

- [7] L. Zhang, A. Eisenberg, *Science* **1995**, *268*, 1728.
[8] L. Zhang, K. Yu, A. Eisenberg, *Science* **1996**, *272*, 1777.
[9] R. Vaidya, L. J. Mathias, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 5514.
[10] W. K. Fife, S. Rubinsztajn, M. Zeldin, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 8535.
[11] S. Rubinsztajn, M. Zeldin, W. K. Fife, *Macromolecules* **1991**, *24*, 2682.
[12] W. K. Fife, *Trends Polym. Sci.* **1995**, *3*, 214.
[13] G. J. Wang, D. Ye, W. K. Fife, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 12536.
[14] G. J. Wang, W. K. Fife, *Macromolecules* **1996**, *29*, 8587.
[15] F. A. Long, W. F. McDevit, *Chem. Rev.* **1952**, *51*, 119.
[16] D. B. Wetlauffer, S. K. Malik, S. Stoller, R. L. Coffin, *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 508.
[17] R. Breslow, *Acc. Chem. Res.* **1991**, *24*, 159.
[18] R. Breslow, C. J. Rizzo, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4340.
[19] L. Zhang, A. Eisenberg, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 3168.
[20] L. D. Sutton, J. S. Stout, D. M. Quinn, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 8398.
[21] A. Sein, J. B. F. N. Engberts, *Langmuir* **1995**, *11*, 455.
[22] L. L. Brasher, K. L. Herrington, E. W. Kaler, *Langmuir* **1995**, *11*, 4267.

Über die Aktivität 2',5'-verknüpfter RNA in der templatgesteuerten Oligomerisierung von Mononucleotiden**

Thazha P. Prakash, Christopher Roberts und Christopher Switzer*

Die Fähigkeit 2',5'-verknüpfter Nucleinsäuren zur Kodierung von genetischer Information war und ist Gegenstand experimentellen und theoretischen Interesses. Bis in die achtziger Jahre wurde diskutiert, ob 2',5'-verknüpfte Nucleinsäuren Helices bilden;^[1] dann entdeckte man, daß 2',5'-verknüpfte Oligonucleotide assoziieren.^[2] Ein verwandtes Thema ist die Möglichkeit, chimäre Helices aufzubauen. Seit langem etwa ist bekannt, daß 2',5'-verknüpftes Polyadenylat einen Triplex mit natürlichem Oligouridylat bildet.^[3] Dieses Phänomen wurde seitdem auch an anderen Strukturen und Sequenzen beobachtet.^[4] Die erwähnten Befunde weisen auf die Möglichkeit hin, mit 2',5'-verknüpfter RNA oder mit natürlicher, 2',5'-Verknüpfungsdefekte enthaltender RNA genetische Informationen zu übertragen. Für enzymatische Reaktionen zeigten Lorsch et al., daß reverse Transkriptase ein RNA-Templat mit einer 2'-Fehlverknüpfung verarbeiten kann.^[5] Für nichtenzymatische Reaktionen wurde die Fähigkeit isomerer RNA, als Templat zu dienen, vor kurzem bestätigt, und zwar durch die Verwendung eines komplexen Gemisches linearer und cyclischer 2',5'-verknüppter Oligocytidylate, das bei der Ton-katalysierten Kondensation von aktiviertem 5'-CMP erhalten wurde.^[6] Wir berichten hier über die ersten Mononucleotid-Oligomerisierungen, die einen direkten Vergleich der Eigenschaften von natürlichen und 2',5'-verknüpften RNA-Templaten ermöglichen.

Die Oligonucleotide, die als Template eingesetzt wurden, sind in Abbildung 1 aufgeführt. Eine schematische Beschreibung der

Abb. 1. In dieser Studie eingesetzte Oligonucleotidtemplate. Doppelt unterstrichene Buchstaben bedeuten 2',5'-verknüpfte, einfach unterstrichene 3',5'-verknüpfte RNA und kursiv gesetzte 3',5'-verknüpfte DNA.

[*] Prof. C. Switzer, Dr. T. P. Prakash, C. Roberts
Department of Chemistry, University of California
Riverside, CA 92521 (USA)
Telefax: Int. + 909/787-4713
E-mail: switzer@citrus.ucr.edu

[**] Diese Arbeit wurde durch die National Aeronautics and Space Administration gefördert [NAGW-4184].

