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

# Entwicklung und Untersuchung verschiedener Szenarien der präbiotischen Peptidsynthese und Analyse komplexer Peptidmischungen via Kapillarelektrophorese-Massenspektrometrie

Fabian Sauer aus Heidelberg, Deutschland

### <u>Erklärung</u>

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

### **Eidesstattliche Versicherung**

Diese Dissertation wurde eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, 26.10.2021

.....

(Fabian Sauer)

Dissertation eingereicht am: 03.11.2021

2. Gutachter: Prof. Dr. Paul Knochel

Mündliche Prüfung am: 03.12.2021

### Kurzzusammenfassung

Der Ursprung des Lebens beschreibt eine Zeitspanne auf dieser Erde, in der aus unbelebter Materie über eine unbekannte Route der chemischen Evolution die ersten reproduzierenden Organismen entstanden sind. Peptide nahmen aufgrund ihrer katalytischen und strukturgebenden Fähigkeiten eine zentrale Rolle in diesem Prozess ein. Allerdings ist ihre Synthese vor allem in wässrigen Umgebungen sowohl kinetisch als auch thermodynamisch gehemmt und insbesondere die Entstehung langkettiger Peptidoligomere konnte bislang nicht geklärt werden. Diese Arbeit beschäftigt sich sowohl mit der Entwicklung neuer präbiotischer Routen zu vielfältigen Peptidmischungen als auch deren detaillierter Analyse über Kapillarelektrophorese-Massenspektrometrie (CE-MS).

In bisher postulierten präbiotischen Peptidsynthesen werden meist nur sehr wenige Aminosäuren gleichzeitig eingesetzt, wodurch allerdings Wechselwirkungen der Aminosäuren untereinander und die Entstehung potentiell wichtiger Peptidsequenzen verhindert werden. In dieser Arbeit wurden daher unter den Bedingungen der salzinduzierten Peptidbildung (SIPF) komplexe Aminosäuregruppen sowie erstmals auch die Gesamtheit der proteinogenen Aminosäuren umgesetzt. Es wurde gezeigt, dass kooperative Effekte zwischen den Aminosäuren ausgebildet werden können und deren Reaktivität nicht isoliert betrachtet werden sollte. In einer alternativen Umgebung bestehend aus flüssigem SO<sub>2</sub> konnten ähnliche Beobachtungen gemacht werden. Außerdem wurde in SO<sub>2</sub> eine gesteigerte Reaktivität der Aminosäuren und eine daraus resultierende größere Vielfalt an Peptidsequenzen nachgewiesen. Somit wurde neben der Schaffung eines neuen Szenarios für präbiotische Peptidsynthesen demonstriert, dass die Reaktivität innerhalb komplexer Mischungen durch die Wechselwirkungen der einzelnen Komponenten untereinander gesteigert werden kann. Dies ist vor allem im präbiotischen Kontext, der selten das Vorliegen reiner Ausgangsverbindungen erlaubt, eine wichtige Erkenntnis.

Eine ständige Herausforderung in der Erforschung des Ursprungs des Lebens ist die Identifikation neuer, möglichst universell verfügbarer Umgebungen und Modelle, die besonders günstige Bedingungen für die Entstehung der verschiedenen Biomoleküle und Reaktionsnetzwerke darstellen. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde eine neue Peptidsynthese entwickelt, die auf den hohen Eisenvorkommen der frühen Erde basiert und somit in vielen verschiedenen präbiotischen Szenarien realisierbar ist. Weiterhin reichen für eine erfolgreiche Synthese eine sehr limitierte Anzahl an Reaktanten aus, da die Fe(II)-Ionen sowohl die Peptidknüpfung katalysieren als auch dehydratisierende Bedingungen garantieren. Selbst die großzügige Variation der äußeren Einflüsse führte zu einer beständigen und effektiven Peptidkondensation. Innerhalb von 21 Tagen konnten Gly<sub>3</sub>-Ausbeuten von 4.1 % erzielt und Peptidketten bis zu einer Länge von Decameren detektiert werden. Damit wurde die maximale Peptidkettenlänge im Vergleich zum vorigen Ansatz der SIPF erheblich gesteigert. Insbesondere auf einer präbiotischen Zeitskala weisen diese höchst relevanten Reaktionsbedingungen somit ein hohes Potenzial für die Entstehung der frühzeitlichen Peptidwelt auf.

Während der Analyse der resultierenden komplexen Peptidmischungen dieser Arbeit mussten die zahlreichen gebildeten Verbindungen oft in Spuren nachgewiesen werden. Für die detaillierte Untersuchung der Reaktionen wurde deshalb ergänzend ein CE-Orbitrap-MS Interface entwickelt und die Kombination aus hochauflösenden CE-Messungen und sensitiver Massendetektion ermöglicht. Das Interface zeichnet sich durch einen robusten Aufbau mit zugeführtem *sheath liquid* und einem goldbeschichteten Stahlemitter aus. Beide Faktoren garantierten eine erhöhte Elektrospraystabilität und Massenkompatibilität der Analyten. Die zur Charakterisierung verwendeten Modellpeptide Angiotensin II und Neurotensin konnten noch bei Konzentrationen von 2.3 und 2.1 nM detektiert werden. Sowohl die Sensitivität der Messungen als auch die Auftrennung der Peptidmischungen wurde durch eine Beschichtung der Kapillaren mit linearem Polyacrylamid weiter verbessert. Somit stellte das entwickelte Interface eine wichtige Grundlage zur Aufklärung der komplexen Mischungen dieser Arbeit dar. Darüber hinaus ist dessen Verwendung für weitere zuverlässige und exakte Analysen in anderen Forschungsbereichen möglich.

### Abstract

The origin of life describes a period of time on Earth during which the first reproducing organisms arose from inanimate matter via an unknown route of chemical evolution. Peptides played a central role in this process due to their catalytic and structural functions. However, their synthesis is both kinetically and thermodynamically inhibited, especially in aqueous environments, and the formation of long-chain peptide oligomers has not yet been elucidated. This thesis is focused on both the development of new prebiotic routes to diverse peptide mixtures and their detailed analysis via capillary electrophoresis-mass spectrometry (CE-MS).

In previously postulated prebiotic peptide syntheses, usually only very few amino acids are used simultaneously. However, this prevents interactions among amino acids and the formation of potentially important peptide sequences. In this work, complex amino acid groups were therefore brought to reaction under the conditions of the salt induced peptide formation (SIPF). Additionally, for the first time, the entirety of the proteinogenic amino acids was applied. It was shown that cooperative effects can be formed between the amino acids and that their reactivity should not be considered in isolation. Similar observations could be made in an alternative environment consisting of liquid SO<sub>2</sub>. Moreover, the amino acids exhibited an increased reactivity in SO<sub>2</sub> resulting in a greater diversity of peptide sequences. Thus, in addition to creating a new scenario for prebiotic peptide syntheses, it was demonstrated that the reactivity within complex mixtures can be increased by the interactions of individual components with each other. This is an important finding, especially in the prebiotic context since specific starting compounds were rarely found in pure form.

An ongoing challenge in the study of the origin of life is the identification of new environments which are as universally available as possible and represent particularly favorable conditions for the formation of various biomolecules and reaction networks. In the next step of this thesis, a new peptide synthesis was developed which is based on the high iron occurrences of the early Earth and is thus feasible in many different prebiotic scenarios. Furthermore, a very limited number of reactants is sufficient for a successful synthesis, since the Fe(II) ions catalyze the peptide linkage while simultaneously guaranteeing dehydrating conditions. Even large variations of the reaction conditions resulted in consistent and effective peptide condensation. Within 21 days, Gly<sub>3</sub> yields of 4.1 % were achieved and peptides up to the length of decamers were detected. This represents a significant increase compared to the previous SIPF conditions. Especially on a prebiotic time scale, these highly relevant reaction conditions show high potential for the formation of the primeval peptide world.

During the analysis of the resulting complex peptide mixtures in this work, the numerous compounds formed often had to be detected in trace amounts. Therefore, a CE-Orbitrap-MS interface was developed as a complementary tool for the detailed study of the reactions, enabling the combination of high-resolution CE measurements and sensitive mass detection. The interface features a robust design with added sheath liquid and a gold-coated steel emitter. Both factors guaranteed increased electrospray stability and mass compatibility of the analytes. The model peptides angiotensin II and neurotensin used for characterization could still be detected at concentrations of 2.3 and 2.1 nM, respectively. Both the sensitivity of the measurements and the separation of the peptide mixtures was further improved by coating the capillaries with linear polyacrylamide. Thus, the developed interface provided an important basis for the investigation of the complex mixtures of this work. Additionally, it is also applicable for other reliable and accurate analyses in various research areas.

### Wissenschaftliche Beiträge

Teile dieser Arbeit wurden bereits publiziert oder auf Konferenzen in Form von Vorträgen oder Posterpräsentationen vorgestellt.

### Publikationen

F. Sauer, C. Sydow, O. Trapp, *Electrophoresis* **2020**, *41*, 1280-1286; A robust sheath-flow CE-MS interface for hyphenation with Orbitrap MS. (Front cover)

F. Sauer, M. Haas, C. Sydow, A. F. Siegle, C. A. Lauer, O. Trapp, *Nat. Commun.*, in Revision; Peptide formation as on the early Earth: from amino acid mixtures to peptides in sulphur dioxide.

### <u>Vorträge</u>

31. Doktorandenseminar des AK Separation Science (online), Januar 2021; A robust sheathflow CE-MS interface for hyphenation with Orbitrap MS.

### **Posterpräsentationen**

<u>F. Sauer</u>, M. Seibicke, O. Trapp, Molecular Origins of Life, CAS Conference, Oktober 2018, München (Deutschland); Novel Insights into Enantiomeric Enrichment and its Role in Prebiotic Peptide Synthesis.

<u>F. Sauer</u>, C. Sydow, O. Trapp, CE-Forum, Dezember 2019, Waldbronn (Deutschland); A robust sheath-flow CE-ESI-MS interface for high sensitivity analyses.

<u>F. Sauer</u>, M. Seibicke, O. Trapp, Science of Early Life, November 2019, Kloster Seeon (Deutschland); Novel Insights into Enantiomeric Enrichment and its Role in Prebiotic Peptide Synthesis.

<u>F. Sauer</u>, M. Haas, C. Sydow, A. F. Siegle, C. A. Lauer, O. Trapp, Molecular Origins of Life, August 2021, München (Deutschland, online); Peptide formation as on the early Earth: from amino acid mixtures to peptides in sulphur dioxide.

# Abkürzungsverzeichnis

Äq.	Äquivalente
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BFS	Blankes Quarzglas
BGE	Hintergrundelektrolyt
°C	Grad Celsius
CDI	N,N'-Carbonyldiimidazol
CE	Kapillarelektrophorese
COS	Carbonylsulfid
$CS_2$	Kohlenstoffdisulfid
DAP	Diamidophosphat
DCM	Dichlormethan
DKP	Diketopiperazin
DMF	Dimethylformamid
DNA/RNA	(Desoxy)ribonukleinsäure
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EIE	extrahiertes Ionenelektropherogramm
ESI	Elektrospray-Ionisation
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
FT-ICR	Fourier-Transform Ionenzyklotronresonanz Massenspektrometer
Ga	Jahrmilliarde, Giga-Jahr
GC	Gaschromatographie
h	Stunde
HBTU	2-(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluoro-phosphat
HILIC	Hydrophile Interaktionsflüssigchromatographie
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
ID	Innendurchmesser
LC	Flüssigchromatographie

LOD	Nachweisgrenze
LPA	Lineares Polyacrylamid
Ma	Jahrmillion, Mega-Jahr
MAPS	Methacryloxypropyltrimethoxysilan
min	Minute
MPA	3-Mercaptopropionsäure
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
NCA	N-Carboxyanhydrid
NMM	4-Methylmorpholin
OD	Außendurchmesser
OPA	o-Phthalaldehyd
PVA	Polyvinylalkohol
RPLC	Umkehrphasen-Flüssigchromatographie
RSD	Relative Standardabweichung
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SIPF	Salzinduzierte Peptidbildung
S/N	Signal-zu-Rausch-Verhältnis
TFA	Trifluoressigsäure
TMEDA	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TOF-MS	Flugzeitmassenspektrometer

Aminosäure	Drei-Buchstabencode	Ein-Buchstabencode
Alanin	Ala	А
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	Ν
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	С
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	Е
Glycin	Gly	G
Histidin	His	Н
Isoleucin	Ile	Ι
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	Κ
Methionin	Met	Μ
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	Р
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	Т
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V
Unbekannt	Xaa	Х

## Literaturverzeichnis

Kurzzusammenfassung		
Abstract	v	
Abkürzungsverzeichnis	IX	
1. Einleitung	1	
2. Kenntnisstand	3	
2.1. Der Ursprung des Lebens		
2.1.1. Die Bedingungen auf der jungen Erde	3 5	
2.1.2. Potenzielle Szenanen für die Entstehung des Lebens		
2.2. Die Peptid-Weit	9 9	
2.2.2. Die Laborsvnthese von Peptiden		
2.2.3. Präbiotische Peptidsynthesen	14	
2.2.4. Die Bedeutung von Peptiden für die Entstehung des Lebens		
2.3. Analytik von Peptiden		
2.3.1. Methoden für die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie		
2.3.2. Methoden für die Kapillarelektrophorese		
2.3.3. Proteinsequenzierung durch Massenspektrometrie		
3. Zielsetzung	41	
4. Ergebnisse und Diskussion	43	
4.1. Analyse komplexer Peptidmischungen		
<ul><li>4.1. Analyse komplexer Peptidmischungen</li><li>4.1.1. Methoden der Kapillarelektrophorese</li></ul>	43 43	
<ul> <li>4.1. Analyse komplexer Peptidmischungen</li> <li>4.1.1. Methoden der Kapillarelektrophorese</li> <li>4.1.2. Methoden der Kapillarelektrophorese-Massenspektrometrie</li> </ul>	43 43 44	
<ul> <li>4.1. Analyse komplexer Peptidmischungen</li></ul>		
<ul> <li>4.1. Analyse komplexer Peptidmischungen</li></ul>	43 43 44 53 58	
<ul> <li>4.1. Analyse komplexer Peptidmischungen</li></ul>		
<ul> <li>4.1. Analyse komplexer Peptidmischungen</li></ul>	43 43 44 53 58 60 60	
<ul> <li>4.1. Analyse komplexer Peptidmischungen</li></ul>	43 43 44 53 58 60 60 60 65	
<ul> <li>4.1. Analyse komplexer Peptidmischungen</li></ul>		
<ul> <li>4.1. Analyse komplexer Peptidmischungen</li></ul>	43 43 44 53 58 60 60 60 65 	
<ul> <li>4.1. Analyse komplexer Peptidmischungen</li></ul>	43 43 44 53 58 60 60 60 65 82 82 82 91	
<ul> <li>4.1. Analyse komplexer Peptidmischungen</li></ul>	43 43 44 53 58 60 60 65 65 82 91 <b>95</b>	
<ul> <li>4.1. Analyse komplexer Peptidmischungen</li></ul>	43 43 44 53 58 60 60 65 82 82 82 91 91 95 101	
<ul> <li>4.1. Analyse komplexer Peptidmischungen</li></ul>	43 43 44 53 58 60 60 60 65 	
<ul> <li>4.1. Analyse komplexer Peptidmischungen</li></ul>	43 43 44 53 58 60 60 60 60 60 60 60 60 60 60 60 60 60 60 60 60 	
<ul> <li>4.1. Analyse komplexer Peptidmischungen</li></ul>	43 43 44 53 58 60 60 65 82 91 <b>95</b> <b>101</b> 91 91 101 101	

	6.1.4.	Kapillarelektrophorese-Massenspektrometrie Interface	102
	6.1.5.	Peptidsynthesizer	102
	6.1.6.	Kugelmühle	102
	6.1.7.	Kleingeräte	102
6	5.2. Ana	lyse der Peptidmischungen	103
	6.2.1.	Dipeptidsynthesen mittels des Peptidsynthesizers	103
	6.2.2.	Beschichtung der Kapillaren	105
	6.2.3.	Analysen mittels Kapillarelektrophorese	105
	6.2.4.	Analysen mittels Kapillarelektrophorese-Massenspektrometrie	105
	6.2.5.	Charakterisierung des Interfaces	107
	6.2.6.	Entfernung von Kupfer	107
6	6.3. Kup	ferkatalysierte Peptidkondensation	108
	6.3.1.	Herstellung der komplexen Mischungen	108
	6.3.2.	Peptidkondensationen bei konstantem Reaktionsvolumen	109
	6.3.3.	Verdunstungsexperimente	110
6	6.4. Eise	enkatalysierte Peptidkondensation	111
	6.4.1.	Allgemeine Vorgehensweise	111
	6.4.2.	Quantifizierung	111
7.	Anhang		117
8.	Danksag	gung	133
9.	Literatu	rverzeichnis	135

### 1. Einleitung

Nach dem heutigen Wissensstand beherbergt unser Planet Erde als einziger Himmelskörper des gesamten Universums eine Vielfalt unterschiedlicher Lebewesen, die dem Prinzip der Biogenese folgen: neues Leben wird aus bereits existierendem Leben geschaffen. Allerdings muss zu einem gewissen Zeitpunkt der Erdgeschichte aus unbelebter, abiotischer Materie über eine noch nicht greifbare Route der chemischen Evolution die erste reproduzierende Lebensform entstanden sein. Die Erforschung dieses Phänomens, dem Ursprung des Lebens, beschäftigt die verschiedensten Fachbereiche zahlreicher Wissenschaften.

Dem zugrunde liegt die scheinbar einfache Frage nach der Definition des Lebens. Eine weit verbreitete, einfache, aber sehr weit gefasste Definition beschreibt Leben als "ein sich selbst erhaltendes chemisches System, das zur Darwin'schen Evolution befähigt ist."[1, 2] Tatsächlich gibt es jedoch keine einheitliche Definition des Lebens oder einen definierten Zeitpunkt in der Entwicklung eines System, ab dem es als ein lebendes bezeichnet wird.<sup>[3]</sup> Weiterhin besteht das zentrale Problem, dass keine Relikte aus den frühen Erdjahren existieren, die Rückschlüsse auf die vorherrschende Umgebung und die Struktur der ersten Lebewesen zulassen würden. Somit hat sich ein interdisziplinäres Forschungsgebiet entwickelt, in dem Erkenntnisse aus mehreren Fachbereichen wie der Astrophysik, Geochemie, organischen Chemie und Biochemie zusammengetragen werden. Da es keine einheitliche Definition präbiotischer Reaktionsbedingungen gibt, bestehen verschiedene Szenarien und Modelle für die Entstehung des Lebens. Es steht jedoch außer Frage, dass als Voraussetzung für ein lebendiges System zuvor die Biomoleküle entstanden sein müssen, die auch heute noch die Grundlage aller Lebensformen bilden. Dementsprechend müssen aus elementaren organischen und anorganischen Verbindungen zunächst einfache Grundbausteine (Aminosäuren, Nukleobasen, Zucker) gebildet worden sein, die wiederum Bestandteil der komplexen Polymere wurden, deren Netzwerk jede heutige Zelle am Leben hält (Proteine, (Desoxy)ribonukleinsäuren, Phospholipide).

Proteine sind dabei als katalytisch aktive Enzyme oder strukturgebende, informationsspeichernde Polymere eine Biomolekülklasse von zentraler Bedeutung. Allerdings konnte bisher das Auftreten langkettiger Peptide in Szenarien der frühen Erde noch nicht bestätigt werden. In dieser Arbeit sollen neue Syntheserouten zu umfangreichen Peptidmischungen unter möglichen präbiotischen Bedingungen vorgeschlagen werden. Weiterhin soll durch die Entwicklung sensitiver Analytikmethoden der Kapillarelektrophorese-Massenspektrometrie die Aufklärung derartiger Mischungen verbessert werden.

### 2. Kenntnisstand

### 2.1. Der Ursprung des Lebens

#### 2.1.1. Die Bedingungen auf der jungen Erde

Seit der Entstehung der Erde vor 4.54 Milliarden Jahren (Ga) veränderten verschiedenste Ereignisse wie Asteroideneinschläge, Verschiebungen der Lithosphäre oder Eiszeiten wiederholt die vorherrschenden äußerlichen Gegebenheiten und damit die Voraussetzungen für den Ursprung des Lebens.<sup>[4]</sup> Somit ist die Erforschung dieses Ursprungs fest mit der Frage nach dem Zeitpunkt der Entstehung des Lebens verknüpft. Anfänglich trafen den aus Magma bestehenden Planeten noch zahlreiche Asteroideneinschläge, dessen heftigster die Bildung des Monds vor ca. 4.5 Ga zur Folge hatte.<sup>[5, 6]</sup> In der Folge kühlte der Planet ab, wodurch sich flüssiges Wasser bilden konnte. Die ersten Hinweise darauf finden sich schon für den Zeitraum von vor 4.4 Ga und schaffen eine wichtige Grundvoraussetzung für mögliches Leben.<sup>[7, 8]</sup> Doch auch wenn das Erkalten der Erde die Bildung einer Erdkruste und Ozeanen ermöglichte, so konnten vereinzelte Asteroideneinschläge immer noch zu einer zeitweisen starken Erhöhung der Temperatur führen, die einen Großteil der lebenswichtigen organischen Moleküle zerstört hätte.<sup>[9]</sup> Die ersten gesicherten Nachweise irdischer Lebensformen werden durch sogenannte Stromatolithen erbracht. Dabei handelt es sich um Sedimentgesteine, die durch Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen in Gewässern entstanden. Diese lassen sich auf eine Zeit von vor ca. 3.5 Ga zurückdatieren<sup>[10, 11]</sup> und grenzen so den Zeitraum für den Ursprung des Lebens auf die Zeit davor ein. Damit steht für die Bildung der ersten Biomoleküle, deren Verknüpfung zu informationsspeichernden und katalytisch aktiven Polymeren und der Anordnung dieser in einem selbsterhaltenden System ein Zeitraum von 900 Millionen Jahren (Ma) zur Verfügung, der in das Äon des Hadaikums und des frühen Archaikums fällt. In Abbildung 2.1 sind die verschiedenen Erdzeitalter zusammen mit wichtigen Ereignissen und Meilensteinen der Entwicklung des Lebens zusammengefasst.<sup>[12]</sup>

Über die Bedingungen zur Zeit der Entstehung des Lebens auf dem noch jungen Planeten Erde ist noch sehr wenig bekannt. Die bisherigen Erkenntnisse lassen zumindest eine aus heutiger Sicht toxische und sehr unbeständige Welt vermuten, deren Äon nicht ohne Grund nach dem griechischen Gott der Unterwelt benannt ist.<sup>[13, 14]</sup> Aus dem Hadaikum wurden außer geringen Beständen an detritischen Zirkonen bisher keine Gesteinsproben gefunden,



**Abbildung 2.1:** Die Äonen der Erdgeschichte (braun) und damit verbundene, wichtige Ereignisse der Entwicklung der heutigen Lebensformen. Der Ursprung des Lebens kann auf einen Zeitraum zwischen dem Auftreten flüssigen Wassers und den ältesten Stromatolithen eingegrenzt werden. Die zeitliche Entstehung von Einzellern, Photosynthese, Eukaryoten und dem ersten multizellulären Leben kann noch nicht sicher belegt werden. Die Abbildung ist angelehnt an MaxPlanck-Forschung 3/15, S. 70-77.<sup>[12]</sup>

weshalb Aussagen über die damaligen Verhältnisse durch die Theorie der Planetenentstehung und Vergleiche mit anderen Objekten dieses Sonnensystems begründet werden müssen.<sup>[15]</sup> Man geht davon aus, dass die damalige Atmosphäre nicht der heutigen entsprach und vermutet eine eher neutrale Atmosphäre bestehend aus den Hauptkomponenten CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O und H<sub>2</sub>, sowie geringe Konzentrationen an CH<sub>4</sub>, CO, H<sub>2</sub>S, SO<sub>2</sub> und NH<sub>3</sub>.<sup>[16-18]</sup> Ein großer Unterschied liegt weiterhin im Sauerstoffgehalt der Atmosphäre, der im Hadaikum und Archaikum wahrscheinlich zunächst sehr gering war und erst vor ungefähr 2.5 Ga im Zusammenhang mit der Großen Sauerstoffkatastrophe und zunehmender Photosynthese zunahm.<sup>[19]</sup> Auch bezüglich der Temperatur auf dem jungen Planeten lässt sich noch keine feste Aussage treffen. Das Paradoxon der schwachen jungen Sonne beschreibt die Diskrepanz zwischen der noch geringen Strahlungsleistung der Sonne und den trotzdem ausreichend hohen Temperaturen für flüssige Wasservorkommen.<sup>[20]</sup> Die junge Sonne allein hätte noch nicht ausreichend hohe Temperaturen liefern können, um die Temperaturen dauerhaft über dem Gefrierpunkt von Wasser halten zu können, was eine ganzheitlich mit Eis bedeckte Erde zur Folge haben müsste. Denkbar ist, dass Treibhausgase wie CO2 und CH4 schon damals die Temperatur ansteigen ließen. Dementgegen steht nach der Bildung einer Erdkruste die Bindung von CO<sub>2</sub> in Gesteine und entstehende Ozeane, was wiederum eine Abnahme der Temperatur zur Folge hätte. Insgesamt gelten Temperaturen von Minusgraden bis zu ca. 200 °C als möglich. Somit sind sowohl eine großflächige Eisdecke als auch längere Wärmeperioden möglich, zusätzlich amplifiziert durch Meteoroiden und Vulkanismus, die die Eisflächen aufbrechen und über einen längeren Zeitraum schmelzen konnten.<sup>[18, 21]</sup> Weiterhin lag ein weitaus höherer Atmosphärendruck als heute von ungefähr 200 bar vor, der aber im Zusammenhang mit der CO<sub>2</sub>-Absorption innerhalb eines unbekannten Zeitraums auf 1 bar fiel.<sup>[13]</sup>

Ab welchem Zeitpunkt sich große zusammenhängende Landmassen auf dem jungen Planeten Erde gebildet haben, ist nach wie vor umstritten.<sup>[22]</sup> Auch die Zusammensetzung der jungen Lithosphäre ist nicht bekannt, da das Angebot an Mineralen und Metallsalzen entscheidend vom Redoxzustand der Umgebung bestimmt wird. Bei einer neutralen Atmosphäre mit geringem Sauerstoffgehalt würden Metalle eher in ihren tieferen Oxidationszahlen auftreten. So wäre zum Beispiel Cu(II) erst ab einem Sauerstoffpartialdruck von 10<sup>-35</sup> atm für Organismen verfügbar.<sup>[23]</sup> Es ist nicht sicher, ob dieses Level erst im Zusammenhang mit der Großen Sauerstoffkatastrophe erreicht wurde, auch wenn es Hinweise auf Sauerstoff in der präkambrischen Atmosphäre gibt.<sup>[24-27]</sup> Eventuell könnten Cu(II)-Vorkommen auf wenige Sauerstoffoasen beschränkt gewesen sein und nur dort für präbiotische Synthesen zur Verfügung gestanden haben.<sup>[28]</sup> Aufgrund fehlender Plattentektonik wird der Mineralbestand der Erdlithosphäre weitaus begrenzter gewesen sein als heute; einen sehr umfassenden Überblick über wahrscheinliche Minerale des Hadaikums gibt R. M. Hazen.<sup>[29]</sup> Auch konnte die sich bildende Erdkruste immer wieder durch astronomische Himmelskörper aufgeschmolzen und durchmischt werden. Allerdings stellten solche Einschläge auch eine Möglichkeit für den Eintrag von organischem Material dar. Auf Kometen konnte eine Vielzahl an einfachen organischen Verbindungen nachgewiesen werden, darunter Alkohole, Ketone, Aldehyde, Carbonsäuren, Amide und Nitrile. Aber vor allem durch kohlige Chondrite, Meteoriten mit einem besonders hohen Kohlenstoffanteil, fanden auch komplexere Aminosäuren, Nukleinbasen und Fettsäuren dadurch einen Weg auf unsere Erde.<sup>[30, 31]</sup>

Ergänzend zu diesen generellen Annahmen über die Bedingungen im Hadaikum muss die Möglichkeit zusätzlicher, ortsabhängig unterschiedlicher Bedingungen, hervorgerufen durch Phänomene wie Tag-Nacht-Zyklen, Gezeitenströme und die sich verändernde Atmosphäre bedacht werden. Aber auch Jahreszeiten und verschiedene Mikrohabitate ähnlich zu der heutigen Erde sind denkbar.

#### 2.1.2. Potenzielle Szenarien für die Entstehung des Lebens

Entsprechend der vielfältigen und wechselhaften Bedingungen auf dem jungen Planeten, werden diverse Umgebungen für den Ursprung des Lebens vorgeschlagen. Am bekanntesten sind dabei wässrige Milieus wie zum Beispiel die präbiotische Ursuppe oder der warme, kleine Teich Darwins.<sup>[32-35]</sup> Wasser als allgegenwärtiges und effektives Lösemittel von Salzen und diversen organischen Molekülen bietet hierbei die Möglichkeit, verschiedene Monomere zu kumulieren und diese in einem wachsenden System zu immer komplexeren Verbindungen und schließlich Organismen zu verknüpfen. Ergänzt wird dieses Szenario durch das mögliche Auftreten hydrothermaler Quellen, deren einzigartige Chemie einen wichtigen Beitrag zur Synthese essentieller Biomoleküle geleistet haben könnte.<sup>[36]</sup> Hydrothermale Quellen treten in mehreren Kilometern Tiefe auf dem Meeresgrund oberhalb von Magmakammern auf. Durch diese Magmakammern und den extrem hohen Wasserdruck auf dem Meeresboden kann das Wasser auf sehr hohe Temperaturen von bis zu 464 °C erhitzt werden.<sup>[37]</sup> Dadurch lösen sich im heißen Wasser sonst unlösliche Minerale und Gase, die allerdings nach Kontakt mit dem 2 °C kalten Umgebungswasser in Form von feinen Partikeln ausfallen und den Eindruck von Rauchwolken erwecken. Diese Partikel lagern sich sukzessive im Quellbereich an und bilden sogenannte Schornsteine, die eine Höhe von mehreren Metern erreichen können. In Abhängigkeit von der Farbe der austretenden Partikelwolken unterscheidet man zwischen schwarzen und weißen Rauchern, die grundlegend unterschiedliche Charakteristika aufweisen. Schwarze Raucher befinden sich in unmittelbarer Nähe zu Magmablasen, wodurch hauptsächlich Eisen- und Mangansulfide im Wasser gelöst sind, die die schwarzen Partikelwolken verursachen. Typischerweise ist das austretende Wasser sauer (pH 2-3) bei Temperaturen von 400 °C und weist hohe Konzentrationen an gelöstem CO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>S und CH<sub>4</sub> auf.<sup>[36, 38, 39]</sup> Weiße Raucher entstehen ohne den Einfluss von Magmaquellen durch die Reaktion von Meerwasser mit eisenhaltigen Mineralen, wodurch Serpentin-Minerale entstehen. Das austretende Wasser ist stark basisch (pH 9-11) und enthält vor allem Sulfate, Carbonate und Hydroxide. Außerdem betragen die Temperaturen hier nur 40-90 °C und der Anteil an gelöstem CH<sub>4</sub> und H<sub>2</sub> ist hier um einiges höher.<sup>[40, 41]</sup> Diese faszinierende Umgebung mit Temperatur- und Konzentrationsgradienten, einer konstanten Energiequelle und zahlreichen katalytisch aktiven Mineralen bietet heute einem großen Ökosystem einen einmaligen Lebensraum.<sup>[42]</sup> Vor allem Günter Wächtershäuser sah in ihnen schon früh eine besondere Möglichkeit für die Entstehung von Lebensformen im präbiotischen Kontext. In der von ihm vorgeschlagenen Eisen-Schwefel-Welt könnten die ersten Organismen auf Eisen-Schwefel-Mineralen entstanden sein, die die Reduktion von Schwefel mit Wasserstoff als konstante Energiequelle nutzten.<sup>[43-46]</sup> Insbesondere die Bildung unterschiedlicher Molekülklassen wie Peptiden, Nukleotiden und anderen Metaboliten aus dem gleichen Reaktionspfad klingt vielversprechend. Allerdings konnte das Szenario noch nicht im Ganzen experimentell bestätigt werden.<sup>[47, 48]</sup>

Zusätzlich wird das Szenario der präbiotischen Ursuppe durch das Auftreten von austrocknenden Lagunen<sup>[49, 50]</sup> oder mit Wasser gefüllten Kometenkratern ergänzt.<sup>[51-53]</sup> In diesen Umgebungen könnten Reaktanten aufkonzentriert worden sein oder es standen durch einen weichen Aufprall des Himmelskörpers ein wärmeres Umfeld mit zusätzlichem organischem Material und somit besonders förderliche Bedingungen zur Entstehung der ersten Biomoleküle zur Verfügung. Ein ähnlicher Effekt der Aufkonzentration wird mit Nass-Trocken-Zyklen erzielt, die Gezeitenströme, Jahreszeiten oder Tag-Nacht-Zyklen simulieren sollen.<sup>[54, 55]</sup>

Allerdings werden nicht nur wässrige Umgebungen für die Entstehung der ersten Biomoleküle in Betracht gezogen. Gänzlich lösemittelfreie Gegebenheiten könnten auf den sich bildenden Landmassen des frühen Planeten vorgeherrscht haben. So wurden heiße Wüsten oder Strände als möglicher Ort für Phosphorylierungen in Betracht gezogen.<sup>[56]</sup> Ergänzend zur Wärme als Energiequelle könnten dabei auch mechanische Einflüsse tektonischer Bewegungen oder auch einschlagender Himmelskörper eine Rolle gespielt haben. In diesem Umfeld wurden präbiotische Strecker- und Zuckersynthesen realisiert.<sup>[57-59]</sup>

Als weitere Alternativen zu den wässrigen Bedingungen der Ursuppe und der trockenen Umgebung der Erdkruste wurden Formamid als Lösemittel,<sup>[60, 61]</sup> eutektische Lösungen<sup>[62, 63]</sup> oder auch die magmatischen Bedingungen von Vulkanen vorgeschlagen.<sup>[64, 65]</sup> Heute sorgen vor allem die mineralreichen Böden in der Nähe von Vulkanen für eine besonders fruchtbare Umgebung. Auf dem Urplaneten könnten hingegen die ausgestoßenen Gase eine besondere Rolle eingenommen haben. Die Zusammensetzung vulkanischer Gase wird durch das Magma bestimmt und kann in Abhängigkeit von der Vulkanlage unterschiedlich sein. Hauptbestandteile sind Wasserdampf in Kombination mit CO<sub>2</sub>, HCl, SO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>S.<sup>[66, 67]</sup> Unter den extremen Bedingungen des Hadaikums und dem damit verbundenen erhöhten Atmosphärendruck könnte aber speziell SO2 aufgrund seines geringen Dampfdrucks und der niedrigen Siedetemperatur wieder in flüssiger Form auf der Erde kondensiert sein.<sup>[68, 69, 13]</sup> Auch andere Planeten weisen heute noch große Mengen an SO<sub>2</sub> auf.<sup>[70]</sup> Kasting *et al.* schätzen für die frühe Erde einen SO<sub>2</sub>-Partialdruck von  $5.8 \times 10^{-9}$  atm, Halevy *et al.* nehmen eine obere Grenze des Partialdruckverhältnisses zwischen  $CO_2$ und SO<sub>2</sub> von  $p_{SO_2}$ :  $p_{CO_2} = 1.3 \times 10^{-8}$  an.<sup>[71, 72]</sup> Insgesamt steht das Vorhandensein von SO<sub>2</sub> auf der frühen Erde außer Frage und flüssige Vorkommen insbesondere in der näheren Umgebung von Vulkanen gelten als sehr wahrscheinlich. So gewinnt SO<sub>2</sub> als alternatives Lösemittel immer mehr an Bedeutung und wurde schon in verschiedenen präbiotischen Synthesen untersucht, allerdings wurden meist Sulfite in Wasser gelöst, um flüssiges SO<sub>2</sub> zu simulieren.<sup>[73-77]</sup>

Natürlich besteht auch die Möglichkeit, dass das Leben seinen Ursprung gar nicht auf der Erde, sondern auf einem ganz anderen Planteten dieses Universums unter vorteilhafteren Bedingungen fand. Vertreter der Panspermie-Hypothese argumentieren, dass einfache Lebensformen auch über große Distanzen des Weltalls transportiert werden können und so das Leben auf die Erde brachten. Unterstützt wird diese Theorie durch das Vorkommen zahlreicher organischer Verbindungen auf astronomischen Objekten (siehe voriges Kapitel) und der Tatsache, dass Materialien auf Meteoriten unter sterilen Bedingungen durch das All transportiert werden können, ohne sie extremen Temperaturen oder schädlicher UV-Strahlung auszusetzen.<sup>[78]</sup> Allerdings setzt diese Theorie voraus, dass Lebensformen die Reise über einen längeren Zeitraum im Weltall und den anschließenden Aufschlag auf der Erde unversehrt überleben können, was als sehr unwahrscheinlich betrachtet wird.<sup>[79]</sup> Insbesondere wird so die Frage nach der Entstehung des Lebens nicht gelöst, sondern lediglich auf einen anderen Ort verschoben.<sup>[80]</sup>

Auch wenn also über die Zeit während des Ursprung des Lebens hauptsächlich Vermutungen angestellt werden müssen, so zeichnen die bisherigen Erkenntnisse ein drastisches Bild einer jungen, chaotischen und toxischen Erde, die kaum unterschiedlicher von unserer heutigen Welt sein könnte. Die ersten Biomoleküle entstanden unter extremen äußeren Einflüssen und heute undenkbaren Bedingungen. Ein begrenztes Angebot an organischem und anorganischem Material bildete unter Temperatur-, Druck-, und Konzentrationsschwankungen, zwischen Asteroideneinschlägen und Vulkanausbrüchen, in Wasser oder alternativen Lösemitteln die ersten Bausteine des Lebens. Dementsprechend können präbiotische Reaktionsbedingungen nicht im Detail definiert werden, aber präbiotische Reaktionen sollten sich durch eine limitierte Anzahl einfacher Edukte und einen robusten, einfachen Reaktionspfad unter fluktuierenden äußeren Einflüssen auszeichnen.

