

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Untersuchungen zur präbiotischen Entstehung von RNA und ihrer Modifikationen

Christina Schneider
aus
Schwäbisch Hall, Deutschland

2019

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 7 der Promotionsordnung vom 28. November 2011 von Herrn *Prof. Dr. Thomas Carell* betreut.

Eidesstattliche Versicherung

Diese Dissertation wurde eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 09.07.2019

Christina Schneider

Dissertation eingereicht am: 11.07.2019

1. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Carell

2. Gutachter: Dr. Stefanie Kellner

Mündliche Prüfung am: 05.08.2019

„Ich habe gelernt, dass man nie zu klein dafür ist, einen Unterschied zu machen.“

Greta Thunberg, 2019

Publikationsliste

Teile dieser Arbeit wurden bereits publiziert oder auf Konferenzen vorgestellt.

Publikationen während der Doktorarbeit

- S. Becker*, C. Schneider*, A. Crisp, T. Carell, *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 325.
- C. Schneider, S. Becker, H. Okamura, A. Crisp, T. Amatov, M. Stadlmeier, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 5943-5946.
- S. Becker, C. Schneider, H. Okamura, A. Crisp, T. Amatov, M. Dejmek, T. Carell, *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 163.

*: Diese Autoren haben zu gleichen Teilen beigetragen.

Konferenzbeiträge

- Molecular Origin of lifes – CAS conference, 11.-12.10.2018, München, Deutschland.
- 52nd ESBOC Symposium “Life and Death of Nucleic Acids”, 18.-20.5.2018, Gregynog, Wales, Großbritannien, Posterpräsentation.
- GDCh-Wissenschaftsforum, 10.-14.9.2017, Berlin, Deutschland, Vortrag.
- 17th Symposium on Chemistry of Nucleic Acid Components (SCNAC), Cesky Krumlov, Tschechien, Posterpräsentation.
- 20th Lecture Conference ORCHEM, 5.-7.9.2016, Weimar, Deutschland, Posterpräsentation.
- CIPSM Scientific Oktoberfest, 15.-16.9.2016, München, Deutschland.

Danksagung

Diese Arbeit wäre nicht ohne die Unterstützung von einigen Leuten möglichen gewesen, denen ich an dieser Stelle danken möchte.

Großer Dank geht an meinen Doktorvater *Prof. Dr. Thomas Carell* für die spannende Themenauswahl, die Unterstützung und die hervorragenden Arbeitsbedingungen.

Dr. Stefanie Kellner danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Bei den Mitgliedern der Prüfungskommission bedanke ich mich herzlich für das Beisitzen der mündlichen Prüfung.

Dr. Markus Müller, dir möchte ich für dein immer offenes Ohr, für deine vielen hilfreichen Ratschläge und für unsere gemeinsamen Laufrunden danken. Egal ob in der Mittagspause oder früh morgens auf Konferenzen, es war immer schön mit dir den Kopf frei zu bekommen.

Slava Gärtner danke ich für ihre Hilfe bei allen bürokratischen Belangen.

Bei *Kerstin Kurz*, *Kristof Hufnagel* und *Luis de la Osa de la Rosa* möchte ich mich für den Einsatz im Arbeitskreis Carell bedanken. Egal ob es um die außerterminlichen Bestellungen von dringend benötigten Chemikalien oder die Versorgung mit Glaswaren fürs Labor ging, ihr hattet immer ein offenes Ohr und konntet mir immer weiterhelfen.

Den Analytikabteilungen der LMU danke ich für die gewissenhafte und zeitnahe Messung meiner Proben.

Michael Stadlmeier, *Jonas Feldmann*, *Eva Korytiaková*, *Stefan Wiedemann*, *Sebastian Vogel* und *Sebastian Hölzl* danke ich für das gewissenhafte Korrekturlesen meiner Arbeit.

Meinen Praktikanten *Fabian Pilz*, *Annika Menke*, *Felix Xu*, *Felix Schäfer*, *Melis Cabbar* und *Yuhao Jiang* danke ich für den großen Einsatz während ihrer Praktika und Bachelorarbeiten. Ihr habt tolle Arbeit geleistet! Es hat Spaß gemacht euch zu betreuen und ich konnte viel von euch lernen.

Auch bei meinen aktuellen und ehemaligen Laborkollegen in F4.017 *Dr. Anna Rydzik*, *Milda Nainyte*, *Dr. Miriam Wallner*, *Samuele Stazzioni*, *Matthias Kurz*, *Kerstin Kurz* sowie *Fabian Hernichel* möchte ich mich herzlich bedanken. Danke, für die vielen hilfreichen und mutmachenden Gespräche, durch euch habe ich mich im Labor immer wohlgeföhlt.

Mein Dank gilt auch allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Präbiotik-Subgroup. *Dr. Sidney Becker*, *Dr. Hidenori Okamura*, *Antony Crisp*, *Dr. Tynchtyk Amatov*, *Martin Rossa*, *Milda Nainyte*, *Stefan Wiedemann* und *Jonas Feldmann*, ich habe durch euch viel gelernt und ich denke, wir haben in den letzten Jahren gemeinsam viel gute Arbeit geleistet.

Danksagung

Dr. Michael Stadlmeier und *Dr. Stefanie Kellner*, danke für die Unterstützung und die Ratschläge bei meinen massenspektrometrischen Untersuchungen sowie der unermüdlichen Hilfe, wenn die Orbitrap mal wieder nicht so wollte wie ich.

Dr. Katharina Iwan danke, dass du immer ein offenes Ohr für mich hattest und du mich davon überzeugt hast, dass ein *Life on the edge* mit Kiwi und Milch nicht unbedingt sein muss. *Eva Korytiaková* danke für die unzähligen Gespräche und Notfallexpressi. *Dr. Michael Stadlmeier* du bist mir in den vergangenen drei Jahren nicht nur im Kampf gegen Korbi zur Seite gestanden, du hast mich auch sonst immer ermutigt und unterstützt, sei es mit flüssigem Glück, Nerf Gun-Fights oder Lindor-Schokolade. Danke, dass du dich von keiner meiner verrückten Ideen abschrecken lässt und du sogar 21 km mit mir läufst.

Auch bei allen anderen Mitgliedern des Arbeitskreis Carells möchte ich mich für die tolle Zeit bedanken. Ohne euch wäre die Doktorarbeit nicht das gleiche gewesen.

Dr. Maike Wahl und *Franziska Pecho* und allen anderen Felscrew-Mitgliedern, danke, dass ihr mit mir dem Alltag beim Klettern entflohen seid.

Großer Dank gilt auch meinen Freunden und Kommilitonen aus Saarbrücken und Heidelberg, *Kerstin Egele*, *Cynthia Prudel*, *Philipp Rebmann*, *Giulia Worf*, *Dr. Sebastian Hahn*, *Andreas Zech*, *Thorsten Lohr*, *Stefanie Federle*, *Manuel Hodecker*, *Michael Ganschow*, *Dr. Julius Hornung*, *Christina Völkel*, *Miriam Starke* und *Dorothee Schindler*. Wir haben uns zusammen durch Praktika gekämpft, stundenlang in der Bib gebüffelt und unsere Erfolge anschließend zusammen gefeiert. Das Studium hätte ohne euch nicht halb so viel Spaß gemacht.

Ich hatte das große Glück, bereits sehr früh Weggefährtinnen zu finden, die mich heute noch begleiten. *Tabea Sturm*, *Katharina Frank*, *Eleni Stark*, *Maren Dingler*, *Jasmin Frey* und *Katharina Schwerdt*, danke, dass ihr mit mir seit Jahren die Welt auf verschiedensten Trips unsicher macht, ich mich immer auf euch verlassen kann und ihr sogar „Veröffentlichungs-Cosmos“ mit mir trinkt. Ich bin unglaublich dankbar euch als Freundinnen zu haben.

Sebastian Hölzl, danke, dass du mich auch nach den längsten und anstrengendsten Tagen noch zum Lachen bringst, dass du mir immer zuhörst und mir Rückhalt gibst.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern *Maria Schneider-Mota* und *Helmut Schneider* sowie meinen Schwestern *Sabrina* und *Lydia Schneider*. Ihr habt mich immer auf jede erdenkliche Weise unterstützt, sei es finanziell oder emotional. Ihr standet immer hinter mir, habt mich aufgefangen, wenn ich es brauchte und euch mit mir über meine Erfolge gefreut, wenn es etwas zu feiern gab. Danke, dass ich mich immer auf euch verlassen kann, ohne euch wäre ich heute nicht, wo ich jetzt bin.

Inhaltsverzeichnis

Abstract.....	i
Zusammenfassung.....	v
1. Molekulare Evolution.....	1
1.1. Die RNA-Welt Hypothese.....	2
1.2. Alternative RNA-Oligomere.....	3
1.3. Bedingungen auf der frühen Erde.....	5
1.4. Synthese von Nukleosiden unter präbiotischen Bedingungen.....	6
1.4.1. Präbiotische Entstehung von Zucker.....	6
1.4.2. Präbiotischer Zugang zu den Nukleosiden.....	9
1.5. Phosphorylierungen unter präbiotischen Bedingungen.....	16
1.6. Kondensation von Nukleotiden unter präbiotischen Bedingungen.....	18
1.7. Modifizierte Nukleoside.....	21
1.7.1. LUCA.....	22
1.8. Präbiotische Entstehung von Aminosäuren und Peptiden.....	23
1.9. Die Verbindung von Aminosäuren und Nukleosiden.....	25
2. Zielsetzung.....	29
3. Veröffentlichte Ergebnisse.....	30
3.1. Nass-Trocken-Zyklen ermöglichen den parallelen, kontinuierlichen Zugang zu kanonischen und nicht-kanonischen Nukleosiden.....	30
3.2. Nicht-kanonische Nukleoside und die Chemie der Entstehung des Lebens.....	40
3.3. Nicht-kanonische RNA-Nukleoside als molekulare Fossilien einer frühen Erde – Generierung durch präbiotische Methylierungen und Carbamoylierungen.....	45
4. Unveröffentlichte Ergebnisse.....	73
4.1. Alternativer Zugang zu aminoacetylierten Adenosin-Derivaten.....	73
4.1.1. Prolog.....	73
4.1.2. Ergebnisse und Diskussion.....	74
4.1.3. Zusammenfassung und Ausblick.....	90
4.2. Zugang zu aminoacetylierten Cytidin-Derivaten.....	92
4.2.1. Prolog.....	92
4.2.2. Ergebnisse und Diskussion.....	92
4.2.3. Zusammenfassung und Ausblick.....	96
4.3. Mineralien als präbiotische Phosphorylierungsreagenzien.....	97
4.3.1. Prolog.....	97
4.3.2. Ergebnisse und Diskussion.....	97

Inhaltsverzeichnis

4.3.3. Zusammenfassung und Ausblick	106
4.4. Oligomerisierung von aktivierten Nukleotiden unter Hochdruck-Bedingungen.....	107
4.4.1. Prolog.....	107
4.4.2. Ergebnisse und Diskussion	107
4.4.3. Zusammenfassung und Ausblick	113
5. Experimenteller Teil.....	115
5.1. Methoden.....	115
5.2. Synthese der aminoacetylierten Adenosin-Derivate	120
5.3. Synthese der aminoacetylierten Cytidin-Derivate	141
5.4. Experimentelle Durchführung der Präbiotischen Phosphorylierung	151
5.5. Experimentelle Durchführung der Hochdruckexperimente	154
6. Literatur	160
7. Abkürzungsverzeichnis.....	171
8. Anhang.....	174
8.1. Co-Injektionen.....	174
8.2. Kalibriergeraden.....	176

Abstract

The RNA world hypothesis postulates that life began with self-replicating RNA molecules and that both DNA and proteins developed later. RNA can store genetic information and to carry out catalytic processes, which fundamentally strengthens this hypothesis. However, the hypothesis requires the development of RNA building blocks of which the synthesis is compatible with geochemical models of the early Earth. It has been known for a long time that RNA consists of four canonical nucleosides (A, C, G and U) and more than 120 RNA modifications. The question arises whether life only began with the canonical nucleosides or whether modified nucleosides are fossils of this early phase of chemical evolution. The non-canonical bases, in particular amino acid-modified purines, increase the chemical diversity of RNA and thus the folding possibilities and catalytic functions can be achieved. Finding evidence for the potential existence of modified nucleosides on the early Earth requires simple chemistry compatible with early Earth geochemical models to produce these non-canonical bases.

In the first part of this work, a model was developed that allows the synthesis to RNA nucleosides through continuous synthesis by simple fluctuations of physical parameters such as temperature, pH value and concentration. In this way, both the canonical and many non-canonical purine nucleosides can be produced in parallel by wet-dry cycles (see Figure 1A). The data show that modified nucleosides may have been formed as competing molecules. In this sense, they could be regarded as molecular fossils.

In the course of this PhD thesis, synthesis routes to further methylated and carbamoylated nucleosides were developed by post-modification of the canonical nucleosides. The simple reaction cascade for obtaining the modified nucleosides is based on isocyanate, methylisocyanate, methylamine, ammonia and sodium nitrite. Therefore, it is compatible with the conditions on the early Earth. The unstable molecule isocyanate can be chemically stored in the form of methylurea while being trapped by methylamine. Methylurea can be nitrosylated to *N*-methyl-*N*-nitrosourea, releasing isocyanate again under basic conditions. This chemistry can convert canonical pyrimidines and purines into non-canonical nucleosides. The nitrosylation chemistry described above has also been extended to amino acids, enabling biologically important modified nucleosides such as *N*⁶-threonylcarbamyl-adenosine (*t*⁶A) to be obtained prebiotically (see Figure 1B).

Since the modification of the amino acids only led to low yields of aminoacylated nucleosides, adenosine was modified directly by the reaction with methylisocyanate to create a methyl urea bond and converted to amino acids by the same nitrosylation chemistry. Thus, the yield of aminoacylated adenosine could be considerably increased (see Figure 1D). In further

experiments, the adenosine precursor molecule formamidopyrimidine (FaPy) could also be derivatized with a methyl urea bond and reacted in further steps to methyl urea-derivatized adenosine (see Figure 1C). The multitude of reaction pathways, all based on the same chemistry, consolidate that these nucleosides were present on the early Earth.

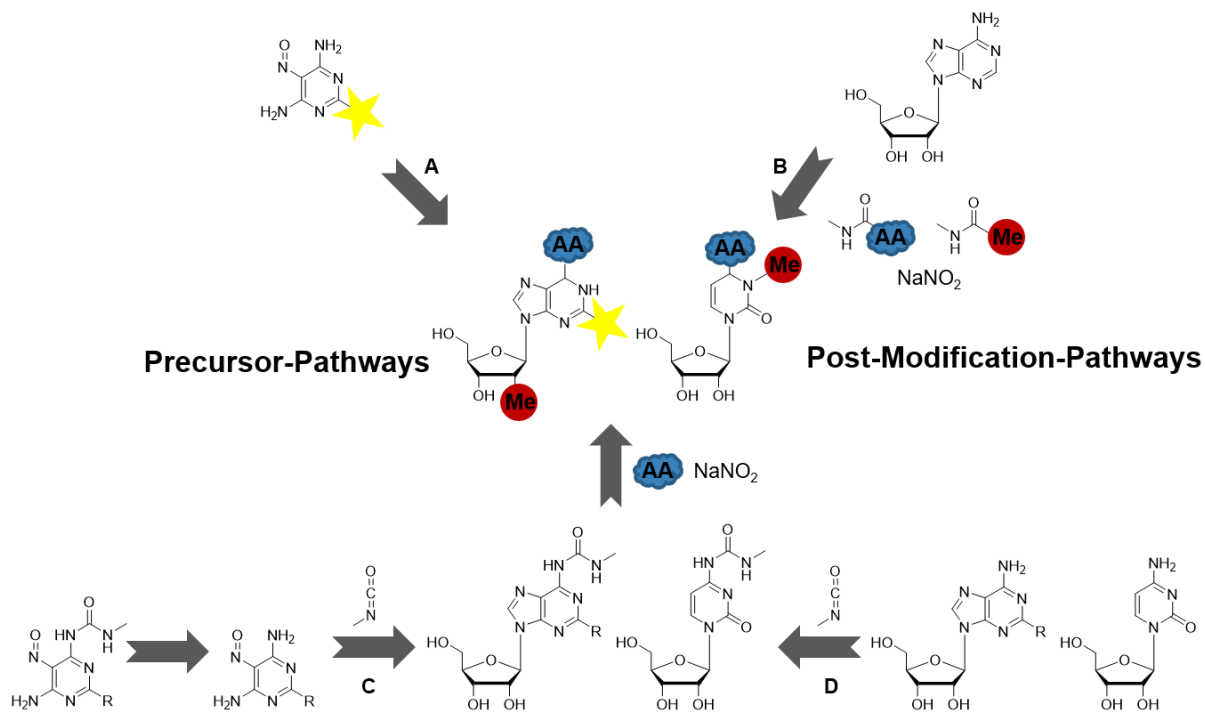


Figure 1: Reaction cascades for the prebiotic access of modified nucleosides. AA: Amino acids. A: Modification of nitrosopyrimidine precursor molecules. B: Modification of adenosine with amino acids or methyl groups by reaction with methyl urea derivatives. C: Modification of nitrosopyrimidines with methylisocyanate to insert methyl urea groups. After nucleoside formation the methyl urea group is nitrosylated with NaNO_2 which is then reacted with amino acids. D: Modification of nucleosides with methylisocyanate to insert a methyl urea group at the exocyclic nitrogens followed by nitrosylation with NaNO_2 and the reaction with amino acids.

So far, only aminoacetylated adenosine compounds are known in biological systems. It is highly unlikely that only adenosine-amino acid conjugates were selectively formed and other canonical nucleosides with exocyclic nitrogen atoms were not converted under the conditions that prevailed on the early Earth. Therefore, the chemistry for carbamoylation of adenosine was also transferred to the nucleoside cytidine. By reacting cytidine with methylisocyanate, methylurea-derivatized cytidine was furnished in proper yields, which reacted with amino acids to *N*⁴-acinoacetylated cytidine through the same nitrosylation chemistry.

Thus, the results gained in the context of this doctoral thesis provide evidence that canonical and non-canonical ribonucleosides could be formed spontaneously under prebiotic conditions. Interesting pathways were discovered to modify nucleosides by simple chemistry and possibilities were developed to convert nucleoside precursor molecules into non-canonical RNA building blocks. For the reliable product identification of the prebiotic studies, reference molecules were produced and characterized by classical organic synthesis.

Almost all phosphorus in the Earth's crust is in the form of orthophosphate, which is unreactive and has poor solubility. Consequently, it is hardly possible to use the phosphate for the phosphorylation of nucleosides to nucleotides under prebiotic conditions. However, this phosphorylation is indispensable for the polymerization to oligonucleotides. In a further part of this work, methods were developed to use frequently occurring minerals such as struvite and vivianite as phosphate sources for phosphorylation. By using oxalic acid, the yield of nucleotides could be significantly increased with struvite. In addition, the poorly soluble iron phosphate vivianite could be partially dissolved with the help of oxalic acid, so that the phosphate was available for phosphorylation of nucleosides to monophosphates. Finally, the acquired results in the present doctoral thesis provide important information on possible phosphate sources on the early Earth (see Figure 2).

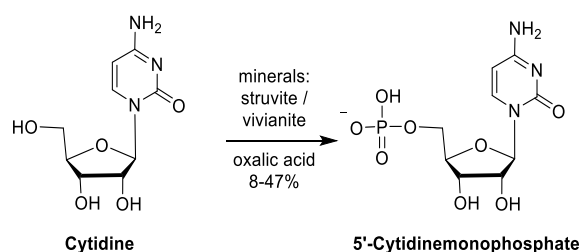


Figure 2: Phosphorylation of cytidine with the minerals vivianite and struvite as well as oxalic acid.

Another aim of this thesis was to test whether it is possible to polymerize activated cyclic 2',3'-nucleoside monophosphates by pressure. The oligomerization of nucleotides in aqueous solutions poses a challenge because it is neither kinetically nor thermodynamically preferred. Cyclic nucleoside monophosphates are much more reactive than the corresponding 5'-monophosphates, as the binding of the newly formed phosphodiester bond is thermodynamically favoured.

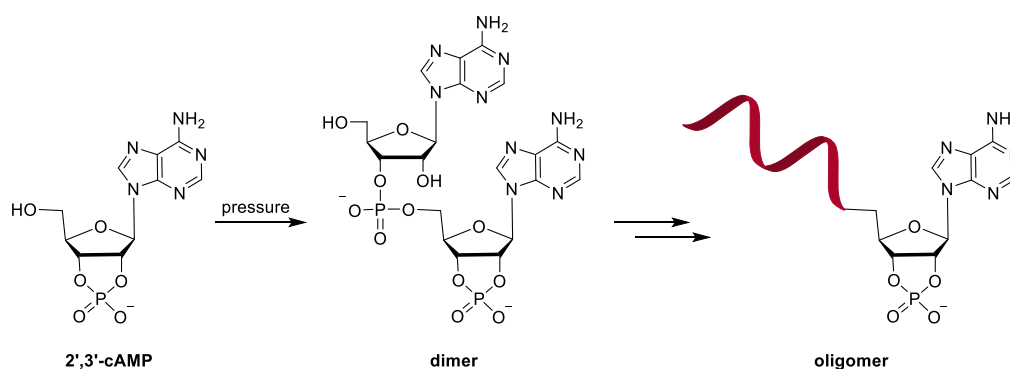


Figure 3: Compression of cyclic 2',3'-Cytidinemonophosphate under high pressure to achieve a dimerization followed by oligomerisation.

The polymerization of the nucleosides into oligomers demand the variation of diverse parameters such as pressure and temperature. Dinucleotides could be obtained by short heating pulses (1-2 min) or prolonged heating (30 min) up to 50°C. The exchange of the sodium

Abstract

counterion and the subsequent pressing of the free nucleoside monophosphate also led to the formation of dimers in the case of adenosine. The yields of the dimers for adenosine are between 2% and 3% (see Figure 3). In conclusion, in the course of this work novel methods were developed towards the production of RNA dimers from activated nucleosides by pressure.

Zusammenfassung

Die RNA-Welthypothese postuliert, dass das Leben mit selbstreplizierenden RNA-Molekülen begann und sich sowohl DNA als auch Proteine später entwickelten. RNA ist zum einen in der Lage genetische Informationen zu speichern und zum anderen katalytische Prozesse durchzuführen, was diese Hypothese grundlegend stärkt. Die Hypothese erfordert allerdings Entstehungswege der RNA-Bausteine, die mit geochemischen Modellen der frühen Erde kompatibel sind. Es ist schon lange bekannt, dass RNA neben den vier kanonischen Nucleosiden (A, C, G und U) auch aus über 120 RNA-Modifikationen besteht. Es stellt sich die Frage, ob das Leben nur mit den kanonischen Nucleosiden begann oder ob modifizierte Nucleoside Fossilien dieser frühen Phase der chemischen Evolution darstellen. Die nicht-kanonischen Basen, insbesondere die Aminosäure-modifizierten Purine, steigern die chemische Vielfalt von RNA, womit die Faltungsmöglichkeiten und die katalytischen Funktionen ausgeweitet werden können. Um Beweise für die Existenz von modifizierten Nucleosiden auf der frühen Erde zu finden bedarf es einfacher Chemie, die mit geochemischen Modellen der frühen Erde kompatibel ist, um diese nicht-kanonischen Basen zu erzeugen.

Im ersten Teil der Arbeit konnte ein Modell entwickelt werden, welches durch die einfache Änderung physikalischer Parameter wie Temperatur, pH-Wert und Konzentration den Zugang zu RNA-Nucleosiden durch eine kontinuierliche Synthese ermöglicht. Dabei können sowohl die kanonischen als auch viele nicht-kanonische Purin-Nucleoside parallel durch Nass-Trocken-Zyklen erzeugt werden (vgl. Abbildung 1A). Die Daten zeigen, dass modifizierte Nucleoside möglicherweise als Konkurrenzprodukte gebildet wurden. Sie könnten in diesem Sinne als molekulare Fossilien betrachtet werden.

Im Zuge dieser Doktorarbeit wurden außerdem Syntheserouten zu weiteren methylierten sowie carbamoylierten Nucleosiden durch eine Postmodifikation der Nucleoside entwickelt. Die einfache Reaktions-Kaskade zur Erlangung der modifizierten Nucleoside beruht auf Reaktionen unter Beteiligung von Isocyanat, Methylisocyanat, Methylamin, Ammoniak und Natriumnitrit und ist somit mit den Bedingungen auf der frühen Erde kompatibel. Das instabile Molekül Isocyanat kann in Form von Methylharnstoff chemisch gespeichert werden, indem es durch Methylamin abgefangen wird. Methylharnstoff kann zu *N*-Methyl-*N*-nitrosoharnstoff nitrosyliert werden, wodurch unter basischen Bedingungen wieder Isocyanat freigesetzt wird. Durch diese Chemie können kanonische Pyrimidine und Purine in nicht-kanonische Nucleoside umgewandelt werden. Die beschriebene Nitrosylierungs-Chemie konnte darüber hinaus auf Aminosäuren ausgeweitet werden, wodurch biologisch wichtige modifizierte Nucleoside, wie *N*⁶-Threonylcarbamyladeonsin (*t*⁶A), auf präbiotischem Wege erhalten werden konnten (vgl. Abbildung 1B).

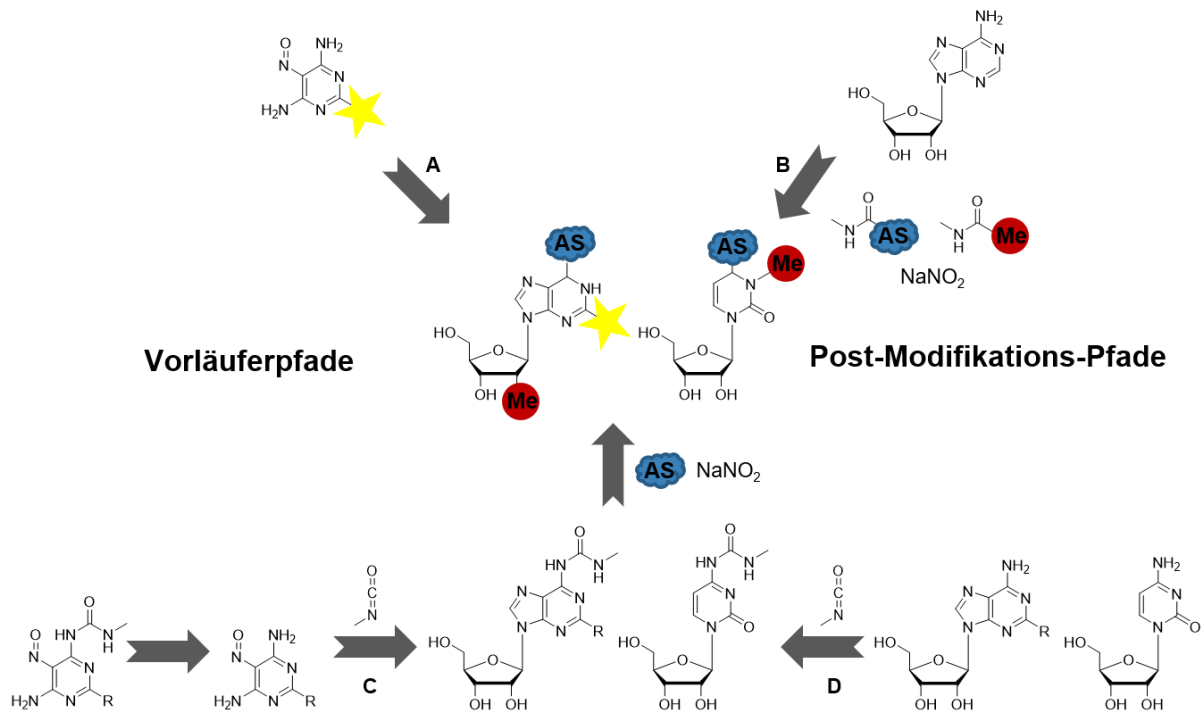


Abbildung 1: Reaktionskaskaden zur Darstellung von modifizierten Nucleosiden. AS: Aminosäuren. A: Modifizierung der Nitrosopyrimidin-Vorläufermoleküle. B: Modifizierung von Adenosin mit Aminosäuren oder Methylresten durch die Reaktion mit Methylharnstoffderivaten. C: Modifizierung von Nitrosopyrimidinen mit Methylisocyanat zur Einfügung einer Methylharnstoffbindung. Nach der Bildung des Nucleosids wird dieses mit NaNO_2 nitrosyliert und anschließend mit Aminosäuren zur Reaktion gebracht. D: Modifizierung von Nucleosiden mit Methylisocyanat zur Einfügung einer Methylharnstoffbindung am exocyclischen Stickstoff gefolgt von einer Nitrosylierung mit NaNO_2 und anschließender Umsetzung mit Aminosäuren.

Da die Modifizierung der Aminosäuren zu geringen Ausbeuten an aminoacetylierten Nucleosiden führte, wurde Adenosin direkt durch die Reaktion mit Methylisocyanat mit einer Methylharnstoffbindung modifiziert und durch dieselbe Nitrosylierungs-Chemie unter der Bildung von Isocyanaten mit Aminosäuren umgesetzt. Dadurch konnte die Ausbeute an aminoacetyliertem Adenosin erheblich gesteigert werden (vgl. Abbildung 1C). In weiteren Experimenten konnte auch das Adenosin-Vorläufermolekül Formamidopyrimidin (FaPy) mit einer Methylharnstoffbindung derivatisiert werden und in zusätzlichen Schritten zu Methylharnstoff-derivatisiertem Adenosin reagieren (vgl. Abbildung 1D). Die Vielzahl an Reaktionswegen, die alle auf derselben Chemie beruhen, bekräftigen die Zugänglichkeit zu Aminosäure-modifizierten Nucleosiden auf der frühen Erde.

Bisher sind ausschließlich aminoacetylierte Adenosin-Verbindungen in biologischen Systemen bekannt. Es ist allerdings höchst unwahrscheinlich, dass unter den Bedingungen, die auf der frühen Erde herrschten, selektiv nur Adenosin-Aminosäuren-Konjugate entstanden und anderen kanonische Nucleoside mit exocyclischen Stickstoffen nicht umgesetzt wurden. Deshalb wurde die Chemie zur Carbamoylierung von Adenosin auch auf das Nucleosid Cytidin übertragen. Durch die Umsetzung von Cytidin mit Methylisocyanat konnte Methylharnstoff-

derivatisiertes Cytidin erhalten werden, welches durch dieselbe Nitrosylierungs-Chemie mit Aminosäuren zu *N*⁴-aminoacetyliertem Cytidin reagiert.

Damit liefern die im Rahmen dieser Doktorarbeit gewonnen Ergebnisse einen Beweis dafür, dass kanonische und nicht-kanonische Ribonukleoside spontan unter präbiotischen Bedingungen gebildet werden konnten. Dabei wurden zum einen Wege gefunden, um Nukleoside durch einfache Chemie zu modifizieren und zum anderen Möglichkeiten entwickelt, um Nukleosid-Vorläufermoleküle in nicht-kanonische RNA-Bausteine zu überführen. Um die Produkte der präbiotischen Studien sicher zu identifizieren, wurden außerdem Referenzmoleküle durch klassische organische Synthesen hergestellt und charakterisiert.

Fast der gesamte Phosphor der Erdkruste liegt in Form von Orthophosphat vor, welches zum einen unreaktiv ist und zum anderen eine schlechte Löslichkeit aufweist. Somit ist es kaum möglich, das Phosphat für die Phosphorylierung von Nukleosiden zu Nukleotiden unter präbiotischen Bedingungen zu verwenden. Diese Phosphorylierung ist für die Polymerisation zu Oligonukleotiden allerdings unumgänglich.

In einem weiteren Teil dieser Arbeit wurden daher Methoden entwickelt, um häufig vorkommende Mineralien wie Struvit und Vivianit als Phosphatquellen für die Phosphorylierung einzusetzen (vgl. Abbildung 2). Durch den Einsatz von Oxalsäure konnte die Ausbeute an Nukleotiden durch das Mineral Struvit deutlich erhöht werden. Darüber hinaus konnte das schwerlösliche Eisenphosphat Vivianit mit Hilfe von Oxalsäure teilweise gelöst werden, so dass das Phosphat für Phosphorylierungen von Nukleosiden zu Monophosphaten zur Verfügung stand.

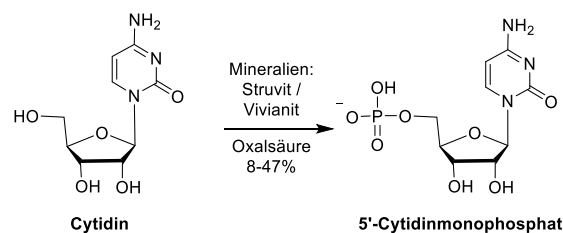


Abbildung 2: Phosphorylierung von Cytidin mit den Mineralien Vivianit und Struvit sowie Oxalsäure.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte getestet werden, ob es möglich ist, aktivierte cyclische 2',3'-Nukleosidmonophosphate durch Druck zu polymerisieren (s. Abbildung 3). Die Oligomerisierung von Nukleotiden in wässrigen Lösungen stellt eine Herausforderung dar, da sie weder kinetisch noch thermodynamisch bevorzugt ist. Cyclische Nukleosid-Monophosphate sind sehr viel reaktiver als die entsprechenden 5'-Monophosphate, da die Knüpfung der neu entstehenden Phosphodiesterbindung thermodynamisch begünstigt ist. Um

Zusammenfassung

die Nucleoside zu Oligomeren zu polymerisieren, wurden verschiedene Parameter wie Druck und Temperatur variiert.

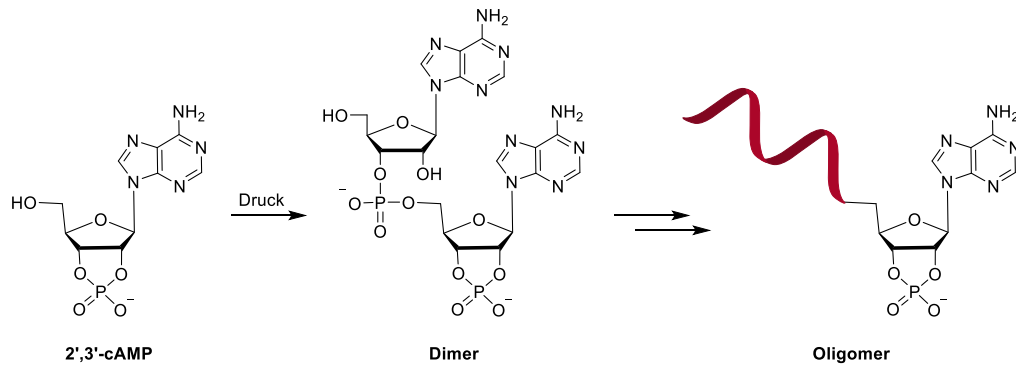


Abbildung 3: Kompression von cyclischem 2'3'-Cytidinmonophosphat unter hohem Druck, um eine Dimerisierung und anschließende Polymerisierung zu begünstigen.

Durch kurze Heizschübe oder kurzes Erhitzen auf 50°C konnten Dimere erhalten werden. Auch der Austausch des Natrium-Gegenions und das anschließende Pressen des freien Nucleosidmonophosphat führte im Fall von Adenosin zur Bildung von Dimeren. Die Ausbeuten der Dimere lagen zwischen circa 2 % und 3 %.

1. Molekulare Evolution

Die Frage, wie Leben entstand, beschäftigt die Menschheit schon seit jeher. Sie wurde während verschiedener Epochen und Zeitpunkten der menschlichen Entwicklung auf komplett unterschiedliche Weise beantwortet. Dabei handelte es sich lange Zeit nicht um wissenschaftliche Fragestellungen, sondern um religiöse Konzepte.^[1] Noch im 17./18. Jahrhundert war die Theorie, dass Leben überall spontan entstehen könnte, weit verbreitet. Diese Ansicht änderte sich erst Mitte des 19. Jahrhunderts durch Experimente von *Louis Pasteur*^[2] und mit der berühmten Aussage von *Rudolf Virchow*, dass jede Zelle, die kleinste Einheit des Lebens, von einer anderen Zelle abstammen müsse.^[3] Durch diese Entdeckungen begann die große Frage nach dem Ursprung des Lebens. Denn wenn Leben nicht spontan entstehen kann, wann und wie ist es entstanden? Aus *Darwins* Evolutionstheorie (*Origin of Species*) heraus entwickelte sich der Gedanke, dass alles bestehende Leben auf einen einzigen, gemeinsamen Vorfahr-Organismus zurückzuführen sei.^[4] Die moderne Genforschung und Phylogenie unterstützen die Idee eines gemeinsamen Urvorfahrens (LUCA, englisch: *last universal common ancestor*), auch wenn es für diesen wahrscheinlich keine fossilen Überreste gibt.^[5] Welche molekularen Prozesse zu dessen Entstehung führten, bleibt bisher eine ungeklärte Frage aus Charles *Darwins*' Vermächtnis.^[6]

Vor fast 150 Jahren berichtete *Darwin* in seinem bekannten Brief an den Botaniker *Joseph Hooker* von seiner Idee, dass die ersten Proteine „in einem warmen kleinen Teich mit allen möglichen Ammonium- und Phosphorsalzen mit Licht, Hitze und Elektrizität“ entstanden sein könnten. Heute wissen wir mit Sicherheit, dass die chemische, molekulare Evolution allen Arten heute lebender Organismen vorausging. Durch Reaktionen von einfachen Gasen und Mineralien auf der Oberfläche und in den Ozeanen der frühen Erde ist vermutlich komplexe organische Materie entstanden, aus der sich primitive Lebensformen entwickelten.^[7] Daraus folgt, dass „der Ursprung des Lebens [...] als nahtloser Übergang von selbstordnenden chemischen Reaktionen zu sich selbst erhaltenden chemischen Systemen betrachtet [werden kann], die zur darwinistischen Evolution fähig sind“.^[8]

Die Präbiotik beschäftigt sich mit den chemischen Prinzipien der molekularen Evolution vor der Entstehung des Lebens auf der frühen Erde. In den nächsten Kapiteln werden verschiedene Entstehungsmöglichkeiten von wichtigen Biomolekülen unter präbiotischen Bedingungen diskutiert und erläutert.

1.1. Die RNA-Welt Hypothese

Unser heutiges Leben basiert auf drei Arten von Biomolekülen: Desoxyribonukleinsäure (DNA), Ribonukleinsäure (RNA) und Proteinen. Bei der Frage welches dieser Moleküle zuerst entstanden ist, stellt sich die große Herausforderung, dass die jeweiligen Systeme voneinander abhängen. Die Replikation der Nukleinsäuren (DNA und RNA) wird von Proteinen katalysiert, wohingegen die Synthese dieser Proteine von Nukleinsäuren gesteuert wird. Es gilt nun also zu beantworten, welches dieser Moleküle ohne das jeweilige andere bestehen kann und somit zuerst existiert haben könnte. Durch die Ausbildung von Watson-Crick-Basenpaaren ist die Replikation von Polynukleotiden im Gegensatz zu Polypeptiden möglich.^[9]^[10] Aus dem Gedanken heraus, dass RNA sowohl genotypische (vgl. DNA) als auch phänotypische Eigenschaften (vgl. Proteine) besitzt, entwickelte sich die *RNA-Welt Hypothese*. Diese besagt, dass alles Leben mit RNA begann und sich daraus sowohl DNA als auch Proteine später entwickelten.^[10] Die Entdeckung von Ribozymen stärkte diese Hypothese grundlegend.^[11] Ribozyme sind aus RNA bestehende Enzyme, welche eine Vielzahl chemischer Reaktionen katalysieren und somit eine proteinfreie biologische Welt möglich machen könnten.^[12] Die Annahme, dass alles Leben durch RNA Moleküle begonnen hat, gewann durch diese Entdeckung an großer Bedeutung, woraufhin der Begriff *RNA-Welt* 1986 von *Gilbert* eingeführt wurde.^[13] Diese Hypothese schließt die Möglichkeit, dass Peptide in der Chemie des Ursprungs des Lebens involviert waren nicht aus. Allerdings können diese Peptide nicht durch ribosomale Proteinsynthese entstanden sein.^[14]

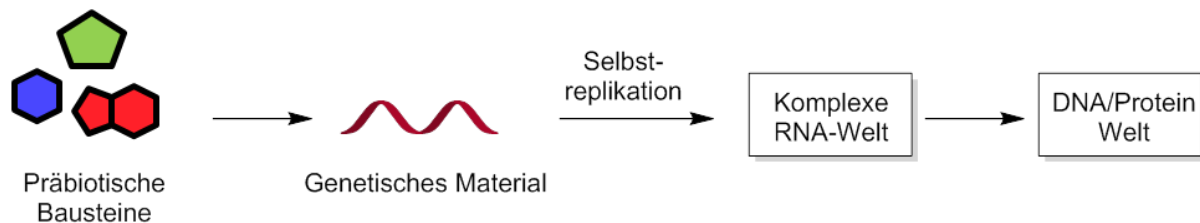


Abbildung 4: Entstehung von genetischem Material durch präbiotische Bausteine. Durch Selbstreplikation entsteht eine komplexe RNA-Welt aus welcher wiederum die DNA/Protein Welt entspringt.

Unter der Annahme einer RNA-Welt kann die Frage, wie Proteine und DNA entstanden sind, im ersten Schritt außen vorgelassen und der Fokus auf die Entstehung der RNA gelegt werden. Dabei gilt es, einige grundlegende Fragestellungen zu beantworten. Im ersten Schritt muss geklärt werden, wie Nukleotide ohne die Hilfe von Enzymen unter präbiotischen Bedingungen entstanden sein könnten. Daraufhin muss beantwortet werden, wie Nukleotide in einer proteinfreien Welt zu RNA mit zufälliger Sequenz polymerisieren konnten und wie die resultierende RNA anschließend enzymfrei repliziert bzw. kopiert werden konnte (vergleiche Abbildung 4).^[14] In den nächsten Kapiteln werden Möglichkeiten für den präbiotischen Zugang

zu Nucleosiden diskutiert, sowie denkbare Wege aufgezeigt, diese zu phosphorylieren und zu oligomerisieren.

1.2. Alternative RNA-Oligomere

Es ist durchaus möglich, dass sich die im vorherigen Kapitel diskutierte *RNA-Welt* aus einer Vorläufer-RNA entwickelt hat. Die Oligonukleotide einer solchen *proto-RNA-Welt* könnten aus einfacheren Bausteinen als die unserer heutigen RNA aufgebaut gewesen sein.^[15, 16] Durch chemische Selektion könnten im Laufe der molekularen Evolution nur die stabilsten RNA-Stränge ausgewählt worden sein, was zu der jetzt vorhandenen Zusammensetzung unserer RNA führte.

Im Laufe der letzten Jahre wurden Strukturen für *proto-RNA*-Oligomere vorgeschlagen und untersucht. Eine Auswahl verschiedener Oligomere ist in Abbildung 5 dargestellt. Bei den alternativen Nucleinsäuren können sowohl die Nucleobasen als auch das Polymer-Rückgrat ersetzt werden. Als *proto*-Basen werden oft einfache Heterocyklen,^[15] verwendet und das Ribose-Rückgrat kann durch andere Zucker oder komplett andere Moleküle ausgetauscht werden.

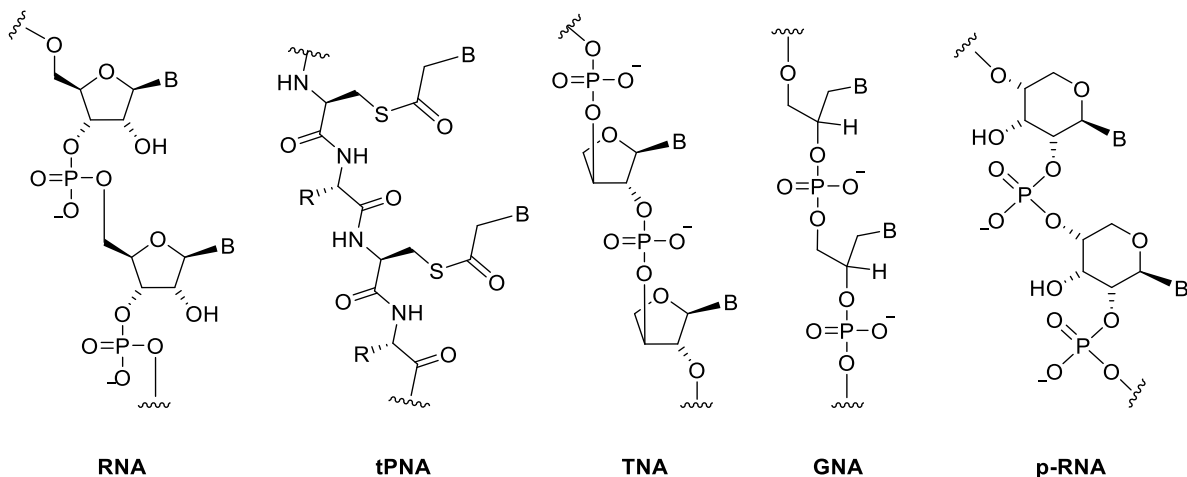


Abbildung 5: Struktur von RNA und den alternativen Nucleinsäuren tPNA (Thioester-Peptid-Nucleinsäure, englisch: *thioester peptide nucleic acids*),^[17, 18] TNA (Threose-Nucleinsäuren, englisch: *threose nucleic acid*),^[19, 20] GNA (Glykol-Nucleinsäuren, englisch: *glycol nucleic acid*)^[21] und p-RNA (pyranosidische RNA, englisch: *pyranosyl-RNA*).^[22, 23] Die dargestellten Moleküle beruhen alle auf der Verknüpfung kanonischer Nucleobasen (B) mit verschiedenen Rückgraten.

Ein Beispiel für eine mögliche *proto-RNA* sind die Thioester-Peptid-Nucleinsäuren (tPNA, englisch: *thioester peptide nucleic acids*), bei welcher die Nucleobasen an ein Dipeptid-Rückgrat gekoppelt sind (vgl. Abbildung 5). Die einzelnen Bausteine der tPNA sind unter präbiotischen Bedingungen durch die Umsetzung von Thioester-Derivaten mit Peptiden zugänglich. tPNAs sind in der Lage, sowohl untereinander als auch mit RNA und DNA stabile Basenpaare auszubilden. Die Substanzen besitzen darüber hinaus die üblichen Seitenketten-

1. Molekulare Evolution

Funktionalitäten von Peptiden, was sie zu besonders interessanten Molekülen für eine mögliche *proto*-RNA macht.^[17, 18]

Darüber hinaus wurden viele Versuche unternommen, das Ribose-Rückgrat durch andere Zucker-Moleküle zu ersetzen. Bei Threose-Nukleinsäuren (TNA, engl. *threose nucleic acid*), wird die Ribose **1** (s. Abbildung 6) beispielsweise durch den Zucker Threose ersetzt. TNA besitzt eine relativ große Resistenz gegenüber Hydrolyse und ist ebenfalls dazu in der Lage, sowohl mit sich selbst als auch mit natürlichen Nukleinsäuren *Watson-Crick* Basenpaarung einzugehen.^[19, 20] Darüber hinaus könnte die TNA durch die Ausbildung von Tertiärstrukturen komplexe Funktionen erfüllt haben.^[24]

Meggers und seine Gruppe stellten 2005 acyclische Glykol-Nukleinsäuren (GNA, engl. *glycol nucleic acid*) vor. In diesem Fall sind die Nukleobasen durch kurze Glykol-Einheiten verknüpft, wobei die Stereokonfiguration dabei entweder *R* als auch *S* sein kann. Auch die GNA ist in der Lage, stabile antiparallele Duplexstrukturen auszubilden. Auf Grund dieser stabilen *Watson-Crick* Basenpaarung, sowie der außerordentlichen Einfachheit des Systems, schlug Meggers die GNA als potentiellen Vorläufer für RNA vor.^[21]

Die Gruppen um Hud und Krishnamurthy stellten 2018 ebenfalls eine Reihe von möglichen *proto*-Nukleinsäuren her. Sie setzten 2,4,6-Triaminopyrimidine (TAP **2**, s. Abbildung 6), eine mögliche Vorläufer-Nukleobase, mit verschiedenen Ketosen und Aldosen von Threosen, Pentosen und Hexosen um. Damit konnte gezeigt werden, dass die präbiotische Nukleinsäure-Synthese nicht auf Ribose limitiert war und dass die Fähigkeit zur Ausbildung höher geordneter Strukturen die *proto*-RNA-Monomer Selektion beeinflusst haben könnte.^[15]

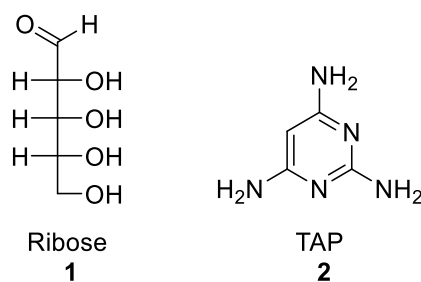


Abbildung 6: Struktur von Ribose **1** und 2,4,6-Triaminopyrimidin (TAP, **2**).

Es ist ein Rätsel, warum die Natur die thermodynamisch weniger bevorzugten fünfgliedrigen Furanoside und nicht die sechsgliedrigen Pyranoside als Teile der Moleküle des Lebens auserwählt hat. *Eschenmoser* und seine Gruppe untersuchten pyranosidische RNA (pRNA, s. Abbildung 5) und fanden heraus, dass auch diese in der Lage ist Doppelstränge mit selektiver Basenpaarung auszubilden. Die Entdeckung, dass p-RNA in der Lage ist, sich durch Replikation zu vervielfältigen, steigerte die Plausibilität der Verbindung bezüglich des

Vorhandenseins auf der frühen Erde enorm.^[22] Zusätzlich fand dieselbe Forschungsgruppe heraus, dass die Basenpaare der p-RNA viel stärker sind, als die der Furanosyl-RNA.^[23] Eine starke Basenpaarung ist zwar für die Assemblierung der Duplexstrukturen hilfreich, allerdings wird die Selbstreplikation der RNA erschwert. Deswegen vertreten *Eschenmoser et al.* die Meinung, dass in der Natur Oligomere notwendig sind, welche weniger stabile Duplexstrukturen bilden und somit einfacher repliziert werden können.^[22, 23]

Dies könnte einer der Gründe sein, warum sich die Furanosyl-RNA, wie wir sie heute kennen, als Biomolekül durchgesetzt hat. Darüber hinaus können die 5-gliedrigen Furanoside, durch ihre primäre Hydroxylgruppe, einfacher phosphoryliert werden.^[25] Diese Phosphorylierung wird für die spätere Oligomerisierung der einzelnen RNA-Bausteine zur RNA benötigt und ist damit unerlässlich.^[26]

Nachdem nun einige mögliche *proto*-RNA-Strukturen vorgestellt wurden, soll nun näher auf die Frage eingegangen werden, wie sich diese Moleküle auf der frühen Erde bilden konnten.

1.3. Bedingungen auf der frühen Erde

Die Entstehung des Lebens war ein lokales, geochemisches Ereignis, welches durch die Ansammlung von sich selbst replizierenden, organischen Molekülen ermöglicht wurde. In welcher Umgebung Biomoleküle entstehen und sich anreichern konnten, ist allerdings immer noch eine offene Frage. Um eine plausible Erklärung für die Entstehung der RNA zu finden, müssen die Gegebenheiten berücksichtigt werden, die auf der früheren Erde nach aktuellen Theorien geherrscht haben könnten.^[27]

Um diese Bedingungen zu berücksichtigen, sollte die präbiotische Chemie nur Startmaterialien verwenden, welche in ausreichender Menge auf der frühen Erde verfügbar gewesen sein könnten. Um mögliche Moleküle zu identifizieren, wurden zum Beispiel massenspektrometrische Experimente auf Kometen durchgeführt, wie bei der *Rosetta* Weltraummission auf dem Kometen 67P/Churyumov-Gerasimenko.^[28] Darüber hinaus sollten die Reaktionen nur in Lösungsmitteln durchgeführt werden, welche auf der frühen Erde zugänglich waren, beispielsweise Wasser oder auch Formamid.^[29] Zusätzlich besteht die Möglichkeit, dass Reaktionen in Abwesenheit eines Lösungsmittels stattgefunden haben könnten.^[14, 30]

Die Erdoberfläche hat sich im letzten Jahrhundert als möglichen Entstehungsort des Lebens durchgesetzt. Die Entdeckung von Leben in Tiefseegebieten und hydrothermalen Quellen, in welchen hohe Drücke herrschen, eröffneten allerdings auch viele andere mögliche Ursprungsorte.^[31] Theorien, welche diese Entstehungsorte in Betracht ziehen, werden durch die erstaunlich hohe Druckresistenz von vielen Mikroorganismen unterstützt. Zusätzlich wird

die Plausibilität solcher Orte durch einfache Reaktionswege gesteigert, welche unter hohen Drücken möglich sind.^[27]

1.4. Synthese von Nucleosiden unter präbiotischen Bedingungen

RNA ist ein komplex aufgebautes Molekül bestehend aus Nucleosiden, die über Phosphodiester miteinander verknüpft sind. Die einzelnen Nucleoside bestehen aus einem Heterocyclus (Adenosin **3**, Guanosin **4**, Cytidin **5** oder Uridin **6**) und dem Zucker Ribose **1** (s. Abbildung 7).

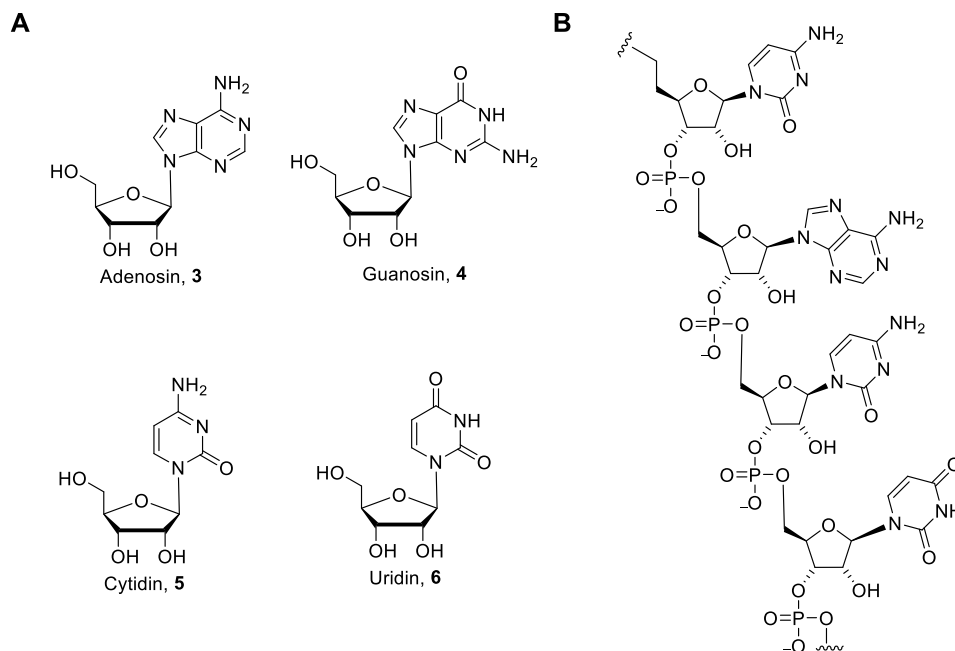


Abbildung 7: Aufbau von RNA. A: Strukturformel von Ribose **1**. B: Die vier kanonischen Nucleoside Adenosin **3**, Guanosin **4**, Cytidin **5** und Uridin **6**. C: Aufbau eines RNA-Oligomers.

Auf der Suche nach einem präbiotischen Zugang zu den Nucleosiden ist die naheliegendste Idee, die jeweiligen Bausteine getrennt voneinander herzustellen und im Anschluss daran miteinander zu koppeln. Sowohl zu den Pyrimidin-^[29, 32-40] als auch zu den Purin-Nucleobasen^[39, 41-46] sind in der Literatur eine Vielzahl an Syntheserouten beschrieben. In den nächsten Kapiteln werden zum einen präbiotische Synthese-Möglichkeiten für Zucker aufgezeigt und zum anderen die Verknüpfung dieser mit den jeweiligen Nucleobasen diskutiert.

1.4.1. Präbiotische Entstehung von Zucker

Alexander Butlerov setzte 1861 mit seiner berühmten *Formosereaktion* den Grundstein für die präbiotische Darstellung von Zuckern. Er stellte durch die Reaktion von Formaldehyd unter basischen Bedingungen eine nach Karamell riechende Verbindung her, welche sich als Zuckermischung herausstellte (s. Abbildung 8A).^[47] Der Mechanismus der Reaktionskaskade

ist immer noch umstritten, wobei vor allem die Reaktion von zwei Formaldehyden zu Glycolaldehyd **7** problematisch ist. Damit diese Reaktion möglich ist, muss einer der beiden Formaldehydmoleküle umgepolt werden.^[48-52] Darüber hinaus, läuft unter den vorgeschlagenen basischen Bedingungen normalerweise hauptsächlich die *Cannizzaro-Reaktion* ab, welche Ameisensäure und Methanol liefert.^[53]

Durch elektrische Entladungen in einer feuchten CO₂-Atmosphäre der frühen Erde kann Formaldehyd entstehen, das zu Glycolaldehyd **7** weiterreagieren kann. Sobald eine α-Hydroxycarbonylverbindung, wie **7**, entstanden ist, setzt ein Reaktionskreislauf aus Aldolreaktionen und Umlagerungen ein, wodurch nach und nach komplexere Zucker aufgebaut werden. Durch das große Netzwerk an Aldolreaktionen werden sämtliche C₃-C₆-Zucker ohne Selektivität erhalten (s. Abbildung 8C). Die *Formosereaktion* bietet somit keine Erklärung für die selektive Bildung von Ribose **1**.^[48-52]

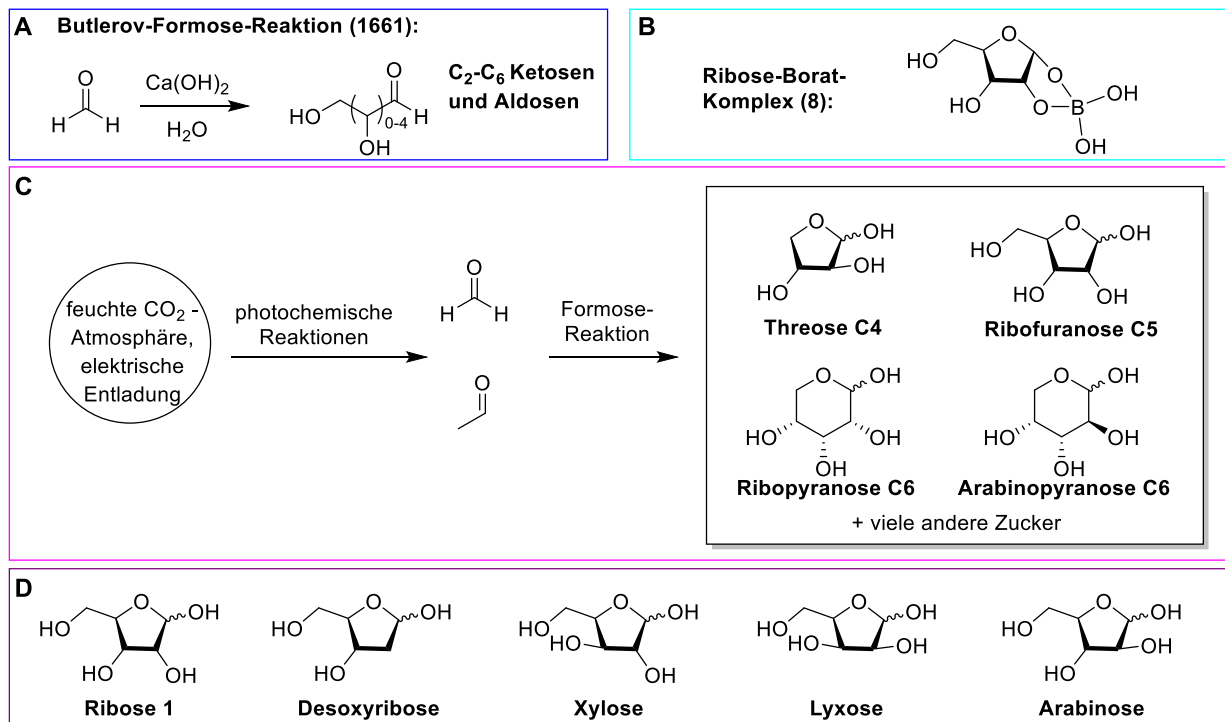


Abbildung 8: Präbiotische Entstehung von Zuckern. A: Die von Alexander Butlerov publizierte Formose-Reaktion.^[47] B: Struktur eines stabilisierenden Ribose-Borat-Komplexes **8**.^[54] C: Schematische Darstellung der Entstehung von Zuckern auf der frühen Erde. D: Strukturen von verschiedenen Pentosen.

Die große Herausforderung besteht nun darin, bei der Vielzahl möglicher Reaktionen die Selektivität zugunsten der biologisch relevanten Ribose **1** zu steuern. Die Ausbeute an **1** aus der *Formosereaktion* ist limitiert, da diese verglichen mit anderen Aldopentosen (s. Abbildung 8D) am wenigsten stabil ist.^[55] Aus diesem Grund wurde die spontane Anreicherung von Ribose **1** auf der frühen Erde von einigen Wissenschaftlern angezweifelt.^[55, 56] In den letzten

1. Molekulare Evolution

Jahren wurden verschiedene Möglichkeiten vorgeschlagen, wie **1** bevorzugt entstehen und stabilisiert werden könnte.

Shapiro war der Erste der 1988 Ribose **1** in der *Formosereaktion* nachwies. Er arbeitete dabei in basischer Lösung unter Verwendung von Mg^{2+} - oder Ca^{2+} -Ionen.^[57] Allerdings polymerisieren die entstehenden Zucker, inklusive Ribose **1**, sofort weiter zu einer braunen karamellartigen Substanz, welche aus einem Gemisch aus Zuckerpolymeren und Abbauprodukten besteht.^[54]

Benner und seine Mitarbeiter veröffentlichten 2011 eine mineralgesteuerte Synthese verschiedener Carbohydrate, darunter auch Ribose **1**.^[58] Durch die Zugabe von Boraten zur *Formosereaktion* gelang es *Benner* und seinen Mitarbeitern, *cis*-ständige Alkohole zu stabilisieren und damit die Bildung von Ribose **1** zu fördern. Pentosen sind die ersten in diesem System entstehenden Zucker, welche von Mineralien wie Boraten in Form von cyclischen Hemiacetalen komplexiert werden können. Vor allem Ribose **1** bildet mit Borat einen besonders stabilen Komplex **8** aus (s. Abbildung 8B). Durch diesen Komplex wird die weitere Enolisierung des Zuckers unter schwach basischen Bedingungen verhindert und eine größere Ansammlung von **1** ermöglicht. Ändert sich nun der pH-Wert der Umgebung von schwach basisch zu neutral, löst sich der Ribose-Borat-Komplex **8** wieder und **1** wird freigesetzt. In den dann neutralen Bedingungen ist Ribose **1** stabil gegenüber Enolisierung oder Aldolreaktionen und ist somit für weitere Reaktionen zugänglich.^[58, 59] *Furukawa* und *Kakegawa* vermuten, dass sich Ribose **1** genau wegen dieser bevorzugten Stabilisierung durch Borate als Zucker in Nukleinsäuren durchgesetzt hat.^[54]

Auch der Arbeitsgruppe um *Trapp* gelang es, die Selektivität der *Formosereaktion*, zugunsten von C_5 Zuckern, durch die Anwesenheit von Mineralien zu steigern. Sie nutzen Schreibersite $(Fe, Ni)_3P$, ein meteoritisches Material, das Phosphor in reduzierter Form enthält. Durch die Reaktion des Phosphors mit Wasser werden reaktive Phosphoroxiionen, durch einen Radikalmechanismus, freigesetzt.^[60] Der Einsatz von Schreibersite erhöhte den Anteil an Pentosen zwar, allerdings wurde die biologisch relevante Ribose **1** trotzdem nur in geringen Ausbeuten erhalten.^[61]

Sutherland und seine Mitarbeiter veröffentlichten 2012 einen alternativen präbiotischen Zugang zu Zuckern. Dabei stellen sie einfache Zuckermoleküle auf Grundlage der *Kiliani-Fischer-Synthese* über Photoredox-chemische Reaktionen her.^[62] Bei der *Kiliani-Fischer-Synthese* wird Blausäure **9** an Kohlenhydrate addiert und anschließend durch Wasserstoff auf Palladium/Bariumsulfat reduziert womit die Zucker um eine Kohlenstoffeinheit verlängert werden.^[63, 64]

Somit stehen verschiedene Methoden zur Verfügung, welche Ribose **1** auf präbiotisch plausiblen Wegen, beispielsweise durch die Zuhilfenahme von Mineralien, zugänglich machen.

1.4.2. Präbiotischer Zugang zu den Nukleosiden

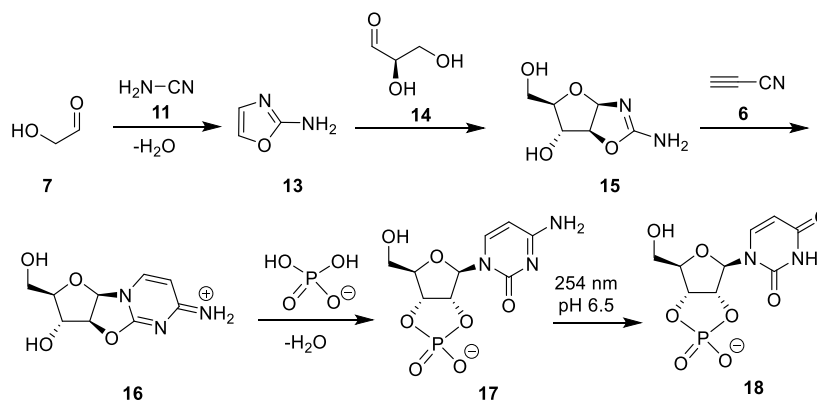
Der präbiotische Zugang zu den Nukleosiden gestaltete sich im Gegensatz zum Zugang zu den Nukleobasen als schwieriger. Die Ausbildung der glykosidischen Bindung zwischen Zucker und Base steht in wässriger Lösung stets in Konkurrenz mit dem nukleophilen Angriff durch Wasser.

Fuller et al. gelang 1972 der präbiotische Zugang zu Inosin, indem er Hypoxanthin mit D-Ribose **1** in der Gegenwart von anorganischen Salzen erhitzte. Wenn diese Reaktion allerdings mit Adenin **10** durchgeführt wird, kann β -D-Adenosin **3** nur in sehr geringen Ausbeuten erhalten werden.^[65] Für die Pyrimidine ist die Verknüpfung von Zucker und Nukleobasen nicht bekannt. Daher wurden in den letzten Jahren Syntheserouten entwickelt, die ohne die klassische Glykosylierung auskommen und zwar von gleichen oder ähnlichen Ausgangsmaterialien starten, jedoch andere Intermediate durchlaufen. Diese Syntheserouten werden in den nächsten Kapiteln im Detail diskutiert.

1.4.2.1. Präbiotischer Zugang zu Pyrimidinen

Der erste Zugang zu Pyrimidin-Nukleosiden gelang *Orgel* und *Sanchez* 1970 durch die Reaktion von Cyanamid **11** mit Ribose-5-phosphat. Der nukleophile Angriff kann sowohl an der 1'- als auch an der 2'-Hydroxylgruppe stattfinden wobei das entstehende Aminooxazolin-Derivat mit Cyanoacetylen **12** umgesetzt werden kann und nach anschließender Hydrolyse zu α -Cytidin **5a** reagiert. Dieses kann durch Photoanomerisation in geringen Ausbeuten zu β -Cytidin **5** umgesetzt werden.^[66]

2009 gelang es *Sutherland* und seinen Mitarbeitern aktivierte Pyrimidin-Ribonukleotide unter präbiotischen Bedingungen herzustellen. Die Syntheseroute startet nicht mit den klassischen RNA-Bausteinen Ribose **1** und der entsprechenden Nukleobase, sondern basiert auf der Bildung eines Oxazol-Intermediats **13**. Der genaue Ablauf der präbiotischen Synthese ist in Schema 1 gezeigt.^[67]



Schema 1: Präbiotischer Zugang zu aktivierten Pyrimidinen basierend auf 2-Aminooxazol **13**.^[67]

Die gesamte Reaktionskaskade findet in Phosphat-Puffer statt und beginnt mit der Reaktion von Cyanamid **11** mit Glycolaldehyd **7** zu 2-Aminooxazol **13**. Im nächsten Schritt reagiert dieses durch Phosphat-Katalyse mit Glyceraldehyd **14** zu Intermediat **15**, welches anschließend mit Cyanoacetylen **6** zum dem Anhydroarabinonukleosid **16** weiterreagiert. Der letzte Schritt der Reaktionskaskade besteht aus einer Phosphorylierung zu β -Ribocytidin-2',3'-Cyclophosphat **17**. Dieses kann durch photochemische Reaktionen zu dem entsprechenden Uracil-Derivat **18** umgewandelt werden.^[67]

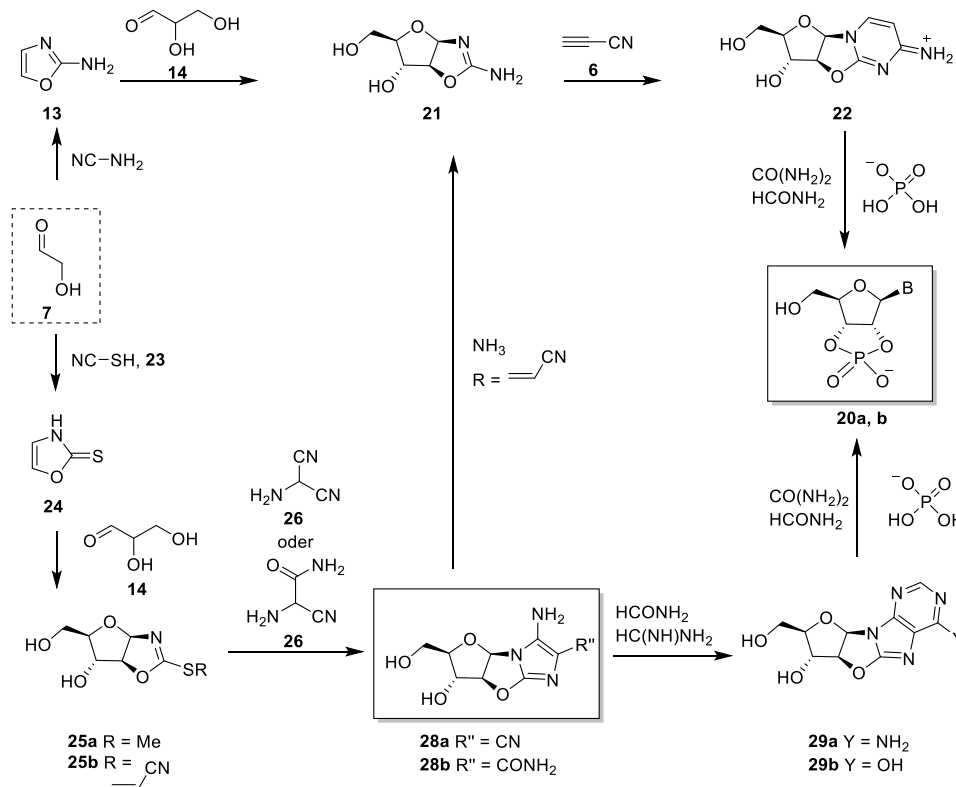
Mit ihrer Pyrimidin-Synthese konnten *Sutherland* und seine Mitarbeiter eine präbiotische Route entwickeln, mit welcher eine direkte Glykosylierung umgangen wird. Allerdings muss die gesamte Reaktionskaskade in gepufferten Systemen durchgeführt werden und die jeweiligen Reaktionspartner für die Folgereaktionen stets gut gereinigt verwendet werden, was die Plausibilität dieser Syntheseroute auf der frühen Erde in Frage stellt.

1.4.2.2. Präbiotischer Zugang zu Purinen

Wie bereits im vorangehenden Kapitel beschrieben gelang *Fuller et al.* zwar ein präbiotischer Zugang zu Purinen indem sie Ribose **1** direkt mit den Nucleobasen kondensierten,^[65] allerdings nur unter wasserfreien Bedingungen und in geringen Ausbeuten. Als Hauptprodukt entstand hier die Bindung nicht am N^9 -Atom der Nucleobase, sondern am N^6 -Atom. *Saladino et al.* gelang es 2017 dieses Selektivitätsproblem mit Hilfe von Protonenbestrahlung von Nucleobasen, in Gegenwart von Zuckern, zu umgehen. Dabei berufen sie sich auf Protonenströme, die auf der frühen Erde oder im Weltall durch Sonnenwinde vorhanden gewesen sein könnten.^[68]

Um nasschemische Methoden statt der Protonenbestrahlung zu ermöglichen versuchten *Sutherland* und seine Mitarbeiter lange Zeit ihren präbiotischen Zugang zu Pyrimidinen^[67] auch auf Purine auszuweiten, indem sie von anderen Vorläufermolekülen als 5-Aminoimidazol-4-carboxamid (AICA, **19**) starteten.^[69] 2017 gelang *Powner* und seinen

Mitarbeitern tatsächlich der präbiotische Zugang zu 8-Oxopurinen **20a** und **b** entsprechend des Pyrimidin-Zugangs (s. Schema 2).^[70]



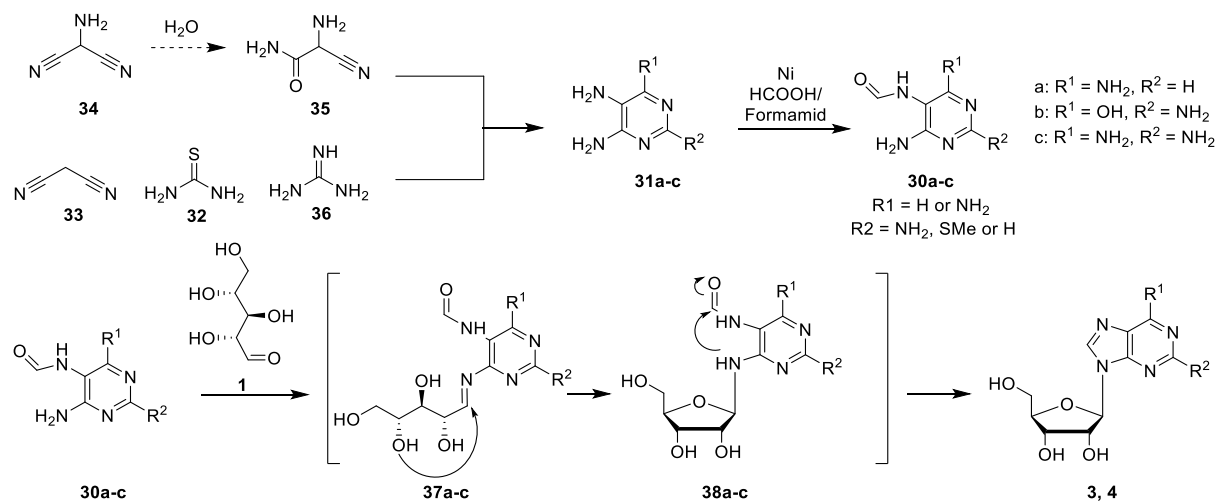
Schema 2: Präbiotische Synthese zur Herstellung von aktivierten Purinen ausgehend von Glycolaldehyd **7** und Cyanamid **11**.^[67]

Powner brachte Isooxazol **13** mit Glyceraldehyd **14** zur Reaktion, um **21** zu erhalten. Umsetzung mit **6** liefert **22** und anschließende Phosphorylierung **20a** und **b**. Alternativ wird aus Glycolaldehyd **7** und Thiocyanensäure **23** Thiopyrimidin **24** hergestellt, welches mit Glyceraldehyd **14** zu **25a** und **b** reagiert. Umsetzung mit **26** oder **27** führt zur Bildung von **28a** und **b**, was über **29a** und **b** zu **20a** und **b** zur Reaktion gebracht werden kann.

Szostak et al. überprüfte die Eignung dieser modifizierten Nukleoside für nicht enzymatische RNA-Replikation. Tatsächlich verlangsamten 8-Oxopurine **20a** und **b**, sowohl als aktivierte Nukleotide, als auch im Templatstrang, die Primerverlängerung enorm.^[71] Die Syntheseroute für **20a** und **b** konnte bisher nicht auf die kanonischen Purine ausgeweitet werden.

2016 entwickelten *Carell* und seine Mitarbeiter einen präbiotischen Syntheseweg für die regioselektive Herstellung von Purin-Nukleosiden.^[72] Die Reaktionskaskade beruht auf der Kondensation von Ribose **1** mit formylierten Amino-Pyrimidinen (FaPys, **30**), welche Vorstufen der Nukleobasen darstellen. Nach Kupplung der beiden Bausteine gefolgt von zwei Ringschluss-Reaktionen wird das Purin-Nukleosid in guten Ausbeuten erhalten. Die Syntheseroute ist in Schema 3 dargestellt.

1. Molekulare Evolution



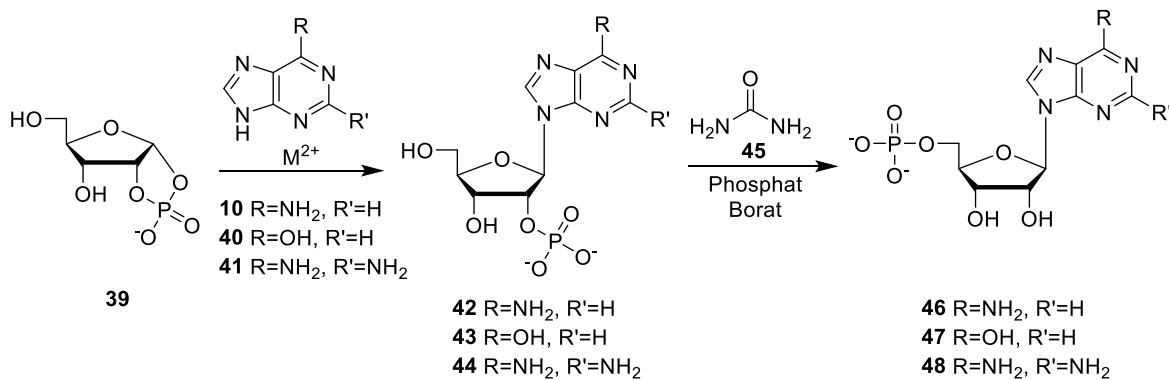
Schema 3: Präbiotischer Zugang zu Purin-Nucleosiden ausgehend von Ribose **1** und Formaminopyrimidinen **30a-c**.^[72]

Der FaPy-Weg beginnt mit der Bildung der Aminopyrimidine **31a-c**, welche aus kleinen, präbiotisch-zugänglichen Molekülen wie NH₄CN zugänglich sind. Triaminopyrimidin **31a** ist durch die Addition von Thioharnstoff **32** an Malonsäuredinitril **33** und anschließender Nitrosylierung sowie Desulfonierung in Wasser zugänglich. Die Desulfonierung kann mit Nickel gemeinsam mit Ameisensäure und Wasserstoff durchgeführt werden. Unter Hydrolyse von Aminomalononitril **34** in Gegenwart von Formamid bildet sich Aminocyanacetamid **35**, welches mit Guanidin **36** zu Triaminopyrimidon **31b** reagieren kann. Tetraaminopyrimidin **31c** ist durch die Reaktion von Guanidin **36** mit Aminomalononitril **34** zugänglich. Die Ausbeuten liegen dabei zwischen 53 und 84 %, was die Aminopyrimidine **31a-c** für Folgereaktionen in ausreichender Menge zur Verfügung stellt.

Die Aminopyrimidine **31a-c** sind nicht nur sehr viel wasserlöslicher als die entsprechenden Purine, sie umgehen auch die Selektivitätsprobleme. Die beiden Stickstoffe im Heterocyclen sind durch die exocyclischen Aminogruppen besonders basisch und liegen bereits bei schwach sauren Bedingungen protoniert vor. Die Protonierung der cyclischen Stickstoffe blockiert aus Symmetriegründen die Reaktivität der *ortho*- und *para*-Aminogruppen, womit nur noch N⁶ an nukleophilen Reaktionen teilnehmen kann. Somit führt die Reaktion der Aminopyrimidine **31a-c** in Ameisensäure zu den N⁵-formylierten FaPys **30a-c** in Ausbeuten von 70-90 %.

FaPys **30a-c** reagieren mit Ribose **1** zu Imin-Intermediaten **37a-c**, welche daraufhin in einer Ringschluss-Reaktion zum Formamidopyrimidin-Ribosid **38a-c** umgewandelt werden. Hierbei können sowohl das Furanosid- als auch das Pyranosid-Derivat entstehen. Durch einen nukleophilen Angriff des exocyclischen Stickstoffs auf den Aldehyd unter schwach basischen Bedingungen wird unter einem zweiten Ringschluss die Nucleobase Adenin **10** aufgebaut und dadurch Adenosin **3** erhalten.

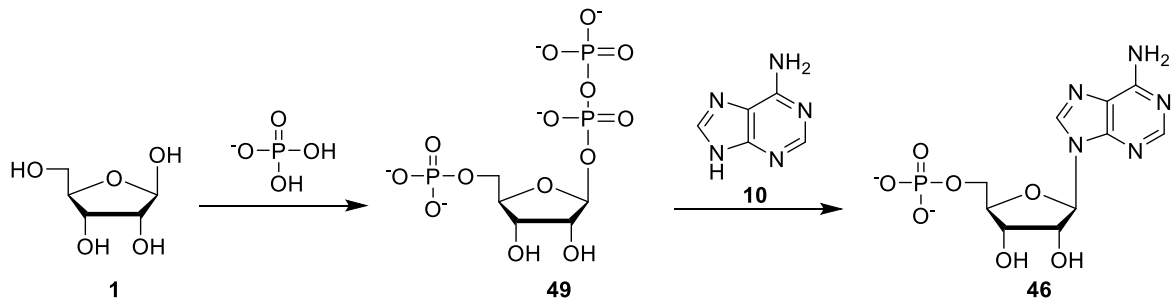
Benner und seine Mitarbeiter entwickelten 2017 einen präbiotischen Zugang für 5'-Purin-Monophosphate. Sie starten dabei von den Purin-Nukleobasen und cyclischen Ribose-Phosphaten (s. Schema 4).^[73]



Schema 4: Ablauf eines möglichen präbiotischen Zugangs zu Purinen ausgehend von Purin-Nukleobasen **14**, **40** und **41** und cyclischen Ribose-Phosphaten **39**.

Das Startmaterial, Ribose-1,2-cyclophosphat **39** ist ausgehend von cyclischem Trimetaphosphat zugänglich.^[74] Reagiert das cyclische Phosphat in Gegenwart von Ca²⁺ oder Mg²⁺ mit den Purin-Nukleobasen **10**, **40** oder **41**, entstehen Ribonukleoside **42-44** als 2'-Phosphate. Bei dieser Reaktion wird nur das β-Nukleotid gebildet und die Nukleobase reagiert nur an Position N⁹, womit die Reaktion nicht nur stereoselektiv, sondern auch regioselektiv ist. In Gegenwart von Harnstoff **45**, Borat und Lüneburgit (anorganisches Mineral, Mg₃[(PO₄)₂][B₂(OH)₆]·6H₂O) gehen die 2'-Phosphate **42-44** nun Umlagerungen ein, die die an der 5'-Position phosphorylierten Nukleoside **46-48** ergibt.^[74] Allerdings ist die Ausbeute der Kupplung zwischen Nukleobase und dem phosphorylierten Zucker mit 15 % eher gering und zusätzlich wird das phosphathaltige Mineral Lüneburgit benötigt, welches wahrscheinlich auf der frühen Erde nur in sehr geringen Mengen zugänglich war.

Akouche et al. veröffentlichte im selben Jahr einen ähnlichen Zugang zu Adenosinmonophosphat (AMP, **46**). Sie stellten **46** auf präbiotische Weise her, indem sie Adenin **10**, KH₂PO₄ und Ribose **1** in einer Eintopfreaktion auf einer Silika-Oberfläche umsetzten. Die Reaktionsgleichung ist in Schema 5 dargestellt. Der Mechanismus der Reaktion beruht auf dem aktiviertem Ribosederivat **49**, wodurch AMP **46** in einer Ausbeute von etwa 20 % erhalten werden kann.^[75]



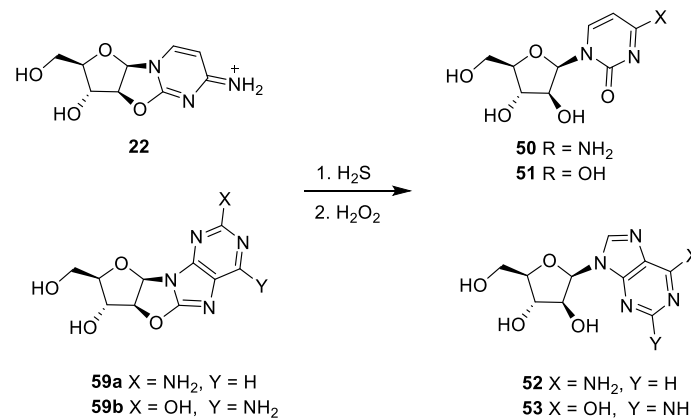
Schema 5: Darstellung von Adenosinmonophosphat (AMP, **46**) durch die Reaktion von Ribose **1** mit KH_2PO_4 auf einer Silika-Oberfläche zu **49** und anschließender Umsetzung mit Adenin **10**.^[75]

In den letzten Jahren wurden sowohl zu den Pyrimidinen als auch zu den Purinen plausible präbiotische Zugangsrouten publiziert. Dabei starten diese Syntheserouten entweder mit den RNA-Bausteinen Ribose **1** und Nukleobase oder mit anderen Vorläufermolekülen, welche die Kupplung von Zucker und Nukleobase umgehen.

1.4.2.3. Paralleler Zugang zu Purinen und Pyrimidinen

Sowohl zu den Pyrimidinen als auch zu den Purinen gibt es Zugangsrouten, welche auf der frühen Erde denkbar sind. Allerdings ist es schwer vorstellbar, dass die beiden verschiedenen Klassen an Nukleosiden präbiotisch durch separate Wege entstanden sind, welche auf unterschiedlichen chemischen Umgebungen beruhen. Die große Herausforderung besteht also darin, einen Weg zu finden, welcher sowohl Purine als auch Pyrimidine parallel zugänglich macht.

