

Standardreaktion mit etwa 10 mL Olefin und 0.03 Mol-% Rhodiumkatalysator wurden durch Atomabsorptionsspektrometrie typischerweise 6–90 ppm Rhodium in der organischen Phase festgestellt, je nach Olefin und Katalysatorligand. Durch erneutes Waschen konnte der Rhodiumgehalt weiter reduziert werden. Verwendete man die wäßrige Phase erneut in der Hydroformylierung, so wurde noch etwa 50% Katalysatoraktivität nachgewiesen. Diese Daten genügen zwar nicht den hohen Anforderungen, die an einen industriellen Prozeß gestellt werden, sind jedoch vielversprechend. Studien zur Optimierung der Katalysatoren, die auf  $\beta$ -CD-Derivaten und anderen als Lösungsvermittler wirkenden Substanzen basieren, unter Kombination von Übergangsmetall- und Phasentransferkatalyse sind im Gange.

Eingegangen am 15. November 1996,  
veränderte Fassung am 10. Januar 1997 [Z9776]

**Stichworte:** Cyclodextrine · Hydrierungen · Hydroformylierungen · Phasentransferkatalyse · Rhodium

- [1] a) J.-M. Lehn, *Supramolecular Chemistry*, VCH, Weinheim, 1995; b) *Comprehensive Supramolecular Chemistry* (Hrsg.: J. L. Atwood, J. E. D. Davies, D. D. MacNicol, F. Vögtle), Pergamon, Oxford, 1996.
- [2] a) E. V. Dehmlow, S. S. Dehmlow, *Phase Transfer Catalysis*, VCH, Weinheim, 1993; b) C. Zucchi, G. Pályi, V. Galamb, E. Sámár-Szerencsés, L. Markó, P. Li, H. Alper, *Organometallics* 1996, 15, 3222.
- [3] a) G. W. Parshall, S. D. Ittel, *Homogeneous Catalysis: The Applications and Chemistry of Catalysis by Soluble Transition Metal Complexes*, 2. Aufl., Wiley, New York, 1992; b) B. Cornils, W. A. Herrmann, *Applied Homogeneous Catalysis with Organometallic Compounds*, VCH, Weinheim, 1996.
- [4] a) M. Komiyama, *Prog. Polym. Sci.* 1993, 18, 871; b) D. R. Benson, R. Valente-kovich, F. Diederich, *Angew. Chem.* 1990, 102, 213; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1990, 29, 191; c) R. Breslow, B. Zhang, *J. Am. Chem. Soc.* 1992, 114, 5882; d) T. J. Meade, D. H. Bush, *Prog. Inorg. Chem.* 1985, 33, 59; e) H.-J. Schneider, F. Xiao, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* 1992, 387; f) W. H. Chapman, Jr., R. Breslow, *J. Am. Chem. Soc.* 1995, 117, 5462; g) R. P. Bonomo, V. Cucinotta, F. D'Alessandro, G. Impellizzeri, G. Maccarrone, G. Vecchio, E. Rizzarelli, *Inorg. Chem.* 1991, 30, 2708; h) G. Impellizzeri, G. Maccarrone, E. Rizzarelli, G. Vecchio, R. Corradini, R. Marchelli, *Angew. Chem.* 1991, 103, 1363; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1991, 30, 1348; i) M. W. Göbel, *ibid.* 1994, 106, 1201 bzw. 1994, 33, 1141; j) I. Willner, Z. Goren, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1983, 1469.
- [5] Übergangsmetalle wie Kupfer oder Zink wurden schon oft mit Rezeptoren wie  $\beta$ -Cyclodextrinen [11] verknüpft oder in Form von Metallomycellen gebunden, allerdings mit dem Ziel, die Hydrolyse von Carbonsäureestern oder Phosphat-estern zu katalysieren [4]: a) F. M. Menger, L. H. Gan, E. Johnson, D. H. Durst, *J. Am. Chem. Soc.* 1987, 109, 2800; b) P. Scrimin, P. Tecilla, U. Tonellato, *ibid.* 1992, 114, 5086; c) M. C. Cleij, P. Scrimin, P. Tecilla, U. Tonellato, *Langmuir* 1996, 12, 2956; d) J. G. J. Weijnen, A. Koudijs, P. G. J. A. Tap, J. F. J. Engbersen, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* 1993, 112, 525.
- [6] Für einen Rh-haltigen Rezeptor, der Substrate wie Allylcatechol auf der Basis von H-Brücken selektiv bindet und hydriert, siehe: a) H. K. A. C. Coolen, P. W. N. M. van Leeuwen, R. J. M. Nolte, *Angew. Chem.* 1992, 104, 906; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1992, 31, 905; b) H. K. A. C. Coolen, J. A. M. Meeuwis, P. W. N. M. van Leeuwen, R. J. M. Nolte, *J. Am. Chem. Soc.* 1995, 117, 11906.
- [7] a) K. Takahashi, K. Hattori, F. Toda, *Tetrahedron Lett.* 1984, 25, 3331; b) R. C. Petter, J. S. Salek, C. T. Sikorski, G. Kumaravel, F.-T. Lin, *J. Am. Chem. Soc.* 1990, 112, 3860.
- [8] a) S. R. Waldvogel, Dissertation, Universität Bochum, 1996; b) M. T. Reetz, S. R. Waldvogel, *Dtsch. Pat.-Anm.* 196 31 322.8 vom 2.8.1996.
- [9] a) K. Issleib, M. Lischewski, A. Zschunke, *Z. Chem.* 1974, 14, 242; b) K. Kellner, W. Hanke, A. Tzschach, Z. Nagy-Magos, L. Markó, *J. Organomet. Chem.* 1984, 268, 175.
- [10] a) J. Fawcett, P. A. T. Hoyer, R. D. W. Kemmitt, D. J. Law, D. R. Russell, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 1993, 2563; b) A. L. Balch, M. M. Olmstead, S. P. Rowley, *Inorg. Chim. Acta* 1990, 168, 255.
- [11] Übersichtsartikel über Cyclodextrine: a) G. Wenz, *Angew. Chem.* 1994, 106, 851; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1994, 33, 803; b) M. L. Bender, M. Komiyama, *Cyclodextrin Chemistry*, Springer, Berlin, 1978; c) I. Tabuschi, *Pure Appl. Chem.* 1986, 58, 1529; d) R. Breslow, *Science* 1982, 218, 532; e) C. J. Easton, S. F. Lincoln, *Chem. Soc. Rev.* 1996, 25, 163.
- [12] Die technische Hydroformylierung von Propen im Zweiphasensystem mit wasserlöslichen Phosphanen des Typs  $P(C_6H_4SO_3Na)_3$  als Rhodiumliganden (Ruhrchemie AG) kann nicht ohne weiteres auf homologe Olefine wie 1-Octen