### 2.2. Die Peptid-Welt

Aufgrund der großen Vielfalt an katalytischen, strukturellen und informationsspeichernden Funktionen, die Proteine in der Natur erfüllen, erhält die Peptidknüpfung für die Entstehung des Lebens auf der Erde eine zentrale Bedeutung.<sup>[81]</sup> Die Bindung zwischen der Amino- und Carboxylgruppe nicht aktivierter Aminosäuren verläuft über eine Kondensationsreaktion, die im wässrigen Medium allerdings sowohl kinetisch als auch thermodynamisch gehemmt ist.<sup>[82]</sup> Bei der Dimerisierung der strukturell einfachsten Aminosäure Glycin (Gly) zu Gly<sub>2</sub> beträgt bei Raumtemperatur und neutralem pH-Wert die Gleichgewichtskonstante  $2.51 \times 10^{-3}$ .<sup>[83]</sup> Dementsprechend liegt das Gleichgewicht weit auf der Seite der Edukte und lediglich 0.01 % Gly werden umgesetzt. Durch Katalysatoren und Aktivierung der Aminosäuren können die kinetische und thermodynamische Barriere der Peptidkopplung herabgesetzt werden. Im Folgenden soll vorgestellt werden, wie dies in der Natur, im Labor und in präbiotischen Szenarien realisiert wird.

#### 2.2.1. Die Proteinbiosynthese

Da die Struktur aller Proteine in der Desoxyribonukleinsäure (DNA) des jeweiligen Organismus kodiert ist, geht der Proteinbiosynthese zunächst der Prozess der Transkription voraus. Dabei wird die Sequenz der Basenpaare des DNA-Doppelstrangs auf eine einsträngige Messenger-RNA (mRNA) umgeschrieben. Während der Translation wird dann die Nukleinsäuresequenz in eine Aminosäuresequenz übersetzt; ein mRNA-Strang dient also als Bauplan für ein spezifisches Protein.<sup>[84]</sup> Dabei bilden drei aufeinanderfolgende Basen ein sogenanntes Codon, das immer eine spezifische Aminosäure kodiert. Jedoch kann eine Aminosäure von mehr als einem Codon kodiert werden und so die Effektivität der Proteinsynthese verbessern. Durch die fehlerhafte Übersetzung eines Codons entsteht nicht zwingend ein fehlerbehaftetes Protein. Meist erfolgt die Auswertung der dritten Base eines Codons nicht so genau wie die der ersten beiden (Wobble-Mechanismus). So wird zum Beispiel die Aminosäure Valin (Val) von vier verschiedenen Codonen kodiert, die sich lediglich in der Natur der dritten Base unterscheiden. Die Aminosäuren können selbst nicht spezifisch an ein Codon binden, um dieses abzulesen. Hierfür werden Transfer-RNA-Moleküle (tRNA) als Vermittler eingesetzt. Sie verfügen über ein Anticodon, dessen Basensequenz komplementär zu einem Codon der mRNA ist und binden die dazu passende Aminosäure. Eine extrem wichtige Rolle kommt dabei den Aminoacyl-tRNA-Synthetasen zu, die zum einen die Verbindung zwischen tRNA und passender Aminosäure katalysieren. Dazu werden sowohl die funktionellen Gruppen und die Form der Aminosäure als auch das Anticodon der tRNA erkannt. Zum anderen erfolgt hier der erste wichtige Schritt der Peptidknüpfung indem mit der Bindung zwischen Aminosäure und tRNA gleichzeitig die Aminosäure aktiviert wird. Diese Aktivierung erfolgt dabei in zwei Schritten: Zunächst wird die Aminosäure auf Adenosintriphosphat (ATP) unter Bildung eines Aminoacyladenylats (Aminoacyl-AMP) übertragen. Danach erfolgt die Übertragung der Aminosäure auf das endständige Adenosinnukleosid der tRNA (Abbildung 2.2). Die so entstandene Aminoacyl-tRNA entspricht einer aktivierten Form der Aminosäure durch die Bildung eines Aminosäureesters. Die Energie für diese Aktivierung stammt aus der Hydrolyse des Pyrophosphats und die Gibbs-Energie der Gesamtreaktion liegt nahe 0. Für jede Bildung einer Aminoacyl-tRNA werden somit zwei Äquivalente ATP benötigt, eines dient der Bildung der Esterbindung, das andere treibt die Reaktion voran. Die tatsächliche Peptidknüpfung zu langkettigen Proteinen findet daraufhin im Ribosom statt. Das Ribosom ist ein hochkomplexes Molekül, das sowohl aus Peptid- als auch aus RNA-Partikeln besteht.<sup>[85]</sup> Den größeren Massenanteil (etwa 2/3) bilden RNA-Ketten und auch die eigentliche katalytische Aktivität des Ribosoms geht auf die RNA-Anteile zurück, sodass das Ribosom zu den Ribozymen gezählt wird. Hier werden die Codonen der mRNA von Aminoacyl-tRNAs abgelesen. Im Prinzip bestehen im Ribosom zwei Bindungsstellen für diese tRNAs, die A-(Aminoacyl-) und P-(Peptidyl-)-Stelle (ergänzt durch eine E-(Exit-)Stelle). An der P-Stelle entsteht das wachsende Peptid, während an der A-Stelle Aminoacyl-tRNAs die neuen Aminosäuren dafür liefern (Abbildung 2.3). Der genaue Mechanismus der Peptidknüpfung zwischen den beiden Aminosäuren im Peptidyltransferasezentrum ist noch unklar.<sup>[86-88]</sup> Allerdings weisen viele Faktoren darauf hin, dass durch das Ribosom die Annäherung der beiden Aminosäuren in einer optimalen Ausrichtung ermöglicht wird.



#### Aminoacyl-AMP

Aminoacyl-tRNA

Abbildung 2.2: Vorbereitung der Peptidknüpfung: Aktivierung der Aminosäuren in den Aminoacyl-tRNA-Synthetasen durch Bildung eines Aminosäureesters unter ATP-Verbrauch.

Somit erfolgt die Katalyse durch eine Verringerung der Entropie der Peptidbindungsaktivierung, was verglichen mit der nicht katalysierten Reaktion zu einer Beschleunigung der Bindungsknüpfung um den Faktor 10<sup>6</sup> führt.<sup>[89]</sup>

Insgesamt werden somit die kinetische und thermodynamische Barriere der Peptidknüpfung im wässrigen Medium durch eine anfängliche Aktivierung des Aminosäure-C-Terminus zum Aminosäureester unter ATP-Verbrauch und einer darauffolgenden exakten Ausrichtung zweier aktivierter Aminosäuren im Ribozym überwunden. Es erfolgt immer ein Angriff der Aminofunktion und damit eine Syntheserichtung vom N- zum C-Terminus. Die Proteinbiosynthese verläuft bei allen Lebewesen sehr ähnlich, was für die frühe Entstehung der Peptidsynthese in der Evolution und die fundamentale Bedeutung von Peptiden für jegliche Organismen spricht. Diese Systeme produzieren Peptide mit einer unvergleichlich hohen Geschwindigkeit und Präzision. Die Fehlerquote der Translation liegt bei ca. 10<sup>-4</sup>, d. h. lediglich eine von 10 000 eingebauten Aminosäuren ist falsch. Außerdem werden pro Sekunde 10-20 Aminosäuren in die wachsende Aminosäuresequenz verbaut, ein Peptid durchschnittlicher Länge wird somit in noch nicht mal einer Minute synthetisiert. Des Weiteren kann ein RNA-Strang von mehreren Ribosomen gleichzeitig abgelesen werden (Polysom), wodurch die Proteinsynthese weiter beschleunigt wird. Insgesamt muss für den gesamten Prozess das Zusammenspiel von über 100 Makromolekülen orchestriert werden, was die Proteinbiosynthese als ein wahres Wunderwerk der Natur auszeichnet.



Abbildung 2.3: Peptidknüpfung im Ribosom: Die Aminosäure der an der A-Stelle gebundenen tRNA greift die Aminosäure der an der P-Stelle gebundenen tRNA nukleophil an. Im weiteren Verlauf tritt die tRNA der P-Stelle aus dem Ribosom aus und die peptidtragende tRNA der A-Stelle wechselt auf die P-Stelle. Die nun freie A-Stelle kann von einer neuen Aminoacyl-tRNA besetzt werden.

### 2.2.2. Die Laborsynthese von Peptiden

In modernen Peptidsynthesen wird standardmäßig die Carboxylgruppe einer Aminosäure aktiviert, woraufhin ein nukleophiler Angriff der Aminogruppe einer zweiten Aminosäure folgt. Für die gezielte und einheitliche Synthese spezifischer Aminosäuresequenzen wurde in diesem Zusammenhang die Festphasenpeptidsynthese von Robert Bruce Merrifield entwickelt.<sup>[90]</sup> Hierbei erfolgt die Synthese vom C- zum N-Terminus (entgegen der Richtung der Proteinbiosynthese) und wird durch die Bindung der ersten Aminosäure an ein unlösliches Kunstharz eingeleitet (Abbildung 2.4). Die Bindung erfolgt dabei über die Carboxylgruppe, was eine Reaktion dieses Terminus im weiteren Verlauf der Peptidverlängerung verhindert, während die Aminogruppe durch eine Schutzgruppe deaktiviert ist. Im nächsten Spülschritt wird diese Schutzgruppe entfernt, um die Kopplung einer weiteren Aminosäure zu ermöglichen. Dazu wird eine am C-Terminus aktivierte und am N-Terminus geschützte Aminosäure zugegeben. In diesem Schritt sind nur eine Aminogruppe und eine Carboxylgruppe jeweils einer Aminosäure für die Peptidknüpfung verfügbar, sodass Nebenreaktionen effektiv vermieden werden. Weiterhin ermöglicht das Kunstharz, dass überschüssige Reagenzien in beliebig vielen Spülschritten ausgewaschen werden können. Das um eine Aminosäure verlängerte Peptid bleibt dabei auf dem unlöslichen Kunstharz zurück. Der Vorgang der Kettenverlängerung kann nach dem gleichen Prinzip beliebig oft wiederholt werden und nach erfolgter Synthese des gewünschten Peptids wird dieses vom Kunstharz abgelöst. Durch die Spülschritte während der Synthese muss dieses meist nicht weiter aufgereinigt werden. Weiterhin kann die Synthese im gleichen Reaktionsgefäß erfolgen und leicht automatisiert werden. Dadurch können routinemäßig Peptide einer Länge von 50 Aminosäuren in guter Ausbeute und Reinheit synthetisiert werden. Merrifield erhielt für die Entwicklung dieser Synthese 1984 den Nobelpreis für Chemie.

Ursprünglich wurden bei der Synthese ein Copolymer aus Styrol und Divinylbenzol als Harz, eine Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppe des N-Terminus und zur Aktivierung der Carboxylgruppe *N*,*N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) verwendet. Mittlerweile sind viele verschiedene Kombinationen unterschiedlicher Kunstharze, Schutzgruppen und Aktivierungsreagenzien in Verwendung. Für individuell unterschiedliche Aspekte der Peptidknüpfung (wie z. B. der Erhaltung der Stereoinformation, Optimierung der Ausbeute oder Reduzierung der Nebenprodukte) wurde eine immense Anzahl an Kupplungsreagenzien entwickelt.<sup>[91-94]</sup>



**Abbildung 2.4:** Die Festphasenpeptidsynthese unter Verwendung eines Wang-Harzes, der Fluorenylmethoxycarbonyl(Fmoc)-Schutzgruppe und 2-(1*H*-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HBTU) zur Aktivierung des C-Terminus.

Damit in jedem Syntheseschritt die gewünschten Peptidbindungen geknüpft werden, ist es erforderlich, die Seitengruppen mancher Aminosäuren zusätzlich zu schützen. Auch aufgrund dieser hydrophoben Schutzgruppen und der damit verbundenen abnehmenden Löslichkeit des Peptids ist eine Synthese von höheren Oligomeren schwierig. Längere Peptide mit 100 Aminosäuren können über die Verknüpfung von synthetischen Peptiden durch die Peptidligation hergestellt werden. Bezüglich der Ausbeuten und Geschwindigkeiten der Peptidkupplungen wurden in den letzten Jahren erhebliche Fortschritte erzielt. In geschwindigkeitsoptimierten Varianten der Synthese wird ohne große Ausbeuteverluste für die Verlängerung der Peptidkette um eine Aminosäure 40 Sekunden benötigt.<sup>[95, 96]</sup> Allerdings können ohne die Anwesenheit des dirigierenden Ribosoms nicht annähernd die Geschwindigkeiten der Proteinbiosynthese erzielt werden. Hier wird in der gleichen Zeit ein komplettes Peptid einer durchschnittlichen Länge von 400 Aminosäuren synthetisiert.

#### 2.2.3. Präbiotische Peptidsynthesen

#### Präbiotische Aminosäuresynthesen

Die erste präbiotische Aminosäuresynthese wurde in bedeutender Pionierarbeit von Stanley Lloyd Miller und Harold Clayton Urey 1953 durchgeführt, die damit auch eine experimentelle Unterstützung der Theorie Oparins von der präbiotischen Ursuppe lieferten.<sup>[97]</sup> In dem Experiment zirkulierte eine nach damaligem Verständnis präbiotische Atmosphäre bestehend aus CH<sub>4</sub>, NH<sub>3</sub> und H<sub>2</sub> über siedendem Wasser und wurde zusätzlich elektrischen Entladungen ausgesetzt, die Blitze simulieren sollten. Im Anschluss konnten in der wässrigen Phase die proteinogenen Aminosäuren Gly, Alanin (Ala) und Asparaginsäure (Asp) neben den nicht-proteinogenen Aminosäuren  $\beta$ -Alanin und  $\alpha$ -Aminobuttersäure nachgewiesen werden. Kürzlich konnte durch wiederholte Untersuchungen der Proben mit moderneren Analytikmethoden die Entstehung von 23 Aminosäuren und weiteren Dipeptiden und Diketopiperazinen gezeigt werden.<sup>[98-101]</sup> Der vorgeschlagene Mechanismus der Aminosäuresynthese folgt dabei einer Variation der Strecker-Synthese (Abbildung 2.5). Nach anfänglicher Bildung von HCN und Aldehyden in der Gasphase und der darauffolgenden Kondensation



Abbildung 2.5: Mechanismus der präbiotischen Bildung von α-Amino- und Hydroxysäuren über eine Strecker-Variation.

dieser mit NH<sub>3</sub> in Wasser entstehen α-Aminonitrile. Aus diesen werden durch Hydrolyse die α-Aminosäuren gebildet, wobei das ursprüngliche Aldehyd die Struktur der Aminosäure bestimmt. Im Verlauf des Experiments tritt neben HCN in großem Umfang Cyanoacetylen auf, das nach Kondensation mit NH4CN und nachfolgender Hydrolyse zu Asp weiterreagiert.<sup>[102, 103]</sup> Miller konnte so erstmals die Synthese grundlegender Lebensbausteine aus abiotischer Materie nachweisen und gab somit den Anstoß für eine umfangreiche Erforschung der Entstehung des Lebens.<sup>[104]</sup> Allerdings entspricht die verwendete, sehr reduzierende Gasmischung nach heutigen Erkenntnissen nicht der Atmosphäre der frühen Erde, die wesentlich geringere Anteile an CH<sub>4</sub> und NH<sub>3</sub> aufwies und größtenteils aus CO<sub>2</sub> und N<sub>2</sub> bestand. Versuche, die Synthese unter einer neutralen Atmosphäre zu reproduzieren, lieferten nicht die gewohnten Ausbeuten und meist nur Gly als einziges Aminosäureprodukt.<sup>[105]</sup> Allerdings konnte unter Verwendung eines Puffers in der wässrigen Phase (pH 7) und Fe<sup>2+</sup> als Oxidationsinhibitor die anfängliche Aminosäurediversität in den gewohnten Ausbeuten wiederhergestellt werden.<sup>[106]</sup> Somit ist die Aminosäuresynthese zwar sowohl vom Redoxzustand der Atmosphäre als auch von den Bedingungen des Urozeans abhängig, bleibt aber trotzdem ein realistisches Szenario für das Vorkommen eines vielfältigen Angebots an Aminosäuren auf der frühen Erde.

Auch hydrothermale Quellen wurden für präbiotische Aminosäuresynthesen in Betracht gezogen, da Formaldehyd mit NH<sub>3</sub> und Cyanidsalzen in guten Ausbeuten zu diversen Aminosäuren reagiert.<sup>[107, 108]</sup> Allerdings konnte weder Formaldehyd noch HCN in heutigen hydrothermalen Quellen nachgewiesen werden und auch die Stabilität von Aminosäuren bei den vorherrschenden hohen Temperaturen wird in Frage gestellt.<sup>[109]</sup> Die Aminosäuresynthese in der Umgebung von hydrothermalen Quellen ist also möglich, allerdings müssen besondere Bedingungen vorliegen, damit der Aminosäureabbau nicht den Aufbau überwiegt.

Wie bereits erwähnt könnten Aminosäuren auch zusammen mit anderem organischem Material auf Kometen, Meteoriten und kohligen Chondriten auf die Erde übertragen worden sein.<sup>[30, 31]</sup> Interessanterweise konnte für manche auf Meteoriten nachgewiesenen Aminosäuren eine Anreicherung des L-Enantiomers beobachtet werden, wodurch auch eine mögliche Erklärung für den Ursprung der Homochiralität auf der Erde geliefert werden könnte.<sup>[110]</sup>

Insgesamt konnte mit Ausnahme von Glutamin (Gln) und Tryptophan (Trp) für jede proteinogene Aminosäure ein abiotischer Syntheseweg oder eine extraterrestrische Quelle nachgewiesen werden, was auf ein breites Angebot von Aminosäuren auf der jungen Erde hindeutet. Am häufigsten werden neben Gly und Ala die Aminosäuren Prolin (Pro), Val, Serin (Ser), Leucin (Leu), Isoleucin (Ile), Threonin (Thr), Asp und Glutaminsäure (Glu) gebildet.<sup>[111]</sup> Man nimmt an, dass die ersten Proteine auch aus eben diesen Aminosäuren aufgebaut waren, allerdings ist die Fragestellung nach dominant auftretenden, präbiotischen Aminosäuren sehr komplex und noch nicht gelöst. Nicht-proteinogene Aminosäuren, die im Lauf der Zeit ihre Funktion verloren haben oder ersetzt wurden, könnten zusätzlich eine Rolle gespielt haben. Der Zeitpunkt und die Häufigkeit des Auftretens spezifischer Aminosäuren wird rege diskutiert.<sup>[112, 113]</sup>

### Thermische Umsetzung von Aminosäuren zu Peptiden unter dehydratisierenden Bedingungen

Die ersten Peptidsynthesen auf der frühen Erde müssen die thermodynamische und kinetische Barriere der Peptidknüpfung ohne katalysierende Enzyme oder moderne Kupplungsreagenzien überwunden haben. Dementsprechend geht diesen Synthesen ein hohes Maß an Effektivität verloren, weshalb Peptidkopplungsreaktionen meist über Tage und oft über Wochen observiert werden. Dafür wurden zahlreiche Ansätze vorgeschlagen, wovon sich manche miteinander kombinieren lassen. Zum einen werden zahlreiche präbiotische Peptidsynthesen durch den Einsatz von Mineralen ergänzt, die über verschiedene Mechanismen die Synthese positiv beeinflussen. Sie können dabei die Aminosäuren einer verdünnten Lösung auf der Mineraloberfläche konzentrieren und vorselektieren, Kondensationsreaktionen katalysieren und die entstehenden Polymere durch Oberflächenadsorption stabilisieren. Schon 1951 schlug John Desmond Bernal Tonminerale als mögliche Katalysatoren von Kondensationsreaktionen im adsorbierten Zustand vor und bis heute konnte diese Theorie der "chemistry on the rocks" für ein großes Spektrum an zusätzlichen Mineralen wie Oxiden, Hydroxiden, Sulfiden und Silicaten bestätigt werden.<sup>[114-118]</sup> Weiterhin werden in präbiotischen Peptidsynthesen mehrfach Nass-Trocken-Zyklen angewandt, um eine Aufkonzentration der Edukte durch Gezeitenströme oder Tag-Nacht-Zyklen zu simulieren. Es wird argumentiert, dass diese wechselnden Bedingungen aus wiederholter Kumulation und Verdünnung zu einem dauerhaften Zustand abseits des Gleichgewichts führen können und so Kondensationsreaktionen effektiver katalysieren als Aktivierungsreagenzien.<sup>[119, 120]</sup>

Die einfachste Methode, das Gleichgewicht der Kondensation von Aminosäuren auf die Seite der Peptide zu verschieben, ist das direkte Erhitzen von Aminosäuremischungen. Bei erhöhten Temperaturen wird das entstehende Kondensationswasser der Bindungsknüpfung vertrieben und die Gleichgewichtskonstante der Peptidbildung nimmt zu.<sup>[121]</sup> In ersten Studien wurden in einer gänzlich wasserfreien Umgebung Aminosäuremischungen mit einem

großen Überschuss der sauren Aminosäuren Glu und Asp bei ca. 170 °C über variierende Zeiträume geschmolzen. In der Produktmischung konnten tatsächlich Peptidbindungen nachgewiesen werden und die entstandenen Polymere wurden Proteinoide getauft.<sup>[122, 123]</sup> Allerdings konnte in späteren Untersuchungen nachgewiesen werden, dass dabei jegliche Aminosäureseitenketten reagieren und die Monomere nicht nur durch α-, sondern sehr unspezifisch auch mit  $\beta$ -Peptidbindungen miteinander verknüpft sind.<sup>[124]</sup> Abgesehen davon gilt das Szenario der Synthese als sehr unwahrscheinlich, da in keiner bestehenden präbiotischen Aminosäuresynthese bisher ein derartiger Überschuss an sauren Aminosäuren nachgewiesen werden konnte. Und auch wenn die Temperatur durch den Einsatz von Phosphorsäure oder längeren Reaktionszeiten ab 81 Tagen verringert werden kann, so folgt ohne den Überschuss der Dicarbonsäuren die Zersetzung der übrigen Aminosäuren.<sup>[125, 126]</sup> Durch die Verwendung von Nass-Trocken-Zyklen und unterschiedlichen Tonmineralen kann allerdings auch bei geringeren Temperaturen die Bildung kurzer Peptide (bis Gly<sub>6</sub>) beobachtet werden.<sup>[54, 127, 128]</sup> Außerdem kann die Kettenlänge weiter verlängert werden, wenn die Nass-Trocken-Zyklen von einer Mischung wasserziehender Minerale hervorgerufen werden. Diese entziehen in Phasen des Abkühlens der Umgebungsluft geringe Mengen an Feuchtigkeit und verhindern so eine zu hohe Verdünnung der Reaktanten. Dabei konnten Polymere mit einer Kettenlänge von bis zu Gly<sub>13</sub> nachgewiesen werden.<sup>[129]</sup> Doch auch allein durch thermische Umsetzung bei Temperaturen zwischen 90–130 °C können deutliche Mengen an Peptiden gebildet werden.<sup>[130]</sup> Dazu wurden wässrige Lösungen 10 unterschiedlicher, nicht aktivierter Aminosäuren unter dem Einsatz von Nass-Trocken-Zyklen erhitzt und der Einfluss des pH-Werts, der Monomerkonzentration und der Anzahl und Dauer der Zyklen untersucht. In darauffolgenden Versuchen wurden zusätzlich verschiedene Minerale und Salze in der Reaktion verwendet.<sup>[131]</sup> Als längstes Polypeptid konnte Gly<sub>12</sub> nach nur einem Zyklus nachgewiesen und damit auch die Effektivität des einfachen Erhitzens von Aminosäuremischungen aufgezeigt werden. Im präbiotischen Szenario der Aufkonzentration durch Erhitzen muss allerdings beachtet werden, dass die Reaktionsmischung rein vorliegen muss und keine anderen Stoffe beinhalten darf, die die Polymerisation stören oder terminieren können.

Die hohen Temperaturen im wässrigen Milieu könnten unter dem hohen Druck der Tiefsee in hydrothermalen Quellen auftreten. In diesem Zusammenhang wurde die Peptidbildung in Druckreaktoren unter sehr hohen Temperaturen von 200–350 °C untersucht.<sup>[132, 133]</sup> Dabei wurden die Aminosäurelösungen zusätzlich zwischen heißen und kalten Gebieten zirkuliert, um der Zersetzung der Aminosäuren unter den extremen Reaktionsbedingungen vorzubeugen. Tatsächlich konnten kurze Peptide bis Gly<sub>6</sub> in der Reaktionsmischung nachgewiesen werden. Auch in dieser Umgebung scheinen Minerale einen zusätzlichen positiven Einfluss auf die Peptidbildung zu haben.<sup>[134, 135]</sup> Allerdings begünstigen die rauen Bedingungen auch viele Nebenreaktionen. Wie schon erwähnt, findet unter den erhöhten Temperaturen eine verstärkte Zersetzung der Aminosäuren statt und auch die Hydrolysegeschwindigkeit von Peptiden nimmt zu.<sup>[109, 136, 137]</sup> So fällt es auch schwer, die verwendeten hohen Aminosäurekonzentrationen zu rechtfertigen, die für erfolgreiche Peptidsynthesen in dieser Umgebung benötigt werden. Somit müssen hydrothermale Quellen als Ursprung präbiotischer Peptide kritisch betrachtet werden.<sup>[138]</sup>

Alternative Versuche, dehydratisierende Bedingungen für begünstigte Peptidknüpfungen zu schaffen, beinhalten Peptidkupplungen an der hydrophoben Wasser-Luft-Grenzfläche,<sup>[139, 140]</sup> in geschmolzenem Harnstoff<sup>[141]</sup> oder in der Abwesenheit von Lösemitteln unter Einwirkung mechanischer Kräfte.<sup>[142]</sup>

Durch Aktivierungsreagenzien unterstützte Peptidkondensation In der modernen synthetischen Peptidchemie werden Kupplungsreagenzien für die Knüpfung neuer Peptidbindungen verwendet (siehe Kapitel 2.2.2). So wird die thermodynamisch ungünstige Peptidbildung durch die energetisch vorteilhafte Hydrolyse des Kupplungsreagenzes vorangetrieben. Die dafür verwendeten Reagenzien waren auf der präbiotischen Erde nicht verfügbar, stattdessen wurde eine Vielzahl an möglichen Alternativen vorgeschlagen. Bisher wurden Cyanamid, Dicyanamid, Dicyandiamid, Diaminomaleonitril, Harnstoff, Polyphosphate, Diamidophosphat (DAP), Imidazol, Carbonylsulfid (COS), Kohlenstoffdisul-



Abbildung 2.6: Präbiotische Aktivierungsreagenzien zur Peptidknüpfung.

fid (CS<sub>2</sub>), N,N'-Carbonyldiimidazol (CDI) und 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) als präbiotische Aktivierungsmittel einfacher Aminosäuren untersucht (Abbildung 2.6).<sup>[143-158]</sup> Cyanamid wurde schon von Miller in seinen Experimenten zur Entstehung von Aminosäuren unter einer präbiotischen Atmosphäre verwendet und dabei intermittierend der Reaktionsmischung zugegeben. Allerdings wurden die Proben nie von ihm selbst untersucht und erst später von Bada et al. analysiert. Dabei konnten neben Aminosäuren zusätzlich auch Gly-haltige Dipeptide nachgewiesen werden.<sup>[159]</sup> Polyphosphate können in einem vulkanischem Umfeld auftreten, auch wenn nicht bekannt ist in welchem Umfang.<sup>[65]</sup> Auffällig ist, dass diese Phosphate die Bildung mehrerer Biomolekülklassen katalysieren können. Trimetaphosphat begünstigt die Bildung von Dipeptiden unter alkalischen Bedingungen.<sup>[149]</sup> Aus Polyphosphaten gebildetes DAP kann sowohl Kondensationsreaktionen als auch Phosphorylierungen katalysieren. So werden in einer Mischung aus Aminosäuren, Nukleosiden, Triphosphaten, Imidazol und Magnesium gleichzeitig Peptide und Oligonukleotide gebildet.<sup>[155]</sup> In einem präbiotischen Szenario hydrothermaler Quellen wurden in einer alkalischen Aminosäurelösung unter Anwesenheit von (Ni,Fe)S und der vulkanischen Gase H<sub>2</sub>S und CO nach Erhitzen Dipeptide und Spuren an Tripeptiden detektiert.<sup>[154]</sup> Spätere Studien konnten zeigen, dass unter den Bedingungen in situ gebildetes COS mit Aminosäuren zu den aktivierten N-Carboxyanhydriden (NCAs) reagiert.<sup>[160, 152]</sup> Über diese wird weiterhin die Synthese wichtiger energiereicher Aminoacylphosphate mehrerer Molekülklassen ermöglicht. NCAs als aktivierte Vorläufermoleküle zur Peptidbildung, deren Synthesewege und Reaktionsmechanismen werden im nächsten Abschnitt ausführlicher beschrieben. Durch eine kontinuierliche Zugabe von COS-aktivierten Aminosäuren können Peptide von einer Länge bis zu 15 Einheiten entstehen.<sup>[161]</sup> Noch heute ist COS ein Bestandteil vulkanischer Gase, kommt allerdings nur in Anteilen von unter 0.09 % vor.<sup>[162]</sup> CDI und EDC werden meist im Zusammenhang mit Mineralen verwendet und dienen dann eher der Aufklärung von Polymerisationsmechanismen auf deren Oberfläche.<sup>[157, 158]</sup> Die präbiotische Bedeutung der beiden Reagenzien ist in Frage zu stellen. Zwar kann unsubstituiertes Carbodiimid in Anwesenheit von Wasser durch die Tautomerisierung von Cyanamid hergestellt werden, allerdings passiert dies erst bei extrem tiefen Temperaturen unter 100 K.<sup>[163]</sup> Auch generell muss die Plausibilität präbiotischer Kupplungsreagenzien kritisch betrachtet werden. Zum einen wurden viele der Reagenzien nur auf eine limitierte Menge an Aminosäuren (meist Gly) angewendet. Es ist allerdings wichtig zu verifizieren, dass auch die Kondensation aller übrigen proteinogenen Aminosäuren katalysiert werden kann. Weiterhin werden oftmals Nebenreaktionen der Reagenzien beobachtet, was die Effizienz der Aktivierung verringert. Somit müssen sie oft in hohen Konzentrationen eingesetzt werden, was wiederum ein erhöhtes lokales Vorkommen oder eine äußerst ergiebige Synthese der Reagenzien voraussetzt. Im präbiotischen Kontext erweist sich dies oft als schwierig.

Eine etwas andere Form der Aktivierung erfolgt bei der Bildung sogenannter Depsipeptide. Diese entstehen durch Copolymerisation von Aminosäuren mit a-Hydroxysäuren wie Milchsäure und Glycolsäure. Das Vorkommen von  $\alpha$ -Hydroxysäuren auf der frühen Erde gilt als plausibel, da diese einerseits als Nebenprodukte präbiotischer Aminosäuresynthesen auftreten (Abbildung 2.5) und sie weiterhin auch auf Meteoriten nachgewiesen werden konnten.<sup>[164, 165]</sup> Ein gemeinsames lokales Vorkommen von Aminosäuren und α-Hydroxysäuren ist somit naheliegend. Setzt man eine derartige Mischung Nass-Trocken-Zyklen aus, so bilden sich Depsipeptide, deren Monomere sowohl durch Amid- als auch durch Esterbindungen miteinander verknüpft sind.<sup>[166]</sup> Durch weitere Reaktionszyklen kann ein energetisch begünstigter Ester-Amid-Austausch und eine Anreicherung von Amidbindungen im Polymer stattfinden (Abbildung 2.7). Die Aktivierung durch α-Hydroxysäuren erfolgt daher durch die anfängliche Ausbildung von Esterbindungen, die dann den Austausch zu Amidbindungen begünstigen. So können Polymere mit einer Länge von 20 Einheiten entstehen, deren Anteil an Amidbindungen durch ständige Zugabe an Aminosäuren oder die Verwendung von Mineralen erhöht werden kann.<sup>[167, 168]</sup> Weiterhin wurde berichtet, dass proteinogene Aminosäuren bevorzugt gegenüber nicht-proteinogenen Aminosäuren eingebunden werden.<sup>[169]</sup> Offensichtlich resultieren in diesem Szenario allerdings niemals reine Peptide, sondern Polymere mit einem alternativen Rückgrat. Die Synthese tatsächlicher langkettiger Peptide über diese Polymere muss noch belegt werden.



