

Kopieren von RNA-Sequenzen ohne Voraktivierung

Mario Jauker, Helmut Griesser und Clemens Richert*

Abstract: Der templatgesteuerte Einbau von Nukleotiden am Terminus eines Komplementärstrangs ist die Grundlage der Replikation. Im Fall von RNA kann dieser Vorgang in Abwesenheit von Enzymen stattfinden, wenn die Ribonukleotide vorher in eine Aktivspezies mit einer Abgangsgruppe überführt werden. Bisher war für diese Aktivierung ein separater chemischer Schritt nötig, was komplizierte präbiotisch plausible Szenarios erfordert. Wir zeigen nun, dass die Kombination eines Carbodiimids und eines Organokatalysators den annähernd quantitativen Einbau jedes der vier Ribonukleotide induziert. Bei In-situ-Aktivierung von Adenosinmonophosphat bilden sich gleichzeitig Oligomere in wässriger Lösung. Es können also Strangbildung und sequenzspezifische Kopievorgänge ohne künstlichen Syntheseschritt stattfinden.

Ribonukleinsäure (RNA) findet sich in allen Zellen. Sie kann genetische Information codieren, spielt aber auch eine Rolle bei der Proteinsynthese,^[1] der Katalyse^[2] und der Regulierung der Genexpression.^[3] Weil RNA zahlreiche zentrale Rollen in der Biochemie einnehmen kann, ist es möglich, dass das Leben mit einer „RNA-Welt“ begann.^[4] Es ist deshalb wichtig zu fragen, wie sich Oligoribonukleotide in Abwesenheit von Enzymen bilden können und wie die genetische Information, die sie codieren, ohne katalytisches Zutun einer Polymerase in Komplementärstränge kopiert werden kann. Der Metabolismus heutiger Zellen erzeugt Nukleosidtriphosphate für Replikation, Transkription und codierte Proteinsynthese, aber Nukleosidtriphosphate sind in Abwesenheit von Enzymen weitgehend unreaktiv.^[5]

Üblicherweise wird, um ein Ribonukleotid zu oligomerisieren, dieses in einem separaten chemischen Schritt aktiviert, wodurch ein Monomer mit organischer Abgangsgruppe oder ein Anhydronukleotid erhalten wird.^[6] Das Monomer wird isoliert und im darauffolgenden Oligomerisierungsexperiment eingesetzt (Abbildung 1). Auf diese Weise wurde die Bildung von RNA-Strängen in Gegenwart von mineralischen Oberflächen^[7] sowie bei erhöhten Temperaturen und/oder in organischen Lösungsmitteln nachgewiesen.^[8,9] Eine heterogene Umgebung kann vorteilhaft für den Einbau aller vier Nukleotide sein.^[10,11] Lange Polymere wurden in eutektischen

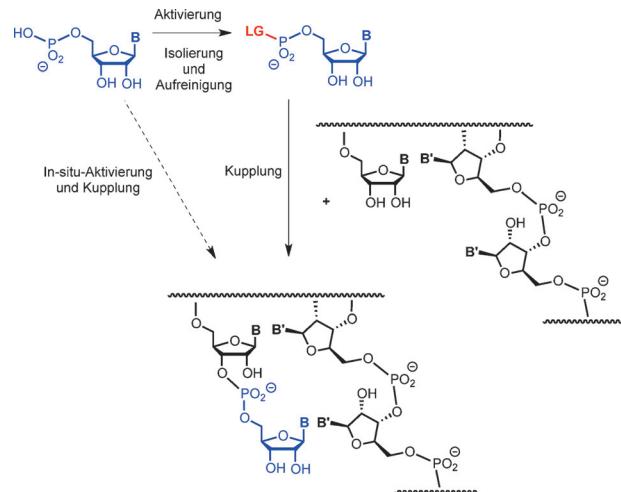


Abbildung 1. Kopieren einer RNA-Sequenz mittels enzymfreier Primerverlängerung, mit oder ohne Voraktivierung des Ribonukleotid-Monomers. LG = Abgangsgruppe.