angewendet werden [13], weil diese eine zu geringe Wasserlöslichkeit aufweisen: a) B. Cornils, E. G. Kuntz, *J. Organomet. Chem.* 1995, 502, 177; b) G. Papadogianakis, R. A. Sheldon, *New J. Chem.* 1996, 20, 175.

- [13] Monflier et al. haben kürzlich das Verfahren der Ruhrchemie AG [12] durch Verwendung von O-alkylierten  $\beta$ -CD als lösungsvermittelnden Additiven (in 10–14fachem Überschuß) modifiziert, so daß Substrate wie 1-Octen oder 1-Decen umgesetzt werden können, nicht jedoch reaktionsträge interne Olefine wie 3-Hexen: a) E. Monflier, G. Fremy, Y. Castanet, A. Mortreux, *Angew. Chem.* 1995, 107, 2450; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1995, 34, 2269; b) E. Monflier, S. Tilloy, G. Fremy, Y. Castanet, A. Mortreux, *Tetrahedron Lett.* 1995, 36, 9481; c) J. R. Anderson, E. M. Campi, W. R. Jackson, *Catal. Lett.* 1991, 9, 55.
- [14] Typische Vorschrift: In 5 mL DMF werden  $2.4 \times 10^{-5}$  mol Cyclodextrin-Diphosphan und  $2 \times 10^{-5}$  mol  $[Rh(cod)_2]BF_4$  gelöst. Man versetzt mit 15 mL  $H_2O$  und 10 mL 1-Octen und führt die Hydroformylierung in einem Stahlautoklaven (200 mL) mit Tefloneinsatz und Magnetrührer bei  $T = 60^\circ C$  unter Synthesegas ( $CO/H_2$  1/1; 100 bar) durch. Nach beendeter Reaktion (Tabelle 1) wird das Reaktionsgemisch in einen Scheidetrichter umgefüllt, die wäßrige Katalysatorlösung entfernt und mit 10 mL  $H_2O$  zum Entfernen des restlichen DMF gewaschen. Die organische Phase wird über wenig  $MgSO_4$  getrocknet und filtriert.

## Nichtenzymatische Oligomerisierung von Ribonucleotiden an guanosinreichen Matrizen: Unterdrückung der Selbstpaarung von Guanosin\*\*