Abbildung 2.7: Polymerisation von  $\alpha$ -Hydroxysäuren (z. B. Milchsäure) und Aminosäuren mit anschließendem Ester-Amid-Austausch zu Depsipeptiden.
#### Peptidbildung mit aktivierten Vorläufermolekülen

Die letzten Abschnitte zeigen, dass die Reaktivität von Aminosäuren und deren Polymerisation zu katalytisch aktiven Proteinen unter präbiotischen Bedingungen einige Herausforderungen mit sich bringt. Alternativ werden Syntheserouten über die Verknüpfung verschiedener Vorläufermoleküle statt einzelner Aminosäuren in Erwägung gezogen. Demnach wären die ersten Peptide durch eine anschließende Umwandlung dieser alternativen Polymere entstanden. Die einfachste und zugleich sehr effektive Form aktivierter Aminosäurederivate bildet die Klasse der N-Carboxyanhydride (NCAs), die nach ihrem Entdecker auch Leuchs'sche Anhydride genannt werden.<sup>[170]</sup> NCAs weisen gleichzeitig eine aktivierte Carbonyl- und geschützte Aminogruppe auf, wodurch eine überlegene Reaktivität gegenüber einfachen Aminosäuren resultiert. Bei Polymerisationen von Glu über deren NCA als Zwischenstufe konnten mithilfe stabilisierender Minerale Peptide einer Länge von ca. 55 Einheiten nachgewiesen werden.<sup>[158]</sup> Die Bildung der cyclischen Diketopiperazine (DKPs), die oftmals als unerwünschte Nebenprodukte während Peptidkondensationen betrachtet werden, wird bei der Reaktion von NCAs nicht beobachtet. Darüber hinaus spielen NCAs auch in der präbiotischen Synthese weiterer Biomolekülklassen eine wichtige Rolle, indem sie zu einer Vielzahl an energiereichen Aminoacylderivaten wie Aminoacylphosphaten, -adenylaten, -fettsäuren und -thiosäuren reagieren können. [171-173] Die wichtige Rolle der Aminoacyladenylate während der Proteinbiosynthese als aktivierte Form der Aminosäuren wurde im entsprechenden Kapitel bereits beschrieben. Die Polymerisation von NCAs zu Peptiden wird schon seit langem umfassend erforscht<sup>[174, 175]</sup> und seit der Entdeckung von mehreren, präbiotisch plausiblen Syntheserouten gelten sie auch als wichtige Intermediate der abiotischen Peptidbildung. Die verschiedenen präbiotischen Routen zu NCAs und mögliche Folgereaktionen sind in Abbildung 2.8 zusammengefasst. Dazu gehört zum einen die Aktivierung von Aminosäuren mit COS zu Thiocarbamaten und anschließender Reaktion zum NCA.<sup>[152]</sup> So konnten auch im Umfeld von hydrothermalen Quellen unter Anwesenheit von CO, H<sub>2</sub>S und (Fe,Ni)S Peptide synthetisiert werden.<sup>[154]</sup> Die Ausbeuten können einerseits durch die Anwesenheit von Oxidationsmitteln und der daraus folgenden Ausbildung von Disulfidderivaten gesteigert werden und andererseits durch eine stete Zufuhr von COS in geringen Konzentrationen, da so wahrscheinlich die Nebenreaktion zu Hydantoinderivaten über Thiocarbamate minimiert wird.<sup>[161]</sup> Weiterhin resultieren NCAs über die Nitrosierung von N-Carbamoylaminosäuren, die entweder über die entsprechenden Aminonitrile oder die Reaktion von Aminosäuren mit Cyanaten gebildet werden können.<sup>[176, 151]</sup> Außerdem wurde auch die NCA-Synthese über andere aktivierte Aminosäurederivaten durch eine intramolekulare Cyclisierung nach der Reaktion mit gelöstem CO<sub>2</sub> in Betracht gezogen.<sup>[175]</sup>

Ein anderer Ansatz schlägt die Bildung der ersten Biomoleküle über die Hydrolyse von HCN-Oligomeren vor. Schon 1960 veröffentlichten Oró *et al.* eine Synthese von sowohl Adenin als auch verschiedenen Aminosäuren ausgehend von HCN unter präbiotischen Bedingungen. Weiterhin wurde im Verlauf der Reaktion die Bildung eines schwarzen HCN-Polymers beobachtet.<sup>[177, 178]</sup> Matthews *et al.* vermuteten, dass dieses Polymer durch die Bestrahlung einer Atmosphäre aus CH<sub>4</sub> und NH<sub>3</sub> auf der frühen Erde entstehen und durch eine anschließende Hydrolyse im Urozean die Bildung von Peptiden und Purinen bewirken könnte. Tatsächlich konnten in entsprechenden Experimenten Adenin und Peptide bestehend



**Abbildung 2.8:** Leuchs'sche Anhydride, deren präbiotische Syntheserouten und eine Auswahl wichtiger Produkte verschiedener Biomolekülklassen (Aminosäure = AS).

aus mindestens acht verschiedenen Aminosäuren nachgewiesen werden.<sup>[179]</sup> Für die Bildung der Peptide wurde vorgeschlagen, dass NH<sub>3</sub> mit HCN zu Formamidin, Diaminoacetonitril und schließlich dem Diradikal Aminocyanomethylen reagiert. Dieses kann im weiteren Verlauf des Mechanismus zu Polyamidinen polymerisieren, woraus nach Hydrolyse und Decarboxylierung Peptide entstehen (Abbildung 2.9). Eine Funktionalisierung des Polymerrückgrats vor der Hydrolyse würde verschiedene Seitengruppen zur Folge haben. Auch wenn diese Syntheseroute unter einer reduzierenden Atmosphäre nach dem aktuellen Stand der Forschung nur sehr unwahrscheinlich auf der frühen Erde hätten stattfinden können, so demonstrieren die Ergebnisse trotzdem einen einfachen Weg zu Peptiden über HCN-Polymere. Die Möglichkeit einer Synthese dieser Polymere auf extraterrestrischen Himmelskörpern und der anschließenden Hydrolyse auf der Erde bleibt bestehen.<sup>[180]</sup>



Abbildung 2.9: Bildung von Polypeptiden über die Hydrolyse von HCN-Oligomeren.

In plausibleren Ansätzen werden verschiedene Syntheserouten über Thiosäuren diskutiert. Ein Ansatz geht dabei von Aminonitrilen als Edukten aus, die als Zwischenprodukte in der Strecker-Synthese auftreten und deshalb in genügendem Umfang auf der Erde zur Verfügung gestanden hätten.<sup>[181]</sup> Während der Reaktion bei einem neutralen pH-Wert findet eine schrittweise Verlängerung der Peptidkette durch einzelne Monomereinheiten statt. Interessanterweise erfolgt dabei die Peptidverlängerung analog der Proteinbiosynthese vom N- zum C-Terminus und unterscheidet sich damit von Synthesen, die durch Kupplungsreagenzien katalysiert werden. Dazu wird zunächst das Aminonitril am N-Terminus acetyliert, um es für die nächsten Reaktionsschritte zu aktivieren (Abbildung 2.10, A). Weiterhin wird durch den Einbau der Acetylgruppe eine spätere DKP-Bildung des Peptids verhindert. Im weiteren Verlauf der Reaktion findet ein Thiolyse des *N*-acetylierten Aminonitrils zum Thioamid mit anschließender Hydrolyse zur Thiosäure statt. Für die Kupplung wird die Thiosäure zunächst oxidativ aktiviert und reagiert dann mit einem einfachen Aminonitril. Durch eine erneute Thiolyse, Hydrolyse und Aktivierung kann das Peptid schrittweise mit neuen Einheiten verlängert werden. In der Regel erfolgt jeder Reaktionsschritt in hohen Ausbeuten und es konnten alle 20 Aminonitrile der proteinogenen Aminosäuren erfolgreich eingesetzt werden. Allerdings wird die Synthese längerer Peptide durch die Abnahme der Löslichkeit verhindert, als längstes Peptid konnte acetyliertes Gly<sub>11</sub> hergestellt werden. Eine wichtige Bedingung der Synthese ist, dass die Abläufe des Zyklus voneinander getrennt durchgeführt werden müssen. Das Oxidationsmittel würde sonst mit H<sub>2</sub>S abreagieren und eine weitere Kettenverlängerung unterbinden. In darauf aufbauenden Studien wurde deswegen eine alternative Aktivierung der *N*-acetylierten Aminonitrile untersucht.<sup>[182]</sup> Durch eine reversible Thiolbildung wurde die Bildung von Amidinen katalysiert, wodurch der Einsatz stöchiometrischer Mengen an H<sub>2</sub>S und des Oxidationsmittels umgangen werden konnte (Abbildung 2.10, B). Auch hier konnten alle proteinogenen Aminosäuren ohne die Verwendung von Schutzgruppen in Peptide eingebaut werden.



**Abbildung 2.10:** Synthese von Peptiden ausgehend von acetylierten Aminonitrilen. Schrittweise Verlängerung der Peptidkette über die oxidative Aktivierung der Thiosäure (A). Weiterhin können die Aminonitrile von diversen Thiolen aktiviert werden, um mit Aminosäuren zu Amidinen und schließlich Peptiden weiterzureagieren (B).

Weiterhin konnten auch Okamoto *et al.* Thiosäuren als Peptidvorläufer einsetzen.<sup>[183]</sup> Hierbei wurden Aminothiosäuren zu den entsprechenden Disulfiden oxidiert und ein anschließender S-zu-N-Acyltransfer lieferte unter sauren Bedingungen die Peptidbindung (Abbildung 2.11). Schutzgruppen für die Seitengruppen wurden nicht verwendet und die Verlängerung der Peptidkette erfolgte dabei auch hier analog zur Biosynthese vom N- in Richtung

des C-Terminus. Zusätzlich wurde die Syntheseroute unter möglichen präbiotischen Bedingungen in Erwägung gezogen, da Aminothiosäuren auf der frühen Erde im Zusammenhang der Reaktion von Aminosäuren mit COS hätten gebildet werden können.<sup>[152]</sup> Dazu wurde Eisenerz als Oxidationsmittel und verdünnte Schwefelsäure zur Herstellung des sauren Mediums verwendet. Unter diesen Bedingungen konnten Tripeptide bestehend aus zwei Phenylalanin- und einer Lysin-Einheit synthetisiert werden, allerdings wurden die Studien nicht auf die restlichen proteinogenen Aminosäuren ausgeweitet.



Abbildung 2.11: Thiosäuren als Vorläufer liefern nach oxidativer Dimerisierung, Acyltransfer und Disulfidaustausch Polypeptide.

Wu *et al.* konnten zeigen, dass nicht nur acetylierte Aminonitrile, sondern auch acetylierte Aminosäuren zur Peptidkondensation eingesetzt werden können.<sup>[184]</sup> Dazu wurde zusätzlich Methylisonitril zur Aktivierung verwendet und die Peptidknüpfung von acetyliertem Ala mit verschiedenen Aminen in Abhängigkeit von dem pH-Wert untersucht. Der Einbau von Aminosäuren gegenüber anderen Aminen schien dabei bei niedrigen pH-Werten begünstigt zu sein. Als längstes Peptid wurde das Tetrapeptid aus einer Ala- und drei Gly-Einheiten detektiert.

Schließlich wird häufig die Rolle der cyclischen DKPs als Vorläufer präbiotischer Peptide diskutiert. Einerseits werden sie häufig als Sackgasse in Peptidsynthesen betrachtet, da sie durch die Cyclisierung von Dipeptiden entstehen (Abbildung 2.12). Dadurch werden sowohl die Carboxyl- als auch die Aminogruppe deaktiviert und stehen erst nach einer Hydrolyse wieder für weitere Kettenverlängerungen zur Verfügung.<sup>[185]</sup> Andererseits werden DKPs auch als Peptidvorläufer betrachtet, da deren Zugabe zu Aminosäuren oder Peptiden eine direkte Kettenverlängerung um zwei Einheiten zur Folge haben kann.<sup>[186]</sup> Die Existenz von DKPs auf der frühen Erde steht außer Frage; sie werden immer wieder als Nebenprodukte in zahlreichen präbiotischen Aminosäure- und Peptidbildungsreaktionen beobachtet und auch auf Meteoriten konnten sie schon nachgewiesen werden.<sup>[159, 187]</sup>

Insgesamt gilt für die Theorie der Peptidsynthese aus alternativen Vorläufermolekülen, dass eine ständige Zufuhr an aktivierten Einheiten für die erfolgreiche Polymerisation notwendig ist. Die Existenz eines breiten Angebots von Aminosäuren auf der jungen Erde gilt als gesichert; die umfangreiche Synthese und Kompatibilität verschiedener Vorläufermoleküle unter präbiotischen Bedingungen muss jeweils konkret überprüft werden.



Abbildung 2.12: DKPs werden sowohl als inaktive Dipeptide als auch als Peptidvorläufer betrachtet, da durch sie eine Kettenverlängerung um zwei Einheiten erzielt werden kann.

#### Metallkatalysierte Peptidknüpfung

Neben der Verschiebung des Gleichgewichts durch Erhitzen, dem Herabsetzen der thermodynamischen Barriere durch Aktivierungsreagenzien oder der Umsetzung aktivierter Vorläufermoleküle, können weiterhin Katalysatoren eingesetzt werden, um die präbiotische Peptidsynthese zu begünstigen. Dazu zählen verschiedene Metalle, die Aminosäuren komplexieren, sie damit in räumliche Nähe bringen und die kinetische Hürde der Peptidknüpfung verringern. Ende der 1980er Jahre entwickelten Rode et al. die salzinduzierte Peptidbildung (SIPF), in der anfänglich hohe Konzentrationen an CuCl<sub>2</sub> von 400 mM verwendet wurden.<sup>[188]</sup> Das divalente Kupferion bildet dabei einen Komplex mit zwei Aminosäuren, von denen eine lediglich über die Carboxylgruppe und die andere sowohl über die Carboxyl- als auch die Aminogruppe gebunden ist (Abbildung 2.13, a). Dadurch kann ein nukleophiler Angriff der chelatgebundenen Aminosäure an der Carboxylgruppe der zweiten Aminosäure mit anschließender Peptidkondensation erfolgen. Der Chloroligand verhindert dabei die Bindung beider Aminosäuren als Chelatliganden, da dies in einem stabilen und unreaktiven Komplex resultieren würde. Falls höhere Peptide über die Carboxylgruppe komplexiert sind, findet eine schrittweise, biomimetische Verlängerung der Peptidkette in Richtung des C-Terminus statt.<sup>[189]</sup>

Weiterhin werden in der Synthese hohe Konzentrationen an NaCl eingesetzt (> 3 M), da unter diesen Bedingungen die Hydrathülle der Natriumionen nicht mehr gesättigt ist und so eine dehydratisierende Umgebung geschaffen wird. Auch wenn eine erhöhte NaCl-Konzentration des Urozeans im Vergleich zu heute durchaus wahrscheinlich ist,<sup>[190]</sup> so fällt die Rechtfertigung der übrigen hohen Eduktkonzentrationen in einem präbiotischen Szenario schwer. Deswegen wurden die späteren Experimente bei niedrigeren Konzentrationen und dem Einsatz von Nass-Trocken-Zyklen bei Temperaturen zwischen 60-90 °C durchgeführt, wie sie in austrocknenden Lagunen oder Tümpeln hätten stattfinden können.<sup>[191]</sup> In einer umfangreichen Serie an Veröffentlichungen wurden anschließend unterschiedliche Aspekte der Synthese beleuchtet.<sup>[192, 193, 49]</sup> Zum einen wurde beobachtet, dass die natürlich auftretenden  $\alpha$ -Aminosäuren weitaus besser reagieren als ihre  $\beta$ - oder  $\gamma$ -Analoga.<sup>[194]</sup> Auch konnten bei der Dimerisierung von L-Aminosäuren höhere Ausbeuten als bei entsprechenden Experimenten mit D-Aminosäuren erzielt werden.<sup>[195]</sup> Ein weiterer interessanter Aspekt betrifft die Ausbeutesteigerung durch Tonminerale, Silica und Aluminiumoxid, aber auch durch die Aminosäure Gly. Durch die Zugabe von Gly zu der Reaktionsmischung einer anderen Aminosäure, wie Val oder Leu, konnte deren Dipeptidbildung deutlich gefördert werden. Es wurde vorgeschlagen, dass Gly als katalytisch aktive Aminosäure zunächst mit der anderen Aminosäure ein gemischtes Dimer und daraufhin ein Trimer, bestehend aus einer Gly- und zwei Einheiten der anderen Aminosäure bildet (Abbildung 2.13, b). Durch die Hydrolyse und Abspaltung der Gly-Einheit bleibt das Homodimer der anderen Aminosäure zurück. Ein ähnlicher, wenn auch nicht so stark ausgeprägter Effekt, konnte für Histidin (His) beobachtet werden.<sup>[196, 197]</sup> So wurde die Dimerisierung aller proteinogenen Aminosäuren (bis auf Thr, Gln, Asn, Cystein (Cys) und Tyrosin (Tyr)) erfolgreich durchgeführt, als längstes Polypeptid konnte Gly<sub>6</sub> detektiert werden.<sup>[198]</sup>



**Abbildung 2.13:** Der katalytisch aktive Cu(II)-Komplex der SIPF bringt zwei Aminosäuren (oder eine Aminosäure und ein Peptid) in räumliche Nähe und erleichtert den nukleophilen Angriff (a). Durch Gly kann über die zeitweise Bildung eines gemischten Dimers und Trimers die Dipeptidsynthese einer anderen Aminosäure (Xaa) katalysiert werden (b).

Auch abseits dieser Veröffentlichungen konnte die außergewöhnliche Effektivität von Cu(II) in Peptidkupplungsreaktionen bestätigt werden. Durch die Inklusion von Kupfersalzen konnte die Aktivität verschiedener Minerale während Peptidkondensationen um ein Vielfaches erhöht werden.<sup>[199, 200]</sup> Allerdings wird häufig kritisiert, dass große Cu(II)-Vorkommen unter den vorherrschenden, sauerstofffreien Bedingungen des Hadaikums schwer zu realisieren waren. So wäre ein Sauerstoffpartialdruck von 10<sup>-35</sup> atm notwendig, um Cu(II) für Organismen verfügbar zu machen. Allerdings ist fraglich, ab wann dieser existiert hat.<sup>[23]</sup> Des Weiteren würden Fällungsreaktionen und Adsorption auf Mineraloberflächen eventuelle Vorkommen weiter dezimieren. Die Existenz von Cu(II)-Salzen ist nicht ausgeschlossen, allerdings gelten hohe Konzentrationen als sehr unwahrscheinlich und würden nur lokal begrenzt auftreten. Auch Rode *et al.* untersuchten die Fähigkeit alternativer Metallionen Peptidkondensationen zu katalysieren. In diesem Zusammenhang setzten sie Cr(III), Al(III), Ca(II), Mg(II), Zn(II), Cd(II), Fe(II), Ni(II), Co(II) und Mo(VI) in der SIPF ein.<sup>[201]</sup> Allerdings konnte nur in sehr wenigen Fällen Spuren an Dipeptiden detektiert werden, wodurch diese Ansätze auch aufgrund der hohen Aktivität von Kupfer nicht weiterverfolgt wurden. Von der verwendeten Auswahl sticht insbesondere Eisen hervor, das aufgrund der Beschaffenheit des Erdkerns in den verschiedensten Formen omnipräsent gewesen sein sollte (für die stabile Koexistenz der beiden Eisenoxidationsstufen sorgt bereits ein niedriger Sauerstoffpartialdruck von 10<sup>-70</sup> atm).<sup>[23]</sup> Eine weitere Quelle für Eisen könnten Asteroideneinschläge gewesen sein,<sup>[13, 202]</sup> dementsprechend kann eine Vielzahl an eisenhaltigen Mineralen für die Zeit des Hadaikums aufgelistet werden.<sup>[29]</sup>

Wenige Studien beschäftigen sich mit eisenkatalysierten Peptidknüpfungen, da bisher in keinem der Fälle hohe Umsätze erzielt werden konnten. Die ersten Studien zu Peptidkondensationen auf Eisenmineralen wurden von Matrajt et al. durchgeführt.<sup>[203]</sup> Hierbei wurde Ferrihydrit, ein Eisen-Hydroxid, synthetisch hergestellt und die Adsorption verschiedener natürlicher und synthetischer Aminosäuren darauf untersucht. Im weiteren Verlauf wurde die Peptidsynthese von sowohl Gly als auch Ala auf dem Mineral getestet. Tatsächlich konnten durch Ferrihydrit die Ausbeuten an Dipeptiden gesteigert werden, allerdings nur im geringen Maße. Tripeptide konnten nicht detektiert werden. Auch in anderen Studien konnte die begünstigte Oligomerisierung von Aminosäuren auf Eisen-Hydroxiden bestätigt werden. Allerdings wurde hier das Mineral in Form eines Sols (kolloidale Suspension) und außerdem Aktivierungsreagenzien eingesetzt.<sup>[204]</sup> Shanker et al. berichteten von erfolgreichen Peptidkondensationen auf verschiedenen Mineraloxiden, darunter die Eisenoxide Goethit, Akaganeit und Hämatit. Auch hier wurde die Peptidkupplung von Gly und Ala untersucht. Die Reaktivität der Minerale war dabei von deren Oberfläche und Azidität abhängig. Die größte Aktivität konnte für Goethit nachgewiesen werden, auf dem sich als einziges Gly<sub>3</sub> bilden konnte.<sup>[205]</sup> Ein weiteres Eisenoxid (Maghemit) wurde zusammen mit Akaganeit und Hämatit von Georgelin et al. analysiert, die auf entsprechenden Nanopartikeln Gly aus der Gasphase kondensierten und anschließend die Minerale auf erfolgreiche Peptidkupplungen untersuchten. Auch hier konnte im besten Fall Gly<sub>3</sub> detektiert werden.<sup>[206]</sup> Alle diese Systeme haben gemeinsam, dass eine erfolgreiche Peptidsynthese auf den Eisenoberflächen zwar nachgewiesen werden konnte, allerdings nur in sehr geringen Ausbeuten. Diese Beobachtung konnte in einer vergleichenden Studie von Kitadai *et al.* bestätigt werden, die unter gleichen Reaktionsbedingungen neun verschiedene Mineraloxide untersuchten und deren Effektivität in Gly-Kondensationen verglichen.<sup>[207]</sup> Dabei konnte für die beiden getesteten Eisenoxide Hämatit und Magnetit nur eine geringe Aktivität festgestellt werden, die in Gly<sub>2</sub>-Ausbeuten von unter 1 % resultierte. Auch wenn somit die katalytische Aktivität von Eisenoberflächen in Peptidkupplungen nur in geringen Ausmaßen demonstriert werden konnte, so gilt eine genaue Untersuchung der Reaktivität des universell verfügbaren Elements als besonders aussichtsreich.

#### 2.2.4. Die Bedeutung von Peptiden für die Entstehung des Lebens

Komplexe Proteine übernehmen heute in jeder lebenden Zelle eine Vielzahl an verschiedenen katalytischen, strukturellen und informationsspeichernden Funktionen. Die Entwicklung eines zusammenhängenden Proteoms muss über Jahrtausende hinweg angedauert haben, an deren Anfang allerdings kurzkettige Peptide präbiotischer Synthesen gestanden haben. Es stellt sich die Frage, ob die diversen Funktionen der heutigen multidimensionalen Proteine auch von einfacheren, kürzeren Analoga hätten übernommen werden können. Oder, welche Kettenlänge ein Peptid aufweisen muss, um diese unterschiedlichen Funktionen erfüllen zu können.

Eine wichtige Eigenschaft von Enzymen ist deren Fähigkeit, sich über intramolekulare Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrückenbindungen,  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen oder Disulfidbrücken zu stabilen, mehrschichtigen Strukturen anzuordnen. Dabei kann die Faltung mit einer derartigen Präzision wiederholt werden, dass im aktiven Zentrum eine einmalige Umgebung verschiedener funktioneller Gruppen in unmittelbarer Nähe entsteht, die jedem Enzym seine spezifische Funktion verleiht. Die Ausbildung dieser übergeordneten Strukturen erfordert meist eine Peptidkette von ca. 20 Einheiten, doch auch für kürzere Peptide, wie Penta-,Tetra- und sogar Dipeptide, konnten schon Selbstorganisationen nachgewiesen werden.<sup>[208-210]</sup> Dabei können bestimmte Peptidsequenzen präbiotisch häufig auftretender Aminosäuren zu der selbstorganisierten Bildung von alternativen "Peptidmembranen" führen. Peptidsequenzen aus alternierenden hydrophilen und hydrophoben Seitenketten können amphiphile  $\beta$ -Faltblattdoppelschichten ausbilden, ähnlich zu Lipidmembranen.<sup>[211]</sup> Auch weitere Strukturen wie Micellen, Nanotubes und Nanovesikel konnten durch proteinogene Aminosäuren synthetisiert werden.<sup>[212]</sup> Es ist somit denkbar, dass Peptide neben Lipidmembranen eine Rolle bei der Kompartimentierung und Schaffung alternativer Reaktionsräume innehatten.<sup>[213, 214]</sup>

Eine weitere wichtige Funktion von Peptiden ist die Katalyse verschiedener stereo- und regiospezifischer Reaktionen des Stoffwechsels. Diese erfolgt in lebenden Zellen über strukturell komplexe und sehr effiziente Enzyme. Überraschenderweise können auch schon kurzkettige Peptide eine große katalytische Aktivität aufweisen. Schon Di- bis Heptapeptide beschleunigen diverse Transformationen wie Aldol- oder Additionsreaktionen ohne dabei selbst verbraucht zu werden.<sup>[215-217]</sup> Eine Zunahme der Kettenlänge und Komplexität scheint dabei nicht automatisch auch eine erhöhte katalytische Aktivität zur Folge zu haben.<sup>[218]</sup> Sogar für einzelne Aminosäuren (wie z. B. Pro) konnten schon effektive, asymmetrische Katalysen nachgewiesen werden.<sup>[219]</sup> Auch speziell im präbiotischen Kontext wurden verschiedene peptidkatalysierte Reaktionen untersucht. Zum einen konnte die stereospezifische Synthese verschiedener Zucker unter präbiotischen Bedingungen und Zugabe verschiedener Dipeptide realisiert werden.<sup>[220-222]</sup> Weiterhin wurde ausgehend von racemischen Startmaterialien eine starke Anreicherung von Enantiomeren von RNA-Vorläufermolekülen erzielt.<sup>[223]</sup> Außerdem sind Peptide zur Autokatalyse befähigt und können so ihre eigene Replikation begünstigen.<sup>[224]</sup> Dadurch ist eine wichtige Voraussetzung für das ständige Wachstum und die Evolution des Systems geschaffen.

Peptide können somit schon von sehr kurzen Sequenzen an eine Vielzahl an Funktionen erfüllen und auch im präbiotischen Kontext den Mittelpunkt eines metabolischen Netzwerkes einnehmen, den sie noch heute innehaben.

# 2.3. Analytik von Peptiden

Präbiotische Synthesen sind meist komplexe Reaktionen, bei denen aus einem begrenzten Angebot einfacher Startmaterialien ein immenses Produktspektrum erzeugt wird. Außerdem werden in dieser Mischung die relevanten Zielverbindungen oft nur in Spuren gebildet oder es kann nur eine geringe Probenmenge entnommen werden, um diese zu untersuchen. Die Erforschung solch komplexer, empfindlicher Systeme erfordert die Anwendung von fortgeschrittenen und höchst sensitiven Trenn- und Analytikmethoden, die gleichzeitig eine große Anzahl an Verbindungen in teilweise verschwindend geringen Konzentrationen nachweisen können. Für die Auftrennung und Detektion von Aminosäuren und Peptiden kommen dabei mehrere Methoden in Frage. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) und Kapillarelektrophorese (CE) ermöglichen die Analyse von sowohl nativen als auch derivatisierten Aminosäuren und Peptiden, während bei der Gaschromatographie (GC) derartige Mischungen nur nach Erhöhung der Volatilität durch Derivatisierungen untersucht werden können. Bei Aminosäuren kann dies mit Silylierung oder Trifluoracetylierung erreicht werden, für längerkettige Peptide kann die notwendige Volatilität dadurch allerdings nicht mehr hergestellt werden. Daher liegt der Fokus der nachfolgenden Kapitel auf Methoden der HPLC und CE.

## 2.3.1. Methoden für die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Aufgrund der guten Löslichkeit von Peptiden in wässrigen Lösemitteln bietet sich für deren Analytik die Umkehrphasen-Flüssigchromatographie (RPLC) an. Hierbei wird eine hydrophobe stationäre Phase verwendet, die meist aus Kieselgel und daran gebundenen Alkylketten besteht. Am häufigsten werden dabei C<sub>18</sub>- und C<sub>8</sub>-Säulen genutzt. Als mobile Phase werden wässrige Lösemittel eingesetzt, deren pH-Wert einen wichtigen Einfluss auf die Retentionszeit der Analyten hat. Durch den Einsatz von Ionenpaarreagenzien kann die Auftrennung von Aminosäuren zusätzlich verbessert werden. Dabei werden zwischen den Aminosäuren und Reagenzien Ionenpaare ausgebildet, deren stärker hydrophober Charakter besser mit der stationären Phase wechselwirken kann.<sup>[225]</sup> Allerdings muss dabei beachtet werden, dass dadurch schwankende Retentionszeiten und Ionensuppressionen bei Verwendung von Massendetektion auftreten können.<sup>[226]</sup> Eine attraktive Alternative bietet die hydrophile Interaktionsflüssigchromatographie (HILIC), die eine orthogonale Trennung zur RPLC bietet.<sup>[227]</sup> Sie ist dennoch nicht mit der Normalphasen-Flüssigchromatographie gleichzusetzen, da zwar eine hydrophile stationäre Phase, aber trotzdem Eluenten verwendet werden, die normalerweise in RPLC-Methoden eingesetzt werden. Die Auftrennung basiert auf einer starken Wechselwirkung zwischen polaren Analyten und der stationären Phase, wodurch Ionenpaarreagenzien nicht mehr eingesetzt werden müssen. Zusammen mit der Verwendung von wässrigen Lösemitteln wird somit vor allem die Massendetektion begünstigt, wodurch HI-LIC-Säulen häufig in diesem Bereich eingesetzt werden.<sup>[228-231]</sup>

Da die meisten Aminosäuren keine chromophore Einheit aufweisen, werden häufig Derivatisierungsreagenzien eingesetzt, um deren Detektion zu verbessern. Eine gängige Methode nutzt die Reaktion von Aminosäuren mit *o*-Phthalaldehyd (OPA) und Thiolen zu fluoreszierenden Isoindolderivaten aus (Abbildung 2.14).<sup>[232]</sup> Diese sind allerdings nur sehr kurze Zeit stabil und müssen zügig analysiert werden. Weiterhin können nur primäre Aminosäuren auf diese Art derivatisiert werden. Außerdem werden Ninhydrin (obwohl hier nur eine Anfärbung nach erfolgter Auftrennung möglich ist), 5-(Dimethylamino)naphthalin-1-sulfonylchlorid (Dansylchlorid) und eine Vielzahl weiterer Reagenzien angewendet.<sup>[233-235]</sup> Welches dieser Reagenzien im Einzelfall eingesetzt wird, muss individuell entschieden werden, da jedes über Vor- und Nachteile verfügt. Generell müssen bei Derivatisierungen oft ein hoher Zeitaufwand und die Instabilität oder mangelhafte Reproduzierbarkeit der Ausbeuten von Derivaten in Kauf genommen werden.<sup>[236-238]</sup> Als Alternative können auch Detektionsmethoden eingesetzt werden, die keine Derivatisierung benötigen. Die niedrigsten Nachweisgrenzen werden dabei mit der Massendetektion erreicht.<sup>[239]</sup> Außerdem werden so zusätzliche Informationen über eventuelle Fragmentierungsmuster der Analyten erhalten.

Insgesamt überzeugen HPLC-Methoden durch ihr breites Anwendungsgebiet und die Möglichkeit zur einfachen Kombination mit der sensitiven Massendetektion. Bei der Analytik von Peptidmischungen muss allerdings oft ein individueller Kompromiss eingegangen werden aufgrund von geringen Sensitivitäten oder Auftrennungen, zeitaufwendigen Derivatisierungen oder einer unzureichenden Reproduzierbarkeit der verschiedenen Methoden.



Abbildung 2.14: Derivatisierung von Aminosäuren mit OPA und 3-Mercaptopropionsäure (MPA) zu fluoreszierenden Isoindolderivaten.

## 2.3.2. Methoden für die Kapillarelektrophorese

Da Aminosäuren und Peptide als permanente Ladungsträger eine gute Wasserlöslichkeit aufweisen, eignen sie sich hervorragend für die Analytik durch CE-Methoden. Tatsächlich zeichnen sie sich durch einige klare Vorteile gegenüber Flüssigchromatographie (LC)-Methoden aus. Grundsätzlich basieren CE-Trennungen auf einem simplen Aufbau und Trennungsmechanismus, bei dem im Wesentlichen die Probe in eine mit Hintergrundelektrolyt (BGE) gefüllte Glaskapillare hydrodynamisch injiziert wird. Wenn der Kapillarausgang geerdet ist, kann am Kapillareingang eine Spannung angelegt werden und die geladenen Analyten werden nach ihrem Größe-zu-Ladung-Verhältnis aufgetrennt. Sehr kleine und mehrfach geladene Moleküle bewegen sich dabei schneller als große, ungeladene Verbindungen.<sup>[240]</sup> Dieser einfache Aufbau führt einerseits zu einem reduzierten Probenverlust, andererseits zeichnen sich CE-Trennungen durch eine hohe Sensitivität und Trennauflösung auf.<sup>[241]</sup> Dadurch wird der Einsatz von geringen Injektionsvolumina ermöglicht, was sich speziell im Bereich der präbiotischen Chemie oft von Vorteil erweist. Die effizienten Trennungen werden außerdem durch charakteristisch kurze Messungen ergänzt. Darüber hinaus erlaubt der einfache Trennmechanismus eine erstaunlich genaue Vorhersage der Trennung. Letztendlich bietet die CE mindestens eine ergänzende und meist sogar überlegene Analytik, die neue Informationen über eine komplexe Mischung offenbaren kann. Auch wenn Aminosäuren und Peptide im derivatisierten Zustand analysiert werden können, so ermöglichen Leitfähigkeitsdetektoren und Massenspektrometer auch eine Untersuchung nativer Mischungen. Durch die Entwicklung leistungsstarker und hochsensitiver Massenspektrometer gewinnt die Massendetektion vermehrt an Bedeutung. Speziell die Kombination CE-Elektrospray-Ionisation-Massenspektrometrie (CE-ESI-MS) wird in den letzten Jahren verstärkt in diversen Bereichen der Peptidanalytik verwendet.<sup>[242-244]</sup> Das Funktionsprinzip, Herausforderungen und Anwendungen werden daher im nächsten Kapitel näher diskutiert.