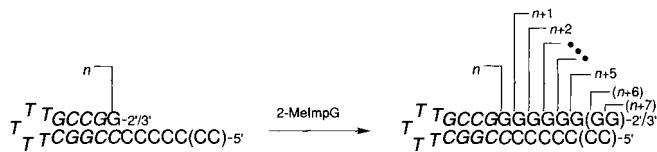


Abb. 2. Allgemeines Schema für den Ablauf der Reaktion zwischen den Templayten **1–4** (Abb. 1) und 2-MeImpG. Die GMP-Einheiten addieren sich sequentiell an das 2'/3'-Ende des Templayts (mit n^* gekennzeichnet). Das maximal lange Produkt bei den Templayten **1** und **2** ist G^{n+5} und bei den Templayten **3** und **4** G^{n+7} .

untersuchten Reaktionen findet sich in Abbildung 2. Die Templayte von Abbildung 1 sind den Haarnadeltemplayten, über die Wu und Orgel berichteten,^[7] nachgebildet. Wie hier genutzt werden wird und auch schon in früheren Arbeiten^[7] angemerkt ist, ermöglicht der Einbau von DNA in die Strang- und Schleifenregionen der Templayte, die Art der Phosphodiesterverknüpfungen (3',5' oder 2',5') durch Verdauung mit RNase zu bestimmen. Um eine eventuelle Störung der Konformation des 2',5'-verknüpften RNA-Teils im Templat **1** durch den DNA-Strangteil abzuschätzen, wurden die CD-Spektren von **1** und einem Standard, der dem RNA-Teil entspricht, 2',5'-C₁₂, verglichen. Das Spektrum des Standards wies auf eine *A*-Helix hin, während das von **1** als Überlagerung der Spektren einer *B*-Helix und einer *A*-Helix interpretiert werden kann. Dies spricht dafür, daß der RNA-Teil in **1** seine Konformation beibehalten hat.

Zunächst untersuchten wir den Einfluß von divalenten Metall-Ionen auf die Oligomerisierung des 2-Methylimidazolids von Guanosin-5'-phosphat (2-MeImpG) an den Templayten **1** und **2**. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tabelle 1 zusam-

Tabelle 1. Acht Tage dauernde Oligomerisierungen mit den Templayten **1** und **2** unter Verwendung verschiedener Metall-Ionen (jeweils 100 mM). Für weitere Details siehe Abb. 3.

Metallsalz	Templat 1 [%]	Templat 2 [%]
MgCl ₂	27.4	1.44
HgCl ₂	84.5	18.4
ZnCl ₂	73.8	36.7
CoCl ₂	76.6	61.4
MnCl ₂	80.1	92.4
UO ₂ (NO ₃) ₂	76.6	58.2
Pb(NO ₃) ₂	71.3	43.7
Ni(NO ₃) ₂	80.7	75.4

mengefaßt. Die Zahlen geben an, wieviel Templat jeweils nach acht Tagen Inkubationsdauer noch nicht verbraucht war. Magnesium war das bei weitem effektivste zweiwertige Metall-Ion für die Beschleunigung der Oligomerisierung am 2',5'-verknüpften RNA-Templat **1**. Dasselbe gilt für die Oligomerisierung am 3',5'-verknüpften RNA-Templat **2**; hier erwiesen sich allerdings auch andere Metall-Ionen als effektiv, besonders Quecksilber-, Zink- und Blei-Ionen. Gegenwärtig ist noch nicht klar, warum 2',5'-verknüpfte RNA durch Mg²⁺ am stärksten aktiviert wird; man kann jedoch spekulieren, daß das Metall-Ion für eine kinetisch günstige Anordnung der aktivierten Nucleotide am Templat sorgt. Ein repräsentatives Autoradiogramm der Oligomerisierungsprodukte, die nach acht Tagen mit Templat **1** erhalten wurden, zeigt Abbildung 3. Auf der Grundlage von zeitabhängigen Daten und dem Vergleich mit dem Produkt an Templat **2** (nicht gezeigt) scheint das vorherrschende Produkt in Spur 2 das Resultat eines Einbaus von vier Ribonucleotiden zu sein. Um sicherzugehen, daß tatsächlich templatgesteuerte Reaktionen stattgefunden hatten, wurden die Templayten **1** und **2** mit

-	Mg ²⁺	Hg ²⁺	Zn ²⁺	Co ²⁺	Mn ²⁺
1	2	3	4	5	6



Abb. 3. Autoradiogramm der Produkte, die bei der Oligomerisierung von 2-MeImpG am Templat 1 in Gegenwart von 100 mM zweiseitigen Metall-Ionen (über den Spuren angegeben) innerhalb von acht Tagen entstanden sind. Alle Oligomerisierungen wurden unter den von Wu und Orgel beschriebenen Bedingungen [7] durchgeführt.