Markus Kurz, Karin Göbel, Christian Hartel und Michael W. Göbel\*

Professor Gerhard Quinkert zum 70. Geburtstag gewidmet

Das Auftreten informationstragender Moleküle, die durch Selbstreplikation zu Vermehrung und evolutiver Fortentwicklung imstande waren, wird vielfach als Schlüsselereignis für die Entstehung des Lebens angesehen.<sup>[1]</sup> Kann RNA diese zentrale Rolle gespielt haben? Manches spricht dafür. Vor allem die Arbeiten von Orgel et al. [2a–d] ergaben, daß die Oligomerisierung der 2-Methylimidazole von Nucleosid-5'-monophosphaten an komplementären Oligonucleotid-Matrizen mit erstaunlicher Effizienz verlaufen kann.<sup>[2,3]</sup> Dieser ohne jedes Enzym stattfindende Vorgang wird durch die Watson-Crick-Basenpaarung und die Stapelung der Basen gesteuert. Allerdings ist der Weg zur Selbstreplikation<sup>[4,5]</sup> durch mehrere Hindernisse versperrt: Das vielleicht wichtigste ist die Neigung guanosinreicher Stränge zur Tetramerisierung. Hierdurch werden sie unfähig, als Matrize für die Synthese von Oligocytidin-Einheiten zu dienen. Die zweite Phase der Replikation ist damit blockiert.<sup>[6]</sup> Zwar läßt sich das Problem durch Modifizieren der Nucleinsäurestruktur umgehen;<sup>[7,8]</sup> bei RNA selbst aber konnte die Aggregation guanosinreicher Matrizenstränge bislang nur durch extremes Verdünnen verhindert werden.<sup>[2b]</sup>

Kürzlich berichteten wir über die Synthese eines Acridinfarbstoffs, der mit den üblichen Standardmethoden an Nucleinsäu-

\* Prof. Dr. M. W. Göbel, Dipl.-Chem. M. Kurz, Dipl.-Chem. C. Hartel  
Département de Chimie Organique, Université de Genève  
30 quai Ernest-Ansermet, CH-1211 Genève 4 (Schweiz)  
Telefax: Int. + 22/328-7396  
E-mail: Michael.Gobel@chiorg.unige.ch

Dr. K. Göbel  
Département de Biologie Moléculaire, Université de Genève  
30 quai Ernest-Ansermet, CH-1211 Genève 4 (Schweiz)

\*\* Diese Arbeit wurde vom Fonds der Chemischen Industrie, von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und vom Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung unterstützt.

ren angeknüpft werden kann und der sich durch hohe chemische Stabilität auszeichnet.<sup>[9]</sup> Zur Untersuchung der matrizengesteuerten Oligomerisierung von RNA haben wir nun ein System entwickelt, das auf der Verlängerung acridinmarkierter Primer beruht. Es bietet eine große Flexibilität in der Durchführung und ermöglicht die gleichermaßen rasche wie präzise Untersuchung der Kinetik durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC). Wie wir mit dieser Methode fanden, läßt sich die Guanodin-Aggregation durch Optimieren der Reaktionsbedingungen auf ein Minimum reduzieren.

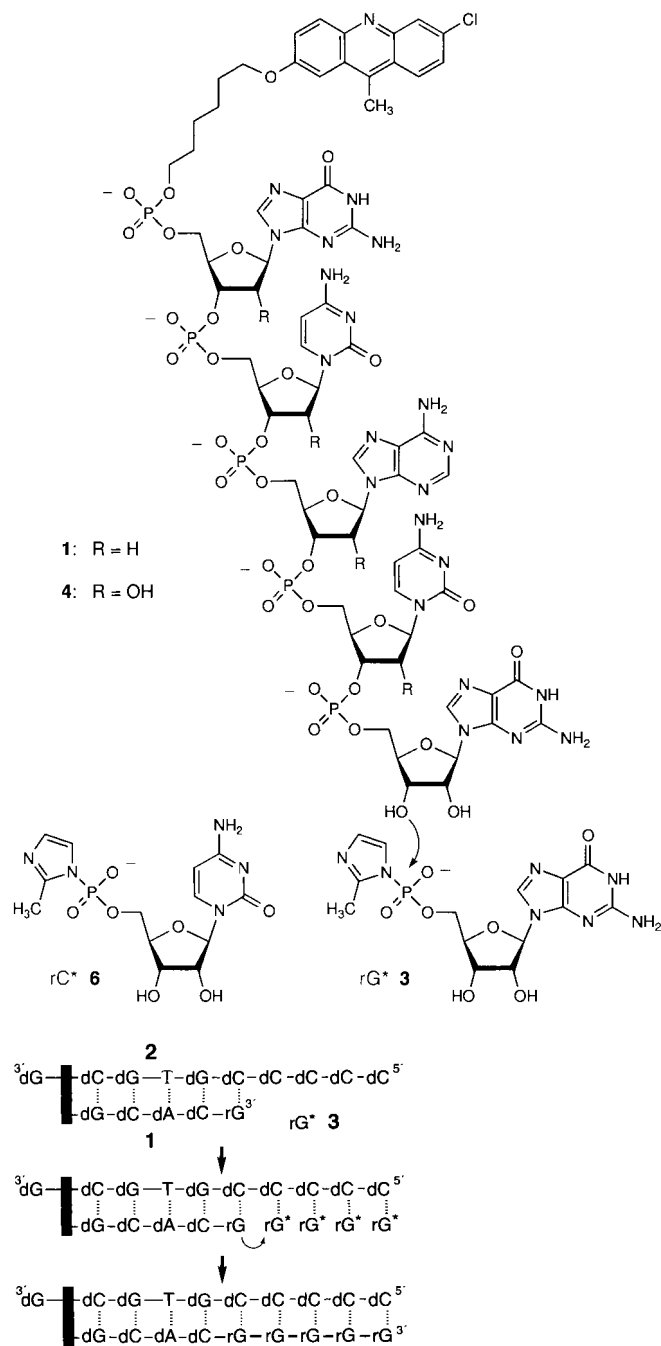
Erste Experimente wurden mit dem Primer **1** durchgeführt, der aus einem 3'-terminalen *ribo*-Guanosin und sonst aus Des-

oxyribonucleotiden besteht (Schema 1 oben). **1** bildet einen stabilen Doppelstrang mit der DNA-Matrize **2**, dessen Schmelzpunkt etwa 15 K höher ist als der des entsprechenden acridin-freien Doppelstrangs (Tabelle 1). Als Matrize dient der einzel-