#### Kapillarelektrophorese-Massenspektrometrie

Durch die Kopplung der beiden Analysemethoden CE und MS sollen die schnellen, hochaufgelösten Trennungen geringer Probenvolumina der CE mit der präzisen, hochsensitiven Detektion moderner Massenspektrometer kombiniert werden. Zum ersten Mal wurde diese Idee Ende der 1980er Jahre umgesetzt. Insbesondere der Ausbau immer schnellerer und präziserer Massenspektrometer und ein wachsendes Angebot verschiedener, auch kommerziell erhältlicher Kopplungsmöglichkeiten (Interfaces) ermöglichte in den letzten Jahren den Einsatz dieser Methode in einer Vielzahl an Forschungsgebieten.<sup>[245-247]</sup> Mittlerweile findet die CE-MS eine umfassende Anwendung im Bereich der Proteinanalyse und Proteomik, aber auch in der pharmazeutischen Chemie oder der Untersuchung von Metaboliten, Nanopartikeln und sogar einzelnen Zellen wird die Analysemethode immer öfter eingesetzt.<sup>[248]</sup> Auch wenn dabei verschiedene Ionisationsmethoden verwendet werden können, so ist der Gebrauch der Kombination CE-ESI-MS am weitesten verbreitet. Allerdings gestaltet sich die Verbindung von CE und ESI-MS nicht so unkompliziert wie bei der LC-MS, da zwei Faktoren die Ausbildung eines stabilen, konstanten Elektrosprays behindern. Zum einen weisen CE-Messungen extrem niedrige Flussraten im Bereich weniger 100 nL/min auf, zum anderen muss das Kapillarende gleichzeitig als Elektrosprayemitter dienen. Dabei muss ein robuster elektrischer Kontakt an diesem Ende geschaffen werden, ohne dass die laufende Messung gestört wird oder Nebenreaktionen geschaffen werden. Des Weiteren müssen, wie bei allen Methoden der Massenspektrometrie, Restriktionen bezüglich nicht volatiler Stoffe berücksichtigt werden, wodurch das Spektrum an geeigneten BGEs der CE-Messungen limitiert wird.<sup>[249]</sup>

Um diese Schwierigkeiten zu umgehen, wurde ein breites Angebot an verschiedenen Interfaces entwickelt, deren Anzahl weiterhin wächst.<sup>[248, 244]</sup> Grundsätzlich kann zwischen Aufbauten unterschieden werden, die zur Unterstützung des Elektrosprays eine externe Mantelflüssigkeit (sheath liquid, sheath-flow design) verwenden und solchen, die dies vermeiden (sheathless design).<sup>[250, 251]</sup> Das sheathless design ist ein sehr direkter Ansatz, bei dem das Kapillarende vor dem Massenspektrometer platziert und somit der BGE inklusive der aufgetrennten Analyten direkt eingesprüht wird. Infolgedessen muss die Spannung zur Herstellung des Elektrosprays direkt an der eigentlich nichtleitenden Glaskapillare angelegt werden. Dies kann entweder durch die Beschichtung der äußeren Kapillarspitze mit leitenden Materialien,<sup>[252, 253]</sup> der Einführung einer Elektrode in das Kapillarende<sup>[254, 255]</sup> oder durch porös geätzte Kapillarwände erfolgen.<sup>[256]</sup> Indem die Probe direkt in das Massenspektrometer übertragen wird, werden jegliche Verdünnungen vermieden und maximal hohe Sensitivitäten erzielt. Allerdings sorgen die extrem niedrigen Flussraten der CE-Messungen für ein instabiles Elektrospray und die sehr speziellen Anfertigungen am Kapillarende erfordern ein hohes Maß an Erfahrung und Geschick. Weiterhin müssen Restriktionen in der BGE-Wahl toleriert werden, da sich deren Zusammensetzung direkt auf die Sprayqualität auswirkt. Dies hemmt einen routinemäßigen Einsatz dieser Art von Interfaces.

Das *sheath-flow design* zielt darauf ab, die Analyseflüssigkeit der CE mit einem zugeführten *sheath liquid* anzureichern, sobald sie aus der Kapillare austritt. Dadurch wird die Flussrate erhöht und ein stabiles Elektrospray geschaffen. Zusätzlich wird durch das *sheath liquid* ein

unkomplizierter elektrischer Kontakt zwischen Elektrode und Kapillare geschaffen und sowohl die Analytionisation als auch die Massenkompatibilität des BGE verbessert. So können robuste Emitter verwendet werden, die meist in einem einfacheren Aufbau dieser Art Interfaces resultieren. Das sheath liquid kann in zwei verschiedenen Arten zugeführt werden. Bei liquid junction-Interfaces wird die Analyseflüssigkeit der CE und das sheath liquid in einem kleinen Zwischenraum gemischt, bevor sie gemeinsam in den Emitter eintreten und von dort ins Massenspektrometer transferiert werden.<sup>[257]</sup> Allerdings können durch nicht exaktes Einstellen des Zwischenraums Totvolumina auftreten, die wiederum zu Peakverbreiterungen und einem Verlust der Trenneffizienz führen können.<sup>[258]</sup> Daher wird für robuste, reproduzierbare Messungen meist das koaxiale sheath-flow design verwendet. Hier wird das Kapillarende von einer Röhre umschlossen, die einerseits das sheath liquid liefert und andererseits meist auch als Emitter fungiert.<sup>[259]</sup> Erst an der Kapillarspitze mischen sich die beiden Flüssigkeiten und werden gemeinsam ins Massenspektrometer übertragen, wodurch Totvolumina vermieden werden. Allerdings müssen mit der Verwendung eines sheath liquid und der damit verbundenen Verbesserung der Elektrosprayqualität auch die Verdünnung der Analyten und eine verminderte Sensitivität in Kauf genommen werden.<sup>[260]</sup> Daher versuchen viele neue Interfaces die verwendete Menge an sheath liquid zu minimieren. Dies kann unter anderem durch elektrokinetisch angetriebenes *sheath liquid*,<sup>[261]</sup> Microvials,<sup>[262]</sup> unter Druck stehende *liquid junction*-Interfaces<sup>[263]</sup> oder durch sogenannte Nanofluss-Interfaces<sup>[264, 265]</sup> erzielt werden.

Neben dem Aufbau und den entsprechenden Eigenschaften des Interfaces wird die Qualität der Messungen entscheidend von dem verwendeten Massenspektrometer beeinflusst. Diese unterscheiden sich in verschiedenen, individuellen Charakteristika. Zu den wichtigsten zählt die Messgenauigkeit (*mass accuracy*), die ein Maß für die Abweichung der theoretisch berechneten von der gemessenen Masse eines Moleküls darstellt:

Messgenauigkeit (in ppm) = 
$$\left(\frac{m_{gemessen} - m_{berechnet}}{m_{berechnet}}\right) \times 10^6$$

Die Messgenauigkeit muss nicht in jedem Messbereich gleich sein und hängt zusätzlich von der Kalibrierung des Geräts ab. Eine weitere wichtige Größe ist die Auflösung eines Massenspektrometers, die durch das Verhältnis zwischen der Höhe und der Halbwertsbreite eines Ionenpeaks definiert ist. Daneben gibt die Sensitivität an, welche minimale Konzentration eines Analyten notwendig ist, um ein Signal über einem definierten Signal-zu-Rausch-Verhältnis (*S/N*) zu erhalten. Das *S/N* wiederum gibt das Verhältnis zwischen der Peakintensität und dem ständigen Hintergrundsignal wieder. Hochentwickelte Massenspektrometer

zeichnen sich durch eine hohe Messgenauigkeit (geringe Abweichung in ppm), Auflösung und Sensitivität bei einem hohen *S/N* aus.<sup>[241]</sup>

Grundsätzlich kann jedes Massenspektrometer durch ein passendes Interface mit CE-Messungen kombiniert werden. Allerdings sollte das verwendete Spektrometer aufgrund der raschen CE-Trennungen, geringer Probenvolumina und der scharfen Probenpeaks eine hohe Sensitivität und schnelle Scanraten aufweisen. Weit verbreitet ist die Anwendung von Flugzeitmassenspektrometern (TOF-MS), da sie aufgrund ihrer sehr schnellen Messraten in Verbindung mit einer guten Messgenauigkeit, Auflösung und Sensitivität besonders geeignet für CE-MS-Verfahren sind.<sup>[266, 248]</sup> Im Gegensatz dazu bieten Fourier-Transform Ionenzyklotronresonanz Massenspektrometer (FT-ICR-MS) unvergleichlich hohe Messgenauigkeiten und Auflösungen, allerdings auf Kosten sehr langer Analysezeiten.<sup>[267, 268]</sup> Somit sind sie vor allem für kurze Messungen ungeeignet. Orbitrap-Massenspektrometer finden sich in der Mitte dieses Spektrums wieder und bilden somit einen attraktiven Kompromiss. Sie verfügen über eine hohe Auflösung und eine große Messgenauigkeit über den gesamten Messbereich. Weiterhin weisen sie eine extrem hohe Sensitivität auf, wobei trotzdem sehr schnelle Scanraten aufrechterhalten werden können, um auch kurze CE-Trennungen zu verfolgen.<sup>[269, 241]</sup>

Obwohl die Orbitrap-MS prädestiniert für die Kopplung mit CE-Messungen erscheint, wurde diese in nur wenigen Fällen mit einem *sheath-flow*-Interface kombiniert. Am eindrucksvollsten konnte das Potenzial dieser hochleistungsfähigen Massenspektrometer von Amenson-Lamar *et al.* gezeigt werden, die lediglich 1 zmol (=10<sup>-21</sup> mol) Angiotensin II unter einem Hintergrund des Bovinen Serumalbumins (BSA) detektierten.<sup>[270]</sup> Auch andere Forschungsgruppen konnten Orbitrap-Massenspektrometer erfolgreich einsetzen. Dabei wurden meist *nanoflow*-Interfaces verwendet und sehr hohe Sensitivitäten erreicht.<sup>[271-273]</sup> Hinsichtlich dieser Ergebnisse bietet sich die Kombination CE-Orbitrap-MS als ein geeignetes Instrument zur Analyse komplexer Proteinmischungen an.

## Kapillarbeschichtungen

Die Differenz zwischen Injektion und Detektion eines Analyten während CE-Messungen wird Migrationszeit genannt (im Gegensatz zur Retentionszeit bei LC-Messungen). Die Geschwindigkeit eines Analyten im BGE wird einerseits durch dessen Größe-zu-Ladung-Verhältnis bestimmt, andererseits wird sie entscheidend durch das Vorhandensein und die Stärke des in jeder Messung auftretenden elektroosmotischen Flusses (EOF) beeinflusst. Dieser tritt aufgrund von Wechselwirkungen der im BGE gelösten Ionen mit der Kapillarwand auf. Standardmäßig werden innen blanke Quarzglaskapillaren (BFS-Kapillaren) verwendet. Da die Silanolgruppen der Glaskapillarwand in Abhängigkeit von dem BGE immer zu einem gewissen Anteil deprotoniert vorliegen, besteht in unmittelbarer Nähe zur Kapillarwand eine negativ geladene Umgebung. Daher bildet sich dort eine Doppelschicht aus den im BGE gelösten Kationen aus, wobei die Ladungsdichte mit steigendem Abstand zur Wand exponentiell abfällt. Während die erste Ionenschicht noch statisch an der Kapillarwand haftet, können die weiter entfernten Schichten durch das Anlegen einer Spannung bewegt werden. Die positiven Ionen bewegen sich dabei immer in Richtung der negativ geladenen Elektrode (Kathode) und der Fluss, der dadurch entsteht, wird EOF genannt (Abbildung 2.15). Da dieser direkt an der Kapillarwand entsteht, bewegt er sich mit einem annähernd geraden Profil, was ihn vom durch Druck ausgelösten parabolischen Profil von LC-Methoden unterscheidet. Der EOF wirkt auf alle Moleküle (positiv/negativ geladen, neutral) eine Kraft aus und beeinflusst so die Migrationszeiten der Analyten und die Auftrennung einer Messung. Während einer Messung im Positivmodus (Anode am Kapillareingang) werden positiv geladene Moleküle durch den EOF beschleunigt und erreichen als erste den Detektor. Danach folgen Neutralteilchen zusammen mit dem EOF. Aber auch die Detektion von negativ geladenen Analyten ist möglich, falls diese groß genug sind, um mit der Reibungskraft des EOF mitgezogen zu werden.<sup>[274]</sup>



Abbildung 2.15: Die Entstehung des EOF und Auftrennung der Analyten in einer unbeschichteten Kapillare. Durch die Silanolgruppen bildet sich an der Kapillarwand eine elektronische Doppelschicht aus, dessen Kationen sich immer in Richtung der Kathode bewegen und damit den EOF begründen. Die Auftrennung der Analyten (weiß hinterlegt) wird durch den EOF beeinflusst. Kleine und mehrfach geladene Kationen bewegen sich am schnellsten in Richtung Kathode, Neutralteilchen migrieren zeitgleich mit dem EOF. In Abhängigkeit von der Stärke des EOF können große und einfach geladene Anionen mit dem EOF mitgezogen und detektiert werden, während kleine Anionen sich meist in Richtung Anode bewegen.

Die Kontrolle des EOF bestimmt daher den Ausgang einer Messung. Schnelle Analysen werden erzielt, wenn die Analyten in Richtung des EOF migrieren; große Auftrennungen werden entgegengesetzt des EOF erreicht. Am einfachsten lässt sich der EOF durch den pH-Wert des BGE kontrollieren. Tiefe Werte resultieren in einer geringen Anzahl an deprotonierten Silanolgruppen und einem schwachen, langsamen EOF. Hohe pH-Werte haben das Gegenteil zur Folge. Um den EOF ganz zu unterdrücken oder auch dessen Richtung umzudrehen, werden dynamische oder permanente Beschichtungen der Kapillarinnenwand eingesetzt.<sup>[275]</sup> Weiterhin wird durch die Beschichtungen verhindert, dass Analyten mit den Kapillarwänden wechselwirken. Speziell Peptide neigen dazu, an Glas zu adsorbieren, was zu einer schlechten Reproduzierbarkeit der Messungen, Peakverbreiterungen und einer verminderten Sensitivität führt.<sup>[276]</sup> Für die Kopplung mit Massenspektrometern sind permanente, kovalent an die Kapillarwand gebundene Beschichtungen besser geeignet. Dabei ist die Verwendung von Polyvinylalkohol-beschichteten (PVA-) Kapillaren für die Analyse von Peptidmischungen weit verbreitet.<sup>[277]</sup> Nach Karger et al. wird zur Herstellung der Beschichtung zunächst an den Silanolgruppen der Kapillarwand eine Subschicht bestehend aus einem polymerisierten Vinylsilanol hergestellt. An dessen freien Vinylgruppen kann Vinylacetat copolymerisieren, woraufhin nach einem Verseifungsschritt die PVA-Beschichtung gebildet wird.<sup>[278]</sup> Um diese mehrstufige Reaktion an der Kapillarwand zu umgehen, wurde von Belder et al. ein schnelles einstufiges Verfahren entwickelt, bei dem in der Kapillare gelöster PVA durch Glutaraldehyd quervernetzt und somit immobilisiert wird.<sup>[279]</sup> Inzwischen sind PVA-Kapillaren auch kommerziell erhältlich, allerdings sind diese oft nicht mit niedrigen pH-Werten kompatibel.

Eine weitere Möglichkeit, Wechselwirkungen von Analyten mit der Kapillarwand während der Messung zu verhindern, besteht durch die Beschichtung mit linearem Polyacrylamid (LPA). Die erste Anwendung davon wurde schon 1985 von Hjertén vorgestellt (Abbildung 2.16).<sup>[280]</sup> Standardmäßig wird hier (ähnlich der Methode von Karger *et al.*) zunächst eine bifunktionelle Verbindung in die Kapillare eingeführt, deren erste funktionelle Gruppe an die Silanolgruppen der Kapillarwand bindet und mit der zweiten Gruppe eine Grundlage für die polymere Beschichtung schafft. Hier wird dafür  $\gamma$ -Methacryloxypropyltrimethoxysilan ( $\gamma$ -MAPS) verwendet, das mit der endständigen Vinylgruppe an der Polymerisation teilnimmt. Nach einem Waschschritt wird mit einer Acrylamidlösung zusammen mit Persulfat und *N*,*N*,*N'*,*N'*-Tetramethylethylendiamin (TMEDA) zur Initiation und Katalyse der Polymerisation gespült, wodurch die LPA-Beschichtung an der Kapillarwand ausgebildet wird. Beschichtungen dieser Art verhindern sehr effektiv die Adsorption von Peptiden und sind auch bei niedrigen pH-Werten stabil. Für reproduzierbare Ergebnisse muss das Ausmaß der Polymerisation sorgfältig kontrolliert werden, da durch diese die Migrationszeit der Analyten bestimmt wird. Zhu *et al.* schlugen in diesem Zusammenhang eine leichte Abänderung des Verfahrens vor.<sup>[281]</sup> Sie gaben bei der Polymerisation kein TMEDA zu sondern aktivierten diese thermisch. So kann die Dauer und Geschwindigkeit der Polymerisation genau kontrolliert und ein konstantes Migrationsverhalten der Probenmischung erzielt werden.



Abbildung 2.16: LPA-Beschichtung der Kapillarwand durch Verwendung der bifunktionellen Verbindung γ-MAPS.

## 2.3.3. Proteinsequenzierung durch Massenspektrometrie

Ursprünglich wurde für die Sequenzierung von Proteinen, also die Bestimmung der Primärstruktur der sogenannte Edman-Abbau verwendet. Dabei wurde eine Peptidkette schrittweise vom N-Terminus aus abgebaut und die abgespaltene Aminosäure bestimmt. Durch die Entwicklung der Massenspektrometrie wurde dieser aufwendige Prozess abgelöst. Peptide können so innerhalb von Sekunden und nicht Stunden oder Tagen fragmentiert werden und die Sequenzierung kann auch für modifizierte Aminosäuren erfolgen. Weiterhin ist die Detektion sensitiver, ohne dass das zu sequenzierende Peptid unbedingt rein vorliegen muss. In der Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) können durch Energieeinwirkung auf das Peptidrückgrat verschiedene Fragmente auftreten.<sup>[282]</sup> Roepstorff und Fohlman schlugen in diesem Zusammenhang eine einheitliche Nomenklatur der Fragmente vor, die heute weitestgehend verwendet wird.<sup>[283]</sup> Bleibt die positive Ladung des ursprünglichen Peptids auf der Seite des N-Terminus erhalten, so unterscheidet man in Abhängigkeit von der Position des Bindungsbruchs zwischen a-, b-, und c-Fragmenten. Wird die positive Ladung allerdings auf den C-Terminus übertragen, so wird zwischen x-, y-, und z-Fragmenten differenziert (Abbildung 2.17). Mit einer tiefgestellten Zahl wird angegeben, wie viele Seitengruppen das Fragment enthält. Weiterhin können auch die Seitengruppen fragmentiert oder der Verlust von NH<sub>3</sub> oder H<sub>2</sub>O ausgelöst werden.<sup>[284]</sup> Anhand dieser Fragmente, deren Vergleich mit Proteindatenbanken und unter Zuhilfenahme moderner Algorithmen, kann eine schnelle und zuverlässige Identifizierung des ursprünglichen Proteins erfolgen.<sup>[285, 286]</sup>



Abbildung 2.17: Einheitliche Nomenklatur der bei MS/MS-Experimenten auftretenden Peptidfragmente nach Roepstorff und Fohlman.

# 3. Zielsetzung

Unter den extremen Bedingungen des Hadaikums sind auf der Erde aus unbelebter Materie über bislang unbekannte Mechanismen die ersten Lebensformen entstanden. Entlang dieser Route müssen die Biomoleküle gebildet worden sein, die noch heute die Grundlage für jegliche Lebewesen schaffen. Peptiden kommt aufgrund ihrer vielfältigen katalytischen und strukturellen Funktionen eine zentrale Bedeutung für die Entstehung des Lebens zu. Allerdings ist die Peptidknüpfung vor allem in wässrigen Umgebungen (und damit in einem Großteil der vorgeschlagenen Szenarien des Ursprungs des Lebens) sowohl thermodynamisch als auch kinetisch gehemmt. Das fehlende Auftreten langkettiger Peptide und Proteine in bisherigen Studien zeigt, dass alternative Ansätze für präbiotische Peptidsynthesen benötigt werden.

Zum einen werden in aktuellen Veröffentlichungen unter den postulierten Syntheserouten meist nur sehr wenige Aminosäuren gleichzeitig eingesetzt. Im Szenario einer komplexen Ursuppe der jungen Erde sind diese Ansätze allerdings schwer zu realisieren, da präbiotische Aminosäuresynthesen immer in einer Mischung verschiedener Aminosäuren resultieren. Außerdem werden in diesen Experimenten Wechselwirkungen zwischen den Aminosäuren untereinander sowie die Entstehung zahlreicher, potentiell wichtiger Peptidsequenzen nicht ermöglicht. Dementsprechend sollen zur Untersuchung möglicher kooperativer Effekte größere Aminosäuregruppen sowie die Gesamtheit aller proteinogenen Aminosäuren unter den Bedingungen der salzinduzierten Peptidbildung (SIPF) umgesetzt werden. Weiterhin sollen verschiedene Faktoren der Reaktionsbedingungen bezüglich ihres Einflusses auf die Produktverteilung dieser Mischungen untersucht werden.

Zum anderen gilt es neue Syntheserouten zu entwickeln, die sowohl die Barrieren der Peptidknüpfung überkommen als auch eine hohe präbiotische Plausibilität aufweisen. Durch die Notwendigkeit von Cu(II)-Ionen ist die SIPF auf wenige Szenarien der frühen Erde beschränkt. Eisen bietet aufgrund seines umfangreichen und vielfältigen Vorkommens eine attraktive Alternative für metallkatalysierte Peptidsynthesen. Allerdings wurde eine katalytische Aktivität bislang nur in sehr geringem Umfang nachgewiesen. Infolgedessen soll im Rahmen dieser Arbeit eine eisenkatalysierte Peptidsynthese entwickelt werden, die durch einen direkten Reaktionsmechanismus und die Schaffung dehydratisierender Bedingungen einen effizienten Weg hin zu langkettigen Peptiden in vielen präbiotisch plausiblen Modellen darstellt. Ergänzend zur Untersuchung möglicher Umgebungen für die Entstehung der präbiotischen Peptidwelt soll die Analyse der resultierenden Reaktionsmischungen etabliert und optimiert werden. Durch den Einsatz komplexer Mischungen in präbiotischen Synthesen entstehen oft zahlreiche Verbindungen, die oft nur in Spuren nachgewiesen werden können. Eine erfolgreiche Detektion dieser Moleküle erfordert eine hochempfindliche Analysemethode mit hohem Trennvermögen. Die Kapillarelektrophorese (CE) bietet vor allem im Bereich der Proteomik schnelle, hochaufgelöste Trennungen während die Massendetektion eine unvergleichliche Sensitivität liefert. Für die akkurate und detaillierte Aufklärung der komplexen Peptidmischungen dieser Arbeit soll daher ein robustes CE-Orbitrap-MS Interface entwickelt und charakterisiert werden, um die Stärken dieser beiden Analysemethoden zu kombinieren.

# 4. Ergebnisse und Diskussion

# 4.1. Analyse komplexer Peptidmischungen

Im Verlauf dieser Arbeit sollten neue präbiotische Syntheserouten zu langkettigen Peptiden entwickelt werden. In Abhängigkeit von der Anzahl an eingesetzten Aminosäuren können bei Synthesen dieser Art sehr komplexe Produktmischungen auftreten. Bei der erfolgreichen Kupplung aller 20 proteinogenen Aminosäuren können gleichzeitig 400 verschiedene Dipeptide, 8 000 unterschiedliche Tripeptide und 160 000 Tetrapeptide gebildet werden. Die Aufklärung solch umfangreicher Mischungen erfordert Analysemethoden mit einer möglichst großen Auflösung und einem hohen Trennvermögen. Weiterhin entstehen interessante Zielverbindungen oft nur in Spuren, sodass Analysemethoden über möglichst geringe Nachweisgrenzen (LODs) verfügen sollten. Speziell längere Peptidketten konnten im präbiotischen Kontext nur selten nachgewiesen werden, was einerseits an deren erschwerter Synthese aber auch an der Verwendung einer unzureichend sensitiven Analytik liegen könnte. Um eine detaillierte und akkurate Aufklärung der komplexen Peptidmischungen zu gewährleisten, wurden daher zunächst verschiedene Methoden der CE und CE-MS auf deren Sensitivität, Auflösung und dem damit verbundenen Anwendungsaufwand getestet.

## 4.1.1. Methoden der Kapillarelektrophorese

CE-Trennungen basieren auf dem Ladungszustand der Analyten und der Stärke des EOF, die beide entscheidend durch den pH-Wert des BGE beeinflusst werden. Bei neutralen pH-Werten liegen Aminosäuren zum Großteil als Neutralteilchen vor, was in einer schlechten Auftrennung resultiert. Andererseits tragen Aminosäuren als Zwitterionen sowohl bei tiefen als auch bei hohen pH-Werten eine Ladung und könnten somit im sauren oder basischen Milieu aufgetrennt werden. Im basischen Milieu tragen Aminosäuren eine negative Ladung, wodurch sie entgegen dem EOF aufgetrennt werden könnten (der EOF fließt in einer BFS-Kapillare immer in Richtung der negativen Elektrode). Allerdings ist bei hohen pH-Werten des BGE der EOF sehr stark ausgeprägt, dessen Fluss eine Vielzahl an Analyten dann nicht überwinden kann. Eine Verringerung des pH-Wertes in Richtung eines neutralen Milieus würde zwar den EOF abschwächen, allerdings auch den Anteil an geladenen Aminosäuren reduzieren. Einen ständigen Ladungszustand der Aminosäuren bei einem ausreichend schwachen EOF zu garantieren, ist daher in unbeschichteten Kapillaren bei hohen pH-Werten sehr schwierig. Sehr gute Resultate werden allerdings bei der Verwendung von BGEs



**Abbildung 4.1:** Elektropherogramm der Auftrennung aller 20 proteinogenen Aminosäuren (1 mM) nach Leitfähigkeitsdetektion. BGE, Essigsäure (2 M); BFS-Kapillare, 80 cm; 30 kV; 25 °C; Injektion, 30 mbar für 10 s.

mit tiefem pH-Wert erzielt. Dabei fließen zwar EOF und Analyten in die gleiche Richtung, allerdings ist der EOF dabei nicht stark ausgeprägt. Daher wurden vier verschiedene, literaturbekannte Puffersysteme in einer Trennung aller 20 proteinogenen Aminosäuren untersucht: 2 M Essigsäure, 50 mM H<sub>3</sub>PO4 ohne Zusatz und 50 mM H<sub>3</sub>PO4 zusammen mit 2 M Harnstoff oder 50 mM ZnCl<sub>2</sub>.<sup>[287-289]</sup> Der pH-Wert aller BGEs betrug dabei ca. 2. Für die Trennung wurde eine BFS-Kapillare verwendet und die Detektion erfolgte durch einen Leitfähigkeitsdetektor. 2 M Essigsäure lieferte dabei die besten Ergebnisse (Abbildung 4.1). Prinzipiell erfolgte eine sehr gute Auftrennung der Aminosäuren, allerdings überschneiden sich die Peaks mancher Aminosäuren bei höheren Retentionszeiten. Nichtsdestotrotz wurde dieser BGE für alle zukünftigen CE- und CE-MS-Messungen verwendet, auch weil die Auftrennung durch die Verwendung von LPA-beschichteten Kapillaren weiter verbessert werden konnte (siehe Kapitel 4.1.3).

#### 4.1.2. Methoden der Kapillarelektrophorese-Massenspektrometrie

Entwicklung eines robusten und hochsensitiven CE-ESI-MS Interfaces Mit dem Leitfähigkeitsdetektor können Aminosäuren und Peptide noch in sehr geringen Konzentrationen (ca. 5 µM) nachgewiesen werden, allerdings müssen zur Zuordnung der Signale Referenzsubstanzen verwendet werden. Speziell bei der Untersuchung komplexer Mischungen ist dies problematisch, da alle möglichen Produkte zunächst synthetisiert werden müssten. In Abhängigkeit von der Anzahl an eingesetzten Aminosäuren entspricht das einem bedeutendem synthetischen Mehraufwand. Bei der Verwendung der Massenspektrometrie als Detektionsmethode muss dieser Aufwand nicht erbracht werden, da zusammen mit der Retentionszeit die Masse des jeweiligen Analyten mitbestimmt wird und so die Zuordnung erleichtert wird. Weiterhin ergibt sich so die Möglichkeit die unvergleichliche Sensitivität moderner Massenspektrometer auszunutzen. Die Kombination CE-ESI-MS wird vor allem im Bereich der Proteomik in den letzten Jahren vermehrt angewendet,<sup>[248]</sup> auch weil die Schwierigkeiten der Kopplung durch die Entwicklung zahlreicher unterschiedlicher Interfaces besser kontrolliert werden konnten. Manche dieser Interfaces sind dabei auch kommerziell erhältlich. Besonders die von Moini (CESI 8000),<sup>[256]</sup> Dovichi *et al.* (kommerzialisiert von CMP Scientific)<sup>[261]</sup> und Agilent entwickelten Interfaces werden dabei am häufigsten verwendet. Allerdings fällt insbesondere das Interface von Agilent in Vergleichen mit handgefertigten Interfaces durch eine unterlegene Sensitivität auf.<sup>[252, 290]</sup> Und auch andere *sheath-flow* oder *sheathless* Interfaces sind häufig auf die spezifischen Bedürfnisse des jeweiligen Nutzers zugeschnitten, sodass das volle Potenzial der CE-MS-Kopplung nur selten voll ausgenutzt werden kann.

Daher wurde ein eigenes Interface entwickelt, das sowohl zuverlässige aber vor allem auch hochsensitive Analysen ermöglichen sollte.<sup>[291]</sup> Abbildung 4.2 zeigt das unkomplizierte Design des Interfaces. Um die häufig auftretenden Instabilitäten des Elektrosprays von Interfaces im *sheathless design* zu umgehen, wurde ein koaxiales *sheath-flow* Interface konstruiert, die sich generell durch einen stabileren Aufbau und eine einfachere Bedienung auszeichnen. Das *sheath liquid* wird dem System über eine externe Pumpe zugeführt und umhüllt die Kapillare im Emitter. Erst am Kapillarausgang trifft das *sheath liquid* auf den BGE und die Analyten der CE-Trennung, die dann gemeinsam in das Massenspektrometer eingesprüht werden. Prinzipiell bestehen durch das Interfacedesign keine Beschränkungen in der Wahl des *sheath liquid*, wodurch optimale Bedingungen für ein konstantes Elektrospray geschaffen werden.



Abbildung 4.2: Schematische Darstellung (A) und Bilder des entwickelten koaxialen *sheath-flow* Interfaces (B) inklusive einer Nahaufnahme des goldbeschichteten Emitters mit Taylor-Konus (C). I, II, und III: 10, 50, und 0 M $\Omega$  Widerstand.<sup>[291]</sup>

Außer durch die Anwesenheit einer sheath liquid kann das Elektrospray entscheidend durch die Qualität des Emitters beeinflusst werden. Symmetrische und möglichst spitz zulaufende Emitter begünstigen die Ausbildung eines deutlichen und beständigen Taylor-Konus, wodurch reproduzierbar sensitive Messungen ermöglicht werden.<sup>[292, 290]</sup> Dementsprechend wurden anstatt der häufig verwendeten aber zerbrechlichen Glasemitter handgefertigte Emitter aus rostbeständigem Stahl verwendet. Dazu wurden leicht verfügbare Eisenröhrchen mit einem Dremel angespitzt und unter dem Mikroskop evaluiert. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen zeigten immer wieder, wie wichtig dieser Prozess für die Ausbildung eines stabilen Elektrosprays und zufriedenstellende Messungen war. Nur symmetrische, in einer möglichst dünnen Kante spitz zulaufende und ganzheitlich polierte Emitter waren für die weitere Verwendung geeignet. Durch die selbstständige Fertigung der Emitter konnten diese an die Anforderungen der jeweiligen Messungen angepasst und bei eintretender Abnutzung schnell ausgetauscht und erneuert werden. Ein häufiger Grund für Abnutzungen von Metalloberflächen können darauf stattfindende elektrochemische Nebenreaktionen wie z. B. die Gasentwicklung durch Lösemitteloxidation sein.<sup>[293]</sup> Da Edelmetalle eine höhere Resistenz gegen oxidative Belastungen aufweisen, wurde auf die Emitterspitze eine zusätzliche Goldbeschichtung aufgetragen (Abbildung 4.2, Bild B und C). Damit sollten die

Nebenreaktionen minimiert und die Haltbarkeit der Emitter verlängert werden. Das Verfahren dazu wurde von Trapp *et al.* entwickelt und kann sehr schnell durchgeführt werden.<sup>[294]</sup> Im Wesentlichen wird die Kapillarspitze in eine Lösung aus AuCl<sub>3</sub>, KCN, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> und Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> getaucht und daraufhin einer Spannung zwischen 1.5-2.2 V für eine Dauer von 5 min ausgesetzt. Die dadurch entstandene Goldbeschichtung wurde gründlich gespült, um etwaige Cyanidreste zu entfernen. Weiterhin ist sie sehr fein, wodurch der Innendurchmesser des Emitters nicht verändert wurde. Wie bei CE-Messungen üblich wird die Trennspannung am Kapillareingang angelegt (CE HV). Die Spannung zur Herstellung des Elektrosprays wurde in dem System durch eine externe Spannungsquelle (ESI HV) erzeugt, die direkt am Metallemitter angelegt wurde. Durch das sheath liquid wurde die Spannung direkt auf das Kapillarende übertragen und der Stromkreis somit geschlossen. Das Netzwerk aus Widerständen sorgt dabei für eine Stabilisierung der Trennungs- als auch Sprayspannung. Das gesamte Interface ist auf einer verstellbaren (x-y-z)-Bühne montiert und ersetzt die Standard-ESI-Spannungsquelle des Massenspektrometers, dessen Anwesenheit durch einen 15-poligen Stecker simuliert wird. Prinzipiell kann das Interface so an jedes beliebige Spektrometer angeschlossen werden; im vorliegenden System wurde allerdings ein Q Exactive Plus Orbitrap Massenspektrometer verwendet, welches sich durch hohe Auflösungen, schnelle Scanraten und empfindliche Sensitivitäten auszeichnet.