2-MeImpA inkubiert. Bei Verwendung dieses Monomers wurde keines der beiden Template im Verlauf von acht Tagen zu mehr als 10% verbraucht, und in keinem Fall wurden multiple Addukte erhalten.

Die Zeitabhängigkeit der Oligomerisierung ist für alle in Abbildung 1 gezeigten Template untersucht worden. Die Ergebnisse für die Template 3 und 4 nach 10 bzw. 1 Tag Inkubation sind in Abbildung 4 zusammengefaßt. Die Halbwertszeiten für den

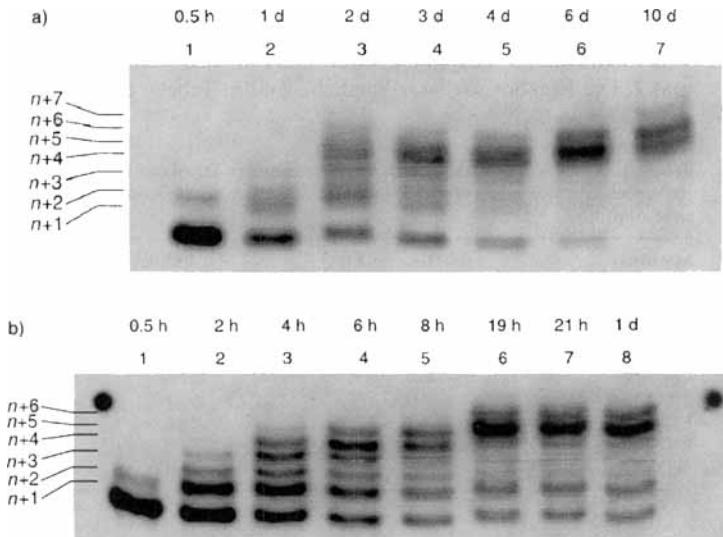


Abb. 4. Ergebnisse der Oligomerisierung von 2-MeImpG an den Templayen 3 (a) und 4 (b) in Gegenwart von MgCl₂. An jeder Spur ist die Zeit angegeben, nach der das Reaktionsprodukt analysiert wurde.

Verbrauch der Templayen 1–4 betragen 59, 3.4, 23 bzw. 0.83 Stunden. Danach ist das Templat 3 rund 28mal weniger effizient als das 3',5'-verknüpfte Templat 4, und das 2',5'-verknüpfte Templat 1 ist gut 17mal weniger effizient als das 3',5'-verknüpfte Templat 2. Diese Zahlen legen ähnlich große Aktivitäten der Templayen 1 und 3 nahe. Dabei hätte man sehr wohl auch eine stärkere Hemmung von Oligomerisierungen durch 2',5'-Verknüpfungen erwarten können, besonders beim alternierende Verknüpfungen enthaltenden Templat 3. Tatsächlich war diese Erwartung sogar der Grund für die Synthese des längeren Templayen 3.

Mit den Produkten wurden Verdauungen mit RNase T1 durchgeführt.^[7] Dieses Enzym spaltet genau neben ribo-G-Resten, allerdings nur, wenn diese durch eine 3',5'-Phospho-

diesterbindung verknüpft sind. Dabei entstehen aus den beiden benachbarten Nucleotiden eines mit 3'-Phosphateinheit und einer mit freier 5'-Hydroxygruppe. Im vorliegenden Fall dient die erschöpfende RNase-T1-Verdauung eines Oligomerisierungsprodukts dazu, das Verhältnis der Verknüpfungstypen zu bestimmen, die zwischen dem 2'/3'-terminalen ribo-G-Rest in den Haarnadeltemplayen, Gⁿ, und dem unmittelbar benachbart eingebauten Guanylat, Gⁿ⁺¹, vorliegen. Wie in Abbildung 5, Spur 4, gesehen werden kann, führt die Verdauung des Pro-