Durch eine Erweiterung ihrer 8-Oxopurin-Synthese gelang es *Powner* und seinen Mitarbeitern 2018 Arabino-Pyrimidine und Arabino-Purine simultan aus denselben Vorläufermolekülen herzustellen.^[76] Ihre Syntheseroute beruht dabei auf den gleichen Molekülen wie für den Zugang zu den 8-Oxopurinen. Allerdings erfolgt die nukleophile Öffnung der 5-Ringe der Moleküle **22** sowie **29a** und **b** in diesem Fall nicht durch Phosphat, sondern durch Schwefelwasserstoff (s. Schema 6). Die Thiolyse in wässriger Lösung wird von einer Oxidation gefolgt, welche entweder durch Wasserstoffperoxid oder durch UV-Licht stattfinden kann. Auch wenn die Arabinose-Stereochemie, welche auf diese Weise erhalten wird, in keinem genetischen System bekannt ist, könnte die entstehende Arabino-RNA ein Vorläufermolekül unserer heutigen RNA sein. Die vorgeschlagene Syntheseroute von *Powner et al.* benötigen allerdings Aufreinigungen nach den einzelnen Syntheseschritten, was an der präbiotischen Plausibilität zweifeln lässt.^[76]

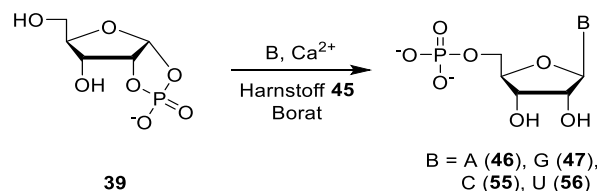


Schema 6: Synthese der Arabino-Pyrimidine **50** und **51** sowie –Purine **52** und **53** ausgehend von **22** und **29a** und **b**.^[76]

Nam et al. präsentierte eine direkte Synthese von Nucleosiden, indem sie Ribose **1** mit den Nucleobasen unter sauren Bedingungen in Mikrotröpfchen zu den Nucleosiden umsetzten. Sie erhielten Uridin **6**, Cytidin **5**, Adenosin **3** und Inosin **54** bei der Umsetzung der entsprechenden Nucleobasen in wässrigen Lösungen unter Anwesenheit von Ribose **1**, Magnesium-Ionen und Phosphorsäure in einem Ionenspray, unter Anlegen von Spannung. Die Ausbeuten liegen dabei allerdings nur zwischen 0,7 und 2,5 % und es sind weder regio- noch stereochemische Informationen über die erhaltenen Nucleoside bekannt.^[77, 78]

2019 veröffentlichten *Kim et al.* eine Syntheseroute, mit der es Ihnen möglich war, alle vier Nucleoside zu erhalten. Sie erweiterten dazu Ihre 2017 publizierte Methode zur Herstellung von Purinen über cyclische Ribose-Phosphate **39** auf Pyrimidine aus (s. Schema 7).^[79]

Um die glykosidische Bindung zwischen den Pyrimidin-Nucleobasen und der Ribose **1** aufzubauen, arbeiten *Kim et al.* bei 100°C unter trockenen Bedingungen. Für die Purine können sowohl Ca²⁺- als auch Mg²⁺-Salze verwendet werden, die Verknüpfung der Pyrimidine funktioniert allerdings nur unter Verwendung von Mg²⁺-Salzen. Die vorgeschlagene Syntheseroute liefert zwar Cytidinmonophosphat **55** in einer Ausbeute von 7 %, allerdings liegt die Ausbeute für die Nucleoside Uridin **56** und Guanosin **47** bei unter 1 %.^[79]



Schema 7: Parallele Synthese der vier kanonischen Nucleotide.^[79]

In den letzten Jahren wurden zwar einige Zugangsrouten zur simultanen Synthese von Purinen und Pyrimidinen vorgeschlagen, allerdings benötigen diese entweder Aufreinigungsschritte oder liefern die gewünschten Produkte nur in geringen Ausbeuten.

Daher ist es immer noch eine große Herausforderung, einen Reaktionsweg zu finden, der alle kanonischen Nucleoside im gleichen chemischen Umfeld, unter präbiotischen Bedingungen, liefert.

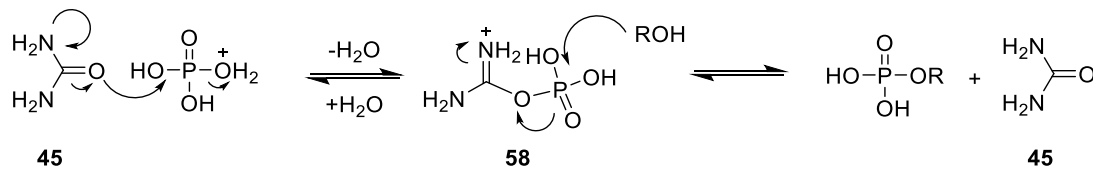
1.5. Phosphorylierungen unter präbiotischen Bedingungen

Um RNA-Moleküle zu erhalten, müssen die Nucleoside im nächsten Schritt mit Phosphaten zu Nucleotiden reagieren, welche daraufhin zu einsträngigen Polynucleotiden polymerisieren können.

Fast aller Phosphor in der Erdkruste liegt in Form von unreaktivem und unlöslichem Orthophosphat vor und ist daher nur schlecht für präbiotische Phosphorylierungs-Reagenzien zugänglich.^[80] Darüber hinaus ist die Phosphorylierung von Biomolekülen in Wasser thermodynamisch nicht begünstigt, da sie unter der Eliminierung eines Wasser-Moleküls abläuft.^[81] Phosphorylierungen von Nucleosiden in wässriger Lösung, in der Gegenwart von Kondensationsmitteln lieferten die entsprechenden Nucleotide in maximalen Ausbeuten von 3.6 %.^[82, 83] Um dieses Problem zu umgehen, wurden viele Versuche unternommen, Phosphorylierungen von Nucleosiden unter lösungsmittelfreien Bedingungen^[84-86] oder in organischen Lösungsmitteln, beispielsweise Formamid, durchzuführen.^[87, 88] Die Ausbeuten an Nucleotiden konnten durch die Verwendung von kondensierten Phosphaten, wie zum Beispiel Trimetaphosphat **57** in Kombination mit Nickelsalzen, auf bis zu 30 % gesteigert werden.^[89] Kondensierte Phosphate lassen sich durch Erhitzen von Orthophosphaten unter lösungsmittelfreien Bedingungen ^[86, 90] oder durch organische Kondensationsmittel in wässrigen Lösungen herstellen.^[91-93] Das natürliche Vorkommen von kondensierten Phosphaten ist allerdings beschränkt und viele dieser Reaktionen benötigen sehr hohe Temperaturen, was ihre präbiotische Zugänglichkeit erschwert.

Harnstoff **45** kann die Effizienz der Phosphorylierung mit Orthophosphaten erheblich steigern, indem es als Katalysator fungiert. Durch die Bildung von intermediären Organophosphor-Verbindungen **58** können sowohl 5'- als auch cyclische-2',3'-Monophosphate in erhöhten Ausbeuten erhalten werden.^[94-96]

So gelang es den Gruppen um *Hud* und *Menor-Salvàn* unlösliche Mineral-Phosphate durch Harnstoff in Ammoniumformiat-Wasser-Gemischen zu aktivieren. Der Mechanismus der Aktivierung ist in Schema 8 dargestellt.^[97]



Schema 8: Mechanismus der Aktivierung von Phosphat mit Hilfe von Harnstoff **45**.^[97]

Durch die Harnstoff-Aktivierung von Struvit ((NH₄)Mg[PO₄] x 6H₂O), Natriumhydrogenphosphat oder Hydroxylapatit (Ca₅(PO₄)₃OH), gelang ihnen die Phosphorylierung von Adenosin **3** und Uridin **6** zu den entsprechenden 5' oder 2',3'-cyclischen Phosphaten in Ausbeuten von bis zu 22 %.^[97]

Die Phosphorylierung des Zuckers kann je nach Phosphat-Quelle an einer der drei Hydroxylgruppen stattfinden. Während Orthophosphat bevorzugt mit der reaktiveren primären 5'-Alkohol-Gruppe der Ribose **1** reagiert,^[85, 94, 98, 99] erfolgt die Phosphorylierung unter Verwendung von Trimetaphosphat **57** auch an einer der sekundären 2'- oder 3'-OH-Gruppen.^[100, 101]

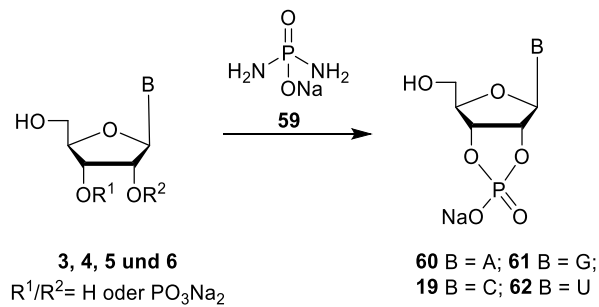
Der Gruppe um *Benner* gelang es, die Selektivität der Phosphorylierung zugunsten der 5'-Hydroxylgruppe zu steuern, indem sie Lüneburgit (Mg₃[(PO₄)₂[B₂(OH)₆] x 6H₂O) einsetzten. Das Mineral Lüneburgit dient dabei zum einen als Phosphat-Quelle, zum anderen ist das enthaltene Borat in der Lage die cis-ständigen OH-Gruppen zu komplexieren, wodurch die 5'-Alkoholgruppe bevorzugt phosphoryliert wird. Zur Aktivierung des anorganischen Phosphats verwendeten sie ebenfalls Harnstoff **45**.^[25] Der Reaktionsweg von *Benner* und seinen Mitarbeitern liefert zwar Phosphorylierungen in guten Ausbeuten, allerdings ist die Verfügbarkeit von Lüneburgit auf der frühen Erde, wie bereits erwähnt, fraglich.^[102]

Um die geringe Reaktivität des Phosphats zu umgehen, können Phosphorylierungen auch mit Phosphor-Verbindungen in anderen Oxidationsstufen durchgeführt werden. Die Verbindungen H-Phosphonat (HPO₃²⁻) und H-Phosphinat (H₂PO₂²⁻) sind zum Beispiel sehr viel reaktiver als Phosphat.^[103-105] Sie hätten auf der frühen Erde aus Phosphat durch elektrische Entladungen in einer reduzierenden Atmosphäre entstehen können.^[106] Darüber hinaus, können H-Phosphonat und H-Phosphinat durch die Reaktion von Schreibersit ((Fe,Ni)₃P) mit Wasser entstanden sein.^[60, 107, 108] Schreibersit ist ein meteoritisches Material, welches einen Anteil von bis zu 10% des in der Erdkruste vorkommenden Phosphors ausgemacht haben könnte.^[109, 110] *Pasek* und seine Gruppe konnten durch die Verwendung von Schreibersit erfolgreich Phosphorylierungen von Nucleosiden in wässrigen Lösungen durchführen.^[111]

Phosphorylierungen unter präbiotischen Bedingungen sind auch mit Organophosphorverbindungen möglich. *Krishnamurthy* und seine Gruppe nutzen

1. Molekulare Evolution

Diamidophosphat (DAP, **59**) um biologisch relevante Moleküle, wie Nucleoside, Aminosäuren und Lipid-Vorstufen, zu phosphorylieren (s. Schema 9).^[74, 112]



Schema 9: Phosphorylierung von Nucleosiden mit Diamidophosphat (DAP, **59**) zu den cyclischen Phosphaten **19** und **60-62**.^[112]

Die Phosphorylierungen können dabei in wässriger Lösung ohne die Verwendung von Kondensationsmittel durchgeführt werden. Der präbiotische Zugang zu DAP **59** erfolgt durch die Reaktion von Trimetaphosphat **57** mit Ammoniak.^[74, 112]

Im nächsten Schritt müssen die phosphorylierten Nucleoside kondensieren, um einsträngige Polynucleotide auszubilden. Im folgenden Kapitel werden verschiedene Möglichkeiten diskutiert, wie die Oligomerisierung von Nucleotiden unter präbiotischen Bedingungen stattgefunden haben könnte.

1.6. Kondensation von Nucleotiden unter präbiotischen Bedingungen

Die Oligomerisierung von Nucleotiden in wässrigen Lösungen ist weder kinetisch noch thermodynamisch bevorzugt. Nucleosid-5'-phosphate sind zwar hoch-energetische Phosphorester, allerdings beträgt die Halbwertszeit der Hydrolyse von ATP **63** zu ADP **64**, bei neutralem pH und 25°C, 6,3 Jahre, womit sie in wässriger Lösung eher unreaktiv sind.^[113] Für lange Zeit konnten daher nur sehr kurze Oligonucleotide, in geringen Ausbeuten, erhalten werden.^[114] Das Erhitzen der Nucleotide unter lösungsmittelfreien Bedingungen^[115] und die Verwendung von organischen Aktivierungsmitteln, wie Cyanamid **11**,^[116-118] konnten die Ausbeuten zwar etwas steigern, allerdings konnten trotzdem keine längeren Oligomere erhalten werden.^[119] Durch die Verwendung des Schichtsilikats Montmorillonit gelang es *Joshi et al.* Trimere aus Adenosinmonophosphat **46** zu erhalten. Bei Durchführung der Reaktion in Gegenwart von Na⁺-Salzen, wie NaCl, konnte die Länge der Oligomere auf bis zu zwölf erhöht werden.^[120]

Cyclische Monophosphate von Nucleosiden sind im Gegensatz zu den 5'-Monophosphaten sehr viel reaktiver, da die Bildung der neu entstehenden Phosphodiesterbindung thermodynamisch bevorzugt ist.^[121, 122] 2',3'-cyclische Monophosphate **17** und **60-62** sind das Hauptprodukt der von *Lohrmann* und *Orgel* vorgestellten Harnstoff-katalysierten Phosphorylierung von Nucleosiden bei 100°C,^[94] wohingegen 3',5'-Monophosphate **65-68** von

Saladino et al. durch das Erhitzen von Nucleosiden mit KH_2PO_4 in Formamid hergestellt wurden.^[123] Die Strukturformeln der jeweiligen cyclischen Nucleotide sind in Abbildung 9 dargestellt. Um die Polymerisation von cyclischen 2',3'-Monophosphaten **17** und **60-62** durchzuführen, werden diese in Gegenwart von organischen Katalysatoren unter lösungsmittelfreien Bedingungen erhitzt.^[124-126] Cyclische 3',5'-Monophosphate **65-68** hingegen polymerisieren in wässrigen Lösungen bei Temperaturen von 40-90°C ohne den Zusatz von Katalysatoren. Im Falle von Guanosin **4** konnten so Oligomere mit einer Länge von bis zu 25 Einheiten erhalten werden.^[127, 128]

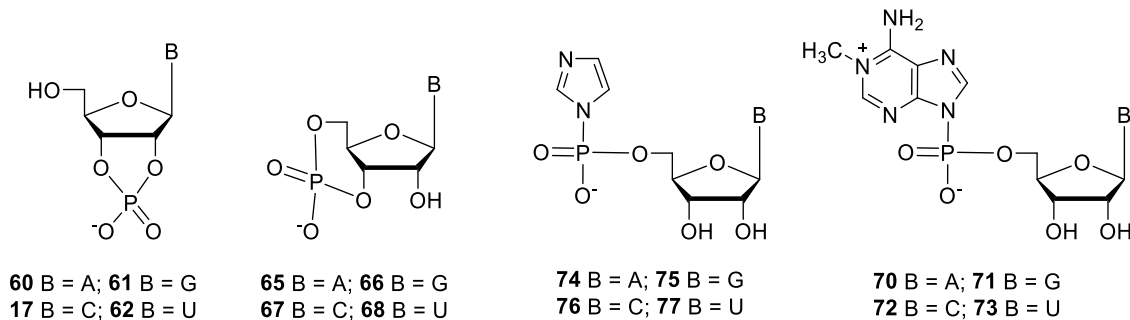


Abbildung 9: Strukturformeln aktivierter Nucleoside: 2',3'-cyclische Monophosphate **17** und **60-62**, 3',5'-cyclische Monophosphate **65-68** 5'-Phosphorimidazolidin **74-77** und 5'-Phosphoro-1-methyladenin **70-73**.

Interessanterweise können Nucleoside auch aktiviert werden, indem sie an modifizierte Nucleobasen geknüpft werden. 1-Methyladenin **69** reagiert mit 5'-Monophosphaten in der Gegenwart von Carbodiimiden zu 5'-Phosphoro-1-Methyladenin **70-73** (vgl. Abbildung 9).^[129] *Ferris* und seine Mitarbeiter zeigten, dass dieses aktivierte Nucleotid bei Raumtemperatur unter Montmorillonit-Katalyse zu 55meren reagieren kann.^[130-132]

Durch die Verwendung von aktivierten 5'-Phosphorimidazolidinen **74-77** (vgl. Abbildung 9) in der Gegenwart von Pb^{2+} -Salzen konnten Oligonucleotide mit einer Kettenlänge von bis zu 16 Nucleotiden in wässriger Lösung erhalten werden. Besonders effizient ist die Reaktion bei -18°C in der eutektischen Wasserphase. Hier konnten Oligomere in Ausbeuten von bis zu 90 % erhalten werden.^[133-137] Phosphorimidazolidine **74-77** können durch die Reaktion von 5'-Polyphosphaten mit Imidazol unter lösungsmittelfreien Bedingungen erhalten werden, weshalb sie auch auf der frühen Erde zugänglich gewesen sein könnten.^[138] Allerdings bestehen die Oligomere, die durch Phosphorimidazolidine **74-77** erhalten werden, nicht aus den biologisch relevanten 3'-5'-Verknüpfungen, sondern darüber hinaus auch 2'-5' und 5'-5'-Bindungen. Die Selektivität der 3'-5'-Bindungsknüpfung konnte durch die Verwendung von Metallionen zwar erhöht werden, allerdings ist der Anteil an anderen Verknüpfungen immer noch sehr hoch.^[139]

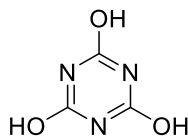
Die Steuerung der Selektivität der 3'-5'-Bindungsknüpfung der Nucleotide, unter Bedingungen die auf der frühen Erde geherrscht haben könnten, stellt im Allgemeinen eine weitere

1. Molekulare Evolution

Schwierigkeit bei der RNA-Oligomerisierung dar.^[140, 141] Die Verwendung von Montmorillonit kann die Selektivität zugunsten der 3',5'-Verknüpfung steuern. Die Nukleotide adsorbieren durch die Ausbildung von *Van-der-Waals*-Kräfte zwischen den Silikatschichten und den Nukleobasen an das Mineral, wodurch vermutlich eine Orientierung eingenommen wird welche die favorisierte Ausbildung von 3',5'-Verküpfungen begünstigt.^[142, 143] Die *Van-der-Waals*-Kräfte sind im Falle der Purine durch das größere aromatische System stärker als bei den Pyrimidinen.^[144] Dadurch ist die 3',5'-Selektivität bei aktivierten Adenosin-Derivaten sehr viel höher als bei den entsprechenden Cytidin - und Uridin-Derivaten.^[140, 144-146] *Wang* und *Ferris* untersuchten den Mechanismus dieses katalytischen Effektes und schlugen vor, dass die Oligomerisierung nur an einer begrenzten Anzahl an spezifischen, aktivierten Zentren in den Montmorillonit Schichten abläuft.^[147]

Diesen Effekt nutzen auch *Deamer* und seine Mitarbeiter aus. Sie verwendeten Montmorillonit als Katalysator um Lipid-Mizellen herzustellen. Die entstehenden Vesikel können Nukleotide, welche an das Mineral adsorbiert sind, einschließen und dadurch Oligomere in ausreichender Länge und mit der korrekten Konfiguration herstellen.^[148] Die Lipidmatrix beschleunigt die Polymerisation von 5'-Monophosphaten durch Hydrations-Dehydrations-Zyklen um ein Vielfaches, wodurch 25-100 Einheiten lange Polymere erhalten werden konnten.^[149, 150]

Yokosawa et al. gelang 2017 die Polymerisation von Adenosinmonophosphat **46** mit Hilfe von Cyanursäure **78** (s. Abbildung 10). **78** ist in der Lage durch Interaktionen der π -Systeme Hydrogele mit Nukleosiden auszubilden. Durch diese Interaktion der π -Systeme können sich die beiden reagierenden Spezies annähern, was einen wichtigen Faktor für die nukleophile Reaktion der Oligomerisierung darstellt.^[151] Bei Cyanursäure **78** handelt es sich um eine mögliche Vorläufer-Nukleobase, die präbiotisch durch die Reaktion von Ammoniak und Kohlenstoffdioxid zugänglich ist und bereits in meteoritischen Proben nachgewiesen werden konnte.^[152-154]



Cyanursäure **78**

Abbildung 10: Strukturformel von Cyanursäure **78**.

Nach erfolgreicher Polymerisation können die Einzelstränge durch Templat-Vermittlung einen komplementären Strang und somit eine Doppelhelix ausbilden. Auch für diese Prozesse sind schon einige vielversprechende Vorschläge vorhanden.^[74, 155-157]

1.7. Modifizierte Nucleoside

RNA besteht nicht nur aus den 4 kanonischen Nucleosiden, sondern darüber hinaus auch aus mehr als 120 RNA-Modifikationen. Diese modifizierten Nucleoside sind für die korrekte Faltung der RNA und die Feinabstimmung der RNA/RNA- und RNA/Protein-Wechselwirkungen unerlässlich.^[158-160]

Modifikationen der Nucleoside können sowohl an verschiedenen Positionen der Nucleobase als auch an der 2'-Hydroxy-Gruppe des Zuckers auftreten. Die Art der Modifikationen kann dabei stark variieren und reicht von einfachen Methylierungen, über Carbamoylierungen, zu komplexeren Modifikationen, bei welchen die Struktur maßgeblich verändert wird. Eine Auswahl verschiedener RNA-Modifikationen ist in Abbildung 11 dargestellt.

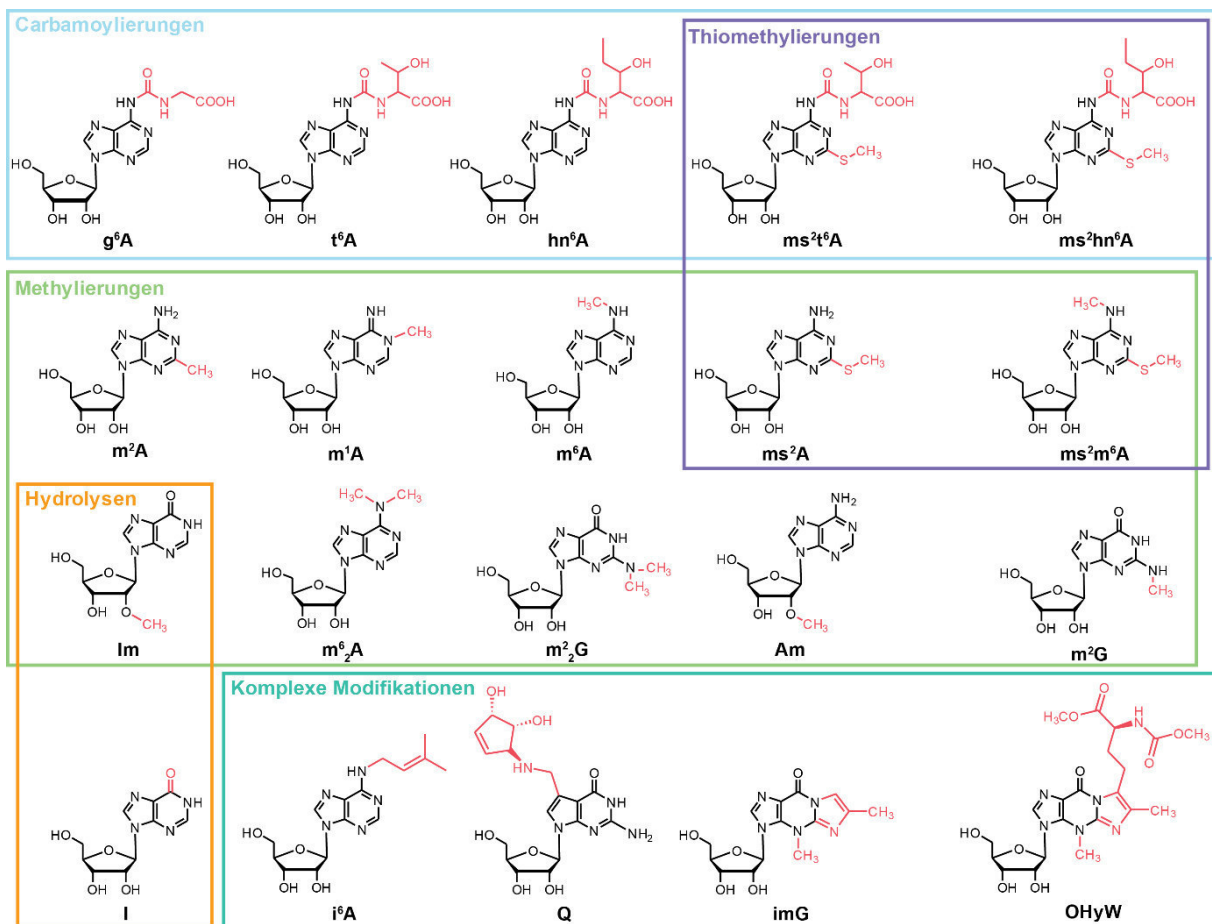


Abbildung 11: Beispiele einiger modifizierter Nucleoside. Die modifizierten Bereiche der Nucleoside sind in Rot gekennzeichnet.

Die Funktion der modifizierten Nucleoside kann je nach Art der Modifizierung variieren. Das methylierte Nucleosid m^6A **79** erfüllt zum Beispiel eine Vielzahl von Aufgaben. Es ist in die X-Chromosom-Inaktivierung involviert^[161] und reguliert die mRNA Stabilität,^[162] das Splicing,^[163, 164] sowie die Translation.^[165-167] m^7G **80**, ebenfalls ein methyliertes Nucleosid, ist Teil der 5'-Cap-Struktur in eukaryotischer mRNA.^[168] Modifikationen wie t^6A **81**, welche sich in

1. Molekulare Evolution

unmittelbarer Nähe der Anticodonschleife befinden, sind in die Translation des genetischen Codes involviert.^[169, 170]

1.7.1. LUCA

In Anbetracht der großen Anzahl an RNA-Modifikationen, stellt sich die Frage, wie und wann diese im Laufe der Evolution entstanden sind. *Martin* und seine Mitarbeiter veröffentlichten 2016 eine phylogenetische Analyse, aus welcher hervor geht, dass nicht-kanonische Nukleoside bereits im *Last Universal Common Ancestor* (LUCA, deutsch: letzter gemeinsamer Urvorfahr) vorhanden waren.^[5] LUCA ist ein hypothetischer, evolutionärer Organismus, welcher die abiotische Evolution auf der frühen Erde mit dem ersten mikrobiologischen Leben vor 3,8-3,5 Mio. Jahren verknüpft.^[171] Es wird davon ausgegangen, dass alle drei Domänen des Lebens von LUCA abstammen.^[172-174] *Martin* geht davon aus, dass LUCA's Ursprung auf spontanen organischen Reaktionen beruhte, welche unter den Bedingungen auf der frühen Erde ablaufen konnten. Dabei beruft er sich vor allem auf die von *Amend et al.* vorgeschlagenen hydrothermalen Spalten, in denen hohe Wasserstoff-Drücke herrschten.^[175, 176] Unter diesen harschen Bedingungen liegt es nahe, dass nicht nur die vier kanonischen Nukleoside entstanden sein könnten, sondern auch deren Modifikationen.

In Abbildung 12 sind einige von *Weiß et al.* postulierten Modifikationen im LUCA dargestellt. Bei den Modifikationen handelt es sich vor allem um Methylierungen und Sulfonierungen, allerdings wurde auch das Vorhandensein von Aminosäure- und Selen-modifizierten Nukleosiden postuliert.^[5]

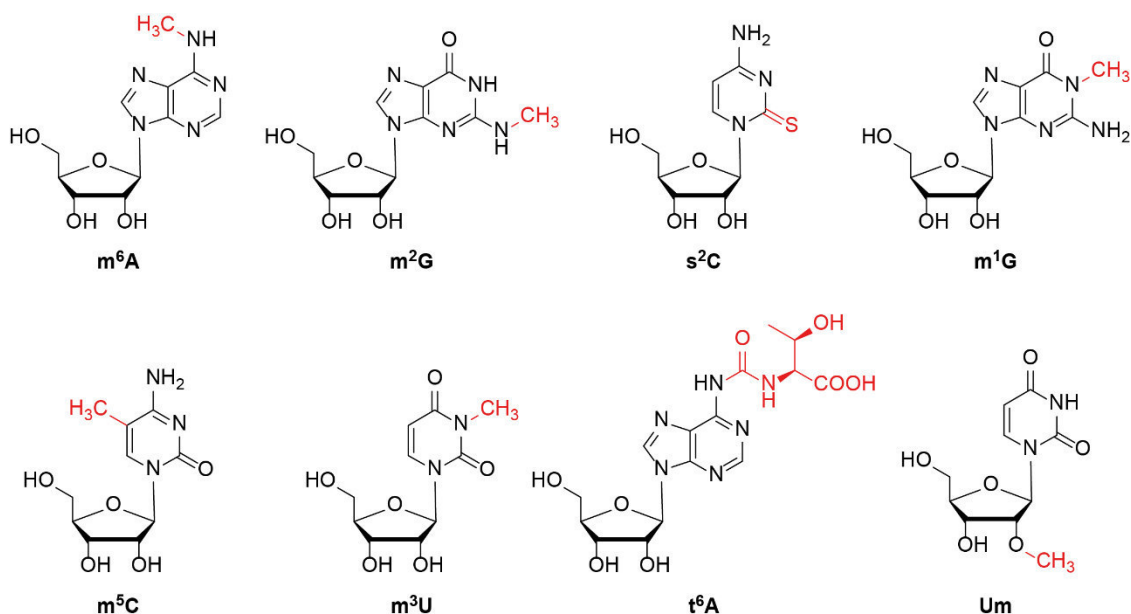


Abbildung 12: Strukturen einiger modifizierter Nukleoside, die durch eine phylogenetische Studie nachweislich bereits im LUCA vorhanden waren.^[5]

In dem Venn-Diagramm in Abbildung 13 sind alle zu diesem Zeitpunkt bekannten Nicht-kanonischen Nukleoside nach ihrem Vorkommen in den drei Domänen des Lebens aufgeteilt. Viele der einfachen Modifikationen, wie Methylierungen, kommen in allen drei Domänen vor (orange hinterlegt).^[160, 177-179] Interessanterweise, sind fast alle diese Modifikationen hypothetisch auch im LUCA vorhanden gewesen.^[5]

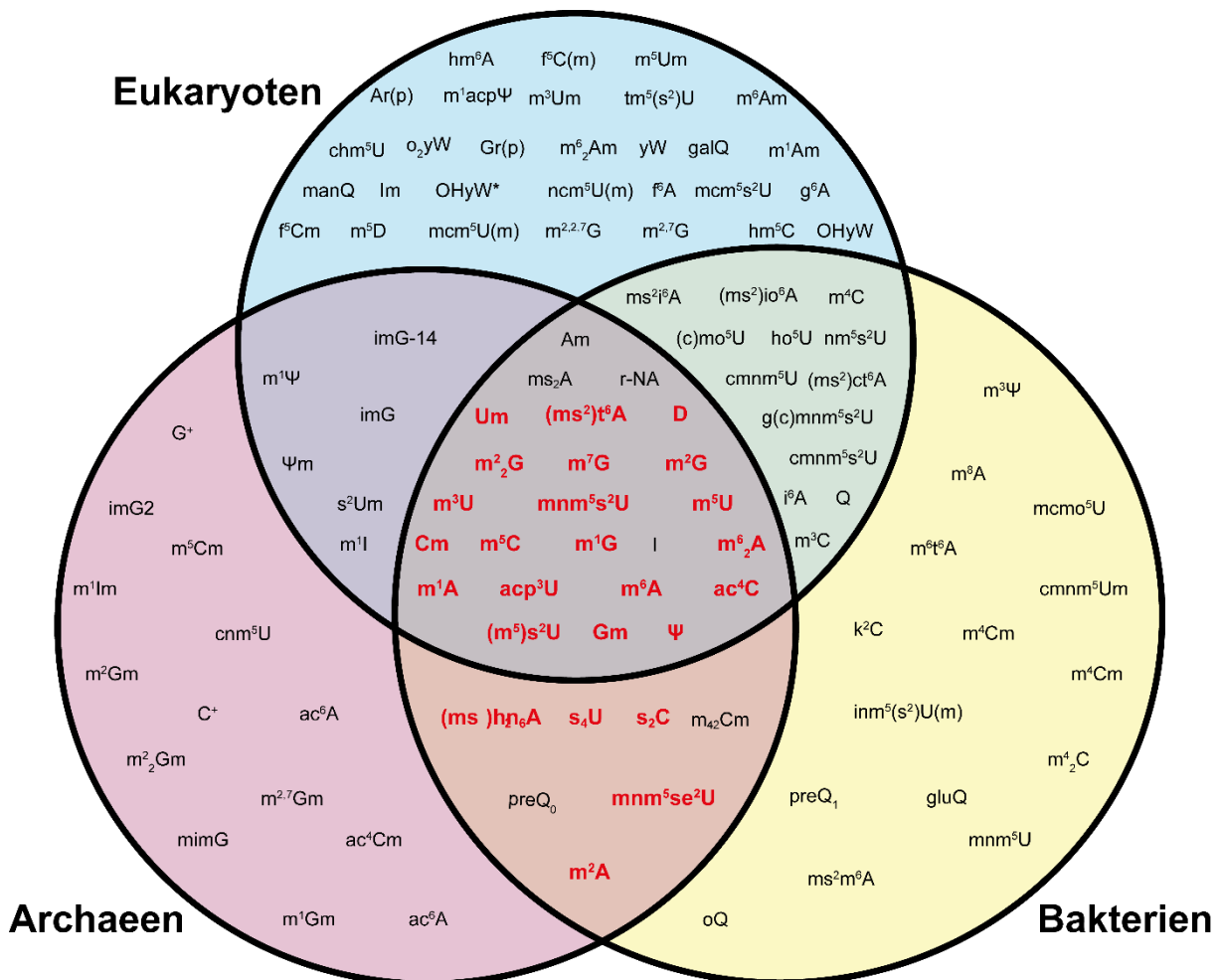


Abbildung 13: Aufteilung der nicht-kanonischen Nukleoside auf ihr Vorkommen in den drei Domänen des Lebens.^[160, 177-179] Die in Rot gekennzeichnet Modifikationen wurden durch eine phylogenetische Studie im LUCA nachgewiesen.^[5]

1.8. Präbiotische Entstehung von Aminosäuren und Peptiden

Auch unter der Annahme einer *RNA-Welt* muss die Frage, wie Aminosäuren und deren Polymere, Peptide, auf der frühen Erde entstehen konnten, beantwortet werden. Dass Aminosäuren in einer präbiotischen Atmosphäre entstehen konnten, zeigte bereits *Miller* 1953 in seinem bekannten Experiment.^[180] Er setzte Methan, Ammoniak, Wasserstoff und Wasser elektrischer Ladung aus, und konnte dabei unter anderem Glycin **82**, Alanin **83**, Asparaginsäure **84** und α -Amino-*n*-butylsäure **85** nachweisen. Durch Weiterentwicklung des Experiments und Verbesserung der Bedingungen konnte so die Entstehung 26 weiterer biologisch relevanter Substanzen nachgewiesen werden.^[181, 182]

1. Molekulare Evolution

Die *Strecker-Synthese*^[183] ermöglicht die Herstellung von Aminosäuren aus Ammoniak, Cyanwasserstoff und Aldehyden durch eine *Mannich*-artige Reaktion. Dabei werden zwar nur Moleküle verwendet, die durchaus auf der frühen Erde präsent gewesen sein könnten, allerdings stellt der hohe pK_s-Wert von Ammoniak ein problematisches Umfeld für die präbiotische Aminosäure-Synthese dar.^[184] *Powner* und seine Mitarbeiter ersetzten Ammoniak durch das präbiotische Phosphorylierungsreagenz Diamidophosphat **59**^[74, 185] und ließen dieses mit Aldehyden und Blausäure **9** unter wässrigen Bedingungen, bei neutralen pH-Werten, reagieren. Die entstehenden *N*-Phosphoro-Aminonitrile können im Weiteren mit Schwefelwasserstoff zu Aminothioamiden oder unter saurer Hydrolyse zu den entsprechenden Aminosäuren reagieren. Unter basischer Hydrolyse entstehen *N*-Phosphoro-Aminosäure-Derivate.^[186]

Die Kondensation von Aminosäuren zu Peptiden erwies sich allerdings lange Zeit als schwierig. Zwar konnten kleine Peptide mit der Hilfe von Mineralsalzen,^[187] Carbonylsulfid^[119] sowie *N,N*-Carbonyldiimidazol **86**^[188] erhalten werden, allerdings nur kurze Oligomere in geringen Ausbeuten.^[172, 189] Durch Aggregatbildung der Peptide konnte die Kettenlänge zwar verlängert werden, allerdings ist die Variabilität im Fall der verschiedenen Aminosäuren sehr gering.^[190, 191] *Greenwald* und seinen Mitarbeitern gelang es 2018, Aminosäuren mit Hilfe solcher Peptidaggregate sequenzspezifisch, regioselektiv sowie stereoselektiv zu kondensieren. Sie konnten durch die Reaktion von aktivierten DL-Aminosäuren in Gegenwart von Peptidaggregaten und eines Templatstranges die entsprechenden isotaktischen Peptide erhalten. Ohne Templatstrang wurden nur Dimere bzw. Trimere ohne Stereoselektivität gebildet.^[192]

Forsythe et al. gelang es, durch Austauschreaktionen zwischen α -Hydroxysäuren und α -Aminosäuren Oligomere herzustellen.^[193, 194] Es entstehen hierbei Depsipeptide, welche dadurch definiert sind, dass sie sowohl Amid- als auch Esterbindungen enthalten. Die Esterbindungen werden mit der Zeit allerdings hydrolysiert, wohingegen sich die stabileren Amidbindungen im Peptid anreichern.

Cyclische Dipeptide könnten auch eine wichtige Rolle in der präbiotischen Entstehung von Peptiden gespielt haben. Cyclische Dipeptide können nicht nur als Peptid-Vorläufermoleküle fungieren, sondern darüber hinaus auch die chirale Induktion von Reaktionen katalysieren,^[195] weshalb sie besonders wichtig auf der frühen Erde gewesen sein könnten. *Rabinowitz et al.* stellten Alanin- und Glycin-Dimere her, indem sie die entsprechenden Aminosäuren in wässrigen Lösungen mit Trimetaphosphat **57** umsetzten.^[196] Durch Weiterentwicklung dieser Methode fanden *Ying et al.* heraus, dass die Aminosäure Prolin in wässrigen Trimetaphosphat-Lösungen mit sich selber oder mit anderen Aminosäuren cyclische Derivate bildet.^[197]

In den letzten Jahren konnten große Fortschritte im Bereich der präbiotischen Protein-Synthese erzielt werden. Die nächste Herausforderung besteht nun darin, die Peptid- und Proteinsynthesen unter den Bedingungen der *RNA-Welt* durchzuführen, um damit eine Verbindung dieser zwei Welten zu schaffen.

1.9. Die Verbindung von Aminosäuren und Nukleosiden

Die Peptidsynthese aller lebenden Organismen beruht auf aktivierten 5'-Aminoacetyladenylaten (5'-aa-AMP **87**).^[198] 5'-aa-AMPs sind Moleküle, bei denen Aminosäuren über Phosphordiester an Nukleoside verknüpft sind (vgl. Abbildung 14).

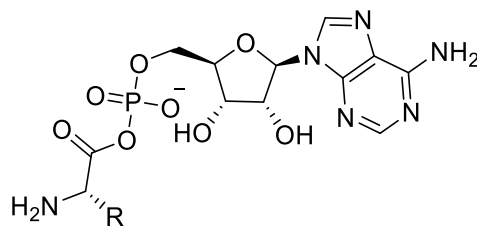


Abbildung 14: Struktur von 5'-Aminoacetyladenylaten (5'-aa-AMP, **87**), welche für die biologische Peptidsynthese verantwortlich sind. R = verschiedene Aminosäureseitenketten.

Interessanterweise gibt es auch nicht-kanonische RNA-Nukleoside, bei welchen eine Aminosäure an die Nukleobase geknüpft ist. In Abbildung 15 sind einige Beispiele für solche Aminosäure-modifizierten Nukleoside dargestellt.

Threonylcarbamoyladenysin, t^{6A} **81**, ist ein bekannter Vertreter dieser Klasse von Modifikationen. Hier ist die Aminosäure Threonin **88** über das N^6 -Atom an die Nukleobase gekoppelt. In der tRNA befindet sich **81** auf Position 37 direkt neben dem Anticodon, wo es für die korrekte Faltung während der Translation verantwortlich ist.^[169, 170] In den vorangehenden Kapiteln, wurde bereits über die präbiotische Entstehung von Aminosäuren berichtet. Threonin **88** ist eine der Aminosäuren, die bereits unter präbiotischen Bedingungen nachgewiesen werden konnte.^[199] Viele der Aminosäure-modifizierten Nukleoside konnten in allen drei Domänen des Lebens nachgewiesen werden.^[160]

Sowohl unter den modifizierten Nukleosiden als auch in der Peptidsynthese treten also Verknüpfungen zwischen Aminosäuren und Nukleosiden auf. Da es noch immer unklar ist, wie aus der *RNA-Welt* Peptide hervorgingen, stellt sich die Frage, ob durch die Kupplung von Aminosäuren und Nukleosiden erstmals eine Verbindung dieser zwei Welten existiert haben könnte. Es ist schwer vorstellbar, dass sich zwei hochkomplexe Systeme wie RNA und Proteine parallel und zueinander passend, allerdings trotzdem unabhängig voneinander, ausgebildet haben sollen. In den letzten Jahren wurden daher bereits einige präbiotische Syntheserouten zu verschiedenen Aminosäuren-Nukleosid-Addukten veröffentlicht.

1. Molekulare Evolution

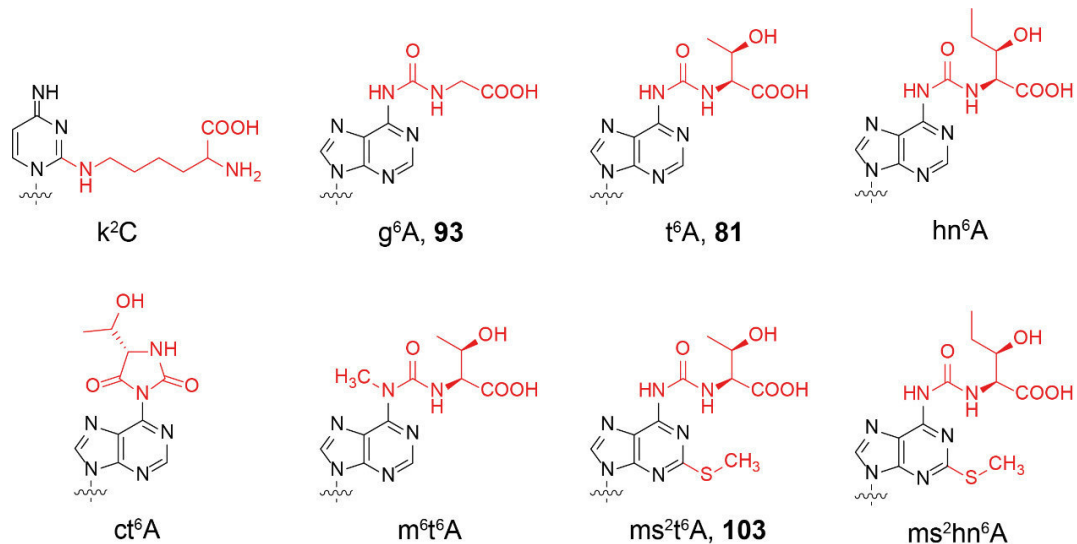


Abbildung 15: Strukturen einiger Aminosäure-modifizierter Nucleoside.

Wie bereits im vorhergehenden Kapitel berichtet, gelang es *Ura et al.* 2009 eine Verbindung zwischen RNA-Molekülen und Aminosäuren zu knüpfen, indem sie Polymere herstellten, bei welchen Nucleobasen an ein Dipeptid-Rückgrat gekoppelt sind (vgl. Abbildung 16A). Um diese *thioester peptide nucleic acids* (tPNAS, deutsch: Thioester-Peptid-Nucleinsäuren) unter enzymfreien Bedingungen herzustellen, verwendeten sie Thioester-Derivate und setzten diese mit Peptiden um. tPNAS sind in der Lage, sowohl untereinander, als auch mit RNA und DNA Basenpaare auszubilden und kombinieren diese Fähigkeit mit den üblichen Seitenketten-Funktionalitäten von Peptiden.^[17, 18]

Zhao und seine Mitarbeiter berichteten 2018 von der Entstehung verschiedener Aminoacyladenylate (aa-5'-N-AMP, **89**), indem sie Aminosäuren und Nucleoside unter basischen Bedingungen in Gegenwart von Trimetaphosphat **57** reagieren ließen. Bei den entstehenden Aminoacyladenylaten sind Aminosäuren mit dem N-Terminus über die Phosphat-Gruppe an das Nucleotid verknüpft (vgl. Abbildung 16B). Neben der Bildung der Aminoacyladenylaten konnten sie außerdem die Entstehung von Dipeptiden beobachten.^[197]

Es wurden bereits einige Versuche unternommen, instabile 5'-aa-AMP-Moleküle **87** auf präbiotische Weise herzustellen.^[200-202] *Sutherland* und seinen Mitarbeitern gelang es, Nucleoside über die Carboxyl-Gruppe mit Aminosäuren zu verknüpfen, indem sie N-Carboxyanhydride verwendeten.^[203] N-Carboxyanhydride sind durch die präbiotische Aktivierung von Aminosäuren durch vulkanisches Carbonylsulfid unter präbiotischen Bedingungen zugänglich.^[119, 204] Durch Reaktion der aktivierten Aminosäuren mit Nucleotiden erhielten sie Carbonsäure-Phosphorsäure-Anhydride **90**, welche allerdings sofort zu 2'-3'-cyclischen Monophosphaten **17** und **60-62** und einem Umlagerungsprodukt **91** weiterreagierten. Bei dem Umlagerungsprodukt ist die Aminosäure über die 2'-Hydroxylgruppe

mit dem Nucleotid verknüpft und die Phosphatgruppe befindet sich noch an der 3'-Hydroxylgruppe (vgl. Abbildung 16C). Der Aminoacyltransfer ist dabei schneller als die Cyclisierung. Diese Erkenntnisse führte sie zu der Annahme, dass 5'-aa-AMP-Verbindungen **87** zu reaktiv für die frühe Erde sind und eventuell erst später im Laufe der Evolution entstanden sind.^[203]

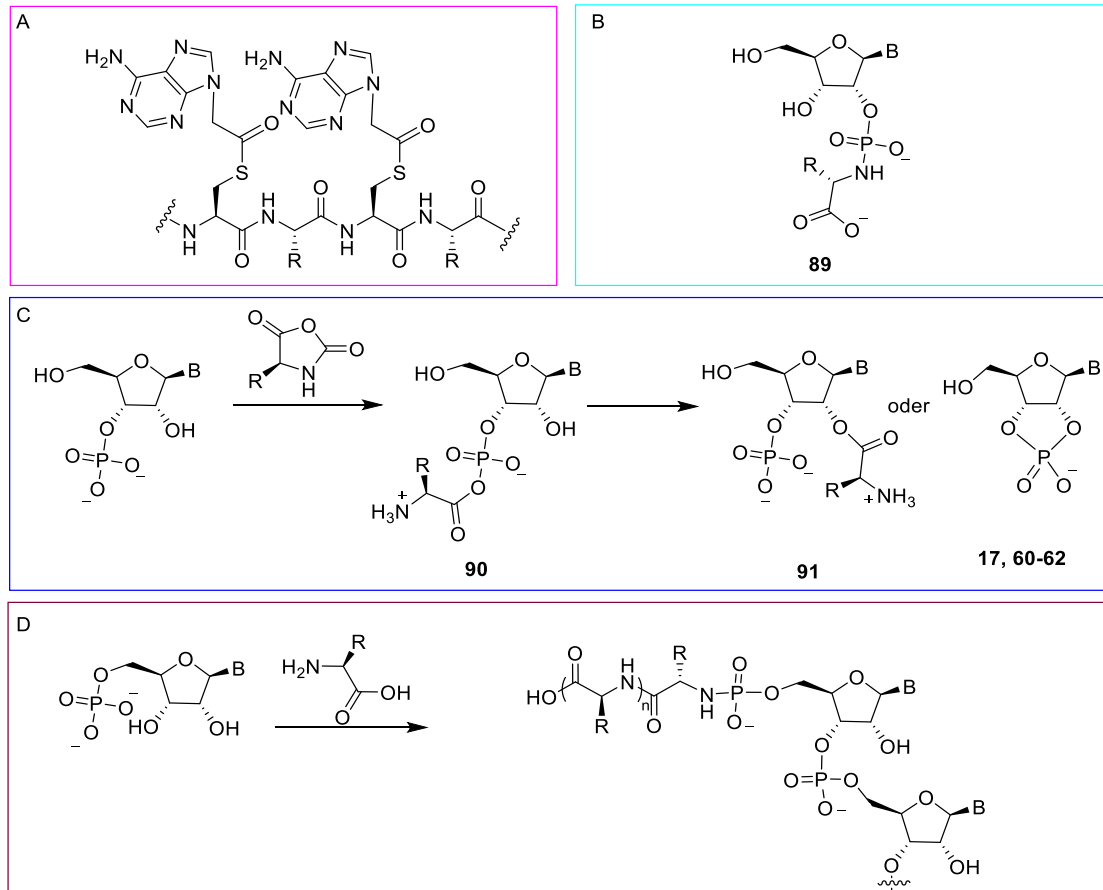


Abbildung 16: Strukturformeln und präbiotische Syntheserouten zu verschiedenen Aminosäuren-Nucleosid/Nucleotid-Addukten A: Struktur von *thioester peptide nucleic acids* (tPNAs, deutsch: Thioester-Peptid-Nucleinsäuren).^[17] B: Struktur von *aa-N-AMP* wie sie von *Zhao* und seiner Gruppe hergestellt wurden.^[197] C: Syntheschema zu Aminosäure-Nucleotid-Konjugaten von der *Sutherland*-Arbeitsgruppe.^[203] D: Präbiotischer Zugang zu *Richerts Peptidyl-RNA*.^[205-207]

Clemens Richert und seine Gruppe zeigten, dass eine Mischung aus Aminosäuren und Nucleotiden in Gegenwart von Aktivierungsreagenzien gemischte Polymere aus Nucleotiden und Aminosäuren bilden. In ihrer sogenannten *Peptidyl-RNA* sind Peptide kovalent über Phosphoramidat-Bindungen an Nucleoside verknüpft, weshalb sie stabiler als die biologisch relevanten 5'-aa-AMP-Derivate sind (vgl. Abbildung 16D).^[207] *Richert* und seinen Mitarbeitern gelang es, Aminosäuren am Phosphat-Terminus der RNA auszubilden und Peptide daran zu koppeln. Sie schlugen vor, dass Ribonucleosid-medierte Kupplungen von Aminosäuren eine wichtige Rolle in der Peptid-Synthese auf der frühen Erde spielten. Für diese Synthese wird

1. Molekulare Evolution

allerdings EDC **91** als Aktivierungsreagenz benötigt, welches präbiotisch eher weniger plausibel erscheint. Wird EDC **91** durch Cyanamid **11** ersetzt, werden die gewünschten Produkte nur nach sehr langen Reaktionszeiten und in geringen Ausbeuten erhalten.^[205, 206]

2. Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit wurde die präbiotische Entstehung von kanonischer und nicht kanonischer RNA untersucht.

Der Fokus dieser Arbeit lag auf der Entwicklung neuer präbiotischer Syntheserouten zu methylierten sowie carbamoylierten Nukleosiden. Dabei sollten zum einen Wege gefunden werden, um Nukleoside direkt durch einfache Chemie zu modifizieren und zum anderen sollten Möglichkeiten entwickelt werden, um Nukleosid-Vorläufermoleküle in nicht-kanonische RNA-Bausteine zu überführen. Um die Produkte der präbiotischen Studien sicher zu identifizieren, sollten Referenzmoleküle durch klassische organische Synthesen hergestellt und charakterisiert werden. Im Zuge dieser Arbeit wurde die Chemie zur Carbamoylierung von Adenosin **3** auch auf Cytidin **5** übertragen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollten Methoden entwickelt werden, um Mineralien wie Struvit und Vivianit als Phosphatquellen für Phosphorylierungen von Nukleosiden einzusetzen. Darüber hinaus sollte in der vorliegenden Arbeit die Polymerisation von 2',3'-cyclische Monophosphaten unter dem Einfluss großer Drücke untersucht werden.

3. Veröffentlichte Ergebnisse

3.1. Nass-Trocken-Zyklen ermöglichen den parallelen, kontinuierlichen Zugang zu kanonischen und nicht-kanonischen Nucleosiden

„Wet-dry cycles enable the parallel origin of canonical and non-canonical nucleosides by continuous synthesis”

Sidney Becker, Christina Schneider, Hidenori Okamura, Antony Crisp, Tynchtyk Amatov, Milan Dejmek, Thomas Carell, *Nat. Commun.* **2018**, 9, 163.

Prolog

Die Biomoleküle, die für unser heutiges Leben essenziell sind, entstanden vor rund 4 Milliarden Jahren unter Bedingungen, die von der Zusammensetzung der damaligen Erdkruste und Atmosphäre bestimmt wurden. In dieser hadeanischen Umgebung wurden chemische Transformationen durch Schwankungen der natürlich gegebenen physikalischen Parameter, wie beispielsweise Nass-Trocken-Zyklen, angetrieben. So konnte beispielsweise (selbst-)replizierende RNA, als grundlegendes Biopolymer, durch kontinuierliche physikalisch-chemische Prozesse entstehen. In der vorliegenden Studie wird eine kontinuierliche Synthese von RNA-Nucleosiden durch Nass- und Trocken-Zyklen vorgestellt. Dieses Modell liefert sowohl die kanonischen als auch viele allgegenwärtige nicht-kanonische Purinnucleoside parallel durch einfache Änderungen physikalischer Parameter wie der Temperatur, des pH-Wertes und der Konzentration. Die Daten zeigen, dass modifizierte Nucleoside möglicherweise als Konkurrenz-moleküle zu den kanonischen RNA-Bausteinen gebildet wurden. Sie könnten in diesem Sinne als Fossilien der frühen Erde betrachtet werden.

Autorenbeitrag

Für diese Arbeit entwickelte ich Syntheserouten zu Referenzmolekülen.

Lizenz

Kopie der Publikation mit Erlaubnis des Verlags; Copyright 2018 Nature Publishing Group.

Weiterführende Informationen






Die weiterführenden Informationen zur experimentellen Durchführung der Experimente werden im Rahmen dieser Arbeit nicht aufgeführt.

ARTICLE

DOI: 10.1038/s41467-017-02639-1

OPEN

Wet-dry cycles enable the parallel origin of canonical and non-canonical nucleosides by continuous synthesis

Sidney Becker ¹, Christina Schneider ¹, Hidenori Okamura¹, Antony Crisp ¹, Tynchtyk Amatov ¹, Milan Dejmek² & Thomas Carell ¹

The molecules of life were created by a continuous physicochemical process on an early Earth. In this hadean environment, chemical transformations were driven by fluctuations of the naturally given physical parameters established for example by wet-dry cycles. These conditions might have allowed for the formation of (self)-replicating RNA as the fundamental biopolymer during chemical evolution. The question of how a complex multistep chemical synthesis of RNA building blocks was possible in such an environment remains unanswered. Here we report that geothermal fields could provide the right setup for establishing wet-dry cycles that allow for the synthesis of RNA nucleosides by continuous synthesis. Our model provides both the canonical and many ubiquitous non-canonical purine nucleosides in parallel by simple changes of physical parameters such as temperature, pH and concentration. The data show that modified nucleosides were potentially formed as competitor molecules. They could in this sense be considered as molecular fossils.

¹Center for Integrated Protein Science Munich CiPSM at the Department of Chemistry, Ludwig-Maximilians-Universität München, 81377 Munich, Germany.

²Institute of Organic Chemistry and Biochemistry ASCR, 16610 Prague 6, Czech Republic. Correspondence and requests for materials should be addressed to T.C. (email: thomas.carell@lmu.de)

The molecules of life originated around 4 billion years ago under conditions governed by the composition of the Earth's crust and atmosphere at that time^{1, 2}. Molecules such as nucleic acids and amino acids must have formed by a continuous physicochemical process, in which greater structural complexity was generated based on fluctuations of the naturally given physical parameters³. Geothermal fields, for example, could have established such fluctuations by wet-dry cycles that may have driven chemical transformations, which ultimately allowed the emergence of life⁴⁻⁸. The appearance of (self)-replicating RNA was certainly of central importance for the transition from an abiotic world to biology⁹⁻¹¹. We need to consider, however, that an early genetic polymer might have been structurally different from contemporary RNA. This involves differences regarding the sugar configuration (e.g., pyranosyl RNA) or the presence of other nucleobases^{12, 13}. Selection pressure led in this scenario to the chemical evolution of RNA. Contemporary RNA molecules contain four canonical nucleosides (A, G, C, U), which establish the sequence information. In addition, >120 non-canonical nucleosides are present, which govern a diverse set of properties such as correct folding, e.g., to enable catalysis¹⁴. In fact, the genetic system of all known life is dependent on modified nucleosides. Many of these non-canonical nucleosides are found today in all three domains of life, which indicates that they were present early on during the development of life. For the ubiquitous non-canonical nucleosides we may assume that they were already formed as competitors in parallel with the canonical ones on the early Earth¹⁵. So far, however, a geochemical scenario that would allow for the parallel formation of canonical and non-canonical RNA building blocks by a continuous process is not known. All reported multistep chemical models so far rely on tightly controlled laboratory conditions and the isolation and purification of central reaction intermediates by sophisticated methods^{1, 16-19}.

Herein, we report a robust synthetic pathway, which is purely based on fluctuations of physicochemical parameters such as pH, concentration, and temperature, driven by wet-dry cycles. These fluctuations enable the direct enrichment or purification of all reaction intermediates that are directly used for the next synthetic steps. As such, a continuous synthesis is established. Our results show that RNA building blocks can indeed be formed in a prebiotically plausible geochemical environment without sophisticated isolation and purification procedures. The chemical scenario presented here supports the hypothesis that life may have originated in a hydrothermal milieu on land rather than in a deep sea environment. The key assembly step in our pathway is the formation of variously substituted 5-nitroso-pyrimidines (nitrosoPys) that can be converted into formamidopyrimidines (FaPys) in the presence of formic acid and elementary metals (Ni or Fe). When combined with ribose, the FaPy compounds react to give a set of purine nucleosides. This chemical pathway delivers not only the canonical purine nucleosides but concomitantly many of the ubiquitously present non-canonical relatives, suggesting their origin as prebiotic competitor nucleosides (A, ms²A, m²A, DA, G, m²G, m²₂G, m¹G). Since chemical evolution depended on those molecules that were available on early Earth, these non-canonical nucleosides may be considered to be molecular fossils, which maintained their essential life-supporting character until the present day.

Results

Selective crystallization of an organic salt. The chemical scenario that leads to a continuous synthesis of RNA building blocks by just fluctuations of physical parameters is shown in Figs. 1 and 2a. The scenario starts with an aqueous solution of malononitrile **1** and different amidinium salts **2a-d** (HCl or H₂SO₄ salts, 400 mM), both recognized prebiotic compounds¹⁸. In addition,

River landscape in a geothermal environment

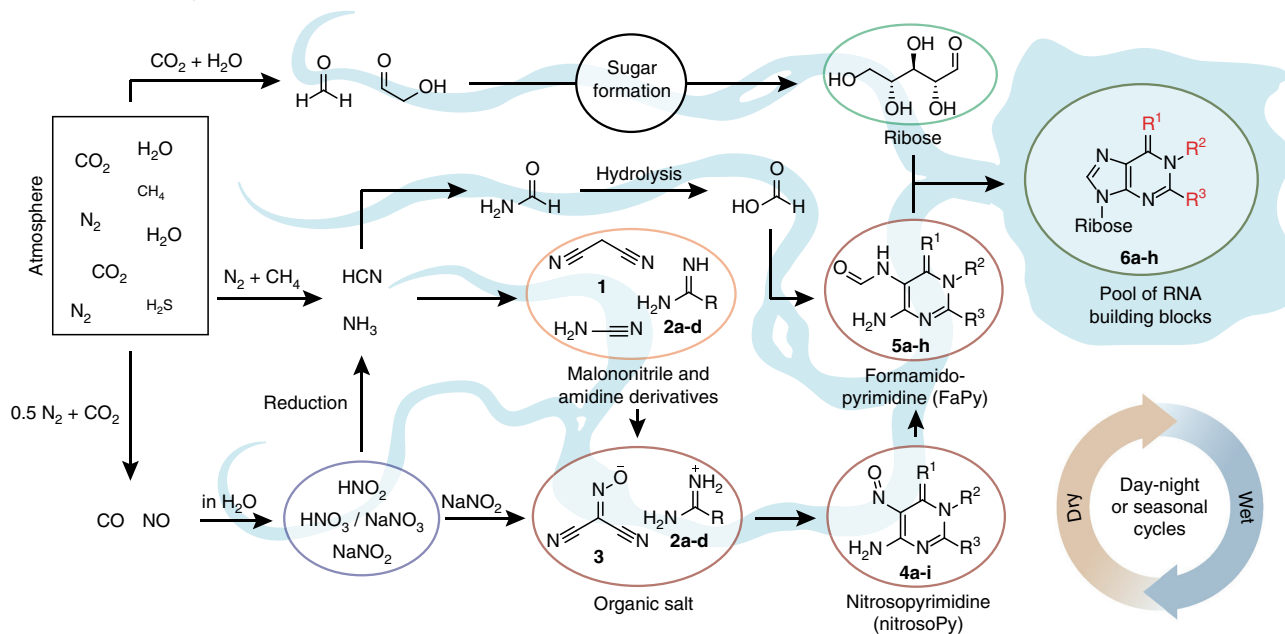


Fig. 1 RNA nucleoside formation pathway. A geothermal environment provides the right set up for the depicted transformations by establishing wet-dry cycles. The prebiotic starting materials are produced from a prebiotic atmosphere and washed into an aqueous environment (e.g. by rain). Major atmospheric components are written in larger letters, whereas minor components are written in smaller letters. Transformations are taking place in different environments, illustrated by various rivers (in light blue). Each environment provides the right setup for different chemistries, leading to several different chemical transformations. This geochemical setup leads to a set of canonical and non-canonical RNA building blocks by continuous synthesis (**6a**, m¹G: R¹ = O, R² = Me, R³ = NH₂; **6b**, ms²A: R¹ = NH, R² = H, R³ = SMe; **6c**, A: R¹ = NH, R² = H, R³ = H; **6d**, m²G: R¹ = O, R² = H, R³ = NHMe; **6e**, m²₂G: R¹ = O, R² = H, R³ = N(Me)₂; **6f**, G: R¹ = O, R² = H, R³ = NH₂; **6g**, DA: R¹ = NH, R² = H, R³ = NH₂; **6h**, m²A: R¹ = NH, R² = H, R³ = Me)

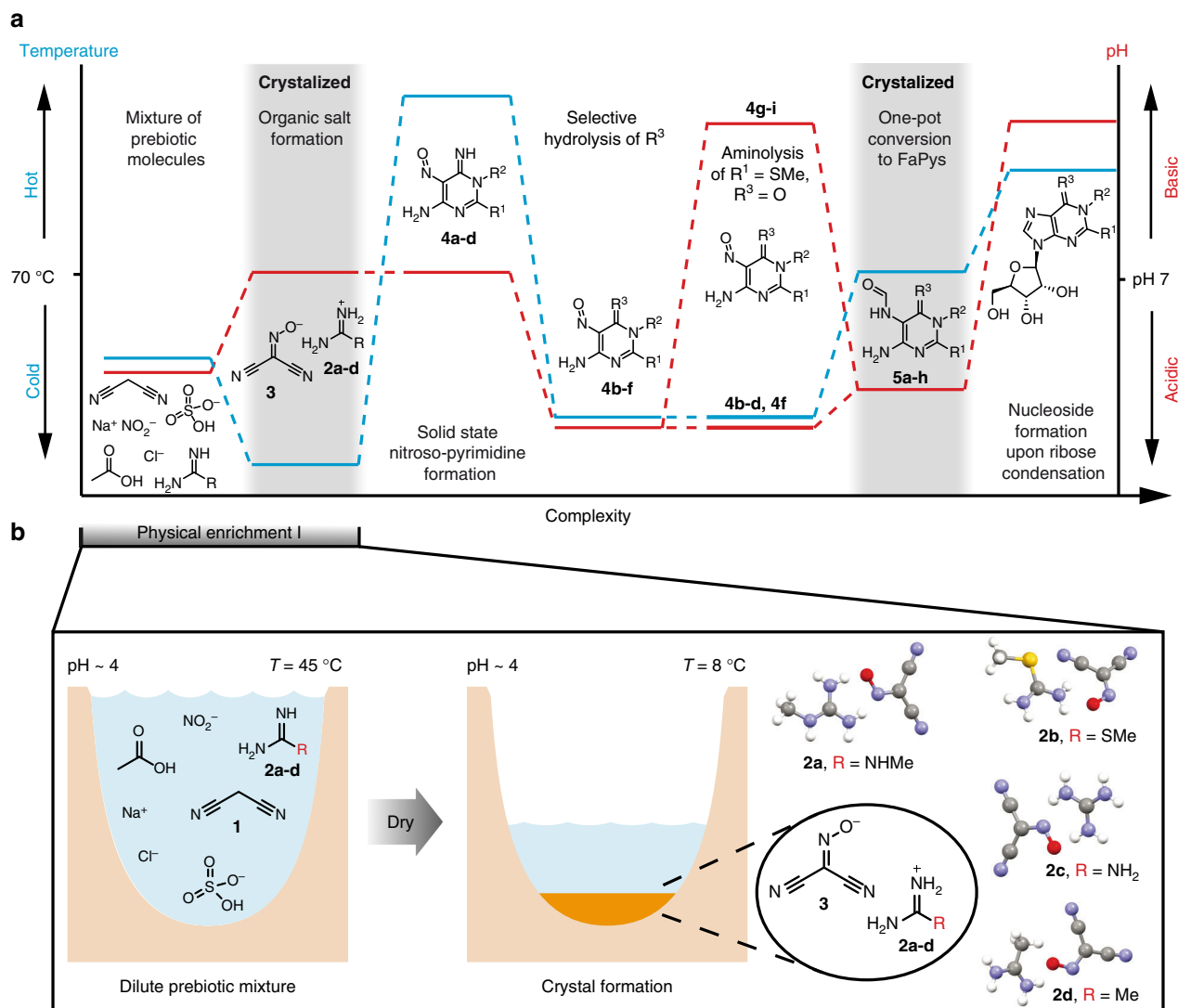


Fig. 2 Chemical complexity created by physical fluctuations. **a** Relative changes of temperature (in blue) and pH (in red) are shown for each synthetic step for the continuous synthesis of purine RNA building blocks from small organic and inorganic molecules. Several wet-dry cycles establish fluctuations of the depicted physical parameters that enable the physical enrichment of intermediates. Gray backgrounds denote compounds that are enriched by crystallization from an aqueous solution. **b** Formation of an organic salt consisting of amidine derivatives **2a-d** and (hydroxyimino)malononitrile **3**. The salt is selectively crystallized by concentrating a dilute mixture of organic and inorganic compounds by slow evaporation. The crystal structures of the four crystallized organic salts are depicted (Supplementary Tables 1-4)

sodium nitrite and acetic acid are present to establish a slightly acidic pH of around 4. Under these conditions the amidine molecules (**2a-d**) are protonated, which leads to their chemical deactivation. This allows selective nitrosation of malononitrile **1** to give (hydroxyimino)malononitrile **3** in situ. Slow evaporation of water under ambient conditions, followed by gentle cooling to 8–10 °C resulted in crystallization of a salt from the ca. 1 M amidinium solution. This crystallization is very robust and resembles naturally occurring concentration processes. The resultant crystals had excellent quality for X-ray analysis, which showed that the salts are formed from the amidinium cations **2a-d** and the (hydroxyimino)malononitrile anion of **3** (Fig. 2b). Interesting is the distance between the negatively charged oxygen in **3** and the positively charged H-bond donor centre of the amidinium units **2a-d**. We determined distances between 1.85–1.95 Å, which is long for a salt bridge but right in the regime for a typical hydrogen bond. This is important because it is supposedly the reason for the comparably low melting temperatures of the salts, which we determined between 110 and 160 °C.

The robustness and ease of crystallization establishes a first physical enrichment step that finishes the initial wet-dry phase with the deposition of these salt materials (Fig. 2b).

Nitroso-pyrimidine formation. When the obtained salts containing **2a-d** and **3** are subsequently heated to their respective melting temperatures, transformation into the corresponding nitroso-pyrimidines (**4a-d**, Fig. 3a) occurs. The required temperatures between 110 and 160 °C could have been readily accessible under early Earth conditions, due to, for example, volcanic activity in geothermal fields or sunlight shining on dark surfaces. In order to investigate whether the nitroso-compounds **4a-d** would form in parallel despite their varying structures and different melting points, the different salts were combined in a reaction flask and a temperature gradient (1 °C/5 min, from 100–160 °C) was applied to simulate soil that would slowly heat up. Subsequent ¹H-NMR analysis indicated successful formation of the anticipated nitroso-pyrimidines **4a-d** (Supplementary Fig. 1).

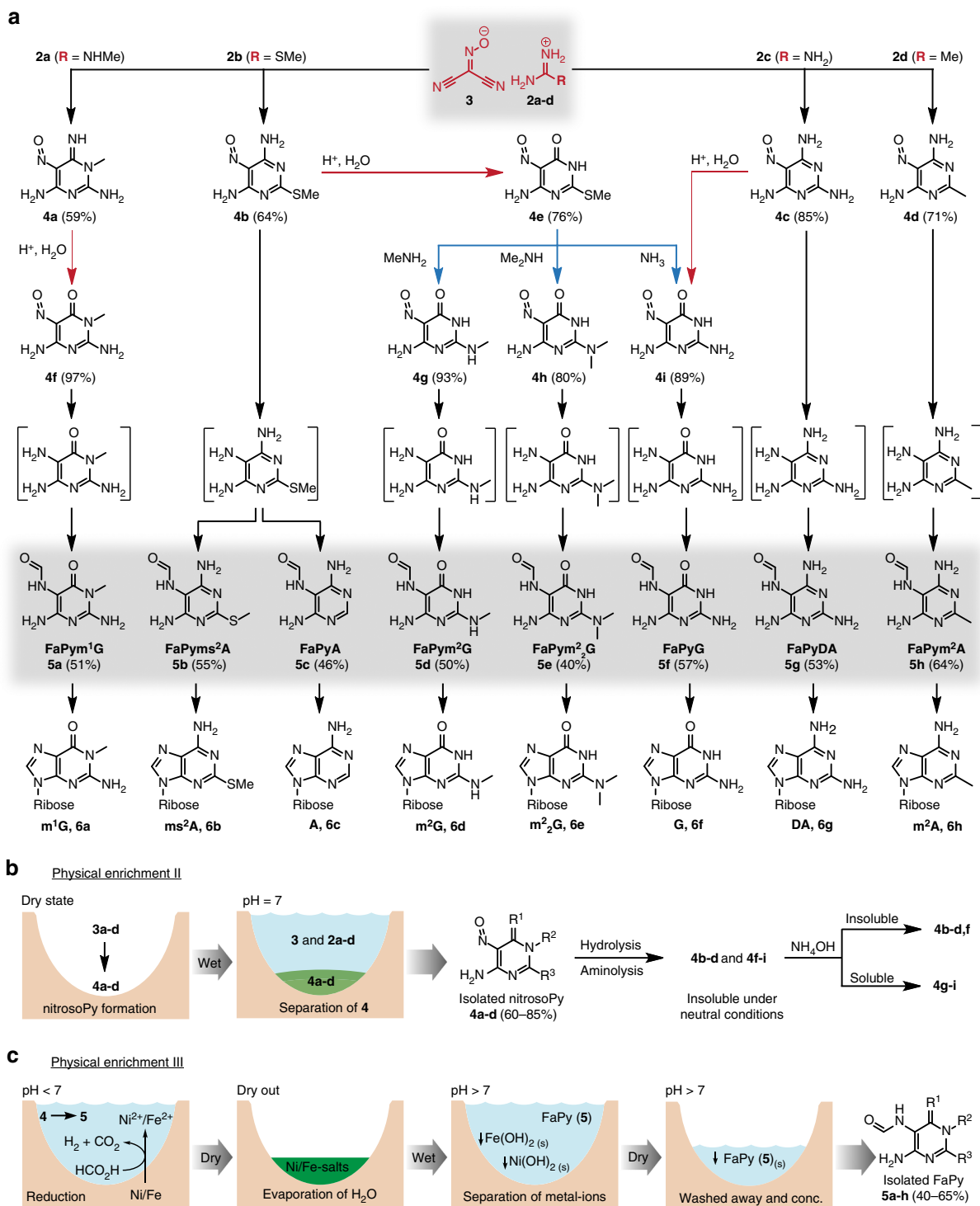


Fig. 3 Reaction scheme and physical enrichment of intermediates. **a** Dry-state reactions of salts containing **2a-d** and **3** provide nitroso-pyrimidines **4a-d**, which can be further diversified by hydrolysis (red arrows) or aminolysis (blue arrows) to give a set of nitroso-pyrimidines (nitrosoPys) **4a-i**. In the presence of elementary Fe and Ni and dilute formic acid, formation of the formamidopyrimidines (FaPys) **5a-h** as direct purine base precursors takes place. In square brackets: non-isolated reaction intermediates. **b** Second physical enrichment of the nitroso-pyrimidines isolated in high purity and yield. **c** Third physical enrichment of the formed FaPys **5a-h** as nucleoside precursors from nitroso-pyrimidines

The resultant nitroso-pyrimidines are stable compounds with melting points typically $>250\text{ }^{\circ}\text{C}$ without decomposition. In addition we noted that the nitroso-pyrimidines are rather insoluble in water, which offers the possibility for a second physical enrichment step. Addition of water to the reaction mixture dissolves unreacted starting materials, leaving the

nitroso-pyrimidines in basically NMR-pure form behind (Supplementary Fig. 2). In this model, one wet-dry cycle and two physical enrichment steps with a final rain shower or flooding would be sufficient to deposit a mixture of stable nitroso-pyrimidines (**4a-d**) in excellent purities and good chemical yields between 60 and 85% (Fig. 3a).

Diversification by hydrolysis and aminolysis. Depending on the composition and pH of the aqueous environment, which may or may not contain different amines, the nitroso-pyrimidines could undergo further hydrolysis and aminolysis reactions (Fig. 3a). Because these reactions are very slow under neutral conditions, we used dilute HCl to accelerate the processes for investigation. Importantly, we noted a high regioselectivity. Upon treatment overnight at room temperature with 0.5 M HCl, compounds **4a** and **4c** for example are hydrolyzed to afford the oxo-nitroso-pyrimidines **4f** and **4i** in near quantitative yields. Hydrolysis of **4b** to product **4e** was comparatively slower, and under our accelerated conditions a mixture of **4b** and **4e** was obtained. This inefficient conversion would be advantageous in a prebiotic context given that from **4b** the canonical nucleoside adenosine (A) and its 2-thiomethyl derivative (*ms*²A) are derived later, whereas **4e** gives rise to guanosine derivatives (G, *m*²G, *m*²₂G, Fig. 3a). This allows for the simultaneous formation of canonical and non-canonical bases from the same precursor. In contrast to the 2-amino (**4a,c**) or 2-methyl (**4d**) substituted nitroso-pyrimidines, we noted that the 2-thiomethyl functionality in **4b** and **4e** was prone to undergo selective nucleophilic substitution. Reaction of **4e** with different amines leads to efficient formation of the nitroso-pyrimidines **4g-i** with the concomitant release of methanethiol. Due to its insolubility under basic conditions, nucleophilic substitutions of **4b** are very inefficient. To confirm this, we partially hydrolyzed **4b** to **4e** in the presence of methylamine (300 mM) and dimethylamine (100 mM). The pH was carefully adjusted with Na₂CO₃ to about pH 10. Compound **4b** precipitated, while **4e** stayed in solution, consequently protecting **4b** from further reactions. It is in this context interesting that nucleosides that would form via aminolysis of **4b** have not yet been found in nature. In contrast, **4e** reacts efficiently and after 3–4 days at room temperature **4e** is almost completely converted into **4g** and **4h**, which are direct precursors to the ubiquitous non-canonical RNA bases *m*²G and *m*²₂G (Fig. 3a, Supplementary Fig. 3).

Thus, a few simple chemoselective and regioselective hydrolysis and aminolysis reactions affords a diverse mixture of differently substituted nitroso-pyrimidines (**4b-d**, **f-i**), all of which possess the right substitution pattern for the synthesis of naturally occurring canonical and non-canonical RNA nucleosides. Because all the formed nitroso-pyrimidines are poorly soluble in water at neutral pH, neutralizing the solutions leads to their efficient precipitation, providing a naturally occurring purification step (Fig. 3b). Importantly, all nitroso-pyrimidines that later give adenosine-derived nucleosides (**4b-d**) are soluble in water under acidic conditions, while the nitroso-compounds that are converted into guanosine-derived nucleosides (**4g-i**, except for **4f**) are soluble under basic pH conditions. These properties allow for potentially divergent chemical pathways leading to A-derived and G-derived nucleosides (Fig. 3b, Supplementary Fig. 4).

Formamidopyrimidine formation as nucleobase precursor. The next wet–dry cycles allow for the formation and isolation of formamidopyrimidines (FaPys) **5a-h**, from nitroso-pyrimidines **4** that are after their precipitation exposed to acidic conditions like dilute formic acid in the presence of elementary Fe or Ni, which are components of the Earth's crust. This leads to reduction of the nitroso-pyrimidines **4** to aminopyrimidines as non-isolated reaction intermediates (Fig. 3a, in square brackets), which are immediately formylated to give the water soluble formamidopyrimidines (FaPys) **5a-h** in a one-pot reaction. During the wet phase, Ni⁰ and Fe⁰ are converted into the biologically relevant Ni²⁺/Fe²⁺ ions, while formic acid decomposes into CO₂ and H₂ (Fig. 3c). In the reaction formic acid has a dual function. It provides the H-atoms needed for the reduction and it

subsequently reacts with the formed aminopyrimidines to give FaPy compounds that were already shown to be prebiotically valid precursors to purine nucleosides¹⁸. The Ni/Fe/formic acid environment converts quantitatively all nitroso-compounds **4b-d**, **f-i** into the corresponding FaPy compounds **5a-h** (Fig. 3a). The water soluble FaPy compounds (under dilute basic conditions) can now be separated from unreacted Ni⁰/Fe⁰ and from the formed Ni²⁺/Fe²⁺ byproducts. Under slightly basic conditions (pH ≈ 9–10) the latter compounds precipitate as insoluble carbonate or hydroxide salts. The FaPys **5a-h** are thus washed away, while the transition metal compounds sediment out. Final evaporation of water concentrates the reaction mixture, leading to the crystallization of the FaPy molecules. This third physical enrichment step, involving a wet–dry cycle, leads to the NMR-clean formation of FaPy-derivatives **5a-h** (Fig. 3c).

The 2-(methylthio)-5-nitrosopyrimidine-4,6-diamine (**4b**) gives after treatment with formic acid and elementary Ni two different FaPy products depending on the reaction conditions. One of the products (**5b**) contains a thiomethyl group, while the other (**5c**) is desulfurated. The desulfurization reaction is simply controlled by time and can be promoted when H₂ is bubbled through the solution prior to reaction. Compound **5c** is always generated in a stepwise reaction cascade via compound **5b** which was confirmed by reacting **4b** for 2 h and isolating the only product formed (**5b**, Fig. 3c). The isolated product was immediately subjected to the same conditions, which provided **5c** after 7 days in pure form. This pathway via nitroso-pyrimidines thus affords **5c**, the precursor for the canonical base A under plausible prebiotic conditions²⁰. These conditions also lead to the parallel formation of the precursor to the ubiquitous 2-thiomethyl modification (*ms*²A), which is today found in all three domains of life.

Formation of canonical and non-canonical nucleosides. All of the prepared FaPy compounds undergo rapid and regioselective condensations with ribose when they are present in the same dry-state environment (Fig. 4). We do not assume that ribose was formed at the same location together with the FaPy compounds since the required carbohydrate chemistry may be incompatible. Several models are available, however, that show ribose formation in different physical environments^{21–24}. Even though ribose and FaPys might have formed separately, the water solubility of the FaPys and of ribose allows them to be washed into the same environment by rain or flooding. Evaporation of water in the last wet–dry cycle would enable a condensation reaction under dry-state conditions. Indeed, the physically enriched FaPy compounds (**5a-h**) engage in a rapid reaction with ribose to give the corresponding FaPy-ribosides. Upon dissolution in water and subsequent heating under basic conditions, all four expected purine α/β -ribofuranosides (α/β -f) and α/β -pyranosides (α/β -p) are obtained (**6a-h**, Fig. 4a), completing the last wet–dry cycle. The LC-MS traces of the reactions using both UV- and MS-detection are shown in Fig. 4b. To ensure correct structural assignment we chemically synthesized some of the expected products and performed co-injection studies (Supplementary Methods). These experiments show that the major isomers are the naturally occurring β -configured pyranosides and furanosides. Pyranosides are building blocks for pyranosyl-RNA, which was suggested to be a potential RNA predecessor¹². Therefore, our scenario delivers the building blocks for this pre-RNA and for RNA. As such it provides the basis for the chemical transition from one genetic polymer to the other directed by selection pressure. Importantly, our continuous synthetic pathway provides next to the canonical bases A and G also the non-canonical β -furanosyl-nucleosides (β -f) *m*²G, *m*₂G, *m*¹G, *ms*²A and *m*²A (in red, Fig. 4b), arguing

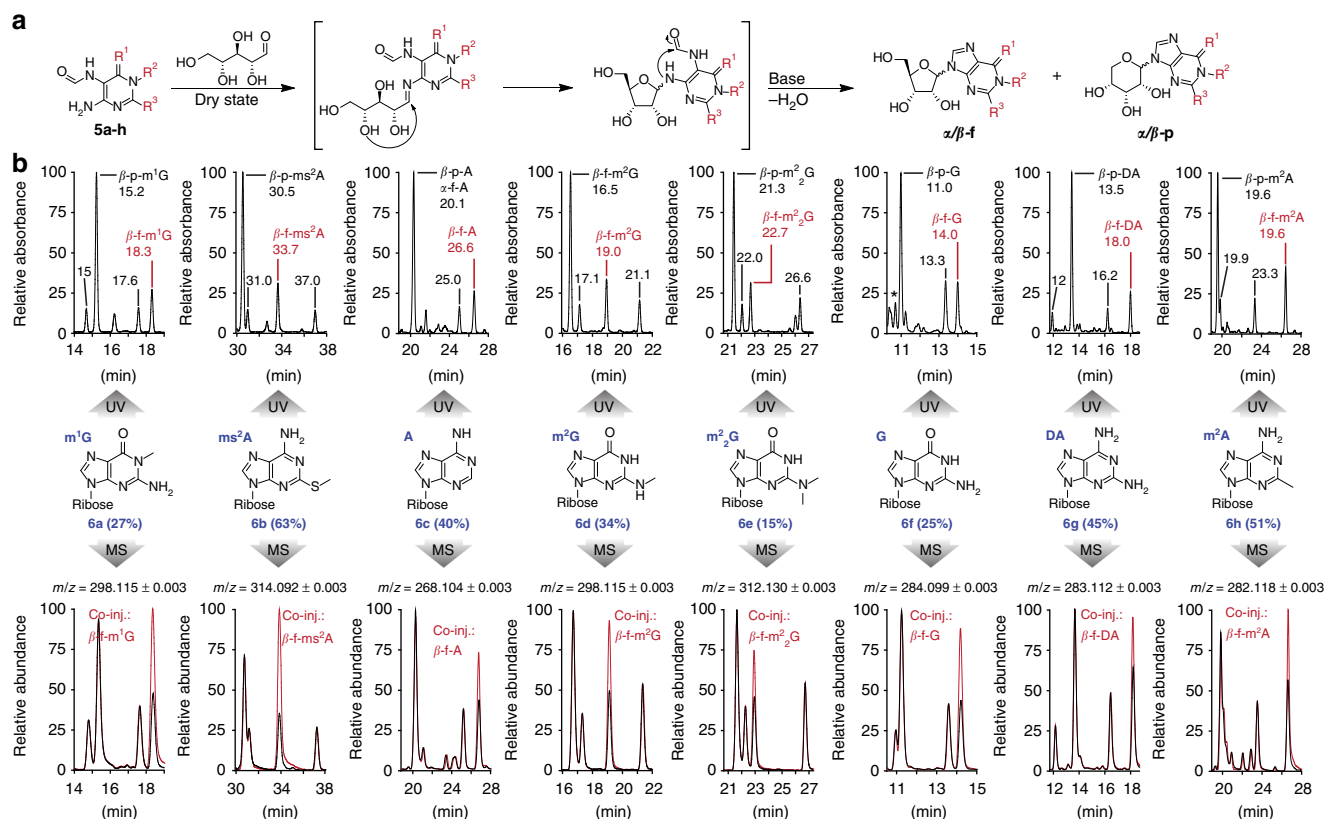


Fig. 4 Formation of RNA nucleosides from nucleobase precursors. **a** Reaction mechanism for the formation of canonical and non-canonical RNA nucleosides **6a-h** from formamidopyrimidines (FaPys) **5a-h** and ribose. The reaction provides the four expected isomers α/β -ribofuranosides (α/β -f) and α/β -ribofuranosides (α/β -p). **b** LC-MS analysis of the reaction products from **5a-h** and ribose. Compounds identified by MS detection are labeled (β -p or α/β -f). The UV- and MS-chromatograms show all four expected isomers for each compound (labeled with the retention time or asterisk (*) in the UV-chromatogram). The structural assignment was assisted by co-injection (Co-inj.) studies. The MS traces show in red the co-injection signal obtained with the naturally occurring isomer (β -f)

that the early RNA polymer was structurally already more complex regarding the nucleobases. The ribosylation of the FaPys leading to non-canonical nucleosides is equally efficient to the formation of A and G, with yields between 15 and 60%. Interestingly, we noted that for some A derivatives (m^2 A, DA and A) other regioisomers were found as well. These isomers were not formed when pure FaPy starting materials were used that were not derived from our continuous synthesis. We believe that these isomers might be the N3-connected nucleosides, previously proposed by Wächtershäuser for homo-purine RNA²⁵. Despite the presence of these side products, we observe efficient N9-nucleoside formation with remarkable yields of up to 60% for the canonical and the non-canonical nucleosides. This work demonstrates that the non-canonical compounds could plausibly have formed as companion and potential competitor compounds in parallel to the canonical nucleosides.

