bis zu 18% gebildet wird und damit einen Fall für transkriptive Informationsübertragung in einem nicht-

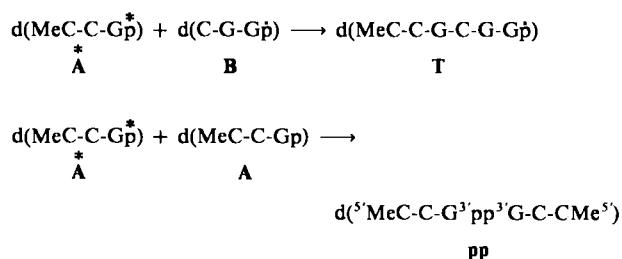
cleotide an einer hexameren Matrice mit Palindromsequenz. Die Oligonucleotide wurden nach der Phosphotriester methode in Lösung hergestellt<sup>[7]</sup>; es handelt sich um d(MeC-C-Gp) **A**, ein Tridesoxyribonucleotid-3'-phosphat, dessen 5'-Terminus als Methylether geschützt ist, um d(C-G-Gp) **B**, ein komplementäres Tridesoxynucleotid-3'-phosphat mit 3'-terminaler *o*-Chlorphenylschutzgruppe, sowie um d(MeC-C-G-C-G-Gp) **T**, ein selbstkomplementäres Hexadesoxyribonucleotid-3'-phosphat mit einer Methylgruppe am 5'-Ende und einer *o*-Chlorphenylgruppe am 3'-Ende<sup>[8]</sup>. Zur in-situ-Aktivierung des Bausteins **A** wird – wie bei chemischen Verknüpfungen von Oligodesoxynucleotid-3'-phosphaten üblich<sup>[9]</sup> – das wasserlösliche 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethyl-carbodiimid (CDI) benutzt, das mit der 3'-Phosphatgruppe von **A** unter Bildung des Carbodiimidadduktes **A** reagiert.



zymatischen System konstituiert<sup>[3]</sup>. Selbstreplikation, bei der sich der synthetisierte (–)-Strang vom (+)-Strang abtrennt und dann beide Stränge als Matrize fungieren, wurde dagegen in nichtenzymatischen Reaktionen bisher nicht beobachtet. Ein solcher Vorgang wäre autokatalytisch und wird seit geraumer Zeit in Theorien über den Ursprung des Lebens als Schlüsselprozeß beschrieben, der den Übergang von der chemischen Evolution in die biologische Evolution eingeleitet haben soll<sup>[4–6]</sup>.

Wir berichten nun über den Nachweis der Autokatalyse in einer matrizengesteuerten Kondensation zweier Trinu-

Die Kondensationsreaktionen zwischen den Bausteinen **A** und **B** wurden in 1- $\mu$ L-Kapillargefäßen bei 0°C durchgeführt und durch HPLC<sup>[2]</sup> verfolgt. Immer entstanden zwei Produkte: die Matrize **T** und ein durch Selbstkondensation aus **A** gebildetes, 3'-3'-verknüpftes Pyrophosphat **pp**:



Die gleichen Produkte entstanden, wenn das 3'-Phosphoimidazolid von A als aktivierter Baustein eingesetzt wurde. Eine Erhöhung der Reaktionstemperatur von 0°C auf 22°C bewirkte eine Abnahme der Matrizenproduktion und eine Zunahme der Pyrophosphatbildung. Da doppel-

[\*] Dr. G. von Kiedrowski [\*]  
Chemical Evolution Laboratory, The Salk Institute  
P.O. Box 85800, San Diego, CA 92138 (USA)

[\*] Neue Adresse: Institut für Organische Chemie der Universität  
Tammannstraße 2, D-3400 Göttingen

\*\*\* Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der National Aeronautic and Space Administration (NASA) gefördert. Der Autor dankt Prof. Dr. L. E. Orgel für die Ermöglichung dieser Arbeit sowie für wertvolle Hinweise, ferner A. Hill für technische Hilfe, Dr. N. Assa-Munt für die Aufnahme der NMR-Spektren und Dr. C. K. Bieler für Unterstützung bei Simulationen des Reaktionsablaufs.

strängige Oligonucleotide bei Temperaturerhöhung aufschmelzen, sollte die Bildung von T vorwiegend über Doppelstrang-Spezies verlaufen, während an der von pp überwiegend Einzelstrang-Spezies beteiligt sind.

