

ley gebildet würden, konnten nicht nachgewiesen werden. Das Hydrid-Ion reagiert offenbar schneller mit dem Phenonium-Ion als mit dem zugesetzten Keton oder Aldehyd, da das Kation ein niedrigeres Reduktionspotential hat^[8].

Wie seit langem vermutet, disproportioniert **1** also in Gegenwart protischer Verbindungen sehr leicht. Die Befunde dieser Arbeit könnten auch helfen, einen Zugang zu den bislang unbekannten Verbindungen Cycloheptatrienol und Cyclopropenol zu finden.

Eingegangen am 8. Mai 1989 [Z 3325]

CAS-Registry-Nummern:

1, 91598-47-9; [D]-1, 122114-41-4; 3, 548-39-0; 4, 203-80-5; [D₂]-4, 122144-54-1.

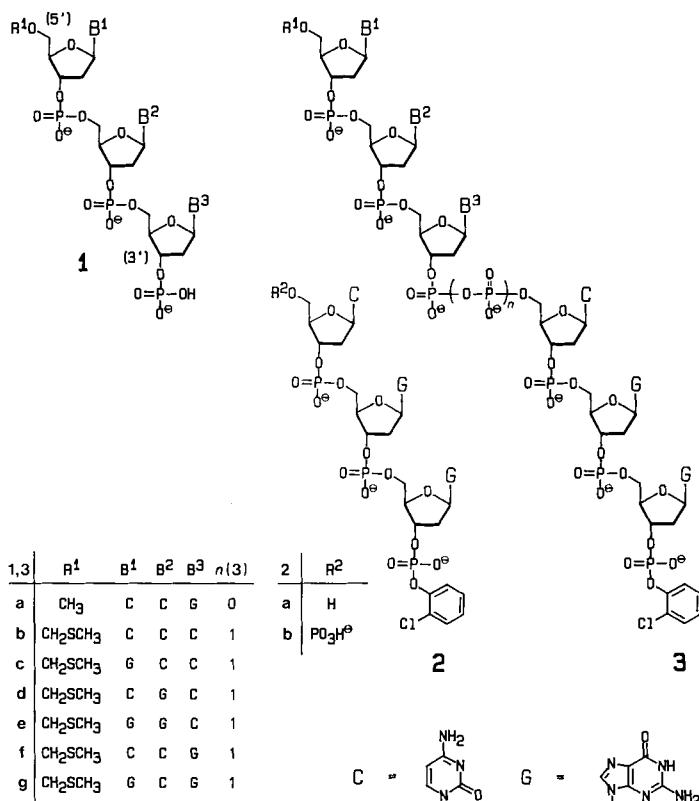
- [1] D. H. Reid, *Q. Rev. Chem. Soc.* 19 (1965) 274.
- [2] a) R. Pettit, *Chem. Ind. (London)* 1956, 1306; b) *J. Am. Chem. Soc.* 82 (1960) 1972.
- [3] a) V. Boekelheide, C. E. Larrabee, *J. Am. Chem. Soc.* 72 (1950) 1240; b) R. M. Pagni, P. D. Johnson, *Tetrahedron* 29 (1973) 3807; c) P. Boudjouk, P. D. Johnson, *J. Org. Chem.* 43 (1978) 3979.
- [4] a) J. L. Luche, L. Rodriguez-Hahn, P. Crabbe, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1978, 601; b) J. L. Luche, *J. Am. Chem. Soc.* 100 (1978) 2226.
- [5] Alle Experimente wurden in Argon-Atmosphäre durchgeführt, und durch die Lösungsmittel wurde vor Gebrauch Argon geleitet.
- [6] Gefunden: C 85.69, H 5.55%; berechnet für **1**: C 85.69, H 5.53%.
- [7] Aus dem Vergleich der ¹H-NMR-Signalintensitäten von H-2 (dd) in **1** und H-9 (d) in **3** wurde der Anteil an durch Disproportionierung von **1** gebildetem **3** auf weniger als 0.6% geschätzt.
- [8] a) H. Adkins, F. W. Cox, *J. Am. Chem. Soc.* 60 (1938) 1151; b) F. W. Cox, H. Adkins, *ibid.* 61 (1939) 3364; c) R. H. Baker, H. Adkins, *ibid.* 62 (1940) 3305.