Insgesamt wurde so ein leicht zu bedienendes Interface mit einem einfachen, aber stabilen Aufbau konstruiert. Durch die Anwesenheit einer *sheath liquid* und die Verwendung von beständigen, beschichteten Emittern, wird die Ausbildung eines konstanten Elektrosprays über einen langen Zeitraum garantiert. Somit werden wichtige Voraussetzungen für reproduzierbare und durch die Kopplung mit einem hochsensitiven Orbitrap Massenspektrometer gleichzeitig akkurate und empfindliche Analysen geschaffen. Im Folgenden soll das Potenzial des Interfaces in Abhängigkeit von der *sheath*-Flussrate, der ESI-Spannung und der zusätzlichen Goldbeschichtung charakterisiert werden.

#### Charakterisierung des entwickelten CE-ESI-MS Interfaces

Alle Messungen wurden im Positivmodus und unter Verwendung von 2 M Essigsäure als BGE bei 25 °C durchgeführt. Als *sheath liquid* wurde sowohl eine Lösung aus 50 % v/v Essigsäure (2 M) und Methanol als auch eine Lösung aus 50 % v/v Isopropanol in Wasser, der 0.05 % Ameisensäure zur besseren Ionisation der Analyten zugesetzt war, in Erwägung gezogen. Dabei lieferte die Lösung basierend auf Isopropanol, Wasser und Ameisensäure die besseren Ergebnisse. Zur Trennung wurde eine BFS-Kapillare von 80 cm genutzt, deren Polyimidbeschichtung am Kapillarende um 2 mm entfernt wurde. Die Konditionierung vor der ersten Nutzung der Kapillaren erfolgte durch Wasser (2 min), 0.1 M NaOH (5 min), Wasser (2 min) und BGE (2 min). Zwischen den Messungen wurden die Kapillaren mit 0.1 M NaOH (30 s), Wasser (1 min) und BGE (2 min) gespült. Als Probesubstanzen wurden die Peptide Angiotensin II und Neurotensin verwendet, die hydrodynamisch meist mit einem Druck von 30 mbar für 10 s injiziert wurden. Über die (*x-y-z*)-Bühne wurde vor jeder Messung die Emitterspitze so vor dem Massenspektrometer positioniert, dass ein stabiles und konstantes Elektrospray ausgebildet wurde. Weiterhin befand sich der Kapillarausgang auf der gleichen horizontalen Höhe wie der Kapillareingang, um Sogeffekten vorzubeugen.

In dem entwickelten System wird die Sprayspannung direkt am Emitter angelegt und kann durch die externe Spannungsquelle variiert werden. Nach der Auftrennung der Analyten sorgt sie für deren Übertragung in das Massenspektrometer. Die Ausbildung einer stabilen Übertragung und eines konstanten Elektrosprays erlaubt daraufhin eine akkurate Detektion durch das Massenspektrometer. In einem ersten Set an Experimenten sollte deshalb untersucht werden, welchen Einfluss die Sprayspannung auf die Qualität der erhaltenen Massenspektren hat. Dazu wurde die Sprayspannung bei verschiedenen Trennungsläufen von Angiotensin II und Neurotensin zwischen 2 und 4 kV variiert. Die resultierenden Signalintensitäten und Peakflächen wurden miteinander verglichen (Abbildung 4.3). Sehr geringe Spannungen führten dabei zu regelmäßigen Abbrüchen des Elektrosprays und somit zu einem Verlust der Sensitivität. Bei steigender Sprayspannung nimmt deren Einfluss auf die Qualität der Massenspektren ab, da über einen weiten Spannungsbereich ein stabiles Elektrospray



**Abbildung 4.3:** Peakflächen von zweifach geladenem Angiotensin II (m/z 523.7745) und dreifach geladenen Neurotensin (m/z 558.3105) in Abhängigkeit von der angelegten ESI-Spannung. Alle Experimente wurden drei Mal durchgeführt. Die Fehlerbalken entsprechen ± SD. BGE, Essigsäure (2 M); BFS-Kapillare, 80 cm; 30 kV; 25 °C; Injektion, 30 mbar für 10 s.

erzeugt werden kann. Allerdings erhöhen zu hohe Spannungen das Risiko für elektrochemische Reaktionen am Emitter und führen zu einer reduzierten Haltbarkeit. Dementsprechend wurde für alle zukünftigen Messungen eine ESI-Spannung von ca. 3 kV angewendet.

Als nächstes wurde der Einfluss der sheath-Flussrate untersucht. Prinzipiell wird das Elektrospray durch das Vorhandensein einer sheath liquid stabilisiert und führt so zu genaueren Messungen. Weiterhin kann dadurch die Massenkompatibilität des BGE und die Ionisierung der Analyten verbessert werden. Allerdings wird oft argumentiert, dass durch den Einsatz einer zusätzlichen Flüssigkeit die Probe weiter verdünnt wird, wodurch Nachweisgrenzen wieder erhöht werden. Somit ist es wichtig die sheath-Flussrate bei einem gleichbleibend stabilen Elektrospray zu minimieren. In dem vorliegenden System wurde die sheath-Flussrate bei verschiedenen Trennungen von Angiotensin II und Neurotensin (beide 10 µM) zwischen 2 und 9 µL/min variiert. Die resultierenden Peakflächen wurden miteinander verglichen (Abbildung 4.4, A). Hohe Flussraten resultierten in vergleichsweise kleinen Peakflächen, welche mit abnehmender Verdünnung weiter zunahmen. Ein Maximum der Peakflächen von Angiotensin und Neurotensin konnte bei einer Flussrate von 3 µL/min erzielt werden. Eine noch geringere Menge an sheath liquid resultierte in mangelhaften Spraybedingungen und führte zu einer erneuten Abnahme der Peakflächen. Die Ergebnisse dieser Experimente werden weiterhin durch eine Betrachtung der Peakformen veranschaulicht (Abbildung 4.4, B). Bei hohen Flussraten erfolgt keine konstante Übertragung der Analyten und



**Abbildung 4.4:** Peakflächen von doppelt geladenem Angiotensin II (m/z 523.7745) und dreifach geladenem Neurotensin (m/z 558.3105) in Abhängigkeit von der verwendeten *sheath*-Flussrate (A) und repräsentative EIEs von 3 und 9 µL/min (B). Alle Experimente wurden drei Mal durchgeführt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der Experimente dar. Die gestrichelte Linie dient lediglich Illustrationszwecken. BGE, Essigsäure (2 M); *sheath liquid*, 50 % v/v wässrige Isopropanollösung mit 0.05 % Ameisensäure; Probe (Angiotensin II und Neurotensin jeweils 10 µM in BGE) injiziert bei 30 mbar für 10 s; CE-Inlet, 30 kV; Emitter, 3.2 kV.<sup>[291]</sup>

die extrahierten Ionenelektropherogramme (EIEs) sind sehr instabil. Außerdem ist die maximale Peakintensität um ein Vielfaches geringer als bei geringeren Flussraten. Im Vergleich dazu werden bei einer Flussrate von 3  $\mu$ L/min sehr scharfe Signale mit hohen Intensitäten, Peakflächen und großem *S/N* erzielt. Infolgedessen wurde in den restlichen Experimenten eine *sheath*-Flussrate von 3  $\mu$ L/min eingesetzt.

Im nächsten Schritt wurde die Anfälligkeit des Metallemitters für Nebenreaktionen untersucht und ob diese durch die zusätzliche Goldbeschichtung verringert werden konnte. Da die Beschaffenheit direkt die Ausbildung eines konstanten Taylor-Konus und damit auch die Elektrospraystabilität beeinflusst, wurde diese für beide Emitter über einen langen Zeitraum observiert. Dafür wurde fortlaufend Angiotensin in die CE-Kapillare injiziert und das entsprechende Signal am Massenspektrometer verfolgt. Unter stabilen Spraybedingungen (und damit einer intakten Emitterspitze) sollte die Intensität des ankommenden Angiotensin-Signals weniger fluktuieren als unter instabilen Bedingungen. Dementsprechend wurde die relative Standardabweichung (RSD) der Intensität des Angiotensin-Signals für beide Emitter während sechs aufeinanderfolgenden Läufen untersucht (dies entspricht einer Gesamtmesszeit von 300 min). Diese Experimente wurden ohne das Anlegen einer CE-Spannung durchgeführt, da keine Auftrennung, sondern ein konstanter Ionenstrom von Angiotensin erreicht werden sollte. Der goldbeschichtete Emitter produzierte einen leicht höheren Durchschnittswert von 9 % verglichen mit dem reinen Stahlemitter (Abbildung 4.5). Der Unterschied im absoluten Wert der Standardabweichung ist der Form des Emitters geschuldet. Da diese von Hand angefertigt werden variieren die Emitterspitzen in geringen Maßen. Allerdings konnte



**Abbildung 4.5:** Abweichung des EIEs in Abhängigkeit von der Anzahl an durchgeführten Experimenten mit entweder dem rostbeständigen Stahlemitter oder dem goldbeschichteten Emitter. Jedes Experiment war eine durchgehende Infusion einer 1  $\mu$ M Lösung aus Angiotensin II in BGE für 50 min. BGE, Essigsäure (2 M); *sheath liquid*, 50 % v/v wässrige Isopropanollösung mit 0.05 % Ameisensäure; konstanter, unterstützender Druck von 80 mbar; Emitter, 3.2 kV. <sup>[291]</sup>

auch beobachtet werden, dass die relative Standardabweichung des Stahlemitters während den 6 Messungen stärker zunimmt als die des goldbeschichteten Emitters. Besonders nach dem dritten Experiment nimmt die Stabilität des Elektrosprays bei der Verwendung des Stahlemitters deutlich ab. Im Gegensatz dazu können die Elektrospraybedingungen durch den Goldemitter über einen langen Zeitraum stabil gehalten werden, wodurch die relative Standardabweichung nur sehr leicht zunimmt. Somit wurde nachgewiesen, dass die Goldbeschichtung mögliche Nebenreaktionen auf der Metalloberfläche reduziert und somit konstante Spraybedingungen schafft.

In abschließenden Experimenten zur Charakterisierung des Interfaces wurde die Sensitivität des Systems untersucht. Dazu wurden die optimierten Messbedingungen auf eine Trennung von Angiotensin II und Neurotensin angewandt. Die resultierenden LODs wurden bestimmt und mit Literaturwerten anderer Interfaces verglichen. Abbildung 4.6 zeigt die EIEs von Angiotensin II und Neurotensin bei Probenkonzentrationen von 50, 5 und 2 nM (im Messvial). Es fällt auf, dass die Massenspuren kein klassisches Hintergrundsignal aufweisen. Stattdessen treten einzelne Rauschsignale in sehr unregelmäßigen Abständen auf und Signale unter einer bestimmten Intensität werden gar nicht erst aufführt. Durch die Abwesenheit eines konstanten Hintergrundsignals kann das LOD deswegen nicht durch das *S/N* (für gewöhnlich = 3) bestimmt werden. Auch Amenson-Lamar *et al.* beobachteten das gleiche Problem bei der Bestimmung des LOD von Angiotensin II durch die Kopplung ihres entwickelten Interfaces an ein Q Exactive Orbitrap Massenspektrometer.<sup>[270]</sup> Dementsprechend wurde eine alternative Methode zur Bestimmung des LOD verwendet, wie sie von Knoll beschrieben wurde.<sup>[295]</sup> Hierbei wird das LOD nach folgender Formel berechnet:

LOD (nM) = 
$$K_{Knoll} \times h_n \times n_{injected} / h_s$$

Dabei entspricht  $K_{Knoll}$  einer Konstante, die sich aus der Halbwertsbreite des jeweiligen Probesignals und der Dauer einer Blankmessung ergibt.  $h_n$  und  $h_s$  geben die maximale Signalintensität des Hintergrundsignals (innerhalb des Blankbereichs) und Probesignals wider und  $n_{injected}$  ist die Konzentration der Probe. Für die Bestimmung der LODs wurde in den Messungen der 2 nM Probenkonzentration eine Dauer der Blankmessung von 3 min direkt vor dem Probenpeak angenommen. Somit ergaben sich folgende LODs:

$$LOD_{Angiotensin II} = 1.9718 \times 1.64 \times 10^{4} \times 2 \text{ nM} / 2.77 \times 10^{4} = 2.3 \text{ nM}$$
$$LOD_{Neurotensin} = 1.9718 \times 1.57 \times 10^{4} \times 2 \text{ nM} / 2.91 \times 10^{4} = 2.1 \text{ nM}$$

Der Vergleich mit anderen Interfaces ist in Tabelle 4.1 zusammengefasst. Obwohl beide Interfaces weniger *sheath liquid* verwenden, können mit dem entwickelten robusten Interface LODs kleiner Proteine in der gleichen Größenordnung erzielt werden.<sup>[262, 296, 297]</sup>

 

 Tabelle 4.1: Vergleich der LODs von verschiedenen Testproteinen nach der Messung mit unterschiedlichen Interfacedesigns.

Interface	Nanofluss <sup>[262]</sup>	Sheathless <sup>[296]</sup>	Dieses Int	erface <sup>[291]</sup>
LOD	4 ng/mL (Angiotensin II)	$7.4  imes 10^{-3}$ ng/mL (Insulin)	2.4 ng/mL (Angiotensin II)	3.5 ng/mL (Neurotensin)

Insgesamt wurde somit ein sowohl stabiles als auch effizientes CE-Orbitrap-MS Interface entwickelt. Zuverlässige, wiederholbare Messungen sollten im Fokus des entwickelten Systems stehen. In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass die Goldbeschichtung des Emitters zu einer erhöhten Elektrospraystabilität führt. Weiterhin verbessert das *sheath liquid* die



**Abbildung 4.6:** EIEs von Angiotensin II (m/z 523.7745, A) und Neurotensin (m/z 558.3105, B) bei einer 50, 5 und 2 nM Probenkonzentration. Der Wert oberhalb der entsprechenden MS-Signale entspricht den absoluten Zählungen der Intensität. Das entsprechende LOD wurde aus der Trennung der 2 nM Probe berechnet. CE-Kapillare, 80 cm; BGE, Essigsäure (2 M); *sheath liquid*, 50 % v/v wässrige Isopropanollösung mit 0.05 % Ameisensäure; *sheath*-Flussrate 3.0 µL/min; Probe mit 100 mbar für 10 s injiziert; CE-Inlet, 30 kV; Emitter, 3.2 kV; MS-Einlasskapillare, 140 °C; Messbereich: m/z 450-1300.<sup>[291]</sup>

Ionisation und Massenkompatibilität der Analyten und des BGE. Obwohl während der Charakterisierung des Interfaces nur BFS-Kapillaren verwendet wurden, erlaubt das Design die Verwendung jeglicher anderer, auch beschichteter Kapillaren. Dies ist vor allem bei der Analyse von Proteinmischungen ein großer Vorteil, was insbesondere im nächsten Kapitel gezeigt wird. Außerdem konnten die schnellen und akkuraten Analysen des Orbitrap Massenspektrometers genutzt werden und die gemessenen LODs der Modellpeptide demonstrieren eine bemerkenswerte Sensitivität des Systems. Somit wurde eine wichtige Grundlage für die detaillierte Aufklärung komplexer Peptidmischungen gelegt, aber auch eine Kopplungsmethode bereitgestellt, deren Anwendung für andere zuverlässige, sensitive und exakte Analysen in anderen Forschungsbereichen denkbar ist.

## 4.1.3. Untersuchung verschiedener Kapillarbeschichtungen

Da in präbiotischen Peptidsynthesen primär Aminosäuren eingesetzt werden und meist nur kurze Peptidketten gebildet werden, wurde in einem weiteren Schritt der Charakterisierung des Interfaces die Analyse auf derartige Verbindungen ausgeweitet. Dazu wurde eine Mischung aus wichtigen Aminosäuren und kurzkettigen Peptiden in unterschiedlichen Konzentrationen zusammengestellt (Tabelle 4.2). Verbindungen mit hohen Konzentrationen sollten mit der entsprechenden Peakfläche Aufschluss über die Genauigkeit der Messung geben. Andererseits waren z. B. die Peptide Ala<sub>2</sub> und Gly<sub>3</sub> so gering konzentriert, dass allein schon die erfolgreiche Detektion der Moleküle optimale Messbedingungen bescheinigen sollte. Durch eine regelmäßige Vermessung dieser Testmischung (in etwa vor jeder Vermessung einer Experimentserie an unterschiedlichen Tagen) konnte so die Beständigkeit der Analysen untersucht werden.

Aminosäure/Peptid	Konzentration (µM)	
His	250	
Trp	250	
Arginin (Arg)	50	
GlyAla	50	
AlaGly <sub>2</sub>	50	
Gly <sub>3</sub>	1	
Ala <sub>2</sub>	0.5	

Tabelle 4.2: Zusammensetzung der Testmischung zur Untersuchung der Beständigkeit der mit dem CE-Orbitrap-MS Interface erhaltenen Analysen.

Die vorangegangenen Untersuchungen hatten gezeigt, dass während einer Messung die *she-ath*-Flussrate den größten Einfluss auf die Sensitivität der Messungen hat. Somit wurden

verschiedene Flussraten zwischen 1 und 8  $\mu$ L/min auf unterschiedliche Trennungsläufe der Testmischung angewendet. Dabei fielen vor allem bei den Signalen von His extreme Fluktuationen in der Peakfläche auch unter Verwendung der gleichen Flussrate auf (Abbildung 4.7). Da das Ausmaß der Schwankungen nicht bei allen Peptiden gleich war, wurden diese nicht auf eine mangelhafte Beständigkeit des Interfaces zurückgeführt. Stattdessen wurden Wechselwirkungen der Aminosäuren und Peptide mit der Kapillarwand in Betracht gezogen, da diese vor allem im Bereich der Proteomik häufig beobachtet werden.



**Abbildung 4.7:** Peakfläche von His (m/z 523.0768) in Abhängigkeit von der verwendeten *sheath*-Flussrate. Alle Experimente wurden drei Mal durchgeführt. Die Fehlerbalken entsprechen ± SD. BGE, Essigsäure (2 M); BFS-Kapillare, 80 cm; 30 kV; 25 °C; Injektion, 30 mbar für 10 s; Emitter, 3.2 kV.

Um die Adsorption der Peptide an der Kapillarwand zu unterbinden, wurden verschiedene Strategien erwogen. Einerseits wurde der Testmischung Harnstoff (500 mM) beigemischt, da dieser häufig zur Denaturierung und Strukturveränderung von Peptiden eingesetzt wird. Außerdem wurden zusätzlich der Einsatz von PVA- und LPA-beschichteten Kapillaren untersucht, da diese standardmäßig in Proteinanalysen eingesetzt werden. Hier wird allerdings neben der Unterbindung der Wechselwirkungen von Analyten mit der Kapillarwand auch der EOF unterdrückt. Dies resultiert in einer besseren Auftrennung, allerdings auf Kosten längerer Messzeiten. Zur Durchführung der Analysen wurden deshalb kommerziell erhältliche PVA-Kapillaren erworben (Agilent Technologies). Da die Beschichtung laut Herstellerangaben nur bei pH-Werten zwischen 2.5 und 9.5 beständig ist, wurde in diesen Messungen auch die Konzentration des Essigsäure-BGE von 2 M auf 1 M verringert. LPA-Kapillaren sind nicht kommerziell erhältlich, allerdings besteht hier keine Einschränkung im pH-Wert des BGE. Dementsprechend wurden von Hand beschichtete Kapillaren nach einer Methode von Zhu *et al.* hergestellt.<sup>[281]</sup> Dabei wird die Kapillare zuerst mehrfach gespült, worauf die

Silanisierung der Silanolgruppen mit  $\gamma$ -MAPS folgt. Nach erneutem Spülen wird daraufhin die Polymerisation von Acrylamid mit Persulfat thermisch aktiviert. Ein abschließender Spülvorgang beschließt den Beschichtungsprozess. Bei dem Versuch die Ergebnisse zu reproduzieren, fiel die LPA-Beschichtung zunächst oft zu dick aus. Dies führte entweder zu einem vollständig unterdrückten EOF und damit zu extrem zeitaufwändigen Messungen. Selbst in druckassistierten Läufen wurden nur große Retentionszeiten der Aminosäuren erhalten. Andererseits verstopfte die Kapillare oft schon während dem Beschichtungsprozess. Also wurden die verschiedenen Parameter der Prozedur wie die Dauer der Silanisierung oder Polymerisation und der Menge an zugegebenem Acrylamid und Persulfat in darauffolgenden Durchführungen variiert. Danach wurde mittels CE überprüft, welche Messdauer für die Auftrennung aller proteinogenen Aminosäuren mit der jeweiligen Kapillare benötigt wurde. Es wurde beobachtet, dass vor allem die Dauer des Silanisierungs- und Polymerisationsschritts, aber auch die Menge an zugegebenem Persulfat ausschlaggebend für den Ausgang der Beschichtung waren. Die optimierte Prozedur ist in Kapitel 6.2.2 aufgeführt. Mit derartig beschichteten Kapillaren konnte so innerhalb von 20 min ein Großteil der proteinogenen Aminosäuren sehr effektiv aufgetrennt werden (Abbildung 4.8). Der Vergleich mit der Auftrennung der BFS-Kapillare (Abbildung 4.1) zeigt vor allem für die Aminosäurepaare Val und Ile (V, I) sowie Glu und Phenylalanin (E, Phe/F) eine geringere Überlagerung. Allerdings sollten durch die Beschichtung der Kapillare primär Peptidadsorptionen unterbunden werden, da durch die Massendetektion eine Überlagerung der Signale meist keine Schwierigkeiten bei der Zuordnung dieser zur Folge hatte. Eine Verringerung der Adsorption ließ



**Abbildung 4.8:** Elektropherogramm der Auftrennung aller proteinogenen Aminosäuren und Hydroxyprolin (HP) mit der LPA-beschichteten Kapillare nach Leitfähigkeitsdetektion. BGE, Essigsäure (2 M); LPA-Kapillare, 80 cm; 30 kV; 25 °C; Injektion, 30 mbar für 10 s.

sich besonders bei den Aminosäuren Cys und Asp (C, D) beobachten, deren Signale im Vergleich zur BFS-Kapillare nicht mehr zweigeteilt waren. Um die Messungen zu beschleunigen, wurde ein konstanter Druck von 30 mbar an der CE angelegt.

Im nächsten Schritt wurden die drei Strategien zur Unterbindung der Peptidadsorption (Harnstoff, PVA-, LPA-beschichtete Kapillare) in CE-MS-Analysen der Testmischung evaluiert. Dazu wurde die Testmischung unter den entsprechenden Bedingungen vermessen und die Peakflächen der dadurch erhaltenen Signale miteinander verglichen. Für alle Verbindungen der Testmischungen konnten dieselben Trends beobachtet werden. In Abbildung 4.9 sind stellvertretend die Signale von GlyAla, AlaGly<sub>2</sub>, Arg und His dargestellt, da deren Peakflächen in der gleichen Größenordnung liegen. Aus dem Vergleich wird ersichtlich, dass sich durch die Verwendung beschichteter Kapillaren in der Peptidanalytik weitaus genauere Ergebnisse erzielen lassen. In den Messungen mit der BFS-Kapillare wurden durchgehend die geringsten Peakflächen erhalten. Allerdings hatte auch die Zugabe von Harnstoff zum BGE nur einen sehr geringen Einfluss auf die Peptidadsorption. Andererseits zeigten die beschichteten Kapillaren einen deutlichen Anstieg der Signale aller verwendeten Peptide und Aminosäuren. Durch die LPA-beschichtete Kapillare konnten die Peptidadsorptionen am effektivsten unterbunden werden. Am stärksten betroffen waren dabei die Aminosäuren Arg und



Abbildung 4.9: Peakflächen ausgewählter Peptide und Aminosäuren der Testmischung in Abhängigkeit von der verwendeten Kapillarbeschichtung. Untersucht wurden dabei eine unbeschichtete Kapillare (BFS) ohne und mit zusätzlicher Zugabe von Harnstoff zur Analysemischung, eine PVA- und eine LPA-beschichtete Kapillare.
His, deren Peakflächen um den Faktor 20 zunahmen. Aber auch die Signale der Peptide wurden in jedem Fall gesteigert; im Fall von Ala<sub>2</sub> stieg die Signalfläche um das 10-Fache an.

Der immense Einfluss der LPA-Beschichtung auf die Peptidanalysen lässt sich nicht nur durch die Betrachtung der Peakflächen, sondern auch der Peakformen veranschaulichen (Abbildung 4.10). Ohne die Verwendung einer Kapillarbeschichtung adsorbiert His an der Kapillarwand und es erfolgt keine klare Auftrennung der Aminosäure. Dementsprechend ist das Signal nicht intensiv und weist ein starkes Tailing auf. Verbindungen in geringen Konzentrationen wie Ala<sub>2</sub> können, wenn überhaupt, nur durch vereinzelte Signalpeaks detektiert werden, da Anteile des Dipeptids in der Kapillare zurückbleiben. Durch die Verwendung der LPA-Beschichtung wird die Adsorption effektiv minimiert, die Signalintensität nimmt in beiden Fällen stark zu und auch Tailing wird unterbunden. Daraus folgen größere Peakflächen, aber vor allem wird so die Sensivität der Messung um ein Vielfaches gesteigert. Eine abschließende Variation der *sheath*-Flussrate bei Analysen der Testmischung unter





Verwendung von LPA-Kapillaren ergab, dass bei einer Flussrate von 3  $\mu$ L/min die besten Resultate erzielt werden. Dies bestätigt die Ergebnisse der vorangegangenen Charakterisierung des Interfaces und somit wurde in folgenden Messungen immer diese Flussrate angewandt.

Insgesamt konnte so durch die Optimierung der Beschichtungsprozedur eine wichtige Ergänzung zu der genauen und hochaufgelösten Analyse von Peptidmischungen geschaffen werden. Zunächst ermöglichen die LPA-beschichteten Kapillaren durch die Unterdrückung des EOF eine bessere Auftrennung der Aminosäuren und Peptide. Durch die Verhinderung der Analytadsorption werden weiterhin die Signalflächen und –intensitäten gesteigert. Bei der Analyse von Peptidbildungsreaktionen können so mehr Produkte in höheren Ausbeuten und mit niedrigeren LODs detektiert werden.

# 4.1.4. Entfernung von Kupfer aus der Reaktionsmischung

Für beständige und genaue Analysen mit den LPA-Kapillaren musste in einigen Fällen zunächst die Kupferkationen der Probemischung vornehmlich aus zwei Gründen verringert werden. Grundsätzlich war während der Vermessung von Reaktionsmischungen im weiteren Verlauf der Arbeit ein Verschleiß der Beschichtung durch eine Zunahme des Peaktailings und ein Absinken der Stromstärke an der CE zu erkennen. Auffallend stark wurde die Abnutzung der Kapillare dabei von der eingeführten Ionenmenge beeinflusst. Insbesondere bei der Untersuchung von SIPF-Ansätzen, in denen sehr hohe NaCl- und CuCl<sub>2</sub>-Konzentrationen eingesetzt wurden, konnten die Kapillaren nur für sehr wenige Analysen verwendet werden. Die injizierten Salzkonzentrationen beanspruchten die Beschichtung der Kapillare stark, sodass sie anfangs oft mehrfach am Tag ausgetauscht werden musste. Dies war vor allem aufgrund der aufwendigen Beschichtungsprozedur problematisch. Ein Zyklus benötigte im Regelfall 4 Tage und lieferte nur 4 Kapillaren. Um trotzdem die Analyse großer Mengen an Ansätzen zu ermöglichen, mussten daher die Salzkonzentrationen vor den Messungen verringert werden.

Außerdem muss bei CE-MS-Messungen in jedem Fall eine Kontamination des Massenspektrometers durch nicht flüchtige Verbindungen vermieden werden. Aufgrund der kurzen Retentionszeiten von Metallionen kann dies in einigen Fällen schon erreicht werden, indem die Massendetektion zeitversetzt von der CE-Messung gestartet wird. Erfahrungsgemäß betrug die Retentionszeit der Kupferionen bei CE-MS-Messungen 8 min und dementsprechend wurde die Massendetektion erst danach gestartet. Allerdings zeigte sich bei der Umsetzung komplexer Aminosäuremischungen, dass die Dipeptide der basischen Aminosäuren ähnliche Retentionszeiten wie Cu<sup>2+</sup>-Ionen aufwiesen. Dementsprechend würde die Analyse einer unbehandelten Reaktionsmischung automatisch eine Kontamination des Massenspektrometers mit Cu-Ionen zur Folge haben.

Infolgedessen wurden vor manchen Analysen die Kupferionen der Reaktionsmischung mit einem Amberlite IRC-748 Kationentauscher entfernt. Dabei handelt es sich um ein chelatbildendes Harz mit einer hohen Selektivität für Cu(II)-Ionen.<sup>[298]</sup> Um einen weiteren Anstieg der Metallionenkonzentration in der Probe zu verhindern, wurde der Ionentauscher dafür zunächst von seiner Na<sup>+</sup>-Form in die H<sup>+</sup>-Form überführt. Dazu wurde er zunächst mit HCl (1 M) und danach gründlich mit H<sub>2</sub>O gespült. Die Effektivität des Ionentauschers wurde daraufhin in CE-Messungen untersucht. Dabei wurde sowohl die Menge an eingesetztem Ionentauscher als auch die Kontaktzeit mit der Probe variiert. Weiterhin wurde der Einfluss eines einfachen Austauschs mit neuem Kationentauscher untersucht. Es konnte beobachtet werden, dass durch den Einsatz gleicher Mengen Ionentauscher, aber größeren Kontaktzeiten die Menge an entferntem Kupfer nur geringfügig gesteigert werden konnte. Andererseits erwies sich der Austausch des Kationentauschers als sehr effektiv. Um die Kupferionen aus der Reaktionsmischung vollständig zu entfernen, wurde die Probe deshalb pro 2.2 mg Kupfer zwei Mal für 2 h mit 30 mg Amberlite IRC-748 gerührt. Durch die Behandlung mit dem Kationentauscher wurde die übrige Probenzusammensetzung nicht beeinflusst.

# 4.2. Kupferkatalysierte Peptidbildungen

Um die kinetische und thermodynamische Barriere der Peptidknüpfung zu überwinden, wurden im präbiotischen Kontext eine Vielzahl von Reaktionsrouten vorgeschlagen. Dabei zeichnet sich die SIPF durch einen einfachen Mechanismus ausgehend von simplen Reaktanten aus. Im Verlauf der Reaktion sorgen hohe NaCl-Konzentrationen für dehydratisierende Bedingungen, während Kupfer(II)-Ionen einfache Aminosäuren und kurze Peptide komplexieren, sie in räumliche Nähe bringen und so eine Peptidknüpfung katalysieren.<sup>[188]</sup> So konnte bereits nach zwei Tagen Gly<sub>6</sub> als längstes Peptid erhalten werden.<sup>[198]</sup> Auch die Mehrheit der übrigen proteinogenen Aminosäuren wurde unter SIPF-Bedingungen umgesetzt, allerdings wurde eine Polymerisation über Dipeptide hinaus nur selten beobachtet. Nach der Entwicklung der hochsensitiven CE-Orbitrap-MS-Analytik (siehe Kapitel 4.1) wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit die Synthese längerer Peptide unter SIPF-Bedingungen untersucht. Dabei sollte analysiert werden, ob die bisherigen Versuche langkettige Peptide zu synthetisieren aufgrund der Reaktionsbedingungen oder einer ungenügend sensitiven Analytik scheiterten. Weiterhin wurden in den vorangegangenen Studien die Dimerisierungen verschiedener Aminosäuren meist getrennt voneinander durchgeführt. Allerdings sind derartige Reaktionen in einem präbiotischen Kontext schwer zu realisieren, da Aminosäuresynthesen bisher nur zu einer Mischung verschiedener Aminosäuren führten. Um das vollständige Potenzial der SIPF-Reaktion auszuleuchten, sollten daher in weiteren Untersuchungen unterschiedliche komplexe Aminosäuremischungen umgesetzt werden.

### 4.2.1. Variation der Reaktionsbedingungen

Im Fokus dieser Arbeit stand zunächst eine detaillierte Untersuchung der Reaktionsbedingungen der SIPF und wie groß der Einfluss der verschiedenen Parameter auf die erfolgreiche Kupplung der eingesetzten Aminosäuren war. In unterschiedlichen Systemen wurde dazu die Peptidkondensation der Aminosäuren Ala und Val verfolgt und die Menge an NaCl oder verschiedenen Kupferkatalysatoren variiert. Weiterhin wurde der Einfluss unterschiedlicher katalytisch aktiver Aminosäuren und Peptide auf die Produktbildung untersucht. Grundsätzlich wurden alle Reaktionen bei 85 °C durchgeführt, während Proben zwischen 4 – 60 Tagen (d) entnommen wurden.

Da diese Versuche vor der Entwicklung des CE-MS Interfaces durchgeführt wurden, wurden die Reaktionen mittels CE und anschließender Leitfähigkeitsdetektion analysiert. Für eine richtige Zuordnung der gebildeten Peptide mussten somit deren Migrationszeiten mit denen

von entsprechenden Referenzpeptiden abgeglichen werden. Meist wurde als zusätzliche katalytische Aminosäure Gly eingesetzt. Dementsprechend wurden alle möglichen Dipeptidkombinationen der Aminosäuren Ala und Val mit Gly gezielt hergestellt oder kommerziell erworben. Die Synthese erfolgte dabei unter Einsatz eines automatischen Peptidsynthesizers. Hierbei wurde ein Wang-Harz, eine Fmoc-Schutzgruppe und HBTU zur Aktivierung der Carbonsäure verwendet (Abbildung 4.11). Der Fortschritt der Reaktion wurde mittels des Kaiser-Tests verfolgt.



Abbildung 4.11: Synthese der Referenzpeptide Val<sub>2</sub>, GlyVal und ValGly durch einen automatischen Peptidsynthesizer. Nach der Zugabe einer aktivierten Aminosäure wird das entstandene Dipeptid entschützt und danach vom Harz abgelöst.

#### Variation der katalytisch aktiven Aminosäure



**Abbildung 4.12:** In Nass-Trocken-Zyklen wurde der Einfluss unterschiedlicher Mengen der katalytisch aktiven Aminosäuren Gly, His oder Gly<sub>2</sub> auf die Peptidkondensation von Ala und Val untersucht. Ala und Val wurden dabei nicht zusammen in der gleichen Reaktion eingesetzt.