Tabelle 1. Thermische Stabilität der hier getesteten Oligonucleotidduplexe.

Primer P	c(P) [ $\mu$ M]	c(2) [ $\mu$ M]	T <sub>m</sub> [°C]	Bedingungen [a]
<b>1</b>	30	50	50.2	a
<b>1</b>	1.2	2	31.3	a
d(GCACG)	30	50	35.1	a
d(GCACG)	1.2	2	18.8	a
<b>1</b>	0.8	0.8	19.8	b
<b>4</b>	0.8	0.8	19.8	b

[a] a: 0.25 M TRIS-HCl, pH = 7.65. b: 10 mM Phosphat, pH = 7.0, 70 mM NaCl; Detektion jeweils bei 260 nm.



Schema 1. Oben: Strukturformeln der acridinmarkierten Primer **1** und **4** und der Imidazole **3** und **6**, die zur Kettenverlängerung genutzt wurden. Unten: Verlängerung des DNA-Primers **1** an der Matrize **2** um vier Guanodin-Einheiten. Das schwarze Rechteck symbolisiert den Intercalator.

strängige Teil des Komplexes **1·2**, mit dem bis zu vier komplementäre Guanodinbausteine **3** assoziieren können (Schema 1 unten). Innerhalb des doppelhelicalen Aggregats **1·2·(3)<sub>n</sub>** findet dann die Kettenverlängerung statt. Dieser Vorgang läßt sich bequem durch Umkehrphasen-HPLC analysieren. Während die Retentionszeiten der übrigen Mono- und Oligonucleotide kurz sind, wird **1** wegen seines lipophilen Farbstoffteils stark zurückgehalten. Verlängerungsprodukte von **1** haben mit zunehmender Polarität kürzere Retentionszeiten. Fluoreszenzdetektion führt zu einer weiteren Verbesserung der Nachweisempfindlichkeit, wie das typische Chromatogramm in Abbildung 1a, b belegt. In nur 5 h setzen sich mehr als 50 % des Primers um.<sup>[10]</sup> Aus den Integralen der Peaks (Abb. 1c) können die Geschwindigkeiten für jeden Verlängerungsschritt ermittelt werden (Tabelle 2). Es fällt auf, daß der letzte Schritt um den Faktor 10 bzw. 20 langsamer ist als die beiden vorausgehenden. Dieser schon früher beobachtete Effekt läßt sich durch die geringeren Stapelwechselwirkungen des zuletzt eingebauten Mononucleotids erklären.<sup>[12a]</sup> Überraschenderweise ist aber auch der erste Schritt der Verlängerung von **1** ungefähr fünfmal langsamer als der zweite.

Zum Verständnis dieses Effektes beigetragen haben Experimente mit dem Primer **4**, dessen Sequenz mit der von **1** übereinstimmt, nur daß er gänzlich aus Ribonucleotiden aufgebaut ist. Wird **4** im Komplex mit dem Matrizenstrang **2** durch den Guanodinbaustein **3** verlängert, vollzieht sich der Einbau des ersten Nucleotids mit ähnlich hoher Geschwindigkeit wie der des zweiten (Abb. 2, Tabelle 2). Ein Vergleich der CD-Spektren der Primer-Matrizen-Duplexe **1·2** und **4·2** gibt weitere Hinweise auf die Ursache dieses Unterschieds: Trotz identischer Sequenzen weichen die Spektren drastisch voneinander ab (Abb. 3). Die Duplexkonformationen sind folglich verschieden. Während das Spektrum von **1·2** weitgehend dem einer B-Helix gleicht, weist das Spektrum von **4·2** die Charakteristika der A-Form auf.<sup>[11]</sup> Damit werden die Unterschiede in den Reaktionskinetiken verständlich: Die Oligomerisierung von RNA verläuft nur dann optimal, wenn der Primer-Matrizen-Duplex dem A-Konformationstyp angehört. Da jedoch bei **1·2** beide Komponenten aus DNA bestehen, bevorzugt dieser Duplex die B-Konformation. Der erste Schritt ist deshalb langsam. DNA-RNA-Hybride hingegen sind auf die A-Form festgelegt. Ist die erste Bindung zwischen den Ribonucleotiden geknüpft, ändert sich daher der Konformationstyp des Primer-Matrizen-Duplex mit der Folge, daß die weiteren Kupplungsschritte (mit Ausnahme des letzten) leichter ablaufen. Der Duplex **4·2** liegt bereits zu Beginn in der A-Form vor. Er zeigt daher auch im ersten