Eisphasen gefunden.^[11] Auch wurden voraktivierte Nukleotide genutzt, um zu zeigen, dass das Kopieren einer gegebenen Templatsequenz in einen Komplementärstrang in Form von enzymfreier Primerverlängerung in Abwesenheit von Enzymen möglich ist. Voraktivierte Nukleotide, die typischerweise für Kopierreaktionen verwendet wurden, sind Imidazolide,^[12] Methylimidazolide^[13] und Oxyazabenzotriazolide.^[14] Wir konnten kürzlich zeigen, dass bei der Reaktion von Letzteren mit immobilisierten Templat-Primer-Duplexen der annähernd quantitative Einbau jedes der vier Nukleotide (A/C/G/U) beobachtet werden kann.^[15]

Diskontinuierliche, zweistufige Synthesen erfordern komplizierte präbiotische Szenarien. Bedingungen, die Aktivierung und Strangverlängerung simultan auslösen, lassen potenziell präbiotische Prozesse wahrscheinlicher erscheinen. Es ist deshalb wichtig zu fragen, ob solche Bedingungen existieren und welche chemische Aktivierungsmethode sich dafür eignet. Uroniumsalze sind bekannt dafür, Nukleotide für darauffolgende Kupplungsschritte zu aktivieren,^[16,17] sie werden jedoch üblicherweise in organischen Lösungsmitteln eingesetzt, und es ist unklar, ob sie präbiotisch relevant sind. Eine Kombination eines Phosphans mit Dithiodipyridin wurde ebenfalls genutzt, um Nukleotide zu aktivieren,^[18,19] jedoch ist diese Methode nicht für die In-situ-Aktivierung geeignet. Für einfache anorganische Aktivierungsmittel wie COS konnte gezeigt werden, dass sie zwar die Bildung von Aminoacylnukleotiden^[20] induzieren, aber nicht die von RNA-Oligomeren. Auch sind zu schlichte Reagenzien problematisch, weil das Potenzial für Nebenreaktionen in komplexen Reaktionsmischungen mit hochreaktiven Reagentien

[*] Dipl.-Chem. M. Jauker, Dipl.-Chem. H. Griesser, Prof. C. Richert
Institut für Organische Chemie, Universität Stuttgart
70569 Stuttgart (Deutschland)

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201506592> zu finden.

© 2015 Die Autoren. Veröffentlicht von Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Dieser Open Access Beitrag steht unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution Non-Commercial License, die eine Nutzung, Verbreitung und Vervielfältigung in allen Medien gestattet, sofern der ursprüngliche Beitrag ordnungsgemäß zitiert und nicht für kommerzielle Zwecke genutzt wird.

oder erhöhten Temperaturen sehr groß ist. Komplexe Ein-topfreaktionen führen oft zu schwer analysierbaren Gemischen oder Teer.^[21]

Aktivierungsmittel mit präbiotischer Relevanz sind Carbodiimide. Carbodiimid selbst ist ein Tautomer des Cyanamids, d.h. einer Verbindung, die unter als präbiotisch angenommenen Bedingungen gebildet werden kann.^[22–24] Ligationen von Strängen mit endständigen Aminogruppen und Phosphaten wurden schon durch Carbodiimide induziert. Dies schließt Replikationsvorgänge ein.^[25–27] Es ist weiterhin bekannt, dass Kondensationsmittel wie *N*-Ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) bei pH 5.5 eine Voraktivierung induzieren können.^[28] Unter diesen Bedingungen findet jedoch kein genetisches Kopieren statt. Kürzlich wurde auch über die templatfreie Oligomerisierung von Ribonukleotiden bis zu Tetrameren in homogener Lösung bei pH 6.5 berichtet. Es traten dabei aber erhebliche Nebenreaktionen auf^[29] und es wurde kein Kopieren von genetischer Information beobachtet. In den 1960er Jahren waren templatgesteuerte Oligomerisierungen unter Anwendung von In-situ-Aktivierung ohne Organokatalysator untersucht worden.^[30,31] Auch hier wurde nicht das Kopieren genetischer Information beobachtet. Außerdem waren die Ausbeuten niedrig und die erhaltenen Oligomere zu kurz, um einen Duplex zu bilden. Diese Ergebnisse sind verständlich, wenn man bedenkt, dass nichtaktivierte Nukleotide als Inhibitoren der enzymfreien Primerverlängerung fungieren können.^[15,32]