Rode *et al.* beobachteten in ihren Untersuchungen der SIPF, dass die Dimerisierung einer beliebigen Aminosäure durch die Zugabe einer anderen, katalytisch aktiven Aminosäure begünstigt werden kann. Der Grund dafür könnte in einer erhöhten Reaktivität der katalytisch aktiven Aminosäuren liegen, die zunächst mit der anderen Aminosäure gemischte Tripeptide bildet. Nach der Abspaltung der Katalysatoraminosäure bleibt dann das Dipeptid der anderen Aminosäure zurück. Eine derartige katalytische Aktivität konnte den Aminosäuren Gly, His und dem Dipeptid Gly<sub>2</sub> nachgewiesen werden. Die besten Ergebnisse wurden dabei erzielt, wenn diese in einem Verhältnis von 1:8, bezogen auf die eigentliche Aminosäure, eingesetzt wurden.<sup>[299]</sup> Auch im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss von Gly, His und Gly<sub>2</sub> auf die Kondensation von Ala und Val in unterschiedlichen Verdunstungsexperimenten untersucht (Abbildung 4.12). Ala und Val wurden dabei nicht im gleichen Ansatz verwendet, um

einerseits die Wirkung der katalytischen Aminosäure isoliert betrachten zu können und um andererseits die Zuordnung der Produktpeaks während der Analytik zu erleichtern. Weiterhin wurden Gly, His und Gly<sub>2</sub> in unterschiedlichen Konzentrationen zugegeben. Interessanterweise konnte ohne deren Zugabe weder die Dimerisierung von Ala noch von Val beobachtet werden und auch geringe Mengen im Verhältnis 1:8 resultierten nicht in einer erfolgreichen Kondensation. Lediglich die Dimerisierung von Gly konnte unter diesen Bedingungen beobachtet werden. Erst Konzentrationen von 1:2 lieferten einen deutlichen Zuwachs an gebildeten Peptiden, die bereits nach 4 d detektiert werden konnten. So wurden sowohl die Homodipeptide von Ala und Val als auch deren gemischte Dipeptide mit Gly synthetisiert. Auch mit Gly2 als Katalysatoraminosäure konnten die entsprechenden Dipeptide gebildet werden. Weiterhin traten in beiden Fällen zusätzliche Peaks in den Elektropherogrammen auf, die allerdings aufgrund fehlender Referenzpeptide nicht sicher zugeordnet werden konnten. Ähnliche Beobachtungen konnten bei der Zugabe von His gemacht werden. Auch hier führten erst höhere Konzentrationen zur Dimerisierung von Ala oder Val, allerdings trat diese erst nach 60 d und nicht nach 4 d ein. Zusätzlich auftretende Peaks konnten ohne Referenzsubstanzen nicht zugewiesen werden.

Nichtsdestotrotz lassen sich aus diesen Experimenten wichtige Erkenntnisse über die SIPF ableiten. Zum einen konnte die katalytische Aktivität von Gly, Gly<sub>2</sub> und His bestätigt werden, wobei Gly und Gly<sub>2</sub> die Dimerisierung stärker begünstigen als His. Ohne deren Zugabe erfolgte in keinem Fall Produktbildung. Dementsprechend kann die Reaktivität einer einzelnen Aminosäure unter den Bedingungen der SIPF nicht isoliert betrachtet werden, sondern ist zusätzlich von der Anwesenheit anderer Aminosäuren abhängig. Zum anderen tritt diese katalytische Aktivität verstärkt bei höheren Konzentrationen der zusätzlichen Aminosäure ein und ein Verhältnis von 1:8 scheint nicht optimal.

# Variation der Eduktkonzentration

Rode *et al.* führten die SIPF zunächst bei konstanten Volumina und sehr hohen Eduktkonzentrationen durch. Da derartig hohe Konzentrationen im präbiotischen Kontext unwahrscheinlich sind, wurden in späteren Studien die Peptidbildungen allerdings ausnahmslos in Verdunstungsexperimenten bei geringeren Konzentrationen untersucht. Zur Ermittlung der für die erfolgreiche Peptidkondensation tatsächlich notwendigen Eduktkonzentrationen, wurde die Dimerisierung von Ala und Gly bei vier unterschiedlichen Konzentrationen und konstanten Reaktionsvolumina analysiert (Tabelle 4.3, Tabelle 7.1). Die Verhältnisse der Reaktanten zueinander blieb dabei immer gleich. Die geringste untersuchte Eduktkonzentration entsprach dabei der in den Nass-Trocken-Zyklen eingesetzten Startkonzentration (bevor diese durch die Verdunstung ansteigt). Tatsächlich konnte bei derartig niedrigen Konzentrationen keine Produktbildung beobachtet werden. Erst ab einer NaCl-Konzentration von über 3 M konnten Dipeptide detektiert werden. Noch höhere Konzentrationen führten zu einer schnelleren Synthese von Val<sub>2</sub>, das dabei schon nach 14 und nicht erst nach 21 d detektiert werden konnte. Bei der Dimerisierung von Ala konnten alle möglichen Dipeptidkombinationen ab einer NaCl-Konzentration von 3 M bereits nach 7 d nachgewiesen werden. Weiterhin entstand das Tripeptid AlaGly<sub>2</sub>. Sowohl bei der Reaktion von Ala als auch von Val traten bei den Reaktionen mit großen Konzentrationen weitere Peaks im Elektropherogramm auf, die aufgrund fehlender Standards nicht zugeordnet werden konnten.

	Produkt	Tag 7	Tag 14	Tag 21	Tag 28
c(Ala) = 40  mM, $c(CuCl_2) = 40 \text{ mM},$ c(Gly) = 10  mM, c(NaCl) = 500  mM	Ala2 AlaGly/GlyAla Gly2 AlaGly2				
c(Ala) = 100 mM, c(CuCl <sub>2</sub> ) = 100 mM, c(Gly) = 25 mM, c(NaCl) = 1.3 M	Ala2 AlaGly/GlyAla Gly2 AlaGly2				
c(Ala) = 250  mM, $c(CuCl_2) = 250 \text{ mM},$ c(Gly) = 60  mM, c(NaCl) = 3.2  M	Ala <sub>2</sub>	×	×	×	×
	AlaGly/GlyAla	×	×	×	×
	Gly <sub>2</sub>	×	×	×	×
	AlaGly <sub>2</sub>	×	×	×	
c(Ala) = 400  mM, $c(CuCl_2) = 400 \text{ mM},$ c(Gly) = 100  mM, c(NaCl) = 5  M	Ala <sub>2</sub>	×	×	×	×
	AlaGly/GlyAla	×	×	×	×
	Gly <sub>2</sub>	×	×	×	×
	AlaGly <sub>2</sub>	×	×	×	

**Tabelle 4.3:** Peptidkondensation von Ala und Gly unter SIPF-Bedingungen und unterschiedlichen Eduktkonzentrationen in Abhängigkeit von der Reaktionszeit. × symbolisiert die erfolgreiche Detektion des entsprechenden Peptids.

Die Experimente zeigen, dass es eine bestimmte Schwelle der Eduktkonzentration gibt, unter der keine oder bestenfalls eine sehr langsame Produktbildung erfolgt. Dies entspricht den Berechnungen von Rode *et al.* nach denen die Hydrathülle der Natriumionen erst ab Konzentrationen von > 3 M nicht mehr gesättigt ist. Obwohl die Salzkonzentration des Urozeans

höher gelegen haben könnte als die der heutigen Meere, muss eine Form der Aufkonzentration (wie z. B. durch Nass-Trocken-Zyklen) erfolgt sein, um derartig hohe Konzentrationen zu erzielen. Insgesamt waren die Reaktionen bei hohen Konzentrationen und konstanten Reaktionsvolumina robuster als die Verdunstungsexperimente, da die Ergebnisse zuverlässiger wiederholt werden konnten und mehr Produkte nach kürzeren Reaktionszeiten auftraten.

## Variation des Kupferkatalysators

Die beiden vorangegangenen Abschnitte haben gezeigt, dass hohe Konzentrationen an NaCl oder Aminosäuren zu einer größeren Anzahl an Produkten in kürzeren Reaktionszeiten führen. In einem letzten Satz an Experimenten wurde untersucht, ob dies auch auf den Kupferkatalysator zutrifft. Dazu wurden drei verschiedene CuCl<sub>2</sub>-Konzentrationen (1 mM, 50 mM und 400 mM) in der Dimerisierung von Ala unter Zugabe von Gly bei konstanten Reaktionsvolumina untersucht. Wie erwartet konnte bei der CuCl<sub>2</sub>-Konzentration von 400 mM die Peptidkondensation erfolgreich durchgeführt werden und jegliche Dipeptidprodukte traten bereits nach 4 d auf. Allerdings wurden unter Verwendung der beiden niedrigeren CuCl<sub>2</sub>-Konzentrationen keine Peptide detektiert. Selbst nach 60 d konnte bei diesen Konzentrationen keine Peptidbildung nachgewiesen werden. Auch hier zeigt sich somit, dass hohe Konzentrationen die SIPF beschleunigen. Möglicherweise führt der niedrigere pH-Wert konzentrierter CuCl<sub>2</sub>-Lösungen zu einer begünstigten Kondensation der Aminosäuren.

Weiterhin wurde Cu(OAc)<sub>2</sub> in der Reaktion als alternativer Katalysator eingesetzt, um die Notwendigkeit des Chlorid-Gegenions zu überprüfen. Im katalytisch aktiven Komplex der SIPF sorgt der Chloridligand für die richtigen sterischen und elektronischen Voraussetzungen. Außerdem verhindert er die Chelatbindung der zweiten Aminosäure und somit die Bildung eines zu stabilen, inaktiven Komplexes.<sup>[49]</sup> Mit Cu(OAc)<sub>2</sub> konnte selbst bei hohen Konzentrationen keine Peptidkondensation erzielt werden, wodurch die Bedingung des Chlorid-Gegenions für eine erfolgreiche Reaktion weiter bestätigt wurde.

Insgesamt wurden durch die Variation der Reaktionsbedingungen wichtige Erkenntnisse über die SIPF erlangt. Dipeptide traten schon nach 4 d auf. Allerdings ist auch eine schnellere Synthese möglich, da keine Probenentnahmen bei kürzeren Reaktionszeiten durchgeführt wurden. Aufgrund fehlender Referenzpeptide konnte nicht das komplette Produktspektrum der Reaktionen aufgeklärt werden. Dies wird erst durch die Analyse der Reaktionen mittels CE-MS möglich. Eine wichtige Beobachtung ist, dass hohe Konzentrationen die Reaktion beschleunigen. Besonders für NaCl und CuCl<sub>2</sub> besteht eine Schwellenkonzentration, unter der die Peptidbildung, wenn überhaupt, nur sehr langsam verläuft (> 60 d). Weiterhin ist die Reaktivität einer einzelnen Aminosäure von der Anwesenheit anderer katalytisch aktiver Aminosäuren abhängig. Durch die Anwesenheit von Gly, His und Gly<sub>2</sub> konnte die Peptidkondensation von Ala und Val beschleunigt werden.

## 4.2.2. Untersuchung komplexer Aminosäuremischungen

Gerade im präbiotischen Kontext spielt die Entwicklung komplexer Systeme aus einfachen Startmaterialien eine wichtige Rolle. Bisher postulierte präbiotische Aminosäuresynthesen resultieren nicht in der gezielten Synthese einzelner Verbindungen, sondern in einer großen Mischung verschiedener Aminosäuren. Dementsprechend erscheint es realistisch, unterschiedliche Aminosäuren in der gleichen Synthese umzusetzen. Durch den Einsatz eines breiteren Spektrums an Aminosäuren in der Reaktionsmischung wird die Synthese einer größeren Menge diverser Peptidsequenzen ermöglicht. Da die Funktion eines Peptids durch dessen Sequenz bestimmt wird, wird so eine Gelegenheit für die Entstehung von Funktionalität geboten. Somit lässt sich beobachten, ob spezifische Sequenzen bevorzugt unter bestimmten Bedingungen gebildet werden und aufgrund ihres umfassenden Auftretens eine größere Rolle in der Entstehung des Lebens gespielt haben könnten. Außerdem werden in komplexen Systemen die Wechselwirkungen der einzelnen Komponenten, wie sie zweifelsfrei auch auf der frühen Erde stattgefunden haben müssen, nicht mehr außer Acht gelassen. Die vorangegangenen Studien dieser Arbeit konnten zeigen, dass die Reaktivität einer einzelnen Aminosäure durch die Anwesenheit anderer Aminosäuren deutlich begünstigt werden kann. So wurde die Dimerisierung von sowohl Ala als auch Val erst beobachtet, als Gly, His oder Gly2 zur Mischung hinzugefügt wurden. Um das Potenzial der Reaktionsbedingungen in Peptidbildungsreaktionen grundlegend zu erforschen, reicht es also nicht aus, nur einzelne Aminosäuren zur Reaktion zu bringen.

Aus diesem Grund wurden im weiteren Verlauf dieser Arbeit verschiedene, aus mehreren Aminosäuren bestehende Mischungen unter den Reaktionsbedingungen der SIPF umgesetzt. Dabei wurden die Aminosäuren basierend auf den Eigenschaften ihrer Seitengruppe in eine polare, unpolare, saure und basische Mischung unterteilt. Weiterhin wurde eine präbiotische Mischung untersucht, bestehend aus Aminosäuren, die zum Zeitpunkt des Ursprungs des Lebens wahrscheinlich in einem größeren Umfang vorlagen als die restlichen Aminosäuren im gleichen Reaktionsansatz eingesetzt (Abbildung 4.13).

Außerdem sollte die katalytische Aktivität spezifischer Aminosäuren weiter untersucht werden. Der positive Einfluss von Gly und His auf die Kondensation der einzelnen Aminosäuren Ala und Val konnte bereits nachgewiesen werden, allerdings wurde dieser Effekt in großen Mischungen noch nicht näher betrachtet. Dementsprechend wurde untersucht, ob deren Zugabe zu einer Gruppe an Aminosäuren deren größere Reaktivität und eine umfangreichere Peptidbildung zur Folge hat. Ergänzend zu Gly und His (basische Seitengruppe) wurde auch die saure Aminosäure Asp eingesetzt.

Weiterhin sollte untersucht werden, ob die Reaktivität der Aminosäuren durch Harnstoff begünstigt werden kann, dessen präbiotische Synthese als gesichert gilt.<sup>[300, 301]</sup> Schon mehrfach konnte gezeigt werden, dass durch dessen Einsatz verschiedene Kondensationsreaktionen, wie die Phosphorylierung von Nukleosiden und auch Peptidsynthesen, begünstigt werden können.<sup>[35, 56, 151, 302]</sup> Der Mechanismus der Aktivierung durch Harnstoff ist dabei jedoch noch nicht vollständig geklärt. Allerdings ist bekannt, dass er starke Wasserstoffbrückenbindungen ausbildet und Proteine denaturiert. Dabei werden Wassermoleküle aus der Hydrathülle des Peptids entfernt.<sup>[303]</sup> Somit ist es denkbar, dass Harnstoff einen zusätzlichen dehydratisierenden Einfluss auf die Reaktion ausüben könnte und so Kondensationsreaktionen begünstigt.

Die Reaktionen wurden alle bei konstanten Reaktionsvolumina durchgeführt, da Versuche unter diesen Bedingungen im Gegensatz zu solchen mit Nass-Trocken-Zyklen sich als wiederholbarer und weniger fehleranfällig erwiesen haben. Die Konzentrationen der einzelnen Komponenten richtete sich dabei nach den zuvor optimierten Bedingungen. Die Gesamtstoffmenge der Aminosäuren und des ergänzend eingesetzten Harnstoffs betrug in jedem Experiment 400 mmol. Die Menge an den zusätzlichen Aminosäuren Gly, His und Asp richsich nach der Aminosäuren im jeweiligen tete Anzahl der Mix: n (Gly/His/Asp) = 400 mmol/N. Dabei ist N die Anzahl an Aminosäuren in der Mischung. Die Aminosäuren und Harnstoff wurden eingewogen und dann mit Stammlösungen von NaCl und CuCl<sub>2</sub> aufgefüllt. Deren finale Konzentrationen in der Reaktionsmischung betrugen jeweils 4.4 M und 400 mM. Alle Reaktionen wurden bei 85 °C durchgeführt und nach 7 und 21 d ausgewertet (Abbildung 4.13).

Durch den erfolgreichen Umsatz aller Aminosäuren kann im Verlauf der Reaktionen eine immense Anzahl verschiedener Produkte entstehen. Bei der Reaktion der Gesamtaminosäuremischung ist theoretisch die Synthese 400 verschiedener Di- und 8000 verschiedener Tripeptide in der gleichen Mischung möglich. Dementsprechend wurden die Reaktionsmischungen nicht mehr allein durch CE, sondern durch CE-MS und das entwickelte Interface analysiert.<sup>[291]</sup> Durch die LPA-beschichteten Kapillaren erfuhren die zahlreichen Komponenten der Reaktionsmischung eine effektive Auftrennung, wobei die sensitive Orbitrap Massendetektion eine detaillierte Aufklärung des gebildeten Produktspektrums ermöglichte. Um eine Überlastung der Kapillaren durch die hohe Salzkonzentration zu verhindern, wurden die Reaktionsmischungen vor der Analyse nach beschriebener Prozedur mit dem Amberlite IRC-748 Kationentauscher behandelt (siehe Kapitel 4.1.4).

Um den Ausgang der Peptidkondensationen unter den jeweiligen Bedingungen bewerten und vergleichen zu können, wurde jede Reaktionsmischung auf alle möglichen Peptidsequenzen hin untersucht. Der Fokus lag dabei auf den gebildeten Dipeptiden. Allerdings wurden aufgrund der großen Anzahl möglicher Produkte die verschiedenen Dipeptide nicht einzeln quantifiziert. Stattdessen wurde der Syntheseumfang jedes Peptids durch die Aufnahme von MS/MS-Spektren abgeschätzt. Dabei wurde in jeder CE-MS-Messung der gleiche Schwellenwert für die Fragmentierung jedes möglichen Dipeptids vorgegeben. Wurde ein Peptid im großen Umfang gebildet, überstieg dessen Peakintensität diesen Schwellenwert und es erfolgte eine Fragmentierung der Verbindung. Wurde es nur in Spuren detektiert, erfolgte keine Fragmentierung. Zusätzlich ermöglichen die MS/MS-Spektren durch die unterschiedlichen Fragmentierungsmuster die Zuweisung der Dipeptidsequenzen. Darauf basierend wurde der Erfolg einer bestimmten Dipeptidsynthese mit einem Farbcode belegt und in Tabellen notiert, durch die das gesamte Produktspektrum einer Reaktion ersichtlich wird.



Abbildung 4.13: Einteilung der proteinogenen Aminosäuren in fünf Untergruppen basierend auf ihren Eigenschaften. Jede dieser Gruppen wurde unter verschiedenen Reaktionsbedingungen umgesetzt und mittels CE-MS nach 7 oder 21 d analysiert. Die resultierenden Dipeptidprodukte wurden durch MS/MS bestätigt und in Tabellen notiert, durch die die entsprechenden Bedingungen miteinander verglichen werden konnten.

Dunkelgrüne Felder signalisieren die erfolgreiche Zuordnung von MS/MS-Spektren zu der bestimmten Dipeptidsequenz. Hellgrüne Felder bedeuten, dass das jeweilige Peptid detektiert werden konnte, aber die Intensität nicht hoch genug für die Aufnahme eines MS/MS-Spektrums war. Konnte ein Dipeptid gar nicht detektiert werden, wurde dies mit einem grauen Feld in der Tabelle vermerkt. Die jeweiligen Aminosäuren einer Mischung werden in den Abbildungen gemäß des Ein-Buchstabencodes abgekürzt, wobei die Zeile den N-Terminus und die Spalte den C-Terminus eines spezifischen Dipeptids darstellt. So kann eine große Anzahl an Produkten übersichtlich dargestellt werden und der Erfolg verschiedener Synthesebedingungen miteinander verglichen werden. Allerdings lässt sich aufgrund der unterschiedlichen Ionisationswahrscheinlichkeiten der verschiedenen Dipeptide die Menge eines bestimmten Dipeptids nicht mit anderen der gleichen Mischung vergleichen. Lediglich der Vergleich der Umsätze des gleichen Dipeptids unter verschiedenen Reaktionsbedingungen ist möglich.

Einen Überblick über die verschiedenen eingesetzten Aminosäuregruppen, die Reaktionsbedingungen unter denen sie umgesetzt wurden und die verwendete Methode zur Analyse der komplexen Mischungen sind in Abbildung 4.13 dargestellt. Alle Reaktionen wurden mindestens zwei Mal durchgeführt und jeder Ansatz zwei Mal analysiert.



# Untersuchung der unpolaren Aminosäuremischung

Abbildung 4.14: Detektierte Dipeptide der Peptidkondensation unter SIPF-Bedingungen ausgehend von der unpolaren Aminosäuremischung ( = bestätigt durch MS/MS, = Spuren, = nicht detektiert).

In der unpolaren Aminosäuremischung reagierte mit Ausnahme von Trp jede Aminosäure zu Peptiden (Abbildung 4.14). Die schlechte Reaktivität von Trp stammt von dessen Instabilität unter den vorherrschenden Reaktionsbedingungen. Speziell hohe Temperaturen und die Anwesenheit von Metallen führen zu schnellem Abbau von Trp zu diversen Nebenprodukten.<sup>[304]</sup> Dementsprechend konnte Trp schon nach einer Reaktionszeit von 7 d nur noch sehr selten detektiert werden. Abgesehen davon und den Dipeptiden ValPhe/PheVal wiesen die restlichen Aminosäuren eine hohe Reaktivität auf und es konnte jede Dipeptidsequenz in der Reaktionsmischung detektiert werden. Dies ist vor allem nach der Betrachtung der vorigen Ergebnisse dieser Arbeit erstaunlich, wonach sowohl Ala als auch Val unter den gleichen Bedingungen nicht ohne die Zugabe von Gly dimerisiert werden konnten. Weiterhin traten nach 21 d keine neuen Dipeptide auf, wonach die Peptidkondensation anscheinend schon nach 7 d abgeschlossen war und ein Gleichgewicht erreichte.

Die Abbildungen 7.1-7.3 zeigen die Produktspektren der unpolaren Aminosäuremischung nach der Beimischung von Gly, His oder Asp. Für alle Reaktionsmischungen sind ähnliche Trends erkennbar. Gly und His selbst wiesen eine hohe Reaktivität auf und bildeten nur mit Trp keine Dipeptide, wohingegen Asp eine auffallend geringe Reaktivität mit den Aminosäuren der unpolaren Mischung aufwies. Ansonsten konnten wie schon zuvor über 21 d die Mehrheit aller Dipeptide in allen Reaktionsmischungen gebildet werden. Mit Asp wurden sogar die Dipeptide aus Ala und Trp detektiert. Allerdings fällt auf, dass weniger Dipeptide in genügendem Umsatz entstanden, um fragmentiert zu werden. Zum Beispiel wurden die Dipeptide PhePro/ProPhe, Methionin(Met)Pro/ProMet, MetMet nach der Zugabe von Gly nicht mehr im gleichen Umfang gebildet wie ohne Gly. Scheinbar ist der katalytische Effekt von Gly und His in der großen Mischung der unpolaren Aminosäuren nicht mehr so stark ausgeprägt, wie dies noch im kleineren System bestehend aus Ala/Val und Gly/His der Fall war. Auch wenn Asp selbst schlecht mit den übrigen Aminosäuren reagierte, wurde die Reaktivität der Gruppe sonst nicht weiter beeinflusst.



#### C-Terminus



Durch die Ergänzung der Reaktionsbedingungen durch Harnstoff wurde das Produktbild der unpolaren Aminosäuremischung kaum verändert (Abbildung 4.15). Auch mit Harnstoff in der Reaktionsmischung konnte Trp nicht ausreichend stabilisiert werden, um dessen Dipeptidbildung zu beobachten. Ansonsten wurden auch hier jegliche Sequenzen detektiert, wobei die Reaktionszeit von 7 d schon ausreichte, um die Mehrheit der möglichen Dipeptide zu bilden. Auch nach der Zugabe von Gly, His und Asp konnten die gleichen Trends wie zuvor ohne Harnstoff beobachtet werden und es konnte kein katalytischer Effekt nachgewiesen werden (Abbildungen 7.4-7.6).

Insgesamt weisen die unpolaren Aminosäuren somit eine große Reaktivität unter den Bedingungen der SIPF auf und ein Großteil aller möglichen Dipeptidsequenzen wurde bereits nach 7 d gebildet. Der Grund, warum nicht alle Sequenzen detektiert werden konnten, liegt allein an der Instabilität von Trp unter den Reaktionsbedingungen. Dementsprechend wurden weder durch Harnstoff noch durch die Beimischung zusätzlicher Aminosäuren die Reaktivität der Aminosäuregruppe weiter positiv begünstigt. Gly und His wiesen eine gute Reaktivität mit der Gruppe auf, während dies bei Asp erst durch die Zugabe von Harnstoff erzielt werden konnte. Außerdem konnten Spuren an verschiedenen Tripeptiden detektiert werden.



Untersuchung der polaren Aminosäuremischung

Abbildung 4.16: Detektierte Dipeptide der Peptidkondensation unter SIPF-Bedingungen ausgehend von der polaren Aminosäuremischung mit Gly ( = bestätigt durch MS/MS, = Spuren, = nicht detektiert).

Die polare Aminosäuremischung wies unter den Reaktionsbedingungen der SIPF eine verminderte Reaktivität verglichen mit der unpolaren Mischung auf (Abbildung 4.16 und 7.7). Lediglich die Aminosäuren Ser, Thr und Tyr reagierten miteinander. Dipeptide der Aminosäuren Cys, Asparagin (Asn) und Gln konnten generell nur sehr selten detektiert werden. Ähnlich wie bei der unpolaren Mischung wird dafür eine unzureichende Stabilität dieser Aminosäuren unter den Reaktionsbedingungen verantwortlich gemacht. Cys konnte schon nach einer Reaktionszeit von 7 d nicht mehr in der Reaktionsmischung detektiert werden. Asn und Gln wurden zu den entsprechenden Säuren Asp und Glu hydrolisiert und wurden so der Reaktionsmischung schnell entzogen. Asp zeigte dabei mit den restlichen Aminosäuren der Mischung eine gute Reaktivität, während eine Produktbildung mit Glu eher selten beobachtet werden konnte. Die Zugabe von Gly zu der Reaktionsmischung beeinflusste weder die Stabilität der instabilen Aminosäuren noch die Reaktivität der restlichen Aminosäuren, sodass das Produktbild annähernd unverändert blieb. Lediglich eine hohe Reaktivität von Gly war wieder zu beobachten (Abbildung 4.16). Auch in der polaren Mischung bildeten sich nach 21 d keine neuen Produkte.



**Abbildung 4.17:** Detektierte Dipeptide der Peptidkondensation unter SIPF-Bedingungen ergänzt durch Harnstoff ausgehend von der polaren Aminosäuremischung mit Gly (= = bestätigt durch MS/MS, = = Spuren, = nicht detektiert).

Durch die Zugabe von Harnstoff zur polaren Aminosäuremischung konnte die Reaktivität dieser deutlich begünstigt werden (Abbildung 4.17 und 7.8). Zum einen wurde Asn ausreichend stabilisiert, um Dipeptide zu bilden, zum anderen konnte die Aktivität von Ser, Thr und Tyr so gesteigert werden, dass der Großteil der Dipeptidsequenzen mit MS/MS bestätigt werden konnte. Durch die weitere Zugabe von Gly konnte die Aktivität der Aminosäuren leicht erhöht werden. Somit konnten mit Ausnahme der Dipeptide aus Cys und Gln und dem Homodipeptid von Asn alle Dipeptidsequenzen detektiert werden. Ähnliche Beobachtungen wurden gemacht, wenn zusätzlich His oder Asp zur Mischung zugegeben wurden. Abgesehen davon, dass die zusätzlichen Aminosäuren sehr gut mit den polaren Aminosäuren reagierten, schienen sie einen zusätzlichen kleinen positiven Einfluss auf die Reaktivität der Mischung zu haben (Abbildung 7.9 und 7.10). Wie schon zuvor, änderte sich das Produktbild durch eine längere Reaktionszeit nur in sehr wenigen Fällen.

Die Reaktivität der polaren Aminosäuremischung ist somit etwas komplizierter als die der unpolaren. Ohne Harnstoff wiesen Cys, Asn und Gln eine geringe Stabilität auf und wurden in der Reaktionsmischung schnell abgebaut. Dadurch traten zusätzlich Asp und Glu in der Mischung auf. Insbesondere Asp wies eine sehr gute Reaktivität mit den restlichen Aminosäuren der Mischung auf. Im Unterschied zur unpolaren Mischung wurde die polare Mischung durch die Anwesenheit von Harnstoff sehr stark beeinflusst und es konnten eine Vielzahl neuer Dipeptidsequenzen nachgewiesen werden. Erstaunlicherweise konnte ein geringer katalytischer Effekt von Gly, His und Asp erst durch die Zugabe von Harnstoff beobachtet werden. Wie in der unpolaren Aminosäuremischung wurden auch hier jeweils Spuren an gebildeten Tripeptiden wie z. B. Gly<sub>3</sub> detektiert.

Untersuchung der sauren und basischen Aminosäuremischung C-Terminus



Abbildung 4.18: Detektierte Dipeptide der Peptidkondensation unter SIPF-Bedingungen ohne Harnstoff (a) und ergänzt durch Harnstoff (b) ausgehend von der sauren Aminosäuremischung ( = bestätigt durch MS/MS, = Spuren, = nicht detektiert).

In der sauren Reaktionsmischung konnten sowohl ohne als auch mit Harnstoff alle möglichen Dipeptidsequenzen detektiert werden, allerdings wurden mit Harnstoff mehr Dipeptide durch MS/MS bestätigt (Abbildung 4.18). In beiden Fällen war die Dipeptidsynthese nach 7 d umfangreicher als nach 21 d. Dies könnte entweder an Abbaureaktionen oder an Weiterreaktionen zu höheren Peptiden liegen. Allerdings konnten in beiden Mischungen keine Tripeptide detektiert werden.

Wie bereits erwähnt, war die Detektion der basischen Dipeptide aufgrund gemeinsamer Migrationszeiten mit Metallionen recht anspruchsvoll. Dementsprechend wurde die Reaktionsmischung der basischen Mischung ohne Harnstoff nur nach 7 d analysiert, um eine Kontamination des Massenspektrometers zu vermeiden. Allerdings zeigten die letzten Untersuchungen, dass eine Zunahme an Produkten nach längeren Reaktionszeiten nur selten zu beobachten ist. Auch bei der basischen Mischung konnte die Reaktivität durch die Zugabe von Harnstoff begünstigt werden (Abbildung 4.19). Weiterhin wurde eine starke Präferenz für den Einbau von Lysin (Lys) beobachtet, da keine anderen Dipeptide detektiert werden konnten. Auch hier wurden keine Tripeptide synthetisiert. In sowohl der basischen als auch der sauren Aminosäuremischung wurde nicht untersucht, ob zusätzliche Aminosäuren die Reaktivität der Mischungen begünstigen.



Abbildung 4.19: Detektierte Dipeptide der Peptidkondensation unter SIPF-Bedingungen ohne Harnstoff (a) und ergänzt durch Harnstoff (b) ausgehend von der basischen Aminosäuremischung ( = bestätigt durch MS/MS, = Spuren, = nicht detektiert).

#### Untersuchung der Mischung aller proteinogenen Aminosäuren

Die Umsetzung aller proteinogenen Aminosäuren unter präbiotischen Bedingungen wurde in bisherigen Veröffentlichungen noch nicht durchgeführt. Aufbauend auf den vorigen Ergebnissen dieser Arbeit wurde nun die Peptidkondensation dieser komplexen Gruppe untersucht. Da Harnstoff in den meisten Fällen einen positiven und sonst keinen Einfluss auf die Dipeptidbildung der verschiedenen Gruppen ausübte, wurde er auch ergänzend bei der Umsetzung der Gesamtmischung zugegeben. Die entsprechende Reaktion ohne die Zugabe von Harnstoff wurde nicht untersucht. Nach einer Reaktionszeit von 7 d konnte bereits die Synthese eines Großteils der möglichen Dipeptide beobachtet werden (Abbildung 4.20). Die Trends der kleineren Mischungen setzten sich dabei auch in der großen Mischung fort. So konnte für die Aminosäuren Trp und Cys keine Dipeptidbildung nachgewiesen werden. Gln wies nach wie vor eine sehr geringe Reaktivität auf, allerdings wurden Peptide mit Val, Gly und Asp gebildet. Dies entspricht sogar einer Steigerung der Aktivität, da die Dipeptide mit Gly in keiner der kleineren Mischungen detektiert werden konnten. In diesem Fall war somit ein positiver Effekt der Gesamtmischung auf die Reaktivität einer einzelnen Aminosäure ersichtlich. Ansonsten fiel Val durch eine sehr hohe Aktivität auf, da außer mit Trp und Cys mit allen Aminosäuren Dipeptide gebildet wurden. Ähnlich hohe Reaktivitäten wiesen Gly, Leu/Ile, Asp, Ser und Lys auf. Bei dem Vergleich der Produktspektren der kleineren Mischungen mit den entsprechenden Teilen der Gesamtmischung war eine geringe Abnahme des Dipeptidumsatzes zu erkennen. Manche Verbindungen konnten zwar noch detektiert, allerdings nicht mehr durch MS/MS bestätigt werden. Der Grund dafür lag wahrscheinlich in der Abnahme der Aminosäurekonzentration in der Gesamtmischung verglichen mit der der kleineren Mischungen. Wie bereits erwähnt, betrug die Gesamtstoffmenge der Aminosäuren in jedem Experiment 400 mmol. Somit ergeben sich unterschiedliche Stoffmengen der einzelnen Aminosäure pro Mischung, die in der Gesamtmischung mit der höchsten Anzahl an Aminosäuren dementsprechend am niedrigsten ist. Weiterhin konkurrieren mehr Aminosäuren um die gleiche Konzentration des Kupferkatalysators. Ein geringerer Umsatz entspricht deshalb den Erwartungen. Wie auch bereits zuvor beobachtet, konnte der Umsatz der Dipeptidsynthese nach 21 d nicht weiter gesteigert werden (Abbildung 7.11).



#### **C-Terminus**

Abbildung 4.20: Detektierte Dipeptide der Peptidkondensation unter SIPF-Bedingungen ergänzt durch Harnstoff ausgehend von der Gesamtaminosäuremischung nach 7 d ( = bestätigt durch MS/MS, = Spuren, = nicht detektiert).

Somit konnte in der Gesamtmischung bestätigt werden, dass die Reaktivität der Aminosäuren auch von der Anwesenheit anderer Aminosäuren abhängt. Zu einem großen Teil bestätigten sich die Analysen aus den Mischungen zuvor. Cys und Trp konnten aufgrund der Instabilität keine Dipeptide bilden, während Gly, Val und Asp weiterhin sehr hohe Reaktivitäten aufwiesen. Andererseits unterschied sich das Produktspektrum an wenigen Stellen. Zum Beispiel war in der unpolaren Mischung neben Trp Phe am inaktivsten, allerdings wurden in der Gesamtmischung am wenigsten Dipeptide mit Pro detektiert. Außerdem konnte für Gln ein überraschender Anstieg der Reaktivität nachgewiesen werden.