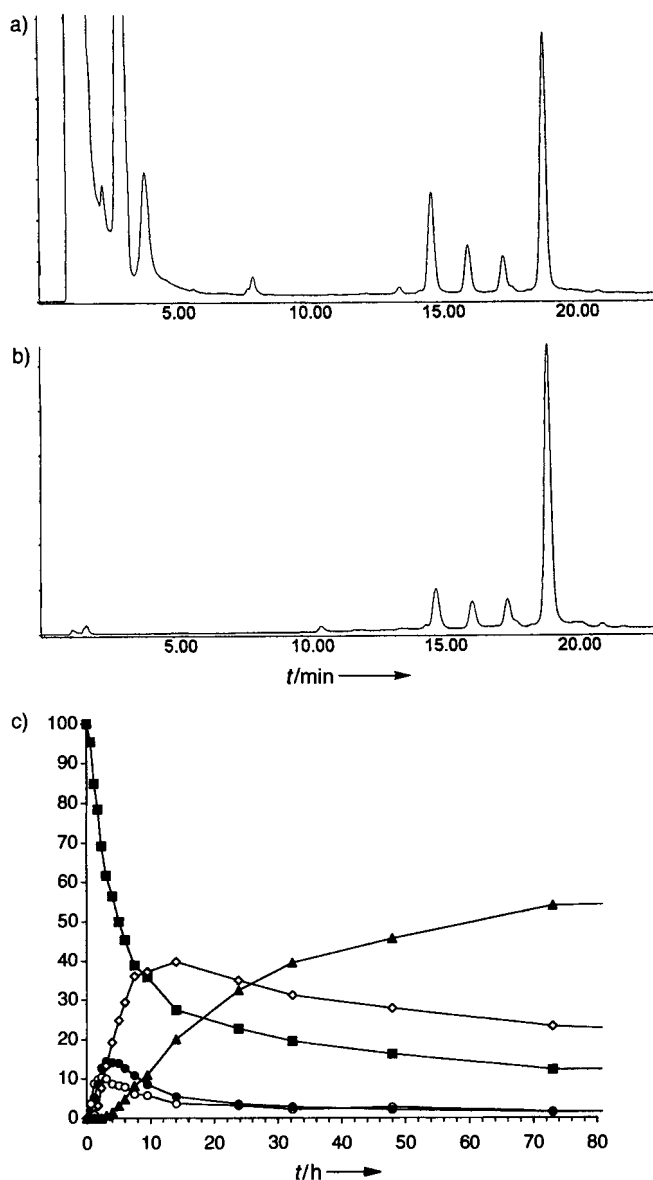


Abb. 1. Analyse der Verlängerung des DNA-Primers 1 an der Matrize 2. a) UV-, b) Fluoreszenzspuren eines typischen Chromatogramms. Von rechts nach links: Primer, Produkte mit ein, zwei und drei zusätzlichen Nucleotiden. Das Gemisch der nicht markierten Mono- und Oligonucleotide wird innerhalb der ersten 5 min eluiert und bleibt bei Fluoreszenzdetektion unsichtbar. c) Prozentuale Produktverteilung als Funktion der Zeit: ■ = Primer (P) 1, ○ = P + 1, ● = P + 2, ◇ = P + 3, ▲ = P + 4.

Schritt die volle Reaktivität. Als Konsequenz steigt die Gesamtausbeute an verlängerten Strängen bei einem Wechsel zum RNA-Primer 4 von rund 85 auf etwa 99% an (davon 90% vollständig verlängert). Dies ist entscheidend, wenn es um den Einbau problematischer Nucleotide geht.

Tabelle 2. Geschwindigkeitskonstanten pseudoerster Ordnung ( $k$  [h<sup>-1</sup>]) für die Kettenverlängerung des DNA-Primers 1 und des RNA-Primers 4 an der Matrize 2 (Einbau des Guanosinbausteins 3).

Schritt	$k(1)$	$k(4)$
1	0.17	1.2
2	0.96	1.5
3	0.54	0.72
4	0.054	0.066

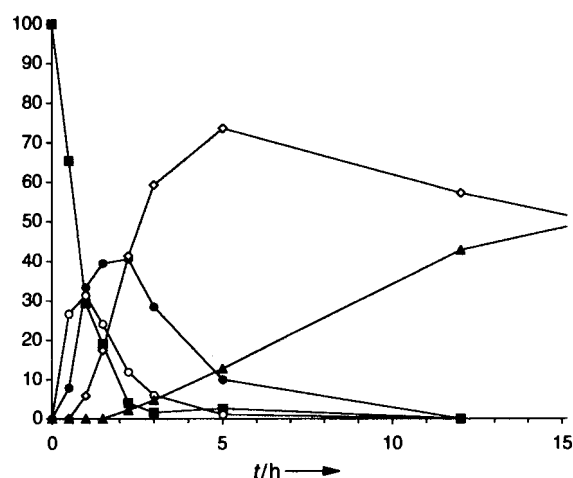


Abb. 2. Prozentuale Produktverteilung bei der Verlängerung des RNA-Primers 4 an der Matrize 2 als Funktion der Zeit. ■ = Primer (P) 4, ○ = P + 1, ● = P + 2, ◇ = P + 3, ▲ = P + 4 (etwa 90% nach mehreren Tagen).