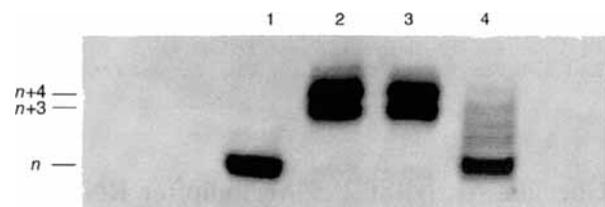


Abb. 5. Verdauung des am Templat 2 erhaltenen Produkts mit RNase T1 gemäß [7]. Spur 1: Templat 2; Spur 2: Oligomerisierungsprodukt; Spur 3: Oligomerisierungsprodukt mit Puffer; Spur 4: Oligomerisierungsprodukt, Puffer und RNase T1.

dukts, das mit dem 3',5'-verknüpften Templat 2 erhalten wurde, zu einer einzigen Hauptbande, die von einigen schwachen, langsamer laufenden Banden begleitet wird. Dieser Befund ist mit einer weit überwiegenden Bildung von 3',5'-Internucleotidbindungen zwischen Gⁿ und Gⁿ⁺¹ während der Reaktion des Templayen 2 mit MeImpG konsistent. Wie Abbildung 6, Spuren 4–6,

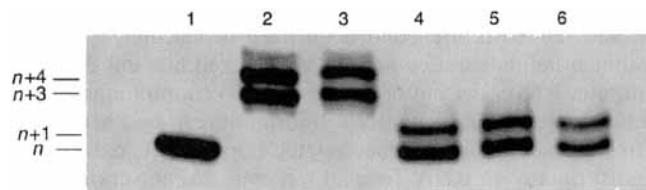


Abb. 6. Verdauung des am Templat 1 erhaltenen Produkts mit RNase T1. Spur 1: Templat 1; Spur 2: Oligomerisierungsprodukt; Spur 3: Oligomerisierungsprodukt mit Puffer; Spuren 4–6: Oligomerisierungsprodukt, Puffer und RNase T1 nach 6, 12 bzw. 24 h.

zu entnehmen ist, führt die entsprechende Verdauung der Produkte, die mit dem 2',5'-verknüpften Templat 1 erhalten wurden, zu zwei Banden von annähernd gleicher Intensität. Ein solches Ergebnis ist in Einklang mit der Bildung von je 50% 2',5'- und 3',5'-Phosphodiesterbindungen zwischen Gⁿ und Gⁿ⁺¹ bei der Oligomerisierung am Templat 1.

2',5'-verknüpfte RNAs in rechtsgängigen Helices sind im allgemeinen anfälliger für Hydrolyse als ihre 3',5'-verknüpften Gegenstücke.^[8] Ein weiterer Nachteil der 2',5'-Verknüpfung ist die hier festgestellte niedrigere Aktivität in templatgesteuerten Synthesen. Demzufolge spricht alles dafür, daß 3',5'-verknüppte Oligonucleotide besser zur abiotischen Übertragung genetischer Information geeignet sind.^[9] Allerdings existieren nur wenige Modelle für die nichttemplatgesteuerte präbiotische Bildung von 3',5'-verknüpften Oligonucleotiden.^[10] Bei 2',5'-verknüpften Oligomeren stellt sich dieses Problem in geringerem Umfang.^[6, 11] Trotz der Hydrolyseempfindlichkeit von 2',5'-verknüpfter RNA scheint nach unseren Befunden ein Überlebensraum für sie zu existieren. Setzt man eine gewisse präbiotische Neigung zur nichttemplatgesteuerten Bildung von 2',5'-ver-

knüpften Oligomeren voraus, könnten templatgesteuerte Reaktionen mit 2',5'-verknüpfter RNA möglicherweise nicht ganz zu vermeiden gewesen sein. Da isomere Verknüpfungen kein Hindernis per se für die Bildung von Templatkopien sind, könnte 2',5'-verknüpfte RNA (oder solche mit gemischten Verknüpfungen) sehr wohl einen positiven Beitrag zur Evolution der heutigen Nucleinsäuren geleistet haben.