Untersuchung der präbiotischen Aminosäuremischung C-Terminus

Weiterhin wurde eine Mischung an Aminosäuren untersucht, die zur Zeit der Entstehung des Lebens wahrscheinlich in einem größeren Maß vorkamen als die übrigen (Abbildung 4.21).<sup>[112, 113]</sup> Auch hier wurden nur die durch Harnstoff ergänzten Reaktionsbedingungen untersucht. Auch wenn eine große Anzahl an Dipeptiden detektiert werden konnte, so schien die Reaktivität der Mischung im Vergleich zu den übrigen gehemmt. Vor allem die Aminosäuren Pro, Ser, Thr, Leu/Ile und Gly wiesen nicht mehr so viele Dipeptide auf wie in den entsprechenden Untergruppen. Dafür konnte nicht allein die geringere Konzentration der Aminosäuren in der Mischung verantwortlich gemacht werden. So war in der präbiotischen Mischung die Reaktivität von Val niedriger als in der Gesamtmischung. Allerdings konnte eine Zunahme der Produkte nach 21 d beobachtet werden, wodurch der Effekt der gehemmten Reaktivität dort etwas weniger stark ausgeprägt war. Dennoch wird auch hier ersichtlich, dass die Reaktivitäten der Aminosäuren durch andere Aminosäuren maßgeblich beeinflusst werden.

## Peptidkondensation komplexer Aminosäuremischungen in SO2

Weiterhin wurde im Rahmen der kupferkatalysierten Peptidkondensationen  $SO_2$  als alternatives Reaktionsmedium in Betracht gezogen. Wie bereits in Kapitel 2.1.2 beschrieben, war

Abbildung 4.21: Detektierte Dipeptide der Peptidkondensation unter SIPF-Bedingungen ergänzt durch Harnstoff ausgehend von der präbiotischen Aminosäuremischung ( = bestätigt durch MS/MS, = Spuren, = nicht detektiert).

SO<sub>2</sub> als ein Gas vulkanischen Ursprungs auf der präbiotischen Erde in großem Umfang verfügbar.<sup>[71, 72]</sup> Im Unterschied zu heute boten die damals vorherrschenden Bedingungen (geringe Temperaturen, hoher Atmosphärendruck) speziell in der näheren Vulkanumgebung die Möglichkeit für flüssige SO<sub>2</sub>-Vorkommen.<sup>[13, 15]</sup> Die Vorteile von flüssigem SO<sub>2</sub> werden in der organischen Synthese häufig ausgenutzt und auch im präbiotischen Kontext gewinnt SO<sub>2</sub> an Bedeutung.<sup>[305]</sup> Allerdings wurde hier SO<sub>2</sub> bisher nur in Wasser gelöst und nicht als reines Lösemittel eingesetzt.<sup>[73-77]</sup>

Dementsprechend wurde im Rahmen dieser Arbeit in Zusammenarbeit mit M. Haas, C. Sydow und A. Siegle die untersuchten Bedingungen der Peptidkondensationen auf eine Umgebung in flüssigem SO<sub>2</sub> übertragen. Auch hier wurden komplexe Aminosäuremischungen eingesetzt und deren Reaktivität mit der in H<sub>2</sub>O verglichen.<sup>[306]</sup>

Um das Potenzial der beiden Reaktionsmedien in Bezug auf präbiotische Peptidsynthesen optimal vergleichen zu können, wurde versucht, jeweils die gleichen Reaktionsbedingungen anzuwenden (Abbildung 4.22). Harnstoff wies in SO<sub>2</sub> den schon zuvor beobachteten positiven Einfluss auf die Dipeptidbildung auf. Dementsprechend wurde in den Peptidsynthesen in SO<sub>2</sub> die gleiche Stoffmenge an Aminosäuren und Harnstoff wie in den wässrigen Lösungen eingesetzt. Weiterhin wurden die gleichen Reaktionszeiten untersucht (7 und 21 d) und die gleichen Probenkonzentrationen über CE-MS analysiert. Andererseits haben die vorigen Studien gezeigt, dass sowohl NaCl als auch CuCl<sub>2</sub> in H<sub>2</sub>O nicht stöchiometrisch eingesetzt werden können und stattdessen jeweils Mindestkonzentrationen gegeben sein müssen, damit Peptide erfolgreich synthetisiert werden können. Dies trifft für SO<sub>2</sub> nicht zu. Zwar konnte ohne CuCl<sub>2</sub> keine Reaktion beobachtet werden, allerdings waren die erforderlichen Mengen für erfolgreiche Peptidsynthesen nicht so hoch wie in H<sub>2</sub>O. Daher wurden in SO<sub>2</sub> stöchiometrische Mengen an CuCl<sub>2</sub> eingesetzt (1/*N* Äquivalente für eine Mischung aus *N* Aminosäuren). Außerdem wirkte sich die Zugabe von NaCl zur Reaktionsmischung in SO<sub>2</sub> sogar



Abbildung 4.22: Vergleich der Reaktionsbedingungen der untersuchten Peptidkondensationen in SO2 und H2O.

negativ auf die Peptidausbeute aus. Durch die geringe Löslichkeit von NaCl konnte dabei keine gute Durchmischung der Reaktion stattfinden. Andererseits reichten die hygroskopischen Eigenschaften von SO<sub>2</sub> aus, um die dehydratisierende Wirkung der Na-Ionen zu ersetzen. Dementsprechend konnte auf den Einsatz von NaCl gänzlich verzichtet werden. Ein letzter Unterschied der Reaktionsbedingungen betrifft die Temperatur der Synthesen. In SO<sub>2</sub> genügte bereits Raumtemperatur, wohingegen 85 °C in H<sub>2</sub>O angewendet werden mussten.

Um das Potenzial der Reaktionsbedingungen in SO<sub>2</sub> zu untersuchen, wurden die gleichen komplexen Aminosäuremischungen umgesetzt wie schon zuvor (unpolar, polar, sauer, basisch, präbiotisch und gesamt). In den vorigen Untersuchungen wurde gezeigt, dass die Reaktivität der Aminosäuren durch andere Aminosäuren beeinflusst wird. Allerdings konnte dieser Effekt nicht einzelnen Aminosäuren zugeordnet werden und die katalytische Aktivität von Gly, His oder Asp konnte nicht für alle Mischungen bestätigt werden. Dementsprechend wurde in den zukünftigen Studien der Einfluss von einzelnen Aminosäuren auf die Reaktivität einer Mischung nicht weiter untersucht. Gly wurde stattdessen der polaren Aminosäuregruppe zugeordnet. Die detektierten Dipeptidsequenzen wurden wie zuvor mit dem gleichen Farbcode in Tabellenform notiert. Für einen besseren Vergleich wurden die jeweiligen Produktspektren aus H<sub>2</sub>O und SO<sub>2</sub> in geteilten Abbildungen dargestellt. Die entsprechenden vollständigen Spektren sind in Kapitel 7 aufgeführt.

Aus der Mischung der unpolaren Aminosäuren konnten in SO<sub>2</sub> alle möglichen Dipeptide gebildet werden (Abbildung 4.23, a). Trp wies eine deutlich höhere Stabilität in SO<sub>2</sub> als in  $H_2O$  auf und so konnten alle entsprechenden Dipeptide detektiert werden. Val wies die geringste Aktivität aus, allerdings konnten nach 21 d alle Dipeptide observiert werden. Generell nahm die Produktbildung nach 21 d zu und es konnten wie in  $H_2O$  Tripeptide in der Mischung gebildet werden.

Bei der Umsetzung der polaren Mischung in SO<sub>2</sub> konnten nach 21 d mehr Dipeptide gebildet werden als in H<sub>2</sub>O (Abbildung 4.23, b). Es wurden zwar keine Dipeptide mit Cys detektiert, allerdings konnte die Oxidation zu Cystin observiert werden. Dieses bildete dann wiederum Tripeptide mit den übrigen Aminosäuren, die teilweise durch MS/MS charakterisiert werden konnten. Mit der Disulfidbrücke kann somit die Bildung eines wichtigen Strukturelements für Peptide in SO<sub>2</sub> beobachtet werden. Im Gegensatz zu den wässrigen Reaktionsbedingungen wurden allerdings nur sehr wenige Tyr-haltige Dipeptide synthetisiert. Dies könnte an der schlechten Löslichkeit von Tyr in der Abwesenheit von sauren oder basischen Bedingungen liegen. Ansonsten konnten alle sonstigen Dipeptidsequenzen nach 21 d detektiert werden und es bildeten sich vor allem Gly-haltige Tripeptide in der Mischung.



**Abbildung 4.23:** Produktspektrum der unpolaren und polaren Aminosäuremischung. Vergleich der detektierten Dipeptide der kupferkatalysierten Peptidkondensation in SO<sub>2</sub> und Wasser nach 7 und 21 d ausgehend von der unpolaren (**a**) oder der polaren (**b**) Mischung ( $\blacksquare$  = bestätigt durch MS/MS,  $\blacksquare$  = Spuren,  $\square$  = nicht detektiert,  $\bigotimes$  = Cystinpeptide bestätigt durch MS/MS,  $\boxtimes$  = Spuren an Cystinpeptiden). Die Aminosäuren sind entsprechend dem Ein-Buchstabencode dargestellt.<sup>[306]</sup>

Auch in der basischen und der sauren Aminosäuremischung konnten in SO<sub>2</sub> (mit Ausnahme von Glu<sub>2</sub>) alle Dipeptide mit MS/MS charakterisiert werden (Abbildung 7.14 und 7.15). Allerdings konnten wie in der wässrigen Umgebung keine Tripeptide detektiert werden.

Auch in der präbiotischen Mischung konnten in SO<sub>2</sub> mehr Dipeptide gebildet werden als in H<sub>2</sub>O (Abbildung 4.24). In beiden Mischungen waren die Aminosäuren Gly, Leu und Ile am reaktivsten, wohingegen Pro eine sehr viel größere Aktivität in SO<sub>2</sub> als in H<sub>2</sub>O aufwies. Andererseits konnten in der wässrigen Umgebung mehr Dipeptide mit den sauren Aminosäuren



Glu und Asp detektiert werden. In beiden Fällen nahm die Ausbeute der Dipeptide nach 21 d zu.

Abbildung 4.24: Produktspektrum der präbiotischen Aminosäuremischung. Vergleich der detektierten Dipeptide der kupferkatalysierten Peptidkondensation in SO<sub>2</sub> und Wasser nach 7 und 21 d ausgehend von der präbiotischen Aminosäuremischung ( $\blacksquare$  = bestätigt durch MS/MS,  $\blacksquare$  = Spuren,  $\blacksquare$  = nicht detektiert). Die Aminosäuren sind entsprechend dem Ein-Buchstabencode dargestellt. <sup>[306]</sup>

In der Gesamtmischung blieb die Bildung von Cys-, Trp-, Asp- oder Glu-haltigen Dipeptiden in SO<sub>2</sub> nach wie vor aus (Abbildung 4.25). Ansonsten zeigte sich aber weiterhin die hohe Reaktivität der Aminosäuren in dieser Umgebung. Zu den aktivsten Aminosäuren gehörten Gly, Leu, Ile, Pro und Lys. Weiterhin beeinflusste die Gesamtmischung besonders die Reaktivität von Val. In der unpolaren Mischung war Val noch die inaktivste Aminosäure, wohingegen nun eine größere Dipeptidbildung zu beobachten war. Insgesamt konnte jede einzelne Aminosäure in Dipeptide umgesetzt werden. Außerdem konnten wie schon in H<sub>2</sub>O aufgrund der geringeren Aminosäurekonzentration in der Gesamtmischung weniger Dipeptide durch MS/MS charakterisiert werden. Allerdings war dieser Effekt weniger stark ausgeprägt als in H<sub>2</sub>O. Um dies weiter zu untersuchen, wurde die Startkonzentration der Reaktanten auf 50 mM reduziert. Somit betrug in SO2 die Konzentration einer einzelnen Aminosäure und die des CuCl<sub>2</sub> lediglich 2.5 mM. Auch in H<sub>2</sub>O waren die Aminosäuren derartig gering konzentriert, allerdings wurden trotzdem die gewohnt hohen CuCl<sub>2</sub>- und NaCl-Konzentrationen eingesetzt. Die resultierenden Produktspektren zeigen das außergewöhnliche Potenzial der Reaktionsbedingungen in SO<sub>2</sub> (Abbildung 4.25). Während in H<sub>2</sub>O bis auf wenige Gly-Dipeptide keine Produkte mehr detektiert werden konnten, wurden in SO<sub>2</sub> immer noch eine große Menge verschiedenster Dipeptide fast aller Aminosäuren gebildet. Diese Ergebnisse demonstrieren eindrucksvoll die produktiven Eigenschaften von SO<sub>2</sub>.



Abbildung 4.25: Produktspektrum der kompletten Aminosäuremischung. Vergleich der detektierten Dipeptide der kupferkatalysierten Peptidkondensation in SO<sub>2</sub> und Wasser nach 21 d ausgehend von einem 400 mM oder 50 mM kompletten Set der proteinogenen Aminosäuren ( $\blacksquare$  = bestätigt durch MS/MS,  $\blacksquare$  = Spuren,  $\square$  = nicht detektiert,  $\square$  = Spuren an Cystinpeptiden). Die CuCl<sub>2</sub>-Konzentration in SO<sub>2</sub> betrug 5 mol% in beiden Experimenten. Die Aminosäuren sind entsprechend dem Ein-Buchstabencode dargestellt. <sup>[306]</sup>

Insgesamt ergänzen diese Resultate das Verständnis, das im Verlauf dieser Arbeit über die kupferkatalysierte Peptidkondensation erlangt werden konnte. Schon während der Untersuchung der verschiedenen Reaktionsparameter konnte ein starker Einfluss der Umgebung auf die Reaktivität der Aminosäuren beobachtet werden. Dazu zählte zum einen die Anwesenheit anderer, katalytisch aktiver Aminosäuren. Durch den Einsatz komplexer Aminosäuremischungen in sowohl einer wässrigen Umgebung als auch in flüssigem SO<sub>2</sub> wurde dieser Effekt weiter untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Reaktivität einer bestimmten Aminosäure nicht isoliert betrachtet werden kann. Oftmals unterschied sich diese in Abhängigkeit von der Aminosäuremischung, in der sie eingesetzt wurde. Dazu zählt z. B. Gln in H<sub>2</sub>O und Val in SO<sub>2</sub>, die jeweils in der Gesamtmischung (trotz niedrigerer Konzentrationen) eine höhere Reaktivität aufwiesen als in der jeweiligen Subgruppe. Somit traten während der Reaktion kooperative Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen Aminosäuren auf. Ein Grund für dieses Verhalten könnte in dem von Rode et al. vorgeschlagenen Mechanismus der katalytisch aktiven Aminosäuren liegen. Durch die hohe Reaktivität mancher Aminosäuren und eine zeitweise Trimerisierung mit anderen Aminosäuren, könnte so deren Dimerisierung begünstigt werden (Abbildung 2.13).<sup>[49]</sup> Allerdings konnte diese katalytische Aktivität nur in kleinen Systemen beobachtet werden. In den großen Mischungen hatte die Zugabe von Gly, His oder Asp nur einen sehr geringen Einfluss auf die Peptidkondensation der übrigen Aminosäuren. Weiterhin könnten Wechselwirkungen der verschiedenen Seitengruppen in größeren Mischungen eine gesteigerte Reaktivität der Gruppe zur

Folge haben. Die Seitengruppen von Ser, Thr oder Tyr könnten dabei z. B. über ihre Hydroxygruppe eine zeitweise Esterbindung mit anderen Aminosäuren ausbilden. In Ähnlichkeit zu der Bildung von Depsipeptiden würde so die Ausbildung einer Amidbindung durch einen Ester-Amid-Austausch energetisch begünstigt werden.<sup>[169]</sup> Das Auftreten kooperativer Effekte zwischen einzelnen Komponenten einer großen Mischung ist vor allem im präbiotischen Kontext sehr wichtig, da hier komplexe Systeme aus einer großen Anzahl verschiedener Reaktanten entstanden sein müssen.

Weiterhin hatte auch die Umgebung der Peptidkondensation einen großen Einfluss auf die Reaktivität individueller Aminosäuren. Sowohl in H<sub>2</sub>O als auch in SO<sub>2</sub> konnte eine große Zahl diverser Dipeptidsequenzen synthetisiert werden. Allerdings reagierten nur in SO<sub>2</sub> alle Aminosäuren zu Dipeptiden. Insbesondere Cys-haltige Peptide konnten in H<sub>2</sub>O in keiner der Reaktionsmischungen nachgewiesen werden. Auch Trp, Gln und His zeigten in H<sub>2</sub>O eine geringe Reaktivität. Teilweise lag das an einer fehlenden Stabilität der Aminosäuren unter den Reaktionsbedingungen. Cys und Trp konnten bereits nach 7 d nicht mehr in der Reaktionsmischung observiert werden, während die Amide Gln und Asn zu den entsprechenden Säuren hydrolisiert wurden. Andererseits zeigten in SO<sub>2</sub> die Aminosäuren Tyr, Glu und Asp eine sehr geringe Aktivität und nur wenige entsprechende Dipeptide wurden synthetisiert. Allerdings bildete Cys in SO2 nicht nur Dipeptide, sondern wurde zusätzlich zu Cystin oxidiert und reagierte mit den übrigen Aminosäuren zu Tripeptiden weiter. Die so entstandenen Disulfidbrücken sind ein wichtiges Strukturelement der Peptide. Auch sonst zeigte SO<sub>2</sub> in den Peptidkondensationen viele Vorteile. So konnte hier eine Vielzahl verschiedener Pro-Peptide detektiert werden, die vor allem für eine hohe katalytische Aktivität bekannt sind.<sup>[218]</sup> Auch die übrigen Aminosäuren reagierten unter den Reaktionsbedingungen besser als in H<sub>2</sub>O, was eine höhere Vielfalt an Peptidsequenzen zur Folge hatte. Interessanterweise konnten diese Ergebnisse auch in sehr niedrigen Eduktkonzentrationen von 50 mM erzielt werden. Zusätzlich war der Einsatz großer Mengen NaCl oder CuCl<sub>2</sub> nicht notwendig und alle Peptidsynthesen fanden schon bei Raumtemperatur statt. Somit führten in SO<sub>2</sub> eine kleinere Anzahl Reaktanten in geringerer Konzentration bei tieferen Temperaturen zu einer umfangreicheren Produktbildung. Dies bestärkt die große Bedeutung dieser Umgebung für die präbiotische Peptidkondensation auf der frühen Erde.

# 4.3. Eisenkatalysierte Peptidbildungen

Die bisher untersuchte SIPF stellt eine unkomplizierte Methode der Peptidkondensation unter präbiotischen Bedingungen dar. Einfache Reaktanten reagieren unter einem direkten Reaktionsmechanismus zu einem breiten Spektrum verschiedener Peptide. Allerdings wird häufig kritisiert, dass die dafür notwendigen Reaktionsbedingungen in der Umgebung des Hadaikums nur schwer zu realisieren sind. Nach wie vor ist die Frage nach den Reaktionsbedingungen zur Zeit des Ursprungs des Lebens nicht gelöst und sehr komplex. Selbst wenn Gesteinsproben aus dieser Zeitspanne von mindestens 200-800 Ma vorhanden sein würden, so wäre es immer noch extrem schwierig daraus verlässliche Aussagen über den vorherrschenden Atmosphärendruck oder die Zusammensetzung der frühen Atmosphäre zu treffen.<sup>[307]</sup> Allerdings sind insbesondere die hohen Konzentrationen an Cu(II)-Ionen stark vom Sauerstoffgehalt dieser Atmosphäre abhängig. Auch wenn manche Studien von einer erhöhten Sauerstoffkonzentration ausgehen,<sup>[24-27]</sup> so würden Fällungsreaktionen durch z. B. H<sub>2</sub>S und die Adsorption auf Mineraloberflächen eventuelle Cu(II)-Vorkommen im Meerwasser reduzieren. Lokale Kupfervorkommen können also nicht ausgeschlossen werden, allerdings wird so die SIPF auf wenige, zerstreute Szenarien beschränkt. Folglich würde ein Ersatz der Cu(II)-Ionen unter Beibehaltung des gleichen direkten Reaktionsmechanismus eine effektivere Route zu präbiotischen Peptiden liefern. Eisen erscheint aufgrund eines umfangreichen Vorkommens auf diesem Planeten (Eisen ist das zweithäufigste Element der Erde)<sup>[308]</sup> als offensichtliche Alternative zur Komplexierung von Aminosäuren und Katalyse der Peptidkondensation. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird eine alternative, eisenkatalysierte Syntheseroute mit einer hohen präbiotischen Relevanz entwickelt.

### 4.3.1. Variation der Reaktionsbedingungen

Eisen zählt nicht nur heute zu den häufigsten Elementen der Erde, sondern wird auch auf der präbiotischen Erde in den verschiedensten Formen verfügbar gewesen sein. Grundsätzlich sorgt schon ein sehr niedriger Sauerstoffpartialdruck von 10<sup>-70</sup> atm für die stabile Koexistenz der beiden Oxidationsstufen von Eisen.<sup>[23]</sup> Dementsprechend lag im Hadaikum ein umfangreiches Angebot unterschiedlicher eisenhaltiger Minerale vor, darunter Oxide, Hydroxide, Phosphate und Silikate.<sup>[29]</sup> Das reichhaltige Angebot an Eisensalzen wird durch große Vorkommen elementaren Eisens ergänzt, dessen Beständigkeit aufgrund einer hauptsächlich neutralen, sauerstoffarmen Atmosphäre begünstigt wird.<sup>[13, 202]</sup> Durch die Reaktion mit H<sub>2</sub>O findet die Korrosion des Eisens statt. Säuren katalysieren diese Reaktion, allerdings reicht schon die Eigendissoziation des Wassers aus, um Eisen zu lösen:

$$Fe + 2 H_3O^+ \rightleftharpoons Fe^{2+} + H_2 + 2 H_2O$$

Dementsprechend ergänzen hohe Konzentrationen an gelöstem Fe(II) das Eisenvorkommen auf der frühen Erde.<sup>[309]</sup>

Für den Erfolg von Kondensationsreaktionen ist neben einem effektiven Katalysator die Schaffung von dehydratisierenden Bedingungen entscheidend. Bei der SIPF müssen dafür hohe NaCl-Konzentrationen verwendet werden, die im präbiotischen Kontext nur durch Nass-Trocken-Zyklen gerechtfertigt werden können. Im vorigen Abschnitt dieser Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass die hygroskopische Umgebung in SO<sub>2</sub> diese hohen NaCl-Konzentrationen ersetzen kann. Auch Eisen weist ähnliche, wasserbindende Eigenschaften auf, indem Fe(II)-Ionen H<sub>2</sub>O zu H<sub>2</sub> reduzieren und so dem System entziehen.<sup>[36]</sup>

Für die eisenkatalysierte Peptidkondensation sind somit nur Aminosäuren und Eisen erforderlich, die in großem Umfang auf der Erde verfügbar gewesen sind. Ergänzend wird hierbei Essigsäure eingesetzt, deren Synthese schon in frühen präbiotischen Experimenten nachgewiesen werden konnte.<sup>[310]</sup> In der entwickelten Synthese wird zunächst elementares Eisen eingesetzt, dessen Korrosion durch Aminosäuren und katalytische Mengen Essigsäure beschleunigt wird (Abbildung 4.26). Dabei werden unter einem direkten Reaktionsmechanismus die Aminosäuren von Eisen(II)-Ionen komplexiert und in räumliche Nähe zueinander gebracht. Neben der Katalyse der Peptidbildung schaffen die Eisenionen gleichzeitig die für die Kondensationsreaktion notwendigen dehydratisierenden Bedingungen. Aufgrund der großen Verfügbarkeit der Startmaterialien wird somit ein präbiotisch hoch relevantes Szenario geschaffen. Welche Faktoren die Peptidkondensation in diesem System begünstigen, wird im Folgenden näher untersucht.



**Abbildung 4.26:** In dem Katalysezyklus der eisenkatalysierten Peptidkondensation wird Eisenpulver zunächst durch Essigsäure und Aminosäuren korrodiert. Die resultierenden Eisen(II)-Ionen komplexieren Aminosäuren und vermitteln die Peptidbindung. Die Essigsäure wird dabei regeneriert.

Die Experimente der eisenkatalysierten Peptidkondensation wurden alle unter einem konstanten Reaktionsvolumen ohne den Einsatz von Nass-Trocken-Zyklen durchgeführt. Dazu wurde feines Eisenpulver mit den eingesetzten Aminosäuren vermischt und ins Reaktionsgefäß überführt. Anfangs wurden lediglich die Aminosäuren Ala und Gly eingesetzt, da die geringere Anzahl auftretender Produkte eine komplette Analyse des Produktspektrums erlaubte. Allerdings wurde die Aminosäuremischung durch das Dipeptid Gly<sub>2</sub> ergänzt, da die Kondensation einer Aminosäure an ein längeres Peptid energetisch begünstigt ist, verglichen mit der Kondensation von Aminosäuren untereinander.<sup>[82]</sup> Dadurch konnte die Peptidsynthese beschleunigt werden und es traten auch längerkettige Peptide in der Reaktionsmischung auf. Die einzelnen Aminosäuren und Gly2 wurden dabei im gleichen Stoffmengenverhältnis zueinander eingewogen. Zum Eisen und den Aminosäuren wurden daraufhin H2O und AcOH zugegeben. Zunächst wurden die Reaktionen unter Schutzgas durchgeführt, um eine sauerstoffarme, präbiotische Atmosphäre zu simulieren. Allerdings konnte in späteren Experimenten kein Einfluss der Atmosphäre auf den Ausgang der Reaktion festgestellt werden, weshalb daraufhin auf die Verwendung von Schutzgas verzichtet wurde. Aufgrund des (magnetischen) Eisenpulvers konnten keine Magnetrührer zur Durchmischung der Reaktionen eingesetzt werden. Stattdessen wurden alle Experimente auf einer Schüttelplatte positioniert und nach 7 oder 14 d analysiert.

Vor der Analyse wurde zu den Reaktionsmischungen 10 mL H<sub>2</sub>O zugegeben und übriges Eisen abfiltriert. Daraufhin wurde die Lösung so verdünnt, dass die Aminosäurekonzentration jeder Probe 5 mM betrug (bezogen auf die Startkonzentration der Aminosäuren). Alle Ansätze wurden mindestens zwei Mal mit CE-MS und den LPA-beschichteten Kapillaren analysiert. Die Auswertung der Experimente erfolgte durch die Integration der Signale häufig auftretender Peptidprodukte. Durch eine mindestens doppelte Messung des gleichen Ansatzes können der jeweilige Mittelwert und die Standardabweichung aller Peakflächen erstellt und miteinander verglichen werden. Aufgrund der unterschiedlichen Ionisationswahrscheinlichkeiten der Peptide kann so allerdings nur die Ausbeute des gleichen Peptids unter verschiedenen Bedingungen untersucht werden. Ohne die zusätzliche Aufnahme der jeweiligen Kalibriergeraden können verschiedene Peptidausbeuten in der gleichen Mischung nicht bestimmt werden. Zur besseren Übersicht werden in den folgenden Abbildungen meist nur die entsprechenden Peakflächen von Gly<sub>3</sub> und Gly<sub>4</sub> gezeigt.



**Abbildung 4.27:** Peakflächen von Gly<sub>3</sub> und Gly<sub>4</sub> in Abhängigkeit von den eingesetzten Äquivalenten AcOH in der eisenkatalysierten Peptidsynthese. Reaktionsbedingungen: AS (1.0 Äq.), Fe (3.3 Äq.), H<sub>2</sub>O (4.2 Äq.); 50 °C; 15 d. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung (SD):

Zunächst wurde untersucht, inwiefern die zugegebenen Mengen an AcOH die Peptidkondensation beeinflussen. Da das Eisen in der Reaktion zunächst elementar vorliegt, sollen katalytische Mengen AcOH neben den Aminosäuren dessen Korrosion beschleunigen. Dazu wurde in verschiedenen Reaktionsansätzen die Säuremenge zwischen 0.07 und 1.30 Äg. variiert, während die restlichen Reaktionsbedingungen konstant waren (Abbildung 4.27). Nach einer Reaktionszeit von 7 d konnte neben Gly<sub>3</sub> und Gly<sub>4</sub> bereits eine Vielzahl der möglichen Kupplungsprodukte aus Ala, Gly und Gly2 detektiert werden, darunter Di-, Tri- und Tetrapeptide wie AlaGly, AlaGly<sub>2</sub> und AlaGly<sub>3</sub>. Als längstes Peptid wurde Gly<sub>5</sub> in der Reaktionsmischung nachgewiesen und nach 15 d nahm die Menge gebildeter Peptide weiter zu. Um den Einfluss unterschiedlicher Säuremengen aufzuzeigen, genügt allerdings die Betrachtung der am häufigsten gebildeten Produkte Gly3 und Gly4. Demnach beschleunigen bereits sehr geringe Mengen an AcOH die Peptidsynthese. Abgesehen davon weist die Reaktion keine große Abhängigkeit von der Säuremenge auf. Mit dem Einsatz größerer Säuremengen nimmt der Umsatz ab, da die saure Umgebung wahrscheinlich verstärkt die Peptidspaltung katalysiert. Tatsächlich konnte die Peptidsynthese auch in Abwesenheit von AcOH durchgeführt werden, allerdings wurden aufgrund der langsameren Korrosion des Eisens wieder geringere Umsätze erzielt.



**Abbildung 4.29:** Peakflächen von Gly<sub>3</sub> und Gly<sub>4</sub> in Abhängigkeit von den eingesetzten Äquivalenten Aminosäure in der eisenkatalysierten Peptidsynthese. Reaktionsbedingungen: Fe (10 Äq.), H<sub>2</sub>O (12.5 Äq.), AcOH (2.4 Äq.); 50 °C; 14 d. Die Fehlerbalken entsprechen  $\pm$  SD.

Durch die Variation der Aminosäuremenge konnte ein weitaus größerer Einfluss auf die Peptidkondensation erzielt werden (Abbildung 4.29). Durch eine höhere Konzentration der Aminosäuren stieg der Umsatz teilweise um mehr als den Faktor 10 an. Mit dem Einsatz noch größerer Mengen konnten allerdings nicht mehr alle Aminosäuren gelöst werden, was wiederum in verminderten Ausbeuten resultierte.



**Abbildung 4.28:** Peakflächen von  $Gly_3$  und  $Gly_4$  in Abhängigkeit von den eingesetzten Äquivalenten Eisen in der eisenkatalysierten Peptidsynthese. Reaktionsbedingungen: AS (1.0 Äq.), H<sub>2</sub>O (4.2 Äq.), AcOH (0.1 Äq.); 50 °C; 14 d. Die Fehlerbalken entsprechen ± SD.

Weiterhin wurde der Einfluss des eingesetzten Eisenpulvers auf die Synthese betrachtet (Abbildung 4.28). Sowohl für sehr große als auch sehr geringe Mengen Eisen konnte die Peptidbildung nachgewiesen werden und selbst 0.007 Äq. Eisenpulver resultierten in einer erfolgreichen Aminosäurekopplung. Optimale Bedingungen lagen dabei bei ca. 0.03 Äq. Eisen vor. Wie bereits zuvor wurde eine Vielzahl weiterer Peptide detektiert, als längstes Peptid wurde Gly<sub>6</sub> gebildet. Weiterhin wurde beobachtet, dass eine gute Durchmischung von Aminosäuren und Eisenpulver vor der Reaktion die Synthese stark begünstigte, da diese während der Reaktion ohne Magnetrührer scheinbar nicht mehr vollständig durchgeführt werden konnte.



**Abbildung 4.30:** Peakflächen von Gly<sub>3</sub> und Gly<sub>4</sub> in Abhängigkeit von den eingesetzten Äquivalenten H<sub>2</sub>O in der eisenkatalysierten Peptidsynthese. Reaktionsbedingungen: AS (1.00 Äq.), Fe (0.07 Äq.), AcOH (0.13 Äq.); 70 °C; 7 d. Die Fehlerbalken entsprechen  $\pm$  SD.

Ergänzend wurde der H<sub>2</sub>O-Anteil der Reaktion variiert. Auch hier findet die Peptidsynthese über einen weiten Bereich statt (Abbildung 4.30). Basierend auf den vorigen Ergebnissen wurden hier nur geringe Mengen an Eisen und AcOH eingesetzt. Ähnlich der Beobachtungen zum Einfluss der Aminosäuremengen nimmt der Umsatz mit einem sinkenden H<sub>2</sub>O-Anteil (und damit steigenden Konzentrationen) zunächst zu. Werden allerdings nur geringe Mengen an H<sub>2</sub>O verwendet, nehmen die Peptidausbeuten stark ab. Dies liegt wieder an einer verminderten Löslichkeit der Aminosäuren und einer dadurch gehemmten Katalyse. Weiterhin konnte unter den eingesetzten Reaktionsbedingungen bereits das Peptid Gly<sub>7</sub> detektiert werden.

In den vorangegangenen Untersuchungen der SIPF konnte die Dipeptidsynthese durch den Einsatz von Harnstoff stark begünstigt werden (Kapitel 4.2.2). Basierend auf diesen Resultaten wurde demnach der Einfluss Harnstoffs auf die eisenkatalysierte Peptidkondensation erforscht. Dazu wurden zu verschiedenen Reaktionsmischungen 0.5 und 1 Äq. Harnstoff zugegeben und mit einem entsprechenden Ansatz ohne Harnstoff verglichen (Abbildung 4.31). Interessanterweise wurde ein peptidabhängiger Einfluss auf die Reaktion beobachtet. So wurde mit der Anwesenheit von Harnstoff die Bildung von Polyglycin stark behindert und je mehr eingesetzt wurde, desto weniger Gly-Peptide wurden detektiert. Andererseits wurde die Bildung von Ala-haltigen Peptiden stark begünstigt und es wurde eine Steigerung der Ausbeute von AlaGly, AlaGly<sub>2</sub> und Ala<sub>2</sub> mit größeren Harnstoffmengen beobachtet. In den vorangegangenen Untersuchungen der SIPF hatte Harnstoff einen stärkeren Einfluss auf die polare Aminosäuremischung. Dementsprechend wurde auch in diesem Kontext zusätzlich untersucht, ob Aminosäuren mit Seitengruppen unterschiedlicher Polarität unterschiedlich beeinflusst werden. Dafür wurden in Reaktionsmischungen mit 0 und 1 Äq. Harnstoff zusätzlich die Aminosäuren Val (unpolar) und Ser (polar) eingesetzt. Auch hier beeinflusste Harnstoff die Peptidbildung in Abhängigkeit von der Aminosäure in entgegengesetzter Richtung. Während die Ausbeute der Val-haltigen Peptide gesteigert wurde, wurde die Synthese der Ser-haltigen Peptide gehemmt. Allerdings entsprach dies nicht den Erwartungen, da die Synthese der unpolaren und nicht der polaren Peptide begünstigt wurde.