Discussion

Life on earth certainly did not start in a chemists' laboratory, where the relevant compounds are assembled in a step-by-step process from pure starting materials under tightly controlled conditions. Even if the individual reaction steps are performed under plausibly prebiotic conditions, the controlled assembly over many steps with sophisticated isolation and purification procedures of reaction intermediates is an unlikely scenario for chemical synthesis under early Earth conditions. For the process of chemical evolution on the early Earth, we may rather envision a

more continuous synthesis, in which small organic molecules, initially formed by volcanic action or lightning, reacted to give increasingly more complex structures (Fig. 1). Here, chemical transformations may have been driven by physical fluctuations, established for example by day-night, seasonal or wet-dry cycles. Such fluctuating parameters might include temperature, concentration, and pH, which have triggered selective precipitation and crystallization to purify and concentrate reaction intermediates (Fig. 2a).

Regarding the central nucleoside building blocks of life, we believe that the four canonical nucleosides were finally selected from a more diverse prebiotic nucleoside pool. These canonical bases today establish the sequence information. The synthesis of the canonical purine (A, G)¹⁸ and pyrimidine (U, C)¹⁶ RNA building blocks has been previously demonstrated in aqueous environments. It is questionable, however, if these multistep synthesis pathways are able to provide all four canonical bases at the same time, which fuels the development of new prebiotically plausible nucleoside formation reactions^{17, 26, 27}. Recently, all four canonical nucleosides (A, G, U, C) were accessed in low yields via a one-pot procedure from pure formamide²⁸. However, in order to establish a functional genetic system a number of non-canonical nucleosides is required as well that provide other functions related to folding and catalysis²⁹⁻³⁴. Since many of these non-canonical bases are present in all three domains of life, it is likely that they have been early on part of the abiotic chemical selection process¹⁵. We report here the discovery of a continuous synthesis pathway that enables the efficient production of

canonical and non-canonical purine bases in parallel. Our data show that formation of the many nucleosides needed to establish a functional genetic system is in fact an unavoidable event if we assume the presence of simple starting materials such as formic acid, acetic acid, sodium nitrite, malononitrile (**1**), amidinium compounds (**2a-d**), as well as transition metals like Ni or Fe. These simple compounds react in several successive wet-dry phases, leading to physical enrichment (I, II, and III) of reaction intermediates to finally give RNA building blocks. Wet-dry cycles have already been shown to be a plausible geological scenario especially for polymerization reactions^{35, 36}. Our reported chemical scenario shows now that such a geological setup can also result in a diverse set of purine nucleosides by continuous synthesis (**6a-h**, Fig. 4). These nucleosides can be converted into the phosphorylated nucleotides based on recent advances in prebiotic phosphorylation reactions^{37, 38}. So far, however, we are not yet able to include this step into our continuous synthesis.

Importantly, all here-reported non-canonical bases are known to exist in the three domains of life. Many are postulated components of the early genetic system of the last universal common ancestor (LUCA), suggesting that they were indeed present already at the onset of biological evolution^{39, 40}. Based on the continuous synthesis pathway reported here, we hypothesize that the canonical and at least these non-canonical nucleosides could have formed side by side, dating the formation of the first non-canonical nucleosides back to the origin of chemical evolution around 4 billion years ago. As such, they could have been part of the chemical evolution process that established the putative RNA world⁴¹. Our chemistry invokes that methylated and thiomethylated nucleosides could particularly have been integral components of the first instructional (pre)-RNA molecules, likely to stabilize folded structures in order to accelerate catalytic processes^{29–34}. We therefore propose that these nucleosides could be vestiges and molecular fossils of an early Earth, as it was suggested for cofactors⁴².

Methods

1-methylguanidine (2a) salt of (hydroxyimino)malononitrile (3). 1-methylguanidine (**2a**) hydrochloride salt (10.95 g, 100 mmol, 1 eq.) and malononitrile (**1**) (6.65 g, 100 mmol, 1 eq.) was dissolved in H₂O (230 mL, containing 6 mL of AcOH) in a 500 mL beaker. A solution of NaNO₂ (7.00 g, 101 mmol, 1.01 eq., in 20 mL of H₂O) was slowly added at room temperature. After stirring at room temperature for 2 h the reaction mixture was kept at 45 °C in an oil bath for 3–4 days open to the air until the mixture was concentrated to about 100 mL. The reaction mixture was placed in a fridge overnight at 8–10 °C. The formed yellow crystals were filtered off to give the desired product (6.70 g, 40 mmol, 40%).

Mp.: 108 °C. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 7.23 (br m, 5H), 2.72 (s, 3H). ¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 157.85, 119.50, 113.31, 107.18, 28.23. IR (cm⁻¹): 3405 (m), 3351 (br, m), 3197 (m), 2977 (br, m), 2229 (s), 2218 (s) 1675 (s), 1635 (s), 1465 (w) 1428 (m), 1344 (s), 1269 (s) 1226 (s), 1172 (w), 1098 (m), 915 (m), 765 (m).

Methylthioamidine (2b) salt of (hydroxyimino)malononitrile (3). S-Methylthioiourea (**2b**) hemisulfate salt (27.8 g, 200 mmol, 1 eq.) and malononitrile (**1**) (13.3 g, 200 mmol, 1 eq.) was dissolved in H₂O (460 mL, containing 12 mL of AcOH) in a 600 mL beaker. A solution of NaNO₂ (14.0 g, 202 mmol, 1.01 eq., in 40 mL of H₂O) was slowly added at room temperature. After stirring at room temperature for 2 h the reaction mixture was kept at 45 °C in an oil bath for 3–4 days open to the air until the mixture was concentrated to about 200 mL. The reaction mixture was placed in a fridge overnight at 8–10 °C. The formed yellow crystals were filtered off to give the desired product (16.7 g, 90 mmol, 45%).

Mp.: 126 °C. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.90 (s, 4H), 2.56 (s, 3H). ¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 171.62, 119.46, 113.29, 107.17, 13.71. IR (cm⁻¹): 3282(m), 3146 (br, m), 2742 (br, w), 2530 (w), 2222 (s), 2213 (s) 1698 (m), 1663 (s), 1643 (s) 1549 (m), 1450 (m), 1424 (s) 1375 (w), 1335 (s), 1269 (s), 1223 (s), 1180 (w), 1099 (m), 1076 (w), 982 (m), 970 (w), 960 (w), 897 (br, m), 801 (m), 736 (m).

Guanidine (2c) salt of (hydroxyimino)malononitrile (3). Guanidine (**2c**) hydrochloride salt (9.55 g, 100 mmol, 1 eq.) and malononitrile (**1**) (6.65 g, 100 mmol, 1 eq.) was dissolved in H₂O (230 mL, containing 6 mL of AcOH) in a 500 mL beaker. A solution of NaNO₂ (7.00 g, 101 mmol, 1.01 eq., in 20 mL of H₂O) was

slowly added at room temperature. After stirring at room temperature for 2 h the reaction mixture was kept at 45 °C in an oil bath for 3–4 days open to the air until the mixture was concentrated to about 100 mL. The reaction mixture was placed in a fridge overnight at 8–10 °C. The formed yellow crystals were filtered off to give the desired product (8.20 g, 53 mmol, 53%).

Mp.: 159 °C. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 6.91 (s, 6H). ¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 158.32, 119.52, 113.32, 107.18. IR (cm⁻¹): 3473 (m), 3373 (m), 3172 (w), 3087 (w), 2815 (br, w), 2223 (s), 2217 (s), 1668 (m), 1641 (s), 1578 (w), 1552 (w), 1369 (w), 1343 (s), 1294 (w), 1264 (s), 1220 (s), 1140 (w), 975 (w), 792 (w), 757 (w).

Acetamidine (2d) salt of (hydroxyimino)malononitrile (3). Acetamidine (**2d**) hydrochloride salt (9.45 g, 100 mmol, 1 eq.) and malononitrile (**1**) (6.65 g, 100 mmol, 1 eq.) was dissolved in H₂O (230 mL, containing 6 mL of AcOH) in a 500 mL beaker. A solution of NaNO₂ (7.00 g, 101 mmol, 1.01 eq., in 20 mL of H₂O) was slowly added at room temperature. After stirring at room temperature for 2 h the reaction mixture was kept at 45 °C in an oil bath for 3–4 days open to the air until the mixture was concentrated to about 100 mL. The reaction mixture was placed in a fridge overnight at 8–10 °C. The formed yellow crystals were filtered off to give the desired product (8.80 g, 60 mmol, 60%).

Mp.: 142 °C. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 8.60 (s, 4H), 2.11 (s, 3H). ¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 168.11, 119.50, 113.31, 107.18, 18.72. IR (cm⁻¹): 3282 (m), 3140 (br, m), 2781 (m), 2395 (w), 2236 (s), 2217 (s) 1708 (s), 1661 (s), 1592 (br, w) 1513 (m), 1373 (s), 1351 (s) 1259 (s), 1200 (s), 1191 (s), 1160 (w), 1125 (m), 969 (w), 907 (w), 883 (w), 857 (w), 790 (s), 691 (s), 684 (s).

Synthesis of nitrosopyrimidine 4a-d from salts containing 2a-d and 3. The reaction time of the following procedures for the formation of **4a-d** depend on the crystal size of the organic salts and the heating source. Usually conversions were done in a beaker open to the air in an oil bath to simulate hot soil. Large crystals sometimes already convert into nitroso-pyrimidines by a solid-state reaction without melting. Then much longer reaction times of up to 7 days are required because of unequally distributed temperature. Alternatively, the organic salt can be converted by heating in an oven where temperature is equally distributed within the sample.

6-imino-1-methyl-5-nitroso-1,6-dihydropyrimidine-2,4-diamine (4a). 1-methylguanidine (**2a**) salt of (hydroxyimino)malononitrile (**3**) (5.00 g, 29.5 mmol, 1 eq.) was heated slowly to its melting temperature of 108 °C and kept overnight. The compound melts suddenly but becomes a dark red solid again after leaving it overnight. The quantitative reaction mixture can be directly used for the next step without purification.

For analytical reasons a small batch of 1-methylguanidine (**2a**) salt of (hydroxyimino)malononitrile (**3**) (100 mg, 0.59 mmol, 1 eq.) was reacted as described above. The reaction mixture was suspended well in water (2–3 mL) and the dark red solid was filtered off to give 6-imino-1-methyl-5-nitroso-1,6-dihydropyrimidine-2,4-diamine (59 mg, 0.35 mmol, 59%).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 11.44 (s, 1H), 8.41 (s, 1H), 8.08 (br, 1H), 7.67 (br, 1H), 7.49 (s, 1H), 3.26 (s, 3H). ¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 165.44, 157.64, 146.95, 137.22, 27.64. HRMS (ESI+): calc. for [C₅H₉N₆O]⁺ 169.0832, found: 169.0832 [M + H]⁺

2-(methylthio)-5-nitrosopyrimidine-4,6-diamine (4b). Methylthioamidine (**2b**) salt of (hydroxyimino)malononitrile (**3**) (5.00 g, 27 mmol, 1 eq.) was heated slowly to its melting temperature of 126 °C and kept overnight. Caution: if the product is heated too quickly above the melting temperature it decomposes with the release of MeSH! The compound melts suddenly but becomes a dark green solid again. The quantitative reaction mixture can be directly used for the next step without purification.

For analytical reasons a small batch of methylthioamidine (**2b**) salt of (hydroxyimino)malononitrile (**3**) (100 mg, 0.54 mmol, 1 eq.) was reacted as described above. The reaction mixture was suspended in water (2–3 mL) and the dark green solid was filtered off to give 2-(methylthio)-5-nitrosopyrimidine-4,6-diamine (64 mg, 0.35 mmol, 64%).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.18 (d, J = 4.2 Hz, 1H), 9.00 (s, 1H), 8.42 (d, J = 4.2 Hz, 1H), 8.02 (s, 1H), 2.46 (s, 3H). ¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 179.05, 164.73, 146.22, 139.43, 14.08. HRMS (ESI+): calc. for [C₅H₈N₅OS]⁺ 186.0444, found: 186.0444 [M + H]⁺

5-nitrosopyrimidine-2,4,6-triamine (4c). Guanidine (**2c**) salt of (hydroxyimino)malononitrile (**3**) (5.00 g, 32 mmol, 1 eq.) was heated slowly to its melting temperature of 159 °C and kept overnight. The compound melts suddenly but becomes a red/pinkish solid again after leaving it overnight. The quantitative reaction mixture can be directly used for the next step without purification.

For analytical reasons a small batch of guanidine (**2c**) salt of (hydroxyimino)malononitrile (**3**) (100 mg, 0.65 mmol, 1 eq.) was reacted as described above. The reaction mixture was suspended in water (2–3 mL) and the solid was filtered off to give NMR clean 5-nitrosopyrimidine-2,4,6-triamine (85 mg, 0.55 mmol, 85%).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 10.26 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H), 8.15 (s, 1H), 7.75 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H), 7.35 (s, 1H), 7.19 (s, 2H). ¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 166.52, 165.32, 151.43, 138.04. HRMS (ESI+): calc. for [C₄H₇N₆O]⁺ 155.0676, found: 155.0676 [M + H]⁺

2-methyl-5-nitrosopyrimidine-4,6-diamine (4d). Acetamidine (2d) salt of (hydroxyimino)malononitrile (3) (5.00 g, 32.5 mmol, 1 eq.) was heated slowly to its melting temperature of 142 °C and kept overnight. The compound melts suddenly but becomes a red/pinkish solid again after leaving it overnight. The quantitative reaction mixture can be directly used for the next step without purification.

For analytical reasons a small batch of acetamidine (2d) salt of (hydroxyimino)malononitrile (3) (100 mg, 0.65 mmol, 1 eq.) was reacted as described above. After suspension in H₂O (2–3 mL) the solid is filtered off to give NMR clean 2-methyl-5-nitrosopyrimidine-4,6-diamine (71 mg, 0.46 mmol, 71%).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 10.04 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 8.97 (s, 1H), 8.36 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 7.96 (s, 1H), 2.20 (s, 3H). ¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 175.20, 166.38, 146.76, 139.94, 26.83. HRMS (ESI-): calc. for [C₅H₆N₅O]⁻ 152.0578, found: 152.0578 [M-H]⁻

Data availability. All data generated or analyzed during this study are presented in this article and its Supplementary Information File, or are available from the corresponding author upon reasonable request. X-ray crystallographic data were also deposited at the Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC) under the following CCDC deposition numbers: 1574226 for 1-methylguanidine (2a) salt of (hydroxyimino)malononitrile (3); 1574223 for methylthioamidine (2b) salt of (hydroxyimino)malononitrile (3); 1574225 for guanidine (2c) salt of (hydroxyimino)malononitrile (3); 1574224 for acetamidine (2d) salt of (hydroxyimino)malononitrile (3). These can be obtained free of charge from CCDC via www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif.

Received: 10 October 2017 Accepted: 14 December 2017

Published online: 11 January 2018

References

- Benner, S. A., Kim, H.-J. & Carrigan, M. A. Asphalt, water, and the prebiotic synthesis of ribose, ribonucleosides, and RNA. *Acc. Chem. Res.* **45**, 2025–2034 (2012).
- Budin, I. & Szostak, J. W. Expanding roles for diverse physical phenomena during the origin of life. *Annu. Rev. Biophys.* **39**, 245–263 (2010).
- Pace, N. R. Origin of life-facing up to the physical setting. *Cell* **65**, 531–533 (1991).
- Mulkidjanian, A. Y., Bychkov, A. Y., Dibrova, D. V., Galperin, M. Y. & Koonin, E. V. Origin of first cells at terrestrial, anoxic geothermal fields. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, E821–E830 (2012).
- Djokic, T., Van Kranendonk, M. J., Campbell, K. A., Walter, M. R. & Ward, C. R. Earliest signs of life on land preserved in ca. 3.5 Ga hot spring deposits. *Nat. Commun.* **8**, 15263 (2017).
- Damer, B. & Deamer, D. Coupled phases and combinatorial selection in fluctuating hydrothermal pools: a scenario to guide experimental approaches to the origin of cellular life. *Life* **5**, 872 (2015).
- Deamer, D., Singaram, S., Rajamani, S., Kompanichenko, V. & Guggenheim, S. Self-assembly processes in the prebiotic environment. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **361**, 1809–1818 (2006).
- Deamer, D., Van Kranendonk, M. & Djokic, T. The new origins of life. *Sci. Am.* **317**, 30–35 (2017).
- Higgs, P. G. & Lehman, N. The RNA World: molecular cooperation at the origins of life. *Nat. Rev. Genet.* **16**, 7–17 (2015).
- Wachowius, F., Attwater, J. & Holliger, P. Nucleic acids: function and potential for abiogenesis. *Q. Rev. Biophys.* **50**, e4 (2017).
- Robertson, M. P. & Joyce, G. F. The Origins of the RNA World. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**, a003608 (2010).
- Joyce, G. F. The antiquity of RNA-based evolution. *Nature* **418**, 214–221 (2002).
- Cafferty, B. J., Fialho, D. M., Khanam, J., Krishnamurthy, R. & Hud, N. V. Spontaneous formation and base pairing of plausible prebiotic nucleotides in water. *Nat. Commun.* **7**, 11328 (2016).
- Carell, T. et al. Structure and function of noncanonical nucleobases. *Angew. Chem. Int. Ed.* **51**, 7110–7131 (2012).
- Rios, A. C. & Tor, Y. On the origin of the canonical nucleobases: an assessment of selection pressures across chemical and early biological evolution. *Isr. J. Chem.* **53**, 469–483 (2013).
- Powner, M. W., Gerland, B. & Sutherland, J. D. Synthesis of activated pyrimidine ribonucleotides in prebiotically plausible conditions. *Nature* **459**, 239–242 (2009).
- Stairs, S. et al. Divergent prebiotic synthesis of pyrimidine and 8-oxo-purine ribonucleotides. *Nat. Commun.* **8**, 15270 (2017).
- Becker, S. et al. A high-yielding, strictly regioselective prebiotic purine nucleoside formation pathway. *Science* **352**, 833–836 (2016).

- Patel, B. H., Percivalle, C., Ritson, D. J., Duffy, C. D. & Sutherland, J. D. Common origins of RNA, protein and lipid precursors in a cyanosulfidic prometabolism. *Nat. Chem.* **7**, 301–307 (2015).
- Fiore, M. & Strazewski, P. Bringing prebiotic nucleosides and nucleotides down to earth. *Angew. Chem. Int. Ed.* **55**, 13930–13933 (2016).
- Kim, H.-J. et al. Synthesis of carbohydrates in mineral-guided prebiotic cycles. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 9457–9468 (2011).
- Kofoed, J., Reymond, J.-L. & Darbre, T. Prebiotic carbohydrate synthesis: zinc-proline catalyzes direct aqueous aldol reactions of α-hydroxy aldehydes and ketones. *Org. Biomol. Chem.* **3**, 1850–1855 (2005).
- Harsch, G., Bauer, H. & Voelter, W. Kinetik, katalyse und mechanismus der sekundärreaktion in der schlupphase der formose-reaktion. *Liebigs Ann.* **1984**, 623–635 (1984).
- Meinert, C. et al. Ribose and related sugars from ultraviolet irradiation of interstellar ice analogs. *Science* **352**, 208–212 (2016).
- Wächtershäuser, G. An all-purine precursor of nucleic acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 1134–1135 (1988).
- Kim, H.-J. & Benner, S. A. Prebiotic stereoselective synthesis of purine and noncanonical pyrimidine nucleotide from nucleobases and phosphorylated carbohydrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **114**, 11315–11320 (2017).
- Saladino, R. et al. Proton irradiation: a key to the challenge of N-glycosidic bond formation in a prebiotic context. *Sci. Rep.* **7**, 14709 (2017).
- Saladino, R. et al. Meteorite-catalyzed syntheses of nucleosides and of other prebiotic compounds from formamide under proton irradiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **112**, E2746–E2755 (2015).
- Björk, G. R. et al. A primordial tRNA modification required for the evolution of life? *EMBO J.* **20**, 231–239 (2001).
- Grosjean, H. *DNA and RNA Modification Enzymes: Structure, Mechanism, Function and Evolution* (Taylor & Francis, Boca Raton, FL, 2009).
- Engel, J. & von Hippel, P. H. Effects of methylation on the stability of nucleic acid conformations. *J. Biol. Chem.* **253**, 927–934 (1978).
- Decatur, W. A. & Fournier, M. J. rRNA modifications and ribosome function. *Trends Biochem. Sci.* **27**, 344–351 (2002).
- Motorin, Y. & Helm, M. tRNA stabilization by modified nucleotides. *Biochemistry* **49**, 4934–4944 (2010).
- Helm, M. Post-transcriptional nucleotide modification and alternative folding of RNA. *Nucleic Acids Res.* **34**, 721–733 (2006).
- Forsythe, J. G. et al. Ester-mediated amide bond formation driven by wet-dry cycles: a possible path to polypeptides on the prebiotic earth. *Angew. Chem. Int. Ed.* **54**, 9871–9875 (2015).
- Da Silva, L., Maurel, M.-C. & Deamer, D. Salt-promoted synthesis of RNA-like molecules in simulated hydrothermal conditions. *J. Mol. Evol.* **80**, 86–97 (2015).
- Burcar, B. et al. Darwin's warm little pond: a one-pot reaction for prebiotic phosphorylation and the mobilization of phosphate from minerals in a urea-based solvent. *Angew. Chem. Int. Ed.* **55**, 13249–13253 (2016).
- Kim, H.-J. et al. Evaporite borate-containing mineral ensembles make phosphate available and regiospecifically phosphorylate ribonucleosides: borate as a multifaceted problem solver in prebiotic chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed.* **55**, 15816–15820 (2016).
- Anantharaman, V., Koonin, E. V. & Aravind, L. Comparative genomics and evolution of proteins involved in RNA metabolism. *Nucleic Acids Res.* **30**, 1427–1464 (2002).
- Weiss, M. C. et al. The physiology and habitat of the last universal common ancestor. *Nat. Microbiol.* **1**, 16116 (2016).
- Orgel, L. E. Prebiotic chemistry and the origin of the RNA world. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **39**, 99–123 (2004).
- Jadhav, V. R. & Yarus, M. Coenzymes as coribozymes. *Biochimie* **84**, 877–888 (2002).

Acknowledgements

We thank the Deutsche Forschungsgemeinschaft for financial support through the research funding schemes SFB749, SFB1032, SPP1784, GRK2062, and the DFG Normalverfahrensprogramm CA275-11/1. We thank the European Union Horizon 2020 program for funding the ERC Advanced project EPIR (741912). Further we thank the excellence cluster CiPS-M. We thank Florian Steinmann for synthetic help, Dr Markus Müller for further discussions and Dr Peter Mayer for providing X-ray structures.

Author contributions

S.B. developed the chemistry for the nitrosopyrimidine route, helped designing the study, analyzed and interpreted results and helped writing the manuscript. C.S., H.O., A.C., T.A. and M.D. performed supportive chemistry. T.C. designed the study, supervised all work, interpreted data and wrote the manuscript.

Additional information

Supplementary Information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02639-1>.

Competing interests: The authors declare no competing financial interests.

Reprints and permission information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give

appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2018

3.2. Nicht-kanonische Nucleoside und die Chemie der Entstehung des Lebens

„*Non-canonical nucleosides and chemistry of the emergence of life*”

Sidney Becker*, Christina Schneider*, Antony Crisp, Thomas Carell *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 163.

* Beitrag der Autoren zu gleichen Teilen.

Prolog

Durch variierende Umweltparameter können kanonische und eine Vielzahl nicht-kanonischer Nucleoside unter Bedingungen erhalten werden, die auf der frühen Erde vorstellbar sind. Dies deutet darauf hin, dass Watson-Crick-Basenpaare aus einem vielfältigen Pool von Nucleosiden in einem vordarwinistischen chemischen Evolutionsprozess ausgewählt wurden. Im vorliegenden Kommentar werden Bedingungen diskutiert, die auf der frühen Erde wahrscheinlich geherrscht haben und unter welchen die Entstehung von Nucleosiden möglich war. Die präbiotische Bildung von Ribose- und der heterocyclischen Anteile der RNA erforderten unterschiedliche chemische Bedingungen. Daher muss davon ausgegangen werden, dass die frühe Erde Gebiete mit unterschiedlichen geologischen Bedingungen zur Verfügung stellte. Durch diese unterschiedlichen geologischen Bedingungen kann ein großes Spektrum an pH-Werten und Temperaturen erreicht werden, die die Entstehung der einzelnen Nucleosid-Bauteile förderte. Es erscheint plausibel, dass die RNA-Vorläufer separat gebildet wurden und sie durch Überschwemmungen oder ähnliche Phänomene zufällig zusammengeführt wurden.

Autorenbeitrag

Für diese Arbeit war ich zusammen mit *Sidney Becker* und *Antony Crisp* an der Erstellung des Manuskripts beteiligt.

Lizenz

Kopie der Publikation mit Erlaubnis des Verlags; Copyright 2018 Nature Publishing Group.

COMMENT

DOI: 10.1038/s41467-018-07222-w

OPEN

Non-canonical nucleosides and chemistry of the emergence of life

Sidney Becker¹, Christina Schneider ¹, Antony Crisp ¹ & Thomas Carell ¹

Prebiotic chemistry, driven by changing environmental parameters provides canonical and a multitude of non-canonical nucleosides. This suggests that Watson-Crick base pairs were selected from a diverse pool of nucleosides in a pre-Darwinian chemical evolution process.

Life and LUCA

Life is a highly diverse phenomenon that occupies all conceivable geological niches on Earth. Its development is explained by Darwinian evolution, which must have begun with rudimentary “living” vesicles that at some point transitioned into what we call the last universal common ancestor (LUCA)¹. LUCA is a hypothetical life form obtained from phylogenetic analysis from which all three kingdoms of life originated². To our understanding, LUCA already possessed the capacity to synthesize specific building blocks such as amino acids, nucleotides and lipids¹. While phylogenetics allow us to ascertain such information, any events that had occurred prior to LUCA’s emergence remain in the dark, leaving us with only the possibility of simulating plausible prebiotic scenarios in the laboratory.

Owing to the discovery of catalytic RNA, it is conceivable that life on Earth emerged from self-replicating RNA oligomers. A prerequisite for this RNA-world concept³ is that RNA was present on the early Earth. RNA, however, is a complex molecule (Fig. 1a) that consists of a sugar (ribose), heterocycles (A, C, G and U) for base pairing, and phosphodiester to link the units. Since the formation of the ribose- and heterocyclic-portions of RNA required different chemistry, we must assume that the early Earth provided areas with different geological conditions to facilitate their syntheses. We can imagine dry desert-type mineralic surfaces that were only occasionally dampened by rain. These mineral fields may have experienced large temperature differences during day and night. Hot fields, close to active volcanos certainly existed with temperatures of above 200 °C, occasionally cooled by rain. We can imagine that much wetter climates existed as well, in which water could dissolve minerals that would later be (re)-precipitated in draughts. pH values may also have varied greatly. Acidic rain generated by NO_x and SO_x could have given rise to ponds with pH values below 3, while ponds filled with amines and amidines could have had pH values of above 10 or even 12. It seems plausible that the different RNA precursors formed separately in different geological settings and that they were incidentally washed together due to flooding or similar phenomena.

Non-canonical bases and peptide-RNA hybrids

The chemistry of the early Earth must have been primitive and unspecific. It is hard to imagine that parameters such as temperatures or concentrations of reactants were so tightly controlled that single products formed selectively. Reactions likely took place in vessels such as aqueous

¹ Department of Chemistry at the Ludwig-Maximilians Universität München, Butenandtstr. 5-13, 81377 Munich, Germany. These authors contributed equally: Sidney Becker, Christina Schneider. Correspondence and requests for materials should be addressed to T.C. (email: thomas.carell@lmu.de)

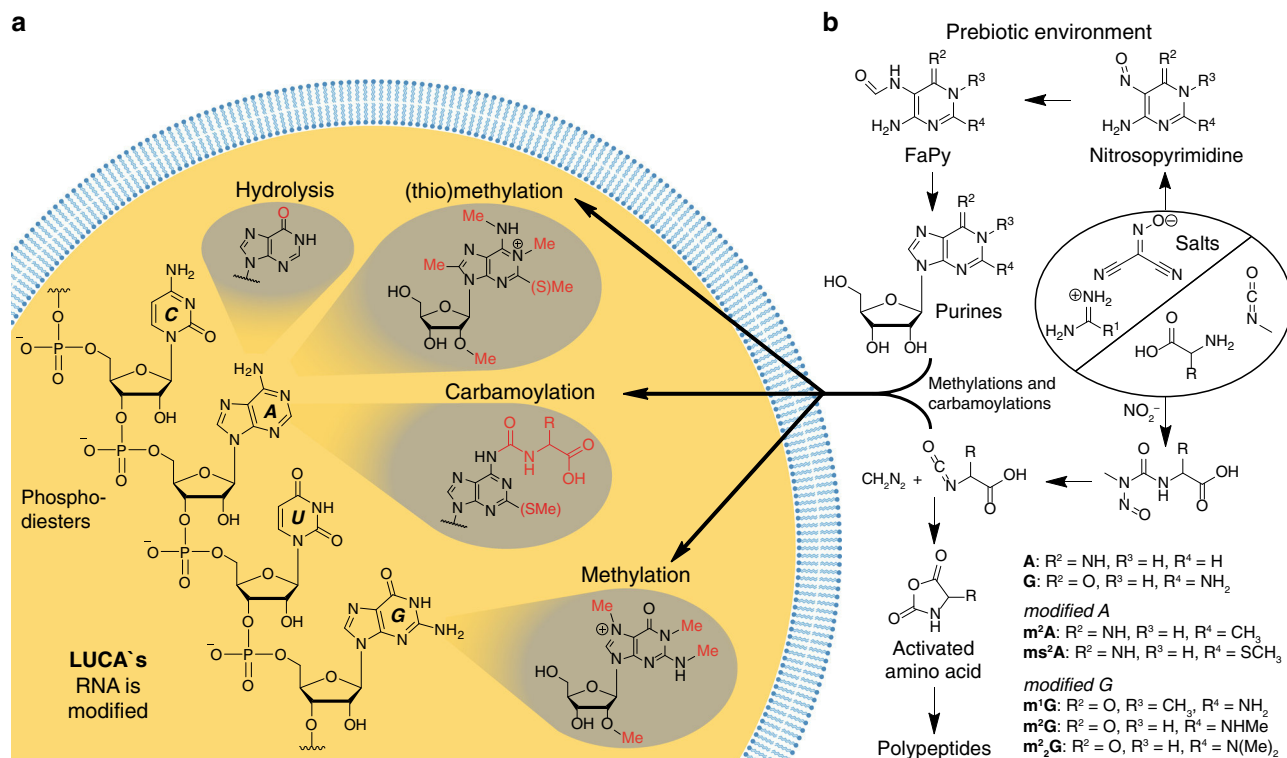


Fig. 1 LUCA's modified bases. **a** The chemical structure of ribonucleic acid (RNA) and of some modified bases. Different (thio)methylation sites and amino acid purine modifications in LUCA are marked in red. **b** Amidine salts are converted into nitrosopyrimidines, which then form formamidopyrimidines. Reaction with ribose provides a set of canonical and non-canonical nucleosides that are assumed to have been present in LUCA

ponds or on hot surfaces containing complex mixtures of different minerals. This leads us to believe that the conditions led to the formation of diverse pools of molecules (Fig. 1). Indeed, even today RNA is tremendously structurally diverse. Besides to the four canonical nucleobases (A, C, G and U) RNA contains a plethora of additional modified nucleosides⁴. Some of these bases are found in all three kingdoms of life, and as such, can be considered to be molecular fossils of the original chemically diverse primordial soup. These non-canonical nucleosides are potential chemical ancestors; relics of early Earth's chemistry¹.

Prebiotic routes to purines and amino acid modified purines.

Prebiotic chemical processes likely occurred under conditions far away from defined laboratory chemistry. Today, Chemists use special glassware for their reactions and reactants are added stepwise in a tightly controlled manner, often in a protecting atmosphere and regularly in inert solvents. Concentration and temperature are controlled, and importantly, the reaction product is carefully isolated and purified before it is introduced into the next reaction. All of this was impossible on the early Earth. Prebiotic chemistry forces chemists therefore to think about robust reactions that proceed under "dirty" conditions. Reactions that are general enough that they tolerate different temperatures and concentrations, and that are selective enough to proceed even in mixtures are privileged in a prebiotic setting. They are driven by fluctuations of outside physico-chemical parameters such as day-night or seasonal cycles, which provide intermittent wet and dry conditions along with changing temperatures. Drying out could have triggered selective precipitation and crystallization, which leads to purification and concentration to enable successive reactions⁵. Prebiotic reactions have to work in water, in dry-state conditions, or otherwise in higher-boiling solvents such as formamide. Reductions and oxidations may have occurred in the

presence of iron- and sulphur-containing compounds, for example, by the conversion of iron sulphide (FeS) to pyrite (FeS₂)⁶. High-energy irradiation could also have initiated chemical reactions, particularly when we assume the absence of a shielding ozone layer. Since DNA and RNA are not stable under UV irradiation ($\lambda < 300$ nm), photocatalysis was probably more important for the formation of small reactive organic molecules. Without sophisticated DNA/RNA repair mechanisms, oligonucleotides could survive only in niches devoid of UV light⁷. It is safe to assume that UV light was a threat to early life.

When we think about the formation of small prebiotic starting molecules, electrical discharge needs to be considered (Fig. 2a). In a nearly neutral N₂ atmosphere composed also of H₂O, CO₂, H₂ and CH₄, electrical discharge converts N₂ into NO⁸ which can be reduced to NH₂OH and then into NH₃. In addition, N₂ reacts with CH₄ under discharge conditions to give products including HCN, cyanamide and cyanoacetylene⁹. Under such electrical discharge conditions (Fig. 2a) humid CO₂ produces the starting materials for sugars such as formaldehyde and glycolaldehyde (Fig. 2b). This all together provides a rather large set of small prebiotic organic molecules that can act as starting materials for the formation of RNA nucleosides (Figs. 1b and 2b).

Cyanamide, for example, can give different amidinium compounds by nucleophilic addition, which form low-melting organic salts with nitrosated malononitrile (Fig. 1b)⁵. We found that these salts form formamidopyrimidines (FaPys, Fig. 1b), which react efficiently with ribose to give purine nucleosides¹⁰. This new FaPy-pathway generates not only the two canonical purine bases (A and G), but also a variety of RNA modifications⁵. Under special conditions, even amino acid modified purine nucleosides are generated. Most importantly all these modified purine bases are found today in contemporary RNA, thus strengthening the idea that non-canonical RNA bases are vestiges of our primordial ancestor¹¹.

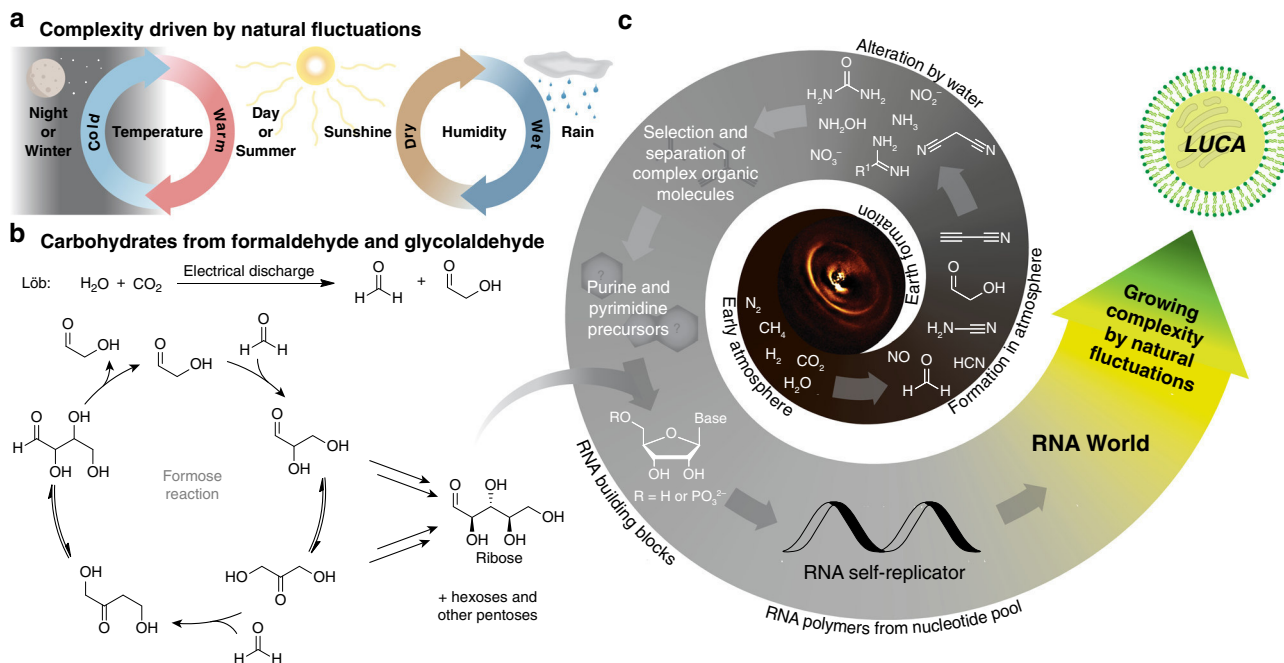


Fig. 2 Natural fluctuations steer chemical transformations towards greater complexity. **a** Molecular complexity driven by fluctuations of physico-chemical conditions, such as day-night or seasonal changes, leading to wet-dry cycles. **b** Since the early Earth was not uniform, carbohydrates could have emerged separately from nucleobases or their precursors e.g. via the formose reaction. **c** When washed into the same environment, different nucleosides/nucleotides could have formed

Ribose and the oligomerization problem. The use of ribose as a prebiotic starting material for nucleoside formation is sometimes criticised because no clear prebiotically plausible route to ribose has been found. We still believe that ribose was present on the early Earth and that we have simply to discover the right conditions. It is well known that formaldehyde and glycolaldehyde produce ribose in the formose reaction (Fig. 2b), but admittedly, the yields are low (<1%)¹². It is known that borates increase the yield of ribose¹³ and we are sure that with more time and research even better and more selective conditions will be found. We should also not forget that life could have begun with oligonucleotides composed of sugars other than ribose¹⁴. Even ribose can exist in a 5- or a 6-membered ring form. The 5-membered arrangement (furanosides) are what today constitute our RNA, but we know from A. Eschenmoser's seminal work that the 6-membered pyranosidic RNA also produces wonderful double strands with selective base pairing¹⁵. It is a riddle, why the thermodynamically less favoured 5-membered furanosides were chosen to create life. One argument is that the 5-membered furanosides are more easily phosphorylated because they possess a very reactive primary hydroxyl group¹⁶. Such phosphorylation is needed to stitch the nucleosides together to enable strand formation¹⁷. Given that prebiotic RNA nucleosides and consequently RNA strands may have been structurally diverse, containing for example, amino acid modifications, we can envision that some had physico-chemical properties or catalytic properties that offered a survival advantage. Pre-Darwinian evolution may have acted first on molecules rather than living species to select the fittest, initially maybe just the most stable molecules or RNA strands (Fig. 2c). At some point nature must have discovered that the ultimate solution to molecular survival is reproduction via self-replication and catalysis. This is best achieved in a shielded environment within which the molecules needed for replication can be autonomously generated (metabolism). This unit is called a cell.

Received: 1 October 2018 Accepted: 19 October 2018
Published online: 12 December 2018

References

- Weiss, M. C. et al. The physiology and habitat of the last universal common ancestor. *Nat. Microbiol.* **1**, 16116 (2016).
- Woese, C. R. & Fox, G. E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **74**, 5088–5090 (1977).
- Gilbert, W. Origin of life: the RNA world. *Nature* **319**, 618 (1986).
- Carell, T. et al. Structure and function of noncanonical nucleobases. *Angew. Chem. Int. Ed.* **51**, 7110–7131 (2012).
- Becker, S. et al. Wet-dry cycles enable the parallel origin of canonical and non-canonical nucleosides by continuous synthesis. *Nat. Commun.* **9**, 163 (2018).
- Wächtershäuser, G. Before enzymes and templates: theory of surface metabolism. *Microbiol. Rev.* **52**, 452–484 (1988).
- Mees, A. et al. Crystal structure of a photolyase bound to a CPD-like DNA lesion after in situ repair. *Science* **306**, 1789–1793 (2004).
- Airapetian, V. S., Gloer, A., Gronoff, G., Hébrard, E. & Danchi, W. Prebiotic chemistry and atmospheric warming of early Earth by an active young Sun. *Nat. Geosci.* **9**, 452 (2016).
- Benner, S. A., Kim, H.-J. & Biondi, E. in *Prebiotic Chemistry and Chemical Evolution of Nucleic Acids* 31–83 (Springer, Berlin, 2018).
- Becker, S. et al. A high-yielding, strictly regioselective prebiotic purine nucleoside formation pathway. *Science* **352**, 833–836 (2016).
- Schneider, C. et al. Noncanonical RNA nucleosides as molecular fossils of an early Earth—Generation by prebiotic methylations and carbamoylations. *Angew. Chem. Int. Ed.* **57**, 5943–5946 (2018).
- Butlerow, A. Formation synthétique d'une substance sucrée. *Comptes Rendus Acad. Sci.* **53**, 145–147 (1861).
- Ricardo, A., Carrigan, M. A., Olcott, A. N. & Benner, S. A. Borate minerals stabilize ribose. *Science* **303**, 196–196 (2004).
- Fialho, D. M. et al. Glycosylation of a model proto-RNA nucleobase with non-ribose sugars: implications for the prebiotic synthesis of nucleosides. *Org. Biomol. Chem.* **16**, 1263–1271 (2018).
- Krishnamurthy, R. et al. Pyranosyl-RNA: base pairing between homochiral oligonucleotide strands of opposite sense of chirality. *Angew. Chem. Int. Ed.* **35**, 1537–1541 (1996).

16. Kim, H. J. et al. Evaporite borate-containing mineral ensembles make phosphate available and regiospecifically phosphorylate ribonucleosides: borate as a multifaceted problem solver in prebiotic chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed.* **55**, 15816–15820 (2016).
17. Li, L. et al. Enhanced nonenzymatic RNA copying with 2-aminoimidazole activated nucleotides. *J. Am. Chem. Soc.* **139**, 1810–1813 (2017).

Acknowledgements

We thank the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) for financial support via the programs SFB1032 (TP-A5), SFB749 (TP-A4), SPP-1784 and CA275/11-1. Additional funding from the Excellence Cluster EXC114 CiPS^M is acknowledged. This project has received funding from the European Research Council (ERC) under the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme (grant agreement n° EPiR 741912).

Author contributions

T.C. conceived, developed and wrote this manuscript. S.B., C.S. and A.C. helped writing this manuscript.

Additional information

Competing interests: The authors declare no competing interests.

Reprints and permission information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2018

3.3. Nicht-kanonische RNA-Nukleoside als molekulare Fossilien einer frühen Erde – Generierung durch präbiotische Methylierungen und Carbamoylierungen

„Noncanonical RNA Nucleosides as Molecular Fossils of an Early Earth — Generation by Prebiotic Methylations and Carbamoylations”

Christina Schneider, Sidney Becker, Hidenori Okamura, Antony Crisp, Tynchtyk Amatov, Michael Stadlmeier, Thomas Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, 57, 5943-5946.

Prolog

Die RNA-Welthypothese postuliert, dass das Leben mit selbstreplizierenden RNA-Molekülen begann, die für den Prozess der chemischen Evolution mit Replikation, Randomisierung und Selektion zugänglich waren. Diese Hypothese beruht auf der Verfügbarkeit von präbiotischen Syntheserouten zu den RNA-Polymeren. Es ist bekannt, dass die RNA nicht nur kanonische Nukleoside enthält, sondern auch eine Vielzahl an modifizierten Nukleobasen. Dabei ist es eine offene Frage, ob das Leben nur mit den vier kanonischen Basen (A, C, G und U) begann, oder ob eine frühe prä-RNA eine größere chemische Vielfalt aufzeigte und auch nicht-kanonische Basen enthielt. In der vorliegenden Studie wird gezeigt, dass Isocyanate in Kombination mit Natriumnitrit methylierende und carbamoylierende Bedingungen schaffen, die kompatibel mit den Voraussetzungen auf der frühen Erde sind. Durch diese Reaktionen können biologisch relevante methylierte und Aminosäure-modifizierte Nukleoside entstehen. Die nicht-kanonischen Basen erhöhen die chemische Vielfalt von RNA, wodurch die Faltungsmöglichkeiten und die katalytischen Funktionen ausgeweitet werden können. Die hier präsentierten Daten liefern ein plausibles Szenario für den chemischen Ursprung nicht-kanonischer Nukleoside. Die durch diese Studie gewonnenen Kenntnisse deuten darauf hin, dass modifizierte Nukleoside Fossilien der frühen Erde sein könnten.

Autorenbeitrag

Für diese Arbeit entwickelte ich die Chemie für den Methylierung sowie die Carbamoylierung von Nukleosiden, half bei der Gestaltung der Studie, analysierte und interpretierte die Ergebnisse und half bei der Erstellung des Manuskripts.

Lizenz

Kopie der Publikation mit Erlaubnis des Verlags; Copyright 2018 Wiley VCH Verlag GmbH und Co. KGaA, Weinheim.

Nicht-kanonische RNA-Nukleoside als molekulare Fossilien einer frühen Erde – Generierung durch präbiotische Methylierungen und Carbamoylierungen

Christina Schneider, Sidney Becker, Hidenori Okamura, Antony Crisp, Tynchtyk Amatov, Michael Stadlmeier und Thomas Carell*

Abstract: Die RNA-Welt-Hypothese besagt, dass das Leben auf der Erde mit kleinen RNA-Molekülen begann, die in der Lage waren, sich selbst zu replizieren. Grundlegend für diese Hypothese ist der präbiotische Zugang zu RNA-Polymeren. Heutige RNA besteht nicht nur aus den vier kanonischen Nucleosiden, sondern darüber hinaus aus vielen chemisch modifizierten RNA-Bausteinen. Ob diese nicht-kanonischen Nucleoside parallel zu den kanonischen Nucleosiden (chemischer Ursprung) oder später gebildet wurden (biologischer Ursprung), ist noch immer ungeklärt. Hier wird gezeigt, dass Isocyanate in Kombination mit Natriumnitrit methylierende und carbamoylierende Bedingungen schaffen, die kompatibel mit den Voraussetzungen auf der frühen Erde sind. Diese Reaktionen führen zur Bildung methylierter und Aminosäure-modifizierter Nucleoside, die heute in der Biologie zu finden sind. Die Daten liefern ein plausibles Szenario für den chemischen Ursprung bestimmter nicht-kanonischer Nucleoside, was darauf hindeutet, dass sie Fossilien der frühen Erde sein könnten.

Es sind bereits mehr als 120 modifizierte RNA-Nucleoside bekannt, die wichtig für die korrekte Bildung von dreidimensionalen Strukturen und die Feinabstimmung von RNA-RNA- sowie RNA-Protein-Wechselwirkungen sind.^[1–3] Modifizierte Nucleoside werden z. B. in unmittelbarer Nähe der Anticodonschleife der tRNA gefunden, wo sie in die Translation des genetischen Codes involviert sind.^[4,5] Methylierte Nucleoside wie m⁶A sind in die Regulation der mRNA-Stabilität,^[6] Spleißen,^[7,8] Translation^[9–11] und X-Chromosom-Inaktivierung^[12] eingebunden. m⁷G, ein weiteres methyliertes Nucleosid, ist Teil der 5'-Cap-Struktur eukaryotischer mRNA.^[13]

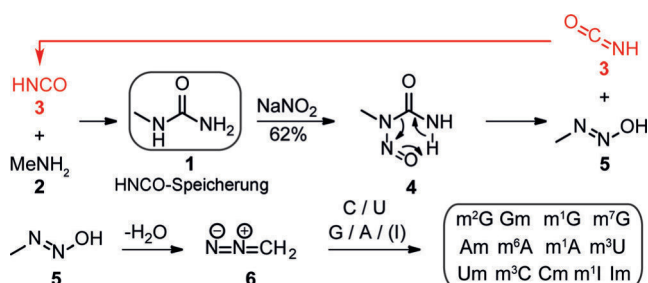
Die RNA-Welt-Hypothese besagt, dass das Leben mit selbstreplizierenden RNA-Molekülen begann, die durch Replikation, Randomisierung und Selektion den Prozess der chemischen Evolution eingehen konnten.^[14] RNA ist in der Lage, sowohl genetische Informationen zu speichern als auch

chemische Prozesse zu katalysieren. Nach dieser Hypothese sollte daher eine frühe Zelle in der Lage gewesen sein, sich auch in Abwesenheit von kodierten Proteinen zu replizieren und einen primitiven Metabolismus aufrechtzuerhalten. Nicht-kodierte Polypeptide^[15,16] und einfache anabolische Prozesse^[17,18] könnten den frühen RNA-basierten Metabolismus unterstützt haben.

Die Hypothese erfordert das Vorhandensein der Schlüsselbausteine des Lebens, wie Nucleoside und Aminosäuren, oder primitiver anabolischer Prozesse, die zu ihrer Bildung führen.^[19] Dabei wird die Frage aufgeworfen, ob das Leben nur mit den vier kanonischen Basen (A, C, G und U)^[20,21] begann oder ob eine frühe prä-RNA eine größere chemische Vielfalt aufwies und auch nicht-kanonische Basen enthielt.^[22] Diese nicht-kanonischen Basen sind bis heute in der RNA vorhanden und könnten als Fossilien dieser frühen Phase der chemischen Evolution betrachtet werden.^[23–25] Um diese Idee zu belegen, bedarf es einfacher chemischer Syntheserouten für nicht-kanonische Basen, die mit den geochemischen Modellen der frühen Erde kompatibel sind. Hier zeigen wir, dass durch die Reaktion der kanonischen Nucleoside mit nitrosyliertem *N*-Methylharnstoff (**1**) eine Vielzahl an methylierten Nucleosiden unter präbiotischen Bedingungen generiert werden kann, die eine wichtige Rolle in den RNAs aller drei Domänen des Lebens spielen (Schema 1).^[26]

NO₂⁻ war auf der frühen Erde potenziell durch NO und NO₂ verfügbar,^[27] die durch Blitze in einer Stickstoff-Atmosphäre entstanden sind.^[28] Alternativ könnte NO durch die Reaktion von N₂ mit CO₂ in heißen Mantel-Plumes entstanden sein.^[29]

Außer den methylierten RNA-Basen sind auch Aminosäure-modifizierte Derivate unter den heutigen nicht-kanonischen



Schema 1. Reaktionen, die zur Bildung von methylierten Derivaten der kanonischen Nucleoside führen, die bis heute in der RNA aller drei Domänen des Lebens gefunden werden. Methylharnstoff fungiert als Speichermolekül für das reaktive Isocyanat.

[*] C. Schneider, S. Becker, Dr. H. Okamura, A. Crisp, Dr. T. Amatov, M. Stadlmeier, Prof. Dr. T. Carell
Center for Integrated Protein Science (CiPS^M) am
Department Chemie, LMU München
Butenandtstraße 5–13, 81377 München (Deutschland)
E-Mail: Thomas.Carell@lmu.de
Homepage: <http://www.carellgroup.de>

Hintergrundinformationen und die Identifikationsnummer (ORCID) eines Autors sind unter:
<https://doi.org/10.1002/ange.201801919> zu finden.

nischen RNA-Nukleosiden zu finden.^[30,31] Sie sind direkt an der Decodierung der genetischen Information beteiligt.^[32,33] Wir zeigen, dass unsere NO₂⁻-basierten Reaktionen auch diese modifizierten Basen liefern, wodurch ein früher, inniger Kontakt zwischen Nucleobasen und Aminosäuren vermutet werden kann, der die Grundlage für die Coevolution von RNA und Proteinen und den Aufbau von primitiven protometabolischen Wegen bilden könnte.

Die chemische Syntheseroute beginnt mit Methylharnstoff (1), einem Molekül, das mit hoher Wahrscheinlichkeit auf der frühen Erde vorhanden war.^[34] Methylharnstoff (1) entsteht z. B. durch die Reaktion von Ammoniak mit Methylisocyanat, das auf dem Kometen 67P/Churyumov-Gerasimenko detektiert wurde.^[35,36] Es bildet sich außerdem direkt im Urey-Miller-Experiment^[37] und ist durch die Reaktion von Methylamin (2) mit Isocyanat (3) in Wasser in hohen Ausbeuten zugänglich (90%).^[38] HNCO hingegen wurde in interstellaren Gasen^[39] und ebenfalls auf Komet 67P/Churyumov-Gerasimenko detektiert.^[35,40] Darüber hinaus ist bekannt, dass Harnstoff in Ammoniak und Isocyanat zerfällt.^[41,42] Trotz der möglichen Bildung von HNCO (3) ist dessen Anreicherung wegen der hohen Reaktivität schwierig. Wenn allerdings kleine Mengen 1 vorhanden sind, kann dieses ohne weiteres mit NO⁺ reagieren (Schema 1). Methylharnstoff (1) kann schnell zu *N*-Methyl-*N*-nitrosuharnstoff (4)^[26] in einer Ausbeute von 62% nitrosyliert werden. Dieses Produkt trennt sich physikalisch als Schaum von der wässrigen Phase ab, was zur Anreicherung von 4 führt, sodass es lokal in hohen Konzentrationen verfügbar gewesen sein könnte. Unter leicht basischen Bedingungen, z. B. in der Gegenwart von Borax (bekanntermaßen wichtig für die Entstehung von Ribose),^[43] zerfällt 4 schnell zu 1-Hydroxy-2-methyldiazin (5) unter Freisetzung von HNCO (3). Somit sind nur kleine Mengen an HNCO nötig, um aus MeNH₂ und NaNO₂ zu 5 zu gelangen. Dieses eliminiert Wasser und zerfällt zu Diazomethan (6), einem weit verbreiteten Methylierungsreagens.^[44] Da alle Ausgangsmaterialien plausible Bestandteile der frühen Erde sind, ist es wahrscheinlich, dass auch 6 zugänglich war. Es kann kontrolliert aus der stabilen Vorstufe 1 freigesetzt werden. Somit könnte 6 trotz seiner hohen Reaktivität und der damit verbundenen kurzen Halbwertszeit auf der frühen Erde für chemische Transformationen verfügbar gewesen sein.

Als wir die Basen-katalysierte Diazomethanbildung in Gegenwart der kanonischen Nucleobasen durchführten, erhielten wir eine große Bandbreite an methylierten Verbindungen (Abbildung 1). Für das Experiment wurden die Nucleoside in einem 1:1-Gemisch aus Boratpuffer und Formamid gelöst. Formamid war auf der frühen Erde durch die Reaktion von HCN mit H₂O zugänglich.^[45] *N*-Methyl-*N*-nitrosuharnstoff (4) wurde in einer Portion zum Reaktionsgemisch hinzugefügt. Nach einer Stunde bei 70 °C wurden Proben entnommen und mittels LC-MS sowie LC-MS/MS analysiert (Abbildung 1). Um die entstehenden methylierten Spezies korrekt zuzuordnen, wurden Coinjektionen mit synthetischen Referenzverbindungen durchgeführt (siehe Hintergrundinformationen (SI)). Die Produkte wurden durch Analyse der Fragmentierungsmuster in LC-MS²-Experimenten weiter untersucht. Als wir die Reaktion in Gegenwart von

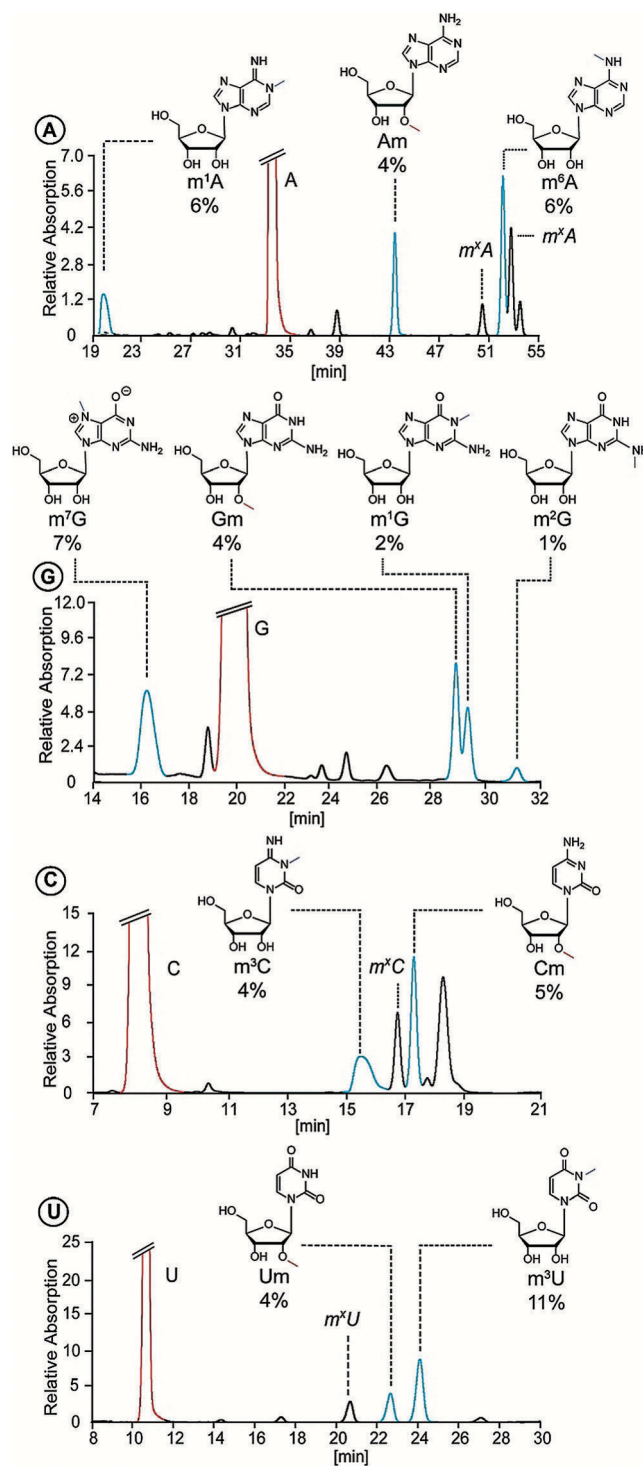


Abbildung 1. HPLC der Reaktion von *N*-Methyl-*N*-nitrosuharnstoff (4) mit den kanonischen Nucleobasen A, G, C und U. Die modifizierten Nucleoside sind in Blau dargestellt, die kanonischen in Rot. Die mit „m“ gekennzeichneten Signale wurden anhand von Fragmentierungsstudien als Zucker-modifizierte Nucleoside identifiziert (SI).

Adenosin durchführten, konnten m¹A, Am und m⁶A zusammen mit den 3'- und 5'-methylierten Spezies (mit m^xA gekennzeichnet; siehe SI) erhalten werden. Als Guanosin unter den gleichen Bedingungen methyliert wurde, konnten wir sowohl m⁷G (7%) als auch Gm, m¹G und m²G detektieren,

bei denen es sich um bekannte nicht-kanonische Basen handelt. In der Gegenwart von Cytidin wurden die Basen m^3C und Cm erhalten. Des Weiteren lieferte die Umsetzung von Uridin die methylierten Spezies Um und m^3U . m^3U wurde in einer hohen Ausbeute von 11 % erhalten. Darüber hinaus untersuchten wir die Methylierungen von Inosin (I), dem Hydrolyseprodukt von Adenosin.^[46,47] Als Inosin denselben Bedingungen ausgesetzt wurde, beobachteten wir die Entstehung von Im und m^1I (siehe SI). Fast alle der entstandenen methylierten Nucleoside sind heute in der RNA aller drei Domänen des Lebens vorhanden.^[2,48]

Als nächstes sollte die Frage beantwortet werden, ob diese einfachen Reaktionen auch dafür verwendet werden können, größere chemische Gruppen, wie Aminosäuren, an kanonische Nucleobasen anzubringen, um RNA-Modifikationen wie t^6A und g^6A zu erhalten. Dies war tatsächlich möglich, indem wir Methylisocyanat, CH_3NCO (**7**), statt HNCO verwendeten. CH_3NCO kann unter präbiotischen Bedingungen durch UV-Bestrahlung von CH_4 und HNCO erhalten werden. In wässriger Umgebung reagierte **7** schnell und fast quantitativ mit Aminosäuren wie Glycin (**8a**) und Threonin (**8b**) zu den Methylharnstoffderivaten **9** (Abbildung 2). Die Produkte **9a,b** können unter denselben Bedingungen wie **1** nitrosyliert werden^[49] und liefern dabei die Nitrosoverbindungen **10a,b** in Ausbeuten von 82 und 95 %. Eine pH-Änderung zu leicht basischen Bedingungen, entweder mit Phosphat- oder Boratpuffer, wandelt **10a,b** in die Isocyanate **11a,b** der entsprechenden Aminosäuren um. Durch Umsetzung mit Adenosin reagieren diese Intermediate zu den N^6 -

Derivaten g^6A und t^6A . Da die Reaktion unter basischen Bedingungen abläuft, reagiert nicht nur N^6 mit den Isocyanatderivaten, sondern es reagieren auch die 2', 3',- und 5'-Hydroxygruppen (Abbildung 2). Die Selektivität der Reaktion kann durch Versetzen Ni^{2+} -Salzen, welche bei der präbiotischen Synthese von Nucleosiden gebildet werden, zugunsten der N^6 -Position gesteuert werden.^[22] Gleichzeitig entsteht CH_2N_2 (**6**), das anschließende Methylierungen begünstigt (siehe SI). Erstaunlicherweise sind die Aminosäuremodifizierten Nucleoside, die durch die hier beschriebenen Reaktionen erhalten werden können, in allen drei Domänen des Lebens vertreten.^[2,48]

Kürzlich zeigte eine vergleichende phylogenetische Analyse,^[50] dass nicht-kanonische Basen wahrscheinlich schon im Urvorfahr allen Lebens auf der Erde, bekannt als LUCA (last universal common ancestor), präsent waren. Ein Vergleich der Nucleoside, die in dieser Studie erhalten wurden, mit denen aus der genetischen Analyse ergibt eine überraschende Übereinstimmung (Abbildung 3). Die meisten einfachen Modifikationen, die in LUCA enthalten waren, konnten auch mit den hier präsentierten Reaktionen gebildet werden.

Zusammenfassend präsentieren wir hier eine einfache Reaktionskaskade, die mit Isocyanat, Methylisocyanat, Methylamin, Ammoniak und Natriumnitrit beginnt. In dieser Kaskade wird das instabile Molekül Isocyanat (**3**) durch Methylamin abgefangen und in Form von Methylharnstoff chemisch gespeichert. Es kann unter basischen Bedingungen von *N*-Methyl-*N*-nitrosoharnstoff (**4**) wieder freigesetzt werden, das durch die Nitrosylierung von Methylharnstoff (**1**) hergestellt wird. Diese Reaktionen ermöglichen es uns, die kanonischen Pyrimidine und Purine, für die kürzlich plausible Bildungsprozesse unter präbiotischen Bedingungen be-

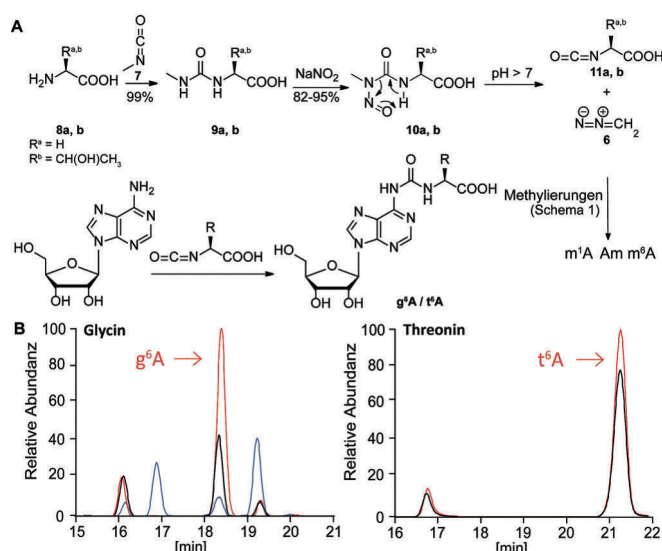


Abbildung 2. A) Plausibles Reaktionsschema für den präbiotischen Zugang zu t^6A und g^6A . B) MS-Chromatogramme der Reaktion des kanonischen Nucleosids A mit den *N*-Methylharnstoffderivaten **9a,b** unter Bildung der Isocyanate der entsprechenden Aminosäuren. Das Chromatogramm in Blau zeigt die Reaktion ohne den Zusatz von Ni^{2+} -Salzen, und die Chromatogramme in Schwarz repräsentieren die Reaktion in Gegenwart von Ni^{2+} -Salzen. Coinjektionen mit synthetischen Standards sind in Rot dargestellt. Die zusätzlichen Signale kommen von der Reaktion der Zuckereinheiten mit den Isocyanaten der Aminosäuren. Die Selektivität kann durch Versetzen mit $[Ni(ClO_4)_2]$ erhöht werden.

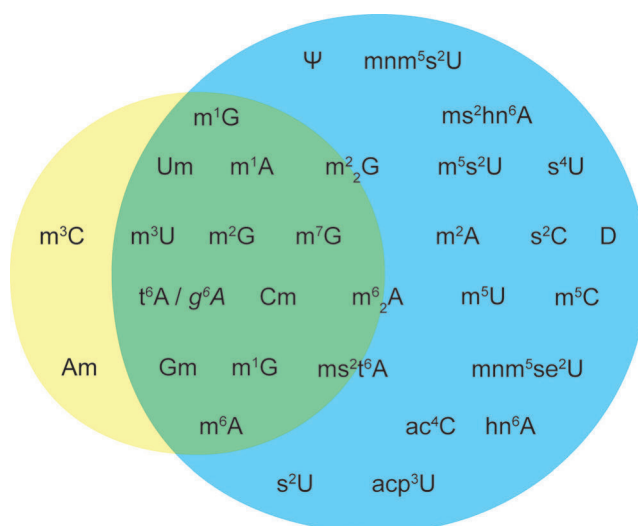


Abbildung 3. Nicht-kanonische Nucleoside, die in dieser Studie erhalten wurden (gelbe Fläche), und Modifikationen, die auf Grundlage der phylogenetischen Analyse wahrscheinlich schon in der frühen Biosphäre gegenwärtig waren (blaue Fläche).^[50] Die modifizierten Nucleoside, die in beiden Studien gefunden wurden, sind in der grünen Fläche dargestellt. ms^2t^6A , m^2_2G und m^6_2A wurden auf der Grenzfläche platziert, da sie ebenfalls mit den hier vorgestellten Reaktionen gebildet werden könnten, wenn ms^2A , m^2G und m^6A als Ausgangsmaterialien gewählt werden.

schrieben wurden,^[20,21,51,52] in nicht-kanonische Nucleoside umzuwandeln. Damit liefern die hier präsentierten Befunde einen Beleg dafür, dass kanonische und nicht-kanonische Ribonucleoside spontan unter präbiotischen Bedingungen gebildet werden konnten. Die hier beschriebenen Reaktionen können mit Nitrosylierungen verbunden werden, die kürzlich von uns beschrieben wurden, um kanonische und nicht-kanonische Nucleoside parallel zu bilden.^[22] Die nicht-kanonischen Basen, besonders die Aminosäure-modifizierten Purine, steigern die chemische Vielfalt von RNA, womit die Faltungsmöglichkeiten und die katalytischen Funktionen ausgeweitet werden können. Dies ergänzt die Hypothese, dass nicht-kanonische Basenpaare in prä-RNA existiert haben könnten.^[22,53]

Danksagung

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für finanzielle Unterstützung durch SFB1032 (TP-A5), SPP1784, CA275/11-1 sowie der Exzellenzinitiative CiPSM. Dieses Projekt wurde durch den Europäischen Forschungsrat unter dem European Union's Horizon 2020 research and innovation programme (grant agreement n° EPiR 741912) finanziert. Wir danken Dr. Markus Müller für Kommentare zu diesem Manuskript.

Interessenkonflikt

Die Autoren erklären, dass keine Interessenkonflikte vorliegen.

Stichwörter: Chemische Evolution · Methylierungen · Nucleoside · Nucleosidmodifikationen · Präbiotische Chemie

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 5943–5946
Angew. Chem. **2018**, *130*, 6050–6054

- [1] T. Carell, C. Brandmayr, A. Hienzsch, M. Müller, D. Pearson, V. Reiter, I. Thoma, P. Thumbs, M. Wagner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 7110–7131; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 7220–7242.
- [2] M. A. Machnicka, K. Milanowska, O. Osman Oglou, E. Purta, M. Kurkowska, A. Olchowik, W. Januszewski, S. Kalinowski, S. Dunin-Horkawicz, K. M. Rother, *Nucleic Acids Res.* **2012**, *41*, D262–D267.
- [3] A. Czerwoniec, S. Dunin-Horkawicz, E. Purta, K. H. Kaminska, J. M. Kasprzak, J. M. Bujnicki, H. Grosjean, K. Rother, *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, D118–D121.
- [4] P. C. Thiaville, B. El Yacoubi, C. Köhrer, J. J. Thiaville, C. Deutsch, D. Iwata-Reuyl, J. M. Bacusmo, J. Armengaud, Y. Bessho, C. Wetzel, *Mol. Microbiol.* **2015**, *98*, 1199–1221.
- [5] J. A. Kowalak, J. J. Dalluge, J. A. McCloskey, K. O. Stetter, *Biochemistry* **1994**, *33*, 7869–7876.
- [6] X. Wang, Z. Lu, A. Gomez, G. C. Hon, Y. Yue, D. Han, Y. Fu, M. Parisien, Q. Dai, G. Jia, *Nature* **2014**, *505*, 117.
- [7] X. Zhao, Y. Yang, B.-F. Sun, Y. Shi, X. Yang, W. Xiao, Y.-J. Hao, X.-L. Ping, Y.-S. Chen, W.-J. Wang, *Cell Res.* **2014**, *24*, 1403.
- [8] W. Xiao, S. Adhikari, U. Dahal, Y.-S. Chen, Y.-J. Hao, B.-F. Sun, H.-Y. Sun, A. Li, X.-L. Ping, W.-Y. Lai, *Mol. Cell* **2016**, *61*, 507–519.
- [9] K. D. Meyer, D. P. Patil, J. Zhou, A. Zinoviev, M. A. Skabkin, O. Elemento, T. V. Pestova, S.-B. Qian, S. R. Jaffrey, *Cell* **2015**, *163*, 999–1010.
- [10] J. Zhou, J. Wan, X. Gao, X. Zhang, S. R. Jaffrey, S.-B. Qian, *Nature* **2015**, *526*, 591.
- [11] X. Wang, B. S. Zhao, I. A. Roundtree, Z. Lu, D. Han, H. Ma, X. Weng, K. Chen, H. Shi, C. He, *Cell* **2015**, *161*, 1388–1399.
- [12] D. P. Patil, C.-K. Chen, B. F. Pickering, A. Chow, C. Jackson, M. Guttman, S. R. Jaffrey, *Nature* **2016**, *537*, 369.
- [13] N. Sonenberg, M. A. Morgan, W. C. Merrick, A. J. Shatkin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1978**, *75*, 4843–4847.
- [14] A. C. Ferretti, G. F. Joyce, *Biochemistry* **2013**, *52*, 1227–1235.
- [15] S. Tagami, J. Attwater, P. Holliger, *Nat. Chem.* **2017**, *9*, 325.
- [16] J. G. Forsythe, S. S. Yu, I. Mamajanov, M. A. Grover, R. Krishnamurthy, F. M. Fernández, N. V. Hud, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 9871–9875; *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 10009–10013.
- [17] K. B. Muchowska, S. J. Varma, E. Chevalot-Beroux, L. Lethuillier-Karl, G. Li, J. Moran, *Nat. Ecol. Evol.* **2017**, *1*, 1716.
- [18] A. J. Coggins, M. W. Powner, *Nat. Chem.* **2017**, *9*, 310–317.
- [19] E. O. Leslie, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2004**, *39*, 99–123.
- [20] S. Becker, I. Thoma, A. Deutsch, T. Gehrke, P. Mayer, H. Zipse, T. Carell, *Science* **2016**, *352*, 833–836.
- [21] M. W. Powner, B. Gerland, J. D. Sutherland, *Nature* **2009**, *459*, 239–242.
- [22] S. Becker, C. Schneider, H. Okamura, A. Crisp, T. Amatov, M. Dejmeck, T. Carell, *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 163.
- [23] M. P. Robertson, G. F. Joyce, *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* **2012**, *4*, a003608.
- [24] B. J. Cafferty, D. M. Fialho, J. Khanam, R. Krishnamurthy, N. V. Hud, *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 11328.
- [25] A. C. Rios, Y. Tor, *Isr. J. Chem.* **2013**, *53*, 469–483.
- [26] A. Tsubura, Y.-C. Lai, H. Miki, T. Sasaki, N. Uehara, T. Yuri, K. Yoshizawa, *in vivo* **2011**, *25*, 11–22.
- [27] Y. L. Yung, M. B. McElroy, *Science* **1979**, *203*, 1002–1004.
- [28] W. L. Chameides, J. C. G. Walker, *Origins Life* **1981**, *11*, 291–302.
- [29] J. F. Kasting, *Origins Life Evol. Biospheres* **1990**, *20*, 199–231.
- [30] G. B. Chheda, *Life Sci.* **1969**, *8*, 979–987.
- [31] C. Deutsch, B. El Yacoubi, V. de Crécy-Lagard, D. Iwata-Reuyl, *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 13666–13673.
- [32] S. E. Kolitz, J. R. Lorsch, *FEBS Lett.* **2010**, *584*, 396–404.
- [33] F. V. Murphy IV, V. Ramakrishnan, A. Malkiewicz, P. F. Agris, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2004**, *11*, 1186.
- [34] T. G. Waddell, L. L. Eilders, B. P. Patel, M. Sims, *Origins Life Evol. Biospheres* **2000**, *30*, 539–548.
- [35] F. Goesmann, H. Rosenbauer, J. H. Bredehöft, M. Cabane, P. Ehrenfreund, T. Gautier, C. Giri, H. Krüger, L. Le Roy, A. J. MacDermott, *Science* **2015**, *349*, aab0689.
- [36] N. F. W. Ligterink, A. Coutens, V. Kofman, H. S. P. Müller, R. T. Garrod, H. Calcutt, S. F. Wampfler, J. K. Jørgensen, H. Linnartz, E. F. van Dishoeck, *Mon. Not. R. Astron. Soc.* **2017**, *469*, 2219–2229.
- [37] S. L. Miller, H. C. Urey, *Science* **1959**, *130*, 245–251.
- [38] B. T. Golding, C. Bleasdale, J. McGinnis, S. Müller, H. T. Rees, N. H. Rees, P. B. Farmer, W. P. Watson, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 4063–4082.
- [39] K. Altwegg, H. Balsiger, A. Bar-Nun, J.-J. Berthelier, A. Bieler, P. Bochsler, C. Briois, U. Calmonte, M. R. Combi, H. Cottin, *Sci. Adv.* **2016**, *2*, e1600285.
- [40] P. Ehrenfreund, S. B. Charnley, *Annu. Rev. Astron. Astrophys.* **2000**, *38*, 427–483.
- [41] W. H. Shaw, J. J. Bordeaux, *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 4729–4733.
- [42] B. P. Callahan, Y. Yuan, R. Wolfenden, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10828–10829.

- [43] H.-J. Kim, A. Ricardo, H. I. Illangkoon, M. J. Kim, M. A. Carrigan, F. Frye, S. A. Benner, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 9457–9468.
- [44] K. K. Park, J. S. Wishnok, M. C. Archer, *Chem.-Biol. Interact.* **1977**, *18*, 349–354.
- [45] R. Saladino, C. Crestini, S. Pino, G. Costanzo, E. Di Mauro, *Phys. Life Rev.* **2012**, *9*, 84–104.
- [46] R. A. Sanchez, L. E. Orgel, *J. Mol. Biol.* **1970**, *47*, 531–543.
- [47] W. D. Fuller, R. A. Sanchez, L. E. Orgel, *J. Mol. Biol.* **1972**, *67*, 25–33.
- [48] M. A. Machnicka, K. Milanowska, O. Osman Oglou, E. Purta, M. Kurkowska, A. Olchowik, W. Januszewski, S. Kalinowski, S. Dunin-Horkawicz, K. M. Rother, M. Helm, J. M. Bujnicki, H. Grosjean, *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, D262–D267.
- [49] T. Machinami, T. Suami, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1975**, *48*, 1333–1334.
- [50] M. C. Weiss, F. L. Sousa, N. Mrnjavac, S. Neukirchen, M. Rottger, S. Nelson-Sathi, W. F. Martin, *Nat. Microbiol.* **2016**, *1*, 16116.
- [51] H.-J. Kim, S. A. Benner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, 11315–11320.
- [52] R. Saladino, E. Carota, G. Botta, M. Kapralov, G. N. Timoshenko, A. Y. Rozanov, E. Krasavin, E. Di Mauro, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, E2746–E2755.
- [53] C. B. Winiger, M.-J. Kim, S. Hoshika, R. W. Shaw, J. D. Moses, M. F. Matsuura, D. L. Gerloff, S. A. Benner, *Biochemistry* **2016**, *55*, 3847–3850.

Manuskript erhalten: 12. Februar 2018
Veränderte Fassung erhalten: 12. März 2018
Akzeptierte Fassung online: 13. März 2018
Endgültige Fassung online: 17. April 2018

Supporting Information

Noncanonical RNA Nucleosides as Molecular Fossils of an Early Earth—Generation by Prebiotic Methylations and Carbamoylations

*Christina Schneider, Sidney Becker, Hidenori Okamura, Antony Crisp, Tynchtyk Amatov, Michael Stadlmeier, and Thomas Carell**

ange_201801919_sm_miscellaneous_information.pdf

Materials and Methods

General Information

Chemicals were purchased from Sigma-Aldrich, Fluka, ABCR, Carbosynth or Acros Organics and used without further purification. Solutions were concentrated *in vacuo* on a Heidolph rotary evaporator. The solvents were of reagent grade or purified by distillation. Chromatographic purification of products was accomplished using flash column chromatography on Merck Geduran Si 60 (40-63 μm) silica gel (normal phase). Thin layer chromatography (TLC) was performed on Merck 60 (silica gel F254) plates. Visualization of the developed chromatogram was performed using fluorescence quenching or standard staining solutions. ^1H - and ^{13}C -NMR spectra were recorded in deuterated solvents on Varian Oxford 200, Bruker ARX 300, Varian VXR400S, Varian Inova 400, Bruker AMX 600 and Bruker AVIIIHD 400 spectrometers and calibrated to the residual solvent peak. Multiplicities are abbreviated as follows: s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, m = multiplet, br = broad. High-resolution ESI spectra were obtained on the mass spectrometers Thermo Finnigan LTQ FT-ICR. IR measurements were performed on Perkin Elmer Spectrum BX FT-IR spectrometer with a diamond-ATR (Attenuated Total Reflection) setup. Melting points were measured on a Büchi B-540. For preparative HPLC purification a Waters 1525 binary HPLC Pump in combination with a Waters 2487 Dual Absorbance Detector was used, with Macherey-Nagel VP 250/10 Nucleosil 100-7 C18 reversed phase column. The analysis of the prebiotic reactions were analyzed by LC-ESI-MS on a Thermo Finnigan LTQ Orbitrap XL and were chromatographed by a Dionex Ultimate 3000 HPLC system with a flow of 0.15 mL/min over an Interchim Uptisphere120-3HDO C18 column. The column temperature was maintained at 30 °C. Eluting buffers were buffer A (2 mM HCOONH_4 in H_2O (pH 5.5)) and buffer B (2 mM HCOONH_4 in $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ 20/80 (pH 5.5)). For samples containing methylated and aminoacylated nucleosides the following gradient was used: 0 \rightarrow 55 min, 0% \rightarrow 8% HPLC/MS Puffer B; 55 \rightarrow 70 min, 8% \rightarrow 60% HPLC/MS Puffer B; 70 \rightarrow 72 min, 60% \rightarrow 100% HPLC/MS Puffer B; 72 \rightarrow 78 min, 100% HPLC/MS Puffer B; 78 \rightarrow 81 min, 100 \rightarrow 0% HPLC/MS Puffer B; 81 \rightarrow 90 min, 0% HPLC/MS Puffer B. The elution was monitored at 260 nm (Dionex Ultimate 3000 Diode Array Detector). The chromatographic eluent was directly injected into the ion source without prior splitting. Ions were scanned by use of a positive polarity mode over a full-scan range of m/z 120-1000 with a resolution of 30000. Parameters of the mass spectrometer were tuned with a freshly mixed solution of adenosine (5 μM). The parameters used in this section were sheath gas flow rate, 16 arb; auxiliary gas flow rate, 11 arb; sweep gas flow rate, 4 arb; spray voltage, 5.0 kV; capillary temperature, 200 °C; capillary voltage, 20 V, tube lens 65 V.

Synthesis of the methylated nucleosides under prebiotic conditions:

Methylated Adenosine

Adenosine (6.00 mg, 22.5 μmol , 1 eq.) was dissolved in a suspension of borax (105 mg, 275 μmol , 12 eq) in H_2O (250 μL) and formamide (100 μL). 1-methyl-1-nitrosourea (80.0 mg, 559 μmol , 25 eq.) was dissolved in formamide (150 μL). The suspension was stirred for 18 h at 50°C before 25 μL of the mixture were diluted into 975 μL H_2O and analyzed with LC-MS. The modifications were confirmed via coinjection of the prebiotic samples with synthetic standards (see Fig. S4). Yields of the prebiotic reactions were determined with calibration curves (see Fig.S6 and S7).

Methylated Guanosine

Guanosine (6.40 mg, 22.5 μmol , 1 eq.) was dissolved in a suspension of borax (105 mg, 275 μmol , 12 eq) in H_2O (250 μL) and formamide (100 μL). 1-methyl-1-nitrosourea (80.0 mg, 559 μmol , 25 eq.) was dissolved in formamide (150 μL). The suspension was stirred for 18 h at 50°C before 25 μL of the mixture were diluted into 975 μL H_2O and analyzed with LC-MS. The modifications were confirmed via coinjection of the prebiotic samples with synthetic standards (see Fig. S4). Yields of the prebiotic reactions were determined with calibration curves (see Fig.S6 and S7).

Methylated Cytidine

Cytidine (5.50 mg, 22.5 μmol , 1 eq.) was dissolved in a suspension of borax (105 mg, 275 μmol , 12 eq) in H_2O (250 μL) and formamide (100 μL). 1-methyl-1-nitrosourea (80.0 mg, 559 μmol , 25 eq.) was dissolved in formamide (150 μL). The suspension was stirred for 18 h at 50°C before 25 μL of the mixture were diluted into 975 μL H_2O and analyzed with LC-MS. The modifications were confirmed via coinjection of the prebiotic samples with synthetic standards (see Fig. S4). Yields of the prebiotic reactions were determined with calibration curves (see Fig.S6 and S7).

Methylated Uridine

Uridine (5.50 mg, 22.5 μmol , 1 eq.) was dissolved in a suspension of borax (105 mg, 275 μmol , 12 eq) in H_2O (250 μL) and formamide (100 μL). 1-methyl-1-nitrosourea (80.0 mg, 559 μmol , 25 eq.) was dissolved in formamide (150 μL). The suspension was stirred for 18 h at 50°C before 25 μL of the mixture were diluted into 975 μL H_2O and analyzed with LC-MS. The modifications were confirmed via coinjection of the prebiotic samples with synthetic standards (see Fig. S4). Yields of the prebiotic reactions were determined with calibration curves (see Fig.S6 and S7).

Methylated Inosine

Inosine (6.00 mg, 22.5 μmol , 1 eq.) was dissolved in a suspension of borax (105 mg, 275 μmol , 12 eq) in H_2O (250 μL) and formamide (100 μL). 1-methyl-1-nitrosourea (80.0 mg, 559 μmol , 25 eq.) was dissolved in formamide (150 μL). The suspension was stirred for 18 h at 50°C before 25 μL of the mixture were diluted into 975 μL H_2O and analyzed with LC-MS. The modifications were confirmed via coinjection of the prebiotic samples with synthetic standards (see Fig. S4). Yields of the prebiotic reactions were determined with calibration curves (see Fig.S6 and S7).

Synthesis of the amino acid modified nucleosides under prebiotic conditions:

Without Nickel:

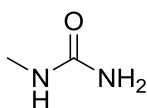
Adenosine (2.67 mg, 10.0 μmol , 1 eq.) was dissolved in phosphate buffer (370 μL , 30 mM, pH 8) and H_2O . (40 μL). The (methyl(nitroso)carbamoyl)amino acid (Glycine: 3.32 mg, 20.9 μmol , 2 eq; Threonine: 4.10 mg, 20.9 μmol , 2 eq) was suspended in water (40 μL) and was slowly added to the reaction mixture. After 17 h at 70°C 50 μL samples were removed and diluted to 1 mL. The samples were used for LC-MS analysis. The modifications were confirmed via coinjection of the prebiotic samples with synthetic standards

With Nickel:

Adenosine (2.67 mg, 10.0 μmol , 1 eq.) was dissolved in phosphate buffer (370 μL , 30 mM, pH 8). $[\text{Ni}(\text{ClO}_4)_2] \times 6 \text{H}_2\text{O}$ (91.4 mg, 250 μmol , 25 eq) was added in H_2O (40 μL). The (methyl(nitroso)carbamoyl)amino acid (Glycine: 3.32 mg, 20.9 μmol , 2 eq; Threonine: 4.10 mg, 20.9 μmol , 2 eq) was suspended in water (40 μL) and was slowly added to the reaction mixture. After 17 h at 70°C 50 μL samples were removed and diluted to 1 mL. The samples were used for LC-MS analysis. The modifications were confirmed via coinjection of the prebiotic samples with synthetic standards

Prebiotic access to Urea und Urea-Nitroso-Compounds

1-methylurea (1)



An aqueous solution of ammonia (100 μL , 25%) was added to H_2O (150 μL) and cooled to 0°C. Methylisocyanate (20.0 μL , 326 μmol , 1.0 eq) was added and the mixture was stirred at

20°C. After 3.5 h the solvent was evaporated and the product could be obtained as a white solid (23.92 mg, 322 μ mol, 99%).

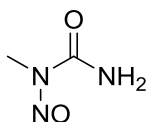
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3CN) δ = 5.04 (bs, 1H, NH), 4.71 (s, 2H, NH_2), 2.60 (d, 3H, NCH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (600 MHz, CD_3CN) δ = 160.32 (1C, CO), 26.94 (s, 1C, NCH_3).