Sequenzabhängigkeit matrizengesteuerter Synthesen von Hexadesoxynucleotid-Derivaten mit 3'-5'-Pyrophosphatverknüpfung **

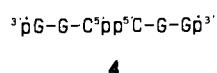
Von Günter von Kiedrowski*, Britta Wlotzka und Jörg Helbing

Chemische Modelle für selbstreplizierende Systeme sind in der chemischen Evolutionsforschung von zentralem Interesse^[1]. Mit dem Nachweis eines autokatalytischen Reaktionskanals bei der Synthese des selbstkomplementären Hexadesoxynucleotids **3a** aus den beiden komplementären Tridesoxynucleotiden **1a** und **2a** in Gegenwart von 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) als Aktivator haben wir erstmals zeigen können, daß Selbstreplikation in enzymfreien Minimalsystemen möglich ist und mit den Methoden der Bioorganischen Chemie untersucht werden kann^[2]. Kernpunkt war die Feststellung, daß das Hexamer **3a** mit einer Reaktionsordnung von 1/2 in die Kinetik seiner eigenen Synthese eingeht^[2]. Dieser Befund wurde inzwischen mit einem zweiten System aus Oligonucleotidbausteinen unabhängig bestätigt^[3].

Wir berichten hier über erste Ergebnisse zur Sequenzabhängigkeit nichtenzymatischer Synthesen von Oligodesoxynucleotiden in Gegenwart eines selbstkomplementären Oligonucleotids als Matrize. Bei diesen Untersuchungen wurden die neuartigen 5'-Methylthiomethyl(MTM)-tridesoxynucleotid-3'-phosphate^[4] **1b-h** eingesetzt, die mit dem 5'-phosphorylierten Trimer **2b** in Gegenwart von EDC unter 3'-5'-Pyrophosphatverknüpfung zu den 5'-MTM-Hexades-



oxynucleotiden **3b-h** reagieren. Als weiteres Hauptprodukt konnte das durch Selbstkondensation des Trimmers **2b** gebildete 5'-5'-verknüpfte Pyrophosphat **4** identifiziert werden, wohingegen 3'-3'-verknüpfte Pyrophosphate nur in Ausnahmefällen nachweisbar waren.



Die Reaktionen wurden in 1 μ L-Präzisionskapillaren durchgeführt und durch HPLC verfolgt (Spherisorb 50 D5 II, 4 \times 250 mm; A: 0.1 M Ammoniumacetat, B: Acetonitril/Wasser 30/70 (v/v); 15–50 % B in 16 min bei einem Fluß von 1 mL min⁻¹; Detektion bei λ = 254 nm). Messungen der Anfangsgeschwindigkeit der Bildung des Hexamers **3f** in Gegenwart steigender Anfangskonzentrationen der Matrize **3a** zeigten wie im bisher untersuchten System^[2], daß die empirische Geschwindigkeitsgleichung (1)^[5] erfüllt ist

$$dc'/dt = a \sqrt{c} + b \quad (1)$$

(Abb. 1). Demzufolge verläuft die Synthese des Hexamers **3f** sowohl über einen matrizenabhängigen Reaktionskanal, der in Abbildung 1 durch den Geradenanstieg *a* beschrieben wird, als auch über einen matrizenunabhängigen Reaktionskanal, der durch den Ordinatenabschnitt *b* erfaßt wird.

Im Gegensatz zur bisher untersuchten Reaktion von **1a** mit **2a** zu **3a** unterscheidet sich hier das Reaktionsprodukt **3f** von der eingesetzten Matrize **3a**, so daß die Konstante *a* nicht mehr eine Autokatalyse sondern eine Katalyse widerspiegelt. Unter den beschriebenen Reaktionsbedingungen^[2] ist die matrizenabhängige Synthese des Pyrophosphats **3f** etwa 21mal schneller als die von **3a**, während die matrizenunabhängige Synthesegeschwindigkeit nur um den Faktor 10 höher ist.

[*] Dr. G. von Kiedrowski, Dipl.-Chem. B. Wlotzka, Dipl.-Chem. J. Helbing
Institut für Organische Chemie der Universität
Tammannstraße 2, D-3400 Göttingen

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert.