Für den Nachweis der Autokatalyse in der Matrizenproduktion wurde die Anfangskonzentration an Matrize  $c_0(T)$  bei konstanten Anfangskonzentrationen aller übrigen Komponenten variiert. Ein ca. 17facher Überschuß an CDI über A ermöglichte die wiederholte in-situ-Aktivierung des durch Hydrolyse verbrauchten A. Die Trinucleotide A und B wurden in mindestens 15fachem Überschuß über T eingesetzt, so daß die anfängliche Reaktionsordnung der Matrizenproduktion bezüglich der Matrize bestimmt werden konnte. Abbildung 1 zeigt links den zeitlichen Verlauf der Matrizenproduktion bei verschiedenen  $c_0(T)$ -Werten. Wie es für einen Autokatalysator zu erwarten ist, führt ein Anstieg in  $c_0(T)$  zu einem Anstieg in der Bildungsgeschwindigkeit von T. Dagegen wird die Bildungsgeschwindigkeit des Pyrophosphats pp nur wenig von  $c_0(T)$  beeinflusst (Abb. 1, rechts). Die geringfügige Hemmung bei Erhöhung von  $c_0(T)$  ist darauf zurückzuführen, daß T und pp bei ihrer Bildung um das aktivierte Trinucleotid A konkurrieren. Da nach vier Tagen die Gesamtausbeute an T und pp immer weniger als 12% beträgt (bezogen auf A), wird die Abflachung der Kurven nicht durch den Verbrauch der Trinucleotide, sondern durch die Hydrolyse des Carbodiimids verursacht.

Die Geschwindigkeit der Matrizenbildung zu Beginn der Reaktion  $[dc(T)/dt]_{\text{Anfang}}$  läßt sich durch ein empirisches Geschwindigkeitsgesetz beschreiben;  $[dc(T)/dt]_{\text{Anfang}}$  setzt sich aus einem autokatalytischen - durch die Konstante  $k_a$  gekennzeichneten - Beitrag mit der Reaktionsordnung  $p$  in der Matrizenkonzentration  $c_0(T)$  sowie einem nichtautokatalytischen Beitrag ( $k_b$ ) zusammen:

$$[dc(T)/dt]_{\text{Anfang}} = k_a c_0(T)^p + k_b$$

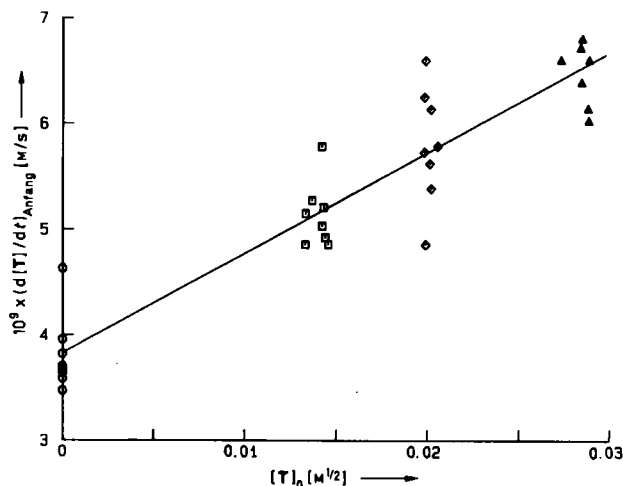


Abb. 2. Auftragung der Anfangsgeschwindigkeit der Matrizenproduktion  $[dc(T)/dt]_{\text{Anfang}}$  gegen die Quadratwurzel aus  $c_0(T)$ . Reaktionsbedingungen und Meßmethode wie bei Abbildung 1 beschrieben. Die Anfangsgeschwindigkeiten entstammen Messungen der Matrizenproduktion innerhalb der ersten 12 h (linearer Bereich in Abb. 1, links). Die Ausgleichsgerade gibt die Lösung der Parameter  $k_a$  und  $k_b$  für eine Reaktionsordnung von  $p = 1/2$  unter Berücksichtigung sämtlicher Wertepaare wieder.

$k_a$  und  $k_b$  wurden für verschiedene Reaktionsordnungen  $p$  mit Regressionsrechnungen aus den Anfangsgeschwindigkeiten bestimmt, wobei der Parametersatz mit der Summe der kleinsten Fehlerquadrate für  $p = 0.48$  erhalten wurde. Mit nur geringfügig größerer Summe der Fehlerquadrate lautet der Parametersatz für eine Reaktionsordnung von  $p = 1/2$ :  $k_a = 9.48 \cdot 10^{-8} \text{ M}^{1/2} \text{ s}^{-1}$ ,  $k_b = 3.83 \cdot 10^{-9} \text{ M s}^{-1}$ . Beim Auftragen der Anfangsgeschwindigkeit gegen die Quadratwurzel aus  $c_0(T)$  ergibt sich hieraus die in Abbildung 2 gezeigte Gerade.