HRMS (EI^+): calc. for $[\text{C}_2\text{H}_5\text{N}_3\text{O}_2]$ 103.0383, found: 103.0374 [M].

IR (cm^{-1}): $\tilde{\nu}$ = 3412 (w), 3320 (m), 3203 (w), 1650 (m), 1625 (m), 1565 (s), 1420 (m), 1348 (m), 1167 (m), 1024 (s), 1004 (m), 657 (m).

1-methyl-1-nitrosourea (4)



The reaction was carried out slightly modified to Arndt *et al.*^[1].

Methylurea (1.00 g, 13.5 mmol, 1 eq) was dissolved in H_2O (8 mL). NaNO_2 (1.02 g, 14.9 mmol, 1.1 eq) was added at 0°C and aq. HCl (1.9 mL, 18.5 mmol, 1.4 eq) was added dropwise to the reaction mixture. The precipitated solid was filtered off, washed with H_2O and dried *in vacuo*. The product was obtained as a white solid (0.86 g, 8.31 mmol, 62%).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ = 8.15 (s, 1H, NH), 7.82 (s, 1H, NH), 3.06 (s, 3H, NCH_3).

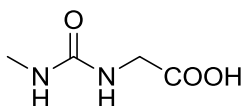
$^{13}\text{C-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ = 150.08 (1C, CO), 48.64 (s, 1C, NCH_3).

HRMS (EI^+): calc. for $[\text{C}_2\text{H}_5\text{N}_3\text{O}_2]$ 103.0383, found: 103.0374 [M].

mp: 108°C

IR (cm^{-1}): $\tilde{\nu}$ = 3377 (w), 3245 (w), 1722 (m), 1604 (m), 1457 (m), 1417 (s), 1369 (m), 1206 (m), 1086 (m), 974 (s), 841 (m), 775 (m), 641 (s).

(Methylcarbamoyl)glycine (9a)



The reaction was carried out slightly modified to Machinami *et al.*^[2].

Glycine (150 mg, 2.00 mmol) was dissolved in 10% NaOH (1mL) and methylisocyanate (150 μ L, 2.42 mmol, 1.2 eq; prepared by thermal cleavage of 3-methyl-1,1-diphenylurea^[3])

was added to the solution at 0°C. The reaction mixture was stirred for 3 hours at room temperature before the pH was adjusted to 2-3 with Amberlite IR-120 (H⁺-type). The reaction mixture was freeze-dried to obtain a white powder (261 mg, 1.98 mmol, 99%). The crude product could be used without further purification.

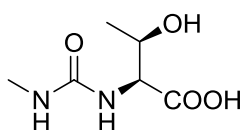
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 6.10 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H, NHCH₂), 6.02 (q, *J* = 4.8 Hz, 1H, NHCH₃), 5.75 (s, 1H), 3.65 (d, *J* = 5.5 Hz, 2H, CH₂), 2.54 (d, *J* = 4.6 Hz, 3H, NCH₃).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 173.10 (1C, COOH), 158.99 (1C, CON₂), 42.14 (1C, CH₂), 26.77 (1C, NCH₃).

HRMS (ESI): calc. for [C₄H₇N₂O₃]⁻: 131.0462, found: 131.0462 [M-H]⁻.

IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3354 (w), 2976 (w), 2936 (w), 2359 (br., w), 1708 (m), 1623 (s), 1552 (s), 1413 (m), 1223 (m), 1185 (s), 1185 (m), 1122 (s) 1077 (w), 1014 (w) 949 (w), 904 (w), 862 (w), 761 (w).

3-hydroxy-2-(3-methylureido)butanoic acid (9b)



The reaction was carried out slightly modified to Machinami *et al.* [2].

Threonine (238 mg, 2.00 mmol) was dissolved in 10% NaOH (1 mL) and methylisocyanate (150 μ l, 2.42 mmol, 1.2 eq; prepared by thermal cleavage of 3-methyl-1,1-diphenylurea^[3]) was added to the solution at 0°C. The reaction mixture was stirred for 3 hours at room temperature before the pH was adjusted to 2-3 with Amberlite IR-120 (H⁺-type). The reaction mixture was freeze-dried to obtain a white powder (348 mg, 1.98 mmol, 99%). The crude product could be used without further purification.

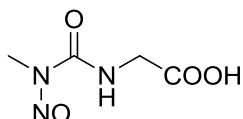
¹H-NMR (400 MHz, D₂O) δ = 4.32 (m, 1H, CHOH), 4.23 (m, 1H, CHNHCOOH), 2.69 (s, 3H, NCH₃), 1.19 (d, *J*=6.4 Hz, 3H, CHCH₃).

¹³C-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 173.58 (s, 1C, COOH), 158.66 (s, 1C, N₂CO), 65.31 (s, 1C, CHCOOH), 56.67 (s, 1C, CHOH), 24.01 (s, 1C, NCH₃), 16.58 (s, 1C, CHCH₃).

HRMS (ESI): calc. for [C₆H₁₁N₂O₄]⁻ 175.0724, found: 175.0723 [M-H]⁻.

IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3368 (w), 2976 (w), 2938 (w), 1701 (s), 1528 (m), 1483 (m), 1405 (m), 1224 (m), 1163 (s), 1127 (m), 1079 (m) 981 (s), 923 (m), 841 (w), 781 (s), 663 (m).

(Methyl(nitroso)carbamoyl)glycine (10a)



The reaction was carried out slightly modified to Machinami *et al.* [2].

(Methylcarbamoyl)glycine (754 mg, 5.71 mmol, 1 eq) was dissolved in water (10 mL) and acetic acid (1.0 mL). NaNO₂ (393 mg, 5.71 mmol, 1 eq) was added at 0°C. The reaction mixture was stirred for 4 h before the pH was adjusted to 3 using Dowex 50WX8-100. The reaction mixture was freeze-dried to obtain a light-yellow solid (735 mg, 4.68 mmol, 82%). The crude product could be used without further purification.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 9.00 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H, NH), 3.94 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H, CH₂), 3.11 (s, 2H, NCH₃).

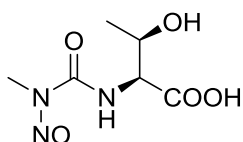
¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-d₆) δ = 170.85 (s, 1C, COOH), 153.47 (s, 1C, CONHCH₃), 42.01 (s, 1C, CH₂), 27.04 (s, 1C, NCH₃).

HRMS (ESI⁺): calc. for [C₄H₆N₃O₄]⁺ 160.0364, found: 160.0362 [M-H]⁺.

mp: 115°C

IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3310 (w), 2943 (w), 2578 (w), 1723 (m), 1689 (s), 1537 (m), 1489 (s), 1434 (m), 1404 (m), 1348 (w), 1258 (m), 1174 (s), 1109 (w), 1067 (m), 1025 (m), 922 (s), 988 (m), 849 (m), 786 (m), 766 (m), 703 (m).

3-hydroxy-2-(3-methyl-3-nitroureido)butanoic acid (10b)



The reaction was carried out slightly modified to Machinami *et al.* [2].

3-hydroxy-2-(3-methylureido)butanoic acid (99.0 mg, 0.56 mmol, 1 eq) was dissolved in water (5 mL) and acetic acid (0.5 mL). NaNO₂ (58.2 mg, 0.84 mmol, 1.5 eq) was added at 0°C. The reaction mixture was stirred for 4 h before the pH was adjusted to 3 using Dowex 50WX8-100. The reaction mixture was freeze-dried to obtain a yellow oil (110 mg, 0.54 mmol, 95%). The crude product could be used without further purification.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 8.05 (d, *J*=1.20, 1H, NH), 4.36 (dd, *J* = 8.7, 3.1 Hz, 1H, CHOH), 4.25 (qd, *J* = 6.4, 3.1 Hz, 1H CHNHCOOH), 3.31 (s, 3H, NCH₃), 1.18 (d, *J*=6.4, 3H, CHCH₃).

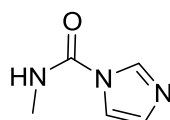
¹³C-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 172.08 (s, 1C, COOH), 153.72 (s, 1C, N₂CO), 66.69 (s, 1C, CHCOOH), 59.90 (s, 1C, CHOH), 27.51 (s, 1C, NCH₃), 21.04 (s, 1C, CHCH₃).

HRMS (ESI⁻): calc. for [C₆H₁₀N₃O₅]⁻ 204.0626, found: 204.0624 [M-H]⁻.

IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3394 (w), 2979 (w), 2938 (w), 1701 (m), 1528 (s), 1483 (m), 1405 (s), 1350 (m), 1291 (m), 1224 (w), 1163 (m), 1127 (s), 1079 (w), 981 (m), 923 (m), 874 (s), 841 (m), 781 (m), 753 (m), 663.

Synthetic access to amino acid-urea-compounds

***N*-methyl-1H-imidazole-1-carboxamide (12)**



The reaction was carried out slightly modified to Duspara *et al.*^[4].

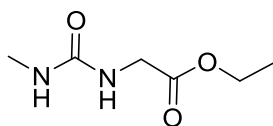
CDI (15.0 g, 92.5 mmol, 1.1 eq) was dissolved dry DMF (14 mL) and dry ACN (41 mL). MeNH₂Cl (5.68 mg, 84.1 mmol, 1.5 eq) was added. After stirring the mixture at rt for 3 h the solvent was removed *in vacuo*. The crude product was purified by column chromatography (DCM : MeOH, 19:1 → 17:3) to afford the product as a white solid (9.87 g, 78.9 mmol, yield: 94%).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 8.20 (bs, 1H), 7.73 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H, NH), 7.48 (t, *J* = 1.5 Hz, 1H), 7.01 (dd, *J* = 1.5, 0.9 Hz, 1H), 2.99 (d, *J* = 4.6 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 149.81 (s, 1C, CO), 135.87 (s, 1H, C_{Ar}), 129.74 (s, 1H, C_{Ar}), 116.73 (s, 1H, C_{Ar}), 27.49 (s, 1C, NCH₃).

HRMS (ESI⁺): calc. for [C₅H₈N₃O]⁺: 126.0662, found: 126.0664 [M+H]⁺.

Ethyl (methylcarbamoyl)glycinate (**13**)



N-methyl-1*H*-imidazole-1-carboxamide **12** (3.00 g, 23.9 mmol, 2.0 eq) was dissolved in DCM (60 mL). Ethyl glycinate hydrochloride (1.67 g, 11.9 mmol, 1.5 eq) and NEt₃ (3.32 mL, 23.9 mmol, 2.0 eq) were added. After stirring the mixture at rt for 18 h the solvent was removed *in vacuo*. The crude product was purified by column chromatography (DCM : MeOH, 9:1, 0.1 % NEt₃) to afford the product as a white solid (9.87 g, 78.9 mmol, yield: 94%).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 6.21 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H, NH), 6.01 (q, *J* = 4.8 Hz, 1H, NHCH₃), 4.07 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂), 3.73 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H, CH₂NH), 2.54 (d, *J* = 4.6 Hz, 3H, NHCH₃), 1.18 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₃).

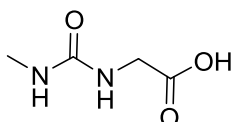
¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-d₆) δ = 171.31 (s, 1C, COOEt), 158.53 (s, 1C, N₂CO), 60.17 (s, 1C, OCH₂), 41.56 (s, 1C, NHCH₂), 26.36 (s, 1C, NCH₃), 14.16 (s, 1C, CH₃).

HRMS (ESI⁺): calc. for [C₆H₁₃N₂O₃]⁺: 161.0924, found: 161.0921 [M+H]⁺.

mp: 83 °C

IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3341 (m), 2936 (w), 1754 (m), 1635 (m), 1575 (s), 1479 (m), 1456 (w), 1424 (w), 1407 (m), 1370 (m), 1283 (m), 1183 (s), 1115 (m), 1065 (m), 1019 (s), 910 (w), 870 (w), 779 (w).

(Methylcarbamoyl)glycine (**9a**)



Ethyl (methylcarbamoyl)glycinate **13** (0.98 g, 6.12 mmol, 1.0 eq) was dissolved in 10% KOH (5.0 mL). After stirring the mixture at rt 1 h it was treated with Amberlite IR 120 (H⁺ type) and the solvent was removed *in vacuo*. The product could be afforded as a white solid (0.53 g, 3.99 mmol, yield: 65%).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 6.12 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H, NHCH₂), 6.01 (q, *J* = 4.9 Hz, 1H, NHCH₃), 3.67 (q, *J* = 5.9 Hz, 2H, CH₂), 2.54 (d, *J* = 4.6 Hz, 3H, NCH₃).

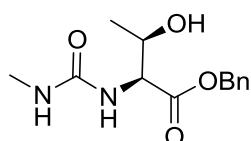
¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 172.73 (s, 1C, COOH), 158.64 (s, 1C, N₂CO), 41.60 (s, 1C, CH₂), 26.39 (s, 1C, NCH₃).

HRMS (ESI): calc. for [C₄H₇N₂O₃]⁻: 131.0462, found: 131.0462 [M-H]⁻.

mp: 144°C

IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3390 (m), 3367 (m), 2363 (br., w), 1959 (br., w), 1707 (m), 1600 (s), 1550 (s), 1496 (m), 1442 (s), 1414 (m), 1354 (m), 1234 (s), 1087 (m), 1040 (m), 1005 (m), 912 (m), 772 (w), 740 (w).

Benzyl (methylcarbamoyl)-L-threoninate (**15**)



N-methyl-1*H*-imidazole-1-carboxamide **12** (1.50 g, 11.9 mmol, 2.0 eq) was dissolved in DCM (30 mL). Threonine benzyl ester hydrochloride (1.48 g, 5.98 mmol, 1 eq) and NEt₃ (1.80 mL, 11.9 mmol, 2.0 eq) were added. After stirring the mixture at rt for 18 h the solvent was removed *in vacuo*. The crude product was purified by column chromatography (MeOH : Hex : EtOAc, 2:4.5:4.5) to afford the product as a white solid (0.78 mg, 4.45 mmol, yield: 74%).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 7.41 – 7.30 (m, 5H, H_{Ar}), 6.23 (q, *J* = 4.6 Hz, 1H, NHCH₃), 6.08 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, NH), 5.12 (s, 2H, CH₂C_{Ph}), 5.12 (d, *J* = 4.6 Hz, 1H, OH), 4.13-4.19 (m, 2H, CHOH, CHNH), 2.56 (d, *J* = 4.6 Hz, 3H, NCH₃), 1.07 (d, *J* = 6.1 Hz, 3H, CH₃).

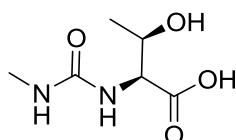
¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 172.02 (s, 1C, COOH), 158.70 (s, 1C, N₂CO), 136.20 (s, 1C, C_{Ph}), 128.41 (s, 2C, C_{Ph}), 127.93 (s, 1C, C_{Ph}), 127.65 (s, 2C, C_{Ph}), 66.57 (s, 1C, CHCOOH), 65.68 (s, 1C, CHOH), 26.21 (s, 1C, NCH₃), 20.48 (s, 1C, CHCH₃).

HRMS (ESI⁺): calc. for [C₁₃H₁₉N₂O₄]⁺: 267.1339, found: 267.1340 [M+H]⁺.

mp: 136°C

IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3467 (w), 3349 (w), 1707 (m), 1628 (s), 1588 (m), 1536 (w), 1500 (w), 1448 (w), 1377 (w), 1290 (s), 1127 (w), 1082 (m), 1021 (s), 870 (w), 727 (s), 692 (m).

(Methylcarbamoyl)-L-threonine (**9b**)



Benzyl (methylcarbamoyl)-L-threoninate **15** (0.10 g, 0.38 mmol, 1.0 eq) was dissolved in MeOH (5.0 mL). Pd/C (10.0 mg, 10 wt%) was added and the mixture was stirred in an H₂-

atmosphere. After 1 h the catalysator was filtered off and the solvent was removed *in vacuo* at 25°C. The product could be afforded as a colorless oil (58.0 mg, 0.33 mmol, yield: 88%).

¹H-NMR (400 MHz, D₂O) δ = 4.32 (m, 1H, CHOH), 4.23 (m, 1H, CHNHCOOH), 2.69 (s, 3H, NCH₃), 1.19 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H, CHCH₃).

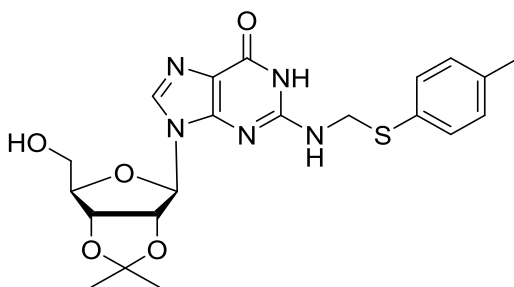
¹³C-NMR (400 MHz, D₂O) δ = 173.58 (s, 1C, COOH), 158.66 (s, 1C, N₂CO), 65.31 (s, 1C, CHCOOH), 56.67 (s, 1C, CHOH), 24.01 (s, 1C, NCH₃), 16.58 (s, 1C, CHCH₃).

HRMS (ESI): calc. for [C₆H₁₁N₂O₄]⁻ 175.0724, found: 175.0723 [M-H]⁻.

IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3354 (w), 2976 (w), 2936 (w), 1709 (m), 1622 (s), 1500 (m), 1550 (m), 1414 (m), 1277 (m), 1223 (m), 1185 (s), 1122 (m), 1077 (s), 1014 (m), 949 (w), 904 (w), 862 (m), 761 (w).

Synthesis of synthetic nucleoside standards

9-((3aR,4R,6R,6aR)-6-(hydroxymethyl)-2,2-dimethyltetrahydrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-4-yl)-2-(((p-tolylthio)methyl)amino)-1,9-dihydro-6H-purin-6-one (16)



The reaction was carried out slightly modified to Bridson *et al.*^[5]

2',3'-O-isopropylidene-guanosine (2.50 g, 7.73 mmol, 1 eq.) and p-thiocresole (1.25 g, 10.1 mmol, 1.3 eq.) were suspended in EtOH (60.0 mL). Acetic acid (1.9 mL) and formaldehyde (2.0 mL) were added to the suspension and the mixture was heated to 90°C. After 14 h the solvent was removed *in vacuo* and the crude product was washed with EtOH to afford the product as a white solid (2.75 g, 5.88 mmol, yield: 76%).

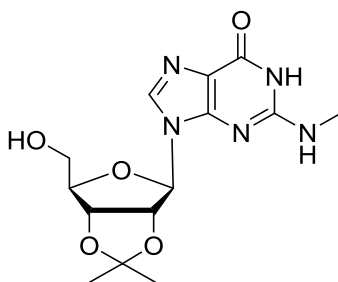
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 10.79 (s, 1H, N_{Ar}H), 7.95 (s, 1H, HC₈), 7.41 – 7.31 (m, 2H, *J* = 8.0 Hz, HC_{Ar}), 7.17 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, HC_{Ar}), 6.01 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H, HC1'), 5.36 (dd, *J* = 6.3, 2.7 Hz, 1H, HC2'), 5.02 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H, OH), 4.95 (dd, *J* = 6.3, 3.0 Hz, 1H, HC3'), 4.84 (h, *J* = 6.7, 6.3 Hz, 2H, CH₂C_{Ar}), 4.13 (td, *J* = 5.5, 3.0 Hz, 1H, HC4'), 3.54 (hept, *J* = 5.7 Hz, 2H, HC5'), 2.28 (s, 3H, C_{Ar}CH₃), 1.54 (s, 3H, CH₃), 1.35 (s, 3H, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 154.14 (C₆), 151.76 (C₂), 149.98 (C₄), 137.49 (C₈), 136.99 (C_{Ar}CH₃), 136.31 (C_{Ar}S), 131.43 (C_{Ar}S), 130.24 (2C, C_{Ar}), 118.02 (C₅), 113.49

(C(CH₃)₂), 89.17 (C1'), 87.10 (C4'), 83.75 (C2'), 81.74 (C3'), 61.99 (C5'), 46.71 (CH₂C_{Ar}), 27.41 (CH₃), 25.52(CH₃), 21.04 (C_{Ar}CH₃).

HRMS (ESI⁺): calc. for [C₂₁H₂₆N₅O₅S]⁺ 460.1649, found: 460.1650 [M+H]⁺.

9-((3aR,4R,6R,6aR)-6-(hydroxymethyl)-2,2-dimethyltetrahydrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-4-yl)-2-(methylamino)-1,9-dihydro-6H-purin-6-one (17)



The reaction was carried out slightly modified to Bridson *et al.*^[5]

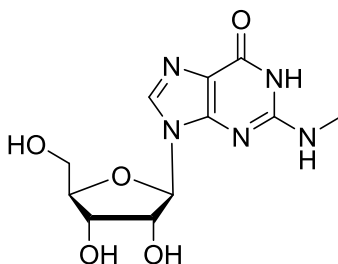
Compound **16** (0.65 g, 1.41 mmol, 1 eq.) was dissolved in DMSO (9.0 mL). NaBH₄ (0.11 g, 2.81 mmol, 2 eq.) was added and the mixture was heated to 100°C. After cooling to rt the mixture was purified by column chromatography (DCM : MeOH, 9:1) to afford the product as a white solid (0.41 g, 1.22 mmol, yield: 86%).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 10.80 (s, 1H, N_{Ar}H), 7.90 (s, 1H, HC8), 6.46 (m, 1H, NHCH₃), 6.00 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H, HC1'), 5.31 (dd, *J* = 6.2, 2.6 Hz, 1H, HC2'), 5.00 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H, OH), 4.95 (dd, *J* = 6.2, 3.0 Hz, 1H, HC3'), 4.12 (td, *J* = 5.5, 3.0 Hz, 1H, HC4'), 3.53 (m, 2H, HC5'), 2.82 (d, *J* = 4.6 Hz, 3H, NCH₃), 1.53 (s, 3H, CH₃), 1.32 (s, 3H, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, DMF-*d*₇) δ = 157.49 (C2), 154.08 (C6), 150.98 (C4), 136.86 (C8), 117.84 (C5), 113.59 (C(CH₃)₂), 89.79 (C1'), 87.52 (C4'), 84.22 (C2'), 82.17 (C3'), 62.50 (C5'), 27.88 (NCH₃), 27.03 (CH₃), 25.06 (CH₃).

HRMS (ESI⁺): calc. for [C₁₄H₂₀N₅O₅]⁺ 338.1457, found: 338.1459 [M+H]⁺.

9-((2R,3R,4S,5R)-3,4-dihydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl)-2-(methyl-amino)-1,9-dihydro-6H-purin-6-one (m²G, 18)



The reaction was carried out slightly modified to Ubiali *et al.*^[6]

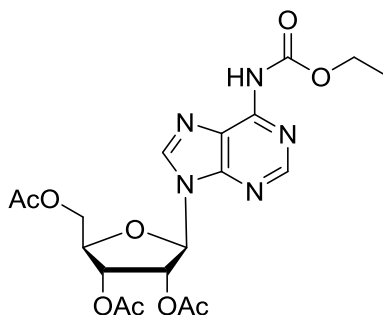
The protected nucleoside **17** (0.28 g, 0.83 mmol, 1 eq.) was dissolved in H₂O (25.0 mL) and TFA (25.0 mL). After stirring for 1.5 h the solvent was removed *in vacuo*. The residue was suspended in acetone and H₂O. The solvent was removed *in vacuo* and the crude product was recrystallized in EtOH/ H₂O to yield the product as a white solid (0.16 mg, 0.54 mmol, yield: 65%).

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ = 10.77 (s, 1H, N_{Ar}H), 7.95 (s, 1H, HC8), 6.28 (d, ³J = 5.0 Hz, 1H, NH), 5.73 (d, ³J = 6.0 Hz, 1H, HC1'), 4.52 (t, J = 5.5 Hz, 1H, HC2'), 4.12 (dd, J = 5.1, 3.4 Hz, 1H, HC3'), 3.88 (d, J = 3.9 Hz, 1H, HC4'), 3.75 – 3.45 (m, 2H, HC5'), 2.81 (d, ³J = 4.7 Hz, 3H, NCH₃).

¹³C-NMR (101 MHz, CD₃OD) δ = 156.77 (C6), 153.29 (C2), 150.97 (C4), 136.15 (C8), 116.65 (C5), 86.79 (C1'), 85.31 (C4'), 73.39 (C2'), 70.55 (C3'), 61.60 (C5'), 27.74 (NCH₃).

HRMS (ESI⁺): calc. for [C₁₁H₁₆N₅O₄]⁺ 298.1146, found: 298.1142 [M+H]⁺.

Ethyl 9-(2',3',5'-tri-O-acetyl- β -D-ribofuranosyl)-9H-purine-6-carbamate (**19**)^[7]



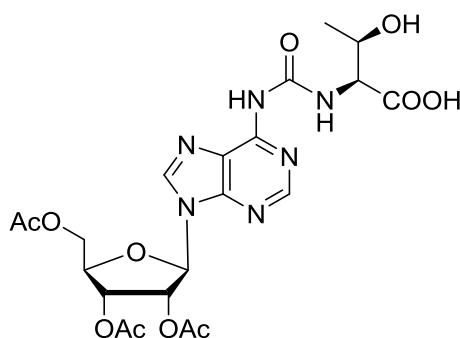
Acetyl protected adenosine (2.00mg, 5.08 mmol, 1 eq) was dissolved in absolute pyridine (37 mL) and cooled to 0°C. Ethyl chloroformate (33.8 μ L, 0.35 mmol, 3 eq) was then added dropwise with stirring during 30 min. The mixture was allowed to warm to rt and stirred overnight. The solvent was removed *in vacuo* by co-evaporation with toluene and the crude product was purified by column chromatography (DCM : MeOH, 100:1) to afford the product as a colorless foam (1.05 g, 2.26 mmol, yield: 44%).

¹H NMR: (400 MHz, DMSO-d₆) δ : 10.56 (s, 1H, NH), 8.66 (s, 1H, HC8), 8.65 (s, 1H, HC2), 6.31 (d, J=5.3, HC1'), 6.06 (t, 1H, J = 5.6 Hz, HC2'), 5.65 (t, 1H, J = 5.6 Hz, HC3'), 4.46-4.33 (m, 2H, HC4', HC5'^a), 4.32-4.22 (m, 1H, HC5'^b), 4.18 (q, 1H, J = 7.1 Hz, CH₂), 2.12 (s, 3H, OAc), 2.04 (s, 3H, OAc), 2.00 (s, 3H, OAc), 1.26 (7, 3H, J=7.1, CH₃).

¹³C NMR: (101 MHz, DMSO-d₆) δ: 170.03 (COCH₃), 169.45 (COCH₃), 169.28 (COCH₃), 152.21 (C(NH)(OCH₂CH₃)) 151.92 (C6), 151.41(C2), 150.11 (C4), 143.16 (C8), 123.93 (C5), 85.76 (C1'), 79.53 (C4'), 71.90 (C2'), 69.99 (C3'), 62.72 (C5'), 61.02 (CH₂), 20.49 (COCH₃), 20.38 (COCH₃), 20.21 (COCH₃), 14.37 (CH₃).

HRMS (ESI⁺): calc. for [C₁₉H₂₄N₅O₉]⁺ 466.1569, found: 466.1569 [M+H]⁺.

2-(3-(9-((2R,3R,4R,5R)-3,4-diacetoxy-5-(acetoxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl)-9H-purin-6-yl)ureido)-3-hydroxybutanoic acid (20)



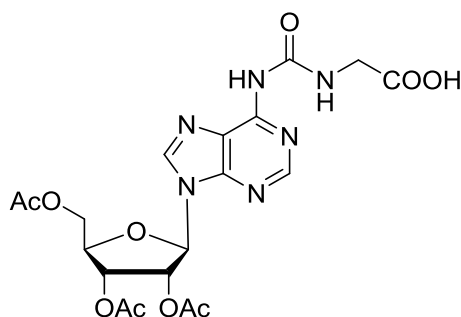
Carbamate **19** (0.30 g, 0.64 mmol, 1 eq) was dissolved in absolute pyridine (30 mL) and L-threonine (0.15 g, 1.29 mmol, 2 eq) was added. The mixture was stirred under reflux for 6 h and cooled down to room temperature. Excess of L-threonine was removed by filtration and the. The solvent was removed *in vacuo* by co-evaporation with toluene and the crude product was recrystallized in EtOH to afford the product as a white solid (0.29 g, 0.54 mmol, yield: 84%).

¹H NMR: (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 9.92 (s, 1H, COOH), 9.68 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, NH), 8.66 (s, 1H, HC8), 8.58 (s, 1H, HC2), 6.31 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H, HC1'), 6.04 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H HC2'), 5.62 (dd, *J* = 5.9, 4.4 Hz, 1H, HC3'), 4.48 – 4.36 (m, 2H, CHOH, CHNH), 4.36 – 4.13 (m, 3H, HC5',HC4'), 2.14 (s, 3H, OAc), 2.04 (s, 3H, OAc), 2.03 (s, 3H, OAc), 1.15 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-d₆) δ = 172.85 (COOH), 170.53 (COCH₃), 169.94 (COCH₃), 169.74 (COCH₃), 154.12 (CON₂), 151.61 (C2), 150.94 (C6), 150.56 (C4), 143.09 (C8), 121.00 (C5), 86.07 (C1'), 80.11 (COH), 72.42 (C4'), 70.50 (C2'), 66.65 (C3'), 63.26 (CHCOOH), 59.09 (C5'), 21.26 (COCH₃), 20.99 (COCH₃), 20.86 (COCH₃), 20.67 (CH₃) ppm.

HRMS (ESI⁺): calc. for [C₂₁H₂₇N₆O₁₁]⁺ 539.1732, found: 539.1736 [M+H]⁺.

((9-((2R,3R,4R,5R)-3,4-diacetoxy-5-(acetoxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl)-9H-purin-6-yl)carbamoyl)glycine (21)

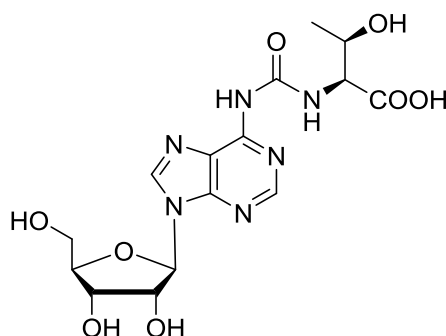


Carbamate **19** (0.75 g, 1.61 mmol, 1 eq) was dissolved in absolute pyridine (60 mL) and L-glycine (0.24 g, 3.22 mmol, 2 eq) was added. The mixture was stirred under reflux for 7 h and cooled down to room temperature. Excess of glycine was removed by filtration and the solvent was removed *in vacuo* by co-evaporation with toluene and the crude product was recrystallized in EtOH to afford the product as a white solid (0.24 g, 0.50 mmol, yield: 31%).

¹H NMR: (400 MHz, **DMSO-d₆**) δ: 12.69 (s, 1H, COOH), 9.99 (s, 1H, NH), 9.61 (bs, 1H, NH), 8.65 (s, 1H, HC8), 8.59 (s, 1H, HC2), 6.30 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H, HC1'), 6.03 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H HC2'), 5.63 (t, *J* = 5.3, 1H, HC3'), 4.45 – 4.38 (m, 2H, HC5'), 4.31 – 4.20 (m, 1H, HC4'), 3.99 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H, CH₂), 2.12 (s, 3H, COCH₃), 2.04 (s, 3H, COCH), 2.01 (s, 3H, COCH).

HRMS (ESI+): calc. for [C₁₉H₂₃N₆O₁₀]⁺ 495.1470, found: 495.1466 [M+H]⁺.

t⁶A (22)



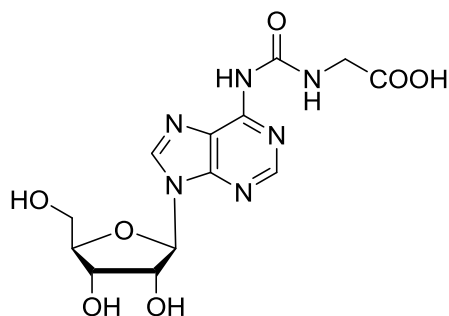
Protected nucleoside **20** (0.17 g, 0.32 mmol, 1 eq) was dissolved in 7 N Ammonia in MeOH (8 mL). The mixture was heated to 40°C for 1 h and then stirred overnight at rt. The solvent was removed *in vacuo* and the crude product was recrystallized in EtOH to afford the product as a white solid (0.97 g, 0.24 mmol, yield: 75%).

¹H NMR: (400 MHz, **DMSO-d₆**) δ: 9.61 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H, NH), 8.64 (s, 1H, HC8), 8.52 (s, 1H, HC2), 5.98 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H, HC1'), 4.59 (t, *J* = 5.3 Hz, 1H HC2'), 4.18 (t, *J* = 4.1 Hz, 1H, HC3'), 4.06 – 4.01 (m, 2H, CHOH, CHNH), 3.96 (q, *J* = 3.8 Hz, 1H, HC4'), 3.63 (ddd, *J* = 48.7, 12.0, 4.0 Hz, HC5'), 1.00 (d, *J* = 6.1 Hz, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-d₆) δ = 172.61 (COOH), 153.21 (CON₂), 151.42 (C2), 150.83 (C6), 150.62 (C4), 142.49 (C8), 120.80 (C5), 88.13 (C1'), 86.08 (COH), 74.22 (C4'), 70.69 (C2'), 66.48 (C3'), 61.70 (C5'), 58.86 (CHCOOH), 19.89 (CH₃) ppm.

HRMS (ESI⁺): calc. for [C₁₅H₂₁N₆O₈]⁺ 413.1415, found: 413.1415 [M+H]⁺.

g⁶A (21)



Protected nucleoside **21** (202 mg, 0.41 mmol, 1 eq) was dissolved in 7 N Ammonia in MeOH (10 mL). The mixture was heated to 40°C for 1 h and then stirred overnight at rt. The solvent was removed *in vacuo* and the crude product was recrystallized in EtOH to afford the product as a white solid (74.0 mg, 0.20 mmol, yield: 49%).

¹H NMR: (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 9.55 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H, NH), 8.66 (s, 1H, HC8), 8.54 (s, 1H, HC2), 5.99 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H, HC1'), 4.18 (dd, *J* = 4.9, 3.7 Hz, 1H HC2'), 3.97 (t, *J* = 4.1 Hz, 1H, HC3'), 3.78 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H, HC4'), 3.64 (ddd, *J* = 48.7, 12.0, 4.0 Hz, HC5').

¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-d₆) δ = 171.67 (COOH), 153.51 (C2), 151.34 (C6), 150.74 (C4), 142.56 (C8), 120.73 (C5), 88.14 (C1'), 86.14 (C4'), 74.24 (C2'), 70.73 (C3'), 61.73 (C5'), 43.85 (CH₂) ppm.

HRMS (ESI⁺): calc. for [C₁₃H₁₇N₆O₇]⁺ 369.1153, found: 369.1152 [M+H]⁺.

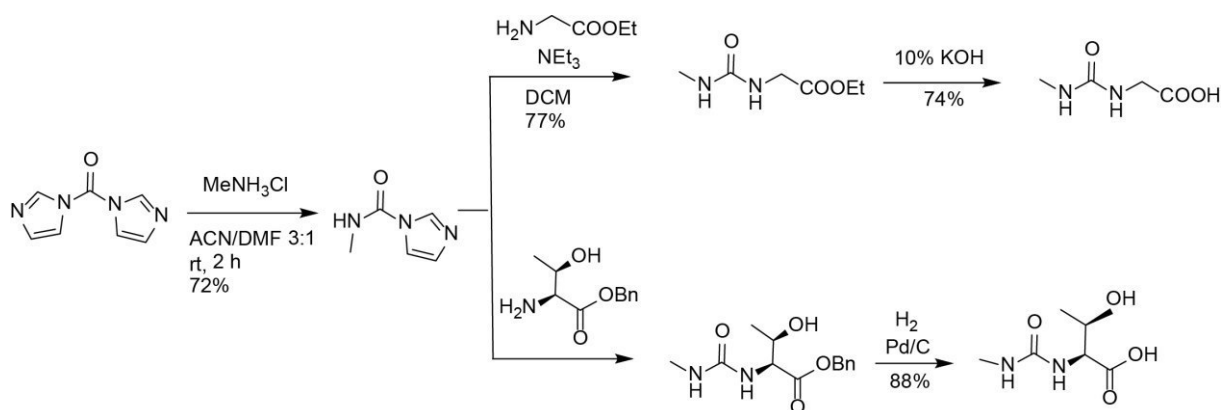


Figure S 1: Reaction scheme of the organic synthesis of the amino acid urea compounds.

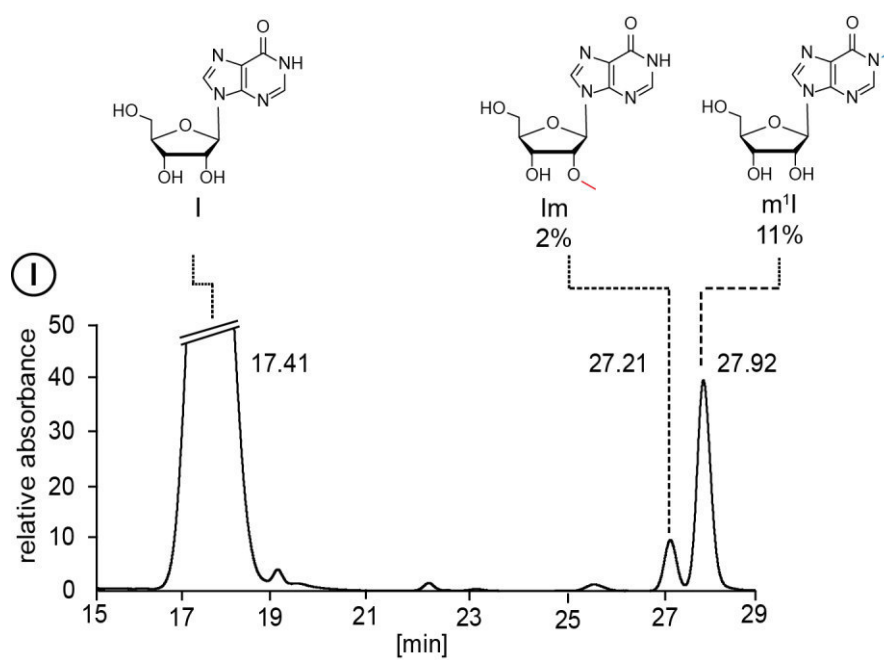


Figure S 2: UV-chromatogram (at 260 nm) of the reaction of Inosine with *N*-methyl-*N*-nitroso-urea under prebiotic conditions.

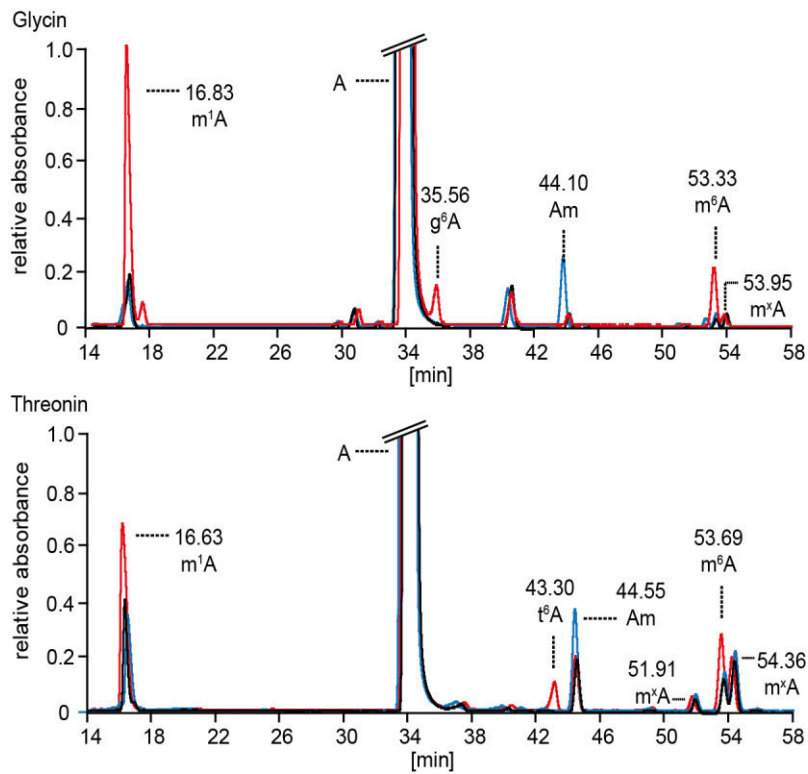


Figure S 3: UV-chromatogram (at 260 nm) of the reaction of Adenosine with amino acid-nitroso compounds under prebiotic conditions. Chromatogram of the reaction itself is shown in black, coinjections of the different modifications are shown in blue and red.

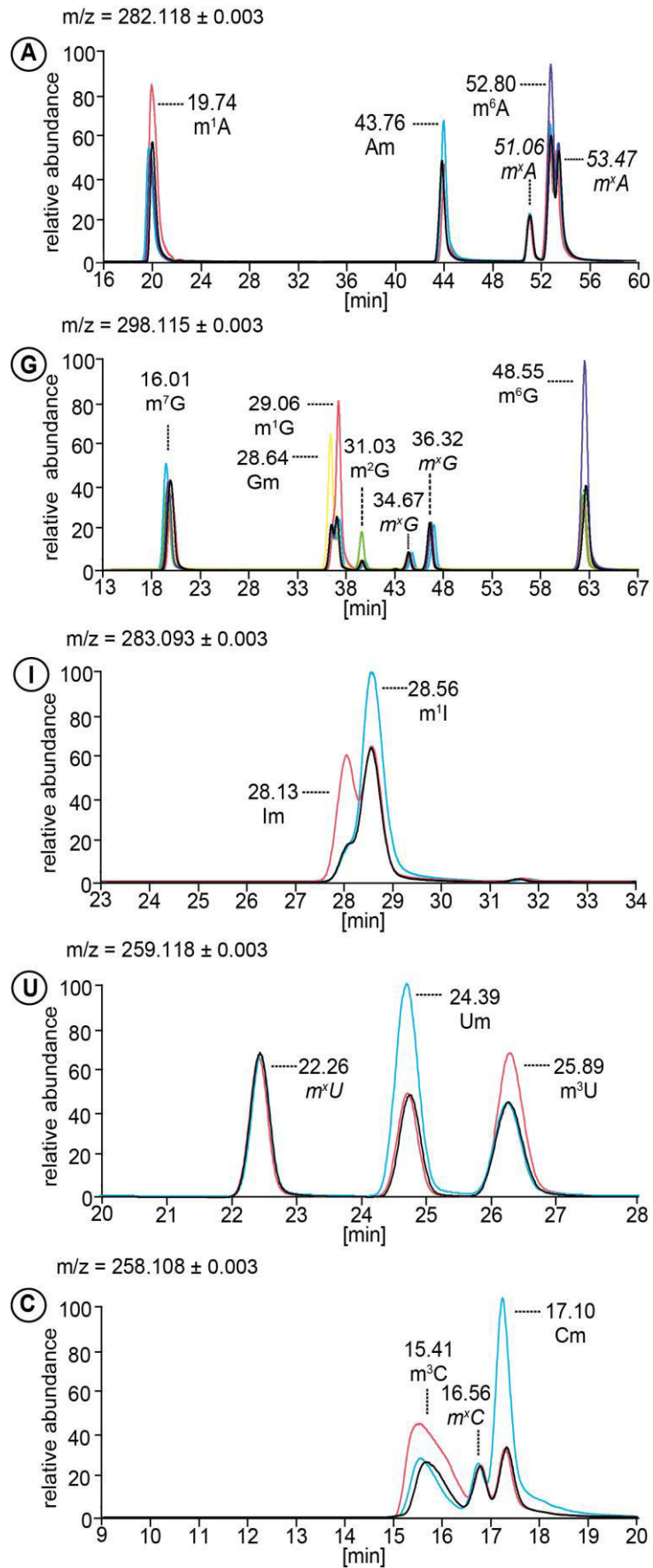


Figure S 4: MS-chromatogram of the reaction of the different canonical nucleosides and Inosine with *N*-methyl-*N*-nitroso-urea (black) and the coinjections with synthetic standards (red, blue, yellow).

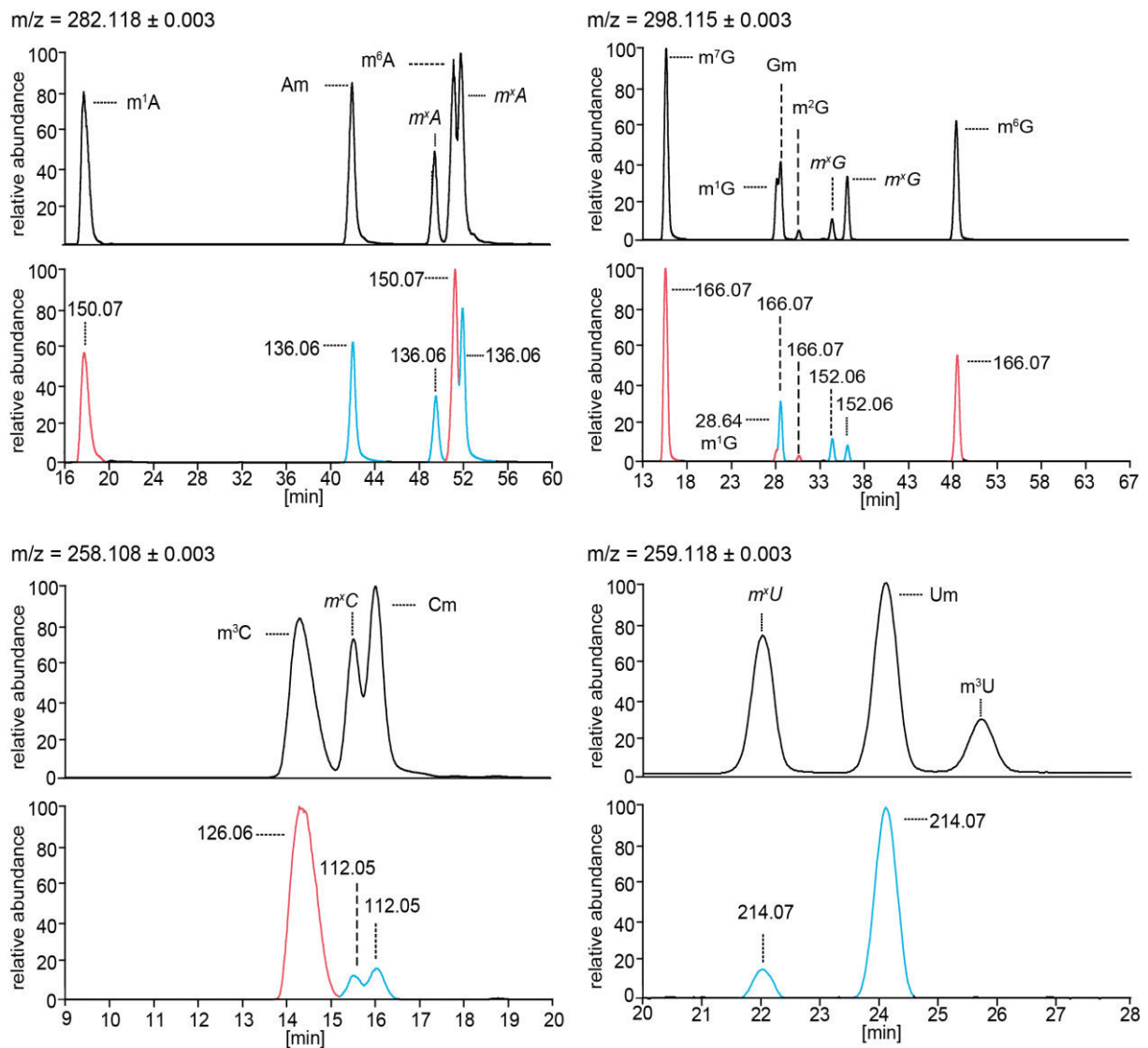


Figure S 5: Fragmentation studies of the methylation products of the prebiotic reaction of *N*-methyl-*N*-nitroso-urea with the canonical nucleosides. Sugar modified nucleosides are shown in blue, and the nucleosides with a methylation at the base in red. The numbers represent the base peak of the modification.

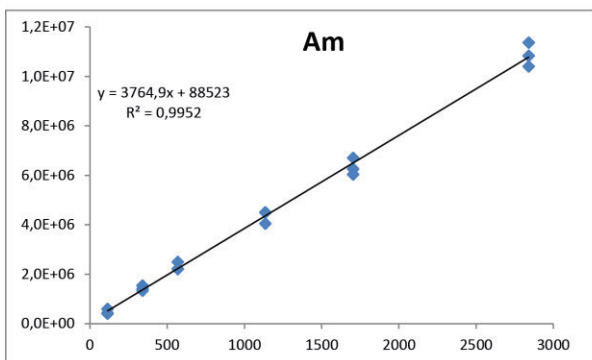
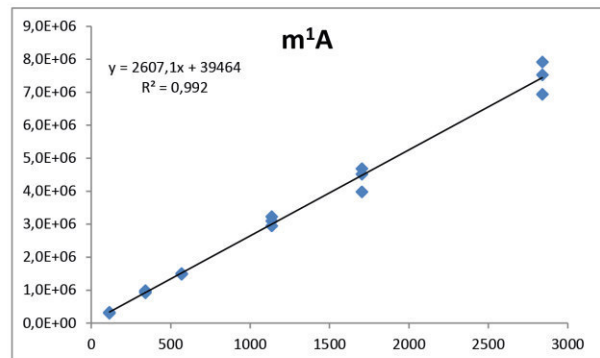
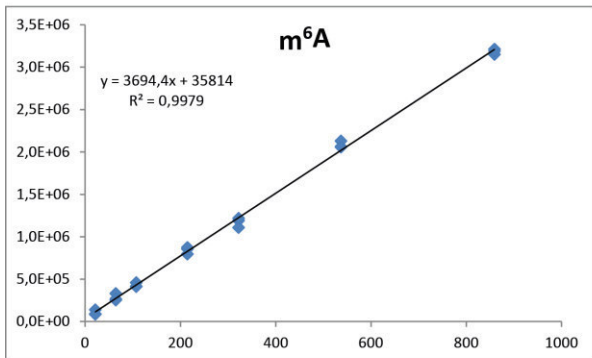
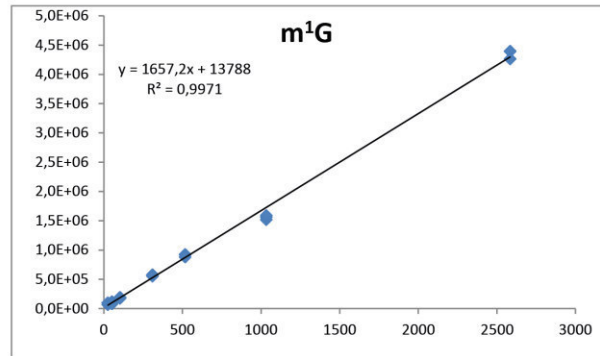
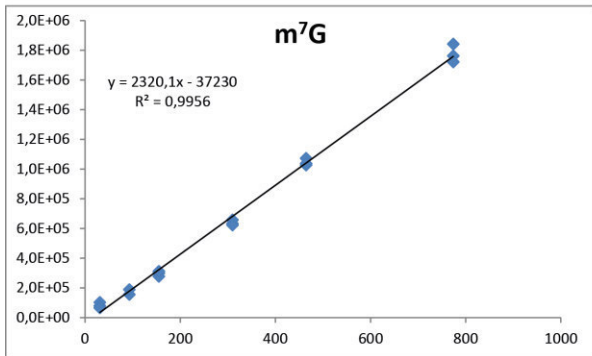
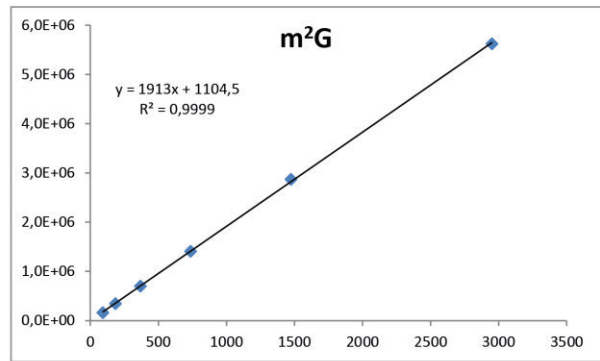
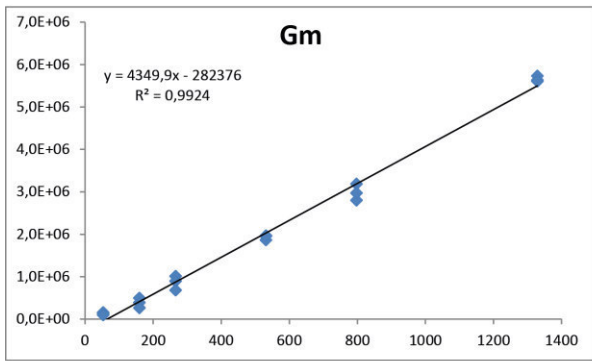


Figure S 6: Calibration curves at 260 nm for quantification of modified A and G nucleosides from UV-signals.

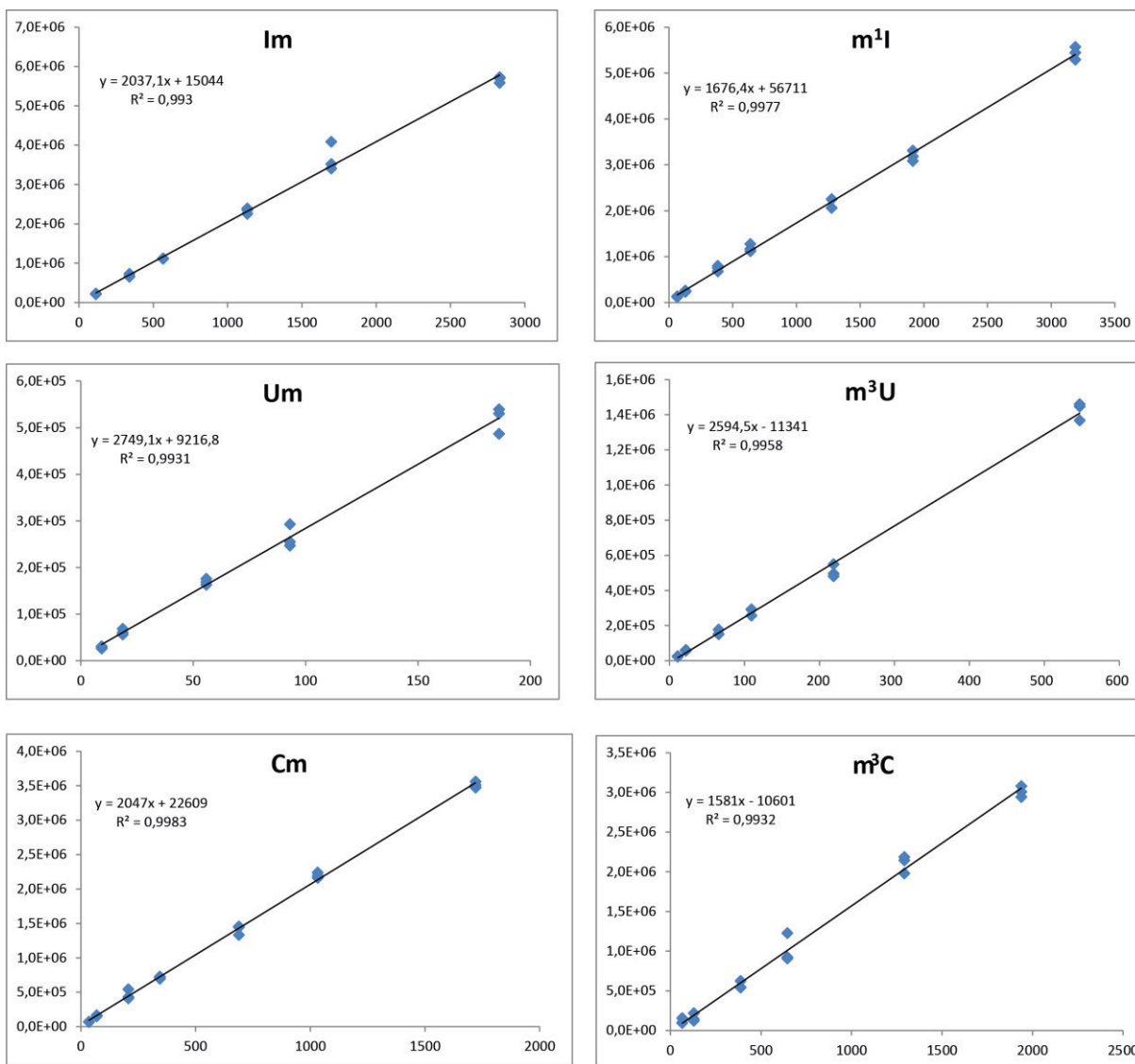


Figure S 7: Calibration curves at 260 nm for quantification of modified C, U and I nucleosides from UV-signals.

Literature:

- [1] F. Arndt, *Org. Synth.* **1943**, 3-3.
- [2] T. Machinami, T. Suami, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1975**, 48, 1333-1334.
- [3] F. U. Richter, *Chem. Eur. J.* **2009**, 15, 5200-5202.
- [4] P. A. Duspara, M. S. Islam, A. J. Lough, R. A. Batey, *J. Org. Chem.* **2012**, 77, 10362-10368.
- [5] P. K. Bridson, C. B. Reese, *Bioorg. Chem.* **1979**, 8, 339-349.
- [6] D. Ubiali, C. D. Serra, I. Serra, C. F. Morelli, M. Terreni, A. M. Albertini, P. Manitto, G. Speranza, *Adv. Synth. Catal.* **2012**, 354, 96-104.
- [7] M. Matuszewski, E. Sochacka, *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2014**, 24, 2703-2706.

4. Unveröffentlichte Ergebnisse

4.1. Alternativer Zugang zu aminoacetylierten Adenosin-Derivaten

4.1.1. Prolog

Wie in Kapitel 1.8. beschrieben, gibt es nicht nur die vier kanonischen RNA-Nukleoside, sondern darüber hinaus auch über 120 Modifikationen. Diese Modifikationen können von einfachen Methylierungen bis hin zu komplexen Veränderungen der Nucleobasen reichen.^[158] Da diese Modifikationen hypothetisch schon im LUCA vorhanden gewesen sein könnten,^[5] stellt sich die Frage, wann und wie diese nicht-kanonischen Nucleoside entstanden sind.

Es gibt zwei verschiedene Möglichkeiten Nucleosid-Modifikationen auf präbiotische Weise einzuführen. Es können entweder die Vorläufer-Moleküle modifiziert (Vorläuferpfad) oder die kanonischen Nucleoside selbst zur Reaktion gebracht werden (Post-Modifikations-Pfad). Die beiden Reaktionsmöglichkeiten sind in Abbildung 17 schematisch dargestellt.

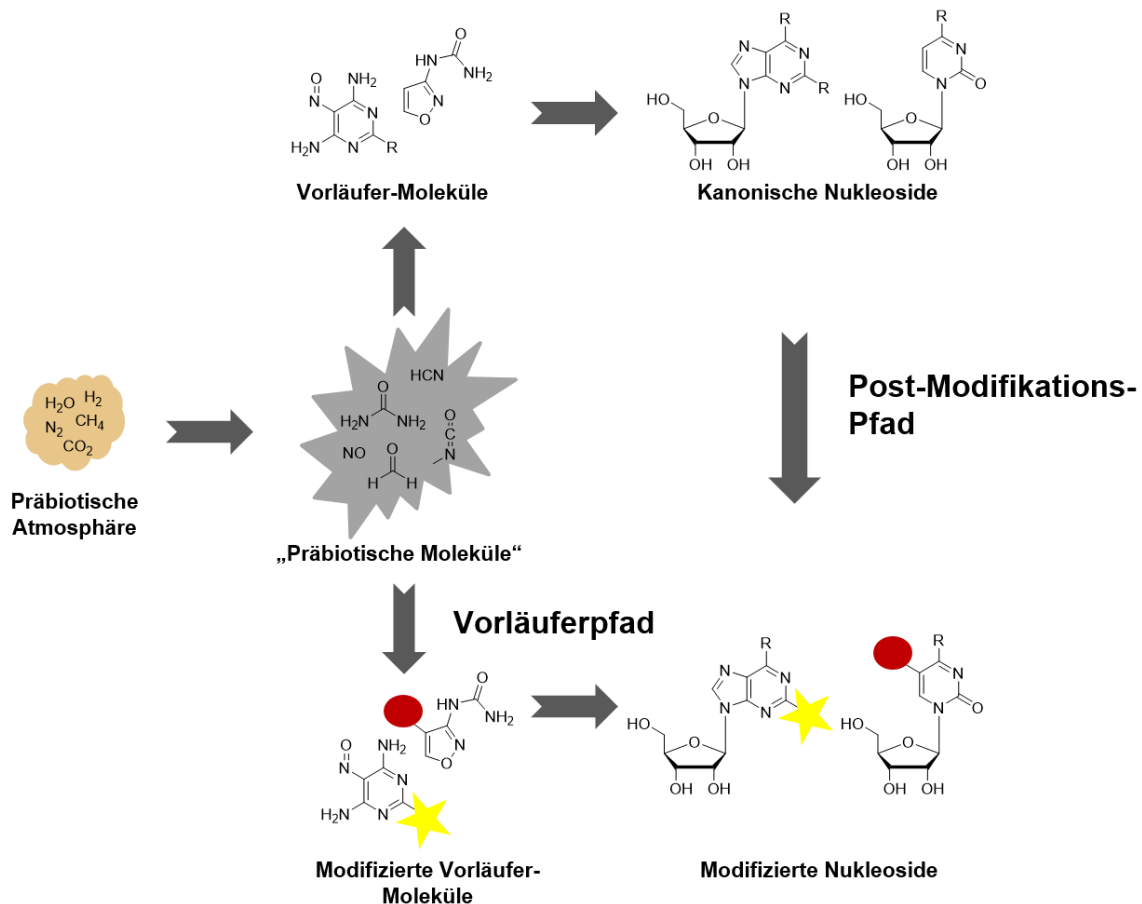


Abbildung 17: Schematische Darstellung der verschiedenen Reaktionswege für die präbiotische Einführung von Modifikationen an RNA-Nucleoside. Es können entweder die kanonischen Nucleoside modifiziert werden (Post-Modifizierung) oder deren Vorläufermoleküle (Vorläuferpfad).

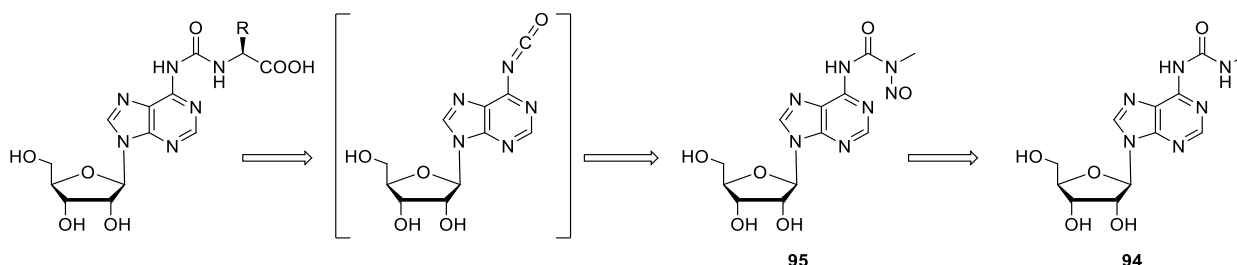
4. Unveröffentlichte Ergebnisse

In der Veröffentlichung in Kapitel 3.1. wurde bereits ein erster präbiotischer Zugang zu methylierten Purinen gezeigt, bei welchem die Vorläufermoleküle (Formamidopyrimidine, FaPys, **30**) modifiziert wurden.^[30] In der Publikation in Kapitel 3.3. konnte die Anzahl der methylierten Purine durch die Einführung einer Post-Modifikation noch gesteigert und darüber hinaus auf methylierte Pyrimidine ausgeweitet werden.^[208] In diesem Fall wurde nitrosylierter Methylharnstoff **92** verwendet um die Methylierungen durchzuführen. Durch eine Weiterentwicklung dieses Reaktionsweges auf Harnstoff-Aminosäure-Derivate konnten auch Aminosäure-modifizierte Nucleoside, wie die biologisch bekannten Modifikationen t⁶A **81** und g⁶A **93**, erhalten werden. Bei diesen Modifikationen ist der Stickstoff an Position N⁶ über eine Harnstoff-Bindung mit den Aminosäuren Threonin **88** bzw. Glycin **82** verknüpft. Da es allerdings zu Nebenreaktionen durch die Hydroxylgruppen von Adenosin **3** mit den Aminosäure-Derivaten kam, ist die Ausbeute dieses Reaktionsweges sehr gering. Daher sollten alternative Zugänge zu N⁶-modifizierten Adenosin-Derivaten geschaffen werden. Die alternativen Reaktionswege sollen auf derselben Chemie beruhen, allerdings sollte das Harnstoff-Derivat anstatt an der Aminosäure direkt am Nucleosid bzw. an dessen Vorläufermolekül angebracht werden.

4.1.2. Ergebnisse und Diskussion

4.1.2.1. Präbiotische Synthesen von N⁶-modifizierten-Adenosin-Derivaten

Wie im vorherigen Kapitel beschrieben, sollte die Ausbeute an N⁶-aminosäureacetylierten Adenosin-Verbindungen gesteigert werden. Dies sollte ausgehend von einem N⁶-Methylharnstoff-Adenosin-Derivat **94** erreicht werden. Diese Harnstoff-Bindung könnte analog zu den Aminosäure-Derivaten zu Nucleosid **95** nitrosyliert werden, um *in situ* unter basischen Bedingungen Isocyanate zu bilden. Die reaktiven Isocyanate können dann von Aminosäuren abgefangen werden. Die retrosynthetische Reaktionskaskade der Herstellung der amino-acetylierten Adenosin-Derivate ist in Schema 10 dargestellt.



Schema 10: Retrosynthetische Reaktionskaskade der präbiotischen Herstellung von amino-acetylierten Adenosin-Derivaten ausgehend von Methylharnstoff-Verbindungen wie **94**.

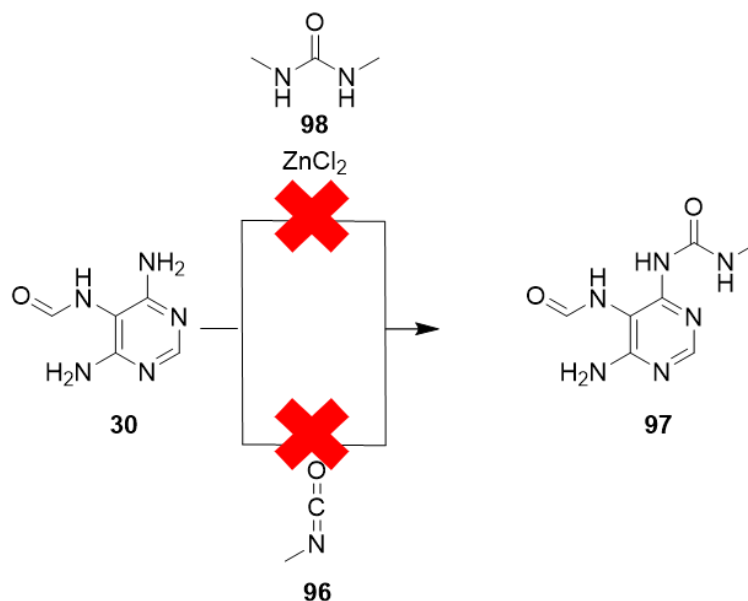
Für die Durchführung der präbiotischen Experimente kommen nur Substanzen in Frage, die auf der frühen Erde vorhanden gewesen sein könnten.^[14, 209] Dasselbe gilt auch für die

Lösungsmittel, weswegen die Reaktionen hauptsächlich in Wasser und Formamid oder unter lösungsmittelfreien Bedingungen durchgeführt werden.^[14, 123] Formamid ist unter präbiotischen Bedingungen durch die Reaktion von Blausäure **9** mit Wasser zugänglich.^[210]

Im ersten Schritt sollten Wege gefunden werden am N^6 einer Methylharnstoff-Gruppe anzuknüpfen. Wie zuvor beschrieben gibt es verschiedene Möglichkeiten, Modifikationen einzuführen. Dies kann entweder direkt auf der Stufe der Nucleoside oder auf der Stufe der Vorläufermoleküle geschehen.

Im Falle der Purine haben *Carell* und seine Mitarbeiter 2016 einen präbiotischen Zugang zu Purinnucleosiden über Formamidopyrimidine (FaPys, **30**) veröffentlicht.^[72] Diese FaPys **30** können mit Ribose **1** reagieren und so unter basischen Bedingungen, durch zwei Ringschluss-Reaktionen, zu Adenosin **3** und Guanosin **4** umgesetzt werden (vgl. Kapitel 1.4.1.2.). In der Veröffentlichung in Kapitel 3.1. wurde gezeigt, dass die Verknüpfung von **30** und Ribose **1** auch möglich ist, wenn eines der exocyclischen Stickstoffatome modifiziert vorliegt.^[30]

Zur Einführung der Methylharnstoffgruppe wurde im Rahmen dieser Arbeit getestet, ob es möglich ist, die FaPy-Moleküle **30** zu modifizieren (Vorläuferpfad). Um einen der exocyclischen Stickstoffe in eine Methylharnstoffbindung umzuwandeln, wurde FaPy **30** mit Methylisocyanat **96** umgesetzt (vgl. Schema 12). **96** wurde auf dem Kometen 67P/Churyumov-Gerasimenko detektiert womit es möglicherweise auch auf unter den Bedingungen der frühen Erde existiert haben könnte.^[28, 209] Es war allerdings weder in Wasser noch in Formamid möglich, durch die Reaktion von **58** und Methylisocyanat **96** das gewünschte Produkt **97** zu erhalten, da die Formamid-Einheit unten den Reaktionsbedingungen nicht stabil war.



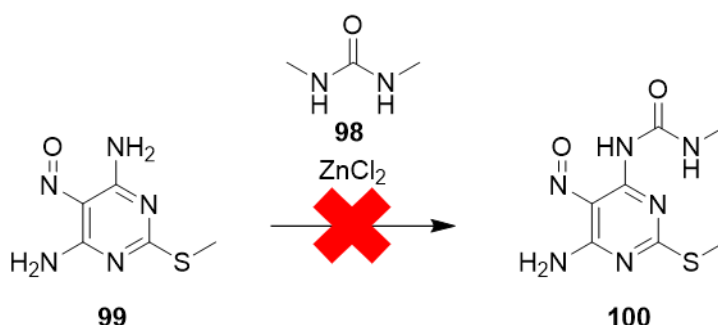
Schema 11: Versuche FaPy **30** mit Methylisocyanat **96** und *N,N*-Dimethylharnstoff **98** zum Methylharnstoff-derivatisiertem FaPy **97** umzusetzen.

4. Unveröffentlichte Ergebnisse

Eine alternative Methode sollte auf der Grundlage von unveröffentlichten Ergebnissen der Arbeitsgruppe *Carell* untersucht werden. Becker *et al.* setzen Isoxazole **13**, mögliche Vorläufermolekül für Pyrimidine, mit Harnstoff **45** in Gegenwart von ZnCl_2 um, womit sie die exocyclischen Amine in Harnstoff-Bindungen überführen konnten.^[211] Aus diesem Grund sollte getestet werden, ob FaPy **30** mit *N,N*-Dimethylharnstoff **98** zur Reaktion gebracht werden kann, um das modifizierte FaPy **97** zu erhalten (siehe Schema 11). **97** ist, analog zu *N*-Methylharnstoff **92**, auf der frühen Erde durch die Reaktion von Methylamin und Methylisocyanat **96** zugänglich. Zur Durchführung der Reaktion wurde FaPy **30** in 500 μL Wasser suspendiert und ZnCl_2 sowie *N,N*-Dimethylharnstoff **98** zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 48 h in einem offenem *Eppendorf*-Reaktionsgefäß auf 95 °C erhitzt. Erste LC-MS-Analysen der Mischung zeigten allerdings keine Umsetzung.

Da es nicht möglich war **58** in das Methylharnstoff-derivatisierte FaPy **97** zu überführen, wurde versucht, die entsprechende Vorläufer-Verbindung zu modifizieren. In der Veröffentlichung in Kapitel 3.1. ist die Synthese der FaPy-Moleküle **30** durch die Reduktion und anschließende Formylierung von Nitrosopyrimidinen **99** dargestellt, wobei diese auch modifiziert vorliegen können.^[30] Im Rahmen dieser Arbeit wurde getestet, ob sowohl Reduktion als auch Formylierung noch möglich sind, wenn eines der exocyclischen Stickstoffatome in eine Methylharnstoffbindung eingebunden ist.

Nitrosopyrimidine **99** sind durch die Cyclisierung von Amidin-Malonondinitril-Salzen zugänglich, welche während der Nitrosylierung von Malonsäuredinitril in Gegenwart von Amidinen entstehen.^[30] In ersten Versuchen wurde getestet, ob Nitrosopyrimidin **99** mit *N,N*-Dimethylharnstoff **98** umgesetzt werden kann, um das modifizierte Nitrosopyrimidin **100** zu erhalten. **99** wurde entsprechend zu FaPy **30** in Schema 12 umgesetzt. Allerdings konnte auch in diesem Fall nach 48 h mittels LC-MS kein Produkt nachgewiesen werden.



Schema 12: Versuche Nitrosopyrimidin **99** mit ZnCl_2 und *N,N*-Dimethylharnstoff **98** zum Methylharnstoff-derivatisierten Nitrosopyrimidin **100** umzusetzen.

Auch Versuche das Nitrosopyrimidin **99** in Wasser mit Methylisocyanat **93** zur Reaktion zu bringen lieferte keine Umsetzung. Die Hydrolyse von **96** verläuft vermutlich schneller als die

Reaktion mit dem Nitrosopyrimidin. Unter lösungsmittelfreien Bedingungen konnte ebenfalls keine Bildung des Produkts beobachtet werden. Wurde die Reaktion allerdings in Formamid durchgeführt, konnte die Entstehung des gewünschten Nitrosopyrimidins **100** mittels LC-MS detektiert werden. Das UV-Chromatogramm der entsprechenden Reaktion ist in Abbildung 18 dargestellt. Nach 5 h war die Reaktion noch nicht vollständig abgelaufen und es konnte noch Edukt **99** in der Reaktionsmischung detektiert werden. Wird die Reaktion allerdings länger bei 60°C gerührt, bildet sich zunehmend das doppelt-reagierte Nitrosopyrimidin **101**. Das Proton der entstehenden Amid-Gruppe des Nitrosopyrimidins **100** ist azider als die Protonen der NH₂-Gruppe des Edukts **99**, weshalb **100** schnell weiterreagieren kann. Die Reaktion wurde auch bei geringeren Temperaturen durchgeführt, allerdings konnte kein besseres Ergebnis erzielt werden, da das Nitrosopyrimidins **99** bei geringeren Temperaturen eine sehr viel schlechtere Löslichkeit besitzt. Zwar scheint die Ausbeute von 11 % zunächst gering zu sein, allerdings muss die Auswirkung eines potenziell vollständigen Umsatzes von Nitrosopyrimidin **99** zu **100** in Betracht gezogen werden. In diesem Falle wären nur noch modifizierte Vorläufermoleküle auf der frühen Erde vorhanden gewesen, wodurch kanonische Nucleoside nicht mehr zugänglich gewesen wären.

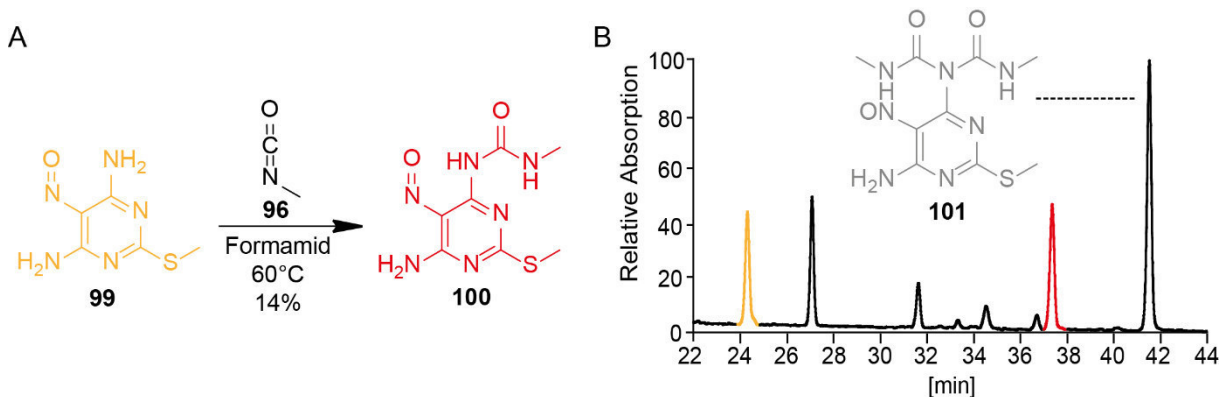


Abbildung 18: Präbiotische Herstellung von Nitrosopyrimidin **100**. A: Umsetzung von Nitrosopyrimidin **99** (gelb) mit Methylisocyanat **96** zum Methyl-Harnstoff-Derivat **100** (rot). B: UV-Chromatogramm der entsprechenden Reaktion. Als Nebenprodukt entsteht unter anderem das doppelt-substituierte Nitrosopyrimidin **101** (grau).

Im darauffolgenden Schritt wurde das entstandene Nitrosopyrimidin **100**, wie in Abbildung 18A dargestellt, zu den Formamidopyrimidin **97** und **102** reduziert und formyliert. Die Reaktion wurde in 20 % Ameisensäure in Gegenwart von 44 Äquivalenten Nickel in einer Wasserstoffatmosphäre durchgeführt. Abhängig von der Reaktionszeit konnte entsprechend der Publikation in Kapitel 3.1. das desulfonierte FaPy **97** oder das thiomethylierte Derivat FaPy **102** erhalten werden.^[30] Wurde die Probe nach 2 h entnommen, lag das reduzierte FaPy **102** mit einer Ausbeute von 64 % vor, wohingegen nach 4 h fast nur noch FaPy **97**, mit einer Ausbeute von 74 %, vorlag.

4. Unveröffentlichte Ergebnisse

Um das Nukleosid **94** zu erhalten, musste FaPy **97** im nächsten Schritt mit Ribose **1** zur Reaktion gebracht werden.^[30, 72] Das Reaktionsschema ist in Abbildung 19 dargestellt.

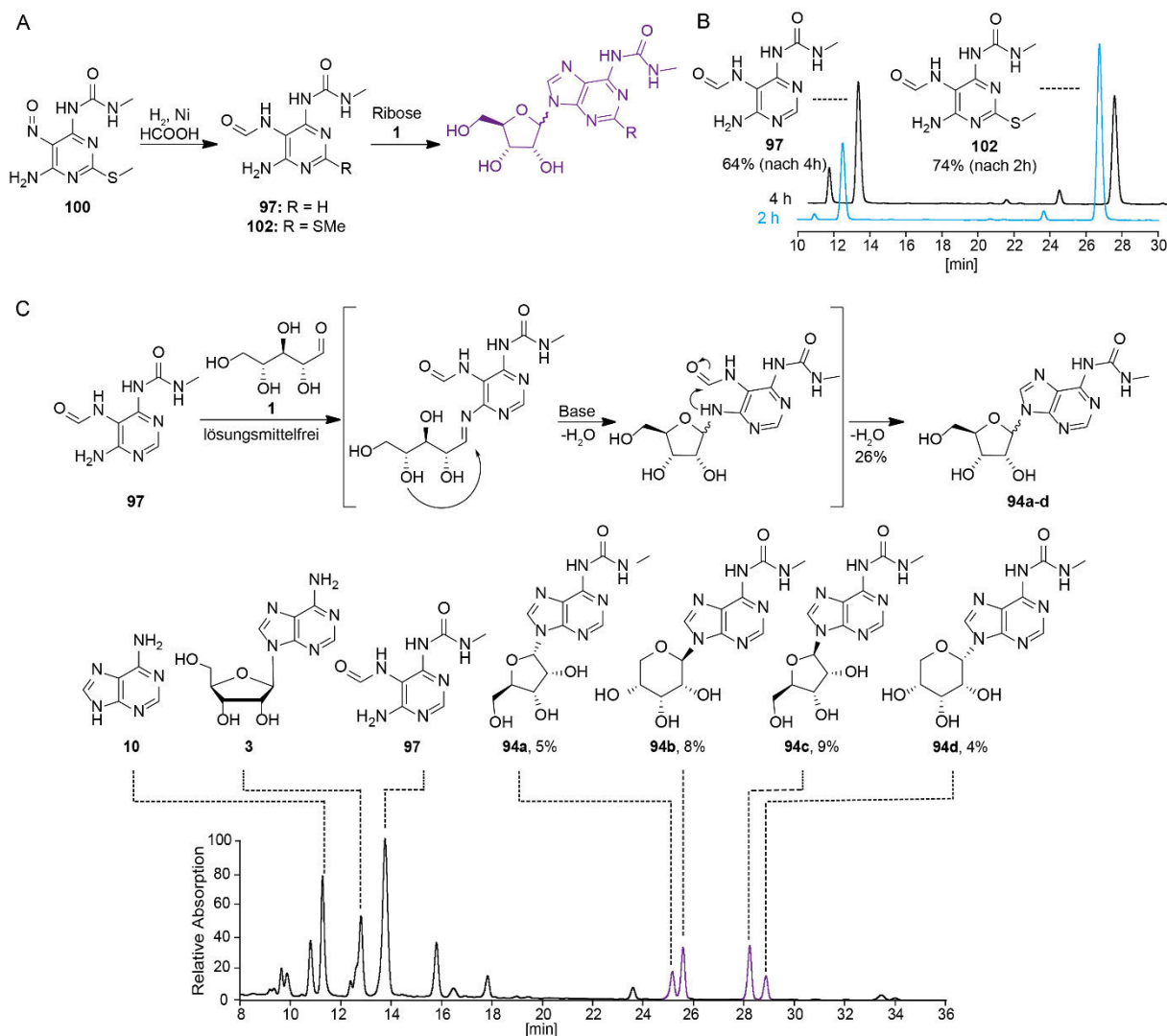


Abbildung 19: Präbiotischer Zugang zu **94a-d** ausgehend von Nitrosopyrimidin **100**. A: Reaktionsschema der präbiotischen Umsetzung. B: UV-Chromatogramm der Reduktion und Formylierung des Nitrosopyrimidins **100** zu FaPys **97** und **102**. C: Mechanismus und UV-Chromatogramm der Reaktion von FaPy **97** mit Ribose **1** und anschließender Nukleosid-Bildung.

Die beiden Feststoffe wurden miteinander zermörkert und anschließend in einem Druckrohr ohne Lösungsmittel für 8 h bei 100°C erhitzt. Durch das Imin-Intermediat, welches anschließend in einer Ringschluss-Reaktion zu den Formamidopyrimidin-Ribosiden umgewandelt wurde. Analog zur Synthese der kanonischen Purine können auch hier sowohl die Furanosid- als auch die Pyranosid-Verbindungen entstehen.^[72] Durch einen nukleophilen Angriff des exocyclischen Stickstoffs auf den Aldehyd unter schwach basischen Bedingungen wurde durch einen zweiten Ringschluss die modifizierte Nucleobase aufgebaut und dadurch die Isomere **94a-d** erhalten. Die Gesamtausbeute der Methylharnstoff-derivatisierten Adenosin-Verbindungen **94a-d** betrug 26%. Die Ausbeute an furanosidischen Nucleosiden

94a und **c** lag bei 14 %, wobei β -konfiguriertes Furanosid-Nukleosid **94c** mit einer Ausbeute von 9 % am stärksten gebildet wurde.

Die hier vorgestellte Reaktionskaskade liefert einen plausiblen Reaktionsweg um Methylharnstoff-modifiziertes Adenosin **3** auf präbiotische Weise, ausgehend von den Nukleosid-Vorläufermolekülen, herzustellen.

Im nächsten Schritt sollte herausgefunden werden, ob es möglich ist, die Nukleoside selbst in einer Postmodifikation direkt zu den Methylharnstoff-Derivaten umzusetzen. Dabei wurde zuerst getestet, ob die Umsetzung analog zum Manuskript in Kapitel 3.3. mit Harnstoff **45** in Gegenwart von ZnCl_2 möglich ist. Entsprechend zu der Reaktion von *Becker et al.* wurde Adenosin **3** mit *N,N*-Dimethylharnstoff **98** zur Reaktion gebracht, um das N^6 -modifizierte Nukleosid zu erhalten (vergleiche Abbildung 20).

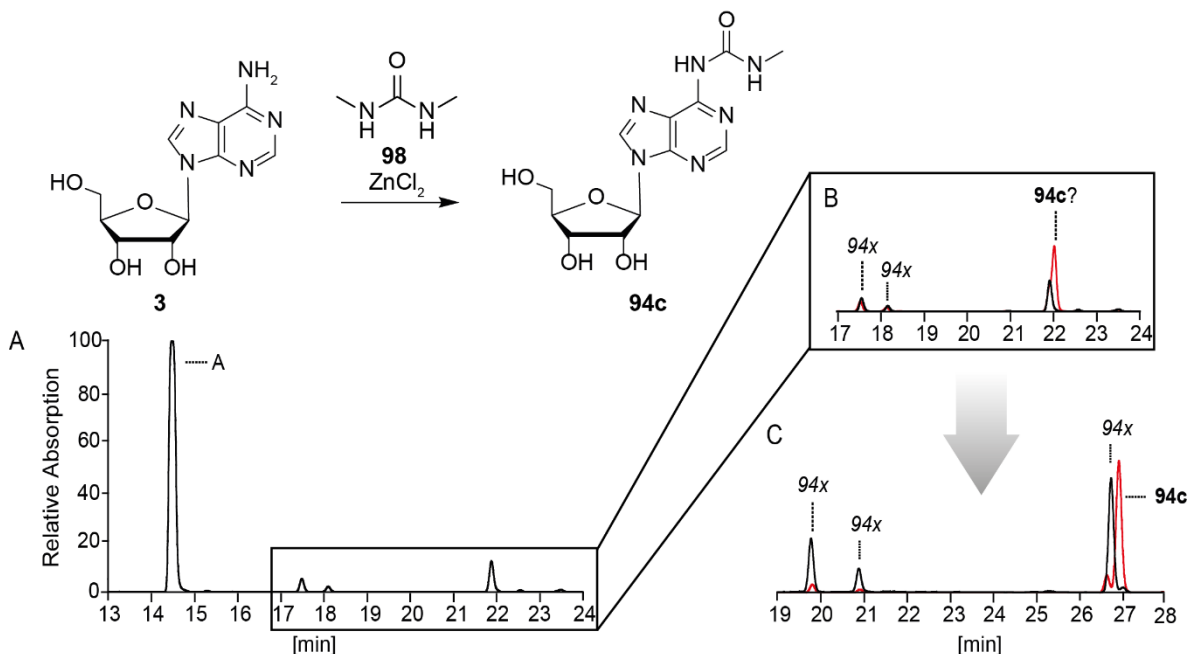


Abbildung 20: Reaktion von Adenosin **3** mit *N,N*-Dimethylharnstoff **98** in Gegenwart von ZnCl_2 . A: UV-Chromatogramm der Reaktion bei einem Gradienten von 0 \rightarrow 40 % Puffer B in 45 min (Säulentemperatur: 30 °C). B: UV-Chromatogramm der Reaktion und Co-Injektion des synthetischen Standards **94c** bei einem Gradienten von 0 \rightarrow 40 % Puffer B in 45 min (Säulentemperatur: 30 °C). C: Co-Injektion der präbiotischen Reaktion mit dem synthetischen Standard **94c**. C: UV-Chromatogramm der Reaktion bei einem Gradienten von 0 \rightarrow 25 % Puffer B in 45 min (Säulentemperatur: 40°C) inklusive Co-Injektion. **94x** steht für Signale mit demselben *m/z*-Verhältnis wie das Nukleosid **94c**.