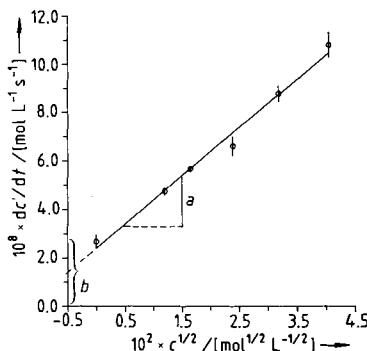
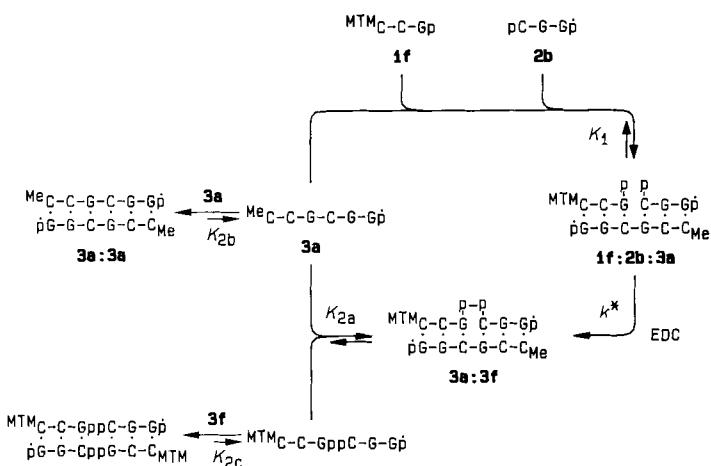


Abb. 1. Auftragung der Anfangsgeschwindigkeit der Bildung des Hexamers **3f** (dc/dt) gegen die Quadratwurzel aus der Anfangskonzentration der Matrize **3a** ($c^{1/2}$). Die Anfangsgeschwindigkeiten wurden aus Konzentrations-Zeit-Verläufen (maximaler Umsatz 25%) durch exponentielle Regression ermittelt, wobei für jede Geschwindigkeit vier Experimente mit insgesamt 16 HPLC-Läufen ausgewertet wurden. Anfangskonzentrationen und Versuchsbedingungen: 0.004 M **1f**, **2b**, $c = 0-0.002$ M, 0.2 M EDC, 0.1 M 2-Morpholinoethansulfosäure (pH 6.15), 0.05 M MgCl_2 , $T = 20^\circ\text{C}$, $t = 0-12$ h.

Nach Gleichung (1) geht der Katalysator **3a** mit halber Reaktionsordnung in die Geschwindigkeit der Synthese des Pyrophosphats **3f** ein. Dieser Befund entspricht der theoretischen Erwartung, sofern die Reaktion nach dem in Schema 1



Schema 1. Vorgeschlagener Mechanismus der matrizenabhängigen Synthese von **3f**.

abgebildeten Mechanismus verläuft und drei Voraussetzungen erfüllt sind:

1) Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt (k^*) ist die Carbodiimid-abhängige Bildung der 3'-5'-Pyrophosphatbindung in einem aus Matrize und Trimerbausteinen gebildeten Komplex **1f:2b:3a**. Es ist dabei unerheblich, ob die Aktivierung durch EDC an der 3'-Phosphatgruppe von **1f** oder an der 5'-Phosphatgruppe von **2b** vor oder nach der Bildung des Komplexes stattfindet. Aus EDC-abhängigen Pyrophosphatsynthesen auf einer nicht-selbstkomplementären Matrize (vollständig komplexiert)^[6] kann abgeschätzt werden, daß die Halbwertszeit dieses Schrittes unter den Reaktionsbedingungen in der Größenordnung von 10^3 s liegen muß.

2) Sämtliche einzel- und doppelsträngigen Oligonucleotide stehen miteinander im dynamischen Gleichgewicht, wobei ihre Konzentrationen zu jeder Zeit äquilibriert sind. Typische Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten C/G-reicher Oligonucleotide ergeben – weitgehend temperaturunabhängig – Werte zwischen 10^6 und 10^7 M $^{-1}$ s $^{-1}$ ^[7, 8]; die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten der Hexamer-Duple-

xe sollten mit der von $(\text{dC-G-C-G-C-G})_2$ vergleichbar sein und dürften sich bei $T = 25^\circ\text{C}$ in der Größenordnung von 1 s $^{-1}$ bewegen^[8].