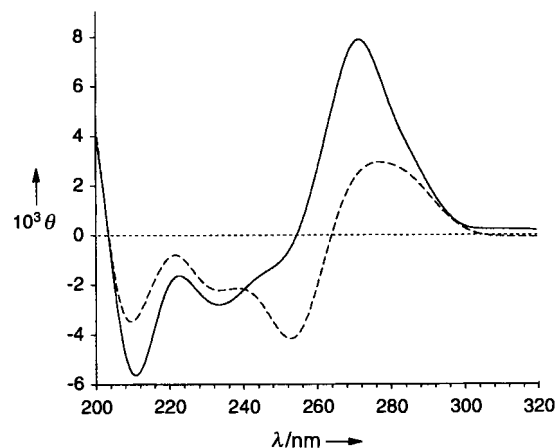


Abb. 3. CD-Spektren der Primer-Matrizen-Duplexe aus DNA-Primer 1 und Matrize 2 (gestrichelt) sowie RNA-Primer 4 und Matrize 2 (durchgezogen). Jeweils 2  $\mu$ M Oligonucleotid, 10 mM Phosphat (pH = 7.0), 70 mM NaCl, 5°C.  $\theta$  in °.

Eine Kettenverlängerung der Primer 1 und 4 gelingt nur, wenn die Matrize 2, der aktivierte Baustein 3 und Mg<sup>2+</sup>-Ionen zugegen sind. Die Konzentration an Na<sup>+</sup> ist dagegen unerheblich: Mit 1, 2 und 3 durchgeführte Oligomerisierungsversuche ergaben in einem Bereich von 0.05 bis 0.85 M keine deutlichen Geschwindigkeitsunterschiede (Tabelle 3). Dies ist wichtig, denn Na<sup>+</sup> induziert die Bildung von Guanodin-Tetraden. Selbstassoziation, die CD-spektroskopisch verfolgt werden kann, zeigt auch die DNA-Matrize 5, die vier Guanodin-Einheiten in Folge enthält (siehe Schema 2). Während in Na<sup>+</sup>-armen Puffern das Maximum bei 289 nm liegt, wird es durch hohe Na<sup>+</sup>- oder K<sup>+</sup>-Konzentrationen zu 263 nm verschoben. Ähn-

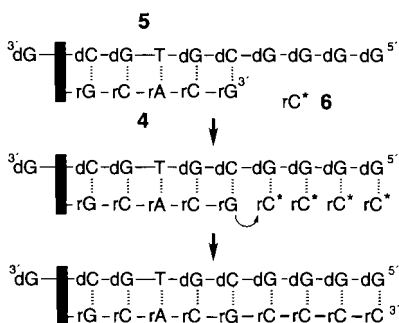
Tabelle 3. Verlängerung des DNA-Primers 1 (P) an der Matrize 2 (Einbau des Guanodinbausteins 3 zu P + 1 bis P + 4). Prozentuale Produktverteilung als Funktion der Na<sup>+</sup>-Konzentration.

$c(\text{Na}^+)$ [M]	$c(P)$	$c(P + 1)$	$c(P + 2)$	$c(P + 3)$	$c(P + 4)$
0.85	16.8	5.1	9.4	52.9	15.7
0.25	22.4	5.8	9.7	49.3	12.8
0.15	24.0	5.6	9.9	48.0	12.4
0.05 [a]	23.2	4.8	8.4	50.6	12.9

[a] Da 3 als Na<sup>+</sup>-Salz verwendet wird, beträgt die minimale Na<sup>+</sup>-Konzentration 0.05 M.

liche Änderungen der CD-Spektren wurden mit der Bildung paralleler Quadrupelstränge in Verbindung gebracht.<sup>[1,2]</sup>

Mit den Primern **1** oder **4** komplexiert sollte der einzelsträngige Teil der Matrize **5** den Einbau des aktivierten Cytidinderivats **6** induzieren (Schema 2). Die Wahl der Reaktionsbedingungen,



Schema 2. Verlängerung des RNA-Primers **4** an der guanosinreichen Matrize **5** um vier Cytidin-Einheiten. Das schwarze Rechteck symbolisiert den Intercalator.