Zur Durchführung der Reaktion wurde Adenosin **3** in H_2O suspendiert und ZnCl_2 sowie *N,N*-Dimethylharnstoff **98** zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 48 h in einem offenem *Eppendorf-Tube* auf 95°C erhitzt. LC-MS-Analysen der Mischung zeigten die Entstehung eines Moleküls, welches dieselbe exakte Masse wie **94c** besetzt. Allerdings zeigte die Co-Injektion mit dem synthetischen Standard eine minimale Verschiebung der Retentionszeit. Um herauszufinden, ob es sich bei dem Molekül um die gewünschte Modifikation handelt, wurde

4. Unveröffentlichte Ergebnisse

die Messung mit einem anderem Lösungsmittel-Gradienten sowie einer höheren Säulentemperatur wiederholt. Eine erneute Co-Injektions-Messung zeigte, dass es sich bei dem Molekül nicht um **94c** handelte. Durch Fragmentierungsstudien konnte nachgewiesen werden, dass die Reaktion vermutlich nicht an der Nukleobase, sondern am Zucker stattgefunden hat.

Als Alternative sollte analog zur Reaktion des Nitrosopyrimidins **99** in Abbildung 18 auch Adenosin **3** mit Methylisocyanat **93** umgesetzt werden, um die gewünschte Modifikation **94c** zu erhalten. Die Reaktion ist in Abbildung 21 dargestellt.

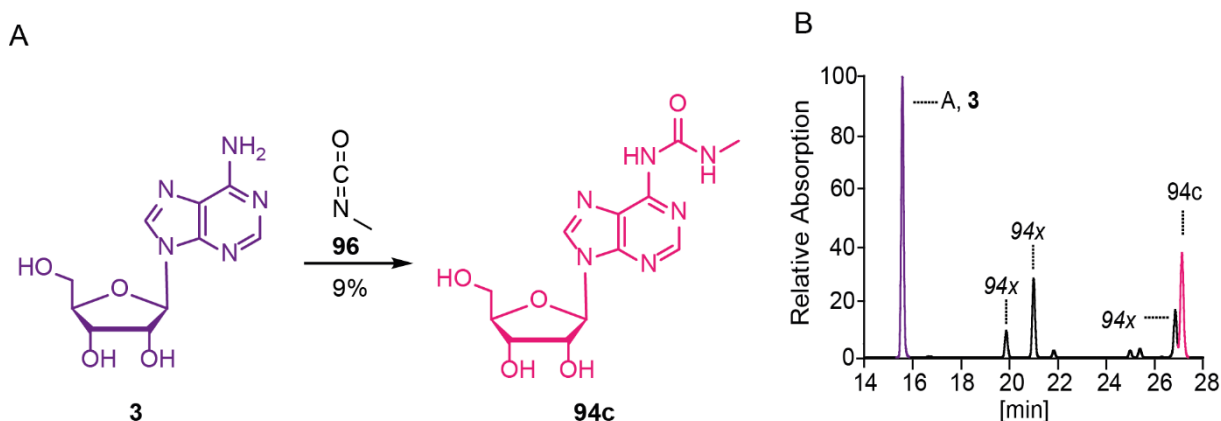


Abbildung 21: Präbiotische Herstellung von Methylharnstoff-derivatisiertem Adenosin **94c**. A: Reaktionsgleichung der Umsetzung von Adenosin **3** mit Methylisocyanat **96**. B: Das entsprechende UV-Chromatogramm der Reaktion. **94x** steht für Signale mit demselben m/z-Verhältnis wie das Nucleosid **94c**.

Wie bereits bei Nitrosopyrimidin **99** war es nicht möglich, die Reaktion mit Methylisocyanat **96** in wässriger Lösung oder im lösungsmittelfreien Zustand durchzuführen. Allerdings konnte die gewünschte Modifikation **94c** durch die Umsetzung von Adenosin **3** und **96** in Formamid in einer Ausbeute von 9 % erhalten werden, wobei nach einer Reaktionszeit von 2 h noch der Großteil von Adenosin **3** vorlag. Fragmentierungsstudien ließen vermuten, dass auch hier die entsprechenden Carbamate aus der Reaktion der Hydroxylgruppen von Adenosin **3** mit Methylisocyanat **96** als Nebenprodukte entstehen. Auch in diesem Fall erscheint die Ausbeute von 9 % im ersten Moment eher gering, allerdings muss auch hier in Betracht gezogen werden, dass es nicht plausibel wäre, wenn Adenosin **3** auf der frühen Erde vollständig zu **94c** reagiert, da das entsprechende kanonische Nucleosid dann nicht mehr verfügbar wäre.

Die durchgeführten Experimente zeigten, dass **94c** sowohl durch eine Post-Modifikation von Adenosin **3** als auch durch eine Modifikation der Adenosin-Vorläufermoleküle erhalten werden kann. Im nächsten Schritt wurde getestet, ob die Methylharnstoffbindung nitrosyliert werden kann und anschließend nach einer Isocyanat-Bildung mit Aminosäuren wie Glycin **82** und Threonin **88** reagiert. Die entsprechenden Reaktionen sind in Abbildung 22 dargestellt.

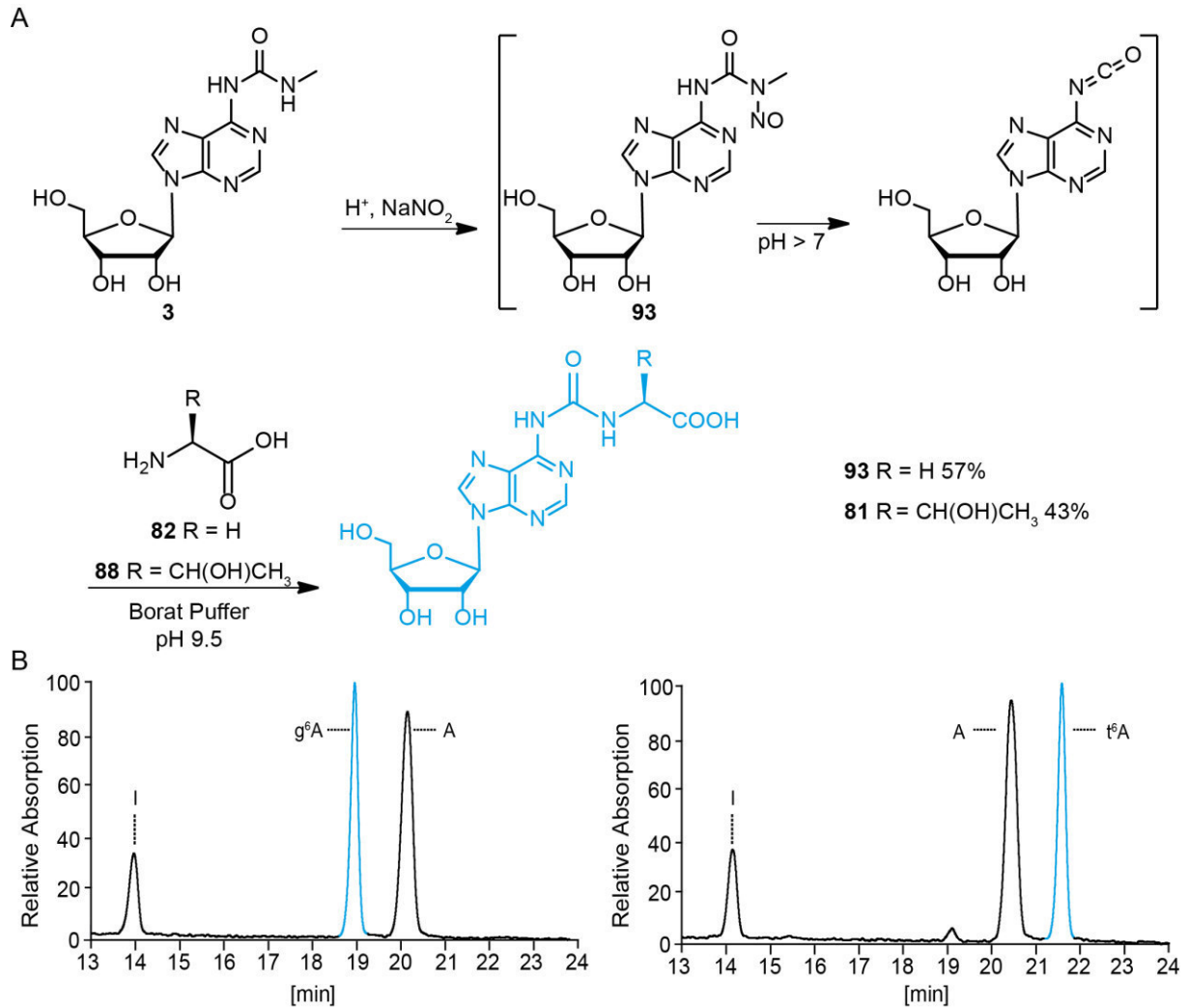


Abbildung 22: Präbiotische Synthese der Aminosäure-acetylierten-Adenosin-Derivate g^6A **93** und t^6A **81**. A: Reaktionsschema der Nitrosylierung von **94c** mit NaNO_2 und anschließende Isocyanat Bildung unter basischen Bedingungen. Das Isocyanat kann *in situ* von den Aminosäuren Glycin **82** oder Threonin **88** abgefangen werden. B: UV-Chromatogramme der Reaktion des nitrosylierten Nucleosids **94c** zu g^6A **93** und t^6A **81** (blau). Als Nebenprodukte entstehen Adenosin (A, **3**) und Inosin (I, **54**).

Die Nitrosylierung von **94c** erfolgte durch NaNO_2 unter sauren Bedingungen. NO_2^- war auf der frühen Erde potenziell durch Reaktion mit Wasser durch NO und NO_2 verfügbar.^[212] NO und NO_2 wiederum können in einer N_2 -Atmosphäre durch elektrische Entladung gebildet werden.^[213] Alternativ kann NO durch die Reaktion von N_2 mit CO_2 in Heißluftfahnen entstanden sein.^[214] In Tabelle 1 sind die getesteten Bedingungen für die Nitrosylierung dargestellt. Das beste Ergebnis konnte in 5- und 10%iger Phosphorsäure-Lösung durch abwechselndes Rühren bei 0°C und Inkubation bei -20°C erzielt werden. Diese Temperaturschwankungen sind durchaus auf der frühen Erde durch Tag- und Nacht-Zyklen vorstellbar.

4. Unveröffentlichte Ergebnisse

Tabelle 1: Verschiedene Reaktionsbedingungen für die Nitrosylierung der Methylharnstoffbindung.

Säure	Temperatur	Ergebnis
10 % Ameisensäure	rt	Keine Umsetzung
10 % Salzsäure	rt	Keine Umsetzung
	0°C/-20°C	Keine Umsetzung
5 % Salzsäure	rt	Keine Umsetzung
	0°C/-20°C	Keine Umsetzung
10 % Phosphorsäure	rt	Depurinierung
	0°C/-20°C	Nitrosylierung
5 % Phosphorsäure	rt	Depurinierung
	0°C/-20°C	Nitrosylierung

Nach 48 h wurde die Nukleosid-Mischung direkt in eine Lösung der entsprechenden Aminosäuren **80a** und **b** in Borat-Puffer gegeben und der pH-Wert mit NaOH auf 9.5 eingestellt. Die Reaktion war bereits nach einer Stunde abgeschlossen und die Aminosäure-Derivate konnten in guten Ausbeuten von 57 % (g⁶A, **93**) und 43 % (t⁶A, **81**) erhalten werden.

Im Vergleich zu den veröffentlichten Ergebnissen in Kapitel 3.3. konnte die Ausbeute der aminoacetylierten Nukleoside deutlich erhöht werden. Durch die Einführung einer Methylharnstoffbindung an Aminosäuren und anschließender Nitrosylierung konnten g⁶A **93** und t⁶A **81** nur in Spuren erhalten werden.^[208] Im Rahmen dieser Arbeit war es möglich verschiedene Reaktionskaskaden zu carbamoylierten Adenosin-Derivaten zu entwickeln. Die entsprechenden Derivate können sowohl durch Modifikation der Vorläufermoleküle (Vorläufer-Pfad) als auch durch direkte Derivatisierung von Adenosin **3** auf Grundlage derselben Chemie erhalten werden (Post-Modifikations-Pfad), womit sich die beiden Wege gegenseitig stützen und die präbiotische Zugänglichkeit von g⁶A **93** und t⁶A **81** erhöhen.

4.1.2.2. Präbiotische Synthese von thiomethylierten N^6 -modifizierten Adenosin-Derivaten

Im Weiteren sollte getestet werden, ob auch die biologisch relevante Modifikation $ms^{2t^6}A$ **103** auf analogem Wege erhalten werden kann. Im Vergleich zu t^6A **81** ist in $ms^{2t^6}A$ **103** die C²-Position zusätzlich durch eine Thiomethylgruppe modifiziert (siehe Abbildung 23).

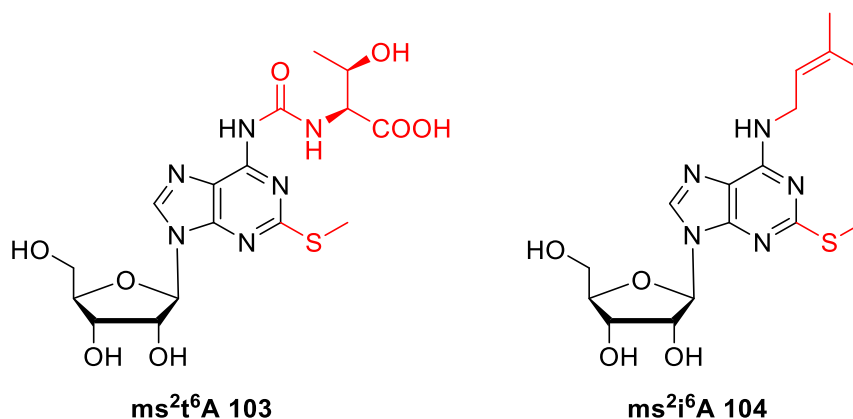


Abbildung 23: Strukturformeln der modifizierten Nucleoside $ms^{2t^6}A$ **103** und $ms^{2i^6}A$ **104**.

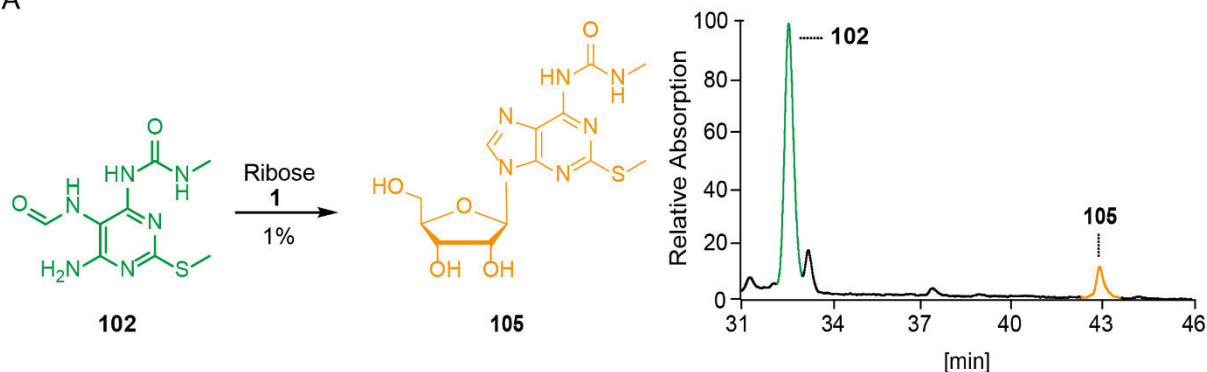
$ms^{2t^6}A$ **103** wurde unter anderem in tRNA aus Leberproben von Hasen auf Position 37 neben des Antikodons nachgewiesen, welche sonst oft durch t^6A **81** besetzt ist.^[215] Davis und seine Mitarbeiter fanden durch Schmelzpunktstudien heraus, dass $ms^{2t^6}A$ **103** die Basenpaarung von tRNA im Gegensatz zu t^6A **81** in höherem Ausmaß destabilisiert. Sie vermuten, dass die Thiomethyl-Gruppe, analog zur Modifikation $ms^{2i^6}A$ **104** (s. Abbildung 23), einen stabilisierenden Effekt auf die Anticodonschleife der tRNA hat.^[216, 217] Für den präbiotischen Zugang zu $ms^{2t^6}A$ **103** musste im ersten Schritt entsprechend zur Synthese der Adenosin-Modifikationen das methylharnstoff-modifizierte Nucleosid **105** hergestellt werden. **105** sollte im Anschluss ebenfalls zu **106** nitrosyliert und das unter basischen Bedingungen entstehende Isocyanat **107** mit den entsprechenden Aminosäuren abgefangen werden. Analog zum Zugang zu **94c** konnte der Zugang zu **105** sowohl ausgehend vom Nucleosid ms^2A **108** als auch von dessen Vorläufer-Molekül **102** getestet werden. Die entsprechenden Reaktionen sind in Abbildung 24 dargestellt.

Das Vorläufermolekül FaPy **102** konnte, wie in Abbildung 15 dargestellt, aus der Reduktion und anschließenden Formylierung des Nitrosopyrimidins **100** erhalten werden. Dabei war das gewünschte thiomethylierte Molekül nach 2 h in einer Ausbeute von 74 % vorhanden. Die Verknüpfung mit Ribose **1** erfolgte analog zu FaPy **97** unter lösungsmittelfreien Bedingungen bei 100 °C, wobei die beiden aufeinanderfolgenden Ringschlussreaktionen in Borat-Puffer nach 6 Tagen vollständig abgelaufen waren. Die gewünschte Modifikation **105** konnte allerdings nur mit einer Ausbeute von 1 % erhalten werden. Die geringe Ausbeute ist

4. Unveröffentlichte Ergebnisse

vermutlich auf die schlechte Löslichkeit von FaPy **102** in der Schmelze der Ribose **1** zurückzuführen.

A



B

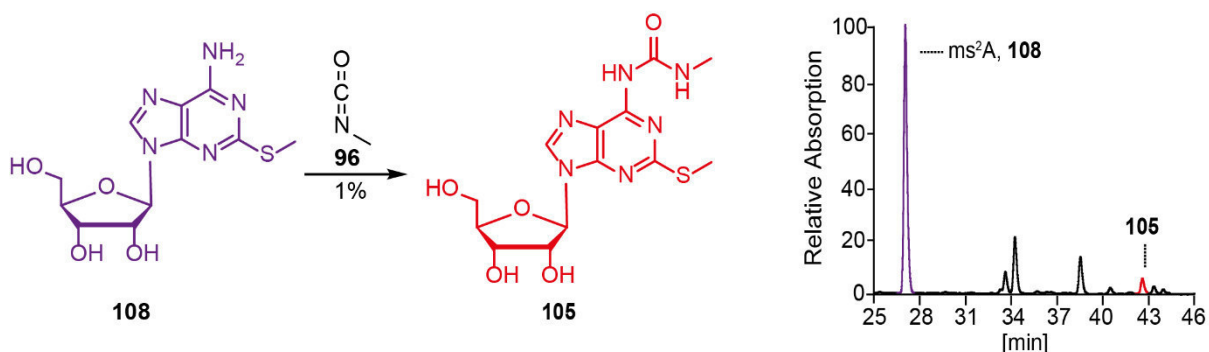


Abbildung 24: Präbiotischer Zugang zum modifizierten Nucleosid **105**. A: Reaktion von FaPy **102** mit Ribose **1** und entsprechendes UV-Chromatogramm. B: Reaktion von *ms*²A **108** mit Methylisocyanat **96** und entsprechendes UV-Chromatogramm.

Alternativ konnte *ms*²A **108** mit Methylisocyanat **96** umgesetzt werden, um das Methylharnstoff-modifizierte Nucleosid **105** auf präbiotische Weise zugänglich zu machen. Die entsprechende Reaktion ist in Abbildung 24B dargestellt. *ms*²A **108** kann unter präbiotischen Bedingungen durch die Reaktion von FaPy **102** und Ribose **1** erhalten werden, wie in Kapitel 3.1. gezeigt wurde.^[30] Wie bereits bei der Umsetzung von **94c** erfolgte die Reaktion des Nucleosids mit **93** weder in wässriger Lösung noch unter lösungsmittelfreien Bedingungen. In Formaldehyd konnte die gewünschte Modifikation **105** ebenfalls nur mit einer Ausbeute von 1 % erhalten werden. Auch in diesem Fall ist die geringere Ausbeute im Gegensatz zu den nicht-thiomethylierten Derivaten vermutlich auf die schlechtere Löslichkeit zurückzuführen.

Anschließend erfolgte wie in Abbildung 25 dargestellt die Nitrosylierung des thiomethylierten Nucleosids **105** analog zu **94c** unter sauren Bedingungen in einer 5 %igen Phosphorsäure-Lösung. Durch abwechselndes Rühren bei 0°C und Inkubation bei -20°C konnte Nucleosid **106** erhalten werden. Nach 48 h wurde die Nucleosid-Mischung direkt in eine Lösung aus Threonin **88** in Borat-Puffer gegeben und der pH-Wert mit NaOH auf 9.5 eingestellt. Die

Reaktion war ebenfalls nach einer Stunde abgeschlossen und $ms^{2t^6}A$ **103** konnte in einer guten Ausbeute von 61 % erhalten werden. Um die Vergleichbarkeit zu den nicht-thiomethylierten Derivaten zu gewährleisten, wurde das nitrosylierte Nukleosid auch mit Glycin **82** umgesetzt. Dadurch konnte das biologisch unbekannte Nukleosid ms^2g^6A **109** in einer Ausbeute von 65 % erhalten werden.

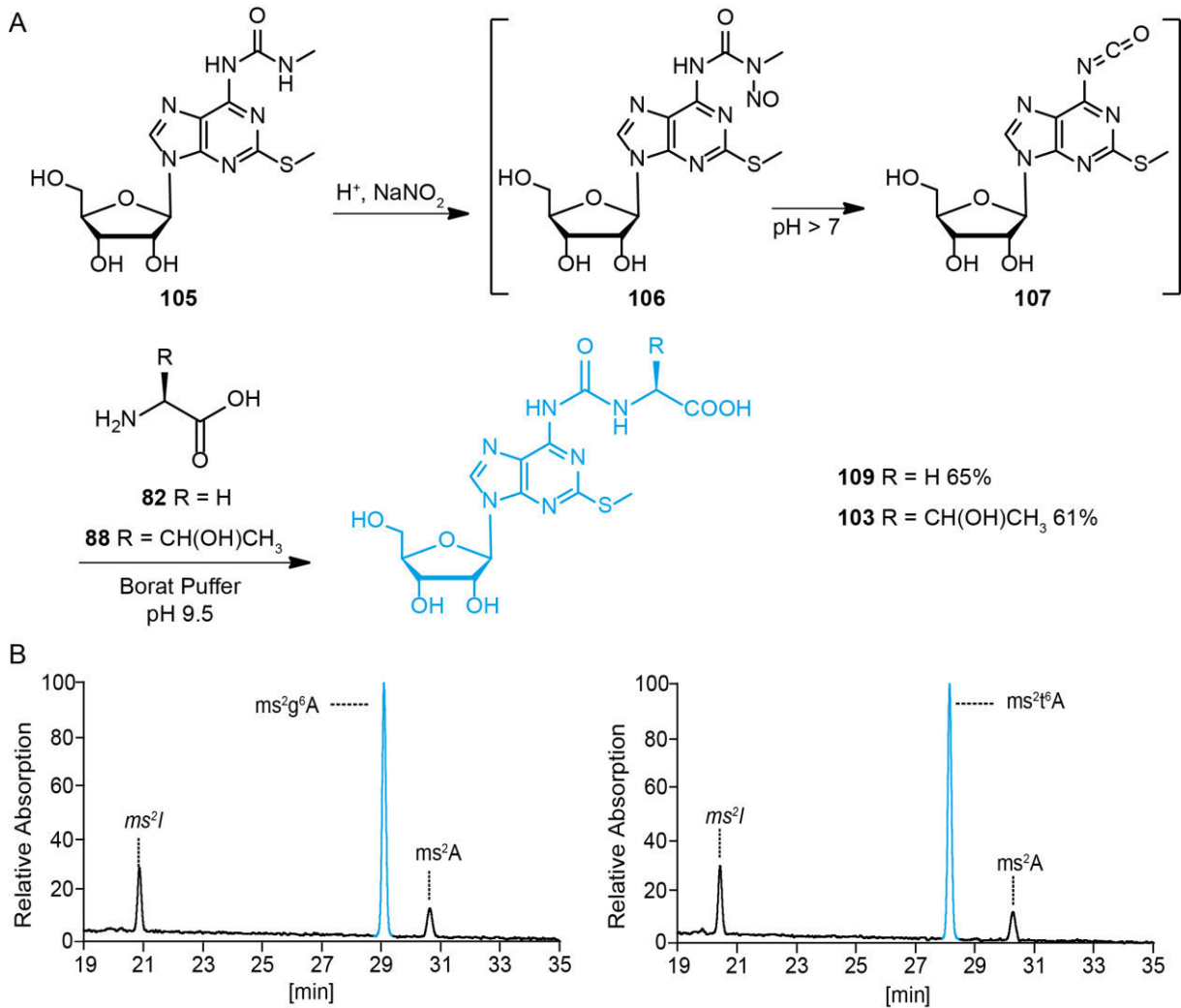


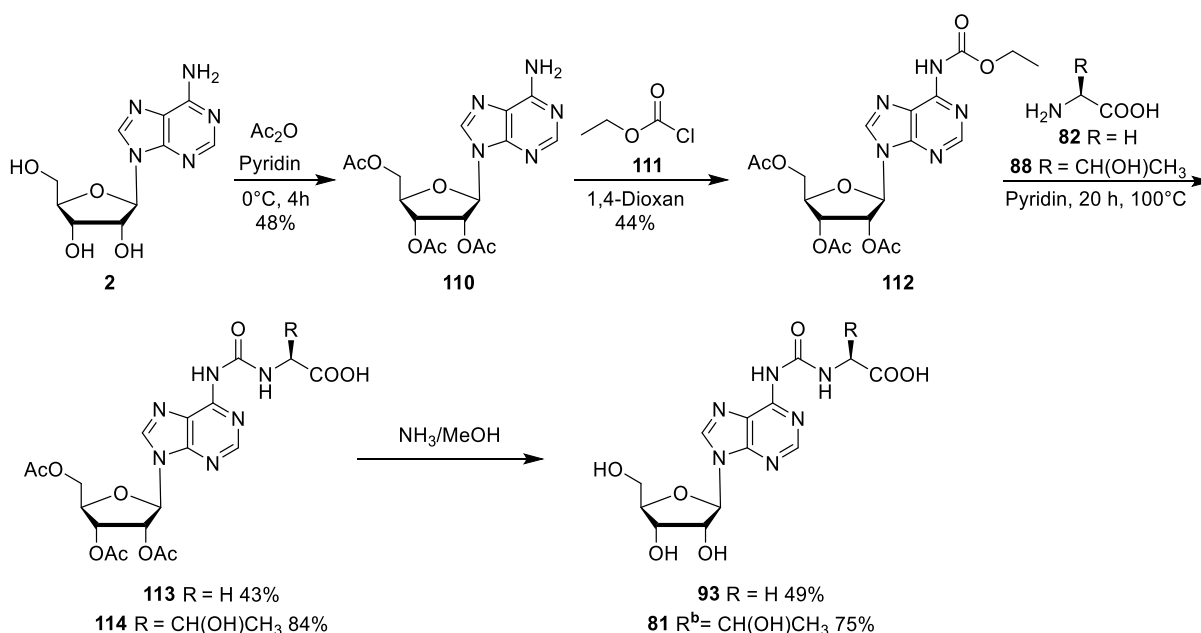
Abbildung 25: Präbiotische Synthese der Aminosäure-acetylierten Adenosin-Derivate ms^2g^6A **109** und $ms^{2t^6}A$ **103**. A: Reaktionsschema der Nitrosylierung des thiomethylierten Nukleosids **105** mit $NaNO_2$ zu **108** und anschließende Isocyanat-Bildung unter basischen Bedingungen. Das Isocyanat **109** kann *in situ* von den Aminosäuren Glycin **82** oder Threonin **88** abgefangen werden. B: UV-Chromatogramme der Reaktion von nitrosyliertem **105** zu ms^2g^6A **109** und $ms^{2t^6}A$ **103** (blau). Als Nebenprodukte entstehen ms^2A **108** und dessen Hydrolyseprodukt ms^2I **105**.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass nicht nur die aminoacetylierten Adenosin-Derivate g^6A **93** und t^6A **81** auf präbiotischem Wege zugänglich sind, sondern darüber hinaus auch die thiomethylierten Äquivalente ms^2g^6A **109** und $ms^{2t^6}A$ **103**. Auch hier konnten die entsprechenden Derivate sowohl durch Modifikation der Vorläufermoleküle als auch durch direkte Derivatisierung des Nukleosids ms^2A **108** erhalten werden.

4.1.2.3. Organische Synthese der Referenzverbindungen

4.1.2.3.1. Synthese von N^6 -modifizierten Adenosin-Derivaten

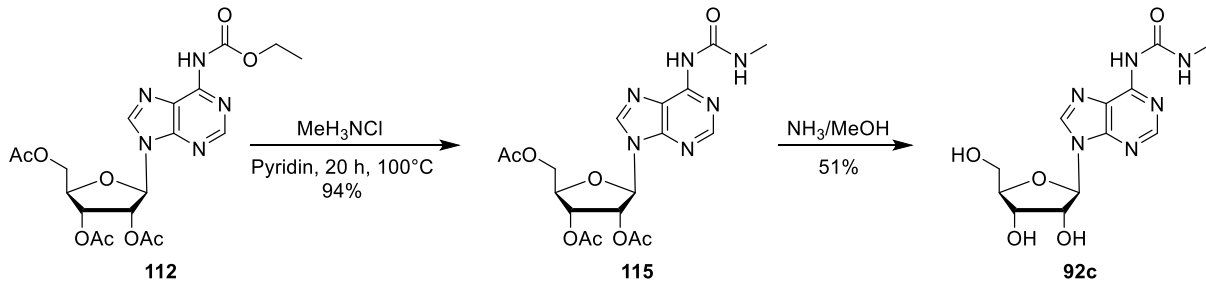
Um die Produkte der präbiotischen Studien sicher zu identifizieren, müssen Referenzmoleküle durch klassische organische Synthese hergestellt und charakterisiert werden. Die Synthese der entsprechenden N^6 -modifizierten-Adenosin-Derivate **81** und **93** ist in Schema 13 dargestellt.



Schema 13: Schrittweise Synthese von Aminosäure-modifizierten Adenosin-Derivaten. Nach der Acetylschätzung von Adenosin **2** erfolgte die Umwandlung von **110** in ein Carbamat **112** mit Chlorameisensäureethylester **111**, gefolgt von der Reaktion mit den Aminosäuren **82** und **88**. Nach einer basischen Entschätzung in NH_3/MeOH konnten $g^6\text{A}$ **93** und $t^6\text{A}$ **81** erhalten werden.

Im ersten Schritt wurden die Hydroxylgruppen von Adenosin **3** als Acetale geschützt. Hierzu wurde das Nukleosid in Pyridin mit Essigsäureanhydrid bei 0°C zur Reaktion gebracht. Nach 4 Stunden wurde die Reaktion mit Ethanol gestoppt und das geschützte Nukleosid **110** konnte durch Umkristallisation aus Ethanol in einer Ausbeute von 48 % erhalten werden. Anschließend wurde das geschützte Nukleosid mit Chlorameisensäureethylester **111** umgesetzt, um die N^6 -Zwischenstufe **112** zu erhalten. Carbamat **112** konnte nach säulenchromatographischer Aufreinigung in einer Ausbeute von 44 % erhalten werden. Im nächsten Schritt erfolgte die Umsetzung mit den entsprechenden Aminosäuren **82** und **88**. Die Reaktion mit Threonin **88** lieferte **113** in einer Ausbeute von 84 % wohingegen bei der Umsetzung mit Glycin **82** das Nukleosid **114** nur in einer Ausbeute von 43 % erhalten wurde. Nach basischer Entschätzung in methanolischer Ammoniak-Lösung und anschließender Umkristallisation in Ethanol konnten die entsprechenden carbamoylierten Nukleosid-Derivate $g^6\text{A}$ **93** und $t^6\text{A}$ **81** in Ausbeuten von 49 % und 75 % erhalten werden.^[208, 218]

Auch für die nicht-biologische bekannte Modifikation **94c** sollte ein Referenzmolekül auf organische Weise synthetisiert werden. Die entsprechende Syntheseroute ist in Schema 14 dargestellt.

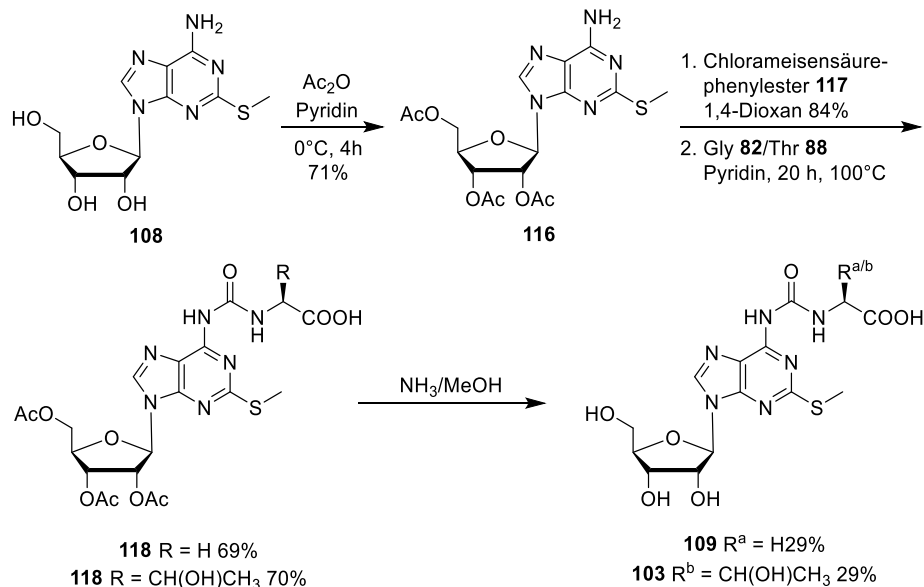


Schema 14: Synthese von **94c** ausgehend von Carbamat **112** durch die Umsetzung mit Methylammoniumchlorid und anschließender Entschützung mit NH_3/MeOH .

Analog zu der Reaktion mit den Aminosäuren in Schema 13 wurde Carbamat **112** mit Methylammoniumchlorid in Pyridin umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Aufarbeitung wurde das geschützte Nukleosid **115** in einer guten Ausbeute von 94 % erhalten. Die anschließende Entschützung in methanolischer Ammoniak-Lösung lieferte **94c** in einer Ausbeute von 51 %.

4.1.2.3.2. Synthese von thiomethylierten N^6 -modifizierten Adenosin-Derivaten

Die Synthese der N^6 -modifizierten, thiomethylierten Adenosin-Derivate **109** und **103** erfolgte nach einer abgewandelten Synthese von *Bajji et al.*^[216] und ist in Schema 15 dargestellt.

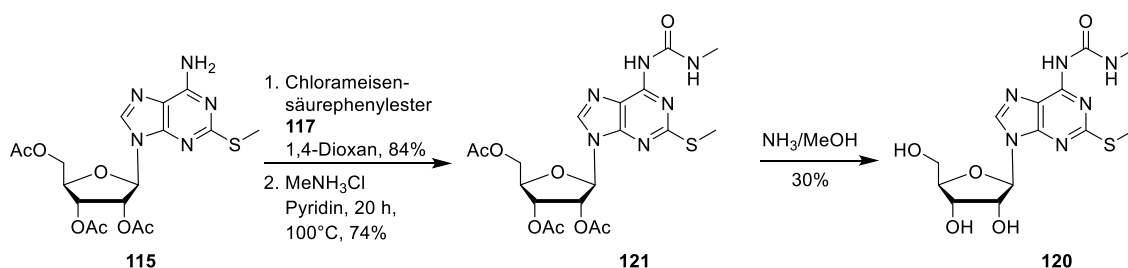


Schema 15: Schrittweise Synthese von Aminosäure-modifizierten thiomethylierten Adenosin Derivaten. Nach der Acetylschützung von ms^2A **108** erfolgte die Umwandlung in das Carbamat mit Chlorameisensäurephenylester **117** welches sofort mit den Aminosäuren **82** und **88** zur Reaktion gebracht wird. Nach einer basischen Entschützung in NH_3/MeOH wurden $\text{ms}^2\text{g}^6\text{A}$ **109** und $\text{ms}^2\text{t}^6\text{A}$ **103** erhalten.^[216]

4. Unveröffentlichte Ergebnisse

Analog zu den nicht-thiomethylierten Derivaten wurden im ersten Schritt ebenfalls die Hydroxylgruppen von ms²A **108** als Acetale geschützt. Hierzu wurde **108** in Pyridin mit Essigsäureanhydrid bei 0°C zur Reaktion gebracht. Nach 4 Stunden wurde die Reaktion mit Ethanol gestoppt und das geschützte Nucleosid **116** durch säulenchromatographische Aufreinigung in einer Ausbeute von 71 % erhalten. Das geschützte Nucleosid wurde mit Chlorameisensäurephenylester **117** umgesetzt, um eine an N⁶-aktivierte Zwischenstufe zu erhalten und anschließend direkt mit den entsprechenden Aminosäuren **82** und **88** zur Reaktion gebracht. Die Umsetzung mit Glycin **82** lieferte Nucleosid **118** in einer Ausbeute von 70 % wohingegen das Nucleosid **119** durch die Reaktion mit Threonin **88** nur in einer Ausbeute von 69 % erhalten werden konnte. Nach basischer Entschützung in methanolischer Ammoniak-Lösung und anschließender HPLC-Aufreinigung konnten die entsprechenden carbamoylierten Nucleosid-Derivate ms²g⁶A **109** und ms²t⁶A **103** in Ausbeuten von jeweils 29 % erhalten werden.^[216] Die geringe Ausbeute ist vermutlich auf Verluste bei der Aufreinigung zurückzuführen.

Wie für das Methylharnstoff-modifizierte Nucleosid **94c** sollte auch für die biologisch nicht-bekannt thiomethylierte Modifikation **120** ein Referenzmolekül synthetisiert werden. Die Syntheseroute ist in Schema 16 dargestellt.



Schema 16: Herstellung des Nucleosids **120** ausgehend von Nucleosid **115** durch die Reaktion mit Methylammoniumchlorid und anschließender Entschützung mit NH₃/MeOH.

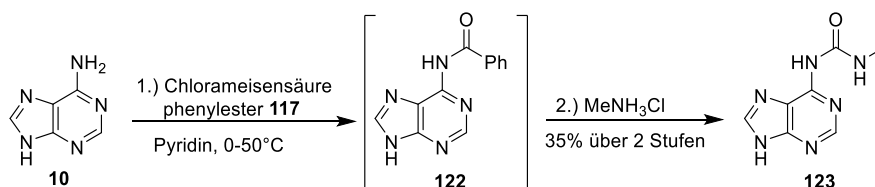
Nucleosid **115** wurde mit **117** und anschließend mit Methylammoniumchlorid in Pyridin umgesetzt. So konnte das geschützte Nucleosid **121** durch säulenchromatographische Aufarbeitung in einer Ausbeute von 74 % erhalten werden. Die Entschützung in methanolischer Ammoniak-Lösung und anschließende HPLC-Aufreinigung lieferte das Nucleosid **120** in einer Ausbeute 30%.

4.1.2.3.3. Synthese von N⁶-modifizierten Pyranosyl-Adenosin-Derivaten

Bei der präbiotischen Synthese von Nucleosiden und Nucleosid-Modifikationen durch die Verknüpfung von FaPys **30** und Ribose **1** entstehen neben den biologisch relevanten β -Furanosyl-Verbindungen auch die Pyranosyl-Derivate sowie die entsprechenden

α -Isomere.^[30, 72] Um auch diese in den präbiotischen Versuchen eindeutig zu identifizieren, wurden hierzu die Referenzmoleküle auf synthetische Weise hergestellt.

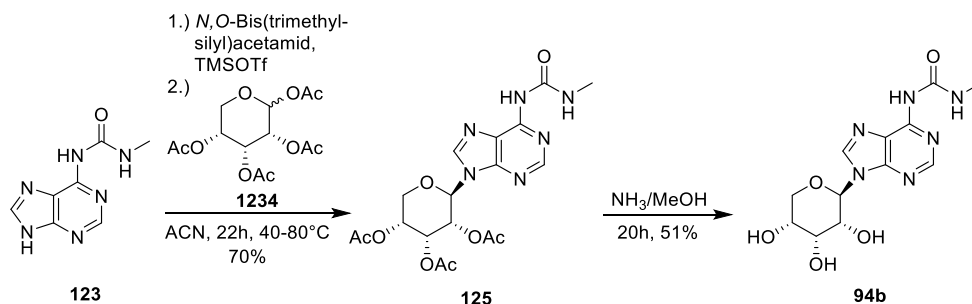
Um Pyranosyl-Verbindungen herzustellen werden die Nucleobasen mit den entsprechenden Zucker-Molekülen umgesetzt. Für die Synthese der pyranosidischen Derivate **94b** und **d** wurde zuvor die Nucleobase, wie in Schema 17 dargestellt, derivatisiert.



Schema 17: Synthese der modifizierten Nucleobase Methylharnstoff-modifiziertes Adenin **123** durch Reaktion von Adenin **14** mit Chlorameisensäurephenylester **117** und anschließender Umsetzung mit Methylammoniumchlorid.

Adenin **14** wurde mit Chlorameisensäurephenylester **117** zu Reaktion gebracht und das entstehende intermediäre Carbamat **122** sofort *in situ* mit Methylammoniumchlorid versetzt. Das gewünschte Produkt **123** konnte nach Kristallisation in einer Ausbeute von 35 % erhalten werden.

Im nächsten Schritt konnte die modifizierte Nucleobase **123** mit dem jeweiligen Zucker verknüpft werden. Im Fall vom β -verknüpften pyranosidischem Nucleosid **94b** wurde die Base mit Tetraacetyl-D-ribose **124**, wie in Schema 18 gezeigt, umgesetzt.^[72]

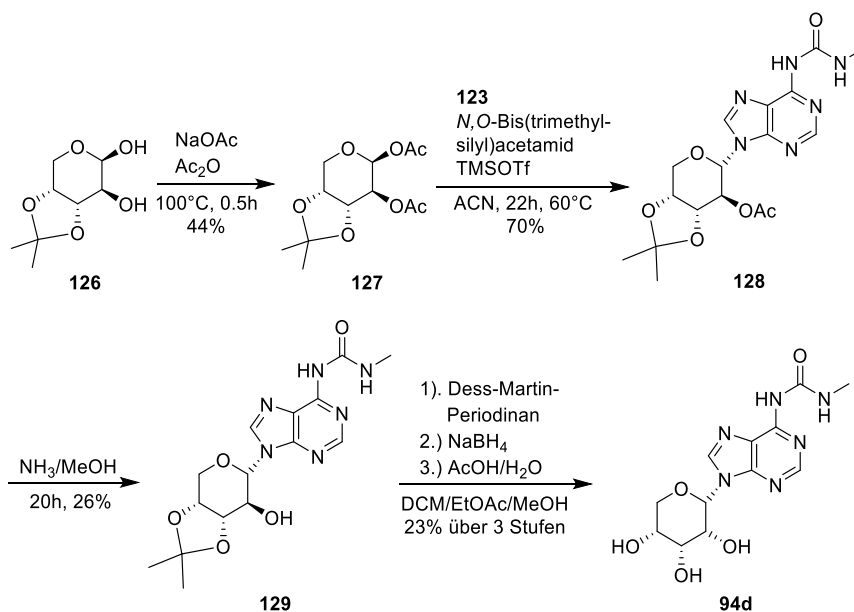


Schema 18: Synthese von pyranosidischem, β -verknüpftem Nucleosid **94b**. Die modifizierte Nucleobase **123** wird acetyl-geschützte Ribose **124** umgesetzt und anschließend mit NH_3/MeOH entschützt.

Die Glykosylierung erfolgte dabei nach einer *Vorbrüggen*-artigen Reaktion und lieferte das gewünschte geschützte Nucleosid **125** in einer Ausbeute von 70%. Durch die nachfolgende Entschützung der Acetal-Gruppen in methanolischer Ammoniak-Lösung wurde **94b** in einer Ausbeute von 51 % erhalten.

4. Unveröffentlichte Ergebnisse

Um das pyranosidische α -Isomer **94d** zu erhalten, wurde die Base mit der geschützten Ribose **126** umgesetzt. Der Reaktionsablauf verlief analog zu *Becker et al.* und ist in Schema 19 dargestellt.^[72]



Schema 19: Synthese von pyranosidischem, α -verknüpftem Nucleosid **94d**. Das Ribose-Derivat **126** wird Acetyl-geschützt und anschließend mit der modifizierten Nucleobase **123** umgesetzt. Partielle Entschützung und anschließende Umsetzung mit Dess-Martin-Periodinan. Reduktion mit NaBH₄ gefolgt von der Entschützung des Diols liefert α -pyranosyl-Nucleosid **94d**.

Die zur Glykosylierung benötigte Ribose **127** wurde durch Acetyl-Schützung von 3,4-*O*-Isopropyliden-D-ribose **126** in einer Ausbeute von 44 % erhalten. Die Ribose **127** wurde mit TMSOTf umgesetzt und mit der, durch *N,O*-bis(trimethylsilyl)acetamid silylierten, Nucleobase **123** in einem Ein-Topf-Verfahren zur Reaktion gebracht um **129** zu erhalten. **129** konnte durch die Reaktion mit methanolischem Methylamin erhalten werden. Die 2'-Hydroxylgruppe konnte daraufhin mit Dess-Martin-Periodinan unter milden Bedingungen oxidiert und anschließend durch NaBH₄ stereoselektiv reduziert werden. Nach vollständiger Entschützung des Nucleosids konnte **94d** in einer Ausbeute von 25 % erhalten werden.^[72]

4.1.3. Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden alternative Zugangsrouten zu aminoacetylierten Adenosin-Derivaten entwickelt, die mit den Bedingungen auf der frühen Erde kompatibel sind. Die Modifikationen können dabei sowohl auf der Stufe der Nucleoside als auch auf der Stufe der Purin-Vorläufermoleküle (FaPys) eingeführt werden. Beide Reaktionswege beruhen auf der Einführung einer Methylharnstoffbindung und anschließender Nitrosylierung. Unter basischen Bedingungen ist so eine *in situ*-Bildung von Isocyanaten begünstigt, welche sofort von Aminosäuren abgefangen werden können. Da beide Zugangsrouten auf derselben Chemie basieren, stärken sie sich gegenseitig und lassen vermuten, dass aminoacetylierte-Adenosin-

Verbindungen bereits auf der frühen Erde präsent waren. Um die Produkte der präbiotischen Studien aufzuklären, wurden Referenzmoleküle der aminoacetylierten, sowie der furanosyl- und pyranosyl-modifizierten Methylharnstoff-Derivate durch organisch-chemische Synthesen hergestellt und charakterisiert.

Unter der Hypothese der RNA-Welt ist bisher nicht geklärt wie Peptide entstanden sind. Es ist eine Möglichkeit, dass die biologisch vorkommenden aminoacetylierten Nucleoside Reliquien von Aminosäure-Addukten sind. Durch die Verbindung von Nucleosid und Aminosäure, könnte das erste Mal die Verknüpfung von Genotyp und Phänotyp gezogen worden sein.

Um herauszufinden, ob die Entstehung von Peptiden durch die Verknüpfung an Nucleoside begünstigt gewesen sein könnte, müssen im nächsten Schritt die Eigenschaften der aminoacetylierten Adenosin-Derivate in Oligonucleotid-Strängen untersucht werden. Der Einbau von t⁶A **81** in Oligomere wurde bereits von *Herdewijn* und seiner Gruppe durchgeführt.^[219] Sie bauten allerdings nur einzelne Modifikationen ein. Damit ein Peptidwachstum möglich ist, sollte getestet werden, ob die Oligonucleotide auch stabil sind, wenn mehrere dieser Modifikationen in einem Strang vorhanden sind. Um ein Peptidwachstum möglich zu machen, müssen die an die Nucleoside geknüpften Aminosäuren unter präbiotischen Bedingungen aktiviert und mit weiteren Aminosäuren zur Reaktion gebracht werden. Das entstandene Peptid muss anschließend vom Oligonucleotid abgespalten werden.

4.2. Zugang zu aminoacetylierten Cytidin-Derivaten

4.2.1. Prolog

Die Nucleoside Guanosin **4** und Cytidin **5** besitzen wie Adenosin **3** exocyclische Amine, die ebenfalls an Aminosäuren konjugiert denkbar sind. Die entsprechenden Strukturformeln sind in Abbildung 26 dargestellt. Im Rahmen dieser Arbeit sollte getestet werden, ob auch die entsprechenden N^4 -modifizierten Aminosäure-Cytidin-Derivate auf präbiotische Weise zugänglich sind.

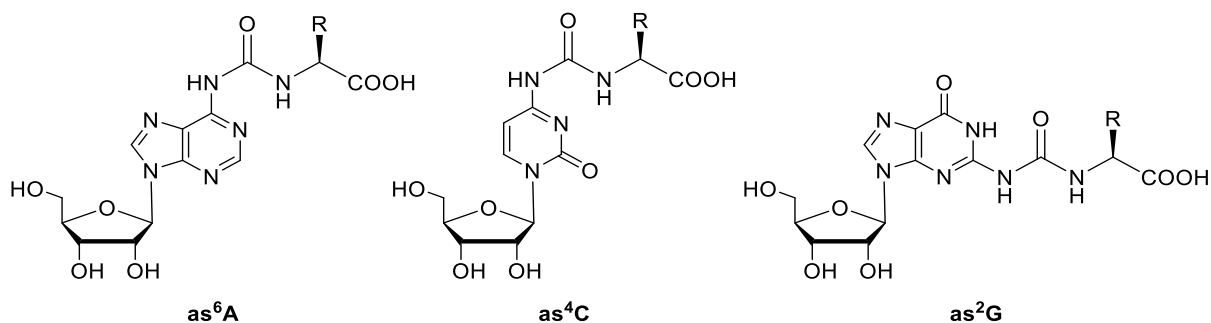


Abbildung 26: Strukturformeln von Aminosäure-modifizierten Nucleosiden. R = verschiedene Aminosäureseitenketten.

4.2.2. Ergebnisse und Diskussion

4.2.2.1. Präbiotische Synthesen von N^4 -modifizierten Cytidin-Derivaten

Für den präbiotischen Zugang zu N^4 -modifizierten Aminosäure-Cytidin-Derivaten wird im Rahmen dieser Arbeit von Cytidin **5** gestartet und die Aminosäure-Einheit durch eine Post-Modifikation eingeführt. Cytidin **5** kann gemäß der von *Powner et al.*^[67] beschriebenen Reaktionskaskade auf präbiotische Weise zugänglich gemacht werden oder durch einen von *Carell* und seinen Mitarbeitern entwickelten Reaktionsweg.^[211]

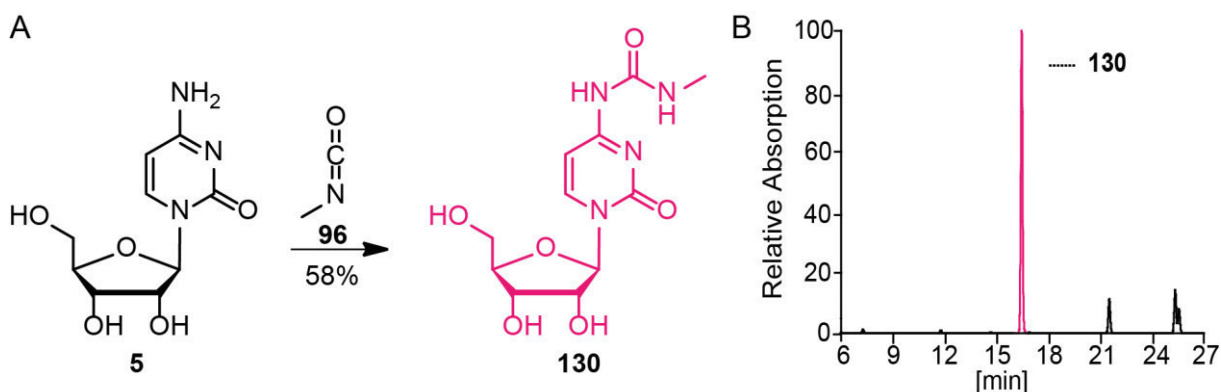


Abbildung 27: Präbiotische Herstellung von Methylharnstoff-derivatisiertem Cytidin **130**. A: Umsetzung des Nucleosids **5** mit Methylisocyanat **96**. B: UV-Chromatogramm der entsprechenden Reaktion.

Die Synthese der Cytidin-Derivate sollte auf derselben Chemie beruhen wie die Herstellung der Adenosin-Modifikationen. Daher wurde Cytidin **5** unter analogen Bedingungen wie Adenosin **3** mit Methylisocyanat **96** umgesetzt, um die Methylharnstoff-derivatisierte Verbindung **130** zu erhalten. Das entsprechende Reaktionsschema ist in Abbildung 27 abgebildet.

Wie bereits bei Umsetzung von Adenosin **3** beobachtet, war es ebenfalls nicht möglich, die Reaktion mit Methylisocyanat **96** in wässriger Lösung oder im lösungsmittelfreien Zustand durchzuführen. Allerdings konnte die gewünschte Modifikation **130** durch die Reaktion von Cytidin **5** und **96** in Formamid nach 2 h in einer Ausbeute von 58 % erhalten werden. Fragmentierungsstudien ließen auch hier vermuten, dass die entsprechenden Carbamate aus der Reaktion der Hydroxylgruppen des Nucleosids **4** mit Methylisocyanat **96** als Nebenprodukt entstanden.

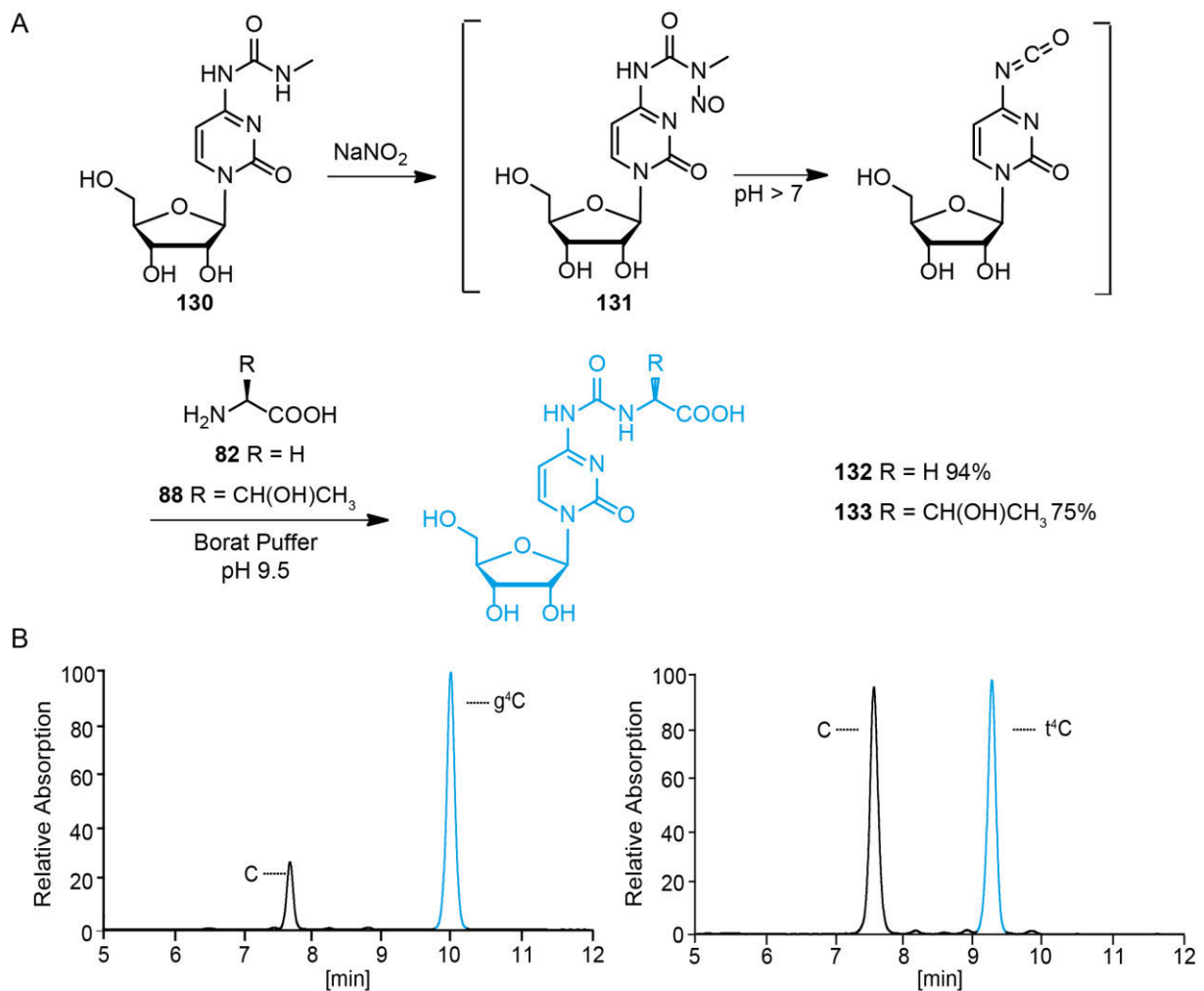


Abbildung 28: Präbiotische Synthese der Aminosäure-acetylierten Cytidin-Derivate g^4C **132** und t^4C **133**. A: Nitrosylierung von modifiziertem Nucleosid **130** mit $NaNO_2$ und anschließende Isocyanat Bildung unter basischen Bedingungen. Das Isocyanat kann *in situ* von den Aminosäuren Glycin **82** oder

4. Unveröffentlichte Ergebnisse

Threonin **88** abgefangen werden. B: UV-Chromatogramme der Reaktion von nitrosyliertem Nucleosid **130** zu g^4C **132** und t^4C **133** (blau). Als Nebenprodukt entsteht Cytidin (C, **5**).

Nachdem das Methylharnstoff-derivatisierte Cytidin **130** in guten Ausbeuten erhalten wurde, erfolgte im nächsten Schritt die Umsetzung mit den entsprechenden Aminosäuren (s. Abbildung 28). Hierfür wurde die Methylharnstoffbindung zunächst wieder unter sauren Bedingungen durch $NaNO_2$ zu **131** nitrosyliert. Die Nitrosylierung erfolgte analog zu den Adenosin-Derivaten in einer 5 %igen Phosphorsäure-Lösung. Durch abwechselndes Rühren bei $0^\circ C$ und Inkubation bei $-20^\circ C$ wurden auch in diesem Fall Tag- und Nacht-Zyklen simuliert.

Nach 48 h wurde die Nucleosid-Mischung direkt in eine Lösung der entsprechenden Aminosäuren in Borat-Puffer gegeben und der pH-Wert mit $NaOH$ auf 9.5 eingestellt. Um die Vergleichbarkeit zu den Adenosin-Derivaten zu erhalten, wurden die Experimente ebenfalls mit Glycin **82** und Threonin **88** durchgeführt. Die Reaktion war ebenfalls nach einer Stunde beendet und die Aminosäure-Derivate konnten in sehr guten Ausbeuten von 94 % (g^4C , **132**) und 75 % (t^4C , **133**) erhalten und durch Co-Injektionsstudien nachgewiesen werden.

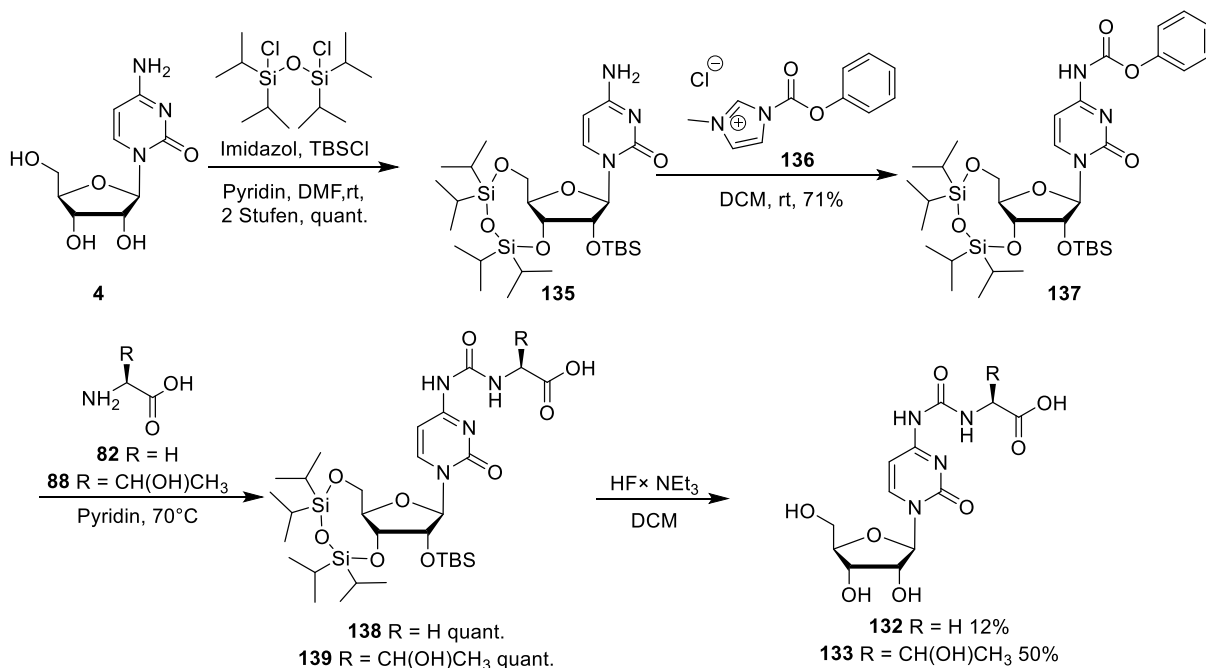
Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass es möglich ist Cytidin **5** unter präbiotischen Bedingungen mit Aminosäuren zu modifizieren. Analog zu der Modifizierung von Adenosin **3** konnten g^4C **132** und t^4C **133** in guten Ausbeuten erhalten werden.

4.2.2.2. Synthese von N^4 -modifizierten Cytidin-Derivaten als Referenzverbindungen

Um die Produkte der präbiotischen Studien aufzuklären, mussten auch für die biologisch unbekanntes Cytidin-Modifikationen Referenzmoleküle durch klassische organische Synthese hergestellt und charakterisiert werden. Das entsprechende Reaktionskaskade ist in Schema 20 dargestellt.

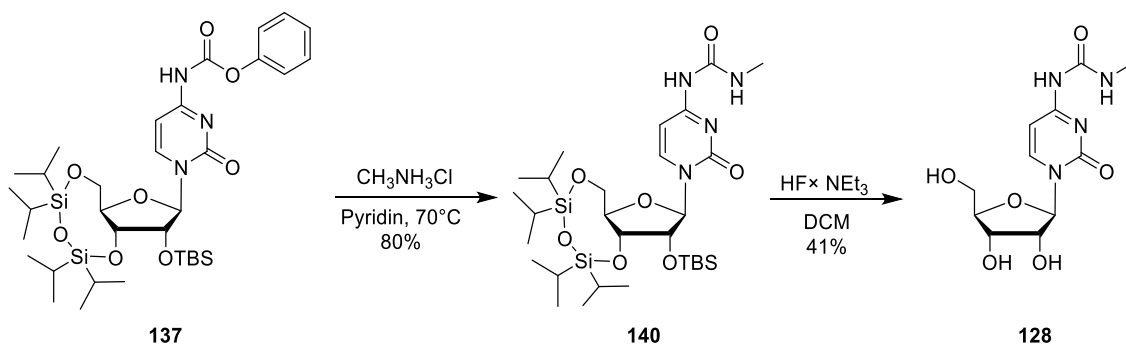
Für die Synthese der N^4 -modifizierten-Cytidin-Derivate **132** und **133** wurden die 3'- und die 5'-Hydroxylgruppen des Nucleosids **4** mit $TIPDSCl_2$ zu **134** umgesetzt, gefolgt von einer *in situ* TBS-Schützung der 2'-Hydroxylgruppe. Durch säulenchromatographische Aufreinigung konnte das geschützte Nucleosid **135** in quantitativer Ausbeute erhalten werden.^[220] Anschließend wurde das geschützte Nucleosid mit dem Phenylester-Imidazol-Carbamat **136** zur Reaktion gebracht, um die N^4 -Position zu aktivieren. Das Carbamat **137** konnte nach säulenchromatographischer Aufreinigung in einer Ausbeute von 71 % erhalten werden. Im nächsten Schritt erfolgte die Umsetzung mit den entsprechenden Aminosäuren **82** und **88**, welche analog zu den Adenosin-Derivaten durchgeführt wurde.^[208] Sowohl die Reaktion mit Threonin **88** als auch die Umsetzung mit Glycin **82** liefen quantitativ zu den Nucleosiden **138** und **139** ab. Nach Entschützung mit HF in Triethylamin und anschließender Aufreinigung mittels HPLC konnten die entsprechenden carbamoylierten Nucleosid-Derivate g^4C **132** und

$t^4\text{C}$ **133** in Ausbeuten von 12 und 50 % erhalten werden. Die eher geringe Ausbeute bei der Entschützung ist höchstwahrscheinlich auf die HPLC-Aufreinigung zurückzuführen.



Schema 20: Schrittweise Synthese der Aminosäure-modifizierten Cytidin-Derivate. Nach der Schützung der Hydroxylgruppen erfolgte die Umwandlung in ein Carbamat **137** mit Phenylester-Imidazol-Derivat **135**. Die aktivierten Nucleoside wurden anschließend mit den Aminosäuren **82** und **88** umgesetzt. Nach Entschützung mit HF in Triethylamin wurden $g^4\text{C}$ **132** und $t^4\text{C}$ **133** erhalten.

Auch für die biologisch unbekannte Modifikation **130** musste ein Referenzmolekül durch organische Synthese hergestellt werden. Die Syntheseroute ist in Schema 21 abgebildet.



Schema 21: Synthese von Nucleosid **130** ausgehend von Carbamat **137** durch die Umsetzung mit Methylammoniumchlorid und anschließender Entschützung mit HF in Triethylamin.

Entsprechend zu der Reaktion mit den Aminosäuren in Schema 20 wurde Carbamat **137** mit Methylammoniumchlorid in Pyridin umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Aufarbeitung wurde das geschützte Nucleosid **140** in einer guten Ausbeute von 80 % erhalten. Die anschließende nukleophile Entschützung mit HF in Triethylamin gefolgt von einer Aufreinigung mittels HPLC lieferte **130** in einer Ausbeute 51 %.

Die in diesem Kapitel synthetisierten Referenzmoleküle konnten anschließend für die Analyse der präbiotischen Reaktionen in Kapitel 4.2. verwendet werden.

4.2.3. Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde sowohl ein synthetischer als auch ein präbiotischer Zugang zu aminoacetylierten Cytidin-Derivaten entwickelt.

Der synthetische Zugang zu g^4C und t^4C beruht auf der TBS- sowie TIPDS-Schätzung der Ribose **1**, gefolgt von der Aktivierung des exocyclischen Stickstoffs durch die Umwandlung in ein Phenoxy-Derivat. Das Carbamat wird im nächsten Schritt analog zu den Adenosin-Derivaten durch die Reaktion mit den Aminosäuren Glycin **82** und Threonin **88** in Urea-Verbindungen überführt und anschließend mit HF in Triethylamin entschützt. Die aminoacetylierten Cytidin-Derivate sind bisher biologisch nicht bekannt. Allerdings ist es durchaus möglich, dass es außer Adenosin **3** noch weitere Nukleoside mit exocyclischen Stickstoffen gibt, die an Aminosäuren gekoppelt sind. In weiteren Experimenten könnte biologische tRNA auf das Vorhandensein der hergestellten Moleküle untersucht werden und g^4C sowie t^4C als Referenzstandards verwendet werden. Darüber hinaus können die entsprechenden Phosphoramidite der Aminosäure-Addukte hergestellt werden, um die Modifikationen in Oligonukleotide einzubauen.

Die modifizierten Nukleoside g^4C und t^4C wurden im Rahmen dieser Arbeit unter Bedingungen hergestellt, die mit den Gegebenheiten auf der frühen Erde kompatibel sein könnten. Die Einführung der Derivatisierung erfolgt dabei als Post-Modifikation ausgehend von Cytidin **5**. Analog zu den Adenosin-Derivaten wurde die Methylharnstoffbindung durch die Umsetzung mit Methylisocyanat **96** eingeführt, gefolgt von einer Nitrosylierung unter sauren Bedingungen. Durch einen pH-Sprung zu 9,5 entstanden auch hier *in situ* Isocyanate der Nukleoside, die durch die Aminosäuren Glycin **82** und Threonin **88** abgefangen werden konnten. Durch diese Reaktionskaskade konnten die Nukleoside g^4C **132** und t^4C **133** in guten Ausbeuten unter präbiotischen Bedingungen erhalten werden. Es ist höchst unplausibel, dass auf der frühen Erde selektiv nur Adenosin-Derivate entstehen konnten, bei denen der exocyclische Stickstoff durch Methylisocyanat **96** derivatisiert wurde, weshalb auch Cytidin **5** und Guanosin **4** durch Aminosäuren modifiziert vorgelegen haben könnten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Cytidin **5** durch dieselbe Chemie in die aminoacetylierten Derivate g^4C **132** und t^4C **133** umgewandelt werden kann und es somit möglich ist, dass diese auf der frühen Erde vorhanden waren.

4.3. Mineralien als präbiotische Phosphorylierungsreagenzien

4.3.1. Prolog

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Ausbeute bekannter Phosphorylierungsreagenzien zu erhöhen sowie neue Mineralien als mögliche präbiotische Phosphatquellen zu untersuchen. In der Vergangenheit konnten bereits gute Phosphorylierungsausbeuten mit dem Mineral Lüneburgit in der Gegenwart von Harnstoff **45** erhalten werden.^[25] Da die Verfügbarkeit von Lüneburgit auf der frühen Erde sehr beschränkt war, sollen andere Mineralien wie Struvit ($\text{NH}_4\text{MgPO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) und Vivianit ($\text{Fe}_4[\text{PO}_4]_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$) auf ihre Phosphorylierungseigenschaften getestet werden. Struvit ist zum Beispiel durch gelöstes Phosphat (z.B. durch Hydroxylapatit $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$) in Magnesiumsulfat-haltigem Meerwasser zugänglich.^[221] Mit dem phosphathaltigen Mineral Vivianit konnten bisher noch keine Phosphorylierungen von Nucleosiden beobachtet werden.^[222] Da das Eisenphosphat ein häufig vorkommendes Mineral in verschiedenen Gewässer-Sedimenten darstellt, soll im Rahmen dieser Arbeit versucht werden, Phosphorylierungen von Nucleosiden mit Hilfe von Vivianit durchzuführen.^[223]

4.3.2. Ergebnisse und Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Methoden entwickelt, um die Phosphorylierungseffizienz bekannter präbiotischer Mineralien zu steigern. Darüber hinaus wurden andere Mineralien, wie zum Beispiel Vivianit, als mögliche Phosphatquellen auf der frühen Erde getestet.

Um Vivianit als Phosphorylierungsreagenz für die präbiotische Synthese von Nucleotiden zu nutzen, wurde das Mineral nach einer Synthese von *Guo et al.* hergestellt.^[224] Die Phosphorylierung erfolgte auf Grundlage einer im Arbeitskreis *Carell* entwickelten Synthese.^[211] Cytidin **5** wurde hierfür in der Gegenwart des Minerals Lüneburgit und eines Überschusses an Harnstoff **45** in einem Natriumcarbonat Puffer bei 65°C umgesetzt. Das Reaktionsgemisch wurde in einem offenen Gefäß über Nacht auf 85°C zur Trockene eingedampft. Solche Nass-Trocken-Cyclen wurden bereits in der Vergangenheit als plausible geologische Szenarien für die präbiotische Synthese von Nucleosiden^[30] sowie Polymerisationsreaktionen vorgeschlagen.^[194, 225] Für die Phosphorylierung mit Vivianit wurden verschiedene Bedingungen getestet, um das schwerlösliche Eisenphosphat zu aktivieren. Dabei wurden sowohl die Reagenzien zur Aktivierung als des Minerals auch das Puffersystem variiert. Die getesteten Reagenzien und Puffersysteme sind in Tabelle 2 aufgelistet.

4. Unveröffentlichte Ergebnisse

Tabelle 2: Auflistung der getesteten Aktivierungsreagenzien und Puffer für die Phosphorylierung mit dem Vivianit.

Getestetes Aktivierungsreagenzien	Getestete Puffer
Natriumcyanid	Natriumcarbonat (75 mM)
Natirumthiocyanat	Borat (125 mM)
Schwefelsäure	Borat pH 8 (30 mM)
Harnstoffoxalat	Borat pH 9 (30 mM)
Eisen(II)-Oxalat	Harnstoff/Ammoniumformiat/Wasser ^[97]
Oxalsäure 141	

Es wurde getestet, ob Cyanide und Thiocyanate in der Lage sind Vivianit auf Grund ihrer großen Affinität zu Eisen zu aktivieren. In LC-MS Analysen der entsprechenden Proben konnten allerdings keine Phosphorylierungsprodukte nachgewiesen werden. Durch die Zugabe von Schwefelsäure konnte Vivianit teilweise gelöst und dadurch Spuren an Nukleotiden detektiert werden. *Schwartz et al.* gelang 1972 die Aktivierung des schwerlöslichen Minerals Apatit durch die Verwendung von Ammoniumoxalat **142**.^[226] Präbiotisches Oxalat kann durch eine Vielzahl an verschiedenen Mechanismen entstanden sein. So kann es zum Beispiel durch die Bestrahlung von Bicarbonat-Lösungen^[227] oder photochemisch durch die Reaktion von CO₂ und Ameisensäure entstehen.^[228] Darüber hinaus ist Ammoniumoxalat eines der Oligomerisationsprodukte von Blausäure **9**.^[229] Die Aktivierung von Vivianit wurde daher in der vorliegenden Arbeit mit verschiedenen Oxalat-Spezies getestet. Das beste Ergebnis zeigte dabei Oxalsäure **141**, vermutlich durch die sauren Eigenschaften kombiniert mit der Möglichkeit Eisen zu komplexieren.

In weiteren Experimenten wurden verschiedene Puffersysteme getestet. Hierzu wurde ein 75 mM Natriumcarbonat-Puffer mit verschiedenen Borat-Puffern bei unterschiedlichen pH-Werten und Konzentrationen verglichen (siehe Tabelle 2). Das beste Ergebnis für die Phosphorylierung konnte durch die Aktivierung von Vivianit mit Oxalsäure **141** in einem Natriumcarbonat-Puffer durch Eindampfen über 20 h erhalten werden. Die Analyse der entsprechenden Reaktionsmischung mittels LC-MS zeigte die Entstehung von Cytosin **143** und Nukleotiden in einer Ausbeute von 8 %. Das UV-Chromatogramm ist in Abbildung 29A dargestellt. Die entstandenen Phosphorylierungsprodukte wurden durch HPLC-Chromatographie abgetrennt und mit Hilfe der YMC-Triart C₁₈ Säule und dem basischen Puffersystem (Puffer A: 10 mM NH₄HCO₃ and 5 mM Dibutylamin in H₂O (pH 9.1)); Puffer B: ACN) mittels LC-MS analysiert. Das entsprechende UV-Diagramm ist in Abbildung 29C dargestellt. Durch Co-Injektionsexperimente mit synthetischem Mono- sowie dem entsprechenden Diphosphat **55** und **144** als Referenzverbindung konnte sowohl die

Entstehung von 5'-Cytidinmonophosphat **55** als auch 5'-Cytidindiphosphat **144** nachgewiesen werden (Abbildung 29C).

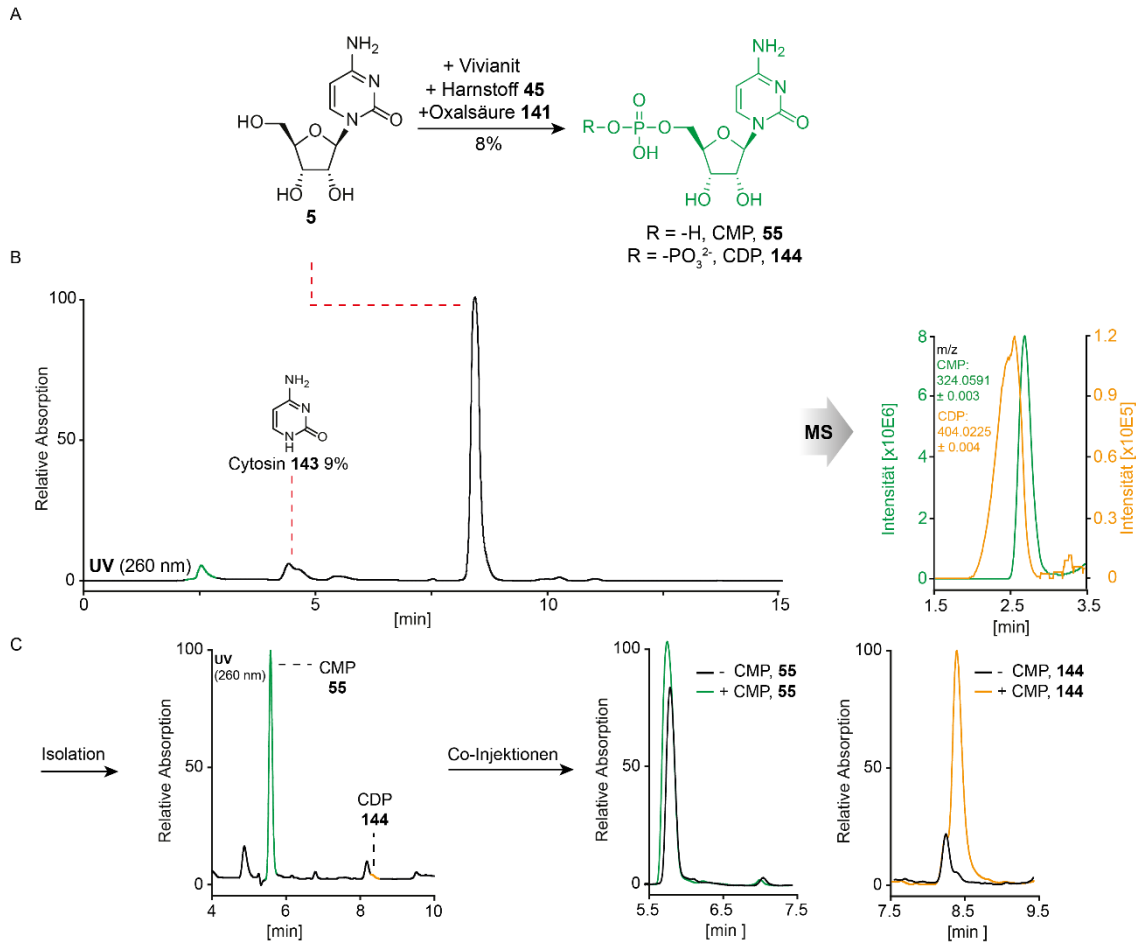


Abbildung 29: Phosphorylierung von Cytidin **5** mit Vivianit, Harnstoff **45** und Oxalsäure **30**. A: Reaktionsschema und UV-Chromatogramm der Phosphorylierung. Neben den Phosphorylierungsprodukten entsteht auch hier die Nucleobase Cytosin **143**. B: LC-MS Analyse der korrespondierenden Nucleotide. C: Isolierung der Nucleotide mittels HPLC und anschließende LC-MS Analyse auf einer YMC-Triart C18-Säule und einem basischen Puffer-System (Puffer A: 10 mM NH₄HCO₃ und 5 mM Dibutylamin in H₂O (pH 9.1); Puffer B: ACN) und Puffer B (ACN). D: Co-Injektion mit synthetischem 5'-Cytidinmonophosphat **55** sowie 5'-Cytidindiphosphat **144**.

In weiteren Experimenten wurde getestet, ob das Phosphat aus dem Vivianit auch mit anderen Reagenzien als Harnstoff **45** aktiviert werden kann. Die getesteten Bedingungen sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Durch die Verwendung von Biuret **145** konnten keine Phosphorylierungsprodukte erhalten werden. Durch den Einsatz von Isoxazol **13** und Thioharnstoff **32** konnten Spuren von Nucleosiden detektiert werden, allerdings ist die Ausbeute sehr gering und nicht mit der Ausbeute durch Harnstoff **45** vergleichbar.

4. Unveröffentlichte Ergebnisse

Tabelle 3: Getestete Reagenzien zur Phosphat-Aktivierung.

Aktivierung Phosphat	Phosphorylierung
Harnstoff 45	hohe Umsetzung
Thiourea 32	sehr geringe Umsetzung
Biuret 145	keine Umsetzung
3-Aminoisoxazol 13	sehr geringe Umsetzung

Die ermittelten Bedingungen der Vivianit-Aktivierung wurden auf das Mineral Struvit angewendet, um zu testen, ob damit die Ausbeute der Phosphorylierung von Nucleosiden gesteigert werden können. Struvit wurde nach einer bekannten Synthese von *Vol'khin et al.* hergestellt.^[230]

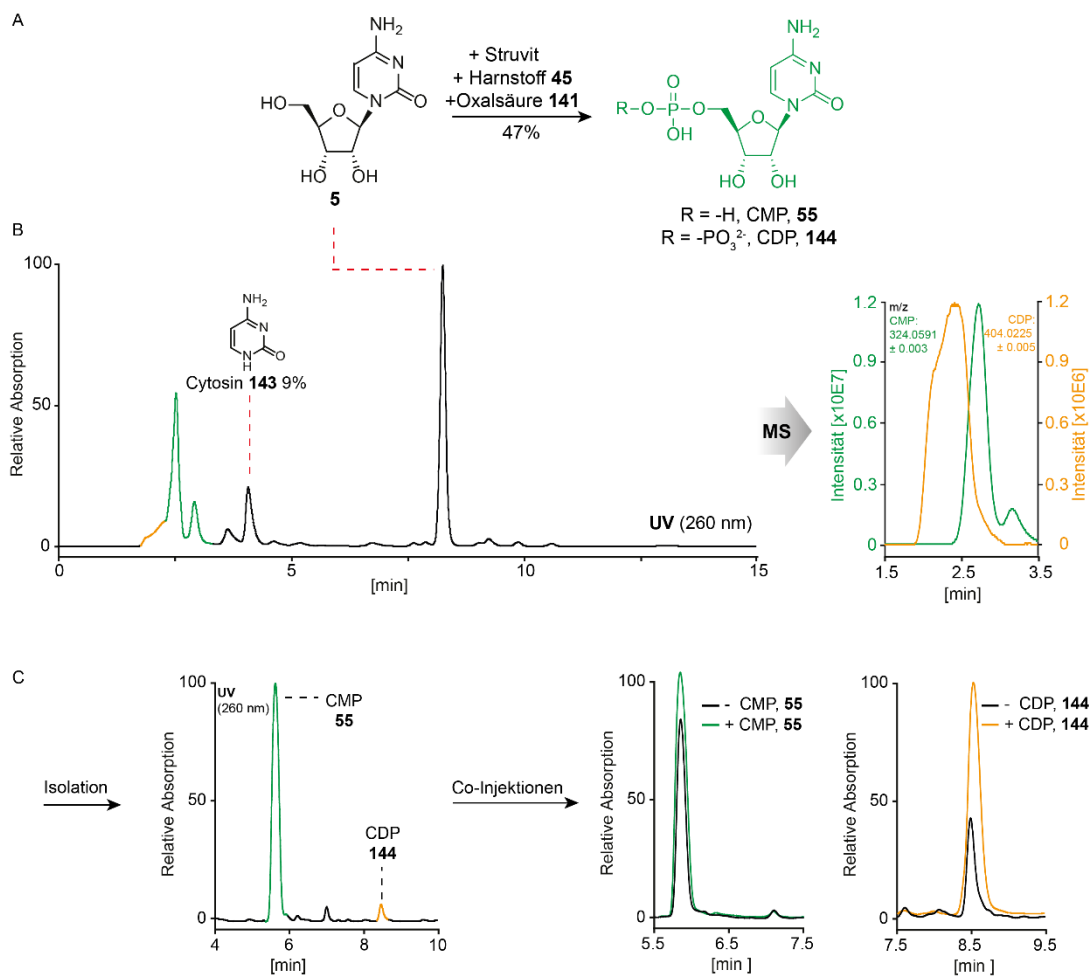
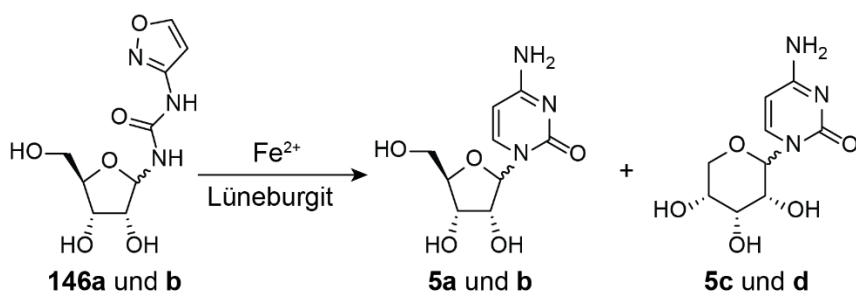


Abbildung 30: Phosphorylierung von Cytidin **5** mit Struvit, Harnstoff **45** und Oxalsäure **30**. A: Reaktionsschema und UV-Chromatogramm der Phosphorylierung. Neben den Phosphorylierungsprodukten entsteht außerdem die Nucleobase Cytosin **143**. B: LC-MS Analyse der korrespondierenden Nucleotide. C: Isolierung der Nucleotide mittels HPLC und anschließende LC-MS Analyse auf einer YMC-Triart C₁₈-Säule und einem basischen Puffer-System (Puffer A: 10 mM NH₄HCO₃ und 5 mM Dibutylamin in H₂O (pH 9.1); Puffer B: ACN) sowie Co-Injektion mit dem synthetischen 5'-Cytidinmonophosphat **55**.