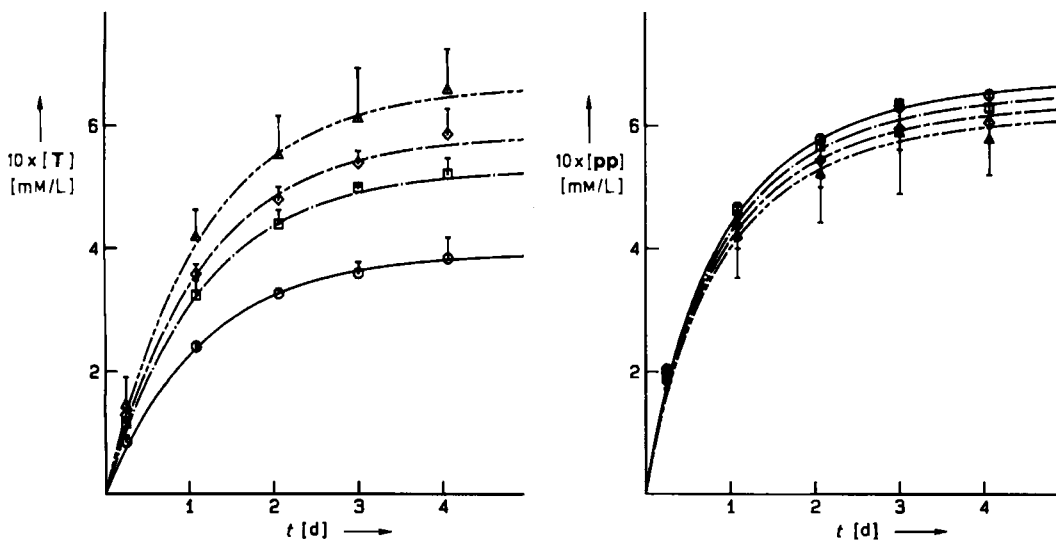


Abb. 1. Zeitlicher Verlauf der Matrizen- (links) und Pyrophosphatproduktion (rechts) in Gegenwart verschiedener Anfangskonzentrationen an Matrize T. Aufgetragen sind Durchschnittswerte und Streubreiten der Konzentrationen aus vier unabhängigen Meßserien mit je vier parallel durchgeführten Experimenten. Grundzusammensetzung der Reaktionsmischungen: 0.012 M A, 0.01 M B, 0.2 M CDI, 0.1 M 2-Morpholino-ethansulfonsäure (pH 6.15), 0.05 M  $\text{MgCl}_2$ ; Anfangskonzentrationen der Matrize T:  $\circ = 0 \text{ mM}$ ,  $\square = 0.02 \text{ mM}$ ,  $\diamond = 0.04 \text{ mM}$ ,  $\triangle = 0.08 \text{ mM}$ . Die Reaktionsmischungen wurden in Volumina von 10  $\mu\text{L}$  bereitet und sofort in 1- $\mu\text{L}$ -Präzisionskapillaren (Micro Caps) gezogen. Die Kapillaren wurden bei  $0^\circ\text{C}$  und konstanter Luftfeuchtigkeit in einem Exsikkator aufbewahrt und nach Ablauf der Reaktionszeit in HPLC-Quencherlösungen (4 mL  $10^{-3} \text{ M}$  Ethylendiamin-*N,N,N',N'*-tetraacetat, pH 11) pipettiert. Die HPLC-Trennungen (Injektionsvolumen: 1 mL) wurden auf einer RPC-5-Säule [2] unter Verwendung eines linearen Perchloratgradienten (0–0.05 M  $\text{NaClO}_4$ , pH 12, 50 min, Flußgeschwindigkeit: 1 mL/min) durchgeführt und durch Messung der UV-Absorption bei 254 nm verfolgt. Bei der Berechnung der Nucleotidkonzentrationen aus den HPLC-Integralen wurden Hypochromieeffekte vernachlässigt.

Ein Reaktionsmechanismus, der die Autokatalyse erklärt und mit den kinetischen Daten im Einklang steht, ist in Abbildung 3 wiedergegeben. Die Matrize T bildet zunächst mit A und B reversibel einen gemischten Komplex

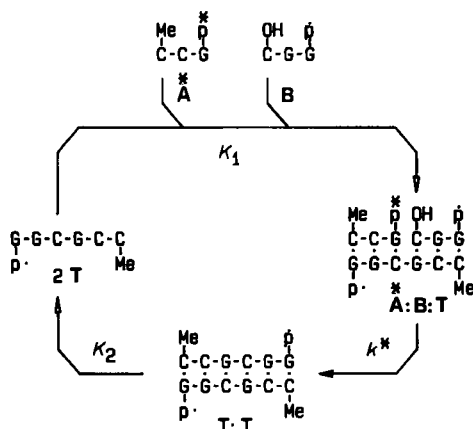


Abb. 3. Reaktionsmechanismus für die autokatalytische Matrizenproduktion. Die Reaktionspfeile mit weißen Spitzen symbolisieren reversible Reaktionen, der mit der schwarzen Spitze kennzeichnet einen irreversiblen Vorgang.