3) Unter den Reaktionsbedingungen liegt der größte Teil der Matrizenmoleküle in Form der Komplexe **3a:3a** sowie **3a:3f**, ein kleiner Teil als Komplex **1f:2b:3a** und ein sehr kleiner Teil als Einzelstrangspezies **3a** vor. Nach vergleichenden thermodynamischen Untersuchungen an Komplexen mit pyrophosphatmodifizierten Oligodesoxynukleotiden^[6] darf erwartet werden, daß **3a:3a** nur etwa 1 kcal mol $^{-1}$ stabiler als **3a:3f** ist. Nach diesen Untersuchungen^[6] ist weiterhin anzunehmen, daß der Komplex **1f:2b:3a** eine sehr ähnliche Stabilität wie der in^[2] formulierte Komplex aus **1a**, **2a** und **3a** aufweist. Ein beträchtlicher Stabilitätsunterschied (mindestens 4 kcal mol $^{-1}$) sollte dagegen zwischen **1f:2b:3a** und **3a:3a** bestehen. Für $K_{2a} \approx K_{2b} \approx K_{2c} \gg K_1 \gg 1$ gilt bei kleinen Umsätzen dann näherungsweise die Proportionalitätsbeziehung (2).

$$a \sim k^* K_1 K_{2b}^{-1/2} \quad (2)$$

Tabelle 1 gibt Aufschluß über die Veränderungen in a und b , wenn anstelle des zur Subsequenz C-G-G der Matrize **3a** vollständig komplementären Trinukleotides **1f** nicht oder nur teilweise komplementäre Trinukleotide verwendet werden. Erwartungsgemäß ist die Geschwindigkeit im matrizenabhängigen Reaktionskanal (vgl. *a*) dann am größten, wenn die Trinukleotidsequenz optimal zur Matrize paßt; Fehlsequenzen werden unter den Reaktionsbedingungen 2- bis 50mal langsamer eingebaut. Weniger ausgeprägt machen sich die Sequenzunterschiede im matrizenunabhängigen Reaktionskanal bemerkbar (vgl. *b*), wobei auch hier das Trinukleotid **1f** am schnellsten reagiert; Trinukleotide mit 3'-terminalem Desoxyguanosin-Einheit werden im Mittel etwa viermal schneller umgesetzt als Trinukleotide mit 3'-terminalem Desoxycytidin-Einheit.

Tabelle 1. Kenngrößen für die matrizenabhängige (*a*) und matrizenunabhängige (*b*) Synthese der Hexadesoxynukleotide **3b-h** in Gegenwart der Matrize **3a**; a_{rel} und b_{rel} sind die auf *a* bzw. *b* von **3f** bezogenen Werte. Anfangskonzentrationen und Versuchsbedingungen siehe Abbildung 1.

Hexamer	$10^8 a / [\text{M}^{1/2} \text{s}^{-1}]$	a_{rel}	$10^9 b / [\text{M} \text{s}^{-1}]$	b_{rel}
3b	15.0	0.07	2.4	0.09
3c	5.3	0.02	4.9	0.19
3d	6.4	0.03	6.2	0.25
3e	106	0.53	7.6	0.31
3f	198	1.00	24.6	1.00
3g	69.8	0.35	22.8	0.92
3h	12.8	0.06	11.5	0.46

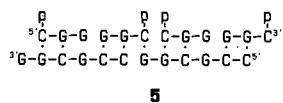
Grundsätzlich wird das 5'-5'-verknüpfte Pyrophosphat **4** in Gegenwart der Matrize **3a** immer etwas langsamer gebildet, da seine Synthese mit der eines 3'-5'-verknüpften Produkts um gemeinsame aktivierte Vorstufen konkurriert. Bei Abwesenheit der Matrize **3a** erweisen sich für **3b-e, g, h** die Summen der Reaktionsgeschwindigkeiten für die Synthese des 3'-5'-verknüpften Produkts **3** und des 5'-5'-verknüpften **4** als vergleichbar ($\Sigma = (2.18 \pm 0.16) \times 10^{-8} \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$), während die aus Experimenten mit **1f** ermittelte Geschwindigkeitssumme ($\Sigma = 5.55 \times 10^{-8} \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$) signifikant abweicht.