Eingegangen am 16. Oktober 1996,
veränderte Fassung am 20. März 1997 [Z 9661]

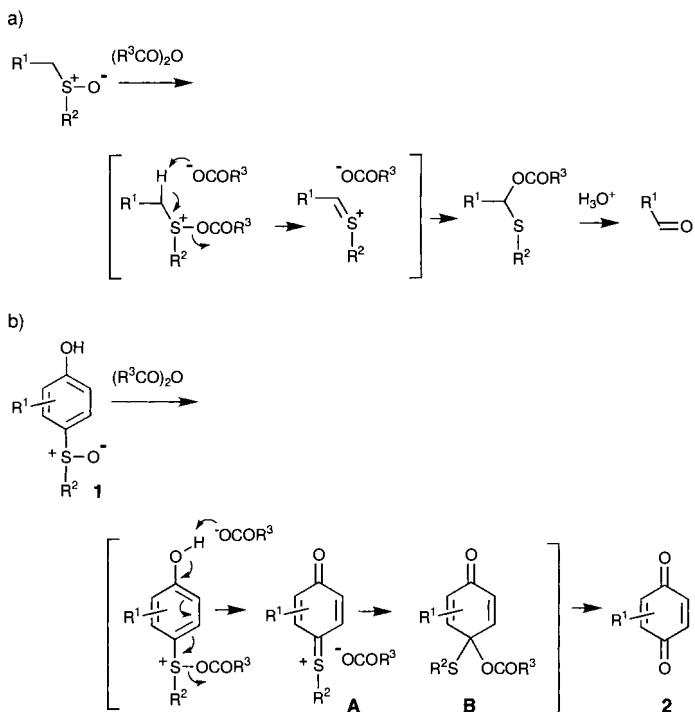
Stichworte: Molekulare Erkennung · Molekulare Evolution · Oligomerisierungen · RNA · Templat synthesen

- [1] a) R. Parthasarathy, M. Malik, S. M. Fridley, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1982**, *79*, 7292–7296; b) M. M. Dhingra, R. H. Sarma, *Nature* **1978**, *272*, 798–801;
- c) A. R. Srinivasan, W. K. Olson, *Nucleic Acids Res.* **1986**, *14*, 5461–5479;
- d) A. Anukanth, P. K. Ponnuswamy, *Biopolymers* **1986**, *25*, 729–752.
- [2] a) H. Hashimoto, C. Switzer, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 6255–6256; b) K.-E. Jung, C. Switzer, *ibid.* **1994**, *116*, 6059–6061; c) H. Robinson, K.-E. Jung, C. Switzer, A. H.-J. Wang, *ibid.* **1995**, *117*, 837–838; d) J. P. Dougherty, C. J. Rizzo, R. Breslow, *ibid.* **1992**, *114*, 6254–6255; e) R. Jin, W. H. Chapman, A. R. Srinivasan, W. K. Olson, R. Breslow, K. J. Breslauer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 10568–10572; f) R. Kierzek, L. He, D. H. Turner, *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20*, 1685–1690; g) P. A. Giannaris, M. J. Damha, *ibid.* **1993**, *21*, 4742–4749.
- [3] A. M. Michelson, C. Monny, *Biochem. Biophys. Acta* **1967**, *149*, 107–126.
- [4] a) I. Hirao, Y. Ishido, K.-I. Miura, *Nucleic Acids Res. Symp. Ser.* **1983**, *12*, 193–196; b) R. Alul, G. D. Hoke, *Antisense Res. Dev.* **1995**, *5*, 3–11; c) H. Sawai, J. Seki, H. Ozaki, *J. Biomol. Struc. Dyn.* **1996**, *13*, 1043–1051; d) T. P. Prakash, K.-E. Jung, C. Switzer, *Chem. Commun.* **1996**, 1793–1794; e) T. L. Sheppard, R. Breslow, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9810–9811.
- [5] J. R. Lorsch, D. P. Bartel, J. W. Szostak, *Nucleic Acids Res.* **1995**, *23*, 2811–2814.
- [6] G. Ertem, J. P. Ferris, *Nature* **1996**, *379*, 238–240.
- [7] T. Wu, L. E. Orgel, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 317–322.
- [8] D. A. Usher, A. H. McHale, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1976**, *73*, 1149–1153.
- [9] a) L. E. Orgel, *Nature* **1992**, *358*, 203–209; b) G. F. Joyce, *Cold Spring Harbor Symp. on Quantum Biol.* **1987**, *LII*, 41–51.
- [10] J. P. Ferris, G. Ertem, *Science* **1992**, *257*, 1387–1389.
- [11] a) R. Lohrmann, L. E. Orgel, *Tetrahedron* **1978**, *34*, 853–855; b) H. Sawai, *J. Mol. Evol.* **1988**, *27*, 181–186.