Wir zeigen nun, dass eine Kombination eines Carbodiimids und eines N-alkylierten Heterocyclus als Organokatalysator effiziente Kopierschritte auf RNA-Templaten induziert, selbst wenn nichtaktivierte, freie Ribonukleotide eingesetzt werden. Während Zusätze wie freies Imidazol relativ unreaktive Imidazolide ergeben, kann alkyliertes Imidazol als Organokatalysator hochreaktive Imidazoliumspezies bilden. Sowohl Primerverlängerung auf bereits vorhandenen RNA-Strängen als auch templatfreie De-novo-Oligomerisierung von Ribonukleotiden zu RNA-Strängen wurde beobachtet. Dies zeigt zum ersten Mal, dass das Abschreiben genetischer Information ohne Voraktivierung des Ribonukleotids in einem Syntheseschritt möglich ist. Sowohl Strangbildung als auch Abschreiben von genetischer Information finden also ohne das Zutun eines Synthesechemikers statt. Die hier beschriebenen Reaktionsbedingungen haben weitere intrinsische Reaktivitäten von Nukleotiden und Aminosäuren zum Vorschein gebracht, die zur spontanen Bildung von Peptidyl-RNA und Cofaktoren führen, wie in Lit. [33] beschrieben wird.

Zunächst untersuchten wir Primerverlängerungen mit Guanosin-5'-monophosphat (GMP) als Monomer und Cytosin als Templatbase im RNA-Templat (Abbildung 2a). Dies ist der günstigste Fall der vier Kopierreaktionen, da GMP stärker als die vier anderen Nukleotide (AMP, CMP und UMP) bindet.^[32] Trotzdem ist genetisches Kopieren auch hier anspruchsvoll, da es sowohl intrinsischer Reaktivität als auch selektiver molekularer Erkennung bedarf, um sequenzspezifisch abzulaufen.^[34] Anfangs schien die Herausforderung, Aktivierung und Kupplung in einer Lösung zu erreichen, fast nicht zu bewältigen. Wie bereits erwähnt, wirkt das Nukleotid als kompetitiver Inhibitor, indem es die zu verlängernde

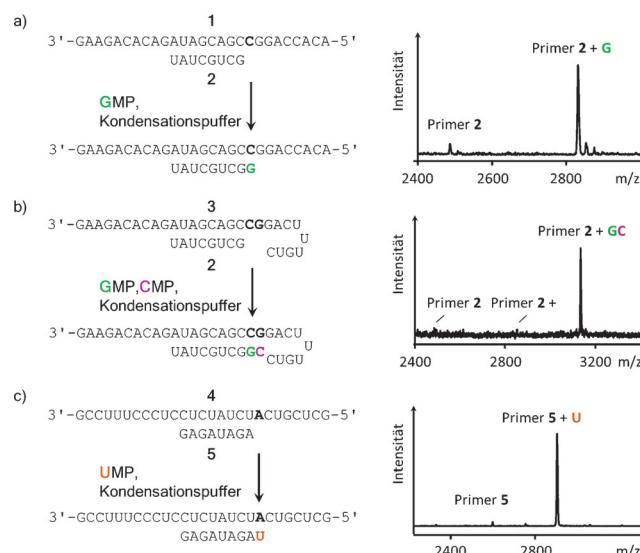


Abbildung 2. Ribonukleotide werden unter In-situ-Aktivierung gegenüber ihren komplementären Basen in wässrigem Kondensationspuffer in hoher Ausbeute eingebaut. a) Primerverlängerung um GMP nach 2 d bei 20°C; b) zweifache Verlängerungen eines Primers (um GMP und dann CMP) nach 6 d bei 20°C; c) Primerverlängerung um UMP nach 5 d bei 0°C. Es ist jeweils die Reaktionsgleichung neben einem MALDI-Massenspektrum gezeigt; Bedingungen: 0.8 M EDC, 0.1–0.15 M 1-Ethylimidazol, 0.4 M NaCl, 0.2–0.5 M HEPES-Puffer und/oder 0.08–0.16 M MgCl₂. Weitere Details in den Hintergrundinformationen.

Stelle blockiert.^[15] Da NMR-Untersuchungen zeigten, dass die überwiegende Mehrheit der Ribonukleotidmoleküle in Lösungen mit EDC nichtaktiviert bleibt, wurde hierdurch ein erhebliches Problem erwartet. Darüber hinaus haben die Schritte der Aktivierung und Verlängerung unterschiedliche Temperatuoptima. Die Kupplung wird am besten bei tiefen Temperaturen durchgeführt,^[14] die Aktivierung jedoch bei Raumtemperatur oder darüber. Während die Aktivierung von organischen Lösungsmitteln und saurem pH-Bereich^[28] begünstigt wird, erfordert der Kupplungsschritt wegen des Templateffekts einen wässrigen Puffer. Ein neutraler oder basischer pH-Bereich ist nötig, um ausreichende Nucleophilie am Primer-Terminus sicherzustellen.