d. h. der Einsatz des DNA- oder des RNA-Primers sowie hohe oder niedrige Alkalimetallionen-Konzentrationen, beeinflusst nachhaltig den Ausgang des Experiments (Tabelle 4): In Einklang mit bisherigen Erfahrungen<sup>[1,2]</sup> ist mit dem DNA-Primer **1** in 1 M NaCl-Lösungen nur eine schleppende Verlängerung zu beobachten. Reduziert man die Na<sup>+</sup>-Konzentration auf 50 mM, beschleunigt sich der Vorgang. Auch die Reaktivität des RNA-Primers **4** wird durch bestimmte Alkalimetallionen gebremst: sehr stark durch K<sup>+</sup>, stark durch Na<sup>+</sup>, doch nahezu nicht durch Li<sup>+</sup> (jeweils 1 M, Tabelle 4). Dieser Effekt korreliert mit der

Tabelle 4. Verlängerung der Primer (P) **1** und **4** an der guanosinreichen Matrize **5** (Einbau des Cytidinbausteins **6** zu P + 1 bis P + 4). Es ist jeweils die prozentuale Produktverteilung für ein typisches Experiment angegeben.

t [h]	c(P)	c(P + 1)	c(P + 2 bis P + 4)	c(P)	c(P + 1)	c(P + 2 bis P + 4)
<i>DNA-Primer 1, 1 M NaCl</i>				<i>DNA-Primer 1, 50 mM NaCl</i>		
4	92.7	6.8	0.5	81.5	15.6	2.8
12	82.4	13.2	4.4	58.1	25.1	16.8
24	73.3	15.4	11.3	45.6	24.6	29.9
<i>RNA-Primer 4, 1 M KCl</i>				<i>RNA-Primer 4, 1 M NaCl</i>		
4	89.6	9.2	1.2	75.3	20.2	4.5
12	81.4	14.0	4.6	56.5	27.2	16.3
24	75.7	18.3	6.0	42.2	26.5	31.3
<i>RNA-Primer 4, 1 M LiCl</i>				<i>RNA-Primer 4, 50 mM NaCl</i>		
4	51.5	36.7	11.8	52.3	32.7	15.0
12	31.0	39.7	30.4	27.3	28.4	44.3
24	13.8	25.0	61.2	14.8	20.5	64.7 [a]

[a] Etwa 87% nach fünf Tagen.

Fähigkeit dieser Ionen, eine Aggregation der guanosinreichen Matrize **5** hervorzurufen. Werden hohe K<sup>+</sup>- und Na<sup>+</sup>-Konzentrationen vermieden, reagiert der Primer **4** im System **4**·**5** mit Cytidin keineswegs langsamer als beispielsweise der Primer **1** im System **1**·**2** mit Guanotin.

Das Replikationshindernis „Selbstaggregation von Guanotin“ ist nach den hier vorgestellten Befunden also keine intrinsische Eigenschaft der RNA! Es wurde vielmehr in hohem Maß mitverursacht durch die bislang üblichen Na<sup>+</sup>-Konzentrationen von mehr als 1 M. Unter optimierten Bedingungen kann selbst bei Matrizenkonzentrationen von 100 µM die Selbstaggregation kurzer Guanotinsequenzen leicht vermieden werden. Wir sehen somit für eine Selbstreplikation von RNA unter Verwendung imidazolaktivierter Mononucleotide weit bessere Chancen, als bislang angenommen wurde.

## Experimentelles

Oligomerisierungsexperimente: In einem 1.5-mL-Polyethylengefäß wurden folgende drei Stammlösungen zusammenpipettiert: Puffer, Primer **1** oder **4**, Matrize **2** oder **5**. Man ließ 15 min bei Raumtemperatur äquilibrieren und kühlte dann auf 10 °C. Anschließend gab man die frisch angesetzte Lösung des Imidazols **3** oder **6** zu, mischte, verschloß das Gefäß und bewahrte es bei (10 ± 0.2) °C auf. Die endgültigen Konzentrationen betragen: 30 µM Primer, 100 µM Matrize, 50 mM Imidazol, 250 mM Puffer (TRIS·HCl, pH = 7.7, Na<sup>+</sup>-frei oder 1 M an KCl, NaCl oder LiCl; oder HEPES, pH = 7.7, 1 M NaCl), 200 mM Mg<sup>2+</sup>.

HPLC-Analyse: 3 µL des Reaktionsgemischs wurden mit 10 µL 8 M wäßriger Harnstofflösung vermischt, 1–2 min auf 90 °C erhitzt und nach dem Abkühlen in die Säule injiziert. Trennbedingungen: Säule Merck LiChrospher 100 RP-18 endcapped, 5 µm, 125 × 4 mm. Linearer Gradient von 5 bis 36% A in B in 22 min, 1 mL min<sup>-1</sup>. A: 50 mM Triethylammoniumacetat, H<sub>2</sub>O, pH = 6.5/Acetonitril 40/60. B: 50 mM Triethylammoniumacetat, H<sub>2</sub>O, pH = 6.5/Acetonitril 90/10. UV-Detektion bei 260 nm; Fluoreszenz: λ<sub>ex</sub> = 355, λ<sub>em</sub> = 450 nm. Die mit der Kettenlänge zunehmenden Extinktionskoeffizienten der Produkte wurden bei der Integration der UV-Spur durch Korrekturfaktoren ausgeglichen.