$\dot{A}:B:T$ , der durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Basen zusammengehalten wird. Kondensation überführt  $\dot{A}:B:T$  irreversibel in die selbstkomplementäre Doppelstrang-Spezies **T:T**. Diese kann reversibel in zwei Matrizenmoleküle **T** dissoziieren, die unter Komplexbildung mit **A** und **B** erneut in den katalytischen Kreislauf eingeschleust werden. Aus thermodynamischen und kinetischen Daten vergleichbarer Oligonucleotide<sup>[10]</sup> kann geschlossen werden, daß unter den Reaktionsbedingungen die meisten Matrizenmoleküle als **T:T**-Komplex, ein kleiner Anteil als  $\dot{A}:B:T$ -Komplex und nur ein verschwindend geringer Anteil als Einzelstrang-Spezies **T** vorliegen. Da man annehmen muß, daß die Geschwindigkeit der Phosphodiesterbildung in  $\dot{A}:B:T$  langsam ist gegenüber allen reversiblen Schritten (insbesondere gegenüber der Dissoziation von **T:T**), kann das System in Bezug auf die Komplexbildungen als zu jeder Zeit äquilibriert betrachtet werden. Folglich läßt sich die Gleichgewichtskonzentration von  $\dot{A}:B:T$  durch die Gleichgewichtskonzentration von **T:T** ausdrücken. Mit

$$K_1 = \frac{[\dot{A}:B:T]}{[\dot{A}][B][T]} \quad \text{und} \quad K_2 = \frac{[T:T]}{[T]^2}$$

ergibt sich für die Geschwindigkeit der matrizen gesteuerten Kondensation, die nach erster Ordnung in  $\dot{A}:B:T$  verläuft:

$$\frac{d[T:T]}{dt} = k^*[\dot{A}:B:T] = k^* K_1 K_2^{-1/2} [\dot{A}][B][T:T]^{1/2}$$

Hiernach ist für die **T:T**-Bildung in Bezug auf **T:T** eine Reaktionsordnung von 1/2 zu erwarten. Da die Gleichgewichtskonzentration  $[T:T]$  nur wenig verschieden von der halben Gesamtkonzentration  $c(T)$  der Matrizenmoleküle sein sollte, liefert der Ausdruck gleichzeitig eine Deutung für  $k_a$  im autokatalytischen Term des empirisch gefundenen Geschwindigkeitsgesetzes.

Wir haben zeigen können, daß die den Nucleinsäuren inhärente Fähigkeit zur Selbstreplikation bereits auf der Stufe eines *chemischen* – keinerlei enzymatische Hilfe erfordernden<sup>[11]</sup> – Modellsystems nachweisbar ist. Obwohl

die Geschwindigkeit der autokatalytischen Matrizenproduktion unter den gewählten Reaktionsbedingungen vergleichsweise gering gegenüber dem nicht autokatalytischen Beitrag ausfällt, ist der Effekt der Autokatalyse per se nicht übersehbar. Weitere Experimente müssen zeigen, ob Autokatalyse auch in anderen Modellsystemen aus Oligonucleotiden auftritt und ob und inwieweit sie durch Wahl geeigneter „Umweltfaktoren“ und „Energiequellen“ noch verstärkt werden kann. Sollte dies gelingen, so sind bei kontinuierlicher Reaktionsführung eine Reihe interessanter Selbstorganisationsprozesse zu erwarten, die Selektionsvorgängen in biologischen Systemen ähneln<sup>[12]</sup>.