Wir verfolgten die Primerverlängerung mit MALDI-TOF-Massenspektrometrie unter Bedingungen, die eine quantitative Auswertung ermöglichen.^[35] Zunächst war trotz eines Puffers mit hoher Salzkonzentration und 0.8 M EDC keine Verlängerung des Primers **2** um GMP feststellbar. Versuche, die auf hohe Ausbeuten abzielten, blieben erfolglos. Dies war in Einklang mit den niedrigen Ausbeuten, über die in der frühen Literatur berichtet worden war.^[30,31] Erst bei Einsatz eines Organokatalysators setzten erkennbare Kopierreaktionen ein.

Der Zusatz von Imidazol oder 2-Methylimidazol ergab nicht mehr als 2 % Umsatz nach 24 h. Vermutlich wurden Imidazolide der Nukleotide, d.h. bekannte Monomere für Kopierreaktionen,^[29,36] in situ gebildet; die Konzentration dieser Spezies erreichte aber vermutlich keine Werte, die für eine effiziente Verlängerung notwendig wären. Mit 1-Methyladenin als Katalysator^[37] konnte 12 % Primerverlängerung nach 1 d bei 20°C beobachtet werden. Wurde 1-Ethyli-

Tabelle 1: Ergebnisse der Primerverlängerungsversuche in Lösung.^[a]

Templat, Primer ^[b]	NMP ^[c]	Kat. ^[d]	Puffer ^[e]	pH	T [C°]	t [h]	Verlänge- rung [%]
1, 2	G	–	A	6.7	20	24	< 1
1, 2	G	Im	A	6.7	20	24	2
1, 2	G	2-Melm	A	6.7	20	24	8
1, 2	G	MeAde	A	7.7	20	24	12
1, 2	G	1-EtIm	A	6.7	20	24	32
1, 2	G	1-EtIm	A	5.5	20	24	44
1, 2	G	1-EtIm	A	6.5	20	24	62
1, 2	G	1-EtIm	A	7.0	20	24	63
1, 2	G	1-EtIm	A	7.5	20	24	74
1, 2	G	1-EtIm	A	7.9	20	24	73
1, 2	G	1-EtIm	A	7.9	20	48	90
3, 2	G + C	1-EtIm	A	7.5	20	140	95
4, 5	U	1-EtIm	A	7.5	20	50	75
4, 5	U	1-EtIm	B	7.5	0	120	92

[a] Bedingungen: siehe „General Protocol 1“ in den Hintergrundinformationen. [b] 60 µM Templat, 50 µM Primer. [c] 20 mM GMP; oder 150 mM UMP; oder 50 mM GMP und 50 mM CMP. [d] Katalysatoren: Im, Imidazol, 2-Methylimidazol; MeAde, 1-Methyladenin; 1-EtIm, 1-Ethylimidazol (jeweils 0.1 M für Puffer A; 0.15 M 1-Ethylimidazol für Puffer B). [e] Puffer A = 0.2 M HEPES, 0.4 M NaCl, 0.16 M MgCl₂, 0.8 M EDC; Puffer B = 0.5 M HEPES, 0.08 M MgCl₂, 0.8 M EDC.

midazol eingesetzt, betrug die Ausbeute an verlängertem Primer 32 % nach 24 h (Tabelle 1). Ein darauffolgendes pH-Wert-Screening ergab ein Optimum von 7.5.

Als nächstes wurden die Salzbedingungen variiert. Ohne zweiwertige Metallionen wurde keine Primerverlängerung beobachtet. Bei Anwesenheit von 80 mM Mn²⁺ wurde 10 % verlängerter Primer nach 24 h bei pH 8 gefunden. Mit 80 mM Ca²⁺ wurde 25 % Umsatz nach 24 h detektiert. Die schnellste Reaktion wurde mit Mg²⁺ beobachtet. Hier ergab sich 70 % Verlängerung nach 1 d und 90 % Umsatz nach 2 d (Massenspektrum in Abbildung 2a). Mit demselben Puffer und einer Mischung aus GMP und CMP fanden zwei aufeinanderfolgende Kopierschritte mit hoher Ausbeute auf einem Haarnadel-Templat statt, dessen Struktur unkontrollierte weitere Verlängerungen verhinderte (Abbildung 2b). Wenn Uridin-5'-monophosphat (UMP) als das am schwächsten bindende Nukleotid^[32] einem Primer angeboten wurde, ergab sich 75 % Einbau nach 2 d. Absenken der Temperatur auf 0°C (Bedingungen, die denen eutektischer Eisphasen nahe kommen) führte zu fast quantitatativem Einbau von UMP nach 5 d in 0.5 M HEPES-Puffer (Abbildung 2c, letzter Eintrag in Tabelle 1).