Für die Phosphorylierung wurde Cytidin **5** ebenfalls in der Gegenwart eines Überschusses an **45** in einem Natriumcarbonat Puffer bei 65°C gelöst und anschließend in einem offenen Gefäß

über Nacht auf 85°C erhitzt. In Abbildung 30A ist das UV-Chromatogramm der Phosphorylierung von Cytidin **5** mit Struvit dargestellt. Durch die Verwendung der Oxalsäure **30** konnte eine Gesamtausbeute an Nukleotiden von 47 % erhalten werden. Damit ist die Ausbeute um ein vielfaches höher als die vereinigte Ausbeute an 5'- und cyclischem Monophosphat **55** und **17** von 12 % im Fall von *Hud* und seiner Gruppe.^[97] Es wurde angenommen, dass es sich bei den erhaltenen Nukleotiden um ein Gemisch aus Cytidin-5'-Mono- und Diphosphaten **55** und **144** handelt. Um genauere Informationen über die entstandenen Phosphorylierungsprodukte zu erhalten wurden diese durch HPLC-Chromatographie abgetrennt und mit Hilfe einer YMC-Triart C₁₈ Säule und einem basischen Puffersystem (Puffer A: 10 mM NH₄HCO₃ and 5 mM Dibutylamin in H₂O (pH 9.1)) und Puffer B: ACN) erneut mittels LC-MS analysiert. Das entsprechende UV-Diagramm ist in Abbildung 30C dargestellt. Um sicherzustellen, dass das 5'-Mono- sowie Diphosphat **55** und **144** entstanden sind, wurden diese durch Co-Injektionsexperimente nachgewiesen (Abbildung 30C). Die erhöhte Ausbeute an Nukleotiden verglichen zu den Ergebnissen von *Hud*^[97] ist vermutlich auf die bessere Löslichkeit des Minerals Struvit nach Zugabe der Oxalsäure **30** zurückzuführen.

In unveröffentlichten Ergebnissen gelang es der *Carell*-Gruppe eine präbiotisch plausible Reaktionskaskade zu Pyrimidin-Nukleosiden und Nukleotiden zu entwickeln,^[211] welche kompatibel zum bereits bekannten Purin-Zugang ist.^[30, 72] Der finale Schritt dieser Reaktionskaskade beruht auf der reduktiven Öffnung der Isoxazol-*N*-*O*-Bindung von **146a** und **b**, gefolgt von einer Tautomerisierung, einer intramolekularen Cyclisierung sowie einer Wassereliminierung (vergleiche Schema 22).



Schema 22: Reduktion von Isoxazol **146a** und **b** zu den Cytidin-Derivaten **5a** bis **d**.

Für die Reduktion verwendeten *Carell* und seine Mitarbeiter Fe²⁺-Ionen in der Gegenwart von Thiolen wodurch sie Cytidin **5** in guten Ausbeuten erlangen konnten. Dabei entstehen wie auch im FaPy-Zugang zu den Purinen die verschiedenen α - und β -Isomere als Pyranosyl- und Furanosyl-Gemisch **5a-d**. Darüber hinaus entstehen auch kleine Mengen an Uridin **6**. Als Eisenquelle verwendeten sie dabei FeS Pyrit (FeS₂) oder (NH₄)₂Fe(SO₄)₂ wobei Dithiothreitol, Propanedithiol, Mercaptoethanol und Cystein als Thiole untersucht wurden. Durch die Zugabe

4. Unveröffentlichte Ergebnisse

der natürlich vorkommenden Mineralien Hydroxyapatit, Colemanit sowie Lüneburgit konnten sie die Verteilung der erhaltenen Cytidin-Isomere steuern.

Im Zuge dieser Arbeit wurde getestet, ob die Reduktion der Isoxazol-Verbindung **146a** und **b** auch in Gegenwart von Struvit möglich ist und ob Vivianit als Fe^{2+} -Quelle für die Reaktion eingesetzt werden kann.

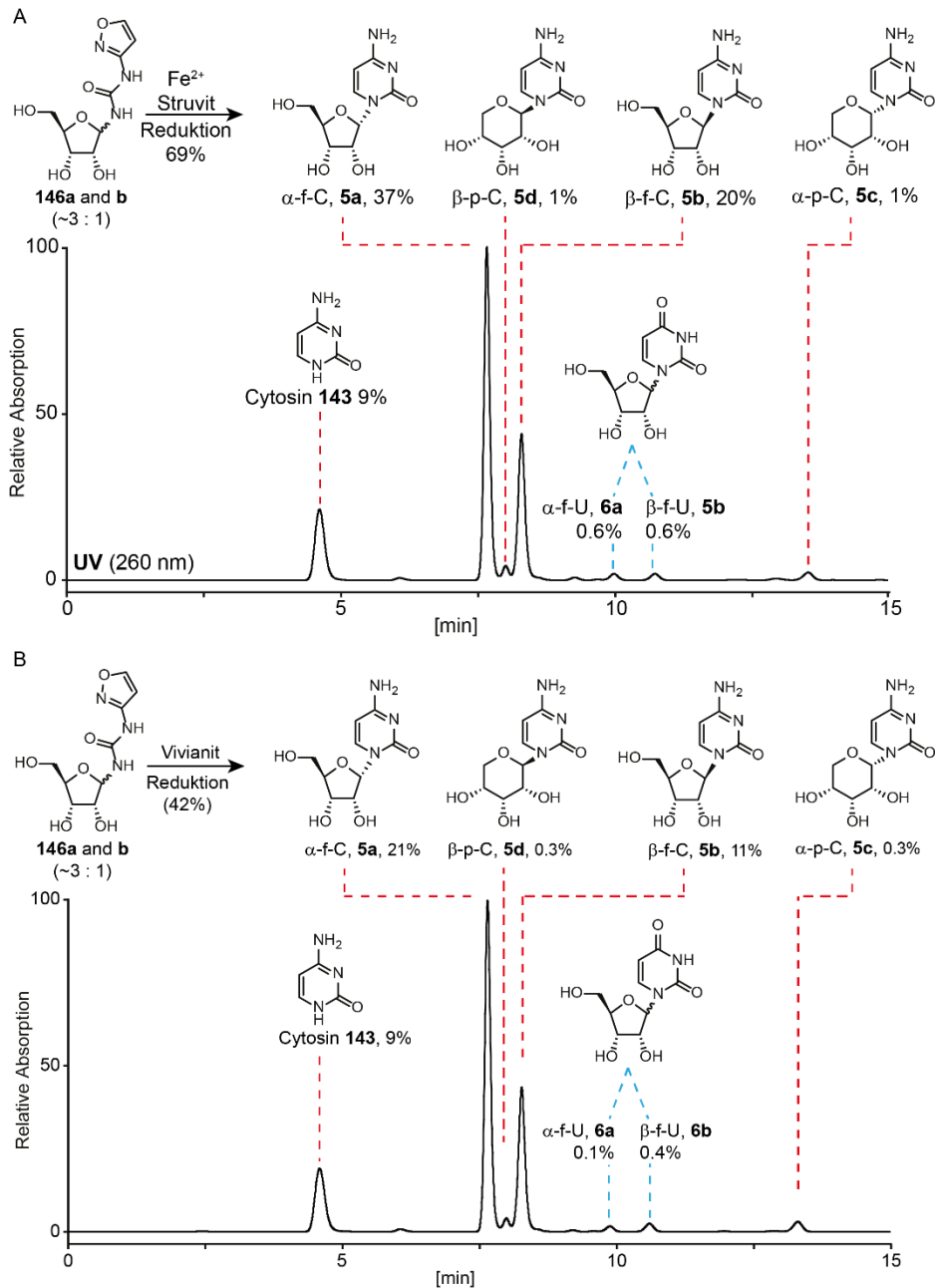


Abbildung 31: Bildung von Pyrimidin Nucleosiden durch die Isoxazol-Riboside **146a** und **b**. Die verschiedenen Isomere sind dementsprechend folgendermaßen benannt: a = α -Furanosid, b = β -Furanosid, c = α -Pyranosid, d = β -Pyranosid. A: Die Reduktion der Isoxazol-Riboside **146a** und **b** mit Struvit lieferte eine Gesamtausbeute von 69 %, wobei das β -Furanosid **5b** in einer Ausbeute von 20 % erhalten wurde. B: Die Reduktion der Isoxazol-Riboside **146a** und **b** mit Vivianit erfolgte mit einer Gesamtausbeute von 42 %, wobei das β -Furanosid **5b** in einer Ausbeute von 11 % erhalten wurde.

Für die Reduktion wurden die Isoxazol-Riboside **146a** und **b** für vier Stunden unter Luftausschluss in Natriumkarbonat-Puffer in Gegenwart von Fe^{2+} und DTT auf 65°C erhitzt. In Abbildung 31A ist das UV-Diagramm der Reduktion der Isoxazol-Riboside **146a** und **b** mit Pyrit in Gegenwart von Struvit abgebildet. Die Reduktion liefert eine Gesamtausbeute von 69 %, wobei das natürlich vorkommende β -Furanosid **4b** in einer Ausbeute von 20 % erhalten wurde. Die Reduktion mit Vivianit ist in Abbildung 31B dargestellt. Die Gesamtausbeute betrug, ohne den Zusatz von weiteren Fe^{2+} -Quellen, 42 %, wobei das natürlich auftretende β -Furanosid **4b** in einer Ausbeute von 11 % erhalten wurde.

Die Ausbeuten liegen damit nur leicht unter den von *Becker et al.* erzielten Werten.^[211] Mit Lüneburgit konnten sie eine Gesamtausbeute der Reduktion von 85 % erzielen, wobei das β -Furanosid **4b** in einer Ausbeute von 27 % erhalten wurde.^[211] Allerdings ist das Verhältnis von Furanosiden zu Pyranosiden, sowohl bei Vivianit als auch bei Struvit, besser als bei *Becker et al.* Sie erhielten Pyranoside in einer Ausbeute von 19 %, wohingegen deren Anteil bei Struvit nur bei 3 % und bei Vivianit sogar nur bei 2 % liegen. Dieser Effekt könnte auch auf die Anwesenheit von Oxalsäure **30** zurückzuführen sein. Wurde Vivianit als Mineral eingesetzt, fand die Reaktion der Isoxazol-Riboside **146a** und **b** ohne den Zusatz weiterer Fe^{2+} -Quellen statt. Das eingesetzte Eisenphosphat konnte ohne weitere Phosphat- oder Eisenquellen sowohl die Isoxazole **146a** und **b** zu Nukleosiden reduzieren als auch deren Phosphorylierung zu Nukleotiden katalysieren.

Becker et al. konnten die Reduktion der Isoxazole **146a** und **b** sowie die anschließende Phosphorylierung in Gegenwart einer Eintopfreaktion durchführen.^[211] Dabei verwendeten sie Lüneburgit als Mineral, Pyrit als Fe^{2+} -Quelle und Dithiothreitol als Thiol. In der vorliegenden Arbeit sollte getestet werden, ob die Reduktion sowie die Phosphorylierung mit Struvit beziehungsweise Vivianit ebenfalls in einer Eintopfreaktion durchgeführt werden kann.

Dabei wurde die Reduktion analog zu der oben beschriebenen Reduktion mit Struvit bzw. Vivianit durchgeführt, wobei das erhaltene Nukleosid-Isomergemisch (s. Abbildung 32A) nach vier Stunden ohne weitere Aufarbeitung umgesetzt wurde. Dazu wurden Harnstoff **45** und Oxalsäure **30** nach der Nukleosid-Bildung zum Reaktionsgemisch gegeben bevor dieses bei 85°C zur Trockene eingedampft wurde (Abbildung 32B). Durch LC-MS Analysen konnten im Falle von Struvit Nukleotide mit 13 % (relativ zu Cytidin **5b**) in einer vergleichbaren Ausbeute zu Lüneburgit (19 %, relativ zu Cytidin **5b**) nachgewiesen werden. Die entsprechenden UV-Chromatogramme sind in Abbildung 32C dargestellt. Auch in diesem Fall wurde angenommen, dass es sich bei den Phosphorylierungsprodukten um ein Gemisch aus Cytidin-5'-Mono- und Diphosphaten handelt. Um mehr Informationen über die entstandenen Nukleotide zu erhalten, wurden diese ebenfalls durch HPLC-Chromatographie abgetrennt und mit Hilfe einer YMC-Triart C_{18} Säule und einem basischen Puffersystem (10 mM NH_4HCO_3 und

4. Unveröffentlichte Ergebnisse

5 mM Dibutylamin in H₂O (pH 9.1)) und Puffer B (ACN) mittels LC-MS analysiert. Das entsprechende UV-Diagramm ist in Abbildung 32D dargestellt. Durch Co-Injektionen konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei den isolierten Produkten hauptsächlich um Cytidin-5'-Monophosphat **55** handelt. Die Ausbeute an Diphosphaten **144** war für eine Isolation zu gering, weshalb diese nicht eindeutig durch Co-Injektionen nachgewiesen werden konnten.

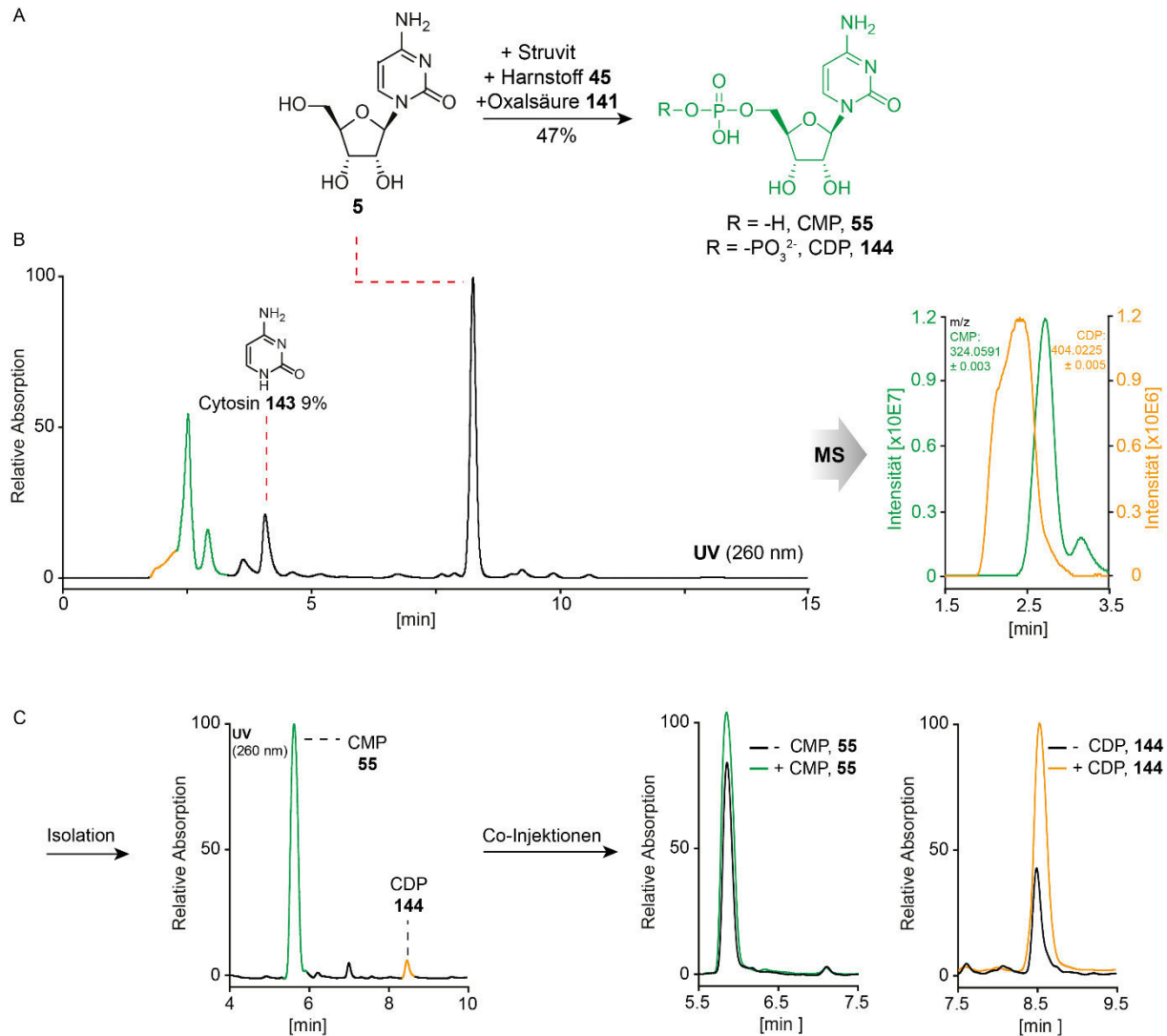


Abbildung 32: Eintopfreaktion der Bildung von Pyrimidin-Bildung aus den Isoxazol-Riboside **146a** und **b**. und anschließende Phosphorylierung. Die verschiedenen Isomere sind folgendermaßen benannt: a = α -Furanosid, b = β -Furanosid, c = α -Pyranosid, d = β -Pyranosid. A: Die Reduktion der Isoxazol-Riboside **146a** und **b** mit Struvit lieferte eine Gesamtausbeute von 69 %, wobei das β -Furanosid **5b** in einer Ausbeute von 20 % erhalten wurde. B: Reaktionsgleichung der Eintopfreaktion von Reduktion und Phosphorylierung. Die Nucleotide können mit einer Ausbeute von 13 % relativ zu Cytidin **5** erhalten werden. C: UV-Chromatogramm und LC-MS-Analyse der korrespondierenden Nucleotide. D: Isolierung der Nucleotide mittels HPLC und anschließende LC-MS Analyse auf einer YMC-Triart C₁₈-Säule und einem basischen Puffer-System (Puffer A: 10 mM NH₄HCO₃ und 5 mM Dibutylamin in H₂O (pH 9.1); Puffer B: ACN) sowie die Co-Injektion mit synthetischem 5'-Cytidinmonophosphat **55**.

Im nächsten Schritt wurden die Bedingungen der Eintopfreaktion mit Struvit auf Vivianit übertragen. Der erste Teil der Reaktion verläuft analog zu der vorher beschriebenen Reduktion (Abbildung 33A).

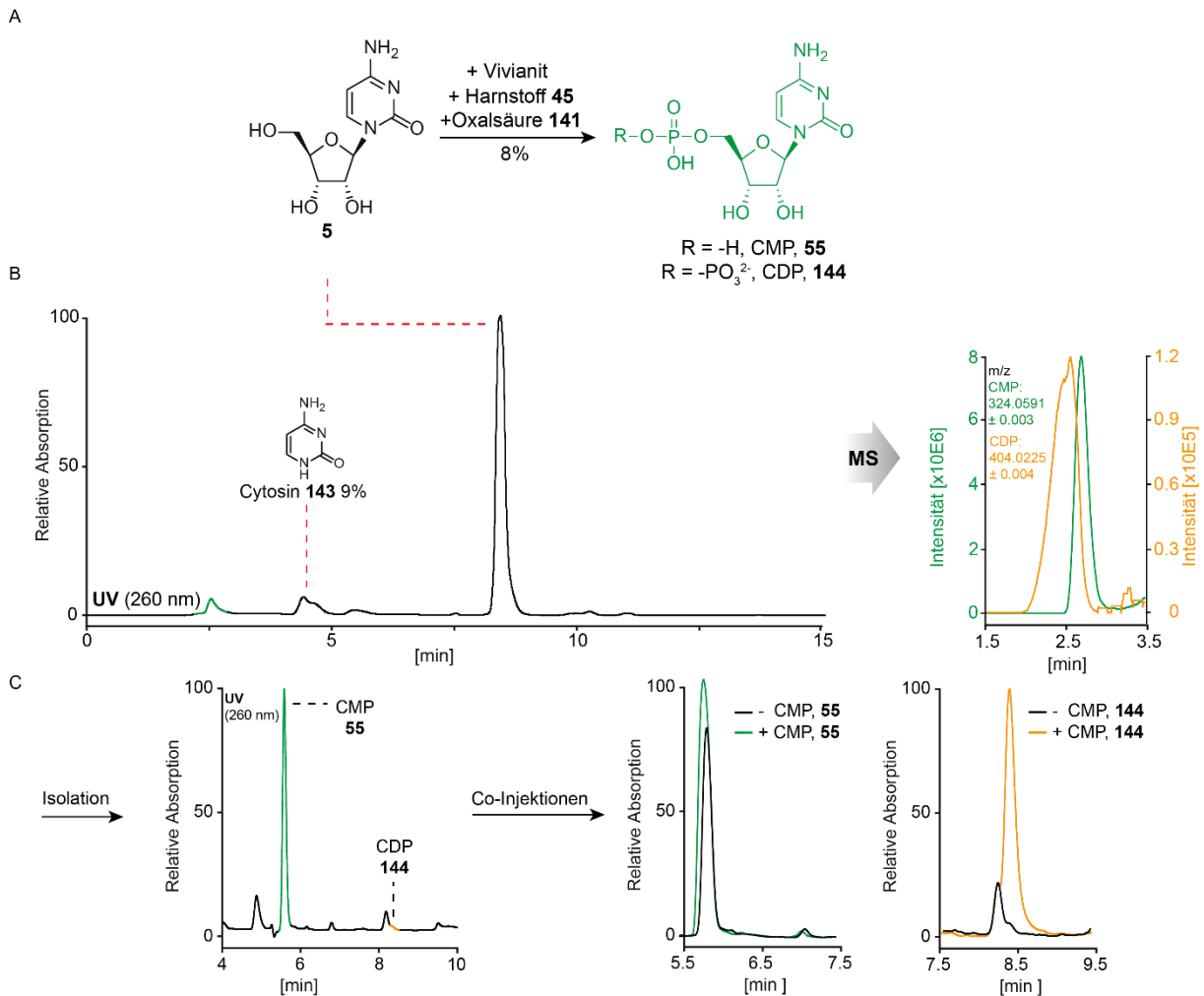


Abbildung 33: Eintopfreaktion der Bildung von Pyrimidin-Bildung aus den Isoxazol-Riboside **146a** und **b**. und anschließende Phosphorylierung. Die verschiedenen Isomere sind folgendermaßen benannt: a = α -Furanosid, b = β -Furanosid, c = α -Pyranosid, d = β -Pyranosid. A: Die Reduktion der Isoxazol-Riboside **146a** und **b** mit Vivianit lieferte eine Gesamtausbeute von 42 %, das β -Furanosid **5b** wurde in einer Ausbeute von 11 % erhalten. B: Reaktionsgleichung der Eintopfreaktion von Reduktion und Phosphorylierung. C: UV-Chromatogramm und LC-MS-Analyse der korrespondierenden Nucleotide. D: Isolierung der Nucleotide mittels HPLC und anschließende LC-MS Analyse auf einer YMC-Triart C₁₈-Säule und einem basischen Puffer-System (Puffer A: 10 mM NH₄HCO₃ und 5 mM Dibutylamin in H₂O (pH 9.1); Puffer B: ACN) sowie die Co-Injektion mit synthetischem 5'-Cytidinmonophosphat **55**.

Die anschließende *in situ* Phosphorylierung durch die Zugabe von Harnstoff **45** und Oxalsäure **30** verläuft weniger selektiv als mit Struvit, so dass im UV-Chromatogramm im Bereich der Phosphorylierungen sehr viele Signale zu sehen sind. Durch Isolierung dieser Signale mittels HPLC und erneuter LC-MS Messung mit dem basischen Puffersystem konnte durch Co-Injektionsexperimente Cytidin-5'-Monophosphat nachgewiesen werden. Damit ist Vivianit in der Lage *in situ* aus Vorläufermolekülen Nucleoside zu generieren und diese anschließend zu

phosphorylieren. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass das Mineral Vivianit eine wichtige Rolle in der Entstehung von RNA gespielt haben könnte.

4.3.3. Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine Methode entwickelt werden, um die Ausbeute der Phosphorylierung von Nucleosiden durch die Verwendung von Struvit um ein Vielfaches zu erhöhen. Durch die Umsetzung von Cytidin **5** mit Struvit in der Gegenwart von Oxalsäure **30** und Harnstoff **45** konnten Phosphorylierungsprodukte in einer Ausbeute von 47 % erhalten werden. Diese Methode konnte auf das häufig vorkommende Eisenphosphat Vivianit übertragen werden. Durch die gleiche Reaktionsführung konnten in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal Nucleotide durch Vivianit in einer Ausbeute von 8 % unter präbiotischen Bedingungen erhalten werden. Durch die Verfügbarkeit des Phosphats in Vivianit kann das Problem der Zugänglichkeit von Phosphor auf der frühen Erde gelöst werden, da Vivianit häufiger vorliegt als andere phosphathaltige Mineralien, wie zum Beispiel Lüneburgit.^[223]

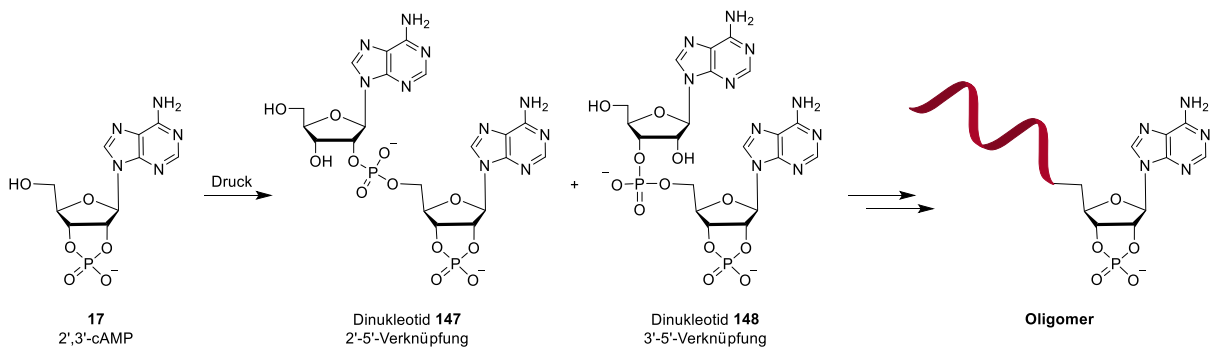
Außerdem konnten die Mineralien Struvit und Vivianit für den präbiotischen Zugang von Nucleosiden verwendet werden. Die Reduktion von Isoxazol-Ribosiden **146a** und **b** konnte in der Anwesenheit von Struvit und Pyrit in einer Ausbeute von 69 % durchgeführt werden. Vivianit ist in der Lage **146a** und **b** ohne weitere Fe²⁺-Quellen in einer Ausbeute von 42 % zu reduzieren. Durch die in dieser Arbeit etablierte Methode mit Oxalsäure **30** konnte außerdem das Verhältnis der Pyranoside und Furanoside auf die Seite der Furanoside verschoben werden.

Darüber hinaus konnten Eintopfreaktionen entwickelt werden, die ausgehend von Isoxazol-Ribosiden **146a** und **b** Nucleotide erzeugen. Als Phosphatquelle dienen dabei die Mineralien Vivianit und Struvit, wodurch eine kontinuierliche Synthese von Nucleotiden aus **146a** und **b** ermöglicht wird. Vivianit dient dabei zugleich als Eisen- und Phosphatquelle weshalb kein weiterer Zusatz von Fe²⁺-Ionen nötig ist.

4.4. Oligomerisierung von aktivierten Nukleotiden unter Hochdruck-Bedingungen

4.4.1. Prolog

Im Rahmen dieser Arbeit soll getestet werden, ob es möglich ist 2',3'-cyclische Monophosphate zu polymerisieren, wenn sie hohen Drücken ausgesetzt sind. Die Oligomerisierung der cyclischen Monophosphate erfolgt durch den Angriff der 5'-Hydroxylgruppe eines cAMP **17** an das cyclische Phosphat eines weiteren Moleküls **17**. Die entstehenden Dinukleotide **147** und **148** können erneut mit **17** reagieren und so Oligomere bilden. Die entsprechende Reaktionskaskade ist in Schema 23 dargestellt.



Schema 23: Polymerisation von 2',3'-cyclischem Adenosinmonophosphat **46** durch hohen Druck.

Die Experimente in diesem Kapitel wurden in Zusammenarbeit mit *Sebastian Vogel* aus dem Arbeitskreis *Schnick* an der *Ludwig-Maximilians-Universität* durchgeführt.

4.4.2. Ergebnisse und Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden 2',3'-cyclische Monophosphate hohen Drücken ausgesetzt, um durch die Reaktion mit einem weiteren cyclischen Nukleosid-Monophosphaten RNA-Oligomere zu erhalten. Die Hochdruck-Experimente wurden in einer *Multianvil*-Presse im Arbeitskreis *Schnick* durchgeführt. Hierfür wurde das Monophosphat in einem Tiegel aus hexagonalem Bornitrit vorgelegt und unter Druck komprimiert.

In einem ersten Experiment wurde 2',3'-cAMP **17** bei Raumtemperatur einem Druck von 7 GPa ausgesetzt. Die Ergebnisse des Experiments sind in Abbildung 34A dargestellt.

4. Unveröffentlichte Ergebnisse

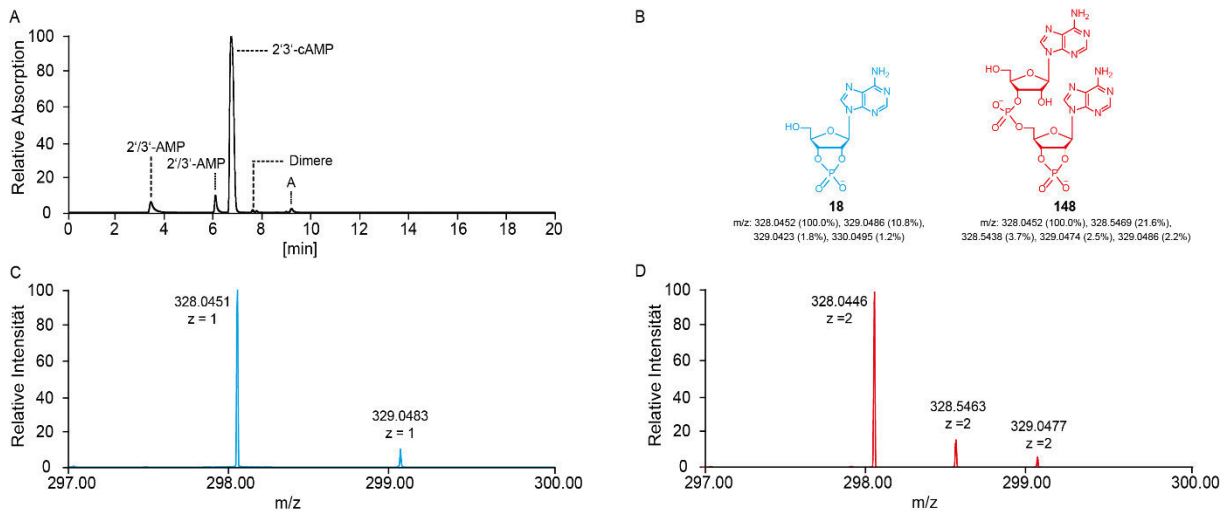


Abbildung 34: A: Kompression von 2',3'-cyclisches Monophosphat **17** bei Raumtemperatur und 7 GPa. A: UV-Chromatogramm der Messung. B: Strukturen und m/z-Werte des Monomers **17** (blau) und des Dinukleotids **148** (rot). C: Massenspektrum des Monomers. D: Massenspektrum des Dinukleotids **148**.

Nach der Kompression von 2',3'-cyclischem Monophosphat **17** für 8 h war noch viel Edukt vorhanden. Ein Teil des cyclischen Phosphats hat sich geöffnet, so dass die entsprechenden 2'- oder 3'-Monophosphate entstanden sind. Ein weiterer kleiner Teil des Edukts hat zu Adenosin **3** reagiert. Darüber hinaus konnte allerdings auch ein Signal mit der Masse des Dinukleotids **148** (Struktur s. Abbildung 34B) nachgewiesen werden. Um sicherzustellen, dass es sich bei der detektierten Masse nicht um die Dimerisierung des Edukts im Massenspektrometer handelt, wurden auch die Ladungszustände der Ionen überprüft und mit der des Monomers verglichen. Dem Signal des Dinukleotids **148** wird eine Masse von $m/z = 328.0445$ und ein Ladungszustand von 2 zugeordnet (Abbildung 34D), wohingegen dem Signal des Monomers eine Masse von m/z von 328.0451 und ein Ladungszustand von 1 zugeordnet wird (Abbildung 34C). Daraus kann geschlossen werden, dass es sich bei der Spezies höchstwahrscheinlich um das in Abbildung 34B dargestellte Dinukleotid **148** handelt.

Um die Ausbeute des Dinukleotids **148** zu erhöhen, wurde versucht das cyclische Monophosphat durch verschiedene Additive zu aktivieren. Die entsprechenden Chromatogramme der Experimente sind in Abbildung 35 abgebildet.

Um den Einfluss verschiedener Additive auf die Oligomerisierung zu untersuchen, wurde im ersten Schritt versucht, Calciumoxid zusammen mit 2',3'-cAMP **17** ebenfalls bei 7 GPa zu komprimieren. Die zweifach positiv geladenen Calcium-Ionen sollten zum einen jeweils zwei einfach negativ geladene Reaktanden räumlich näherbringen und zum anderen auf Grund seiner hygroskopischen Eigenschaften störendes Wasser abfangen. Durch die anschließende LC-MS Analyse konnte allerdings keine Dinukleotid-Bildung nachgewiesen werden.

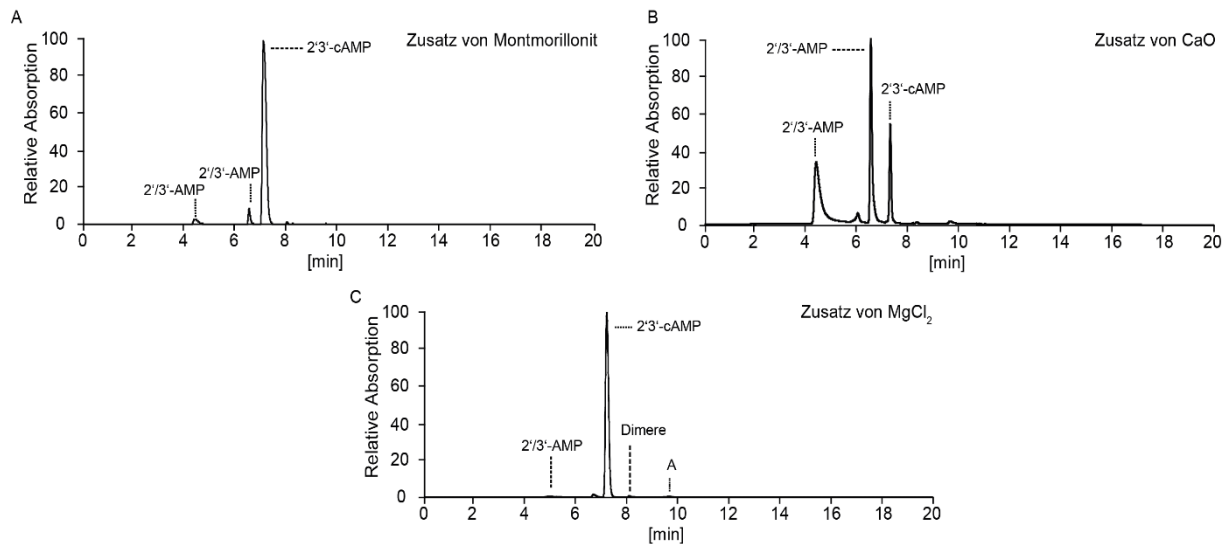


Abbildung 35: UV-Diagramme der Hochdruck-Experimente von 2',3'-cyclisches Monophosphate **17** bei Raumtemperatur und 7 GPa mit verschiedenen Additiven: A: CaO, B: Montmorillonit und C: MgCl₂.

Durch den Einsatz des Schichtsilikats Montmorillonit in Gegenwart von Natrium-Ionen konnten in wässriger Lösung Oligomere bis zu einer Länge von zwölf erhalten und darüber hinaus die Selektivität zugunsten der 3',5'-Verknüpfung gesteuert werden.^[142, 143] Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit getestet werden, ob Montmorillonit ebenfalls in der Lage ist, die Oligomerisierung von 2',3'-cAMP **17** unter Hochdruckbedingungen zu katalysieren. Erste Tests waren allerdings nicht erfolgreich. Der Einsatz des Schichtsilikats führte zur Öffnung des cyclischen Phosphats und damit zur Entstehung von 2'- bzw. 3'-AMP (s. Abbildung 35B). In Abbildung 35C ist das UV-Diagramm des Hochdruck-Experiments von 2',3'-cAMP **17** unter Zusatz von Magnesiumchlorid zu sehen. Die Magnesium-Ionen konnten die Ausbeute der Oligomerisierung der cyclischen Phosphate allerdings ebenfalls nicht erhöhen.

Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob die Ausbeute der Oligomerisierung von 2',3'-cAMP **17** durch Scherkräfte erhöht werden kann. Hierzu wurde der Druck mehrmals zwischen 4 und 7 GPa (s. Abbildung 36A) bzw. zwischen 5 und 7 GPa (s. Abbildung 36B) bei Raumtemperatur variiert. Die entsprechenden Chromatogramme der Experimente sind in Abbildung 36 dargestellt.

4. Unveröffentlichte Ergebnisse

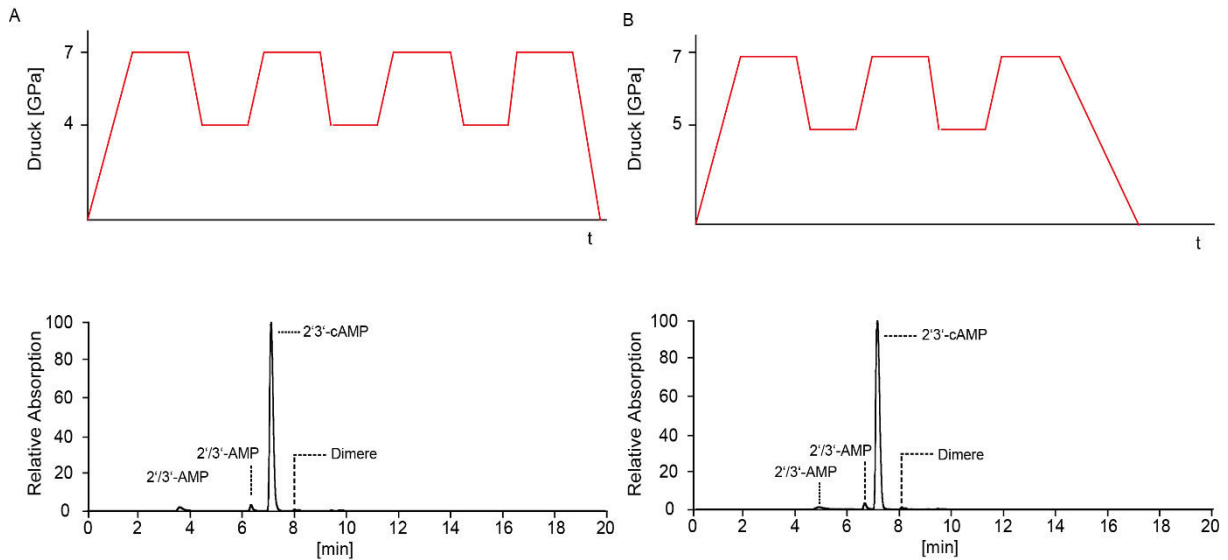


Abbildung 36: UV-Diagramme der Hochdruck-Experimente von 2',3'-cyclischem Monophosphat **17** bei Variation des Drucks. A: Der Druckverlauf entsprach 7-4-7-4-7-4-7 GPa B: Der Druckverlauf entsprach 7-5-7-5-7 GPa.

Auch durch das Einwirken von Scherkräften auf 2',3'-cAMP **17** konnten nur geringe Mengen an Dinukleotid **148** nachgewiesen werden. Daher wurde in weiteren Experimenten die Temperatur der Hochdruck-Experimente variiert. Hierfür wurde **17** bei 7 GPa einer Heizleistung von 4 % ausgesetzt. Gemäß vorangegangenen Kalibrierungen entspricht eine Heizleistung von 4 % dabei etwa einer Temperatur von ca. 110 °C. Das UV-Chromatogramm des Experiments ist in Abbildung 37 dargestellt.

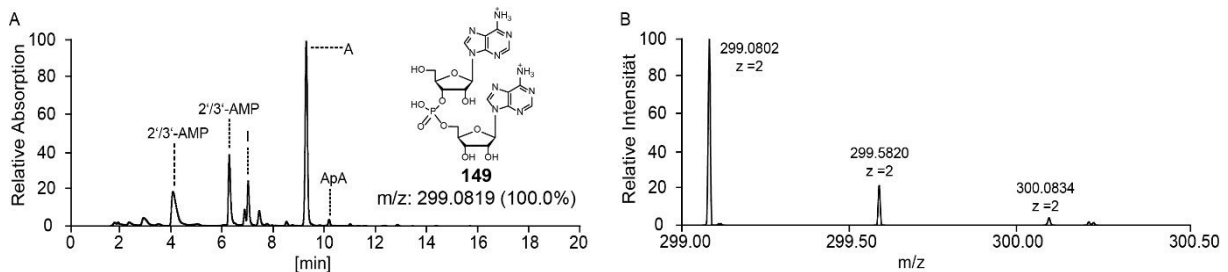


Abbildung 37: Hochdruck-Experiment von 2',3'-cyclischem Monophosphat **17** bei 4 % Heizleistung und 7GPa. A: UV-Diagramm der Umsetzung. B: Ladungszustände des Dinukleotids **149**.

Bei erhöhten Temperaturen ist nach 9 h kaum noch Edukt vorhanden. Das cyclische Phosphat **17** hat sich größtenteils zu Adenosin **3** und 2'- sowie 3'-AMP zersetzt. In kleinen Mengen konnte ein Signal mit der Masse des Dinukleotids **149** nachgewiesen werden, welcher aus der Reaktion von Adenosin **3** mit 2',3'-cAMP **17** resultiert. Um zu verhindern, dass das cyclische Phosphat abspaltet, wurde in weiteren Experimenten versucht, dieses durch Borax zu stabilisieren sowie die Heizleistung um 1 % zu reduzieren (s. Abbildung 38).

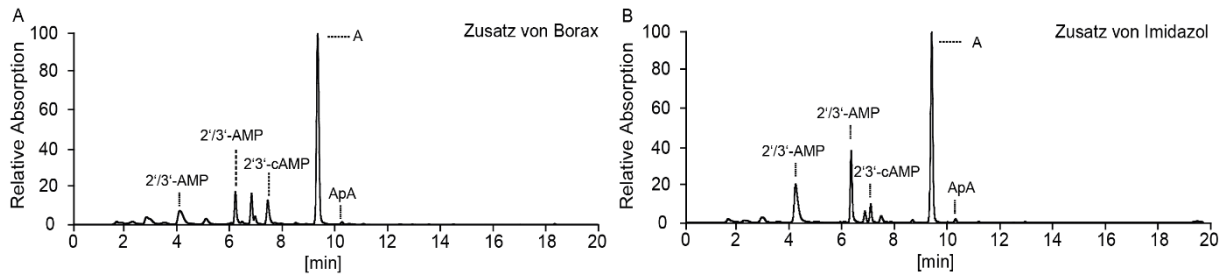


Abbildung 38: UV-Diagramme der Press-Experiments von 2',3'-cyclisches Monophosphate **17** bei 3 % Heizleistung und 7 GPa mit den Additiven Borax (A) und Imidazol (B).

Die Stabilisierung des cyclischen Phosphats war durch die Zugabe von Borax allerdings nicht möglich, da auch unter diesen Bedingungen Adenosin **3** als Hauptprodukt entsteht.

Verlander et al. berichteten 1973 von der Polymerisation cyclischer Adenosinmonophosphate durch Amine in Lösung. Dabei konnten sie eine Selbst-Oligomerisierung der cyclischen Phosphate unter anderem durch Imidazol beobachten.^[126] Im Rahmen dieser Arbeit wurde getestet, ob Imidazol dazu in der Lage ist, die Polymerisation der aktivierten Nukleotide auch unter lösungsmittelfreien Bedingungen zu katalysieren. Die LC-MS-Untersuchungen des Presslings in Abbildung 38B zeigen allerdings hauptsächlich eine Zersetzung des Produkts zu Adenosin **3** und den offenen Monophosphaten.

Für die bisherigen Hochdruck-Experimente in dieser Arbeit wurde das Natriumsalz des cyclischen Monophosphates **17** verwendet. Um herauszufinden, ob das Natrium-Ion einen Einfluss auf die Stabilität des cyclischen Phosphats und damit auf die Dimerisierung hat, wurde dieses mit Hilfe eines Ionentauschers durch ein Proton ausgetauscht und das entstehende freie 2',3'-cAMP **17** anschließend einem Druck von 7 GPa ausgesetzt. Durch die Einwirkung des hohen Drucks auf das freie 2',3'-cAMP **17** entstand ein inhomogener Pressling, bei welchem der farblose Feststoff durch bräunliche Schlieren durchzogen war. Um aufzuklären, ob die jeweiligen Phasen unterschiedliche Zusammensetzungen besitzen, wurden diese voneinander abgetrennt und einzeln mittels LC-MS-Analyse untersucht. Die UV-Chromatogramme der beiden Phasen sind in Abbildung 39 gezeigt.

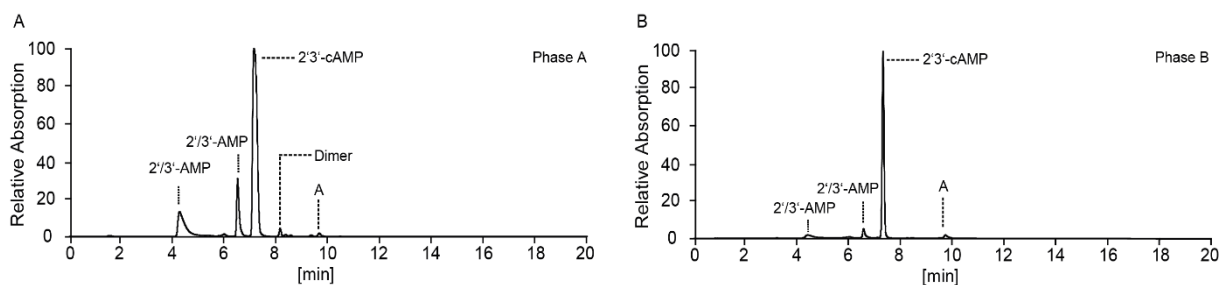


Abbildung 39: UV-Diagramme der Hochdruck-Experimente von 2',3'-cyclischem Monophosphat **17** nachdem das Natrium-Ion ausgetauscht wurde. A: Braune Schlieren. B: Restliche Probe.

4. Unveröffentlichte Ergebnisse

Tatsächlich stellte sich durch die Untersuchung mittels LC-MS heraus, dass die beiden Phasen unterschiedlich zusammengesetzt waren. So enthält der farblose Feststoff (Phase B) fast nur Edukt, wohingegen die bräunlichen Schlieren (Phase A) neben den geöffneten Monophosphaten auch Dinukleotid **148** enthielt. Die Ausbeute des Dinukleotids **148** lag bei etwa 1.5 % (Berechnet über UV-Signale)

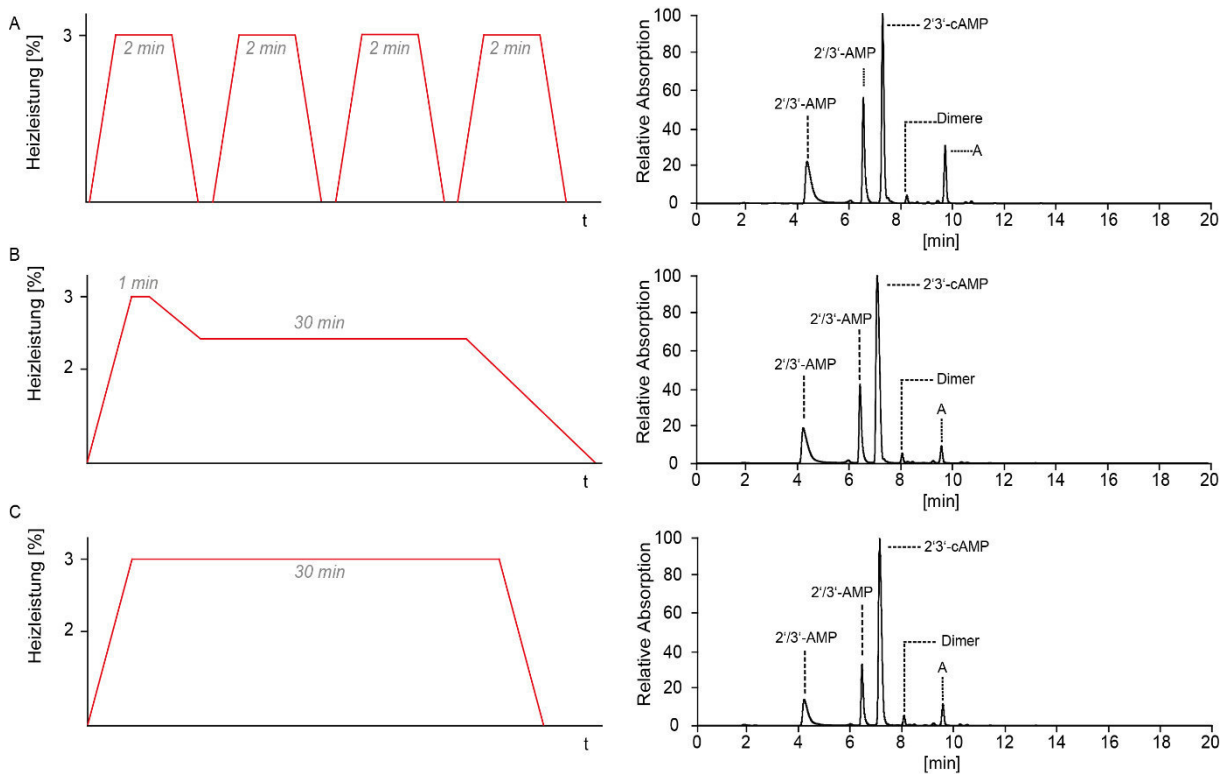


Abbildung 40: UV-Diagramme der Hochdruck-Experimente von 2',3'-cyclischem Monophosphat **17** bei Variation der Temperatur. A: Die Probe wurde vier Mal für je 2 min auf 3 % Heizleistung erwärmt. B: Die Probe wurde für 1 min auf 3 % Heizleistung erwärmt und dann für 30 min auf 2 %. C: Die Probe wurde für 30 min auf 3 % Heizleistung erwärmt.

Da sich das Edukt durch langes Erhitzen hauptsächlich zersetzt und dies auch durch Additive nicht verhindert werden kann, wurde die Heizphase in weiteren Experimenten stark gekürzt und auf geringere Heizleistungen reduziert. Um den Einfluss der Temperatur zu untersuchen wurde getestet, ob wiederholte kurze Aufheiz- und Abkühlphasen die Ausbeute weiter erhöhen können. Hierfür wurde die Probe vier Mal für je 2 min auf 3 % (ca. 90 °C) Heizleistung erhitzt. Durch die Temperaturvariation öffnet sich das cyclische Phosphat zwar teilweise, allerdings ist das UV-Signal des Dinukleotids ebenfalls deutlich angestiegen (Abbildung 40A). In einem weiteren Test wurde die Probe für 1 min auf 3 % Heizleistung (ca. 90 °C) erhitzt und daraufhin für 30 min auf 2 % Heizleistung (ca. 75 °C) gehalten. Bei der LC-MS-Analyse, dargestellt in Abbildung 40B, dieser Probe konnte ebenfalls ein deutliches Signal des Dinukleotids **148** detektiert werden, wobei die Ausbeute etwas höher als war. Durch eine Heizleistung von 3 % für 30 min kann die Menge an Dinukleotid **148** weiter gesteigert werden und liegt somit bei ca. 3 % (Berechnet über UV-Signale, Abbildung 40C).

Im nächsten Experiment sollte getestet werden, ob die Ausbeute des Dinukleotids **148** gesteigert werden kann, wenn die Temperaturvariation auf das freie 2',3'-cAMP **17** angewendet wird. Hierfür wurde das Natrium-Ion wieder mit Hilfe eines Ionentauschers gegen ein Proton ausgetauscht und anschließend bei 7 GPa für eine Minute bei einer Heizleistung von 3 % und anschließend für 30 min bei einer Heizleistung von 2 % geheizt. Im UV-Chromatogramm in Abbildung 41A wird allerdings deutlich dargestellt, dass das cyclische Phosphat unter diesen Bedingungen fast komplett abreagiert und es sich bei den Hauptprodukten um die geöffneten Monophosphate sowie um das Nukleosid Adenosin **3** handelt.

In einem weiteren Experiment wurde das freie 2',3'-cAMP **17** nach dem Ionentausch direkt in einem Calciumchlorid-Puffer aufgenommen. Dadurch sollte das cyclische Phosphat zum einen durch das Calciumion stabilisiert werden, zum anderen sollten sich jeweils zwei einfach negativ geladene Moleküle durch die Koordination an das zweifach positive geladene Ion räumlich näherkommen. Im UV-Diagramm in Abbildung 41B wird allerdings deutlich, dass sich das cyclische Phosphat durch die Zugabe der Calciumionen hauptsächlich zum Monophosphat öffnet und die Entstehung des Dinukleotids **148** nur in sehr geringen Mengen erfolgt.

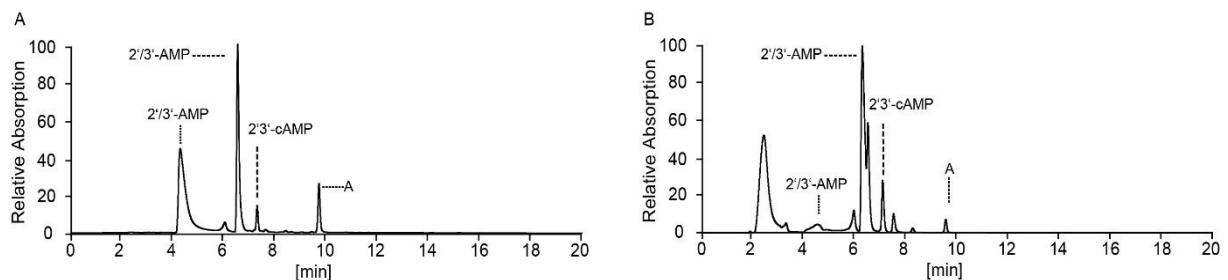


Abbildung 41: UV-Diagramme der Hochdruck-Experimente mit 2',3'-cyclischem Monophosphat **17**. A: Austausch des Natrium-Ions durch ein Proton und anschließendes Heizen der Probe bei 7 GPa für 1 min auf 3 % Heizleistung und 30 min auf 2 %. B: Austausch des Natrium-Ions durch ein Calcium-Ion und darauffolgendes Heizen der Probe bei 7 GPa für 1 min auf 3 % Heizleistung und anschließend 30 min auf 2 %.

4.4.3. Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden aktivierte cyclische 2',3'-Nukleosidmonophosphate durch Druck polymerisiert. Um die Polymerisation der Nukleoside zu begünstigen, wurden verschiedene Parameter wie der Druck und die Temperatur variiert. Das vielversprechendste Ergebnis zeigte dabei die Variation der Temperatur. Sowohl kurze Heizschübe als auch kurzes Erhitzen auf 2 % Heizleistung lieferten Dinukleotide. Auch der Austausch des Natrium-Gegenions und das anschließende Pressen des freien Nukleosidmonophosphats führte zur Entstehung von Dinukleotiden. Somit konnten im Zuge dieser Arbeit Methoden gefunden

4. Unveröffentlichte Ergebnisse

werden, um RNA-Dimere aus aktivierten Nucleosiden mit Hilfe von Druck herzustellen, wobei die Ausbeuten des Dinucleotids **148** zwischen circa 2 und 3 % liegen.

In weiteren Experimenten können diese Bedingungen optimiert werden, um die Ausbeute der Dinucleotide noch weiter zu steigern. Eine Möglichkeit hierfür wäre eine weitere Variation der Heizzeit bzw. der Temperatur. Bei einer Heizleistung von 3 % für 30 min ist noch viel Edukt vorhanden, wohingegen sich das Edukt bei einer Heizleistung von 4 % für sechs Stunden hauptsächlich zu Adenosin **3** zersetzt. Außerdem könnte die Zersetzung zu Adenosin **3** auf störendes Wasser zurückzuführen sein. Da es selbst bei einer Probenvorbereitung des Oktaeders unter Luftausschuss in der *Glovebox* zu Zersetzungen kommt, ist es möglich, dass dieses beim Präparieren des Würfels oder in der Hochdruckpresse in die Probe gelangt. In weiteren Tests könnten Methoden entwickelt werden, die die Anwesenheit von Wasser vollständig ausschließen.

Um sicherzustellen, dass es sich bei dem entstehenden Dinucleotid **148** um die richtige 2'-5'-Verknüpfung handelt, müssen diese als Referenzmoleküle synthetisiert und in den präbiotischen Versuchen durch Co-Injektionsexperimente nachgewiesen werden. In weiterführenden Tests könnten die Dinucleotide Hochdruckbedingungen ausgesetzt werden, um zu untersuchen, ob diese ebenfalls in der Lage sind zu polymerisieren und Tetramere oder eventuell höhere Oligomere zu bilden.

Um mehr Informationen über das Polymerisierungsverhalten von cyclischen Nucleosidmonophosphaten zu erhalten, könnten außerdem 3',5'-cyclisches Monophosphate **75a-d** in Hochdruck-Experimenten untersucht werden. Durch die größere Ringspannung ist das Phosphat reaktiver und liefert selbst in Lösung ohne weitere Aktivierung Oligomere mit einer Länge von bis zu 25 Einheiten.^[127, 128]

5. Experimenteller Teil

5.1. Methoden

Chemische Synthesen und verwendete Chemikalien

Sofern dies nicht anders angezeigt wurde, wurden alle Reaktionen unter Anwendung von Standard-Schlenk-Technik durchgeführt. Glasgeräte wurden vor Gebrauch unter Hochvakuum mit einer Heißluftpistole bei 650 °C ausgeheizt und ausgekühlt. Für die Synthesen wurden generell über Molsieb getrocknete Lösemittel der Firma Sigma Aldrich (< 50 ppm H₂O) verwendet, welche nur unter trockenen Bedingungen und in einem leichten Stickstoff-Gegenstrom entnommen wurden. Darstellungen, welche keiner Schutzgasatmosphäre bedurften, wurden in Lösungsmittel mit HPLC-Güte durchgeführt. Für Extraktionen und säulenchromatographische Aufreinigungen der Rohprodukte wurden Lösemittel technischer Güte verwendet, welche vorab destilliert wurden. Chemikalien wurden von den Firmen *Fluka*, *Acros*, *Sigma-Aldrich*, *Carbolution*, *Carbosynth* und *TCl* in den gängigen Qualitätsstufen puriss, p.a. und purum bezogen.

Dünnschichtchromatographie (DC) und Säulenchromatographie

Zur Reaktions- und Trennkontrolle bei säulenchromatographischen Aufreinigungen wurden DC-Platten F254 (Kieselgel auf Aluminium) der Firma *Merck* verwendet. Aromatische sowie UV- und fluoreszenzaktive Substanzen wurden unter einer UV-Lampe ($\lambda = 254$ nm, 366 nm) beobachtet. Des Weiteren wurden Substanzen mit Kaliumpermanganat- oder CAN-Lösung angefärbt (KMgO₄-Lösung, 3 g KMnO₄, 20 g K₂CO₃, 5 mL 5 % NaOH und 300 mL Wasser, Cer(IV)-ammoniummolybdat-Lösung, 120 g (NH₄)₆Mo₇O₂₄·24H₂O und 5.0 g Ce(NH₄)₄(NO₃)₆ in 800 mL H₂SO₄, 10 %-ig). Die verwendeten Lösungen wurden alle unter Lichtausschluss aufbewahrt.

Normalphasen-Säulenchromatographie

Rohprodukte wurden standardmäßig über Normalphasen-Säulenchromatographie unter Benutzung von Kieselgel 60 (Korngröße: 0.063 - 0.200 mm) der Firma *Merck* aufgereinigt. Der Säule wurde dabei ein leichter Stickstoff-Überdruck angelegt (*Flash*-Methode). Fraktionen wurden in Reagenzgläsern oder je nach Ansatzgröße in 50-250 mL Gefäßen gesammelt und über DC beziehungsweise LC-MS analysiert.

Umkehrphasen-Säulenchromatographie

Rohprodukte wurden über Umkehrphasen-Säulenchromatographie unter Benutzung von C₁₈-beschichtetem Silika von *Sigma-Aldrich* aufgereinigt. Der Säule wurde dabei ein leichter

5. Methoden

Stickstoff-Überdruck angelegt (*Flash-Methode*). Fraktionen wurden in Reagenzgläsern gesammelt und über Umkehrphasen-DC-Platten der Firma *Merck* beziehungsweise LC-MS analysiert.

Rotationsverdampfer

Zur *in vacuo* Destillation der Lösemittel wurde ein *Laborota 4000* der Firma *Heidolph* verwendet. Sofern nicht abweichend angegeben wurde das Wasserbad auf 40 °C geheizt.

Lyophilisation

Gefriertrocknung wurde mit Hilfe einer *Alpha 2-4 LD plus*-Lyophile der Firma *Christ* realisiert. Die zu entfernenden Lösemittel wurden dabei zuvor mit flüssigem Stickstoff eingefroren.

Bidestilliertes Wasser

Für mobile Phasen der HPLC-Analysen und für biochemische Zwecke wurde das Wasser mit einer MilliQ-Anlage der Firma *Sartorius* verwendet.

Schmelzpunktanalyse

Schmelzpunkte kristalliner Feststoffe wurden an einem *Büchi Melting Point B-540* aufgenommen.

High Performance Liquid Chromatography (HPLC & UHPLC)

Semipräparative HPLC-Aufreinigungen wurden an einem *Breeze*-System von *Waters* (*2487 Dual Array Detector, 1525 Binary HPLC Pump*) durchgeführt. Dabei wurde eine C₁₈-Säule (VP 250/10 Nucleosil 100/7 C18) der Firma *Macherey & Nagel* bei einem Fluss von 5.0 mL/min verwendet. Analytische HPLC wurde an einer *Waters Alliance 2695* mit *Photodiode Array Detector 2996* durchgeführt. Zur Auftrennung wurde eine VP 250/10 Nucleodur 100-5 C18 eC-beziehungsweise eine CC 250/4 Nucleosil N 120-3 C₁₈-Säule von *Macherey & Nagel* verwendet, wobei ein Fluss von 0.5 mL/min angewendet wurde. Als flüssige Phasen wurden bidestilliertes Wasser und Acetonitril bzw. davon gepufferte Lösungen verwendet. Die Puffersysteme sind in den jeweiligen Synthesevorschriften konkretisiert.

pH-Meter

Zur Einstellung des pH-Wertes der verwendeten Puffer wurde ein *MP 220* von *Mettler Toledo* verwendet, welches vor jeder Messung mit einer pH = 4.0 und pH = 7.0 Standardlösung kalibriert wurde.

Kernresonanzspektroskopie (NMR)

^1H -NMR, ^{13}C - und 2D-Spektren (COSY, HSQC, HMBC) wurden größtenteils selbstständig an einem *Bruker Ascend 400* oder von der Analytikabteilung für Kernresonanzspektroskopie des Departments Chemie der Ludwig-Maximilians-Universität München von *David Stephenson*, *Claudia Dubler* und *Petra Keilholz* aufgenommen. Dabei wurde ein *Varian Inova 400*, *Bruker ARX 600* oder *Bruker Avance III HD* (800 MHz) verwendet. Die chemischen Verschiebungen sind in ppm (*parts per million*) angegeben, welche sich auf die Mitte des jeweiligen Kopplungsmusters beziehungsweise auf die Ausdehnung des Multipletts beziehen. Als interner Standard relativ zu den chemischen Verschiebungen dienten die verwendeten deuterierten Lösemittel. Die Multiplizitäten der Signale werden als s (Singulet), d (Duplet), t (Triplet), q (Quartet), p (Quintet), s (Sechstet), m (Multiplet) bzw. deren Kombinationen angegeben. Außerdem sind die Angaben der Multiplizitäten phänomenologisch, das heißt, dass die Daten entsprechend ihrer Erscheinung und nicht ihrer theoretisch zu erwartenden Multiplizität angegeben wurden. Kopplungskonstanten sind in Hertz (Hz) angegeben und beziehen sich, sofern nicht anders angegeben, auf H-H-Nah- und Fernkopplungen.

Massenspektrometrie (LC-MS, HR-ESI)

HR-ESI- und EI-MS-Analysen wurden von der Analytikabteilung für Massenspektrometrie des Departments Chemie der Ludwig-Maximilians-Universität München von *Werner Spahl*, *Sonja Kosak* und *Carola Draxler* angefertigt. Es wurde dabei ein *LTQ-FTI-CR (ESI)* der Firma *Finnigan* verwendet. Zur Reaktionskontrolle wurden selbstständig LC-MS-Analysen an einem *Dionex micro* UHPLC-System mit gekoppeltem *MSQ Single-Quadrupol* durchgeführt. Als mobile Phasen wurde dabei bidestilliertes Wasser und ACN mit jeweils 0.05 % Ameisensäure verwendet.

Die Analyse der präbiotischen Reaktionen erfolgte mit Hilfe von LC-ESI-MS. Bei dem Massenspektrometer handelt es sich dabei um eine *Thermo Finnigan LTQ Orbitrap XL* und bei der LC um ein *Dionex Ultimate 3000 HPLC* System mit einer Flussrate von 0.15 mL/min über eine *Uptisphere 120-3HDO C₁₈* Säule. Die Säulentemperatur wurde dabei bei 30°C gehalten oder im Fall der Methylurea-Derivate auf 40°C erhöht.

Puffer A (2 mM HCOONH_4 in H_2O (pH 5.5)) und Puffer B (2 mM HCOONH_4 in $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ 20/80 (pH 5.5)) dienen als Eluenten für die Messungen.

Für Proben die FaPys oder Nitrosopyrimidine enthielten wurde der folgende Gradient gewählt: 0 → 45 min, 0 % → 40 % HPLC/MS Puffer B; 45 → 48 min, 40 % → 100 % HPLC/MS Puffer B; 48 → 54 min, 100 % HPLC/MS Puffer B; 54 → 57 min, 100 % → 0 % HPLC/MS Puffer B; 57 → 67 min, 0 % HPLC/MS Puffer B.

5. Methoden

Für Proben die Methylurea-modifizierte Nucleoside enthielten wurde folgender Gradient gewählt:

0 → 45 min, 0 % → 25 % HPLC/MS Puffer B; 45 → 48 min, 25 % → 100 % HPLC/MS Puffer B; 48 → 54 min, 100 % HPLC/MS Puffer B; 54 → 57 min, 100 % → 0 % HPLC/MS Puffer B; 57 → 67 min, 0 % HPLC/MS Puffer B.

Für alle anderen Proben wurde folgender Gradient benutzt:

0 → 45 min, 0 % → 20 % HPLC/MS Puffer B; 45 → 48 min, 20 % → 100 % HPLC/MS Puffer B; 48 → 54 min, 100 % HPLC/MS Puffer B; 54 → 57 min, 100 % → 0 % HPLC/MS Puffer B; 57 → 67 min, 0 % HPLC/MS Puffer B.

Die Elution wurde bei 260 nm (*Dionex Ultimate 3000 Diode Array Detector*) oder 310 nm für die Nitrosopyrimidine verfolgt.

Die gesamte Flussmenge wurde direkt in die Ionenquelle (*HESI II, Thermo Fisher*) geleitet. Die gebildeten Ionen wurden im positiven oder negativen Polaritätsmodus, in einem *Scan*-Bereich von m/z 120-1000, mit einer Auflösung von 30000 in der *Orbitrap* detektiert. Die Parameter des Massenspektrometers wurden mit einer frischen Adenosin-Lösung (5 μM) angepasst. Die Parameter für die Messungen im Rahmen dieser Arbeit waren: Mantelgas-Flussrate, 5 arb; Hilfsgas-Flussrate, 35 arb; Spray-Spannung, 4.0 kV; Kapillaren-Temperatur, 275°C; HESI-Verdampfer Temperatur, 100°C; Kapillaren-Spannung, 20 V, T-Linse 55 V.

Infrarotpektroskopie (IR)

Zur Aufnahme von IR-Spektren wurde ein *BX FT-IR* System von *Perkin-Elmer* mit einer Diamant-ATR- (*attenuated total reflection*) Einheit verwendet. Feststoffe wurden dabei entweder direkt auf die ATR-Einheit gegeben und mit einem Stempel auf der ATR-Einheit verdichtet oder zuvor in wenig Aceton gelöst, ein Tropfen der Lösung auf die ATR-Einheit gegeben und das Lösemittel verdampft. Öle bzw. flüssige Stoffe wurden als Filme aufgetragen. Die Wellenzahlen sind in cm^{-1} angegeben und die Intensitäten der erhaltenen Signale mit s (stark), m (mittel) oder w (schwach) beschrieben.

UV/Vis-Spektroskopie

UV/Vis-Spektren wurden an einem *JASCO V650* aufgenommen. Dabei wurden 100 Scans/min bei einem Wellenlängenintervall von 0.5 nm verwendet. Die für die zu analysierenden Verbindungen verwendeten Lösemittel wurden dabei als Blindproben verwendet.

Allgemeine Verfahrensweise

Allgemeine Verfahrensweise 1: Bildung modifizierter Nukleoside aus FaPys und Ribose **1**

Die FaPy-Verbindungen (1 eq) wurden mit Ribose **1** (50 eq) gemörsert und für 7 h auf 100°C erhitzt. Der resultierende Rückstand wurde in Borat-Puffer (125 mM) aufgenommen und in einem verschlossenen Druckrohr (ACE, 15 mL) auf 70°C für mehrere Tage (s. unten) erhitzt. 100 µl Proben wurden entnommen und auf 1 mL verdünnt. Die Proben wurden für LC-MS-Analysen verwendet.

Allgemeine Verfahrensweise 2: Bildung modifizierter Nukleoside aus Nukleosiden und Methylisocyanat **96**

Das Nukleosid (10.0 mg, 1 eq) wurde in Formamide (1 mL) gelöst und auf 60°C erhitzt bis alles vollständig gelöst war. Methylisocyanat **96** (5.5 eq) wurde zugegeben und die Reaktion bei Raumtemperatur gerührt. Nach 2 h wurde eine Probe (25 µL) entnommen und mit H₂O auf 1 mL verdünnt. Die verdünnte Probe wurde für LC-MS Analysen verwendet.

Allgemeine Verfahrensweise 3: Nitrosierung der Methylurea-modifizierten Nukleoside

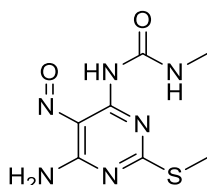
Das Methylurea-derivatisierte Nukleosid wurde in 5 %iger Phosphorsäure gelöst und NaNO₂ bei 0°C zugegeben. Die Mischung wurde für 4 h bei 0°C gerührt, gefolgt von einer Inkubationszeit von 12 h bei -20°C. Nachdem die Mischung erneut für 12 h bei 0°C gerührt wurde, folgte eine weitere Inkubation bei -20°C. Anschließend wurde die Mischung auf 0°C erwärmt und für die Folgereaktion ohne weitere Aufreinigung verwendet.

Allgemeine Verfahrensweise 4: Präbiotische Synthese der Aminosäure-derivatisierten Nukleoside

Die nitrosylierten Nukleoside wurden zu einer Lösung der jeweiligen Aminosäure (9 eq) in Borat-Puffer (30 mM, pH 9.5) gegeben. The pH wurde mit 4 N NaOH auf 9.5 eingestellt. Nach 1 h wurde eine Probe (25 µL) entnommen, mit H₂O auf 1 mL verdünnt und mittels LC-MS Analyse untersucht.

5.2. Synthese der aminoacetylierten Adenosin-Derivate

1-(6-Amino-2-(methylthio)-5-nitrosopyrimidin-4-yl)-3-methylurea (100)



Präbiotische Synthese:

Nitrosopyrimidin **99** (9.50 mg, 39.3 μ mol, 1 eq) wurde in Formamid (1.00 mL) gelöst, Borax (10.0 mg, 393 μ mol, 10 eq) zugegeben und auf 60°C erhitzt bis alles vollständig gelöst war. Methylisocyanat **96** (18.6 μ L, 236 μ mol, 6 eq) wurde zugegeben und das Reaktionsgemisch bei Raumtemperatur gerührt. Nach 5 h wurde eine Probe entnommen (25.0 μ L) und mit H₂O auf 1.00 mL verdünnt. Die verdünnte Probe wurde mittels LC-MS-Analysen untersucht.

Synthetische Referenzverbindung:

Für die organische Synthese des Nitrosopyrimidins **100** wurde dieselbe Vorgehensweise wie für die präbiotische Herstellung angewendet, indem das Nitrosopyrimidin **99** (50.0 mg, 206 μ mol, 1 eq) mit Methylisocyanat **96** (97.9 μ L, 1.24 mmol, 6 eq) umgesetzt wurde. Das Rohprodukt wurde mittels Umkehrphasen-Säulenchromatographie (H₂O:ACN, 100:1 \rightarrow 10:1 \rightarrow 7:3) gefolgt von HPLC (Retentionszeit 32.3 min, Gradient: 0 \rightarrow 16 % ACN in 45 min) aufgereinigt, um das Produkt als grünen Feststoff (7.50 mg, 30.9 μ mol, Ausbeute: 15 %) zu erhalten.

Schmelzpunkt: 191°C Zersetzung.

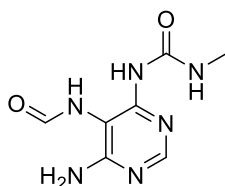
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 10.06 (m, 1H, NH), 8.96 – 8.45 (m, 3H, NH₂, NH), 2.82 (d, J = 19.4 Hz, 2H, NCH₃), 2.56 (s, 3H, SCH₃) ppm.

¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 179.3 (C(SCH₃)), 163.8 (C(NH(CO(NH)(CH₃))), 152.9 (C(O(NH)(NH)(CH₃)), 152.36 (CNH₂), 137.1 (CNO), 26.5 (NH(CH₃)), 14.0 (SCH₃) ppm.

IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3380 (w), 3329 (w), 3269 (w), 3189 (w), 1695 (m), 1620 (m), 1585 (m), 1515 (s), 1349 (m), 1316 (m), 1286 (m), 1239 (s), 1162 (s), 1143 (m).

HRMS (ESI⁺): m/z berechnet für C₇H₁₁N₆O₂S⁺ [M + H]⁺: 243.0659; gefunden 243.0660.

Das ¹H- sowie das ¹³C-NMR enthalten unbekannte Verunreinigungen.

***N*-(4-Amino-6-(3-methylureido)pyrimidin-5-yl)formamid (97)**

Präbiotische Synthese:^[72]

Das modifizierte Nitrosopyrimidin **100** (500 µg, 2.06 µmol, 1 eq) wurde in H₂O:AcOH (4:1, 60 µL) gelöst und Nickelchlorid (5.35 mg, 91.2 µmol, 44 eq) zugegeben. Nach 2 h Rühren unter H₂-Atmosphäre wurde eine Probe entnommen (2.50 µL) und mit H₂O auf 100 µL verdünnt. Die verdünnte Probe wurde für mittels LC-MS analysiert.

Synthetische Referenzverbindung:

Die Synthese der Referenzverbindung wurde von *Antony Crisp* im Arbeitskreis *Carell* durchgeführt.

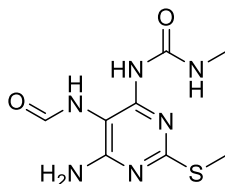
Schmelzpunkt: 178°C.

¹H-NMR (599 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 9.16 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H, NH), 8.98 (s, 1H, NH), 8.14 (s, 1H, CHO), 8.10 (s, 1H, NH(CH₃)), 8.05 (s, 1H, CH(N)(N)), 6.69 (s, 2H, CNH₂), 2.75 (d, *J* = 4.8 Hz, 3H, NH(CH₃)) ppm.

¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 161.5 (CHO), 160.6 (CO(NH)(NH)(CH₃)), 154.6 (CNH₂), 154.4 (CH(N)(N)), 153.6 (C(NH(CO(NH)(CH₃))), 96.3 (C(NH)CHO), 26.1 (NH(CH₃)) ppm.

IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3330, 3265, 3154, 1680, 1557, 1467, 1267.

HRMS (ESI⁺): *m/z* berechnet für C₇H₁₁N₆O₂⁺ [M + H]⁺: 211.0938; gefunden 211.0939.

***N*-(4-Amino-2-(methylthio)-6-(3-methylureido)pyrimidin-5-yl)Formamid (102)**

Präbiotische Synthese:^[72]

Das modifizierte Nitrosopyrimidin **100** (1.30 mg, 5.37 µmol, 1 eq) wurde in H₂O:AcOH (4:1, 168 µL) gelöst und Nickelchlorid (5.35 mg, 91.2 µmol, 17 eq) zugegeben. Nach 2 h Rühren

5. Methoden

unter H₂-Atmosphäre wurde eine Probe entnommen (2.50 µL) und mit H₂O auf 100 µL verdünnt. Die verdünnte Probe wurde für mittels LC-MS analysiert.

Synthetische Referenzverbindung:

Die Synthese der Referenzverbindung wurde von *Antony Crisp* im Arbeitskreis *Carell* durchgeführt.

Schmelzpunkt: 217°C Zersetzung.

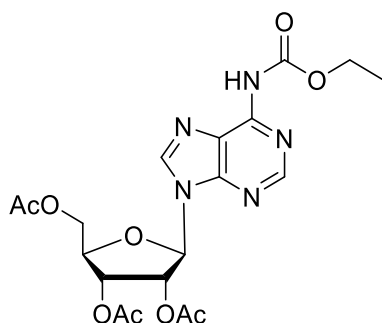
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8.94 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H, NH), 8.77 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H, NH), 8.23 (s, 1H, CHO), 8.06 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H, NH(CH₃)), 6.76 (s, 2H, CNH₂), 2.75 (d, *J* = 4.8 Hz, 3H, NH(CH₃)), 2.42 (s, 3H, SCH₃) ppm.

¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 166.6 (CHO), 161.7 (CSCH₃), 160.3 (CO(NH)(NH)(CH₃)), 154.4 (CNH₂), 153.5 (C(NH(CO(NH)(CH₃))), 92.9 (C(NH)CHO), 26.0 (NH(CH₃)), 13.6 (SCH₃) ppm.

IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3280, 3163, 2882, 1706, 1673, 1537, 1342.

HRMS (ESI⁺): *m/z* berechnet für C₈H₁₃N₆O₂S⁺ [M + H]⁺: 257.0815; gefunden 257.0814.

Ethyl 9-(2',3',5'-tri-*O*-acetyl-β-*D*-ribofuranosyl)-9*H*-purine-6-carbamat^[218] (**112**)



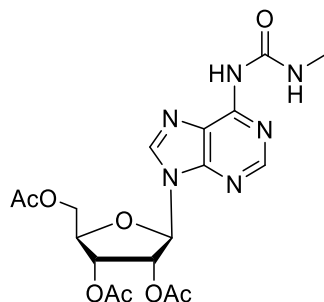
Acetyl-geschütztes Adenosin (2.00 mg, 5.08 mmol, 1 eq) wurde in absolutem Pyridin (37.0 mL) gelöst und auf 0°C gekühlt. Chlorameisensäureethylester **111** (33.8 µL, 0.35 mmol, 3 eq) wurde tropfenweise über 30 min zugegeben und anschließend über Nacht bei rt gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und mit Toluol co-evaporiert. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (DCM:MeOH, 100:1) aufgereinigt, um das Produkt als farblosen Schaum (1.05 g, 2.26 mmol, Ausbeute: 44 %) zu erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 10.56 (s, 1H, NH), 8.66 (s, 1H, HC8), 8.65 (s, 1H, HC2), 6.31 (d, J = 5.3, HC1'), 6.06 (t, 1H, J = 5.6 Hz, HC2'), 5.65 (t, 1H, J = 5.6 Hz, HC3'), 4.46-4.33 (m, 2H, HC4', HC5^a), 4.32-4.22 (m, 1H, HC5^b), 4.18 (q, 1H, J = 7.1 Hz, CH₂), 2.12 (s, 3H, COCH₃)*, 2.04 (s, 3H, COCH₃)*, 2.00 (s, 3H, COCH₃)*, 1.26 (t, 3H, J = 7.1, CH₃) ppm.

¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-d₆): δ = 170.0 (COCH₃)*, 169.4 (COCH₃)*, 169.2 (COCH₃)*, 152.2 (C(NH)(OCH₂CH₃)), 151.9 (C6), 151.4 (C2), 150.11 (C4), 143.2 (C8), 123.9 (C5), 85.76 (C1'), 79.5 (C4'), 71.90 (C2'), 69.9 (C3'), 62.7 (C5'), 61.0 (CH₂), 20.5 (COCH₃)*, 20.4 (COCH₃)*, 20.2 (COCH₃)*, 14.37 (CH₃) ppm.

HRMS (ESI⁺): *m/z* berechnet für [C₁₉H₂₄N₅O₉]⁺ [M + H]⁺: 466.1569, gefunden: 466.1569

Acetyl-geschütztes, Methylharnstoff-modifiziertes Adenosin (115)



Carbamat **112** (300 mg, 645 μmol, 1 eq) wurde in absolutem Pyridin (25.0 mL) gelöst und Methylammoniumchlorid (130 mg, 1.93 mmol, 3 eq) zugegeben. Das Gemisch wurde über Nacht unter Rückfluss erhitzt und anschließend auf rt abgekühlt. Überschüssiges Methylammoniumchlorid wurde durch Filtration entfernt und mit EtOAc gewaschen. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und mit Toluol co-evaporiert. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (DCM:MeOH, 96:4) aufgereinigt, um das Produkt als farblosen Schaum (273 mg, 606 μmol, Ausbeute: 94 %) zu erhalten.

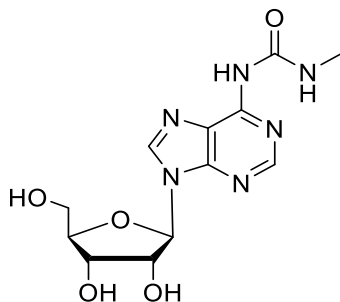
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 9.75 (s, 1H, NH), 9.20 (q, J = 4.6 Hz, 1H, NH), 8.62 (s, 1H, HC8), 8.57 (s, 1H, HC2), 6.29 (d, J = 5.6 Hz, 1H, HC1'), 6.03 (t, J = 5.3 Hz, 1H, HC2'), 5.64 (t, J = 5.3 Hz, 1H, HC3'), 4.49–4.36 (m, 2H, H4', HC5^a), 4.29–4.19 (m, 1H, HC5^a), 2.82 (d, J = 4.6 Hz, 3H, CH₃), 2.12 (s, 3H, COCH₃)*, 2.04 (s, 3H, COCH₃)*, 2.01 (s, 3H, COCH₃)* ppm.

¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-d₆): δ = 169.9 (COCH₃), 169.4 (C), 169.2 (COCH₃), 153.8 (CO(NH)(NCH₃)), 151.1 (C2), 150.4 (C6), 149.9 (C4), 142.5 (C8), 120.2 (C5), 85.8 (C1'), 79.5 (C4'), 71.9 (C2'), 69.9 (C3'), 62.7 (C5'), 26.29 (CH₃), 20.5 (COCH₃), 20.3 (COCH₃), 20.1 (COCH₃) ppm.

IR (cm^{-1}): $\tilde{\nu} = 3246$ (w), 1744 (m), 1701 (s), 1609 (m), 1590 (m), 1545 (m), 1468 (m), 1365 (w), 1110 (s), 1093 (m), 1044 (s), 1024 (m), 924 (w), 900 (w), 797 (m).

HRMS (ESI⁺): m/z berechnet für $[\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{N}_6\text{O}_8]^+$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 451.1572, gefunden: 451.1568.

Methylharnstoff-modifiziertes Adenosin (**94c**)



Präbiotische Synthese:

Alternative 1:

FaPy **97** (1.30 mg, 6.18 μmol , 1 eq) wurde mit Ribose **1** (46.6 mg, 309 μmol , 50 eq) zermörsert und gemäß allgemeiner Verfahrensweise 1 zur Reaktion gebracht. Nach der Zugabe des Borat-Puffers (572 μL) wurde die Reaktion für 5 Tage gerührt.

Alternative 2:

Adenosin **3** (10.0 mg, 37.4 μmol , 1 eq) wurde mit Methylisocyanat **96** (12.2 μL , 206 μmol , 5.5 eq) gemäß allgemeiner Verfahrensweise 2 umgesetzt.

Synthetische Referenzverbindung:

Das geschützte Nukleosid **115** (220 mg, 408 μmol , 1 eq) wurde in 3.5 N Ammoniak in MeOH (10.0 mL) gelöst und über Nacht bei rt gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt aus EtOH umkristallisiert, um das Produkt als weißen Feststoff (87.0 mg, 211 μmol , Ausbeute: 51 %) zu erhalten.

Schmelzpunkt: 201°C.

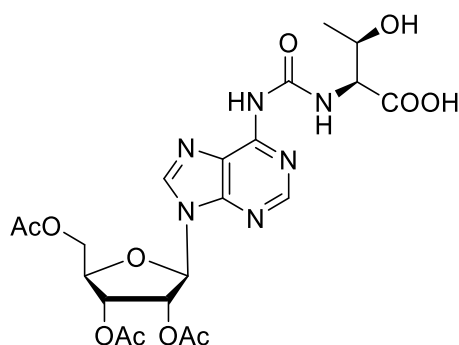
¹H-NMR (599 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 9.21 (q, *J* = 4.6 Hz, 1H, NH), 8.63 (s, 1H, HC8), 8.52 (s, 1H, HC2), 5.96 (d, *J* = 5.7 Hz, 1H, HC1'), 5.49 (d, *J* = 4.3 Hz, 1H, OH), 5.19 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H, OH), 5.10 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H, OH), 4.58 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H, HC2'), 4.16 (q, *J* = 4.0 Hz, 1H, HC3'), 3.95 (q, *J* = 3.8 Hz, 1H, HC4'), 3.72-3.69 (m, 1H, HC5^a), 3.61-3.57 (m, 1H, HC5^b), 2.81 (d, *J* = 4.6 Hz, 3H, CH₃) ppm.

¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 153.9 (CO(NH)(NCH₃)), 150.8 (C2), 150.2 (C6), 150.2 (C4), 142.1 (C8), 120.2 (C5), 87.7 (C1'), 85.7 (C4'), 73.7 (C2'), 70.3 (C3'), 61.3 (C5'), 26.3 (CH₃) ppm.

IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3363 (w), 3238 (w), 3123 (w), 1705 (m), 1681 (m), 1599 (m), 1584 (m), 1544 (m), 1462 (s), 1386 (w), 1331 (w), 1297 (m), 1239 (s), 1219 (w), 1176 (w), 1133 (m), 1104 (s), 1057 (s), 1026 (w), 986 (w), 865 (w), 794 (m), 757 (m).

HRMS (ESI⁺): *m/z* berechnet für [C₁₂H₁₇N₆O₅]⁺ [M + H]⁺: 325.1255, gefunden: 325.1256

Acetyl-geschütztes t⁶A^[208] (114)



Carbamat **112** (0.30 g, 0.64 mmol, 1 eq) wurde in absolutem Pyridin (30.0 mL) gelöst und L-Threonin **88b** (0.15 g, 1.29 mmol, 2 eq) zugegeben. Das Gemisch wurde für 6 h unter Rückfluss erhitzt und anschließend auf rt abgekühlt. Überschüssiges L-Threonin **88** wurde durch Filtration entfernt und mit EtOAc gewaschen. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und mit Toluol co-evaporiert. Das Rohprodukt wurde aus EtOH umkristallisiert, um das Produkt als weißen Feststoff (0.29 g, 0.54 mmol, Ausbeute: 84 %) zu erhalten.

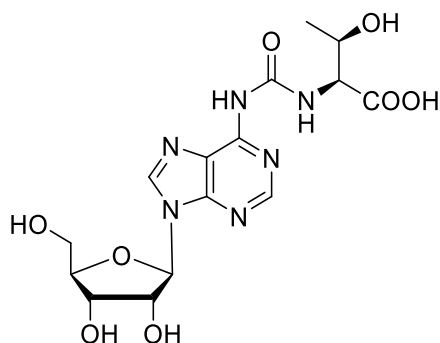
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 9.92 (s, 1H, COOH), 9.68 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, NH), 8.66 (s, 1H, HC8), 8.58 (s, 1H, HC2), 6.31 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H, HC1'), 6.04 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H, HC2'), 5.62 (dd, *J* = 5.9, 4.4 Hz, 1H, HC3'), 4.48–4.36 (m, 2H, CHOH, CHNH), 4.36–4.13 (m, 3H, HC5', HC4'), 2.14 (s, 3H, COCH₃)*, 2.04 (s, 3H, COCH₃)*, 2.03 (s, 3H, COCH₃)*, 1.15 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H, CH₃) ppm.

5. Methoden

¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 172.9 (C_{OOH}), 170.5 (C_{OCH₃}), 169.949 (C_{OCH₃}), 169.7 (C_{OCH₃}), 154.1 (C_{O(NH)(NCH₃)}), 151.6 (C₂), 150.9 (C₆), 150.6 (C₄), 143.1 (C₈), 121.0 (C₅), 86.1 (C_{1'}), 80.1 (C_{OH}), 72.4 (C_{4'}), 70.5 (C_{2'}), 66.7 (C_{3'}), 63.3 (CHCOOH), 59.1 (C_{5'}), 21.3 (COCH₃), 20.9 (COCH₃), 20.9 (COCH₃), 20.7 (CH₃) ppm.

HRMS (ESI⁺): *m/z* berechnet für [C₂₁H₂₇N₆O₁₁]⁺ [M+H]⁺: 539.1732, gefunden: 539.1736.

t⁶A (81)



Präbiotische Synthese:

Nukleosid **94c** (1.00 mg, 3.09 μmol, 1 eq) wurde mit NaNO₂ (2.66 mg, 38.6 μmol, 12.5 eq) in Phosphorsäure (5 %ig, 150 μL) gemäß allgemeiner Verfahrensweise 3 umgesetzt. Das nitrosylierte Zwischenprodukt wurde ohne weitere Aufreinigung mit L-Threonin **88** (3.50 mg, 29.4 μmol, 9.5 eq) in Borat-Puffer (30 mM, 3.00 mL) gemäß allgemeiner Verfahrensweise 4 umgesetzt. Nach einer Stunde wurde eine Probe (25 μL) entnommen und mit H₂O auf 1.00 mL verdünnt. Die Probe wurde mittels LC-MS analysiert.

Synthetische Referenzverbindung:^[208]

Das geschützte Nukleosid **114** (0.17 g, 0.32 mmol, 1 eq) wurde in 7.00 N Ammoniak in MeOH (8.00 mL) gelöst und über Nacht bei rt gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt aus EtOH umkristallisiert, um das Produkt als weißen Feststoff (0.97 g, 0.24 mmol, Ausbeute: 75 %) zu erhalten.

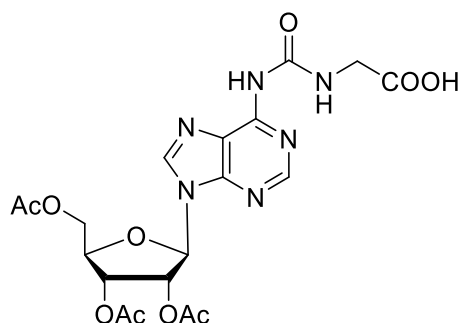
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 9.61 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H, NH), 8.64 (s, 1H, HC₈), 8.52 (s, 1H, HC₂), 5.98 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H, HC_{1'}), 4.59 (t, *J* = 5.3 Hz, 1H, HC_{2'}), 4.18 (t, *J* = 4.1 Hz, 1H, HC_{3'}), 4.06–4.01 (m, 2H, CHOH, CHNH), 3.96 (q, *J* = 3.8 Hz, 1H, HC_{4'}), 3.70 (dd, *J* = 12.0, 4.0 Hz, HC_{5^a}), 3.57 (dd, *J* = 12.0, 4.0 Hz, HC_{5^b}), 1.00 (d, *J* = 6.1 Hz, 3H, CH₃) ppm.

¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 172.6 (COOH), 153.2 (C_{O(NH)(NCH₃)}), 151.4 (C₂), 150.8 (C₆), 150.6 (C₄), 142.5 (C₈), 120.8 (C₅), 88.1 (C_{1'}), 86.1 (C_{OH}), 74.2 (C_{4'}), 70.7 (C_{2'}), 66.5 (C_{3'}), 61.7 (C_{5'}), 58.9 (CHCOOH), 19.9 (CH₃) ppm.

IR (cm^{-1}): $\tilde{\nu} = 3244$ (w), 2360 (w), 1688 (m), 1588 (s), 1530 (m), 1468 (m), 1391 (m), 1243 (m), 1055 (m), 796 (w).

HRMS (ESI⁺): m/z berechnet für $[\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{N}_6\text{O}_8]^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 413.1415, gefunden: 413.1415.

Acetyl-geschütztes $\text{g}^6\text{A}^{[208]}$ (**113**)

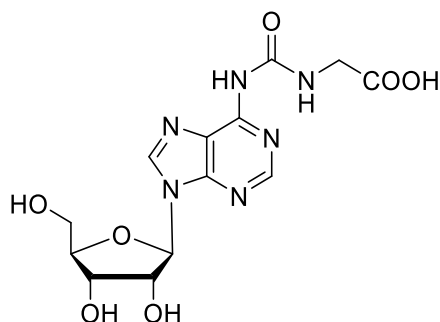


Carbamat **112** (100 mg, 214 μmol , 1 eq) wurde in absolutem Pyridin (8.00 mL) gelöst und L-Glycin **82** (64.5 g, 859 μmol , 4 eq) zugegeben. Das Gemisch wurde für 7 h unter Rückfluss erhitzt und anschließend auf rt abgekühlt. Überschüssiges L-Glycin **82** wurde durch Filtration entfernt und mit EtOAc gewaschen. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und mit Toluol co-evaporiert. Das Rohprodukt wurde aus EtOH umkristallisiert, um das Produkt als weißen Feststoff (45.0 mg, 91.0 μmol , Ausbeute: 65 %) zu erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 12.69$ (s, 1H, COOH), 9.99 (s, 1H, NH), 9.61 (bs, 1H, NH), 8.65 (s, 1H, HC8), 8.59 (s, 1H, HC2), 6.30 (d, $J = 5.3$ Hz, 1H, $\text{HC1}'$), 6.03 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H, $\text{HC2}'$), 5.63 (t, $J = 5.3$, 1H, $\text{HC3}'$), 4.45–4.38 (m, 2H, $\text{HC5}'$), 4.31 – 4.20 (m, 1H, $\text{HC4}'$), 3.99 (d, $J = 5.3$ Hz, 1H, CH_2), 2.12 (s, 3H, COCH_3), 2.04 (s, 3H, COCH_3), 2.01 (s, 3H, COCH_3) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 171.5$ (COOH), 170.1 (COCH_3), 169.5 (COCH_3), 169.3 (COCH_3), 153.6 (CON_2), 151.1 (C2), 150.4 (C6), 150.12 (C4), 142.7 (C8), 120.5 (C5), 85.8 ($\text{C1}'$), 79.6 ($\text{C4}'$), 72.0 ($\text{C2}'$), 69.9 ($\text{C3}'$), 62.8 ($\text{C5}'$), 41.7 (CH_2), 20.6 (COCH_3), 20.4 (COCH_3), 20.3 (COCH_3) ppm.

HRMS (ESI⁺): m/z berechnet für $[\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{N}_6\text{O}_{10}]^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 495.1470, gefunden: 495.1466.

g⁶A (93)

Präbiotische Synthese:

Nukleosid **94c** (1.00 mg, 3.09 μmol , 1 eq) wurde mit NaNO_2 (2.66 mg, 38.6 μmol , 12.5 eq) in Phosphorsäure (5 %ig, 150 μL) gemäß allgemeiner Verfahrensweise 3 umgesetzt. Das nitrosylierte Zwischenprodukt wurde ohne weitere Aufreinigung mit L-Glycin **82** (2.06 mg, 27.5 μmol , 10 eq) in Borat- Puffer (30 mM, 3.00 mL) nach allgemeiner Verfahrensweise 4 umgesetzt. Nach einer Stunde wurde eine Probe (25 μL) entnommen und mit H_2O auf 1.00 mL verdünnt. Die Probe wurde mittels LC-MS analysiert.

Synthetische Referenzverbindung:^[208]

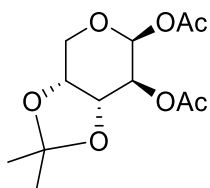
Das geschützte Nukleosid **113** (202 mg, 0.41 mmol, 1 eq) wurde in 7.00 N Ammoniak in MeOH (10.0 mL) gelöst und über Nacht bei rt gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt aus EtOH umkristallisiert, um das Produkt als weißen Feststoff (74.0 mg, 0.20 mmol, Ausbeute: 49 %) zu erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 9.55 (d, J = 6.4 Hz, 1H, NH), 8.66 (s, 1H, HC8), 8.54 (s, 1H, HC2), 5.99 (d, J = 5.6 Hz, 1H, HC1'), 4.18 (dd, J = 4.9, 3.7 Hz, 1H, HC2'), 3.97 (t, J = 4.1 Hz, 1H, HC3'), 3.78 (d, J = 4.9 Hz, 1H, HC4'), 3.69 (dd, J = 12.0, 4.0 Hz, HC5^a), 3.57 (dd, J = 12.0, 4.0 Hz, HC5^b) ppm.

¹³C-NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 171.7 (COOH), 153.5 (C2), 151.3 (C6), 150.7 (C4), 142.6 (C8), 120.7 (C5), 88.1 (C1'), 86.1 (C4'), 74.2 (C2'), 70.7 (C3'), 61.7 (C5'), 43.9 (CH₂) ppm.

IR (cm^{-1}) $\tilde{\nu}$ = 3233 (w), 1685 (w), 1610 (m), 1589 (m), 1528 (m), 1468 (m), 1390 (m), 1359 (m), 1331 (m), 1295 (m), 1242 (s), 1121 (m), 1079 (m), 1053 (s), 983 (m), 896 (w), 866 (w), 796 (m).

HRMS (ESI⁺): m/z berechnet für $[\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{N}_6\text{O}_7]^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 369.1153, gefunden: 369.1152.

2-Di-O-acetyl-3,4-O-isopropylidene- β -D-arabinopyranose^[72] (127)

3,4-O-Isopropyliden-D-ribose **126** (10.3 g, 54.2 mmol, 1 eq.) und NaOAc (22.2 g, 271 mmol, 5 eq.) wurden in Ac₂O (81.3 mL, 860 mmol, 16 eq.) gelöst und die Mischung auf 100°C erhitzt. Nach 0.5 h wurde Eiswasser zugegeben und für eine weitere Stunde gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit DCM (3 x 20 mL) extrahiert und mit ges. NaCl-Lösung (1 x 20 mL) gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde aus EtOH (10 mL) umkristallisiert. Die Kristalle wurden abfiltriert und im Hochvakuum getrocknet, um das β -Anomer **127** (6.56 g, 23.9 mmol, Ausbeute 44 %) als farblose Nadeln zu erhalten.

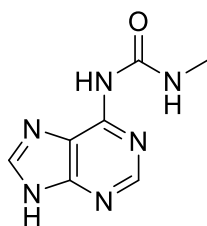
Schmelzpunkt: 106°C.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 5.55 (d, J = 7.8, 1H, HC1'), 4.92 (t, J = 7.3, 1H, HC2'), 4.31 – 4.23 (m, 2H, HC3', HC4'), 4.09 – 3.90 (m, 2H, HC5), 2.06 (s, 3H, CH₃), 2.04 (s, 3H, CH₃), 1.43 (s, 3H, CH₃) und 1.28 (s, 3H, CH₃) ppm.

¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 169.3 (COCH₃)*, 169.2 (COCH₃)*, 109.4 (C(CH₃)₂), 91.2 (C1'), 75.2 (C3'), 72.5 (C4'), 71.1 (C2'), 63.0 (C5'), 27.6 (CH₃)*, 26.1 (CH₃)*, 20.6 (CH₃) *, 20.6 (CH₃)* ppm.

IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 2983 (w), 2934 (w), 1739 (s), 1371 (m), 1213 (vs), 1132 (m), 1039 (vs), 968 (m), 846 (s), 804 (m).

HRMS (ESI⁺): m/z berechnet für: [C₁₂H₁₈NaO₇]⁺ [M+Na]⁺: 297.0945, gefunden: 297.0945.

1-Methyl-3-(9H-purin-6-yl)urea (123)

Adenin **10** (3.00 g, 22.2 mmol, 1 eq) wurde in absolutem Pyridin (20 mL) gelöst und Chlorameisensäurephenylester **117** (6.30 mL, 66.6 mmol, 3 eq) über 30 min bei 0°C

5. Methoden

zutropft. Nach 6 h Rühren bei 0°C, wurde Methylammoniumchlorid (13.4 g, 200 mmol, 9 eq) zugegeben und auf 50°C erhitzt. Nach 16 h wurde der Feststoff abfiltriert und mit H₂O gewaschen um das Produkt **123** als weißen Feststoff (1.68 mg, 8.59 mmol, Ausbeute: 38 %) zu erhalten.

Schmelzpunkt: 284°C Zersetzung.

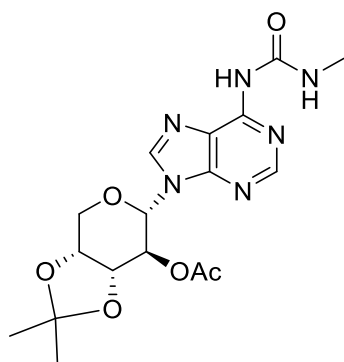
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 9.76 (bs, 1H, NH), 8.51 (s, 1H, HC8), 8.41 (s, 1H, HC2), 2.81 (d, *J* = 4.6 Hz 3H, NCH₃) ppm.

IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3121 (m), 2847 (w), 1684 (s), 1604 (s), 1563 (s), 1477 (m), 1434 (w), 1391 (s), 1321 (w), 1307 (m), 1270 (m), 1245 (m), 1245 (m), 1129 (w), 934 (m), 878 (w), 804 (w). 785(s).

HRMS (ESI⁺): *m/z* berechnet für [C₇H₉N₆]⁺ [M+H]⁺: 193.0832, gefunden: 193.0832.

Aufgrund der schlechten Löslichkeit konnte kein ¹³C-NMR gemessen werden.

(3aR,6S,7S,7aR)-2,2-Dimethyl-6-(6-(3-methylureido)-9H-purin-9-yl)tetrahydro-4H-[1,3]dioxolo[4,5-c]pyran-7-yl acetat (128**)**



Die Synthese dieses Moleküls wurde analog zu einer Synthese von *Becker et al.* durchgeführt.^[72]

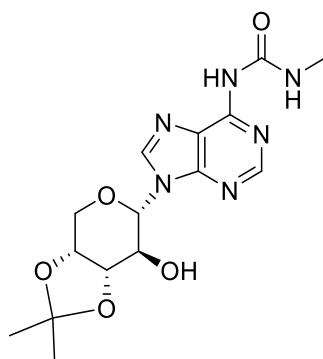
Die modifizierte Nukleobase **123** (100 mg, 482 μmol, 1 eq) wurde in absolutem ACN (10.0 mL) suspendiert und *N,O*-Bis(trimethylsilyl)acetamid (224 μL, 917 μmol, 1.9 eq) und TMSOTf (113 μL, 676 μmol, 1.4 eq) zugegeben. Der geschützte Zucker **127** (172 mg, 627 μmol, 1.3 eq) wurde in absolutem ACN (15 mL) gelöst und tropfenweise zugegeben. Das Gemisch wurde 20 h auf 60°C erhitzt und anschließend das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in gesättigter NaHCO₃-Lösung (70 mL) aufgenommen und mit DCM (3 x 30 mL) extrahiert. Das Lösungsmittel wurde erneut im Vakuum entfernt und das

Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (DCM:MeOH, 98:2) aufgereinigt um das Produkt **128** als weißen Schaum (53.0 mg, 130 μ mol, Ausbeute: 27 %) zu erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 9.52 (s, 1H, NH), 8.52 (s, 1H, HC8), 8.22 (s, 1H, HC2), 5.67 (d, J = 8.8 Hz, 1H, HC1'), 5.59 - 5.49 (m, 1H, HC2'), 4.50 - 4.38 (m, 3H, HC4'), 4.13 - 4.02 (m, 1H, HC3'), 3.00 (d, J = 4.6 Hz, 3H, NCH₃), 1.86 (s, 3H, COCH₃), 1.65 (s, 3H, CH₃), 1.43 (s, 3H, CH₃) ppm.

HRMS (ESI⁺): m/z berechnet für [C₁₇H₂₃N₆O₆]⁺ [M+H]⁺: 407.1676, gefunden: 407.1672.

1-(9-((3aR,6S,7S,7aS)-7-Hydroxyl-2,2-dimethyltetrahydro-4H-[1,3]dioxolo[4,5-c]pyran-6-yl)-9H-purin-6-yl)-3-methylurea (129)



Die Synthese dieses Moleküls wurde analog zu einer Synthese von *Becker et al.* durchgeführt.^[72]

Das geschützte Nukleosid **128** (60.0 mg, 148 μ mol, 1 eq) wurde in 3.5 N Ammoniak in MeOH (5.00 mL) gelöst und bei rt gerührt. Nach 20 h wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (DCM:MeOH, 98:2) aufgereinigt um das Produkt **129** als weißen Schaum (14.0 mg, 38.4 μ mol, Ausbeute: 26 %) zu erhalten.

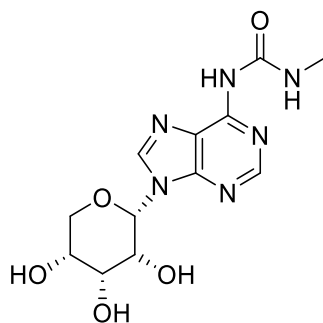
¹H-NMR (400 MHz, MeOD-*d*₄): δ = 8.79 (s, 1H, HC8), 8.61 (s, 1H, HC2), 6.11 (d, J = 3.2 Hz, 1H, HC1'), 4.55 (dd, J = 6.4, 4.4 Hz, 1H, HC2'), 4.40 (dt, J = 6.5, 3.4 Hz, 1H, HC4'), 4.23 (dd, J = 4.4, 3.3 Hz, 1H, HC3'), 4.16 (dd, 13.1, 3.0 Hz, 1H, HC5^a), 4.06 (dd, J = 13.16, 3.18 Hz, 1H, HC5^b), 2.95 (s, 3H, NCH₃), 1.59 (s, 3H, CH₃), 1.42 (s, 3H, CH₃) ppm.

IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3254 (w), 1713 (m), 1697 (m), 1613 (m), 1588 (m), 1557 (w), 1469 (w), 1245 (m), 1210 (m), 1165 (m), 1133 (s), 1076 (s), 1054 (s), 974 (w), 933 (w), 860 (m).

HRMS (ESI⁺): m/z berechnet für [C₁₅H₂₁N₆O₅]⁺ [M+H]⁺: 365.1568, gefunden: 365.1570.

Das ¹H-NMR enthält unbekannte Verunreinigungen.

Methylharnstoff-modifiziertes α -p-Adenosin (**94d**)



Die Synthese dieses Moleküls wurde analog zu einer Synthese von *Becker et al.* durchgeführt.^[72]

Das Nukleosid **129** (14.0 mg, 38.4 μ mol, 1 eq) wurde in absolutem DCM (2.55 mL) gelöst und mit NaHCO_3 (12.9 mg, 153 μ mol, 4 eq) und Dess-Martin-Periodinan (48.9 mg, 1115 μ mol, 3 eq) versetzt. Das Gemisch wurde 2 h auf 50°C erhitzt und anschließend mit EtOAc (2.5 mL) versetzt. Eine Lösung aus $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (0.30 g) and NaHCO_3 (0.30 g) in H_2O (10 mL) wurde zugegeben und gerührt bis die organische Phase klar wurde. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase wurde mit EtOAc (2 x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigten NaHCO_3 - und NaCl -Lösungen gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt als weißer Feststoff erhalten.

Dieses wurde anschließend direkt in einer Mischung aus DCM/EtOAc/MeOH (2:1:1, 2.00 mL) gelöst und NaBH_4 (1.76 mg, 46.6 μ mol, 1.5 eq.) zugegeben. Das Gemisch wurde 0.5 h bei 0°C gerührt und anschließend mit gesättigter NH_4Cl abgestoppt. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase wurde mit EtOAc (2 x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigten NaHCO_3 - und NaCl -Lösungen gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt **94d** (12.0 mg, 32.9 μ mol, 1 eq) in $\text{AcOH}:\text{H}_2\text{O}$ (7:3, 5 mL) gelöst und auf 60°C erhitzt. Nach 5.5 h wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt mittels HPLC (Retentionszeit: 20.8 min, Gradient: 0→30% ACN in 45 min) aufgereinigt, um das Produkt als weißen Feststoff (2.90 mg, 8.94 μ mol, Ausbeute: 27 %) zu erhalten.

Schmelzpunkt: 143°C.

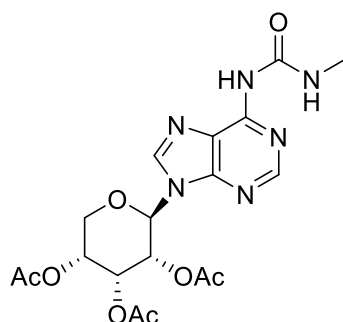
¹H-NMR (800 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 9.27 (q, *J* = 4.7 Hz, 1H, NH), 8.62 (s, 1H, HC8), 8.54 (s, 1H, HC2), 5.88 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H, HC1'), 5.76 (s, 1H, NH), 5.38 - 5.29 (m, 3H, 3 OH), 3.96 (dd, *J* = 12.2, 2.7 Hz, 1H, HC2'), 3.91 (dt, *J* = 3.1, 1.5 Hz, 1H, HC3'), 3.87 (t, *J* = 3.1 Hz, 1H, HC4'), 3.82 (dd, *J* = 12.2, 1.6 Hz, 1H, HC5^a), 3.79 (tt, *J* = 3.0, 1.5 Hz, 1H, HC5^b), 2.82 (d, *J* = 4.6 Hz, 3H, NCH₃) ppm.

¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 154.1 (CO(NH)(NCH₃)), 150.8 (C2), 150.2 (C6), 149.79 (C4), 142.4 (C8), 119.0 (C5), 81.4 (C1'), 71.14 (C4'), 69.4 (C2'), 68.4 (C3'), 67.4 (C5'), 26.3 (NCH₃) ppm.

IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3254 (w), 1684 (s), 1630 (m), 1558 (s), 1533 (m), 1262 (m), 1093 (s).

HRMS (ESI⁺): *m/z* berechnet für [C₁₂H₁₇N₆O₅]⁺ [M+H]⁺: 325.1255, gefunden: 325.1249.

Acetyl-geschütztes, Methylharnstoff-modifiziertes β-p-Adenosin (125)



Die Synthese dieses Moleküls wurde analog zu einer Synthese von *Becker et al.* durchgeführt.^[72]

Die modifizierte Nucleobase **123** (693 mg, 3.61 mmol, 1 eq) wurde in absolutem ACN (100 mL) suspendiert und *N,O*-Bis(trimethylsilyl)acetamid (1.70 mL, 6.90 mmol, 1.9 eq) und TMSOTf (850 μL, 5.07 mmol, 1.4 eq) zugegeben. Der acetylgeschützte Ribose **124** (1.53 g, 4.81 mmol, 1.3 eq) wurde in absolutem ACN (15 mL) gelöst und tropfenweise zugegeben. Das Gemisch wurde 20 h auf 40°C erhitzt und anschließend für 2 h auf 80°C. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in gesättigter NaHCO₃-Lösung (70 mL) aufgenommen und mit DCM (3 x 30 mL) extrahiert. Das Lösungsmittel wurde erneut im Vakuum entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (DCM:MeOH, 98:2) aufgereinigt um das Produkt **125** als weißen Schaum (1.14 g, 2.53 mmol, Ausbeute: 70 %) zu erhalten.

5. Methoden

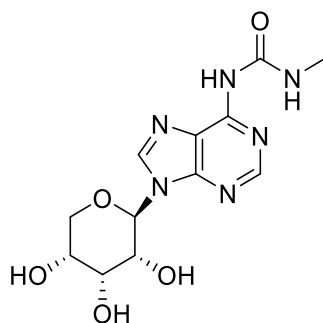
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 9.24 (q, *J* = 5.0 Hz, 1H, NH), 8.53 (s, 1H, HC8), 8.06 (s, 1H, HC2), 5.97 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H, HC1'), 5.87 - 5.78 (m, 1H, HC3'), 5.66 (dd, *J* = 9.6, 2.9 Hz, 1H, HC2'), 5.23 (ddd, *J* = 10.7, 5.8, 2.7 Hz, 1H, HC4'), 4.13 3.91 (m, 2H, HC5'), 2.98 (d, *J* = 4.8 Hz, 3H, CH₃), 2.24 (s, 3H, COOCH₃), 2.03 (s, 3H, COOCH₃), 1.77 (s, 3H, COOCH₃) ppm.

¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 169.9 (COCH₃), 169.4 (COCH₃), 169.2 (COCH₃), 153.8 (CO(NH)(NCH₃)), 151.1 (C2), 150.4 (C6), 149.9 (C4), 142.5 (C8), 120.3 (C5), 85.8 (C1'), 79.5 (C4'), 71.9 (C2'), 69.9 (C3'), 62.7 (C5'), 26.3 (NCH₃), 20.5 (COCH₃), 20.3 (COCH₃), 20.2 (COCH₃) ppm.

IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3253 (w), 1745 (m), 1702 (m), 1610 (m), 1465 (w), 1368 (m), 1239 (s), 1206 (s); 1072 (m), 1039 (s), 981 (m) 950 (m), 878 (m).

HRMS (ESI⁺): *m/z* berechnet für [C₁₈H₂₃N₆O₈]⁺ [M+H]⁺: 541.1572, gefunden: 541.1570.

Methylharnstoff-modifiziertes β-p-Adenosin (94b)



Die Synthese dieses Moleküls wurde analog zu einer Synthese von *Becker et al.* durchgeführt.^[72]

Das geschützte Nukleosid **125** (55.0 mg, 122 μmol, 1 eq) wurde in 3.5 N Ammoniak in MeOH (4.00 mL) gelöst und bei rt gerührt. Nach 20 h wurde der entstandene Feststoff abfiltriert, um das Produkt **94b** als weißen Feststoff (20.3 mg, 62.6 μmol, Ausbeute: 51 %) zu erhalten.

Schmelzpunkt: 181°C.

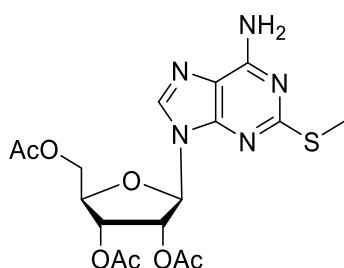
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 9.27 (q, *J* = 4.7 Hz, 1H, NH), 8.60 (s, 1H, HC8), 8.54 (s, 1H, HC2), 5.73 (d, *J* = 9.4 Hz, 1H, HC1'), 5.18 - 5.15 (m, 2H, OH), 4.92 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H, OH), 4.29 - 4.25 (m, 1H, HC2'), 4.07 - 4.05 (m, 1H, HC3'), 3.77 - 3.67 (m, 2H, HC4', HC5^b), 3.65 - 3.62 (m, 1H, HC5^b), 2.83 (d, *J* = 4.6 Hz, 3H, NCH₃) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 154.01$ ($\underline{\text{C}}\text{O}(\text{NH})(\text{NCH}_3)$), 150.9 ($\underline{\text{C}}2$), 150.8 ($\underline{\text{C}}6$), 150.1 ($\underline{\text{C}}4$), 142.50 ($\underline{\text{C}}8$), 119.8 ($\underline{\text{C}}5$), 80.1 ($\underline{\text{C}}1'$), 71.2 ($\underline{\text{C}}4'$), 68.22 ($\underline{\text{C}}2'$), 66.6 ($\underline{\text{C}}3'$), 65.3 ($\underline{\text{C}}5'$), 26.3 (NCH_3) ppm.

IR (cm^{-1}): $\tilde{\nu} = 3260$ (w), 2878 (w), 1681 (m), 1616 (m), 1557 (m), 1470 (w), 1410 (w), 1332 (w), 1293 (m), 1144 (w), 1095 (m), 1076 (m), 1044 (s), 1052 (s), 1015 (m), 973 (w), 917 (w), 846 (w), 771 (m).

HRMS (ESI⁺): m/z berechnet für $[\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{N}_6\text{O}_5]^+ [\text{M}+\text{H}]^+$: 325.1255, gefunden: 325.1253.

Acetyl-geschütztes $\text{ms}^2\text{A}^{[30]}$ (**116**)



ms^2A **108** (100 mg, 319 μmol , 1 eq) wurde in absolutem Pyridin (6.00 mL) gelöst und auf 0°C abgekühlt. Essigsäureanhydrid (3.00 mL) wurde tropfenweise zugegeben und bei rt gerührt. Nach 2 h wurde die Reaktion durch die Zugabe von EtOH (2.00 mL) abgestoppt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und anschließend mit Toluol co-evaporiert. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie (DCM:MeOH, 100:1) aufgereinigt, um das Produkt **116** als gelblichen Feststoff (100 mg, 228 μmol , Ausbeute: 71 %) zu erhalten.

Schmelzpunkt: 174°C Zersetzung.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 8.19$ (s, 1H, HC8), 7.47 (bs, 1H, NH_2), 6.16 (d, $J = 4.2$ Hz, 1H, $\text{HC}1'$), 6.06 (dd, $J = 5.6, 4.3$ Hz, 1H, $\text{HC}2'$), 5.96 (t, $J = 6.1$ Hz, 1H, $\text{HC}3'$), 4.42 (dd, $J = 12, 3.7$ Hz, 2H, $\text{HC}5'^a$), 4.42 (dd, $J = 5.7, 3.7$ Hz, 2H, $\text{HC}4'$), 4.42 (dd, $J = 12, 5.5$ Hz, 2H, $\text{HC}5'^b$), 2.49 (s, 3H, COCH_3), 2.11 (s, 3H, COCH_3), 2.07 (s, 3H, COCH_3) ppm.

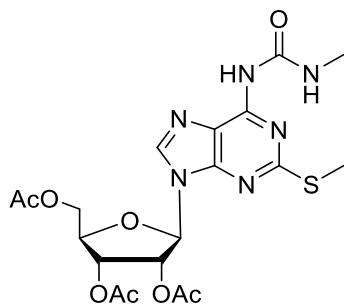
$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 170.07$ ($\underline{\text{C}}\text{OCH}_3$), 169.51 ($\underline{\text{C}}\text{OCH}_3$), 169.42 ($\underline{\text{C}}\text{OCH}_3$), 164.99 ($\underline{\text{C}}2$), 155.53 ($\underline{\text{C}}4$), 149.60 ($\underline{\text{C}}6$), 139.41 ($\underline{\text{C}}8$), 117.05 ($\underline{\text{C}}5$), 86.40 ($\underline{\text{C}}1'$), 78.75 ($\underline{\text{C}}4'$), 71.92 ($\underline{\text{C}}2'$), 69.73 ($\underline{\text{C}}3'$), 62.58 ($\underline{\text{C}}5'$), 20.40 ($\text{CO}\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 20.37 ($\text{CO}\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 20.32 ($\text{CO}\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 13.75 (SCH_3) ppm.

5. Methoden

IR (cm^{-1}): $\tilde{\nu}$ = 3369 (w), 3306 (w), 3188 (w), 1757 (w), 1741 (m), 1723 (m), 1645 (m), 1579 (m), 1461 (w), 1430 (w), 1407 (w), 1365 (w), 1323 (m), 1303 (m), 1239 (s), 1212 (s), 1200 (s), 1094 (m), 1066 (m), 1044 (s), 1010 (w), 909 (m).

HRMS (ESI⁺): m/z berechnet für $[\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{N}_5\text{O}_2\text{S}]^+ [\text{M}+\text{H}]^+$: 440.1234, gefunden: 440.1233.

Acetyl-geschütztes, Methylharnstoff-modifiziertes ms²A (115)



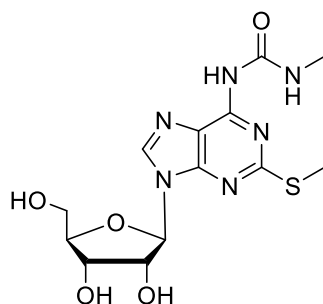
Acetyl-geschütztes ms²A **108** (61.0 mg, 138 μmol , 1 eq) wurde in absolutem Pyridin (3.00 mL) gelöst und auf 0°C abgekühlt. Chlorameisensäurephenylester (52.2 μL , 416 μmol , 3 eq) wurde zugegeben und die Mischung für 1 h bei 0°C gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Hex \rightarrow Hex:EtOAc 1:1 \rightarrow EtOAc) aufgereinigt um das Zwischenprodukt als gelblichen Schaum (65.0 mg, 116 μmol , Ausbeute: 84 %) zu isolieren.

Das Carbamat (50.0 mg, 89.4 μmol , 1 eq) wurde erneut in absolutem Pyridin (7.50 mL) gelöst und Methylammoniumchlorid (24.1 mg, 357 μmol , 4 eq) zugegeben. Die Mischung wurde über Nacht auf 70°C erhitzt und anschließend auf rt abgekühlt. Überschüssiges Methylammoniumchlorid wurde abfiltriert und mit EtOAc gewaschen. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und mit Toluol co-evaporiert. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (DCM:MeOH, 98:2) aufgereinigt, um das Produkt **115** als weißen Feststoff (33.0 mg, 66.5 μmol , Ausbeute: 74 %) zu isolieren.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 9.86 (s, 1H, NH), 8.86 (q, J = 4.6 Hz, 1H, NH), 8.50 (s, 1H, HC8), 6.29 (d, J = 4.4 Hz, 1H, HC1'), 6.09 (dd, J = 6.1, 4.4 Hz, 1H, HC2'), 5.74 (t, J = 6.0 Hz, 1H, HC3'), 4.50 – 4.39 (m, 2H, HC4', HC5^a), 4.27 (dd, J = 11.8, 5.2 Hz, 1H, HC5^b), 2.72 (d, J = 4.6 Hz, 3H, NCH₃), 2.65 (s, 3H, SCH₃), 2.17 (s, 3H, COCH₃), 2.13 (s, 3H, COCH₃), 2.02 (s, 3H, COCH₃) ppm.

HRMS (ESI⁺): m/z berechnet für $[\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{N}_6\text{O}_8\text{S}]^+ [\text{M}+\text{H}]^+$: 497.1449, gefunden: 497.1449.

Das ¹H-NMR Spektrum enthält unbekannte Verunreinigungen.

Methylharnstoff-modifiziertes ms²A (105)

Präbiotische Synthese:

Alternative 1:

FaPy **102** (950 µg, 3.71 µmol, 1 eq) wurde mit Ribose **1** (27.8 mg, 185 µmol, 50 eq) zermörsert und gemäß allgemeiner Verfahrensweise 1 zur Reaktion gebracht. Nach der Zugabe des Borat-Puffers (396 µL) wurde die Reaktion für 6 Tage gerührt.

Alternative 2:

ms²A **108** (5.00 mg, 15.9 µmol, 1 eq) wurde mit Methylisocyanat **96** (12.9 µL, 217 µmol, 13.6 eq) gemäß allgemeiner Verfahrensweise 2 umgesetzt.

Synthetische Referenzverbindung:

Das geschützte Nukleosid **121** (11.0 mg, 22.2 µmol, 1 eq) wurde in 7 N Ammoniak in MeOH (10.0 mL) gelöst und über Nacht bei rt gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt mittels HPLC (Retentionszeit: 33.4 min, Gradient: 0→35 % ACN in 45 min) aufgereinigt, um das Produkt **105** als weißen Schaum (2.44 mg, 6.59 µmol, Ausbeute: 30 %) zu erhalten.

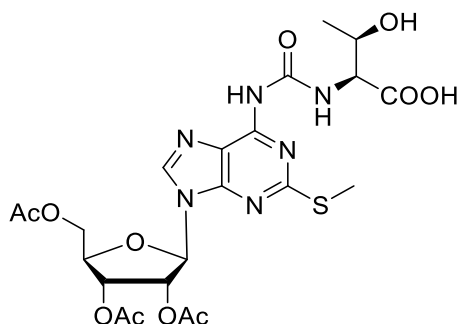
¹H-NMR (599 MHz, DMSO-*d*₆): δ: 9.72 (s, 1H, NH), 8.88 (bs, 1H, NH), 8.49 (s, 1H, HC8), 5.90 (d, *J* = 5.8 Hz, 1H, HC1'), 5.50 (s, 1H, OH), 5.24 (s, 1H, OH), 5.02 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H, HC2'), 4.60 (t, *J* = 4.2 Hz, 1H, HC3'), 4.24 – 4.13 (m, 1H, OH), 3.93 (t, *J* = 4.1 Hz, 1H, HC4'), 3.63 – 3.67 (m, 1H HC5^a), 3.57 – 3.52 (m, 1H, HC5^b), 2.82 (d, *J* = 4.6 Hz, 3H, NCH₃), 2.57 (s, 3H, SCH₃) ppm.

¹³C-NMR (201 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 163.7 (COOH), 153.7 (C2), 151.2 (C6), 149.8 (C4), 141.0 (C8), 117.6 (C5), 87.3 (C1'), 85.6 (C4'), 73.5 (C2'), 70.3 (C3'), 61.3 (C5'), 26.2 (NCH₃) 14.0 (SCH₃) ppm.

IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3262 (w), 2925 (w), 2362 (w), 1691 (m), 1589 (s), 1529 (m), 1390 (m), 1244 (m), 1053 (m), 797 (w).

HRMS (ESI⁺): m/z berechnet für [C₁₄H₁₇N₆O₇S]⁺ [M+H]⁺: 371.1132, gefunden: 371.1129.

Acetyl-geschütztes ms²t⁶A (119)



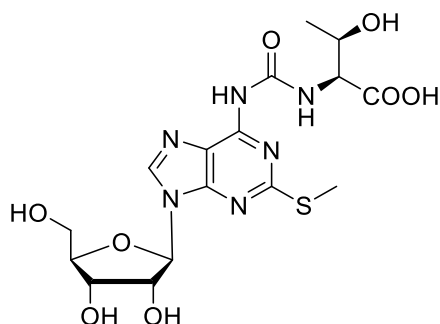
Acetyl-geschütztes ms²A **116** (61.0 mg, 138 μ mol, 1 eq) wurde in absolutem Pyridin (3.00 mL) gelöst und auf 0°C abgekühlt. Chlorameisensäurephenylester (52.2 μ L, 416 μ mol, 3 eq) wurde zugetropft und die Mischung für 1 h bei 0°C gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Hex → Hex:EtOAc 1:1 → EtOAc) aufgereinigt um das Zwischenprodukt als gelblichen Schaum (65.0 mg, 116 μ mol, Ausbeute: 84 %) zu isolieren.

Das Carbamat (15.0 mg, 26.8 μ mol, 1 eq) wurde erneut in absolutem Pyridin (2.25 mL) gelöst und L-Threonin **88** (12.8 mg, 107 μ mol, 4 eq) zugegeben. Die Mischung wurde über Nacht auf 70°C erhitzt und anschließend auf rt abgekühlt. Überschüssiges L-Threonin **88** wurde abfiltriert und mit EtOAc gewaschen. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und mit Toluol co-evaporiert. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (DCM:MeOH:AcOH, 50:1:0.1) aufgereinigt, um das Produkt **119** als weißen Schaum (15.7 mg, 18.8 μ mol, Ausbeute: 70 %) zu isolieren.

¹H-NMR (599 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8.52 (s, 1H, NH), 8.00 (s, 1H, HC8), 6.26 (d, J = 4.2 Hz, 1H, HC1'), 6.06 (dd, J = 6.1, 4.3 Hz, 1H, HC2'), 5.69 (t, J = 5.7 Hz, 1H, HC3'), 4.65 – 4.62 (m, 1H, HC4'), 4.44 – 4.37 (m, 3H, CHCH₃, NCH, HC5^a), 4.20 (t, J = 5.3 Hz, 1H, HC5^b), 2.60 (s, 3H, SCH₃), 2.11 (s, 3H, COCH₃), 2.07 (s, 3H, COCH₃), 1.44 (s, 3H, COCH₃), 1.44 (d, J = 6.2 Hz, 3H, CH₃) ppm.

¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 170.0 (COOH), 169.5 (COCH₃), 169.5 (COCH₃), 169.3 (COCH₃), 165.0 (C2), 158.3 (C8), 152.3 (C6), 148.9 (C(NH)(NH(CH₃))), 142.7 (C4), 121.2 (C5), 86.5 (C1'), 78.9 (NCH), 75.3 (C4'), 71.9 (C2'), 69.6 (C3'), 62.9 (C5'), 60.5 (CH), 20.7 (CH₃), 20.4 (COCH₃), 20.4 (COCH₃), 20.3 (COCH₃), 14.1 (SCH₃) ppm.

HRMS (ESI⁻): m/z berechnet für [C₂₂H₂₇N₆O₁₁S]⁻ [M-H]⁻: 583.1464, gefunden: 583.1462.

ms²t⁶A (103)**Präbiotische Synthese:**

Nukleosid **105** (500 µg, 1.35 µmol, 1 eq) wurde mit NaNO₂ (1.16 mg, 16.9 µmol, 12.5 eq) in Phosphorsäure (5 %, 150 µL) gemäß allgemeiner Verfahrensweise 3 umgesetzt. Das nitrosylierte Zwischenprodukt wurde ohne weitere Aufreinigung mit L-Threonin **88** (1.17 µg, 9.82 µmol, 9 eq) in Borat-Puffer (30 mM, 1.00 mL) gemäß allgemeiner Verfahrensweise 4 umgesetzt. Nach einer Stunde wurde eine Probe (25 µL) entnommen und mit H₂O auf 500 µL verdünnt. Die Probe wurde mittels LC-MS analysiert.

Synthetische Referenzverbindung:

Das geschützte Nukleosid **119** (11.0 mg, 18.8 µmol, 1 eq) wurde in 7.00 N Ammoniak in MeOH (8.00 mL) gelöst und über Nacht bei rt gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt mittels HPLC (Retentionszeit: 35.0 min, Gradient: 0→35 % ACN in 45 min) aufgereinigt, um das Produkt als weißen Feststoff (2.51 mg, 5.47 µmol, Ausbeute: 29 %) zu erhalten.

Schmelzpunkt: 151°C.

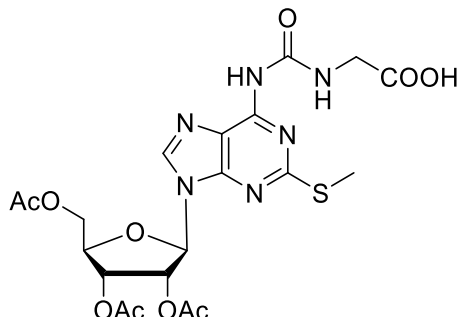
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 9.22 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz, NH), 8.48 (s, 1H, HC8), 5.88 (d, *J* = 5.8 Hz, 1H, HC1'), 5.51 (d, *J* = 6.0 Hz 1H, OH), 5.22 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H, OH), 5.03 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H, OH), 4.58 (q, *J* = 5.6 Hz, 1H, HC2'), 4.15 – 4.10 (m, 2H, HC3', CHNH), 4.09 – 4.06 (m, 1H, CH(CH₃)OH), 3.96 (q, *J* = 4.0 Hz, 1H, HC4'), 3.69 (dt, *J* = 12.0, 4.8 Hz, 1H, HC5^a), 3.58 – 3.53 (m, 1H, HC5^b), 2.59 (s, 3H, SCH₃), 1.06 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H, CH₃) ppm.

¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 172.0 (COOH), 164.2 (C2), 152.8 (CO(NH)(NHCH₃)), 151.2 (C6), 149.9 (C4), 141.1 (C8), 117.8 (C5), 87.3 (C1'), 85.6 (C4'), 73.5 (C2'), 70.3 (C3'), 66.2 (CH(CH₃)OH), 61.3 (C5'), 58.3 (CNH), 45.7 (SCH₃), 14.1 (CH₃) ppm.

IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3257 (w), 1688 (m), 1607 (s), 1541 (m), 1403 (m), 1335 (s), 1248 (m), 1056 (m), 787 (m).

HRMS (ESI⁻): m/z berechnet für $[C_{16}H_{21}N_6O_8]^-$ $[M-H]^-$: 457.1147, gefunden: 457.1149.

Acetyl-geschütztes ms²g⁶A (118)



Acetyl-geschütztes ms²A **116** (61.0 mg, 138 μ mol, 1 eq) wurde in absolutem Pyridin (3.00 mL) gelöst und auf 0°C abgekühlt. Chlorameisensäurephenylester (52.2 μ L, 416 μ mol, 3 eq) wurde zugetropft und die Mischung für 1 h bei 0°C gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Hex → Hex:EtOAc 1:1 → EtOAc) aufgereinigt um das Zwischenprodukt als gelblichen Schaum (65.0 mg, 116 μ mol, Ausbeute: 84 %) zu isolieren.

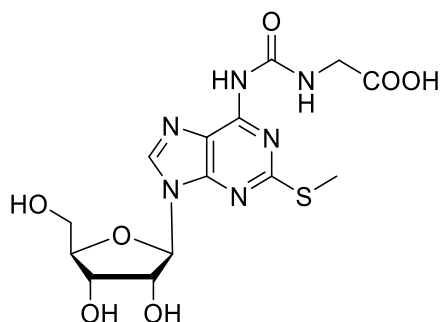
Das Carbamat (15.0 mg, 26.8 μ mol, 1 eq) wurde erneut in absolutem Pyridin (2.25 mL) gelöst und L-Glycin **82** (9.05 mg, 107 μ mol, 4 eq) zugegeben. Die Mischung wurde über Nacht auf 70°C erhitzt und anschließend auf rt abgekühlt. Überschüssiges L-Glycin **82** wurde abfiltriert und mit EtOAc gewaschen. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und mit Toluol co-evaporiert. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (DCM:MeOH:AcOH, 50:1:0.1) aufgereinigt, um das Produkt **118** als weißen Schaum (10.0 mg, 18.5 μ mol, Ausbeute: 69 %) zu isolieren.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 9.47 (s, 1H, NH), 8.90 (t, J = 4.4 Hz, 1H, NH), 8.42 (s, 1H, HC8), 6.21 (d, J = 4.6 Hz, 1H, HC1'), 6.02 (t, J = 5.4 Hz, 1H, HC2'), 5.66 (t, J = 5.8 Hz, 1H, HC3'), 4.43-4.35 (m, 2H HC4', HC5^a), 4.21 (dd, J = 11.6, 5.1 Hz, 1H, HC5^b), 3.72 (d, J = 6.0 Hz, 2H, CH₂), 2.61 (s, 3H, SCH₃), 2.11 (s, 3H, COCH₃), 2.06 (s, 3H, COCH₃), 1.97 (d, J = 6.2 Hz, 3H, COCH₃) ppm.

¹³C-NMR (201 MHz, DMSO): δ 171.22 (COOH), 169.97 (COCH₃), 169.41 (COCH₃), 169.28 (COCH₃), 164.83 (C2), 158.52 (C8), 150.53 (C6), 150.08 (C(NH)(NH(CH₃))), 141.32 (C4), 127.99, 126.37 (C5), 86.04 (C1'), 71.94 (C4'), 69.68 (C2'), 62.51 (C3'), 60.06 (C5'), 41.51 (CH₂), 20.40 (COCH₃), 20.33 (COCH₃), 20.22 (COCH₃), 14.06 (SCH₃) ppm.

HRMS (ESI⁺): m/z berechnet für $[C_{20}H_{27}N_6O_{10}S]^+$ $[M+H]^+$: 541.1347, gefunden: 541.1345.

Das ¹H-NMR Spektrum enthält unbekannte Verunreinigungen.

ms²g⁶A (109)**Präbiotische Synthese:**

Nukleosid **105** (500 µg, 1.35 µmol, 1 eq) wurde mit NaNO₂ (1.16 mg, 16.9 µmol, 12.5 eq) in Phosphorsäure (5 %, 150 µL) gemäß allgemeiner Verfahrensweise 3 umgesetzt. Das nitrosylierte Zwischenprodukt wurde ohne weitere Aufreinigung mit L-Glycin **82** (680 µg, 9.07 µmol, 9 eq) in Borat-Puffer (30 mM, 1.00 mL) gemäß allgemeiner Verfahrensweise 4 umgesetzt. Nach einer Stunde wurde eine Probe (25 µL) entnommen und mit H₂O auf 500 µL verdünnt. Die Probe wurde mittels LC-MS analysiert.

Synthetische Referenzverbindung:

Das geschützte Nukleosid **118** (10.0 mg, 18.5 µmol, 1 eq) wurde in 7.00 N Ammoniak in MeOH (10.0 mL) gelöst und über Nacht bei rt gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt mittels HPLC (Retentionszeit: 22.1 min, Gradient: 0→30% ACN in 45 min) aufgereinigt, um das Produkt als weißen Schaum (2.22 mg, 5.36 µmol, Ausbeute: 29 %) zu erhalten.

¹H-NMR (599 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 9.10 (t, *J* = 4.9 Hz, 1H, NH), 8.49 (s, 1H, HC8), 5.90 (d, *J* = 5.7 Hz, 1H, HC1'), 4.59 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H, HC2'), 4.16 (t, *J* = 4.2 Hz, 1H, HC3'), 3.94 (q, *J* = 4.1 Hz, 1H, HC4'), 3.78 (d, *J* = 4.1 Hz, 2H, CH₂), 3.69 (dd, *J* = 11.9, 4.3 Hz, 1H, HC5^a), 3.55 (dd, *J* = 11.9, 4.3 Hz, 1H, HC5^b), 2.59 (s, 3H, SCH₃) ppm.

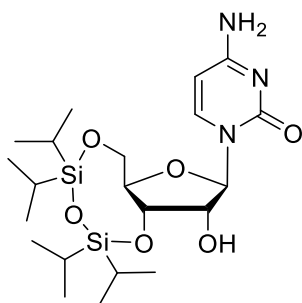
¹³C-NMR (201 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 164.0 (COOH), 152.7 (C2), 151.2 (C6), 149.8 (C4), 141.05 (C8), 117.7 (C5), 87.3 (C1'), 85.5 (C4'), 73.5 (C2'), 70.3 (C3'), 61.4 (C5'), 45.5 (CH₂) 14.1 (SCH₃) ppm.

IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3243 (w), 2362 (w), 1686 (m), 1588 (s), 1535 (m), 1468 (m), 1391 (m), 1242 (s), 1052 (s) 796 (m).

HRMS (ESI): *m/z* berechnet für [C₁₄H₁₇N₆O₇S]⁻ [M-H]⁻: 413.0885, gefunden: 413.0878.

5.3. Synthese der aminoacetylierten Cytidin-Derivate**3',5'-TIPDS-Cytidin (134)**

5. Methoden



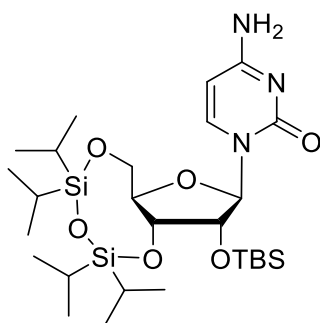
Cytidin **5** (6.00 g, 24.7 mmol, 1 eq) wurde in absolutem Pyridin (60 mL) gelöst und auf 0°C gekühlt. TIPDSCl₂ (9.50 mL, 29.7 mmol, 1.20 eq) wurde tropfenweise über 10 min zugegeben und die Reaktion über Nacht bei rt gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt durch Säulenchromatographie (DCM:MeOH = 100 → 85:15) aufgereinigt, um das Produkt **134** als farblosen Schaum (12.0 g, 24.7 mmol, Ausbeute: quant.) zu isolieren.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 9.68 (s, NH₂), 7.91 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, HC6), 6.10 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, HC5), 5.78 (bs, 1H, 2'OH), 5.51 (s, 1H, HC1'), 4.19-4.16 (m, 2H, HC2', HC5'^a), 4.08 – 4.02 (m, *J* = 2.8 Hz, 2H, HC3', HC4'), 3.90 (d, *J* = 13.0 Hz, 1H, HC5'^b), 1.07 – 0.96 (m, 28H, H/Pr) ppm.

¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 160.0 (C4), 147.2 (C2), 142.7 (C6), 93.2 (C5), 91.2 (C1'), 81.1 (C4'), 73.2 (C2'), 68.1 (C3'), 59.8 (C5'), 17.4 (C/Pr)*, 17.3 (C/Pr)*, 17.3 (C/Pr)*, 17.2 (C/Pr)*, 17.2 (C/Pr)*, 17.1 (C/Pr)*, 16.9 (C/Pr)*, 16.9 (C/Pr)*, 12.7 (C/Pr)*, 12.4 (C/Pr)*, 12.4 (C/Pr)*, 11.9 (C/Pr)* ppm.

IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3082.0 (w), 2943.8 (m), 2866.9 (m), 1722.0 (m), 1673.8 (m), 1537.7 (w), 1487.7 (m), 1464.1 (m), 1386.9 (w), 1335.1 (w), 1274.9 (m), 1248.3 (w), 1215.7 (w), 1160.7 (m), 1119.5 (s), 1035.3 (s), 991.3 (s), 903.9 (m), 883.8 (s), 858.9 (m), 761.8 (m), 692.7 (s) cm⁻¹.

HRMS (ESI⁺): *m/z* berechnet für: [C₂₁H₄₀N₃O₆Si₂]⁺ [M + H]⁺: 486.2450, gefunden: 486.2447.

2'-TBS-3',5'-TIPDS-Cytidin (135)

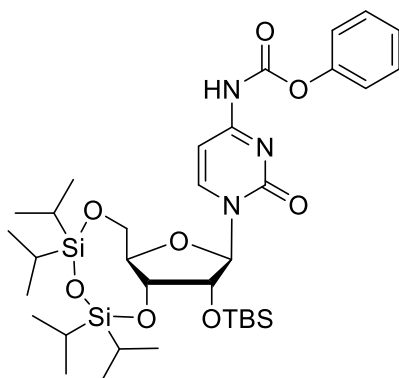
134 (12.0 g, 24.7 mmol, 1 eq) wurde in absolutem (70.0 mL) gelöst. Imidazol (6.72 g, 98.7 mmol, 4 eq) und TBSCl (4.83 g, 32.1 mmol, 1.3 eq) wurden zugegeben und bei rt gerührt. Nach 16 h wurde das Gemisch für 2 h auf 60°C erhitzt und anschließend das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie (MeOH/DCM = 0% – 6 %) aufgereinigt um das Produkt **135** als farblosen Schaum (14.8 g, 24.7 mmol, Ausbeute: quant.) zu erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.74 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, HC6), 7.23 (s, 2H, NH₂), 5.66 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, HC5), 5.45 (s, 1H, HC1'), 4.19 (d, *J* = 13.6 Hz, 1H, HC5'^b), 4.07 – 4.02 (m, 3H, HC2', HC3', HC4'), 3.90 (d, *J* = 13.4 Hz, 1H, HC5'^a), 1.07 – 0.91 (m, 28H, H/Pr), 0.89 (s, 9H, H(CH₃)₃TBS), 0.16 (s, 3H, H(CH₃)₃TBS)*, 0.08 (s, 3H, H(CH₃)₃TBS)* ppm.

¹³C-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 166.2 (C4), 155.2 (C2), 139.6 (C6), 93.6 (C5), 91.0 (C1'), 80.9 (C4'), 76.4 (C2'), 68.3 (C3'), 59.9 (C5'), 26.0 (CTBS), 18.3 (CTBS/C/Pr), 7.8 (CTBS/C/Pr), 17.6 (CTBS/C/Pr), 17.6 (CTBS/C/Pr), 17.5 (CTBS/(C/Pr), 17.2 (CTBS/C/Pr), 17.1 (CTBS/C/Pr), 13.2 (2C, C/Pr)*, 13.0 (2C, C/Pr)*, 12.8 (2C, C/Pr)*, 12.6 (2C, C/Pr)*, -4.3 ((CH₃)₃TBS)*, -4.8 ((CH₃)₃TBS)* ppm.

IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3331.8 (w), 3129.8 (w), 2945.9 (m), 2894.9 (w), 2867.5 (m), 2361.7 (w), 2340.9 (w), 1639.6 (m, br), 1520.7 (m), 1487.5 (m), 1464.4 (m), 1398.2 (m), 1387.7 (m), 1324.4 (w), 1279.6 (m), 1250.2 (m), 1218.3 (m), 1168.7 (m), 1130.1 (s), 1060.7 (m), 1037.0 (s), 1004.6 (m), 971.8 (w), 947.2 (m), 919.1 (w), 883.8 (m), 865.0 (s), 830.0 (s), 813.8 (m), 778.7 (s), 691.9 (s) cm⁻¹.

HRMS (ESI⁺): *m/z* berechnet für [C₂₇H₅₄N₃O₆Si₃]⁺ [M + H]⁺: 600.3315, gefunden: 600.3314.

2'-TBS-3',5'-TIPDS-M⁴-Phenylcarbamat-Cytidin (137)

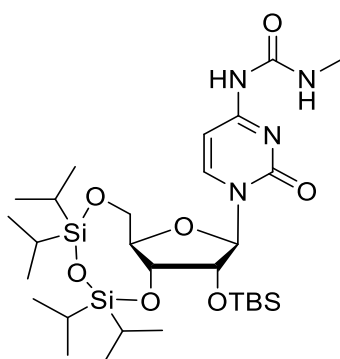
135 (10.9 g, 18.2 mmol, 1 eq) wurde in absolutem DCM (180 mL) gelöst und **136** (6.52 g, 27.3 mmol, 1.5 eq) zugegeben. Die Reaktion wurde über Nacht bei rt gerührt und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie (iHex → EtOAc:iHex 2:8 → EtOAc) aufgereinigt um das Produkt **137** als farblosen Schaum (9.27 g, 12.9 mmol, Ausbeute: 71 %) zu isolieren.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 9.33 (s, NH), 8.15 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, HC6), 7.46-7.41 (m, 2H, HC_{Ph}), 7.31-7.26 (m, 1H, HC_{Ph}), 7.22-7.19 (m, 2H, HC_{Ph}), 7.00 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, HC5), 5.53 (s, 1H, HC1'), 4.26 – 4.20 (m, 2H, HC2'/HC5'^a), 4.13-4.10 (m, 1H, HC4'), 4.05 (dd, *J* = 9.5, 3.6 Hz, 1H, HC3'), 3.92 (dd, *J* = 13.9, 2.3 Hz, 1H, HC5'^b), 1.06 – 0.93 (m, 28H, H/Pr), 0.91 (s, 9H, H(CH₃)₃TBS), 0.20 (s, 3H, H(CH₃)₃TBS)*, 0.11 (s, 3H, H(CH₃)₃TBS)* ppm.

¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 162.9 (C4), 157.3 (C(NH)), 153.9 (C2), 149.9 (C14), 143.2 (C6), 129.6 (C_{Ph}), 126.1 (2C, C_{Ph}), 121.9 (2C, C_{Ph}), 93.9 (C5), 91.1 (C1'), 80.9 (C4'), 75.5 (C2'), 67.7 (C3'), 59.4 (C5'), 25.6 (C_{TBS}), 17.9 (C_{TBS}/CiPr), 17.4 (C_{TBS}/CiPr), 17.2 (C_{TBS}/CiPr), 17.0 (C_{TBS}/CiPr), 16.8 (C_{TBS}/CiPr), 16.7 (C_{TBS}/CiPr), 12.7 (2C, CiPr)*, 12.6 (2C, CiPr)*, 12.3 (2C, CiPr)*, 12.2 (2C, CiPr)*, -4.6 ((CH₃)₃TBS)* -5.1 ((CH₃)₃TBS)* ppm.

IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3146.3 (w), 3075.8 (w), 2945.8 (m), 2928.8 (m), 2894.9 (w), 2867.0 (m), 2361.1 (w), 2341.5 (w), 1943.4 (w), 1766.8 (w), 1646.8 (m), 1621.6 (m), 1593.9 (m), 1561.2 (m), 1504.1 (m), 1489.6 (m), 1471.1 (m), 1388.1 (m), 1377.2 (m), 1326.6 (w), 1303,0 (w), 1268.9 (m), 1247.2 (m), 1218.6 (m), 1184.8 (s), 1168.1 (s), 1127.9 (s), 1061.8 (s), 1037.2 (s), 1003.9 (s), 975.3 (m), 945.7 (m), 919.1 (w), 883.5 (m), 862.0 (m), 829.1 (s), 811.6 (s), 779.1 (s), 751.6 (s), 688.9 (s) cm⁻¹.

HRMS (ESI⁺): *m/z* berechnet für [C₃₄H₅₈N₃O₈Si₃]⁺ [M + H]⁺: 720.3526, gefunden: 720.3527.

Methylharnstoff-modifiziertes 2'-TBS-3',5'-TIPDS-Cytidin (**140**)

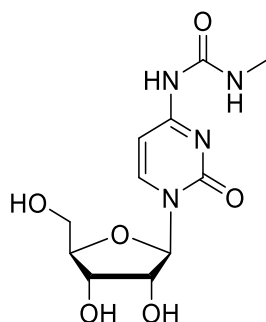
137 (700 mg, 972 μmol , 1.0 eq) wurde in absolutem Pyridin (7.0 mL) gelöst und Methylamin in THF (972 μL , 1.94 mmol, 2.0 eq) zugegeben. Die Mischung wurde für 80 min auf 100°C erhitzt und anschließend das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie (DCM \rightarrow MeOH:DCM 2.5:97.5) aufgereinigt um das Produkt **140** als farblosen Schaum (511 mg, 777 μmol , Ausbeute: 80%) zu isolieren.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 9.92 (s, 1H, NH), 7.98 (d, J = 7.4 Hz, 1H, HC5), 6.26 (bs, 1H, OH), 5.48 (s, 1H, HC1'), 4.24 (s, 1H, HC2'), 4.20 (d, J = 3.5 Hz, 2H, HC3'), 4.09 (dd, J = 9.7, 1.9 Hz, 1H, HC4'), 4.02 (dd, J = 9.5, 3.7 Hz, 1H, HC5^{a}), 3.92 (dd, J = 13.8, 2.3 Hz, 1H, HC5^{b}), 2.75 (d, J = 4.6 Hz, 3H, NCH_3), 1.10 – 0.91 (m, 28H, H/Pr), 0.91 (s, 9H $\text{H}((\text{CH}_3)_3)_{\text{TBS}}$), 0.18 (s, 3H, $((\text{CH}_3)_{\text{TBS}})^*$), 0.10 (s, 3H, $((\text{CH}_3)_{\text{TBS}})^*$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 162.4 (C4), 154.2 ($\text{C}(\text{NH})_2$), 153.3 (C2), 141.6 (C6), 94.2 (C5), 91.0 (C1'), 80.9 (C3'), 75.5 (C2'), 67.7 (C4'), 59.4 (C5'), 26.0 (NCH_3), 25.7 (C_{TBS}), 17.9 ($\text{C}_{\text{TBS}}/\text{C/Pr}$), 17.5 ($\text{C}_{\text{TBS}}/\text{C/Pr}$), 17.3 ($\text{C}_{\text{TBS}}/\text{C/Pr}$), 17.1 ($\text{C}_{\text{TBS}}/\text{C/Pr}$), 16.9 ($\text{C}_{\text{TBS}}/\text{C/Pr}$), 16.8 ($\text{C}_{\text{TBS}}/\text{C/Pr}$), 12. (2C, C/Pr)*, 12.6 (2C, C/Pr)*, 12.3 (2C, C/Pr)*, 12.2 (2C, C/Pr)*, -4.7 ($((\text{CH}_3)_{\text{TBS}})^*$), -5.0 ($((\text{CH}_3)_{\text{TBS}})^*$) ppm.

IR (cm^{-1}): $\tilde{\nu}$ = 3245.4 (w), 3082.2 (w), 2945.7 (w), 2867.6 (w), 1721.4 (m), 1647.3 (s), 1568.0 (m, br), 1503.8 (m), 1464.2 (m), 1432.4 (w), 1415.8 (w), 1388.7 (w), 1377.3 (w), 1333.2 (w), 1250.6 (s), 1218.2 (w), 1169.2 (m), 1130.8 (s), 1063.2 (s), 1038.1 (s), 1005.0 (m), 946.2 (m), 919.6 (w), 946.2 (m), 884.0 (m), 863.9 (s), 830.9 (s), 813.6 (m), 779.7 (s), 693.6 (s) cm^{-1} .

HRMS (ESI^+): m/z berechnet für $[\text{C}_{29}\text{H}_{58}\text{N}_4\text{O}_7\text{Si}_3]^+$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 658.3602, gefunden: 658.3553.

Methylharnstoff-modifiziertes Cytidin (130)

Präbiotische Synthese:

Cytidin **5** (10.0 mg, 41.1 μmol , 1 eq) wurde mit Methylisocyanat **96** (13.4 μL , 226 μmol , 5.5 eq) gemäß allgemeiner Verfahrensweise 2 umgesetzt.

Synthetische Referenzverbindung:

140 (400 mg, 609 μmol , 1.0 eq) wurde in absolutem DCM (2.00 mL) gelöst. HF/ NEt_3 (450 μL , 3.65 mmol, 6.0 eq) wurde zugegeben und die Reaktion bei rt gerührt. Nach 3 h wurde erneut HF/ NEt_3 (450 μL , 3.65 mmol, 6.0 eq) zugegeben und für weitere 1.5 h gerührt. Die Reaktion wurde mit Methoxytrimethylsilan (1.80 mL, 13.1 mmol, 21.4 eq) abgestoppt und für weitere 30 min gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Da die Reaktion noch nicht vollständig war, wurde erneut HF/ NEt_3 (450 μL , 3.65 mmol, 6.00 eq) zugegeben und für weitere 3 h gerührt. Nach dem Abstoppen der Reaktion mit Methoxytrimethylsilan (3.5 mL, 25.5 mmol, 41.6 eq) wurde für 30 min gerührt, das Lösungsmittel entfernt und das Rohprodukt aus H_2O umkristallisiert, um das Produkt **130** als weißen Schaum (74 mg, 247 μmol , 41 %) zu isolieren.

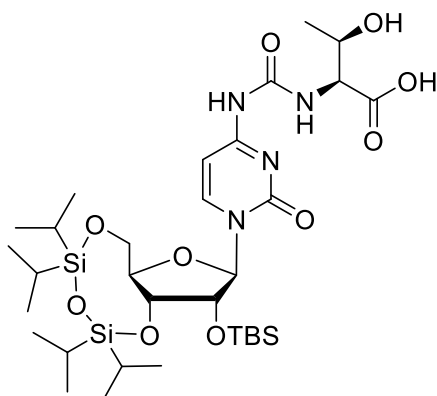
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 9.91 (s, 1H, NH), 8.78 (s, 1H, NH), 8.23 (m, J = 7.4 Hz, 1H, HC6), 6.23 (s, 1H, HC5), 5.76 (d, J = 3.3, 1H, $\text{HC1}'$), 5.40 (s, 1H, OH), 5.13 (s, 2H, OH), 3.99 – 3.90 (m, 2H, $\text{HC2}'$, $\text{HC3}'$), 3.90 – 3.82 (m, 1H, $\text{HC4}'$), 3.70 (dd, J = 12.2, 3.0 Hz, 1H, $\text{HC5}'^a$), 3.57 (dd, J = 12.2, 3.2 Hz, 1H, $\text{HC5}'^b$), 2.75 (d, J = 4.5 Hz, 3H, NCH_3) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 165.5 (C4), 154.2 ($\text{C}(\text{NH})(\text{NHCH}_3)$), 153.7 (C2), 143.7 (C6), 94.6 (C5), 89.8 ($\text{C1}'$), 84.2 ($\text{C3}'$), 74.4 ($\text{C2}'$), 68.9 ($\text{C4}'$), 60.1 ($\text{C5}'$), 25.8 (NCH_3) ppm.

IR (cm^{-1}): $\tilde{\nu}$ = 3233.0 (w), 3059.7 (w), 2948.2 (m), 2869.1 (w), 1709.5 (w), 1649.2 (s), 1565.5 (m), 1510.3 (m), 1464.2 (m), 1391.0 (m), 1364.4 (w), 1277.6 (s), 1251.1 (m), 1214.0 (m), 1167.8 (m), 1105.3 (s), 1059.1 (s), 999.3 (m), 962.9 (w), 923.8 (w), 884.6 (m), 861.0 (m), 839.1 (s), 813.0 (s), 789.9 (s), 689.5 (s), 667.3 (m) cm^{-1} .

HRMS (ESI⁺): m/z berechnet für $[C_{11}H_{17}N_4O_6]^+$ $[M + H]^+$: 301.1143, gefunden: 301.1141.

2'-TBS-3',5'-TIPDS-t⁴C (139)



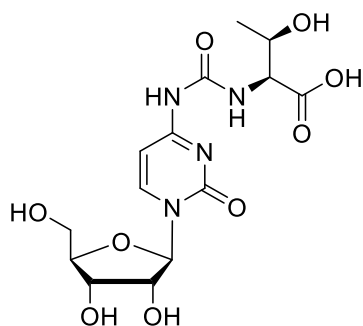
137 (750 mg, 1.04 mmol, 1.0 eq) wurde in absolutem Pyridin (24.0 mL) gelöst und L-Threonin **88** (934 mg, 4.17 mmol, 4.0 eq) zugegeben. Die Mischung wurde über Nacht bei 70°C gerührt und anschließend das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie (DCM → MeOH:DCM 6:94) aufgereinigt um das Produkt **137** als farblosen Schaum (776 mg, 1.04 mmol, Ausbeute: quant.) zu isolieren.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 9.90 (s, 1H, NH), 8.00 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, HC6), 6.48 (s, 1H, HC5), 5.48 (s, 1H, HC1'), 4.61 - 4.32 (m, 2H, HC2', HC5'^a), 4.31 - 4.00 (m, 6H, HC(NH)(COOH), HC(OH)(CH₃), HC3', HC4'), 3.93 (d, $J = 13.6$ Hz, 1H, HC5'^b), 1.09 - 0.93 (m, 31H, 28H, H/Pr), 0.91 (s, 9H, H((CH₃)₃TBS)), 0.19 (s, 3H, ((CH₃)_{TBS})^{*}) 0.11 (s, 3H, ((CH₃)_{TBS})^{*}) ppm.

¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 172.6 (COOH), 162.5 (C4), 153.7 (C(NH)₂), 153.5 (C2), 141.7 (C6), 94.1 (C5), 91.0 (C1'), 80.8 (C4'), 75.5 (C2'), 67.8 (C3'), 66.2 (HC(NH)(COOH)), 59.5 (C5'), 58.3 (HC(OH)(CH₃)), 25.7 (CTBS), 20.3 (CH₃) 18.6 (CTBS/CiPr), 17.9 (CTBS/CiPr), 17.5 (CTBS/CiPr), 17.3 (CTBS/CiPr), 17.1 (CTBS/CiPr), 16.9 (CTBS/CiPr), 16.8 (CTBS/CiPr), 12.8 (2C, CiPr)^{*}, 12.7 (2C, CiPr)^{*}, 12.3 (2C, CiPr)^{*}, -4.6 ((CH₃)_{TBS})^{*} -5.0 ((CH₃)_{TBS})^{*} ppm.

IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu} = 3248.9$ (w, br), 2946.8 (w), 2930.1 (w), 2867.8 (w), 1651.0 (m), 1629.5 (m), 1559.3 (m), 1495.0 (m), 1464.4 (m), 1388.5 (m), 1325.9 (w), 1298.9 (w), 1250.1 (m), 1218.5 (m), 1169.6 (m), 1129.8 (s), 1062.2 (s), 1037.5 (s), 1004.8 (s), 970.3 (w), 946.1 (m), 919.8 (w), 883.8 (m), 863.5 (s), 831.4 (s), 812.0 (s), 780.2 (s), 692.6 (s) cm⁻¹.

HRMS (ESI⁺): m/z berechnet für $[C_{32}H_{61}N_4O_{10}Si_3]^+$ $[M + H]^+$: 745.3690, gefunden: 745.3689.

¹⁴C (133)

Präbiotische Synthese:

130 (0.25 mg, 0.76 μmol , 1 eq) wurde mit NaNO_2 (1.44 mg, 20.8 μmol , 12.5 eq) in Phosphorsäure (5 %ig, 150 μL) gemäß allgemeiner Verfahrensweise 3 umgesetzt. Das nitrosylierte Zwischenprodukt wurde ohne weitere Aufreinigung mit L-Threonin **88** (1.17 mg, 9.82 μmol , 12 eq) in Borat- Puffer (30 mM, 1.00 mL) gemäß allgemeiner Verfahrensweise 4 umgesetzt. Nach einer Stunde wurde eine Probe (25 μL) entnommen und mit H_2O auf 1.00 mL verdünnt. Die Probe wurde mittels LC-MS analysiert.

Synthetische Referenzverbindung:

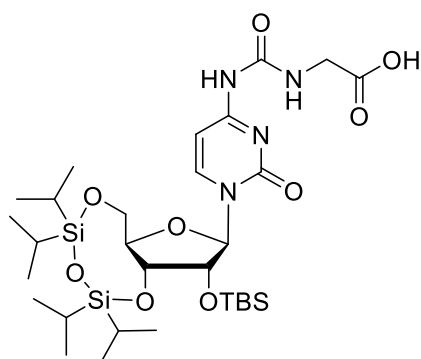
139 (250 mg, 335 μmol , 1.00 eq) wurde in absolutem DCM (1.10 mL) gelöst. HF/NEt_3 (247 μL , 2.42 mmol, 6.0 eq) wurde zugegeben und die Reaktion über Nacht bei rt gerührt. Die Reaktion wurde mit Methoxytrimethylsilan (2.00 mL, 14.5 mmol, 40 eq) und für weitere 30 min gerührt. Das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt wurde aus EtOH umkristallisiert, um das Produkt **133** als weißen Schaum (65.0 mg, 167 μmol , Ausbeute: 50 %) zu isolieren.

¹H-NMR (599 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 9.68 (s, 1H, COOH), 8.21 (d, J = 7.5 Hz, 1H, HC_6), 6.61 (s, 1H, HC_5), 6.35 (s, 1H, NH), 5.77 (d, J = 3.2 Hz, 1H, HC_1'), 5.54 (s, 1H, OH), 5.21 – 5.04 (m, 2H, OH), 3.97 - 3.94 (m, 2H, HC_2' , HC_3'), 3.91 – 3.79 (m, 3H, HC_4' , CHNH , CHOH), 3.79 (dt, J = 12.3, 3.8 Hz, 1H, $\text{HC}_5'^a$), 3.57 (dt, J = 12.3, 3.8 Hz, 1H, $\text{HC}_5'^b$), 0.92 (d, J = 6.0 Hz, 3H, CH_3) ppm.

¹³C-NMR (151 $\text{DMSO}-d_6$): δ = 171.8 (COOH), 162.5 (C_4), 154.3 ($\text{C}(\text{NH})_2$), 152.8 (C_2), 143.5 (C_6), 94.5 (C_5), 89.8 (C_1'), 84.2 (C_4'), 74.4 (C_2'), 68.9 (C_3'), 66.1 ($\text{HC}(\text{OH})(\text{CH}_3)$), 60.1 (C_5'), 57.7 ($\text{HC}(\text{NH})(\text{COOH})$), 18.8 (CH_3) ppm.

IR (cm^{-1}): $\tilde{\nu}$ = 3199 (w), 2916 (w), 1647 (m), 1490 (m), 1376 (m), 1278 (m), 1103 (m), 1023 (s), 996 (m), 786 (m) cm^{-1} .

HRMS (ESI⁺): m/z berechnet für $[\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{N}_4\text{O}_9]^+$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 337.1158, gefunden: 337.1159.

2'-TBS-3',5'-TIPDS-g⁴C (138)

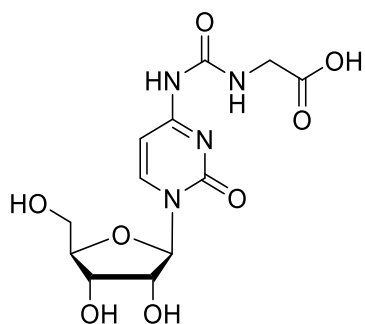
137 (750 mg, 1.04 mmol, 1.0 eq) wurde in absolutem Pyridin (20.0 mL) gelöst. L-Glycin **82** (496 mg, 4.17 mmol, 4.0 eq) wurde zugegeben und das Reaktionsgemisch über Nacht bei 70°C gerührt. Das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie (DCM → MeOH:DCM 1:5, 0.1 % AcOH) aufgereinigt um das Produkt **138** als farblosen Schaum (730 mg, 1.04 mmol, Ausbeute: quant.) zu isolieren.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 10.02 (s, 1H, NH), 8.00 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H, HC6), 6.34 (s, 1H, HC5), 5.48 (s, 1H, HC1'), 4.30 – 4.16 (m, 2H, HC2', HC5'^{ia}), 4.09 (dd, *J* = 9.7, 1.8 Hz, 1H, HC4'), 4.03 (dd, *J* = 9.5, 3.7 Hz, 1H, HC3'), 3.92 (dd, *J* = 13.8, 2.2 Hz, 1H, HC5'^b), 3.84 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H, CH₂), 1.08 – 0.93 (m, 28H, H/Pr), 0.91 (s, 9H, H((CH₃)₃)_{TBS}), 0.18 (s, 3H, ((CH₃)_{TBS})^{*}), 0.10 (s, 3H, ((CH₃)_{TBS})^{*}) ppm.

¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 171.6 (COOH), 162.4 (C4), 153.7 (C(NH)₂), 153.3 (C2), 141.7 (C6), 94.2 (C5), 91.0 (C1'), 80.9 (C4'), 75.6 (C2'), 67.7 (C3'), 59.5 (C5'), 42.0 (CH₂), 25.6 (C_{TBS}), 17.9 (C_{TBS}/C/Pr), 17.4 (C_{TBS}/C/Pr), 17.3 (C_{TBS}/C/Pr), 17.3 (C_{TBS}/C/Pr), 17.1 (C_{TBS}/C/Pr), 16.9 (C_{TBS}/C/Pr), 16.7 (C_{TBS}/C/Pr), 12.8 (2C, C/Pr)^{*}, 12.7 (2C, C/Pr)^{*}, 12.3 (2C, C/Pr)^{*}, 12.2 (2C, C/Pr)^{*}, -4.7 ((CH₃)_{TBS})^{*}, -5.0 ((CH₃)_{TBS})^{*} ppm.

IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 2946.4 (w), 2867.8 (w), 1710.6 (m), 1645.2 (s), 1559.5 (s), 1504.6 (w), 1464.3 (m), 1388.2 (w), 1273.7 (m), 1249.4 (m), 1219.0 (m), 1169.7 (m), 1129.6 (s), 1096.1 (w), 1061.7 (s), 1038.0 (s), 1004.6 (s), 946.4 (m), 883.7 (m), 863.3 (s), 832.1 (s), 811.6 (m), 779.6 (s), 693.1 (s) cm⁻¹.

HRMS (ESI⁺): *m/z* berechnet für [C₃₀H₅₈N₄O₉Si₃]⁺ [M + H]⁺: 702.3501, gefunden: 702.3448.

g⁴C (132)

Präbiotische Synthese:

Nukleosid **130** (0.25 mg, 0.76 μmol , 1 eq) wurde mit NaNO_2 (1.44 mg, 20.8 μmol , 12.5 eq) in Phosphorsäure (5 %ig, 150 μL) gemäß allgemeiner Verfahrensweise 3 umgesetzt. Das nitrosylierte Zwischenprodukt wurde ohne weitere Aufreinigung mit L-Glycin **82** (0.68 mg, 9.07 μmol , 12 eq) in Borat-Puffer (30 mM, 1.00 mL) gemäß allgemeiner Verfahrensweise 4 umgesetzt. Nach einer Stunde wurde eine Probe (25 μL) entnommen und mit H_2O auf 1.00 mL verdünnt. Die Probe wurde mittels LC-MS analysiert.

Synthetische Referenzverbindung:

138 (390 mg, 556 μmol , 1.0 eq) wurde in absolutem DCM (1.50 mL) gelöst. HF/NEt_3 (409 μL , 3.34 mmol, 6.0 eq) wurde zugegeben und die Reaktion über Nacht bei rt gerührt. Die Reaktion wurde mit Methoxytrimethylsilan (1.00 mL, 7.25 mmol, 13.0 eq) abgestoppt und für weitere 30 min gerührt. Das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt wurde aus H_2O umkristallisiert, um das Produkt **132** als weißen Schaum (22.0 mg, 64.0 μmol , Ausbeute: 12 %) zu isolieren.

¹H-NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 9.74 (bs, 1H, NH), 8.21 (d, J = 7.4 Hz, 1H, HC6), 6.51 (s, 1H, NH), 5.77 (d, J = 3.3 Hz, 1H), 5.46 (d, J = 4.7 Hz, 1H, HC5), 5.13 (d, J = 5.3 Hz, 1H, OH), 5.06 (bs, 1H, OH), 3.98-3.94 (m, 2H, HC2', HC3'), 3.87-3.87 (m, 1H, HC4'), 3.70 (dt, J = 12.3, 3.9 Hz, 1H, HC5'^a), 3.57 (dt, J = 12.4, 4.0 Hz, 1H, HC5'^b), 3.41 (s, 3H, CH₂) ppm.

¹³C-NMR (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 171.4 (COOH), 162.2 (C4), 153.9 (C(NH)₂), 153.7 (C2), 143.9 (C6), 94.6 (C5), 89.9 (C1'), 84.2 (C4'), 74.4 (C2'), 68.9 (C3'), 60.1 (C5'), 41.5 (CH₂) ppm.

IR (cm^{-1}): $\tilde{\nu}$ = 3334.8 (w), 3198.2 (w), 3097.0 (w), 2944.1 (w), 1702.5 (s), 1653.2 (s), 1608.9 (m), 1571.2 (s), 1530.6 (m), 1468.8 (s), 1371.8 (m), 1307.1 (m), 1252.7 (s), 1219.3 (m), 1172.2 (w), 1136.0 (m), 1106.9 (m), 1086.1 (m), 1059.1 (s), 1035.2 (s), 965.4 (m), 905.5 (m), 841.4 (m), 805.1 (s), 791.6 (s), 752.5 (m), 723.4 (m), 696.2 (m), 667.7 (m) cm^{-1} .

HRMS (ESI⁺): m/z berechnet für $[\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{N}_4\text{O}_8]^+$ $[M + H]^+$: 345.1041, gefunden: 345.1040.

5.4. Experimentelle Durchführung der Präbiotischen Phosphorylierung

Massenspektrometrie (LC-MS, HR-ESI)

Die Analyse der präbiotischen Experimente erfolgte mit Hilfe von LC-ESI-MS. Die Flussrate betrug dabei 0.20 mL/min. Die Analysen der Nukleotide erfolgten an einer YMC-Triart C₁₈ Säule. Die Säulentemperatur wurde bei 40°C gehalten. Puffer A (10 mM NH₄HCO₃ und 5 mM Dibutylamin in H₂O (pH 9.1)) und Puffer B (ACN) dienen als Eluenten für die Messungen. Für die Analyse der Proben wurde folgender Gradient gewählt: 0 → 10 min, 0% → 20%; 10 → 20 min, 20 → 20% Puffer B.

Synthese von Struvit: MgNH₄PO₄ x 6H₂O

Die Synthese wurde analog zu einer Synthese von *Van'thof et al.* durchgeführt.^[230]

Eine Lösung von (NH₄)₂PO₄ (50 mL, 1 M, 50 mmol) wurde zu einer Lösung aus MgCl₂ (50 mL, 1M, 50 mmol) gegeben. Die Mischung wurde für 15 min bei rt gerührt. Der Feststoff wurde abfiltriert und mit Wasser gewaschen um das Produkt als weißen Feststoff zu erhalten (8.1 g). Das Mineral wurde durch XRD-Messungen analysiert, um die Entstehung des korrekten Produkts nachzuweisen (s. Abbildung 42).