Eingegangen am 19. August, ergänzte Fassung am 23. Dezember 1996 [Z 9467]

**Stichworte:** Molekulare Erkennung · Oligonucleotide · RNA · Selbstreplikation

- Übersichtsartikel: a) G. F. Joyce in *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, Vol. LII, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, **1987**, S. 41–51; b) A. Kanavarioti, *Origins Life Evol. Biosphere* **1994**, *24*, 479–494; c) L. E. Orgel, *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 109–118.
- a) T. Wu, L. E. Orgel, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 317–322; b) *ibid.* **1992**, *114*, 5496–5501; c) *ibid.* **1992**, *114*, 7963–7969; d) A. R. Hill, Jr., L. E. Orgel, T. Wu, *Origins Life Evol. Biosphere* **1993**, *23*, 285–290; e) A. Kanavarioti, C. F. Bernasconi, D. J. Albers, E. E. Baird, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 8537–8546.
- Katalyse des Aufbaus von RNA durch Metallionen: a) H. Sawai, K. Higa, K. Kuroda, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1992**, 505–508; b) R. Rohatgi, D. P. Bartel, J. W. Szostak, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 3332–3339; c) *ibid.* **1996**, *118*, 3340–3344; durch Mineralien: d) G. Ertem, J. P. Ferris, *Nature* **1996**, *379*, 238–240; e) J. P. Ferris, A. R. Hill, R. H. Liu, L. E. Orgel, *ibid.* **1996**, *381*, 59–61; durch Peptide: f) B. Barbier, J. Visscher, A. W. Schwartz, *J. Mol. Evol.* **1993**, *37*, 554–558; durch Ribozyme: g) E. H. Eklund, J. W. Szostak, D. P. Bartel, *Science* **1995**, *269*, 373–376; h) E. H. Eklund, D. P. Bartel, *Nature* **1996**, *382*, 373–376.
- Selbstreplizierende Oligonucleotide: a) G. von Kiedrowski, *Angew. Chem.* **1986**, *98*, 932–934; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1986**, *25*, 932–935; b) G. von Kiedrowski, B. Wlotzka, J. Helbing, *ibid.* **1989**, *101*, 1259–1261 bzw. **1989**, *28*, 1235–1237; c) G. von Kiedrowski, B. Wlotzka, J. Helbing, M. Matzen, S. Jordan, *ibid.* **1991**, *103*, 456–459, 1066 bzw. **1991**, *30*, 423–426, 892; d) D. Sievers, G. von Kiedrowski, *Nature* **1994**, *369*, 221–224; e) T. Li, K. C. Nicolaou, *ibid.* **1994**, *369*, 218–221.
- Selbstreplizierende, nicht auf Nucleinsäuren beruhende Systeme: a) A. Terfort, G. von Kiedrowski, *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 626–628; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 654–656; b) E. A. Wintner, B. Tsao, J. Rebek, Jr., *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 7997–8001; c) D. N. Reinholdt, D. M. Rudkevich, F. de Jong, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 6880–6889; d) R. Wick, P. Walde, P. L. Luisi, *ibid.* **1995**, *117*, 1435–1436.
- Um eine experimentell begründete Antwort auf die Frage zu erhalten, warum die Natur RNA und DNA gegenüber denkbaren Alternativen bevorzugt hat, untersuchten Eschenmoser und Mitarbeiter die „Pyranosyl-RNA“. Bei diesem Strukturtyp tritt das Phänomen der Guanotin-Selbstassoziation nicht auf, was ihn zu einem hervorragenden Substrat für matrizengesteuerte Ligations- und Replikationsreaktionen macht: S. Pitsch, R. Krishnamurthy, M. Bolli, S. Wendeborn, A. Holzner, M. Minton, C. Lesueur, I. Schlönvogt, B. Jaun, A. Eschenmoser, *Helv. Chim. Acta* **1995**, *78*, 1621–1635.
- H. Rembold, R. K. Robins, F. Seela, L. E. Orgel, *J. Mol. Evol.* **1994**, *38*, 211–214.
- H. Rembold, L. E. Orgel, *J. Mol. Evol.* **1994**, *38*, 205–210.
- K. Schütz, M. Kurz, M. W. Göbel, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 8407–8410.
- Da die Produkte durch Ribonuclease T1 vollständig zum phosphorylierten Primer abgebaut werden, muß in Einklang mit den Befunden von Orgel et al. zumindest das erste Ribonucleotid über die 3'-Hydroxygruppe des Primers angeknüpft worden sein (siehe auch Schema 1 oben).
- D. M. Gray, S.-H. Hung, K. H. Johnson, *Methods Enzymol.* **1995**, *246*, 19–71.
- a) P. Balagurumoorthy, S. K. Brahmachari, D. Mohanty, M. Bansal, V. Sasi-sekharan, *Nucl. Acids Res.* **1992**, *20*, 4061–4067; b) M. Lu, Q. Guo, N. R. Kallenbach, *Biochemistry* **1993**, *32*, 598–601.