Die Unterschiede in *a* lassen sich damit erklären, daß es sich bei den Synthesen der Hexamerpyrophosphate **3b-f** in Gegenwart des Hexamers **3a** um matrizensteuerte Reaktionen handelt, die über Komplexe vom Watson-Crick-Typ verlaufen. Nach Gleichung (2) ist die Observable *a* sowohl

von der Kinetik der Pyrophosphatverknüpfung (k^*) als auch vom Stabilitätsunterschied zwischen dem jeweiligen reaktionsbeteiligten Komplex **1:2b:3a** und dem Matrizenduplex **3a:3a** ($K, K_{2b}^{-1/2}$) abhängig. Die Stabilität der Komplexe **1:2b:3a** wird durch die Anzahl der C/G-Basenpaare bestimmt, so daß eine optimale Stabilität nur im Komplex **1f:2b:3a** erreicht wird. In allen übrigen Komplexen treten zwangsläufig destabilisierende „Mismatch“-Paare auf, wobei G/G-Mismatch-Paare im allgemeinen eine geringere Destabilisierung bewirken als C/C-Mismatch-Paare^[17]. Mismatch-Paare in der Nähe des Reaktionszentrums sollten die Kinetik der 3'-5'-Pyrophosphatverknüpfung stärker beeinflussen als weiter entfernte. So reagiert z. B. das Trimer **1g**, dessen Komplex **1g:2b:3a** ein endständiges G/G-Mismatch-



Paar aufweist, schneller als das sequenzisomere Trimer **1h**, dessen Komplex **1h:2b:3a** ein näher am Reaktionszentrum gelegenes G/G-Mismatch-Paar enthält. Überraschenderweise zeigt aber **1e**, das in einem analogen Komplex drei Mismatch-Paare aufwiese, ein mit **1g** vergleichbares Reaktionsverhalten. Eine mögliche Erklärung wäre die Beteiligung eines „verketteten“ Komplexes vom Typ **5**, in dem wie in **1g:2b:3a** ein entfernt liegendes G/G-Mismatch-Paar formuliert werden kann.



Aus thermodynamischen Daten von vergleichbaren Oligonucleotiden^[19] läßt sich abschätzen, daß das Trimerenpaar aus **1f** und **2b** unter den Reaktionsbedingungen anteilig als doppelsträngiger Komplex existieren kann. Das Reaktionsverhalten eines doppelsträngigen Komplexes sollte sich bei der Aktivierung, Hydrolyse und Pyrophosphatsynthese vom Reaktionsverhalten einzelsträngiger Trimere unterscheiden. Wir sehen darin die Ursache, daß in den Reaktionen mit **1f** matrizenunabhängig (vgl. b) sowohl das 3'-5'-verknüpfte Pyrophosphat **3f** als auch das 5'-5'-verknüpfte **4** mit größter Geschwindigkeit gebildet werden.

Die beschriebenen Ergebnisse liefern Evidenz, daß chemische Selbstreplikation auch bei Modellsystemen, in denen Oligonucleotide mit 3'-5'-Pyrophosphatbindungen synthetisiert werden, möglich sein sollte. Oligonucleotide mit Pyrophosphat-Rückgrat werden zunehmend als präbiotisch relevante „Informationsmoleküle“ diskutiert; ihre Matrizenwirkung bei nichtenzymatischen Oligomerisationen wurde jüngst beschrieben^[10]. Weiterführende Untersuchungen zur Sequenzabhängigkeit müssen zeigen, inwieweit Selektionswerte selbstreplizierender Moleküle aus thermodynamisch und kinetisch bedingten Selektivitäten bei der Synthese alternativer Sequenzen zu verstehen sind. Hierüber könnte geklärt werden, ob in der Spätphase der chemischen Evolution eine Selbstkonstituierung^[11] von sequentieller Information in Betracht gezogen werden muß.