Hohe Konzentrationen sind ebenfalls charakteristisch für eutektische Eisphasen, und die positiven Auswirkungen von niedrigen Temperaturen auf Kopierreaktionen sind bekannt.^[17] Der optimierte Puffer wurde „generalisierter Kondensationspuffer“ genannt (0.8 M EDC, 0.15 M 1-Ethylimidazol, 0.08 M MgCl₂, 0.5 M HEPES, pH 7.5) und bei allen weiteren Ansätzen verwendet.

Massenspektren von Kopierexperimenten mit AMP als Monomer zeigten intensive Signale von Oligoadenylenaten.

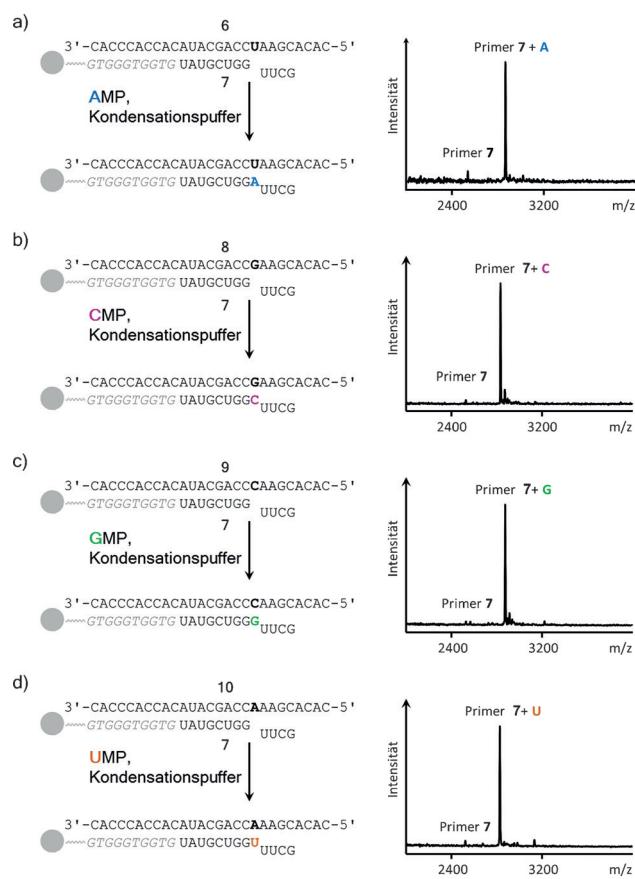


Abbildung 3. Jedes der vier Ribonukleotide wird in Kondensationspuffer, der In-situ-Aktivierung induziert, in hoher Ausbeute gegenüber seiner komplementären Base eingebaut. Reaktionsgleichungen sind neben MALDI-Massenspektren gezeigt. Das Oligodesoxyribonukleotid, das den Primer-Templat-Duplex auf den Partikeln hält, ist kursiv dargestellt. Das Tetramer begrenzt das Strangwachstum auf ein Nukleotid, was die Analyse erleichtert.^[15] a) Verlängerung um AMP, Spektrum nach 21 d bei 0°C; b) Verlängerung um CMP, Spektrum nach 8 d bei 0°C; c) Verlängerung um GMP, Spektrum nach 8 d bei 0°C; d) Verlängerung um UMP nach 21 d bei 0°C. Bedingungen: 0.8 M EDC, 0.15 M 1-Ethylimidazol, 0.5 M HEPES Puffer und 0.08 M MgCl₂. Weitere Details finden sich in den Hintergrundinformationen.

Das war unerwartet, weil ähnliche Assays mit voraktivierten Monomeren keine Oligomere gezeigt hatten.^[14, 15, 17] Die Primer-Templat-Duplexe wurden daraufhin durch Hybridisierung auf magnetischen Partikeln immobilisiert (Abbildung 3).^[15, 38] Magnetische Abtrennung gefolgt vom Waschen der Partikel und Denaturierung ermöglichte nun einen ungestörten Blick auf Kopierreaktionen, selbst wenn A als Monomer eingesetzt wurde (Abbildung 3a). Kinetikmessungen ergaben, dass der Einbau von AMP gegenüber U mit einer Halbwertszeit von ca. 3 d erfolgte, was weniger als eine Größenordnung langsamer als bei ähnlichen Reaktionen mit voraktiviertem AMP ist.^[15, 39]