Isolierung der Chinonmono-*O,S*-acetal-Intermediate der Pummerer-artigen Umlagerung von *p*-Sulfinylphenolen mit 1-Ethoxyvinylestern**

Yasuyuki Kita,* Yoshifumi Takeda, Masato Matsugi, Kiyosei Iio, Kentoku Gotanda, Kenji Murata und Shuji Akai

Aliphatische Sulfoxide reagieren mit Säureanhydriden in einer Pummerer-Umlagerung zu *O,S*-Acetalen. Weil sich diese einfach zu Carbonylverbindungen hydrolysieren lassen, sind Reaktionen dieser Art in vielen organischen Synthesen verwendet worden (Schema 1 a).^[1] Analoge Reaktionen aromatischer Sulfoxide wurden dagegen nicht intensiv untersucht. Pumme-



Schema 1. a) Pummerer-Umlagerung von aliphatischen Sulfoxiden; b) Pummerer-artige Umlagerung von aromatischen Sulfoxiden.

rer-artige Umlagerungen von *p*-Sulfinylphenolen **1** scheinen gut zur effizienten Herstellung von *p*-Chinonen **2** über die *O,S*-Acetale **B** geeignet zu sein und sind nicht zuletzt wegen ihres Mechanismus interessant (Schema 1 b). Thematisch ähnliche Studien wurden von Jung et al. über die Reaktion von Säureanhydriden mit 3,5-Dimethyl-4-(methylsulfinyl)phenol^[2] und mit 4-Methyl-2-(arylsulfinyl)phenolen publiziert.^[3, 4] Die Hauptprodukte dieser Umsetzungen wurden durch konjugierte Addition von Nucleophilen an Sulfoniumionen (wie **A**) erhalten, während die *O,S*-Acetale (wie **B**) nur in sehr niedrigen Ausbeuten^[2] oder in wenigen Fällen^[4] anfielen. Zur selben Zeit, zu der die Veröffentlichungen von Jung et al.^[3, 4] erschienen, berichteten wir über Pummerer-artige Umlagerungen vollständig substituierter *p*-Sulfinylphenole **1** mit Trifluoressigsäureanhydrid (TFAA) zur effizienten Synthese von *p*-Chinonen **2**.^[5] Wir dehnten diese Methode auf in *ortho*-Stellung unsubstituierte *p*-Sulfinylphenole **1** unter Verwendung von TFAA und Allyltrimethylsilan^[6] aus und auch auf Silylether von **1**, was uns die selektive Herstellung von Dihydrochinonen ermöglichte.^[7] Nach diesen bemerkenswerten Ergebnissen sind auf diesem Weg neuartige *ipso*-Substitutionen möglich, wodurch schwefelhaltige funktionelle Gruppen am Phenolring in sauerstoffhaltige umgewandelt werden können.

Obwohl diese Reaktionen alle sicherlich über die Chinonmono-*O,S*-acetal **B** verlaufen, konnten wir diese Acetalintermediate in keinem Fall isolieren oder spektroskopisch identifizieren. Die Schwierigkeit der Isolierung von **B** wurde bereits mehrfach beschrieben,^[2–4] sie ist wahrscheinlich auf die als Initiatoren verwendeten Säureanhydride zurückzuführen, die man verwendet, da Säuren oder Gegenionen aus den Reagentien leicht mit **B** reagieren würden. Die Isolierung des Acetals **B** ist wegen der Nützlichkeit dieser Verbindungen sowohl als wertvolle Synthone als auch als Beleg für den von uns postulierten Reaktionsmechanismus von Interesse. Hier berichten wir über die erstmalige Isolierung der *O,S*-Acetale **3** unter Verwendung der 1-Ethoxyvinylester **2a** und **b** zur Pummerer-artigen Umlage-

[*] Prof. Dr. Y. Kita, Y. Takeda, M. Matsugi, K. Iio, K. Gotanda, K. Murata, Dr. S. Akai

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Osaka University
1-6, Yamada-oka, Suita, Osaka 565 (Japan)
Telefax: Int. + 6/879-8229
E-mail: kita@phs.osaka-u.ac.jp

[**] Diese Arbeit wurde vom japanischen Ministerium für Erziehung, Wissenschaft und Kultur sowie vom Special Coordination Funds of the Science and Technology Agency (Japan) gefördert.