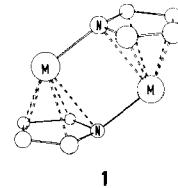
Eingegangen am 7. April 1989 [Z 3280]

- [1] G. F. Joyce, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 7 (1987) 41–51.
- [2] G. von Kiedrowski, *Angew. Chem.* 98 (1986) 932–934; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 25 (1986) 932–935.
- [3] W. S. Zielinski, L. E. Orgel, *Nature (London)* 327 (1987) 346–347.
- [4] Die Verwendung einer MTM-Schutzgruppe anstelle der ursprünglich benutzten Methylgruppe hatte neben logistischen Vorteilen bei der Synthese der Trimere den Effekt, daß die HPLC-kinetischen Messungen genauer wurden. So reagiert **1f** mit dem 5'-Hydroxytrimer **2a** zu einem Hexamer, das sich von der eingesetzten Matrize **3a** nur durch die Schutzgruppe am 5'-Strangende unterscheidet, jedoch chromatographisch von **3a** getrennt werden kann. Hierdurch erübrigt sich bei der Verfolgung der Reaktion die sonst erforderliche Differenzierung von HPLC-Integralen.
- [5] Gleichung (1) soll als „Quadratwurzelgesetz“ bezeichnet werden. Hierin bedeutet c' die Konzentration des entstandenen Hexamers (hier **3f**), c die Konzentration der hinzugegebenen Matrize (hier **3a**), a eine empirische Konstante für die matrizenabhängige Synthese von **3f** und b die Geschwindigkeit der matrizenunabhängigen Synthese von **3f**. Die Konstanten a und b entsprechen den Größen k_a und k_b in [2], K_a und K_b in [1] sowie α und β in [3].
- [6] N. G. Dolinnaya, N. I. Sokolova, O. I. Gryaznova, Z. A. Shabrova, *Nucleic Acids Res.* 16 (1988) 3721–3738.
- [7] C. R. Cantor, P. R. Schimmel; *Biophysical Chemistry*, Freeman, San Francisco 1980, S. 325, 1183 ff.
- [8] S. M. Freier, D. D. Albergo, D. H. Turner, *Biopolymers* 22 (1983) 1107–1131.
- [9] K. J. Breslauer in H. J. Hinz (Hrsg.): *Thermodynamic Data for Biochemistry and Biotechnology*, Springer, Berlin 1986; S. M. Freier, A. Sinclair, T. Neillson, D. H. Turner, *J. Mol. Biol.* 185 (1985) 645–647.
- [10] J. Visscher, C. G. Bakker, R. van der Woerd, A. W. Schwartz, *Science (Washington)* 244 (1989) 329–331.
- [11] A. Eschenmoser, *Angew. Chem.* 100 (1988) 5–40; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 27 (1988) 5–39.

N-Caesiocarbazol · pmdta und *N*-Kaliocarbazol · pmdta (pmdta = *N,N,N',N'',N'*- Pentamethyldiethylentriamin); Kationengröße und Multihapto-Koordination **

Von Karina Gregory, Matthias Bremer,
Paul von Ragué Schleyer*, Peter A. A. Klusener
und Lambert Brandsma

In dieser vergleichenden Studie diskutieren wir die Struktur von *N*-Caesiocarbazol · pmdta und *N*-Kaliocarbazol · pmdta im Kristall. Unseres Wissens^[1] sind dies die ersten Einkristall-Röntgenstrukturanalysen eines Cs-Amids und eines aromatischen K-Amids. Während eine umfangreiche Literatur über Strukturen von Li-Amiden existiert^[2], ist relativ wenig über die Amide der schwereren Alkalimetalle bekannt^[3]. Da wir *N*-Lithiocarbazol · 2THF^[2a] und *N*-Natriocarbazol · 2HMPTA^[3b] bereits röntgenstrukturanalytisch untersucht haben, wählten wir die Cs- und K-Salze als nächste Untersuchungsobjekte. Für *N*-Lithiopyrrol **1**, M = Li, wurden gleichzeitige σ - und π -Wechselwirkungen



[*] Prof. Dr. P. von R. Schleyer, Dipl.-Chem. K. Gregory, Dr. M. Bremer
Institut für Organische Chemie der Universität Erlangen-Nürnberg
Henkestraße 42, D-8520 Erlangen

P. A. A. Klusener, Prof. Dr. L. Brandsma
Organisch-chemisches Laboratorium, Rijksuniversiteit Utrecht
Padualaan 8, NL-3584 CH Utrecht (Niederlande)

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft, dem Fonds der Chemischen Industrie, der Volkswagen-Stiftung, der Convex Computer Corporation, der Netherlands Science Foundation (SON) und der Chemetall GmbH, Frankfurt a. M., (Caesiumspende) gefördert.