Um zu testen, ob die gefundenen Kopierbedingungen allgemeingültig sind, wurde Primer 7 an drei andere Template hybridisiert, von denen jedes eine andere Templatbase anbot (C, G oder U). Den erhaltenen Primer-Templat-Duplexen wurde nun die Möglichkeit gegeben, mit den komplementären Ribonukleotiden (AMP, CMP, GMP oder UMP) zu rea-

gieren. In jedem Fall wurde nahezu quantitative Primerverlängerung beobachtet (Abbildungen 3b-d). Trotz der hohen Konzentrationen, die an das erinnern, was in eutektischen Eisphasen gefunden wird,^[11] liefen die Reaktionen erstaunlich sauber ab. Es waren nur wenige Nebenprodukte per MALDI-MS detektierbar. Das bestätigt zusätzlich, dass enzymfreies Kopieren von RNA keiner Voraktivierung bedarf.

Zum Schluss führten wir Vorversuche zur Strangbildung unter In-situ-Aktivierungsbedingungen durch. Mittels einer Kombination aus Ionentauscher-HPLC und MALDI-MS suchten wir in Lösungen von AMP, UMP oder CMP (jeweils 150 mM) nach 7 d bei 0°C nach Oligomeren. Im Fall von GMP wurde eine 20 mM Lösung verwendet, um Ausfällungen und Aggregation zu vermeiden. Nur für AMP war nach 7 d > 90% des Monomers umgesetzt. Bei CMP war nach dieser Zeit noch ≥ 25% des Monomers übrig, und von UMP verblieben nach 7 d noch ≥ 40%. Im Fall von GMP waren die Peaks zu breit für eine eindeutige Zuordnung, aber es schien als wären signifikante Konzentrationen sowohl der Monomere als auch kurzer Oligomere vorhanden. Abbildung 4 zeigt Ergebnisse eines Ansatzes mit AMP nach 30 d bei 0°C.

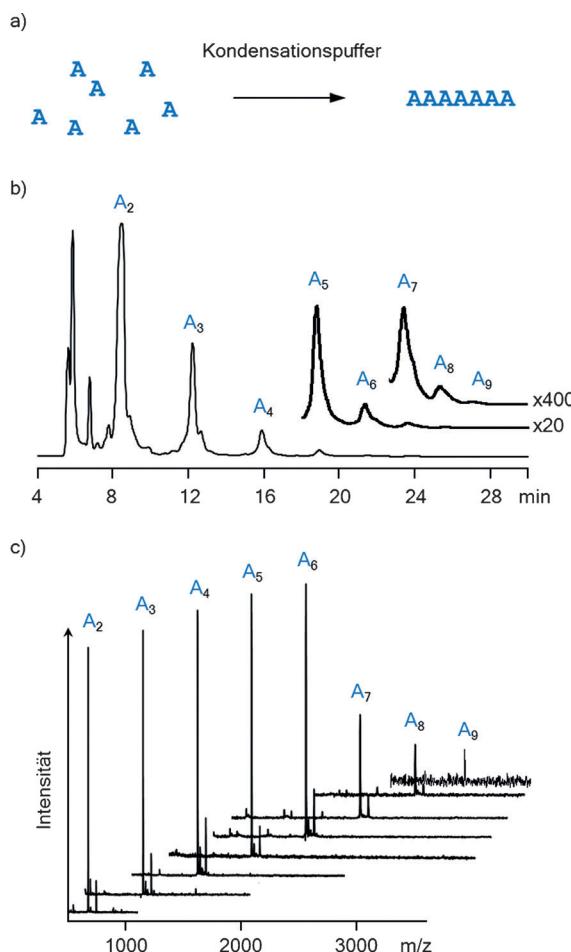


Abbildung 4. Oligomerisierung von AMP in Kondensationspuffer bei 0°C nach 30 d. a) Reaktionsgleichung. b) Ionentauscher-HPLC-Chromatogramm bei $\lambda_{\text{det}} = 260 \text{ nm}$. c) Überlagerung von MALDI-TOF-Massenpektronen der HPLC-Fraktionen, die Peaks von Oligonukleotiden mit 2–9 Nukleotiden zeigen.