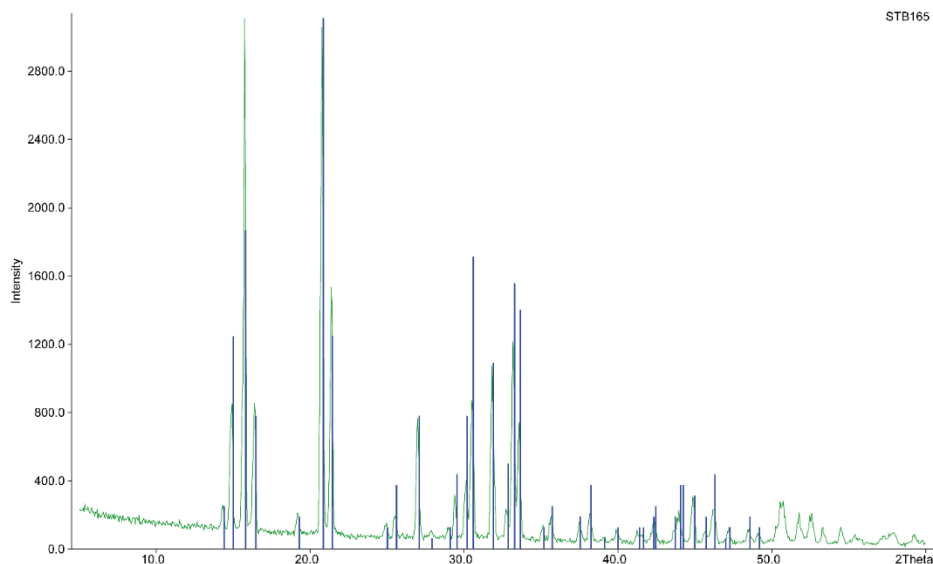


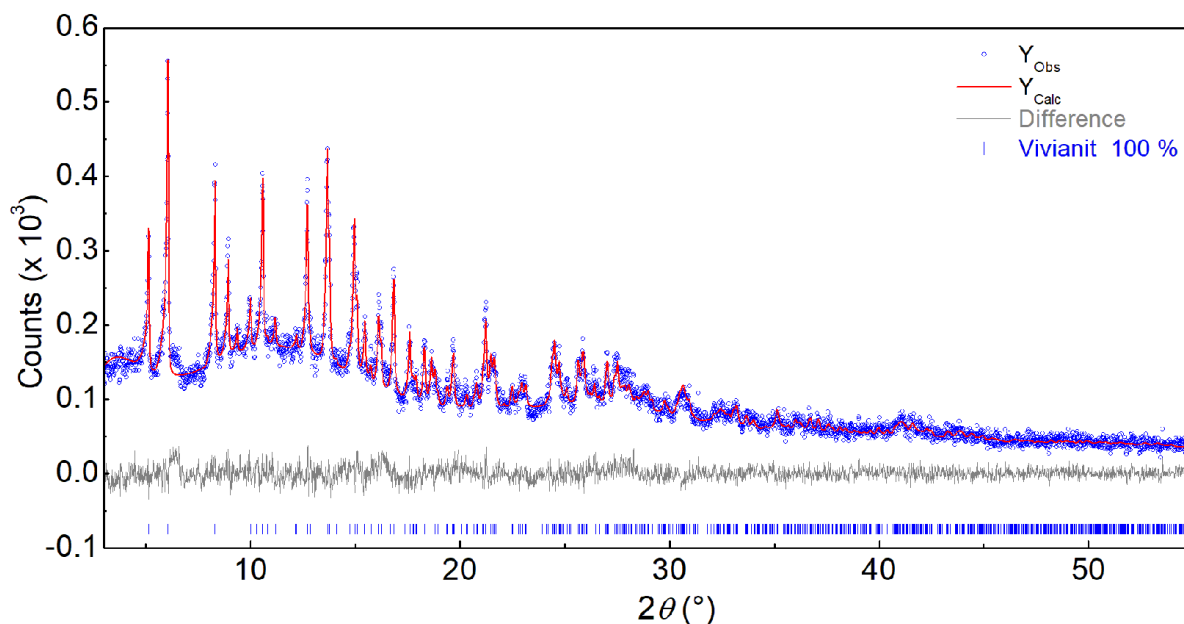
Abbildung 42: XRD-Messung von synthetischem Struvit (grün) und Vergleich mit Datenbankwerten (blau).

Synthese von Vivianit: Fe₃(PO₄)₂ x 8H₂O

Die Synthese wurde analog zu einer Synthese von *Guo et al.* durchgeführt.^[224]

5. Methoden

Alle verwendeten Lösungen wurden vorab mit Argon entgast. Eine Lösung von FeSO_4 (5.23g in 100 mL) wurde zu einer Lösung aus PVP (40.0 mg in 400 mL) gegeben. Die Mischung wurde für 20 min bei rt inkubiert. Daraufhin wurde eine Lösung aus Na_3PO_4 (3.05 g in 100 mL) zum Reaktionsgemisch gegeben. Nach 48 h wurde der entstandene Feststoff unter Schutzgas abfiltriert und mit Wasser gewaschen, um einen grünlichen Feststoff zu erhalten. Das Mineral wurde durch XRD-Messungen analysiert, um die Entstehung des korrekten Produkts nachzuweisen (s. Abbildung 42).



Synthese der Nukleoside

Die Reaktionen wurden unter Argon-Atmosphäre durchgeführt. Alle Lösungsmittel wurden vor Benutzung 1 h mit Argon entgast.

Eine Lösung des Ribose-Isoxazols **146a/b** als 3:1 Mischung (25.9 mg, 0.10 mmol, 1 eq.) in 75 mM Na_2CO_3 (0.5 mL) wurde zu einer Mischung aus Mineral (1 eq.), DTT (23.1 mg, 0.15 mmol, 1.5 eq.), und Pyrit (0.5 eq., nur bei Struvit) in einem 15 mL Falcon-Gefäß gegeben. Das Gefäß wurde durch ein PTFE Band verschlossen und bei 100 °C in einem Eppendorf ThermoMixer® geschüttelt. Nach 4 h wurde das Gemisch auf rt abgekühlt und eine Probe (10 μL) mit H_2O auf 1 mL verdünnt. Die verdünnte Probe wurde mittels LC-MS nach der oben beschriebenen Methode analysiert.

Protokoll Struvit: Struvit (24.0 mg, 0.10 mmol, 1 eq), zusätzliche Zugabe von Pyrit (6.00 mg, 0.05 mmol, 0.5 eq) als Eisenquelle.

Protokoll Vivianit: Vivianit (50.1 mg, 0.1 mmol, 1 eq).

Synthese der Nukleotide

Cytidin **5** (24.3 mg, 0.10 mmol, 1 eq) in wurde in 75 mM Na₂CO₃ (0.5 mL) gelöst und Oxalsäure **30** (27 mg, 0,30 mmol, 3 eq), DTT (23.1 mg, 0.15 mmol, 1.5 eq.), Harnstoff **45** (240 mg, 4 mmol, 40 eq.) sowie das Mineral (0.1 mmol, 1 eq) zugegeben. Die Mischung wurde auf 65°C erhitzt, bis **32** gelöst war anschließend eine Probe (25 µL) in ein 2 mL Eppendorf-Gefäß überführt. Die Probe wurde für 20 h bei 85°C zur Trockene in einem Eppendorf ThermoMixer® eingedampft. Die getrocknete Probe wurde in H₂O (1 mL) aufgenommen und mittels LC-MS nach der oben beschriebenen Methode analysiert.

Protokoll Struvit: Struvit (24.0 mg, 0.10 mmol, 1 eq), zusätzliche Zugabe von Pyrit (6.00 mg, 0.05 mmol, 0.5 eq) als Eisenquelle.

Protokoll Vivianit: Vivianit (50.1 mg, 0.10 mmol, 1 eq).

Durchführung der Eintopfreaktion

Die oben beschriebenen Protokolle zur Synthese der Nukleoside und Nukleotide wurden ohne weitere Aufreinigung kombiniert. Struvit bzw. Vivianit wurden als Mineralien verwendet, DTT (23.1 mg, 0.15 mmol, 1.5 eq.) als Thiol und Pyrit Eisenquelle (nur bei Struvit). Nach der Nukleosid-Bildung wurde Harnstoff **45** (240 mg, 4 mmol, 40 eq.) und Oxalsäure **30** (0.27mg, 0.30 mmol, 3.0 eq.) zugegeben. Die Mischung wurde ebenfalls auf 65°C erhitzt, bis der **32** gelöst war anschließend eine Probe (25 µL) in ein 2 mL Eppendorf-Gefäß überführt. Die Probe wurde für 20 h bei 85°C zur Trockene in einem Eppendorf ThermoMixer® eingedampft. Die getrocknete Probe wurde in H₂O (1 mL) aufgenommen und mittels LC-MS nach der oben beschriebenen Methode analysiert.

Protokoll Struvit: Struvit (24.0 mg, 0.10 mmol, 1 eq), zusätzliche Zugabe von Pyrit (6.00 mg, 0.05 mmol, 0.5 eq) als Eisenquelle.

Protokoll Vivianit: Vivianit (50.1 mg, 0.10 mmol, 1 eq).

5.5. Experimentelle Durchführung der Hochdruckexperimente

Die Hochdruck-Experimente in diesem Kapitel wurden in Kooperation mit *Sebastian Vogel* aus dem Arbeitskreis *Schnick* an der *Ludwig-Maximilians-Universität* durchgeführt.

Chemikalien

2',3'-cyclisches Cytidinmonophosphat **17** wurde als Natriumsalz von *Sigma-Aldrich* bezogen und wurde für den Großteil der Experimente ohne weitere Aufreinigung verwendet.

Ionenaustausch

Der Austausch des Natrium-Ions erfolgte mit Dowex 50 W X 8 von *Fluka*. Hierfür wurde das Ionentauschmaterial mit Wasser gespült und daraufhin in einer wässrigen Lösung des cyclischen Phosphats bei Raumtemperatur gerührt. Nach 10 min wurde das Ionentauschmaterial abfiltriert und das freie Monophosphat durch Gefriertrocknung des Lösungsmittels erhalten.

Multianvil-Hochdruckpresse

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Hochdruck-Experimente wurden an zwei annähernd baugleichen *Multianvil*-Hochdruckpressen der Firma *Voggenreiter* durchgeführt (vgl. Abbildung 2.2; Presse 1, Baujahr 1999 und Presse 2, Baujahr 2007).



Abbildung 43: Abbildung einer verwendeten *Multianvil*-Hochdruckpressen der Firma *Voggenreiter*.^[231]

Mit diesen Hochdruckpressen können bei einer maximalen Presskraft von 1000 t bei einem Öldruck von 700 bar Drücke von bis zu 18 GPa im Probeninneren generiert werden. Soweit nicht anders beschrieben betrug der verwendete Druck in dieser Arbeit 7 GPa. Die Temperatur der Reaktionen wird über eine elektrische Widerstandsheizung mit einer maximalen Leistung von 3000 W eingestellt. Der genaue Zusammenhang zwischen Öldruck und dem Probendruck sowie der prozentualen Heizleistung und der Proben temperatur sind aus vorangegangenen Kalibrierungen bekannt. Eine ausführliche Darstellung des Aufbaus der Hochdruckpressen wurde von Huppertz angefertigt.^[232, 233] Um einen annäherungsweise hydrostatischen Druck

im Probeninneren zu erzeugen, wird ein modifiziertes Walker-Modul genutzt.^[234] Im zylindrischen Inneren des Moduls wird der uniaxiale Druck des Druckbolzens auf die drei Achsen eines Würfels und daraufhin auf die vier Achsen eines Oktaeders verteilt. Um eine quasi-hydrostatische Druckverteilung im Inneren des Probenraums zu generieren, ist das Oktaeder unter Hochdruckbedingungen plastisch verformbar. Der Aufbau des Oktaeders, des Würfels und des modifizierten Walker-Moduls ist im Weiteren näher beschrieben.

Das Oktaeder

Je nach gewünschtem Druck des Experiments und dem benötigten Probenvolumen kann zwischen vier verschiedenen großen *Probenassemblies* ausgewählt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ausschließlich ein Assembly mit einer Oktaederkantenlänge von 18 mm verwendet. Hiermit können Probenvolumina von ca. 35mm³ bei einem maximalen Synthesedruck von 8 GPa zur Reaktion gebracht werden.

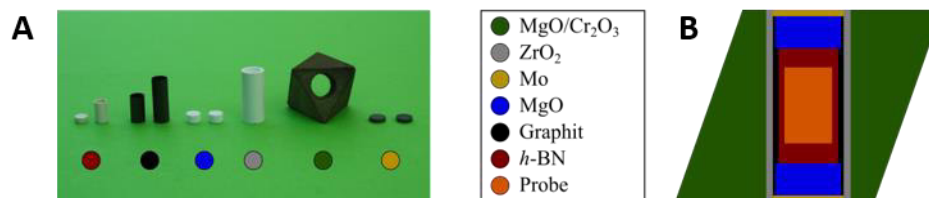


Abbildung 44: Aufbau eines Oktaeders. A: Die Einzelteile eines Oktaeders mit Farbcode. B: Schematischer Querschnitt durch ein fertig präpariertes Oktaeder.^[231]

Um einen geeigneten Probenraum zu schaffen, wird das Oktaeder (MgO, 5 % Cr₂O₃-Dotierung, Kantenlänge 18 mm, *Ceramic Substrates & Components*) mittig durchbohrt und eine Hülse aus ZrO₂ (*Cesima Ceramics*) eingeklebt (Kraftkleber, Pattex Classic, *Henkel*; dieser Klebstoff wurde für sämtliche Klebearbeiten verwendet), um die Probe thermisch zu isolieren. Es werden zwei ineinander gesteckte Graphit-Hülsen (*Schunk Kohlenstofftechnik GmbH*) verschiedener Länge eingesetzt, um die Probe mit einem möglichst geringen Temperaturgradienten zu erhitzen. Die innen-liegende, kürzere Hülse wird dabei von einer MgO-Scheibe (*Cesima Ceramics*) in Position gehalten. Die elektrische Kontaktierung entsteht über eine Mo-Scheibe, welche in direktem Kontakt zur äußeren Graphit-Hülse ist und bündig mit der durchbohrten Oktaederfläche abschließt. Das Eduktgemisch wird in einem Tiegel aus h-BN (*HeBoSint R S100, Henze*) überführt und mit einem Stahlstempel verdichtet. Der Tiegel wird in das vorbereitete Oktaeder eingesetzt und mit einem Deckel aus h-BN verschlossen. Daraufhin wird je eine zweite MgO- und Mo-Scheibe eingesetzt

Der Würfel

Der Würfel ist aus acht kleineren WC-Würfeln (gesintertes Wolframcarbid, Kantenlänge 32 mm, 6 % Co-Dotierung, *Hawedia*) zusammengesetzt. Jeder dieser Würfel besitzt abgeschliffene Ecken (Kantenlänge 11mm).

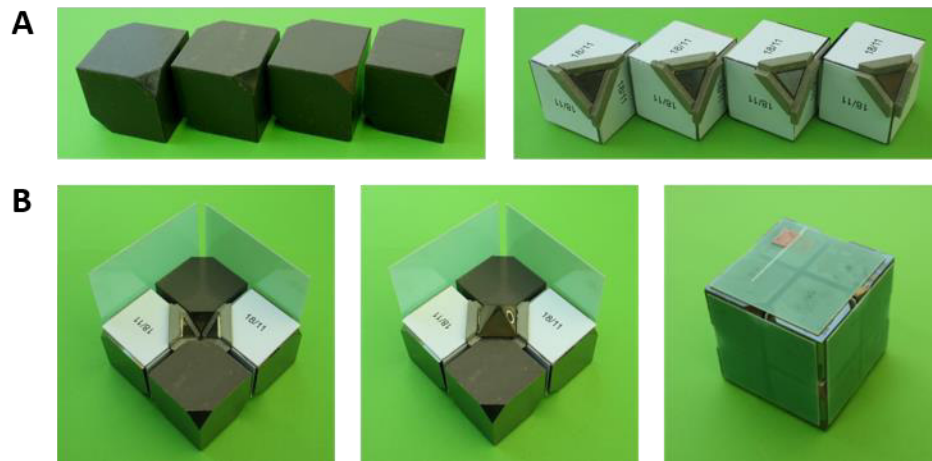


Abbildung 45: Schrittweiser Aufbau des Würfels. A: WC-Würfel mit PTFE-Folie beklebt bzw. mit Dichtungen und Karton präparierte WC-Würfel. B: Zusammenführen des Oktaeders mit den einzelnen beklebten Würfeln und den Epoxidharzplatten inklusive Kupferblech zum fertig zusammengesetzten Würfel.^[231]

Um die Würfel untereinander elektrisch zu isolieren, werden jeweils vier WC-Würfel auf drei Seiten mit PTFE-Folie (einseitig selbstklebend, 35×0.13mm, *Vitaflon Technische Produkte GmbH*) beklebt. Um einen stabilen Druck im Innenraum des Oktaeders zu gewährleisten, werden um je eine abgeschliffene Ecke der vier verbleibenden Würfel Dichtungen aus Pyrophyllit (*Ceramic Substrates & Components*) angebracht. Hierbei werden je sechs kurze und sechs lange Dichtungen verwendet und so kombiniert, dass das später eingesetzte Oktaeder vollständig umschlossen wird. Hinter den Dichtungen werden zudem Kartonschablonen (Bristolkarton, 369 g/m²) aufgeklebt, um die Dichtungen bei der Kompression in Position zu halten. Die WC-Würfel werden durch Platten aus glasfaserverstärkten Epoxidharz (Typ 2372.4, *Menzel & Seyfried*) zusammengehalten. Um das Oktaeder über die WC-Würfel kontaktieren zu können, wird die Bodenplatte so eingeschnitten, dass ein eingeklemmtes dünnes Cu-Blech einen WC-Würfel der unteren Basis berührt. Beim Einsetzen des Oktaeders ist zu beachten, dass die Mo-Scheibe des Oktaeders auf diesem leitenden WC-Würfel liegt. Die verbleibenden WC-Würfel werden komplementär zur unteren Basis auf das Oktaeder aufgesetzt, sodass die aufgeklebten Dichtungen es vollständig umschließen. Die obere Epoxidharzplatte wird entsprechend zur Bodenplatte mit einem Stück Cu-Blech präpariert, sodass eine Kontaktierung des Oktaeders entlang der Raumdiagonale des Würfels verläuft.

Das modifizierte Walker-Modul

Das *Walker-Modul*, das im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde, besteht aus einem Ring aus hartem Stahl, welcher aus Sicherheitsgründen von einem zweiten dünneren Ring aus weichem Stahl ummantelt ist. Die Bodenplatte des Moduls besteht aus einer Stahlplatte, welche auf eine zweite Platte einer Aluminium-Legierung (AMP8000, *Alimex*) angebracht ist.

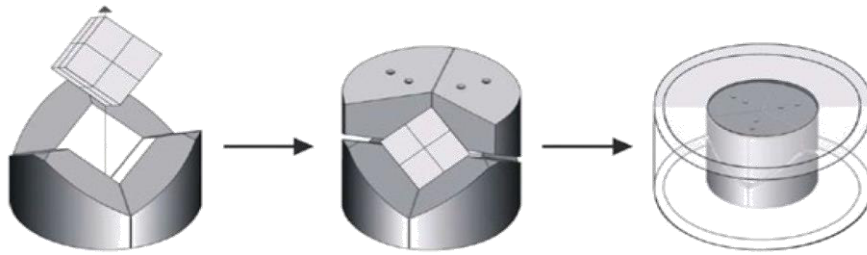


Abbildung 46: Schrittweises Einsetzen der Stahlkeile und des Würfels in das modifizierte Walker-Modul.^[231]

Die Kühlung der Reaktion erfolgt über eine spiralförmige Kühlwasserleitung, die im Inneren der Boden- und Deckelplatte verläuft. Boden- und Deckelplatte bilden zusammen mit dem Stahlmantel einen zylindrischen Hohlraum. Dieser wird mit einer PET-Folie ausgelegt, wobei PTFE-Spray als Haftvermittler verwendet wird. Dies stellt eine reibungsarme Bewegung der inneren Bauteile während der Kompression sicher und dient darüber hinaus der elektrischen Isolation. Der fertig präparierte Würfel wird im Modulinneren mit Hilfe von sechs Stahlkeilen (*Rockwellhäre 62*) entlang seiner Raumdiagonale ausgerichtet. Die runden Flächen der Stahlkeile sind ebenfalls mit einer PET-Folie abgedeckt. Eine Deckelplatte, die analog zur Bodenplatte aufgebaut ist, vervollständigt das Modul. Boden- und Deckelplatte stehen jeweils in elektrischem Kontakt mit den drei unteren bzw. oberen Stahlkeilen. Der Stromfluss der elektrischen Widerstandsheizung verläuft demnach entlang der Grenzflächen von Stahl | Cu | WC | Mo | Graphit | Mo | WC | Cu | Stahl. Das Modul wird unter dem Druckbolzen platziert, an das Kühlwassersystem angeschlossen und die Boden- und Deckelplatte mit dem Steuerelement der Widerstandsheizung verbunden.

Massenspektrometrie (LC-MS, HR-ESI)

Die Analyse der Hochdruck-Experimente erfolgte mit Hilfe von LC-ESI-MS. Die Messungen wurden nach einem abgeänderten, unveröffentlichten Gradienten-System von *Stefanie Kellner* durchgeführt.^[235] Die Flussrate betrug dabei 0.15 mL/min und die Messungen erfolgten an einer Phenomenex Synergi™ 2.5µm Fusion-RP 100 Å C₁₈ Säule. Die Säulentemperatur wurde bei 35°C gehalten. Puffer A (10 mM NH₄OAc in H₂O) und Puffer B (ACN) dienten als Eluenten für die Messungen.

Für Analyse der Proben wurde folgender Gradient gewählt

0 → 10 min, 0 % → 10 % HPLC/MS Puffer B; 10 → 16 min, 10 % → 50 % HPLC/MS Puffer B; 16 → 18 min, 0 % HPLC/MS Puffer B; 18 → 24 min, 0 % HPLC/MS Puffer B.

Durchführung der Hochdruck-Experimente

Für die Durchführung der Hochdruck-Experimente wurde das entsprechende Natriumsalz des cyclischen Monophosphats entweder ohne vorherige Behandlung verwendet oder nach

5. Methoden

vorangehendem Ionentausch umgesetzt. Je nach Versuch werden die Edukte in der Glovebox oder an Luft eingewogen und in einem Achatmörser mit eventuell zugesetzten Additiven vermengt und vermahlen. Die Hochdruck-Experimente können bei Raumtemperatur oder unter Erhitzen durchgeführt werden. Die verschiedenen Phasen eines Hochdruck-Experiments sind in Abbildung 47 dargestellt.

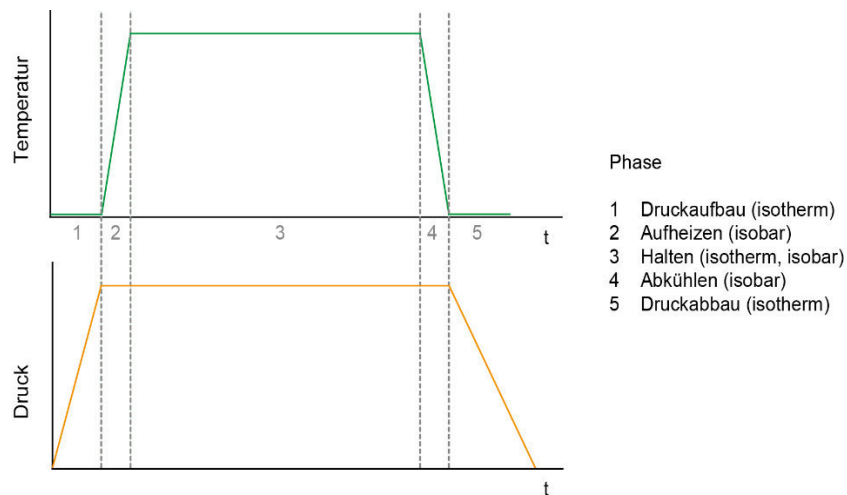


Abbildung 47: Die verschiedenen Abschnitte eines Hochdruck-Experiments.

Das Pressprogramm wird in fünf Phasen unterteilt. Im ersten Abschnitt wird der Druck aufgebaut, in der dritten Phase wird der Druck konstant gehalten wohingegen dieser im fünften Abschnitt wieder abgebaut wird. Soll das Eduktgemenge erhitzt werden, erfolgt das Aufheizen unter isobaren Bedingungen in Phase 2 wobei die Temperatur ebenfalls isobar in Abschnitt 4 wieder auf Raumtemperatur abgekühlt wird. Die verschiedenen Bedingungen der durchgeführten Hochdruck-Experimente sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4: Zusammenfassung der Bedingungen der Hochdruck-Experimente.

Edukt 2'3'-cAMP-	Additiv	Druck [GPa]	Temperatur	Heizleistung	Heizzeit	Programm [min]
Na-Salz		7	20°C	0 %		60/480/60
Na-Salz	Montmorillonit 1 eq.	7	20°C	0 %		60/480/60
Na-Salz	CaO 1 eq.	7	20°C	0 %		60/480/60
Na-Salz	MgCl ₂ 0.5 eq.	7	20°C	0 %		60/480/60
Na-Salz		7-4-7-4-7-4-7	20°C	0 %		manuell
Na-Salz		7-5-7-5-7	20°C	0 %		manuell
Na-Salz		7	110°C	4 %	6 h	60/360/60
Na-Salz	Imidazol 0.5 eq.	7	110°C	4 %	6 h	60/360/60
Na-Salz	Borax 0.5 eq.	7	110°C	4 %	8 h	60/480/60
Na-Salz		7	90°C	3 %	4/2 min	verschieden
Na-Salz		7	75°C	2 %	1/30 min	2/1/30/2
Na-Salz		7	90°C	3 %	1/30 min	1/30/1
Freies cAMP	Dowex	7	75°C	2 %	1/30 min	2/1/30/2
Ca-Salz	Dowex, CaCl ₂	7	90°C	2 %	1/30 min	1/30/1

6. Literatur

- [1] A. I. Oparin, The origin of life, *Courier Corporation*, **2003**.
- [2] L. Pasteur, Nouvelles expériences relatives aux générations dites spontanées, *Mallet-Bachelier*, **1860**.
- [3] R. Virchow, Cellular-pathologie, *Virchows Archiv* **1855**, *8*, 3-39.
- [4] C. Darwin, On the Origin of Species (1988 Nachdruck), *Harvard University Press, Cambridge, MA*, **1859**.
- [5] M. C. Weiss, F. L. Sousa, N. Mrnjavac, S. Neukirchen, M. Roettger, S. Nelson-Sathi, W. F. Martin, The physiology and habitat of the last universal common ancestor, *Nat. Microbiol.* **2016**, *1*, 16116.
- [6] P. Schulle, How simple could life be?, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 10998-11002.
- [7] H. Föllmann, C. Brownson, Darwin's warm little pond revisited: from molecules to the origin of life, *Naturwissenschaften* **2009**, *96*, 1265-1292.
- [8] C. De Duve, Vital dust: life as a cosmic imperative, *Basic Books*, **1995**.
- [9] F. H. Crick, The origin of the genetic code, *J. Mol. Biol.* **1968**, *38*, 367-379.
- [10] L. E. Orgel, Evolution of the genetic apparatus, *J. Mol. Biol.* **1968**, *38*, 381-393.
- [11] K. Kruger, P. J. Grabowski, A. J. Zaugg, J. Sands, D. E. Gottschling, T. R. Cech, Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of Tetrahymena, *Cell* **1982**, *31*, 147-157.
- [12] E. A. Doherty, J. A. Doudna, Ribozyme structures and mechanisms, *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 597-615.
- [13] W. Gilbert, Origin of life: The RNA world, *Nature* **1986**, *319*, 618.
- [14] O. Leslie E, Prebiotic chemistry and the origin of the RNA world, *Crit. Rev. Biochem. Mol.* **2004**, *39*, 99-123.
- [15] D. M. Fialho, K. C. Clarke, M. K. Moore, G. B. Schuster, R. Krishnamurthy, N. V. Hud, Glycosylation of a model proto-RNA nucleobase with non-ribose sugars: implications for the prebiotic synthesis of nucleosides, *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16*, 1263-1271.
- [16] L. E. Orgel, The origin of life—a review of facts and speculations, *Trends Biochem. Sci.* **1998**, *23*, 491-495.
- [17] Y. Ura, J. M. Beierle, L. J. Leman, L. E. Orgel, M. R. Ghadiri, Self-assembling sequence-adaptive peptide nucleic acids, *Science* **2009**, *325*, 73-77.
- [18] J. M. Beierle, Y. Ura, M. R. Ghadiri, L. J. Leman, Templated Self-Assembly of Dynamic Peptide Nucleic Acids, *Biochem.* **2017**, *57*, 160-172.
- [19] K.-U. Schöning, P. Scholz, S. Guntha, X. Wu, R. Krishnamurthy, A. Eschenmoser, Chemical etiology of nucleic acid structure: the α -threofuranosyl-(3'→ 2') oligonucleotide system, *Science* **2000**, *290*, 1347-1351.
- [20] K. U. Schöning, P. Scholz, X. Wu, S. Guntha, G. Delgado, R. Krishnamurthy, A. Eschenmoser, The α -L-Threofuranosyl-(3'→ 2')-oligonucleotide System ('TNA'): Synthesis and Pairing Properties, *Helv. Chim. Acta* **2002**, *85*, 4111-4153.
- [21] L. Zhang, A. Peritz, E. Meggers, A simple glycol nucleic acid, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 4174-4175.
- [22] R. Krishnamurthy, S. Pitsch, M. Minton, C. Miculka, N. Windhab, A. Eschenmoser, Pyranosyl-RNA: base pairing between homochiral oligonucleotide strands of opposite sense of chirality, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, *35*, 1537-1541.
- [23] S. Pitsch, S. Wendeborn, R. Krishnamurthy, A. Holzner, M. Minton, M. Bolli, C. Miculka, N. Windhab, R. Micura, M. Stanek, Pentopyranosyl Oligonucleotide Systems. 9th Communication: The β -d-Ribopyranosyl-(4'→ 2')-oligonucleotide System ('Pyranosyl-RNA'): Synthesis and Resumé of Base-Pairing Properties, *Helv. Chim. Acta* **2003**, *86*, 4270-4363.
- [24] H. Yu, S. Zhang, J. C. Chaput, Darwinian evolution of an alternative genetic system provides support for TNA as an RNA progenitor, *Nat. Chem.* **2012**, *4*, 183.

- [25] H. J. Kim, Y. Furukawa, T. Kakegawa, A. Bitá, R. Scorei, S. A. Benner, Evaporite Borate-Containing Mineral Ensembles Make Phosphate Available and Regiospecifically Phosphorylate Ribonucleosides: Borate as a Multifaceted Problem Solver in Prebiotic Chemistry, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 15816-15820.
- [26] L. Li, N. Prywes, C. P. Tam, D. K. O'Flaherty, V. S. Lelyveld, E. C. Izgu, A. Pal, J. W. Szostak, Enhanced nonenzymatic RNA copying with 2-aminoimidazole activated nucleotides, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 1810-1813.
- [27] R. M. Hazen, N. Boctor, J. A. Brandes, G. D. Cody, R. J. Hemley, A. Sharma, H. S. Yoder, High pressure and the origin of life, *J. Phys. Condens. Matter* **2002**, *14*, 11489-11494.
- [28] N. F. W. Ligterink, A. Coutens, V. Kofman, H. S. P. Müller, R. T. Garrod, H. Calcutt, S. F. Wampfler, J. K. Jørgensen, H. Linnartz, E. F. van Dishoeck, The ALMA-PILS survey: detection of CH₃NCO towards the low-mass protostar IRAS 16293–2422 and laboratory constraints on its formation, *Mon. Notices Royal Astron. Soc.* **2017**, *469*, 2219-2229.
- [29] R. Saladino, E. Carota, G. Botta, M. Kapralov, G. N. Timoshenko, A. Y. Rozanov, E. Krasavin, E. Di Mauro, Meteorite-catalyzed syntheses of nucleosides and of other prebiotic compounds from formamide under proton irradiation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, E2746-E2755.
- [30] S. Becker, C. Schneider, H. Okamura, A. Crisp, T. Amatov, M. Dejmek, T. Carell, Wet-dry cycles enable the parallel origin of canonical and non-canonical nucleosides by continuous synthesis, *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 163.
- [31] I. Daniel, P. Oger, R. Winter, Origins of life and biochemistry under high-pressure conditions, *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35*, 858-875.
- [32] L. Rotelli, J. M. Trigo-Rodríguez, C. E. Moyano-Cambero, E. Carota, L. Botta, E. Di Mauro, R. Saladino, The key role of meteorites in the formation of relevant prebiotic molecules in a formamide/water environment, *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 38888.
- [33] R. Saladino, C. Crestini, U. Ciambecchini, F. Ciciriello, G. Costanzo, E. Di Mauro, Synthesis and degradation of nucleobases and nucleic acids by formamide in the presence of montmorillonites, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 1558-1566.
- [34] D. Niether, D. Afanasenkau, J. K. Dhont, S. Wiegand, Accumulation of formamide in hydrothermal pores to form prebiotic nucleobases, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, 4272-4277.
- [35] M. Ferus, F. Pietrucci, A. M. Saitta, A. Knížek, P. Kubelík, O. Ivanek, V. Shestivska, S. Civiš, Formation of nucleobases in a Miller–Urey reducing atmosphere, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, 4306-4311.
- [36] M. P. Robertson, S. L. Miller, An efficient prebiotic synthesis of cytosine and uracil, *Nature* **1995**, *375*, 772.
- [37] J. P. Ferris, R. A. Sanchez, L. E. Orgel, Studies in prebiotic synthesis: III. Synthesis of pyrimidines from cyanoacetylene and cyanate, *J. Mol. Biol.* **1968**, *33*, 693-704.
- [38] L. E. Orgel, Is cyanoacetylene prebiotic?, *Orig. Life Evol. Biospheres* **2002**, *32*, 279-281.
- [39] C. Menor-Salván, D. M. Ruiz-Bermejo, M. I. Guzmán, S. Osuna-Esteban, S. Veintemillas-Verdaguer, Synthesis of pyrimidines and triazines in ice: Implications for the prebiotic chemistry of nucleobases, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 4411-4418.
- [40] H. Okamura, S. Becker, N. Tiede, S. Wiedemann, J. Feldmann, T. Carell, A one-pot, water compatible synthesis of pyrimidine nucleobases under plausible prebiotic conditions, *Chem. Commun.* **2019**, *55*, 1939-1942.
- [41] J. Oró, Synthesis of adenine from ammonium cyanide, *Biochem. Biophys. Res. Com.* **1960**, *2*, 407-412.
- [42] J. Oró, Mechanism of synthesis of adenine from hydrogen cyanide under possible primitive Earth conditions, *Nature* **1961**, *191*, 1193.
- [43] B. Basile, A. Lazcano, J. Oro, Prebiotic syntheses of purines and pyrimidines, *Adv. Space Res.* **1984**, *4*, 125-131.

- [44] H. L. Barks, R. Buckley, G. A. Grieves, E. Di Mauro, N. V. Hud, T. M. Orlando, Guanine, Adenine, and Hypoxanthine Production in UV-Irradiated Formamide Solutions: Relaxation of the Requirements for Prebiotic Purine Nucleobase Formation, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 1240-1243.
- [45] J. S. Hudson, J. F. Eberle, R. H. Vachhani, L. C. Rogers, J. H. Wade, R. Krishnamurthy, G. Springsteen, A unified mechanism for abiotic adenine and purine synthesis in formamide, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 5134-5137.
- [46] C. Menor-Salván, M. R. Marín-Yaseli, A new route for the prebiotic synthesis of nucleobases and hydantoins in water/ice solutions involving the photochemistry of acetylene, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 6488-6497.
- [47] A. Butlerow, Bildung einer zuckerartigen Substanz durch Synthese, *Liebigs Ann. Chem.* **1861**, *120*, 295-298.
- [48] R. Breslow, On the mechanism of the formose reaction, *Tetrahedron Lett.* **1959**, *1*, 22-26.
- [49] A. H. Weiss, T. John, Homogeneously catalyzed formaldehyde condensation to carbohydrates: III. Concentration instabilities, nature of the catalyst, and mechanisms, *J. Catal.* **1974**, *32*, 216-229.
- [50] P. Karrer, E. v. Krauss, Zur Kenntnis der Formose, *Helv. Chim. Acta* **1931**, *14*, 820-831.
- [51] A. Kusin, Über die katalytische Wirkung von Monosen auf die Formaldehyd-Kondensation, III. Mitteil.: Die Zwischenprodukte der Reaktion, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1935**, *68*, 2169-2173.
- [52] J. Henrique Teles, J. P. Melder, K. Ebel, R. Schneider, E. Gehrler, W. Harder, S. Brode, D. Enders, K. Breuer, G. Raabe, The Chemistry of Stable Carbenes. Part 2. Benzoin-type condensations of formaldehyde catalyzed by stable carbenes, *Helv. Chim. Acta* **1996**, *79*, 61-83.
- [53] S. Cannizzaro, Ueber den der Benzoësäure entsprechenden Alkohol, *Liebigs Ann. Chem.* **1853**, *88*, 129-130.
- [54] Y. Furukawa, T. Kakegawa, Borate and the Origin of RNA: A Model for the Precursors to Life, *Elements* **2017**, *13*, 261-265.
- [55] R. Larralde, M. P. Robertson, S. L. Miller, Rates of decomposition of ribose and other sugars: implications for chemical evolution, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 8158-8160.
- [56] R. Shapiro, Prebiotic ribose synthesis: a critical analysis, *Orig. Life Evol. Biospheres* **1986**, *16*, 283-284.
- [57] R. Shapiro, Prebiotic ribose synthesis: a critical analysis, *Orig. Life Evol. Biospheres* **1988**, *18*, 71-85.
- [58] H.-J. Kim, A. Ricardo, H. I. Illangkoon, M. J. Kim, M. A. Carrigan, F. Frye, S. A. Benner, Synthesis of carbohydrates in mineral-guided prebiotic cycles, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 9457-9468.
- [59] A. Ricardo, M. Carrigan, A. Olcott, S. Benner, Borate minerals stabilize ribose, *Science* **2004**, *303*, 196-196.
- [60] M. A. Pasek, J. P. Dworkin, D. S. Lauretta, A radical pathway for organic phosphorylation during schreibersite corrosion with implications for the origin of life, *Geochim. Cosmochim. Acta* **2007**, *71*, 1721-1736.
- [61] S. Pallmann, J. Šteflová, M. Haas, S. Lamour, A. Henß, O. Trapp, Schreibersite: an effective catalyst in the formose reaction network, *New J. Phys.* **2018**, *20*, 055003.
- [62] D. Ritson, J. D. Sutherland, Prebiotic synthesis of simple sugars by photoredox systems chemistry, *Nat. Chem.* **2012**, *4*, 895.
- [63] E. Fischer, Reduction von säuren der Zuckergruppe, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1889**, *22*, 2204-2205.
- [64] A. S. Serianni, E. L. Clark, R. Barker, Carbon-13-enriched carbohydrates. Preparation of erythrose, threose, glyceraldehyde, and glycolaldehyde with ¹³C-enrichment in various carbon atoms, *Carbohydr. Res.* **1979**, *72*, 79-91.

- [65] W. D. Fuller, R. A. Sanchez, L. E. Orgel, Studies in prebiotic synthesis: VI. Synthesis of purine nucleosides, *J. Mol. Biol.* **1972**, *67*, 25-33.
- [66] R. A. Sanchez, L. E. Orgel, Studies in prebiotic synthesis: V. Synthesis and photoanomerization of pyrimidine nucleosides, *J. Mol. Biol.* **1970**, *47*, 531-543.
- [67] M. W. Powner, B. Gerland, J. D. Sutherland, Synthesis of activated pyrimidine ribonucleotides in prebiotically plausible conditions, *Nature* **2009**, *459*, 239-242.
- [68] R. Saladino, B. M. Bizzarri, L. Botta, J. Šponer, J. E. Šponer, T. Georgelin, M. Jaber, B. Rigaud, M. Kapralov, G. N. Timoshenko, Proton irradiation: a key to the challenge of N-glycosidic bond formation in a prebiotic context, *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 14709.
- [69] M. W. Powner, J. D. Sutherland, J. W. Szostak, Chemoselective multicomponent one-pot assembly of purine precursors in water, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 16677-16688.
- [70] S. Stairs, A. Nikmal, D.-K. Bučar, S.-L. Zheng, J. W. Szostak, M. W. Powner, Divergent prebiotic synthesis of pyrimidine and 8-oxo-purine ribonucleotides, *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 15270.
- [71] S. C. Kim, D. K. O'Flaherty, L. Zhou, V. S. Lelyveld, J. W. Szostak, Inosine, but none of the 8-oxo-purines, is a plausible component of a primordial version of RNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, 13318-13323.
- [72] S. Becker, I. Thoma, A. Deutsch, T. Gehrke, P. Mayer, H. Zipse, T. Carell, A high-yielding, strictly regioselective prebiotic purine nucleoside formation pathway, *Science* **2016**, *352*, 833-836.
- [73] H.-J. Kim, S. A. Benner, Prebiotic stereoselective synthesis of purine and noncanonical pyrimidine nucleotide from nucleobases and phosphorylated carbohydrates, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, 11315-11320.
- [74] R. Krishnamurthy, S. Guntha, A. Eschenmoser, Regioselective α -phosphorylation of aldoses in aqueous solution, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 2281-2285.
- [75] M. Akouche, M. Jaber, M.-C. Maurel, J.-F. Lambert, T. Georgelin, Phosphoribosyl Pyrophosphate: A Molecular Vestige of the Origin of Life on Minerals, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 7920-7923.
- [76] S. J. Roberts, R. Szabla, Z. R. Todd, S. Stairs, D.-K. Bučar, J. Šponer, D. D. Sasselov, M. W. Powner, Selective prebiotic conversion of pyrimidine and purine anhydronucleosides into Watson-Crick base-pairing arabino-furanosyl nucleosides in water, *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 4073.
- [77] I. Nam, J. K. Lee, H. G. Nam, R. N. Zare, Abiotic production of sugar phosphates and uridine ribonucleoside in aqueous microdroplets, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, 12396-12400.
- [78] I. Nam, H. G. Nam, R. N. Zare, Abiotic synthesis of purine and pyrimidine ribonucleosides in aqueous microdroplets, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, 36-40.
- [79] H.-J. Kim, J. Kim, A Prebiotic Synthesis of Canonical Pyrimidine and Purine Ribonucleotides, *Astrobiology* **2019**.
- [80] A. D. Keefe, S. L. Miller, Are polyphosphates or phosphate esters prebiotic reagents?, *J. Mol. Evol.* **1995**, *41*, 693-702.
- [81] M. A. Pasek, T. P. Kee, *Origins of Life: The Primal Self-Organization*, Springer, **2011**, 57-84.
- [82] R. Lohrmann, L. Orgel, Prebiotic synthesis: phosphorylation in aqueous solution, *Science* **1968**, *161*, 64-66.
- [83] G. Steinman, R. M. Lemmon, M. Calvin, Cyanamide: a possible key compound in chemical evolution, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1964**, *52*, 27-30.
- [84] C. Ponnampereuma, R. Mack, Nucleotide synthesis under possible primitive Earth conditions, *Science* **1965**, *148*, 1221-1223.
- [85] A. Beck, R. Lohrmann, L. Orgel, Phosphorylation with inorganic phosphates at moderate temperatures, *Science* **1967**, *157*, 952-952.

- [86] J. Rabinowitz, S. Chang, C. Ponnamperna, Phosphorylation on the primitive earth: Phosphorylation by way of inorganic phosphate as a potential prebiotic process, *Nature* **1968**, *218*, 442.
- [87] A. M. Schoffstall, E. M. Laing, Phosphorylation mechanisms in chemical evolution, *Orig. Life Evol. Biospheres* **1985**, *15*, 141-150.
- [88] A. M. Schoffstall, Prebiotic phosphorylation of nucleosides in formamide, *Origins of life* **1976**, *7*, 399-412.
- [89] C. Cheng, C. Fan, R. Wan, C. Tong, Z. Miao, J. Chen, Y. Zhao, Phosphorylation of adenosine with trimetaphosphate under simulated prebiotic conditions, *Orig. Life Evol. Biospheres* **2002**, *32*, 219-224.
- [90] R. Osterberg, L. Orgel, Polyphosphate and trimetaphosphate formation under potentially prebiotic conditions, *J. Mol. Evol.* **1972**, *1*, 241-248.
- [91] S. L. Miller, M. Parris, Synthesis of pyrophosphate under primitive earth conditions, *Nature* **1964**, *204*, 1248.
- [92] A. Beck, L. Orgel, The formation of condensed phosphate in aqueous solution, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1965**, *54*, 664.
- [93] A. D. Keefe, S. L. Miller, Potentially prebiotic syntheses of condensed phosphates, *Orig. Life Evol. Biospheres* **1996**, *26*, 15-25.
- [94] R. Lohrmann, L. Orgel, Urea-inorganic phosphate mixtures as prebiotic phosphorylating agents, *Science* **1971**, *171*, 490-494.
- [95] M. Bishop, R. Lohrmann, L. Orgel, Prebiotic phosphorylation of thymidine at 65 C in simulated desert conditions, *Nature* **1972**, *237*, 162.
- [96] R. Reimann, G. Zubay, Nucleoside phosphorylation: A feasible step in the prebiotic pathway to RNA, *Orig. Life Evol. Biospheres* **1999**, *29*, 229-247.
- [97] B. Burcar, M. Pasek, M. Gull, B. J. Cafferty, F. Velasco, N. V. Hud, C. Menor-Salván, Darwin's warm little pond: a one-pot reaction for prebiotic phosphorylation and the mobilization of phosphate from minerals in a urea-based solvent, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 13249-13253.
- [98] R. Österberg, L. Orgel, R. Lohrmann, Further studies of urea-catalyzed phosphorylation reactions, *J. Mol. Evol.* **1973**, *2*, 231-234.
- [99] A. M. Schoffstall, R. J. Barto, D. L. Ramos, Nucleoside and deoxynucleoside phosphorylation in formamide solutions, *Origins of life* **1982**, *12*, 143-151.
- [100] E. Etaix, L. Orgel, Phosphorylation of Nucleosides in Aqueous-Solution Using Trimetaphosphate-Formation of Nucleoside Triphosphates, *J. Carbohydr., Nucleosides, Nucleotides* **1978**, *5*, 91-110.
- [101] A. Schwartz, Specific phosphorylation of the 2'-and 3'-positions in ribonucleosides, *Chem. Commun.* **1969**, 1393a-1393a.
- [102] C. Pierre, A. Caruso, M.-M. Blanc-Valleron, J. M. Rouchy, F. Orszag-Sperber, Reconstruction of the paleoenvironmental changes around the Miocene–Pliocene boundary along a West–East transect across the Mediterranean, *Sediment. Geol.* **2006**, *188*, 319-340.
- [103] M. A. Pasek, Rethinking early Earth phosphorus geochemistry, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 853-858.
- [104] A. Gulick, Phosphorus as a factor in the origin of life, *Am. Sci.* **1955**, *43*, 479-489.
- [105] A. W. Schwartz, Phosphorus in prebiotic chemistry, *Phil. Trans. R. Soc. Lon. B* **2006**, *361*, 1743-1749.
- [106] R. De Graaf, A. W. Schwartz, Reduction and activation of phosphate on the primitive earth, *Orig. Life Evol. Biospheres* **2000**, *30*, 405-410.
- [107] M. A. Pasek, D. S. Lauretta, Aqueous corrosion of phosphide minerals from iron meteorites: a highly reactive source of prebiotic phosphorus on the surface of the early Earth, *Astrobiology* **2005**, *5*, 515-535.
- [108] D. E. Bryant, T. P. Kee, Direct evidence for the availability of reactive, water soluble phosphorus on the early Earth. H-Phosphinic acid from the Nantan meteorite, *Chem. Commun.* **2006**, 2344-2346.

- [109] D. E. Bryant, D. Greenfield, R. D. Walshaw, B. R. Johnson, B. Herschy, C. Smith, M. A. Pasek, R. Telford, I. Scowen, T. Munshi, Hydrothermal modification of the Sikhote-Alin iron meteorite under low pH geothermal environments. A plausibly prebiotic route to activated phosphorus on the early Earth, *Geochim. Cosmochim. Acta* **2013**, *109*, 90-112.
- [110] M. Pasek, D. Lauretta, Extraterrestrial flux of potentially prebiotic C, N, and P to the early Earth, *Orig. Life Evol. Biospheres* **2008**, *38*, 5-21.
- [111] M. Gull, M. A. Mojica, F. M. Fernández, D. A. Gaul, T. M. Orlando, C. L. Liotta, M. A. Pasek, Nucleoside phosphorylation by the mineral schreibersite, *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 17198.
- [112] C. Gibard, S. Bhowmik, M. Karki, E.-K. Kim, R. Krishnamurthy, Phosphorylation, oligomerization and self-assembly in water under potential prebiotic conditions, *Nat. Chem.* **2018**, *10*, 212.
- [113] R. B. Stockbridge, R. Wolfenden, The Intrinsic Reactivity of ATP and the Catalytic Proficiencies of Kinases Acting on Glucose, N-Acetylgalactosamine, and Homoserine. A Thermodynamic Analysis, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 22747-22757.
- [114] H. Ogasawara, A. Yoshida, E.-i. Imai, H. Honda, K. Hatori, K. Matsuno, Synthesizing oligomers from monomeric nucleotides in simulated hydrothermal environments, *Orig. Life Evol. Biospheres* **2000**, *30*, 519-526.
- [115] J. Moravek, Formation of oligonucleotides during heating of a mixture of uridine 2'(3')-phosphate and uridine, *Tetrahedron Lett.* **1967**, *8*, 1707-1710.
- [116] J. Ibanez, A. Kimball, J. Oro, Possible prebiotic condensation of mononucleotides by cyanamide, *Science* **1971**, *173*, 444-446.
- [117] J. Ibanez, A. Kimball, J. Oró, Condensation of mononucleotides by imidazole, *J. Mol. Evol.* **1971**, *1*, 112-114.
- [118] J. P. Ferris, G. Ertem, V. Agarwal, Mineral catalysis of the formation of dimers of 5'-AMP in aqueous solution: the possible role of montmorillonite clays in the prebiotic synthesis of RNA, *Orig. Life Evol. Biospheres* **1989**, *19*, 165-178.
- [119] L. Lemán, L. Orgel, M. R. Ghadiri, Carbonyl sulfide-mediated prebiotic formation of peptides, *Science* **2004**, *306*, 283-286.
- [120] P. C. Joshi, M. F. Aldersley, Significance of mineral salts in prebiotic RNA synthesis catalyzed by montmorillonite, *J. Mol. Evol.* **2013**, *76*, 371-379.
- [121] K. S. Dickson, C. M. Burns, J. P. Richardson, Determination of the free-energy change for repair of a DNA phosphodiester bond, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 15828-15831.
- [122] S. A. Rudolph, E. M. Johnson, P. Greengard, The enthalpy of hydrolysis of various 3', 5'-and 2', 3'-cyclic nucleotides, *J. Biol. Chem.* **1971**, *246*, 1271-1273.
- [123] R. Saladino, C. Crestini, F. Ciciriello, S. Pino, G. Costanzo, E. Di Mauro, From formamide to RNA: the roles of formamide and water in the evolution of chemical information, *Res. Microbiol.* **2009**, *160*, 441-448.
- [124] C. M. Tapiero, J. Nagyvary, Prebiotic formation of cytidine nucleotides, *Nature* **1971**, *231*, 42.
- [125] M. Verlander, L. Orgel, Analysis of high molecular weight material from the polymerization of adenosine cyclic 2', 3'-phosphate, *J. Mol. Evol.* **1974**, *3*, 115-120.
- [126] M. Verlander, R. Lohrmann, L. Orgel, Catalysts for the self-polymerization of adenosine cyclic 2', 3'-phosphate, *J. Mol. Evol.* **1973**, *2*, 303-316.
- [127] G. Costanzo, S. Pino, F. Ciciriello, E. Di Mauro, Generation of long RNA chains in water, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 33206-33216.
- [128] G. Costanzo, R. Saladino, G. Botta, A. Giorgi, A. Scipioni, S. Pino, E. Di Mauro, Generation of RNA Molecules by a Base-Catalysed Click-Like Reaction, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 999-1008.
- [129] K. J. Prabahar, J. P. Ferris, Adenine Derivatives as Phosphate-Activating Groups for the Regioselective Formation of 3', 5'-Linked Oligoadenylates on Montmorillonite: Possible Phosphate-Activating Groups for the Prebiotic Synthesis of RNA, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 4330-4337.

- [130] W. Huang, J. P. Ferris, One-step, regioselective synthesis of up to 50-mers of RNA oligomers by montmorillonite catalysis, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 8914-8919.
- [131] J. P. Ferris, A. R. Hill Jr, R. Liu, L. E. Orgel, Synthesis of long prebiotic oligomers on mineral surfaces, *Nature* **1996**.
- [132] J. P. Ferris, Montmorillonite catalysis of 30-50 mer oligonucleotides: laboratory demonstration of potential steps in the origin of the RNA world, *Orig. Life Evol. Biospheres* **2002**, *32*, 311-332.
- [133] H. Sawai, Catalysis of internucleotide bond formation by divalent metal ions, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 7037-7039.
- [134] H. Sawai, L. E. Orgel, Oligonucleotide synthesis catalyzed by the zinc(2+) ion, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 3532-3533.
- [135] H. Sawai, K. Kuroda, T. Hojo, Uranyl ion as a highly effective catalyst for internucleotide bond formation, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1989**, *62*, 2018-2023.
- [136] P. A. Monnard, A. Kanavarioti, D. W. Deamer, Eutectic phase polymerization of activated ribonucleotide mixtures yields quasi-equimolar incorporation of purine and pyrimidine nucleobases, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13734-13740.
- [137] A. Kanavarioti, P. A. Monnard, D. W. Deamer, Eutectic phases in ice facilitate nonenzymatic nucleic acid synthesis, *Astrobiology* **2001**, *1*, 271-281.
- [138] R. Lohrmann, Formation of nucleoside 5'-phosphoramidates under potentially prebiological conditions, *J. Mol. Evol.* **1977**, *10*, 137-154.
- [139] M. P. Robertson, G. F. Joyce, The origins of the RNA world, *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2012**, *4*, a003608.
- [140] J. P. Ferris, G. Ertem, Oligomerization of ribonucleotides on montmorillonite: reaction of the 5'-phosphorimidazolide of adenosine, *Science* **1992**, *257*, 1387-1389.
- [141] A. R. Hernández, J. A. Piccirilli, Chemical origins of life: Prebiotic RNA unstuck, *Nat. Chem.* **2013**, *5*, 360.
- [142] J. P. Ferris, Montmorillonite-catalysed formation of RNA oligomers: the possible role of catalysis in the origins of life, *Phil. Trans. R. Soc. Lon. B* **2006**, *361*, 1777-1786.
- [143] G. Lailach, T. Thompson, G. Brindley, Absorption of pyrimidines, purines, and nucleosides by Li-, Na-, Mg-, and Ca-montmorillonite (clay-organic studies XII), *Clays Clay Miner* **1968**, *16*, 285-293.
- [144] G. Ertem, J. P. Ferris, Template-directed synthesis using the heterogeneous templates produced by montmorillonite catalysis. A possible bridge between the prebiotic and RNA worlds, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 7197-7201.
- [145] J. P. Ferris, G. Ertem, Montmorillonite catalysis of RNA oligomer formation in aqueous solution. A model for the prebiotic formation of RNA, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 12270-12275.
- [146] P. Z. Ding, K. Kawamura, J. P. Ferris, Oligomerization of uridine phosphorimidazolides on montmorillonite: a model for the prebiotic synthesis of RNA on minerals, *Orig. Life Evol. Biospheres* **1996**, *26*, 151-171.
- [147] K. J. Wang, J. P. Ferris, Effect of inhibitors on the montmorillonite clay-catalyzed formation of RNA: studies on the reaction pathway, *Orig. Life Evol. Biospheres* **2001**, *31*, 381-402.
- [148] M. M. Hanczyc, S. M. Fujikawa, J. W. Szostak, Experimental models of primitive cellular compartments: encapsulation, growth, and division, *Science* **2003**, *302*, 618-622.
- [149] S. Rajamani, A. Vlassov, S. Benner, A. Coombs, F. Olasagasti, D. Deamer, Lipid-assisted synthesis of RNA-like polymers from mononucleotides, *Orig. Life Evol. Biospheres* **2008**, *38*, 57-74.
- [150] V. DeGuzman, W. Vercoutere, H. Shenasa, D. Deamer, Generation of oligonucleotides under hydrothermal conditions by non-enzymatic polymerization, *J. Mol. Evol.* **2014**, *78*, 251-262.
- [151] T. Yokosawa, R. Enomoto, S. Uchino, I. Hirasawa, T. Umehara, K. Tamura, A step into the RNA world: Conditional analysis of hydrogel formation of adenosine 5'-monophosphate induced by cyanuric acid, *Biosystems* **2017**, *162*, 53-58.

- [152] Y. Jeilani, T. Orlando, A. Pope, C. Pirim, M. Nguyen, Prebiotic synthesis of triazines from urea: A theoretical study of free radical routes to melamine, ammeline, ammelide and cyanuric acid, *RSC Adv.* **2014**, *4*, 32375-32382.
- [153] B. J. Cafferty, D. M. Fialho, J. Khanam, R. Krishnamurthy, N. V. Hud, Spontaneous formation and base pairing of plausible prebiotic nucleotides in water, *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 11328.
- [154] M. C. Chen, B. J. Cafferty, I. Mamajanov, I. Gallego, J. Khanam, R. Krishnamurthy, N. V. Hud, Spontaneous prebiotic formation of a beta-ribofuranoside that self-assembles with a complementary heterocycle, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 5640-5646.
- [155] G. Costanzo, A. Giorgi, A. Scipioni, A. M. Timperio, C. Mancone, M. Tripodi, M. Kapralov, E. Krasavin, H. Kruse, J. Sponer, Non-Enzymatic Oligomerization of 3', 5'Cyclic CMP Induced by Proton-and UV-Irradiation Hints at a Non-Fastidious Origin of RNA, *ChemBioChem* **2017**.
- [156] B. K. Pearce, R. E. Pudritz, D. A. Semenov, T. K. Henning, Origin of the RNA world: The fate of nucleobases in warm little ponds, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, 201710339.
- [157] T. Walton, J. W. Szostak, A kinetic model of nonenzymatic RNA polymerization by cytidine-5'-phosphoro-2-aminoimidazolide, *Biochem.* **2017**.
- [158] T. Carell, C. Brandmayr, A. Hienzsch, M. Müller, D. Pearson, V. Reiter, I. Thoma, P. Thumbs, M. Wagner, Structure and function of noncanonical nucleobases, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 7110-7131.
- [159] A. Czerwoniec, S. Dunin-Horkawicz, E. Purta, K. H. Kaminska, J. M. Kasprzak, J. M. Bujnicki, H. Grosjean, K. Rother, MODOMICS: a database of RNA modification pathways. 2008 update, *Nucleic Acids Res.* **2008**, *37*, D118-D121.
- [160] M. A. Machnicka, K. Milanowska, O. Osman Oglou, E. Purta, M. Kurkowska, A. Olchowik, W. Januszewski, S. Kalinowski, S. Dunin-Horkawicz, K. M. Rother, M. Helm, J. M. Bujnicki, H. Grosjean, MODOMICS: a database of RNA modification pathways - 2013 update, *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, D262-D267.
- [161] D. P. Patil, C.-K. Chen, B. F. Pickering, A. Chow, C. Jackson, M. Guttman, S. R. Jaffrey, m⁶A RNA methylation promotes XIST-mediated transcriptional repression, *Nature* **2016**, *537*, 369.
- [162] X. Wang, Z. Lu, A. Gomez, G. C. Hon, Y. Yue, D. Han, Y. Fu, M. Parisien, Q. Dai, G. Jia, N⁶-methyladenosine-dependent regulation of messenger RNA stability, *Nature* **2014**, *505*, 117.
- [163] X. Zhao, Y. Yang, B.-F. Sun, Y. Shi, X. Yang, W. Xiao, Y.-J. Hao, X.-L. Ping, Y.-S. Chen, W.-J. Wang, FTO-dependent demethylation of N⁶-methyladenosine regulates mRNA splicing and is required for adipogenesis, *Cell Res.* **2014**, *24*, 1403.
- [164] W. Xiao, S. Adhikari, U. Dahal, Y.-S. Chen, Y.-J. Hao, B.-F. Sun, H.-Y. Sun, A. Li, X.-L. Ping, W.-Y. Lai, Nuclear m⁶A reader YTHDC1 regulates mRNA splicing, *Mol. Cell* **2016**, *61*, 507-519.
- [165] K. D. Meyer, D. P. Patil, J. Zhou, A. Zinoviev, M. A. Skabkin, O. Elemento, T. V. Pestova, S.-B. Qian, S. R. Jaffrey, 5' UTR m⁶A promotes cap-independent translation, *Cell* **2015**, *163*, 999-1010.
- [166] J. Zhou, J. Wan, X. Gao, X. Zhang, S. R. Jaffrey, S.-B. Qian, Dynamic m⁶A mRNA methylation directs translational control of heat shock response, *Nature* **2015**, *526*, 591.
- [167] X. Wang, B. S. Zhao, I. A. Roundtree, Z. Lu, D. Han, H. Ma, X. Weng, K. Chen, H. Shi, C. He, N⁶-methyladenosine modulates messenger RNA translation efficiency, *Cell* **2015**, *161*, 1388-1399.
- [168] N. Sonenberg, M. A. Morgan, W. C. Merrick, A. J. Shatkin, A polypeptide in eukaryotic initiation factors that crosslinks specifically to the 5'-terminal cap in mRNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1978**, *75*, 4843-4847.
- [169] P. C. Thiaville, B. El Yacoubi, C. Köhrer, J. J. Thiaville, C. Deutsch, D. Iwata-Reuyl, J. M. Bacusmo, J. Armengaud, Y. Bessho, C. Wetzel, Essentiality of threonylcarbamoyl-adenosine (t⁶A), a universal tRNA modification, in bacteria, *Mol. Microbiol.* **2015**, *98*, 1199-1221.

- [170] J. A. Kowalak, J. J. Dalluge, J. A. McCloskey, K. O. Stetter, The role of posttranscriptional modification in stabilization of transfer RNA from hyperthermophiles, *Biochem.* **1994**, *33*, 7869-7876.
- [171] H. C. Betts, M. N. Puttick, J. W. Clark, T. A. Williams, P. C. Donoghue, D. Pisani, Integrated genomic and fossil evidence illuminates life's early evolution and eukaryote origin, *Nat. Ecol. Evol.* **2018**, *2*, 1556.
- [172] G. c.-a. Fox, E. Stackebrandt, R. Hespell, J. Gibson, J. Maniloff, T. Dyer, R. Wolfe, W. Balch, R. Tanner, L. Magrum, The phylogeny of prokaryotes, *Science* **1980**, *209*, 457-463.
- [173] N. T. Arndt, E. G. Nisbet, Processes on the young Earth and the habitats of early life, *Annu. Rev. Earth Planet. Sci.* **2012**, *40*, 521-549.
- [174] C. R. Woese, G. E. Fox, Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1977**, *74*, 5088-5090.
- [175] J. Amend, E. Shock, Energetics of amino acid synthesis in hydrothermal ecosystems, *Science* **1998**, *281*, 1659-1662.
- [176] J. P. Amend, D. E. LaRowe, T. M. McCollom, E. L. Shock, The energetics of organic synthesis inside and outside the cell, *Phil. Trans. R. Soc. Lon. B* **2013**, *368*, 20120255.
- [177] B.-i. Kang, K. Miyauchi, M. Matuszewski, G. S. D'Almeida, M. A. T. Rubio, J. D. Alfonzo, K. Inoue, Y. Sakaguchi, T. Suzuki, E. Sochacka, Identification of 2-methylthio cyclic N 6-threonylcarbamoyladenine (ms2ct6A) as a novel RNA modification at position 37 of tRNAs, *Nucleic Acids Res.* **2016**, *45*, 2124-2136.
- [178] S. Kellner, J. Neumann, D. Rosenkranz, S. Lebedeva, R. F. Ketting, H. Zischler, D. Schneider, M. Helm, Profiling of RNA modifications by multiplexed stable isotope labelling, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 3516-3518.
- [179] The RNA Modification Database, *The RNA Institute, State University of New York, University of Albany*, <https://www.rna.albany.edu/>, **25.06.2019**.
- [180] S. L. Miller, A production of amino acids under possible primitive earth conditions, *Science* **1953**, *117*, 528-529.
- [181] S. L. Miller, Production of some organic compounds under possible primitive earth conditions¹, *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 2351-2361.
- [182] A. P. Johnson, H. J. Cleaves, J. P. Dworkin, D. P. Glavin, A. Lazcano, J. L. Bada, The Miller volcanic spark discharge experiment, *Science* **2008**, *322*, 404-404.
- [183] A. Strecker, Ueber die künstliche Bildung der Milchsäure und einen neuen, dem Glycocoll homologen Körper, *Liebigs Ann. Chem.* **1850**, *75*, 27-45.
- [184] S. Islam, M. W. Powner, Prebiotic systems chemistry: Complexity overcoming clutter, *Chem* **2017**, *2*, 470-501.
- [185] R. Krishnamurthy, G. Arrhenius, A. Eschenmoser, Formation of glycolaldehyde phosphate from glycolaldehyde in aqueous solution, *Orig. Life Evol. Biospheres* **1999**, *29*, 333-354.
- [186] K. Ashe, C. Fernández-García, M. K. Corpinot, A. J. Coggins, D.-K. Bučar, M. W. Powner, Selective prebiotic synthesis of phosphoroaminonitriles and aminothioamides in neutral water, *Commun. Chem.* **2019**, *2*, 23.
- [187] M. G. Schwendinger, B. M. Rode, Possible role of copper and sodium chloride in prebiotic evolution of peptides, *Anal. Sci.* **1989**, *5*, 411-414.
- [188] K. Ehler, L. Orgel, N, N'-carbonyldiimidazole-induced peptide formation in aqueous solution, *Biochim. Biophys. Acta* **1976**, *434*, 233-243.
- [189] B. M. Rode, Peptides and the origin of life, *Peptides* **1999**, *20*, 773-786.
- [190] J. Greenwald, M. P. Friedmann, R. Riek, Amyloid aggregates arise from amino acid condensations under prebiotic conditions, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *128*, 11781-11785.
- [191] M. Rodriguez-Garcia, A. J. Surman, G. J. Cooper, I. Suárez-Marina, Z. Hosni, M. P. Lee, L. Cronin, Formation of oligopeptides in high yield under simple programmable conditions, *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 8385.
- [192] S. K. Rout, M. P. Friedmann, R. Riek, J. Greenwald, A prebiotic template-directed peptide synthesis based on amyloids, *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 234.

- [193] J. G. Forsythe, A. S. Petrov, W. C. Millar, S.-S. Yu, R. Krishnamurthy, M. A. Grover, N. V. Hud, F. M. Fernández, Surveying the sequence diversity of model prebiotic peptides by mass spectrometry, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, E7652-E7659.
- [194] J. G. Forsythe, S. S. Yu, I. Mamajanov, M. A. Grover, R. Krishnamurthy, F. M. Fernández, N. V. Hud, Ester-Mediated Amide Bond Formation Driven by Wet–Dry Cycles: A Possible Path to Polypeptides on the Prebiotic Earth, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 9871-9875.
- [195] A. D. Borthwick, 2, 5-Diketopiperazines: synthesis, reactions, medicinal chemistry, and bioactive natural products, *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 3641-3716.
- [196] J. Rabinowitz, J. Flores, R. Krebsbach, G. Rogers, Peptide formation in the presence of linear or cyclic polyphosphates, *Nature* **1969**, *224*, 795.
- [197] J. Ying, S. Fu, X. Li, L. Feng, P. Xu, Y. Liu, X. Gao, Y. Zhao, A plausible model correlates prebiotic peptide synthesis with the primordial genetic code, *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 8598-8601.
- [198] P. Schimmel, Aminoacyl tRNA synthetases: general scheme of structure-function relationships in the polypeptides and recognition of transfer RNAs, *Annu. Rev. Biochem.* **1987**, *56*, 125-158.
- [199] D. A. Zaia, C. T. B. Zaia, H. De Santana, Which amino acids should be used in prebiotic chemistry studies?, *Orig. Life Evol. Biospheres* **2008**, *38*, 469-488.
- [200] R. M. Turk, M. Illangasekare, M. Yarus, Catalyzed and spontaneous reactions on ribozyme ribose, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 6044-6050.
- [201] J. C. Lacey, N. Senaratne, D. W. Mullins, Hydrolytic properties of phenylalanyl- and N-acetylphenylalanyl adenylate anhydrides, *Orig. Life Evol. Biospheres* **1984**, *15*, 45-54.
- [202] M. Paecht-Horowitz, J. Berger, A. Katchalsky, Prebiotic synthesis of polypeptides by heterogeneous polycondensation of amino-acid adenylates, *Nature* **1970**, *228*, 636.
- [203] J. P. Biron, A. L. Parkes, R. Pascal, J. D. Sutherland, Expeditious, potentially primordial, aminoacylation of nucleotides, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 6731-6734.
- [204] K. Wen, L. E. Orgel, The specificity of peptide chain extension by N-carboxyanhydrides, *Orig. Life Evol. Biospheres* **2001**, *31*, 241-248.
- [205] H. Griesser, M. Bechthold, P. Tremmel, E. Kervio, C. Richert, Amino Acid-Specific, Ribonucleotide-Promoted Peptide Formation in the Absence of Enzymes, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *129*, 1244-1248.
- [206] H. Griesser, P. Tremmel, E. Kervio, C. Pfeffer, U. E. Steiner, C. Richert, Ribonucleotides and RNA promote peptide chain growth, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 1219-1223.
- [207] M. Jauker, H. Griesser, C. Richert, Spontaneous formation of RNA strands, peptidyl RNA, and cofactors, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 14564-14569.
- [208] C. Schneider, S. Becker, H. Okamura, A. Crisp, T. Amatov, M. Stadlmeier, T. Carell, Noncanonical RNA Nucleosides as Molecular Fossils of an Early Earth—Generation by Prebiotic Methylations and Carbamoylations, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 5943-5946.
- [209] F. Goesmann, H. Rosenbauer, J. H. Bredehöft, M. Cabane, P. Ehrenfreund, T. Gautier, C. Giri, H. Krüger, L. Le Roy, A. J. MacDermott, Organic compounds on comet 67P/Churyumov-Gerasimenko revealed by COSAC mass spectrometry, *Science* **2015**, *349*, aab0689.
- [210] R. Saladino, C. Crestini, S. Pino, G. Costanzo, E. Di Mauro, Formamide and the origin of life, *Phys. Life Rev.* **2012**, *9*, 84-104.
- [211] S. Becker, H. Okamura, S. Wiedemann, J. Feldmann, C. Schneider, K. Iwan, A. Crisp, M. Rossa, T. Amatov, T. Carell, *unveröffentlichte Ergebnisse* **2019**.
- [212] Y. L. Yung, M. B. Mcelroy, Fixation of Nitrogen in the Prebiotic Atmosphere, *Science* **1979**, *203*, 1002-1004.
- [213] W. L. Chameides, J. C. G. Walker, Rates of fixation by lightning of carbon and nitrogen in possible primitive atmospheres, *Origins of life* **1981**, *11*, 291-302.
- [214] J. F. Kasting, Bolide impacts and the oxidation state of carbon in the Earth's early atmosphere, *Orig. Life Evol. Biospheres* **1990**, *20*, 199-231.

- [215] H. Ishikura, Y. Yamada, K. Murao, M. Saneyoshi, S. Nishimura, The presence of N-[9-(β -D-ribofuranosyl) purin-6-ylcarbamoyl] threonine in serine, methionine and lysine transfer RNA's from *Escherichia coli*, *Biochem. Biophys. Res. Com.* **1969**, *37*, 990-995.
- [216] A. C. Bajji, D. R. Davis, Synthesis of the tRNA^{Lys}, 3 anticodon stem-loop domain containing the hypermodified ms2t6A nucleoside, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 5352-5358.
- [217] C. Houssier, H. Grosjean, Temperature jump relaxation studies on the interactions between transfer RNAs with complementary anticodons. The effect of modified bases adjacent to the anticodon triplet, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1985**, *3*, 387-408.
- [218] M. Matuszewski, E. Sochacka, Stability studies on the newly discovered cyclic form of tRNA N 6-threonylcarbamoyladenine (ct 6 A), *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 2703-2706.
- [219] V. Boudou, J. Langridge, A. Van Aerschot, C. Hendrix, A. Millar, P. Weiss, P. Herdewijn, Synthesis of the Anticodon Hairpin tRNA^{Met} Containing N-[[9-(β -D-Ribofuranosyl)-9H-purin-6-yl] carbamoyl]-L-threonine (= N6-[[[(1S, 2R)-1-Carboxy-2-hydroxypropyl] amino] carbonyl] adenosine, t6A), *Helv. Chim. Acta* **2000**, *83*, 152-161.
- [220] I. N. Michaelides, N. Tago, B. Viverge, T. Carell, Synthesis of RNA Containing 5-Hydroxymethyl-, 5-Formyl-, and 5-Carboxycytidine, *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 15894-15898.
- [221] V. Babić-Ivančić, J. Kontrec, L. Brečević, Formation and transformation of struvite and newberyite in aqueous solutions under conditions similar to physiological, *Urol. Res.* **2004**, *32*, 350-356.
- [222] G. Costanzo, R. Saladino, C. Crestini, F. Ciciriello, E. Di Mauro, Nucleoside phosphorylation by phosphate minerals, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 16729-16735.
- [223] M. Rothe, A. Kleeberg, B. Grüneberg, K. Friese, M. Pérez-Mayo, M. Hupfer, Sedimentary sulphur: iron ratio indicates vivianite occurrence: a study from two contrasting freshwater systems, *Plos one* **2015**, *10*, e0143737.
- [224] J. Guo, Y. Wang, M. Zhao, 3D flower-like ferrous (II) phosphate nanostructures as peroxidase mimetics for sensitive colorimetric detection of hydrogen peroxide and glucose at nanomolar level, *J. Talanta* **2018**, *182*, 230-240.
- [225] L. Da Silva, M.-C. Maurel, D. Deamer, Salt-promoted synthesis of RNA-like molecules in simulated hydrothermal conditions, *J. Mol. Evol.* **2015**, *80*, 86-97.
- [226] A. W. Schwartz, Prebiotic phosphorylation-nucleotide synthesis with apatite, *Biochim. Biophys. Acta* **1972**, *281*, 477-480.
- [227] Z. D. Draganić, A. Negrón-Mendoza, K. Sehested, S. I. Vujošević, R. Navarro-Gonzales, M. Albarran-Sanchez, I. G. Draganić, Radiolysis of aqueous solutions of ammonium bicarbonate over a large dose range, *Radiat. Phys. Chem.* **1991**, *38*, 317-321.
- [228] G. Chittenden, A. W. Schwartz, Prebiotic photosynthetic reactions, *BioSystems* **1981**, *14*, 15-32.
- [229] J. Ferris, E. Edelson, Chemical evolution. 31. Mechanism of the condensation of cyanide to hydrogen cyanide oligomers, *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 3989-3995.
- [230] V. Vol'khin, D. Kazakov, G. Leont'eva, Y. V. Andreeva, E. Nosenko, M. Siluyanova, Synthesis of struvite (MgNH₄PO₄·6H₂O) and its use for sorption of nickel ions, *Russ. J. Appl. Chem.* **2015**, *88*, 1986-1996.
- [231] *Die verwendeten Digitalfotos wurden von Sebastian Vogel zur Verfügung gestellt.*
- [232] H. Huppertz, Habilitationsschrift, Ludwig-Maximilians-Universität (München), **2003**.
- [233] H. Huppertz, Multianvil high-pressure/high-temperature synthesis in solid state chemistry, *Z. Kristallogr. – Cryst. Mater.* **2004**, *219*, 330-338.
- [234] D. Walker, Lubrication, gasketing, and precision in multianvil experiments, *Am. Mineral.* **1991**, *76*, 1092-1100.
- [235] F. Hagelskamp, S. Kellner, *unveröffentlichte Ergebnisse* **2018**.

7. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
aa-AMP	Aminoacetyladenylaten
Ac	Acetyl
AICA	5-Aminoimidazol-4-carboxamid
AMP	Adenosinphosphat
ACN	Acetonitril
C	Cytidin
cAMP	cyclisches Adenosinphosphat
CMP	Cytidinmonophosphat
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
DAP	Diamidophosphat
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> ; (Desoxyribonukleinsäure)
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
ESI	Elektronenspray-Ionisation
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
Et ₂ O	Diethylether
EtOAc	Ethylacetat
EtOH	Ethanol
FaPy	Formamidopyrimidin
Fc	Ferrocen

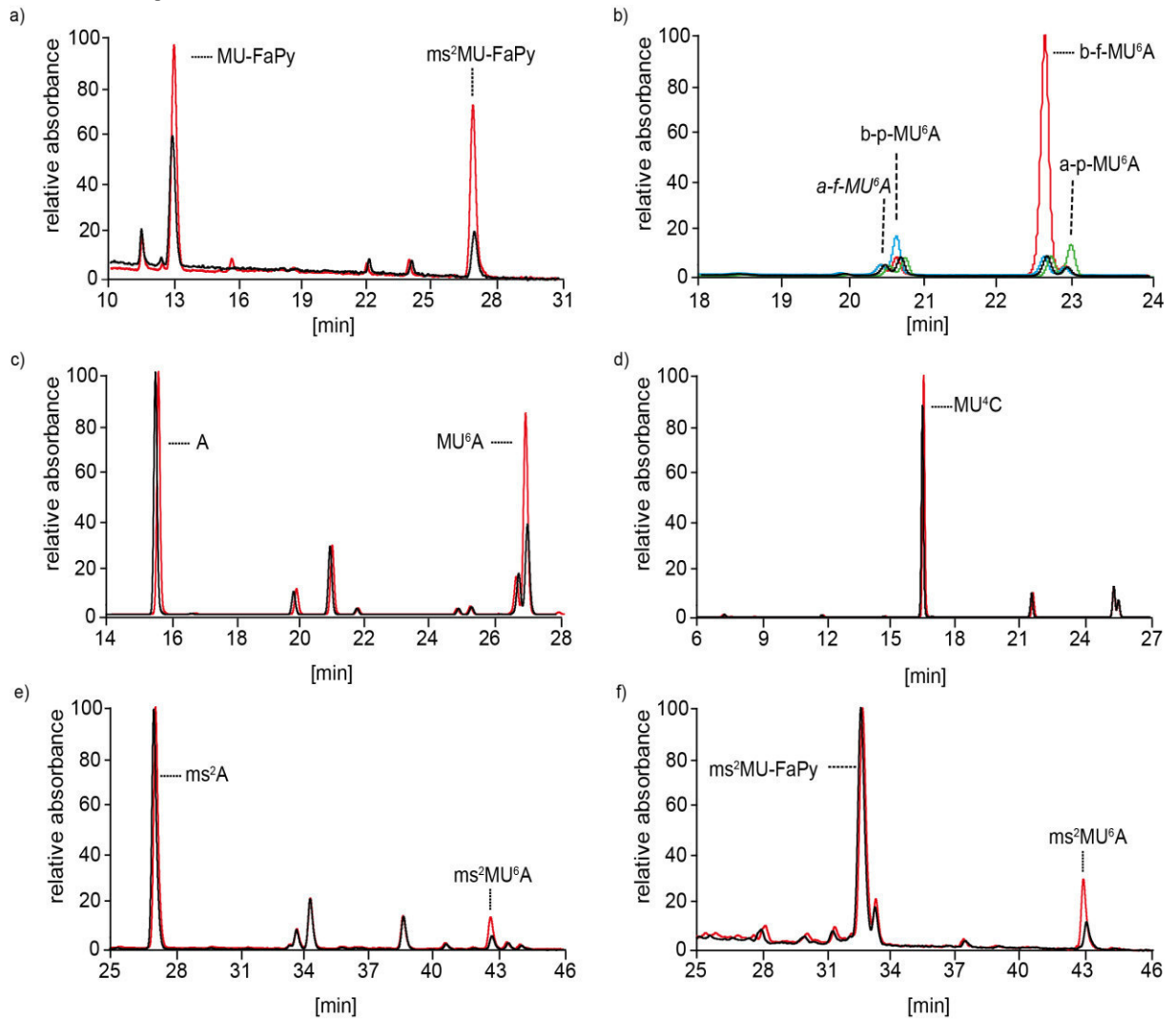
7. Abkürzungsverzeichnis

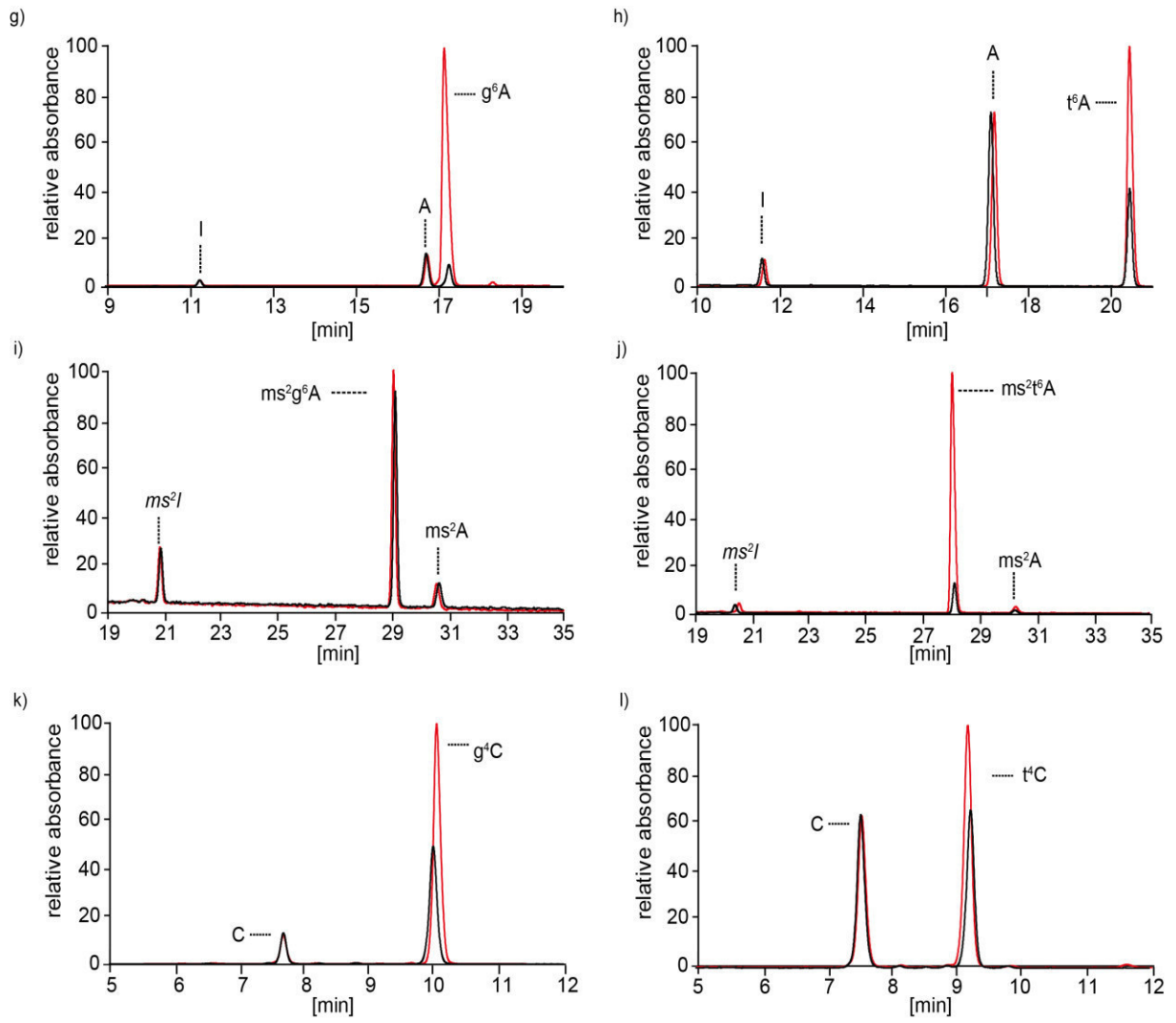
g	Gramm
G	Guanosin
g ⁶ A	N ⁶ -Glycinylylcarbamoyladenosen
g ⁴ C	N ⁴ -Glycinylylcarbamoylcytidin
GNA	<i>glycol nucleic acid</i> (Glykol-Nukleinsäuren)
h	Stunden
Hex	Hexan
HR	<i>high resolution</i> (hohe Auflösung)
Hz	Hertz
I	Inosin
IR	Infrarot
K	Kelvin
LC	<i>liquid chromatography</i> (Flüssig Chromatographie)
LUCA	<i>Last Universal Common Ancestor</i> (letzter gemeinsamer Urvorfahr)
M	molar
m/z	Verhältnis von Ladung zu Masse
m ⁶ A	N ⁶ -Methyladenosin
m ⁷ G	N ⁷ -Methylguanosin
MeOH	Methanol
min	Minute
MS	Massenspektrometrie
ms ² g ⁶ A	2-Thiomethyl-N ⁶ -Glycinylylcarbamoyladenosen
ms ² iA	2-Thiomethylinosin
ms ² t ⁶ A	2-Thiomethyl-N ⁶ -Threonylylcarbamoyladenosen
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> (Kernmagnetresonanz)

OAc	Acetat
p-RNA	pyranosidische RNA
ppm	<i>parts per million</i> (Millionstel)
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> (Ribonukleinsäure)
RT	Raumtemperatur
t ⁶ A	N ⁶ -Threonylcarbamoyladenosin
t ⁴ C	N ⁴ -Threonylcarbamoylcytidin
TAP	2,4,6-Triaminopyrimidine
TBS	<i>tert.</i> -Butyldimethylsilyl
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TIPDS	Tetraisopropyldisilyl
TNA	<i>threose nucleic acid</i> (Threose-Nukleinsäuren)
tPNA	<i>thioester peptide nucleic acids</i> (Thioester-Peptid-Nukleinsäure)
U	Uridin
UV	ultraviolett
$\tilde{\nu}$	Wellenzahl [cm ⁻¹]
Vis	<i>visible</i> (sichtbarer Bereich des elektromagnetischen Spektrums)
XRD	Röntgenbeugung
δ	chemische Verschiebung
λ	Wellenlänge [nm]
°C	Grad Celsius

8. Anhang

8.1. Co-Injektionen





8.2. Kalibriergeraden