Eingegangen am 20. Juni,  
veränderte Fassung am 21. Juli 1986 [Z 1825]

- [1] R. Naylor, P. T. Gilham, *Biochemistry* 5 (1966) 2723.
- [2] L. E. Orgel, R. Lohrmann, *Acc. Chem. Res.* 7 (1974) 368; R. Lohrmann, L. E. Orgel, *J. Mol. Biol.* 142 (1980) 555; T. Inoue, L. E. Orgel, *Science* 219 (1983) 859; C. B. Chen, T. Inoue, L. E. Orgel, *J. Mol. Biol.* 181 (1985) 271.
- [3] T. Inoue, G. F. Joyce, K. Grzeskowiak, L. E. Orgel, J. M. Brown, C. B. Reese, *J. Mol. Biol.* 178 (1984) 669.
- [4] N. H. Horowitz, S. L. Miller, *Fortschr. Chem. Org. Naturst.* 20 (1962) 423; S. L. Miller, L. E. Orgel: *The Origins of Life on the Earth*, Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ, USA 1974.
- [5] M. Eigen, P. Schuster: *The Hypercycle*, Springer, Berlin 1979.
- [6] H. Kuhn, J. Waser, *Angew. Chem.* 93 (1981) 495; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 20 (1981) 500.
- [7] W. A. Denny, W. Leupin, D. R. Kearns, *Helv. Chim. Acta* 65 (1982) 2372, zit. Lit.
- [8] Triethylammoniumsalze: <sup>1</sup>H-NMR (360 MHz, D<sub>2</sub>O, 0.1 M NaCl, 0.1 M Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pD=7.5): A:  $\delta$ =8.04 (s; 8-H, Gua), 7.65, 7.59 (d; 6-H, Cyt), 6.24, 6.16, 6.06 (t; 1'-H), 5.96, 5.91 (d; 5-H, Cyt), 3.36 (s; 5'-OCH<sub>3</sub>); B:  $\delta$ =8.00, 7.81 (s; 8-H, Gua), 7.46 (d; 6-H, Cyt), 7.31, 6.98, 7.18, 7.22 (ABCD; o-Chlorphenyl), 6.17, 6.01, 5.87 (t; 1'-H), 5.90 (d; 5-H, Cyt); T:  $\delta$ =7.98, 7.86, 7.86 (s; 8-H, Gua), 7.67, 7.58, 7.47 (d; 6-H, Cyt), 7.10-7.42 (m; o-Chlorphenyl), 3.39 (s; 5'-OCH<sub>3</sub>).
- [9] Z. A. Shabarova, N. G. Dolinnaya, V. L. Drutsa, N. P. Melinkova, A. A. Purmal, *Nucleic Acids Res.* 9 (1981) 5747; Z. A. Shabarova, M. G. Ivanovskaya, M. G. Isagulians, *FEBS Lett.* 154 (1983) 288.
- [10] N. G. Dolinnaya, E. S. Gromova, *Usp. Khim.* 52 (1983) 138; S. M. Freier, D. D. Albergo, D. H. Turner, *Biopolymers* 22 (1983) 1107.
- [11] Das am besten untersuchte System zur enzymatischen Replikation von RNA in vitro ist Q $\beta$ -RNA/Q $\beta$ -Replikase; siehe dazu: C. K. Biebricher, *Evol. Biol.* 16 (1983) 1.
- [12] Nach Eigen und Schuster ist für selbstreplizierende Moleküle, die unter konstanter Organisation um ihre Bausteine konkurrieren, Darwinsches Selektionsverhalten zu erwarten, wenn die Reaktionsordnung der Autokatalyse >0 und  $\leq 1$  ist; siehe dazu [5], S. 12.

## Synthese des ersten Triphosphabutadiens\*\*

Von Rolf Appel\*, Bärbel Niemann, Winfried Schuhn und Falk Knoch

Der Ersatz von Kohlenstoffatomen des Butadiens durch dikoordinierte Phosphoratome gelang bereits mehrfach (Mono- und Diphosphabutadiene<sup>[1]</sup>). Wir berichten nun über die Synthese des ersten 1,2,4-Triphospha-1,3-butadiens, d. h. einer Verbindung, in der eine PP- und eine PC-Doppelbindung konjugiert sind.

Erstmals erhielten wir das Triphosphabutadien 2 bei der Umsetzung des 3-chlorsubstituierten 1,3,5-Triphospha-1,4-pentadiens 1<sup>[2]</sup> mit Basen wie 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en und 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan in Toluol<sup>[3]</sup>. Aus der zunächst gelben, später roten Lösung entweicht lang-

[\*] Prof. Dr. R. Appel, B. Niemann, W. Schuhn, Dr. F. Knoch  
Anorganisch-chemisches Institut der Universität  
Gerhard-Domagk-Straße 1, D-5300 Bonn 1

[\*\*] 52. Mitteilung über niederkoordinierte Phosphorverbindungen. Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Minister für Wissenschaft und Forschung des Landes Nordrhein-Westfalen gefördert. – 51. Mitteilung: R. Appel, C. Casser, F. Knoch, B. Niemann, *Chem. Ber.* 119 (1986) 2609.