Peaks für Ketten mit bis zu mindestens 9 AMP-Einheiten sind erkennbar. Über die Bildung von gemischten Sequenzen, die genetische Information codieren können, und jedes der vier Nukleotide (A/C/G/U) enthalten, berichten wir in Lit. [33]. Insgesamt bestätigen unsere Ergebnisse, dass „generalisierte Kondensationsbedingungen“ sowohl Kopierreaktionen als auch templatunabhängige De-novo-Bildung von RNA-Strängen induzieren.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass eine Kombination aus einem Carbodiimid und einem N-alkylierten Heterocyclus als Organokatalysator ein effizientes Kopieren genetischer Information induziert. Die Effizienz der Reaktion hängt stark von der Wahl des Katalysators ab. Eine positiv geladene Imidazoliumspezies, von der wir erwarten, dass sie sich mit 1-Ethylimidazol bildet, ist offenbar viel reaktiver als die bekannten Imidazolide. Das Kettenwachstum ist dabei nicht auf templatgesteuerte Reaktionen beschränkt. Oligomerisierung von Ribonukleotiden findet in Abwesenheit einer Mineraloberfläche statt. Die Oligomerisierung ist schnell genug, um Stränge bereitzustellen, die als Template oder Primer dienen könnten, aber langsam genug, um die Reaktionslandschaft nicht zu dominieren, sodass sequenzselektive Kopierschritte noch möglich sind. Die schnelle Oligomerisierung von AMP stellt einen interessanten Kontrast zur langsamen Primerverlängerung auf A-reichen Templaten^[40,41] dar. Letzteres ist der zweite Schritt der Szenarios einer Strangbildung mit anschließendem Kopieren. Deshalb deutet dieser Befund auf einen kinetischen Ausgleich hin. Ausgehend von unseren Ergebnissen kann ein einfacheres Bild der Entstehung von RNA-Strängen formuliert werden. Auch experimentell können nun einfachere Versuchsanordnungen eingesetzt werden. Schließlich lohnt es sich zu erwähnen, dass eine Reihe von anderen Prozessen, die zu wichtigen Biomolekülen führen, unter denselben „generalisierten Kondensationsbedingungen“ stattfinden, wie wir in Lit. [33] berichten.

Experimentelles

Kondensationspuffer: Das optimierte Reaktionsmedium („generalisierter Kondensationspuffer“) ist eine wässrige Lösung aus HEPES (0.5 M), MgCl₂ (0.08 M), 1-Ethylimidazol (0.15 M) und der entsprechenden Konzentrationen der Reaktanten, das mit NaOH-Lösung auf pH 7.5 eingestellt wurde. Diese Lösung (65 μL) wurde frisch zu EDC-Hydrochlorid (10 mg, 52 μmol) gegeben, um eine Anfangskonzentration von ca. 0.8 M EDC zu erhalten.

Primerverlängerung: Zu einer Suspension der mit dem Immobilisierungsstrang beladenen Partikel (5 μL, 5 mg mL⁻¹) in HEPES-Puffer (500 mM mit 80 mM MgCl₂, pH 7.5) wurden Lösungen des Templaats (0.6 μL, 100 μM, 60 pmol) und des Primers (0.5 μL, 100 μM, 50 pmol) gegeben und bei 0°C für 15 min stehen gelassen. Der Überstand wurde abgenommen und 5 μL frisch hergestellter Kondensationspuffer mit entweder AMP (150 mM), GMP (20 mM), CMP (150 mM) oder UMP (150 mM) bei pH 7.5 zugegeben. Das Gemisch wurde in ein Gefäß, das 5 nmol des tetrameren Hilfsstrangs enthielt, gegeben, 5 s kräftig durchmischt und bei 0°C inkubiert. Nach jeweils 5 d wurde der Überstand abgenommen und durch frische Lösung ersetzt. Die Reaktion wurde per MALDI-MS verfolgt.^[15]

Danksagung

Wir danken Dr. C. Deck und Dr. E. Kervio für Diskussionen. Diese Arbeit wurde von der DFG (Projekt RI 1063/8-2) und der EU COST action CM1304 unterstützt.

Stichwörter: Genetisches Kopieren · Nukleotide · Oligomerisierungen · Replikation · RNA

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 14559–14563
Angew. Chem. **2015**, *127*, 14767–14771

- [1] M. M. Yusupov, G. Z. Yusupova, A. Baucom, K. Lieberman, T. N. Earnest, J. H. Cate, H. F. Noller, *Science* **2001**, *292*, 883–896.
- [2] T. R. Cech, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, *29*, 759–768; *Angew. Chem.* **1990**, *102*, 745–755.
- [3] C. C. Mello, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 6985–6994; *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 7114–7124.
- [4] W. Gilbert, *Nature* **1986**, *319*, 618.
- [5] F. Westheimer, *Science* **1987**, *235*, 1173–1178.
- [6] M. S. Verlander, R. Lohrmann, L. E. Orgel, *J. Mol. Evol.* **1973**, *2*, 303–316.
- [7] J. P. Ferris, A. R. Hill, R. H. Liu, L. E. Orgel, *Nature* **1996**, *381*, 59–61.
- [8] S. Pino, F. Ciciruelo, G. Costanzo, E. Di Mauro, *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 36494–36503.
- [9] G. Costanzo, R. Saladino, G. Botta, A. Giorgi, A. Scipioni, S. Pino, E. Di Mauro, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 999–1008.
- [10] P.-A. Monnard, J. W. Szostak, *J. Inorg. Biochem.* **2008**, *102*, 1104–1111.
- [11] P.-A. Monnard, A. Kanavarioti, D. W. Deamer, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13734–13740.
- [12] B. J. Weimann, R. Lohrmann, L. E. Orgel, H. Schneider-Bernloehr, J. E. Sulston, *Science* **1968**, *161*, 387.
- [13] G. F. Joyce, T. Inoue, L. E. Orgel, *J. Mol. Biol.* **1984**, *176*, 279–306.
- [14] S. R. Vogel, C. Deck, C. Richert, *Chem. Commun.* **2005**, 4922.
- [15] C. Deck, M. Jauker, C. Richert, *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 603–608.
- [16] P. Hagenbuch, E. Kervio, A. Hochgesand, U. Plutowski, C. Richert, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 6588–6592; *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 6746–6750.
- [17] S. R. Vogel, C. Richert, *Chem. Commun.* **2007**, 1896.
- [18] T. Mukaiyama, M. Hashimoto, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 8528–8532.
- [19] B. C. Chu, L. E. Orgel, *Nucleic Acids Res.* **1988**, *16*, 3671–3691.
- [20] L. J. Leman, L. E. Orgel, M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 20–21.
- [21] S. A. Benner, H.-J. Kim, M. A. Carrigan, *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 2025–2034.
- [22] A. Schimpl, R. M. Lemmon, M. Calvin, *Science* **1965**, *147*, 149–150.
- [23] F. Duvernay, T. Chiavassa, F. Borget, J.-P. Aycard, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 7772–7773.
- [24] M. L. Kilpatrick, *J. Am. Chem. Soc.* **1947**, *69*, 40–46.
- [25] G. von Kiedrowski, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1986**, *25*, 932–935; *Angew. Chem.* **1986**, *98*, 932–934.
- [26] W. S. Zielinski, L. E. Orgel, *Nucleic Acids Res.* **1987**, *15*, 1699–1715.
- [27] W. S. Zielinski, L. E. Orgel, *Nature* **1987**, *327*, 346–347.
- [28] J. A. Rojas Stütz, E. Kervio, C. Deck, C. Richert, *Chem. Biodiversity* **2007**, *4*, 784–802.
- [29] B. T. Burcar, M. Jawed, H. Shah, L. B. McGown, *Origins Life Evol. Biospheres* **2015**, *45*, 31–40.
- [30] J. E. Sulston, R. Lohrmann, L. E. Orgel, H. T. Miles, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1968**, *59*, 726–733.
- [31] J. Sulston, R. Lohrmann, L. E. Orgel, H. T. Miles, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1968**, *60*, 409–415.
- [32] E. Kervio, B. Claesen, U. E. Steiner, C. Richert, *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, 7409–7420.
- [33] M. Jauker, H. Griesser, C. Richert, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, DOI: 10.1002/anie.201506593; *Angew. Chem.* **2015**, DOI: 10.1002/ange.201506593.
- [34] A. Kaiser, C. Richert, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 793–799.
- [35] D. Sarracino, C. Richert, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 2543–2548.
- [36] R. Lohrmann, L. E. Orgel, *J. Mol. Biol.* **1980**, *142*, 555–567.
- [37] K. J. Prabahar, J. P. Ferris, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 4330–4337.
- [38] A. Kaiser, S. Spies, T. Lommel, C. Richert, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 8299–8303; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 8424–8428.
- [39] K. Adamala, J. W. Szostak, *Science* **2013**, *342*, 1098–1100.
- [40] A. R. Hill, L. E. Orgel, T. Wu, *Origins Life Evol. Biospheres* **1993**, *23*, 285–290.
- [41] E. Kervio, A. Hochgesand, U. E. Steiner, C. Richert, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 12074–12079.

Eingegangen am 16. Juli 2015,
veränderte Fassung am 3. September 2015
Online veröffentlicht am 5. Oktober 2015