Weiterhin wurde in dieser Arbeit Harnstoff auch zur Unterstützung der Peptidanalytik und Verminderung der Wechselwirkungen zwischen CE-Kapillarwand und Peptiden eingesetzt (Kapitel 4.1.3). Auch wenn dabei Harnstoff nur ein geringer Einfluss nachgewiesen werden konnte, sollte auch hier ein eventueller Einfluss auf die Analyse ausgeschlossen werden. Dementsprechend wurden einem Ansatz 3 Äq. Harnstoff erst nach der Reaktion zur Analyse zugegeben und die Peakflächen mit den übrigen verglichen (Abbildung 4.31). Ein Vergleich mit den entsprechenden Signalen der Reaktion ohne Harnstoff zeigt, dass auch hier durch Harnstoff kein Einfluss auf die Analytik genommen wird. Aufgrund des starken negativen



**Abbildung 4.31:** Peakflächen häufig auftretender Peptidprodukte in Abhängigkeit von den eingesetzten Äquivalenten Harnstoff in der eisenkatalysierten Peptidsynthese. Reaktionsbedingungen: AS (1.00 Äq.), Fe (0.07 Äq.), H<sub>2</sub>O (6.67 Äq.), AcOH (0.13 Äq.); 70 °C; 7 d. Die Fehlerbalken entsprechen  $\pm$  SD.

Einflusses auf die Bildung von Polyglycin wurde Harnstoff in zukünftigen Experimenten der eisenkatalysierten Peptidsynthese nicht mehr verwendet.

Ergänzend zu der Variation der Reaktionsbedingungen wurde die Zugabe verschiedener Stoffe in der Reaktion oder Aufarbeitung erforscht. Einerseits wurde der Einsatz der oxidationsfördernden Salze FeCl<sub>3</sub> und MnCl<sub>2</sub> untersucht. Durch die Beschleunigung der Korrosion des Eisenpulvers sollte dieses schneller in der Reaktionslösung vorliegen und eine Beschleunigung der Peptidsynthese zur Folge haben. Allerdings konnte in keinem der beiden Fälle ein erhöhter Umsatz erkannt werden. In diesem Zusammenhang wurde weiterhin anstatt elementaren Eisens und AcOH direkt das entsprechende, kommerziell erworbene Salz Fe(OAc)<sub>2</sub> in der Synthese eingesetzt. Auch hier fand eine erfolgreiche Katalyse der Peptidkondensation statt. Diese erfolgte allerdings auch im gleichen Umfang wie durch die Verwendung der separaten Chemikalien. Somit verläuft die Korrosion von Eisen unter den Bedingungen sehr zügig und weitere Zusätze zur Beschleunigung bringen keine Umsatzsteigerung.

Außerdem wird in vielen mineralkatalysierten Peptidkondensationen die Reaktionsmischung nach erfolgter Synthese mit CaCl<sub>2</sub>-Lösung gewaschen, um alle Peptidprodukte von der Mineraloberfläche abzulösen.<sup>[115]</sup> Mit einer ähnlichen Intention wurden Reaktionsrückstände in Trifluoressigsäure (TFA) gerührt, um speziell längerkettige Peptide zu lösen und nachzuweisen.<sup>[130]</sup> Dementsprechend wurde der Einfluss einer 0.1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung und 0.1%iger TFA auf die eisenkatalysierte Peptidkondensation untersucht, allerdings wies keiner der Zusätze einen positiven Einfluss auf die detektierte Peptidmenge auf.

Abschließend wurde der Einfluss der Temperatur auf die Reaktion untersucht. Wie erwartet, steigt die Peptidausbeute mit steigender Temperatur stark an (Abbildung 4.32). Die Ausbeuten von Gly<sub>3</sub> und Gly<sub>4</sub> konnten so um den Faktor 10 gesteigert werden. Außerdem wurde die Synthese längerer Peptide bei höheren Temperaturen begünstigt. So konnte nach einer Reaktionszeit von 7 d bei 70 °C Gly<sub>7</sub> detektiert werden, das bei 50 °C nicht nach 14 d nachgewiesen werden konnte. Überraschend konnte allerdings auch eine erfolgreiche Peptidsynthese bei Raumtemperatur durchgeführt werden. Zwar erfolgte diese in einem sehr viel geringeren Umfang, allerdings fällt dies auf einer präbiotischen Zeitskala nicht ins Gewicht. Dies demonstriert eindrucksvoll das Potenzial der Eisenkatalyse, da bisher veröffentlichte präbiotische Peptidsynthesen für gewöhnlich hohe Temperaturen zur Unterstützung benötigen.



**Abbildung 4.32:** Peakflächen von Gly<sub>3</sub> und Gly<sub>4</sub> in Abhängigkeit von der Temperatur in der eisenkatalysierten Peptidsynthese. Reaktionsbedingungen: AS (1.00 Äq.), Fe (0.07 Äq.), H<sub>2</sub>O (2.67 Äq.), AcOH (0.13 Äq.); 14 d. Die Fehlerbalken entsprechen  $\pm$  SD.

Insgesamt wurden die Reaktionsbedingungen über einen großen Bereich variiert und trotzdem konnte in jedem dieser Experimente die Peptidkondensation erzielt werden. Allerdings reichen für eine umfangreiche Peptidsynthese oft geringe Mengen der Reaktanten aus. Unter den optimalen Bedingungen werden Eisen und AcOH in katalytischen Mengen im Verhältnis 1:2 eingesetzt. Im Gegensatz zu den Untersuchungen der SIPF hatte Harnstoff keinen rein positiven Einfluss auf die Synthese. Stattdessen wurde mit dem Einsatz von Harnstoff eine starke Abnahme der Polyglycin- und Ser-haltigen Peptide beobachtet. Weitere Zusätze zur Reaktion wie FeCl<sub>3</sub>, MnCl<sub>2</sub> oder CaCl<sub>2</sub> resultierten zwar immer noch in der Bildung diverser Peptide, allerdings konnte dadurch kein gesteigerter Umsatz erzielt werden. Dementsprechend wird in zukünftigen Experimenten auf die Verwendung jeglicher ergänzender Verbindungen verzichtet. Die optimierten Reaktionsbedingungen sind in Abbildung 4.33 zusammengefasst.

## 4.3.2. Zeitlicher Verlauf der eisenkatalysierten Peptidkondensation



Abbildung 4.33: Optimierte Reaktionsbedingungen der eisenkatalysierten Peptidkondensation.

Abschließend wurde der zeitliche Verlauf der eisenkatalysierten Peptidkondensation und die Synthese langkettiger Peptidpolymere unter den optimierten Reaktionsbedingungen aus Abbildung 4.33 untersucht. Wie bereits zuvor wurden die Experimente bei konstanten Volumina auf einer Schüttelplatte durchgeführt. Da in den vorherigen Versuchen bereits gezeigt werden konnte, dass die Synthese in einem großen Temperaturbereich erfolgreich stattfindet, wurden alle Experimente bei 70 °C durchgeführt, um eine möglichst große Produktbildung zu erzielen. Alle Reaktionen wurden doppelt durchgeführt und jeder Ansatz mindestens zwei Mal mittels CE-MS analysiert. Dazu wurde, wie zuvor auch, die Reaktionsmischung in 10 mL H<sub>2</sub>O gelöst, übriges Eisenpulver abfiltriert und die Lösung auf eine Aminosäurekonzentration von 5 mM verdünnt.

Um den zeitlichen Verlauf der Peptidkondensation zu untersuchen, wurde zunächst eine Aminosäuremischung bestehend aus Ala, Gly und Gly<sub>2</sub> unter den optimierten Reaktionsbedingungen umgesetzt und die Peptidausbeuten nach 1, 3, 7 und 21 d bestimmt (Abbildung 4.34). Insgesamt konnte in der Reaktionsmischung eine Vielzahl verschiedener Peptide detektiert werden, deren Umsatz innerhalb der 21 d kontinuierlich zunahm. Bereits nach einem Tag wurden Di- bis Tetrapeptide gebildet, darunter AlaGly, AlaGly<sub>2</sub>, Ala<sub>2</sub>Gly, Gly<sub>3</sub> und Gly<sub>4</sub> (und deren massengleiche Konstitutionsisomere). Die Dimerisierung von Ala wurde nicht beobachtet, obwohl das Tripeptid Ala<sub>2</sub>Gly gebildet wurde. Wahrscheinlich entsteht Ala<sub>2</sub>Gly deshalb aus der Kopplung von AlaGly und Ala. Daraus wird der positive Einfluss von längeren Peptiden auf Peptidkondensationsreaktionen ersichtlich, da die Reaktion von Ala mit AlaGly offensichtlich energetisch günstiger ist als die mit einem weiteren Ala-Molekül.<sup>[82]</sup> Im weiteren Verlauf der Reaktion konnten jegliche Kombinationen der anfänglich eingesetzten Aminosäuremischung detektiert werden (die Dimerisierung von Ala fand nach 3 d statt) und nach einer Reaktionszeit von 21 d wurde Gly<sub>9</sub> als längstes Peptid gebildet. Zusätzlich wurden Eichgeraden der Peptide AlaGly/GlyAla, Ala<sub>2</sub> und Gly<sub>3</sub> aufgenommen, um



Abbildung 4.34: Peakflächen ausgewählter Peptide in Abhängigkeit von der Reaktionszeit der eisenkatalysierten Peptidkondensation unter den optimierten Reaktionsbedingungen. Die Fehlerbalken entsprechen  $\pm$  SD.

diese quantifizieren zu können. Demnach konnten Ausbeuten von bis zu 4.1 % erzielt werden (Tabelle 4.4). Geht man davon aus, dass Gly<sub>3</sub> und Gly<sub>4</sub> eine ähnliche Ionisationswahrscheinlichkeit aufweisen, so läge die Gly<sub>4</sub>-Ausbeute bei ca. 12 %. Allerdings muss dies durch die Messung eines entsprechenden Standards bestätigt werden. In Experimenten unter den kupferkatalysierten SIPF-Bedingungen wurden Gly<sub>3</sub>-Ausbeuten von maximal 2.9 % nachgewiesen, längere Peptide wurden für gewöhnlich in noch geringeren Mengen synthetisiert.<sup>[201]</sup> Auch wenn bei diesen Experimenten kein Gly<sub>2</sub> eingesetzt wurde, so legt ein Vergleich eine mindestens ebenso hohe katalytische Aktivität von Eisen zu Kupfer unter den entwickelten Reaktionsbedingungen nahe.

, ,	- 5	5 5- (	5,		
AlaGly + GlyAla			Gly3		
	Konzentration (mM)	Ausbeute (%)	Konzentration (mM)	Ausbeute (%)	
1 d	$0.11 \pm 0.02$	0.01	$3.6 \pm 0.7$	$0.3 \pm 0.1$	
3 d	$0.47 \pm 0.04$	0.04	9.6 ± 1.4	$0.7 \pm 0.1$	
7 d	$1.31 \pm 0.09$	$0.1 \pm 0.01$	$24.4 \pm 1.2$	$1.9 \pm 0.1$	
21 d	$3.81 \pm 0.48$	$0.29 \pm 0.04$	$52.9 \pm 5.6$	$4.1 \pm 0.4$	

**Tabelle 4.4:** Resultierende Stoffmengen und entsprechende Ausbeuten der Peptide AlaGly/GlyAla und Gly<sub>3</sub> aus der eisenkatalysierten Peptidkondensation in Abhängigkeit von der Reaktionszeit. Für die Ausbeutebestimmung wurde angenommen, dass Gly<sub>3</sub> aus jeweils einem Molekül Gly und Gly<sub>2</sub> (und nicht drei Molekülen Gly) entsteht.

Abbildung 4.34 zeigt, dass während der eisenkatalysierten Peptidsynthese die Peptidausbeuten stetig wachsen und immer längere Polymere gebildet werden. Abgesehen von der Aminosäuresequenz ist die Kettenlänge entscheidend für die Funktionalität eines bestimmten


**Abbildung 4.35:** Peakflächen ausgewählter Peptide in Abhängigkeit von der Reaktionszeit der eisenkatalysierten Peptidkondensation unter den optimierten Reaktionsbedingungen und zusätzlich Gly<sub>3</sub> und Ala<sub>2</sub> als Reaktanten. Die Fehlerbalken entsprechen  $\pm$  SD.

Peptids. In weiteren Experimenten wurde deshalb untersucht, ob es eine maximale Peptidlänge gibt, die unter den Reaktionsbedingungen synthetisiert werden kann. Dazu wurden zusätzlich Ala<sub>2</sub> und Gly<sub>3</sub> zu der anfänglichen Aminosäuremischung gegeben, um damit eine beschleunigte Polymerisation zu längeren Peptiden zu untersuchen. Tatsächlich wurden dadurch längere Peptide im größeren Umfang synthetisiert als zuvor (Abbildung 4.35). So entstand innerhalb von 21 d über die doppelte Menge an Gly<sub>4</sub> im Vergleich zu den vorherigen Experimenten. Auch hier wird ersichtlich, dass Dipeptide schneller miteinander reagieren als Aminosäuren untereinander. Das Tetrapeptid aus Ala2 und Gly2 wird in einem sehr viel größeren Umfang gebildet als das Dipeptid aus Ala und Gly (ähnliche Ionisationswahrscheinlichkeiten vorausgesetzt). Außerdem konnte beobachtet werden, dass die Ausbeute aller Peptide (mit Ausnahme von Gly<sub>5</sub> und Gly<sub>7</sub>) weiterhin über die komplette Reaktionsdauer stetig zunimmt. Somit konnte nach 21 d das bisher längste gebildete Peptid Gly<sub>10</sub> detektiert werden und es kann angenommen werden, dass längere Reaktionszeiten in der Synthese größerer Peptide resultieren würden. Weiterhin wurden die Ausbeuten des Peptids AlaGly/GlyAla und zusätzlich von Ala<sub>3</sub> bestimmt, dessen Synthese nach 21 d zuvor ausgehend von Ala nicht nachgewiesen werden konnte (Tabelle 4.5). Es konnte eine höhere Ausbeute von AlaGly erreicht werden als zuvor. Neben der Begünstigung durch die Reaktionsbedingungen ist auch eine Steigerung der Ausbeute durch die Spaltung höherer Peptide denkbar.

Tabelle 4.5: Resultierende Stoffmengen und entsprechende Ausbeuten der Peptide AlaGly/GlyAla und Ala3 aus der eisen-
katalysierten Peptidkondensation mit zusätzlichem Gly3 und Ala2 als Reaktanten in Abhängigkeit von der Reaktionszeit.
Für die Ausbeutebestimmung wurde angenommen, dass Ala3 aus jeweils einem Molekül Ala und Ala2 (und nicht drei
Molekülen Ala) entsteht.

	AlaGly + G	Ala3		
	Konzentration (mM)	Ausbeute (%)	Konzentration (mM)	Ausbeute (%)
7 d	$0.90 \pm 0.10$	$0.12 \pm 0.01$	$0.94 \pm 0.08$	$0.12 \pm 0.01$
14 d	$2.13 \pm 0.17$	$0.27 \pm 0.02$	$1.15 \pm 0.14$	$0.15 \pm 0.02$
21 d	$3.61 \pm 0.25$	$0.46 \pm 0.17$	$1.36 \pm 0.05$	$0.17 \pm 0.01$

In den umfangreichen Untersuchungen konnte somit eine sehr effektive Route zu präbiotischen Peptiden entwickelt werden. Unter einem direkten, einfachen Reaktionsmechanismus fungieren die Eisen(II)-Ionen dabei einerseits als Katalysator der Reaktion und sorgen gleichzeitig für eine dehydratisierende Umgebung. Somit erfolgt eine extrem effiziente Peptidkondensation durch die ausgehend von Gly<sub>3</sub> Di- bis Decapeptide nachgewiesen und Ausbeuten von bis zu 4.1 % erzielt werden konnten. Besonders in der Umgebung der frühen Erde mit hohen Eisenvorkommen weist die entwickelte Synthese ein hohes Potenzial auf. Für die Peptidkondensation sind lediglich Eisen, Aminosäuren und H<sub>2</sub>O erforderlich, die in dem untersuchten, weiten Bereich verschiedener Mischungsverhältnisse in einer erfolgreichen, robusten Peptidbildung resultierten. Weiterhin konnte demonstriert werden, dass selbst bei Raumtemperatur Aminosäuren gekoppelt werden. Somit stellt die eisenkatalysierte Peptidkondensation eine wichtige Umgebung für die Entstehung der präbiotischen Peptidwelt dar.

## 5. Zusammenfassung und Ausblick

Intensive Forschungen zahlreicher Fachbereiche widmen sich dem Phänomen, wie aus unbelebter Materie unter den extremen Bedingungen des Hadaikums die Bausteine des Lebens entstanden, auf denen die Existenz jeglicher Organismen dieser Erde fundiert. In diesem Zusammenhang leistete diese Arbeit einen Beitrag zur Erforschung neuer präbiotischer Routen zu langkettigen und funktionellen Peptiden und eröffnete neue Möglichkeiten zur präzisen Analyse der resultierenden komplexen Reaktionsmischungen.

Präbiotische Synthesen resultieren meist in komplexen Mischungen unterschiedlicher Molekülklassen, wobei die relevanten Zielverbindungen oft nur in sehr geringen Mengen entstehen. Für die exakte Aufklärung dieser Reaktionsmischungen werden demnach Analysemethoden benötigt, die sowohl über ein hohes Trennvermögen als auch möglichst geringe Nachweisgrenzen verfügen. Deshalb wurde zunächst ein robustes CE-Orbitrap-MS Interface entwickelt, um die Kombination aus hochauflösenden CE-Messungen und der sensitiven Massendetektion zu nutzen und eine detaillierte Aufklärung der Peptidmischungen dieser Arbeit zu ermöglichen. Im Fokus stand dabei ein einfacher, effizienter Aufbau für zuverlässige und wiederholbare Messungen (Abbildung 5.1, C). Daher wurde das Interface nach dem koaxialen *sheath-flow design* konstruiert und durch goldbeschichtete Stahlemitter ergänzt. In der anschließenden Charakterisierung des Interfaces konnte gezeigt werden, dass beide Faktoren wichtige Voraussetzungen für reproduzierbare Analysen schufen. Die Goldbeschichtung des Emitters resultierte in einer erhöhten Elektrospraystabilität, während durch das sheath liquid die Ionisation und Massenkompatibilität des BGE und der Analyten verbessert wurden. Durch die Kopplung mit dem hochsensitiven Q Exactive Orbitrap Massenspektrometer wurden so bemerkenswerte LODs der Modellpeptide erzielt. Angiotensin II und Neurotensin wurden selbst noch in den geringen Mengen von 2.4 und 3.5 ng/mL (entsprechend einer Konzentration von 2.3 und 2.1 nM) detektiert. Außerdem ermöglichte der Aufbau des Interfaces die Verwendung verschiedener CE-Kapillaren. Da in der Peptidanalytik häufig Sensitivitätsverluste aufgrund von Wechselwirkungen zwischen Probe und Kapillarwand in Kauf genommen werden müssen, wurden im weiteren Verlauf verschiedene Kapillarbeschichtungen evaluiert. Durch die Anwendung einer LPA-Beschichtung konnte nicht nur eine bessere Auftrennung der Aminosäuren und Peptide erzielt werden, sondern auch deren Signalflächen bis um den Faktor 26 im Vergleich zu BFS-Kapillaren gesteigert werden. Demnach stellte die Entwicklung einer zuverlässigen Routine zur Proteinanalyse eine wichtige Grundlage für die genaue und hochaufgelöste Untersuchung der Peptidmischungen dieser Arbeit dar. Allerdings ist auch eine Anwendung des Interfaces für weitere exakte Analysen in anderen Forschungsbereichen denkbar.

Im nächsten Schritt dieser Arbeit wurden verschiedene Ansätze zur Entstehung der präbiotischen Peptidwelt erforscht. In der SIPF werden Aminosäuren in einem direkten Reaktionsmechanismus über die Komplexierung durch Cu(II)-Metallionen miteinander verknüpft. In den ersten Untersuchungen dieser Reaktion wurde erprobt, welche Faktoren der Reaktionsbedingungen die Produktbildung besonders stark beeinflussen. Zunächst konnte festgestellt werden, dass nicht alle Reaktionsbedingungen in einer erfolgreichen Peptidknüpfung resultierten. Insbesondere bei niedrigen Eduktkonzentrationen wurde ein verminderter Umsatz beobachtet und vor allem für NaCl und CuCl<sub>2</sub> bestanden Schwellenkonzentrationen, unter denen keine Produktbildung stattfand. Andererseits wurde die Peptidsynthese maßgeblich durch die Anwesenheit der katalytisch aktiven Aminosäuren Gly, His oder Gly<sub>2</sub> begünstigt. Im besten Fall konnten Tripeptide in der Produktmischung bestätigt werden. Diese Ergebnisse ließen vermuten, dass zwischen den Aminosäuren kooperative Effekte, z. B. aufgrund von Wechselwirkungen der diversen Seitengruppen, ausgebildet werden können und deren Reaktivität nicht isoliert betrachtet werden kann. Dementsprechend wurden in weiteren Experimenten verschiedene komplexe Aminosäuremischungen in der Peptidsynthese umgesetzt (Abbildung 5.1, A). In diesem Zusammenhang wurde die Peptidbildung einer unpolaren, polaren, sauren, basischen oder präbiotischen Mischung untersucht. Erstmals wurde außerdem die Gesamtheit aller proteinogenen Aminosäuren in einer präbiotischen Peptidsynthese eingesetzt. Harnstoff hatte einen überwiegend positiven Effekt auf die Produktbildung, weshalb die Reaktionsbedingungen dementsprechend ergänzt wurden. So konnte ein Großteil aller möglichen Dipeptidsequenzen synthetisiert werden, auch wenn nicht alle Aminosäuren im gleichem Maß reagierten. Vor allem Cys, Trp und Gln bildeten nur selten Peptide. Allerdings konnte erneut eine gesteigerte Reaktivität in Abhängigkeit von der Aminosäuremischung beobachtet werden und so bildete Gln in der Gesamtmischung mehr Dipeptide als in der entsprechenden Subgruppe. Dieser positive Einfluss konnte keiner bestimmten katalytisch aktiven Aminosäure zugeordnet werden. Weder Gly, His noch Asp hatten einen erkennbar positiven Einfluss auf die Reaktivität der komplexen Mischungen. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden in der Arbeitsgruppe Trapp die Peptidsynthesen in flüssigem SO<sub>2</sub> durchgeführt, das vor allem in der Nähe von Vulkanen ein alternatives präbiotisches Reaktionsmedium dargestellt haben könnte. Auch in dieser Umgebung konnten ähnliche Beobachtungen bezüglich der Reaktivität der Aminosäuregruppen gemacht werden. Nicht alle

Aminosäuren wiesen die gleiche Aktivität auf, aber auch hier war die Reaktivität der einzelnen Aminosäure von der komplexen Mischung abhängig, mit der sie zusammen umgesetzt wurde. Im Unterschied zu H<sub>2</sub>O reagierte allerdings in SO<sub>2</sub> jede Aminosäure zu Dipeptiden, was in einer größeren Vielfalt an Peptidsequenzen resultierte. Besonders unter sehr geringen Eduktkonzentrationen ergab sich ein größeres Produktspektrum und der Einsatz großer Mengen NaCl und CuCl<sub>2</sub> war nicht notwendig. Neben der Entwicklung eines weiteren wichtigen Szenarios für präbiotische Peptidsynthesen konnte somit die Signifikanz der Untersuchung komplexer Mischungen erarbeitet werden. Unabhängig vom Reaktionsmedium waren begünstigende Effekte ersichtlich, die in Reaktionen einzelner Aminosäuren unbeachtet geblieben wären. Vor dem Hintergrund, dass spezifische Aminosäuren auf der frühen Erde selten rein vorgekommen sein sollten, ist dies eine wichtige Erkenntnis.

Auch wenn durch den Einsatz von komplexen Aminosäuremischungen unter den SIPF-Bedingungen eine hohe Diversität an Peptiden erzeugt werden konnte, so blieb die Synthese langkettiger Peptide aus. Weiterhin ist die Abhängigkeit der Peptidbildung von hohen Cu(II)-Konzentrationen problematisch, da diese nur an wenigen, vereinzelten Orten der frühen Erde vorgeherrscht haben können. Stattdessen sollten präbiotische Synthesen stabil gegenüber äußeren Einflüssen (wie z. B. Druck- und Temperaturschwankungen) und in vielen verschiedenen Szenarien realisierbar sein. Dementsprechend wurde im weiteren Verlauf der Arbeit die katalytische Fähigkeit eines universell verfügbaren Elements dieser Erde, Eisen, ausgenutzt und eine Peptidsynthese entwickelt, die allein durch dieses Metall, Aminosäuren und H<sub>2</sub>O als Lösemittel ermöglicht wurde (Abbildung 5.1, B). Hierbei wird Eisenpulver zunächst durch geringe Mengen (Amino-)Säure korrodiert. Die resultierenden Fe(II)-Ionen katalysieren einerseits die Peptidknüpfung zweier Aminosäuren oder Peptide und schaffen gleichzeitig die für Kondensationsreaktionen wichtigen dehydratisierenden Bedingungen. Um die Korrosion zu beschleunigen, wurden katalytische Mengen AcOH zu der Reaktionsmischung zugegeben, allerdings fand die Synthese auch ohne diese statt. Durch die Variation der Reaktionsparameter wurde die Robustheit der Reaktion ersichtlich. Selbst große Schwankungen der Eduktkonzentrationen führten trotzdem zur erfolgreichen Peptidbildung; unter den optimalen Bedingungen wurden AcOH und Eisen allerdings nur in sehr geringen Mengen benötigt (14 und 7 mol%). Weitere Zusätze wie FeCl<sub>3</sub> oder MnCl<sub>2</sub> hatten keinen Einfluss auf die Reaktion und Harnstoff hatte gleichzeitig einen positiven als auch negativen Effekt auf die Synthese unterschiedlicher Peptide. Während hohe Temperaturen die Reaktion zwar beschleunigten, konnte selbst bei Raumtemperatur eine erfolgreiche Produktbildung demonstriert werden. Dies kann in präbiotischen Peptidsynthesen nur selten gezeigt werden. Außerdem wurde unter den optimierten Reaktionsbedingungen der zeitliche Verlauf der entwickelten Peptidsynthese näher untersucht und die Produktmischung analysiert. Ausgehend von Gly, Ala und Gly<sub>2</sub> wurden bereits nach einer Reaktionszeit von 1 d Tetrapeptide detektiert. Innerhalb von 21 d wuchs das Produktspektrum weiter an und Gly<sub>3</sub> entstand in einer Ausbeute von 4.1 %. Durch den Einsatz von Gly<sub>3</sub> als Reaktant wurde Gly<sub>10</sub> als längstes Oligomer nachgewiesen und dementsprechend im Vergleich zu den SIPF-Bedingungen durch die eisenkatalysierte Peptidkondensation die synthetisierten Peptidlängen deutlich gesteigert. Da innerhalb der 21 d Reaktionszeit der Umsatz der meisten Peptidketten nicht abnahm, ist auf einer präbiotischen Zeitskala mit der Entwicklung von längeren Peptidketten und Proteinen zu rechnen. Die eisenkatalysierte Peptidkondensation stellt somit eine effektive und aussichtsreiche Route zur Entstehung der präbiotischen Peptidwelt dar.

Durch den Einsatz von komplexen Aminosäuremischungen konnte in dieser Arbeit eine hohe Diversität an Peptidsequenzen erzeugt werden. Außerdem wurden unter den Reaktionsbedingungen der Eisenkatalyse sehr lange Peptidketten erzeugt. Beide Faktoren bilden wichtige Voraussetzungen für die Funktionalität von Peptiden. Somit würde der Einsatz von komplexen Aminosäuremischungen unter den entwickelten Reaktionsbedingungen nicht nur mögliche kooperative Effekte zwischen den Aminosäuren ausnutzen, sondern auch die Möglichkeit zu langkettigen Peptidsequenzen mit einem echten Potenzial an Funktionalität eröffnen. Über die Kombination mit der Synthese anderer Biomoleküle würde die robuste Reaktionsroute der Eisenkatalyse die Entwicklung eines holistischen Systems zum Ursprung des Lebens ermöglichen.



**Abbildung 5.1:** Grafische Zusammenfassung der Entwicklung und Untersuchung verschiedener Szenarien der präbiotischen Peptidsynthese sowie der Analyse komplexer Peptidmischungen via CE-MS. Basierend auf den Reaktionsbedingungen der kupferkatalysierten SIPF wurde die Dipeptidbildung verschiedener Aminosäuremischungen sowohl in H<sub>2</sub>O als auch in SO<sub>2</sub> untersucht (A).<sup>[306]</sup> Weiterhin wurde ein präbiotisches Szenario für eisenkatalysierte Peptidkondensationen erarbeitet und der zeitliche Verlauf der Produktbildung erforscht (B). Die resultierenden Peptidmischungen dieser Arbeit wurden mithilfe des entwickelten CE-Orbitrap-MS Interfaces analysiert (C).<sup>[291]</sup>

# 6. Experimenteller Teil

## 6.1. Allgemeines

#### 6.1.1. Chemikalien und Lösemittel

Alle verwendeten Chemikalien wurden von kommerziellen Anbietern (abcr, Iris Biotech, Acros Organics, VWR, Thermo Fisher Scientific, Sigma-Aldrich und TCI Europe) bezogen und falls nicht anders erwähnt, ohne eine weitere Aufreinigung verwendet. Argon (Ar 5.0) wurde von Air Liquide Deutschland GmbH erworben. Falls nicht anders angegeben, wurden isolierte Verbindungen und entnommene Proben bei -20 °C unter Argon gelagert. Für chromatographische Zwecke wurden Lösemittel im HPLC grade oder HPLC-MS grade verwendet. Wasser wurde von einem VWR Puranity PU 15 Gerät deionisiert.

#### 6.1.2. Massenspektrometrie

Die massenspektrometrischen Analysen wurden mit einem Q Exactive Plus Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Die Probe wurde über einen 5  $\mu$ L-Loop injiziert und als Laufmittel wurde eine Lösung aus 80 % v/v Isopropanol in Wasser mit 0.05 % Ameisensäure bei einer Flussrate von 50  $\mu$ L/min verwendet. Falls nicht anders erwähnt, wurde das Gerät im *full scan* Modus eingesetzt. Das RF Level der S-Linse betrug 50 und die Kapillartemperatur wurde auf 140 °C eingestellt. Das *AGC target (automatic gain control)* betrug 1e6. Die Sprayspannung und Flussraten des *sheath gas* und *auxiliary gas* wurden vor jeder Messung variiert, sodass die *total ion count variation* möglichst gering und stabil vorlag. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Thermo Xcalibur Software 4.1.

#### 6.1.3. Kapillarelektrophorese

Für die Auftrennungen wurde ein Agilent 7100 CE System verwendet. Sowohl die Auswertung der Daten als auch die Steuerung des Geräts erfolgte mit der ChemStation Software (Version C.01.07). Die Quarzglaskapillaren (OD 0.36 mm, ID 0.05 mm) wurden von Micro-Quartz (München) und die Polyvinylalkohol-Kapillaren von Agilent Technologies erworben.

#### 6.1.4. Kapillarelektrophorese-Massenspektrometrie Interface

Das entwickelte Interface besteht aus einem handgefertigten Gerüst aus rostfreiem Stahl, das die Standard Ion Max Quelle des oben erwähnten Orbitrap-Spektrometers ersetzt. Weiterhin wurden PEEK T-Stücke, *ferrules* und *tubing* von Sigma-Aldrich und Fisher Scientific verwendet. Die isokratische Pumpe und Splittergruppe wurden von Agilent erworben. Die (*x-y-z*)-Bühne wurde von Thorlabs (Dachau) bezogen. Die Emitter wurden aus rostfreien Stahlrohren (OD 1/16<sup>++</sup>, ID 0.5 mm) von Altmann Analytik KG (München) angefertigt und mithilfe eines Dremels 8100 (Racine, USA) angespitzt. Ein Kruess MSZ5600 Mikroskop (Hamburg) wurde verwendet, um die Spitzengröße und Qualität zu untersuchen. Die Goldbeschichtung der Emitter erfolgte nach einem Verfahren von Trapp *et al.*<sup>[294]</sup> Die ESI-Spannung am Emitter wurde durch eine externe Spannungsquelle von Phywe Systeme KG (Göttingen) angelegt.

#### 6.1.5. Peptidsynthesizer

Die Dipeptide wurden mit einem Tribute-UV Peptide Synthesizer (Protein Technologies Inc., Tucson, USA) synthetisiert. Weiterhin wurden 40 mL Reaktionsgefäße von Gyros Protein Technologies verwendet.

#### 6.1.6. Kugelmühle

Zur Homogenisierung der Aminosäuremischungen wurde eine Planetenkugelmühle Pulverisette 7 premium line (Fritsch GmbH, Idar-Oberstein) mit zwei 20 mL Edelstahl-Mahlbechern und zehn 10 mm Edelstahl-Kugeln verwendet.

## 6.1.7. Kleingeräte

Für die pH-Messungen wurde ein Lab 850 instrument (SI Analytics, Mainz) verwendet, das mit den Standardpuffern pH 4.01, pH 6.87, pH 9.81 (SI Analytics, Mainz) kalibriert wurde.

Weiterhin wurde eine EBA 20 Zentrifuge (Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen) mit Einsätzen für Eppendorf-Gefäße benutzt.

Die Schüttelplatte StandardAnalog Shaker wurde von VWR International (Radnor, USA) erworben.

## 6.2. Analyse der Peptidmischungen



#### 6.2.1. Dipeptidsynthesen mittels des Peptidsynthesizers

Die an einem Wang-Harz gebundene und Fmoc-geschützte Aminosäure des C-Terminus (R<sup>1</sup>, 2.0 mmol, 1.0 Äq.) wurde in das Reaktionsgefäß des Peptidsynthesizers überführt und mit Programm 1 behandelt (Abbildung 6.1). Währenddessen wurde die Aminosäure mit DMF und DCM gespült, mit einer 20% igen Piperidinlösung entschützt und erneut gespült. Die Fmoc-geschützte Aminosäure 2 (R<sup>2</sup>, 8.0 mmol, 4.0 Äq.) wurde zusammen mit HBTU (8.0 mmol, 4.0 Äq.) in NMM (2 M in DMF, 16.0 mmol, 8.0 Äq.) gelöst. Die orange Lösung wurde manuell zu dem Reaktionsgefäß des Peptidsynthesizers gegeben, um daraufhin Programm 2 zu starten (Abbildung 6.2). Dabei wurden die beiden Aminosäuren zunächst für 1 h gemischt. Danach folgte ein Spülvorgang, die Entschützung mit Piperidin, ein erneuter Spülschritt und das Trocknen des Harzes. Daraufhin wurde das Harz in einen Kolben überführt und eine wässrige TFA-Lösung (8 mL, 95 %) zugegeben. Die rote Reaktionsmischung wurde für 1.5 h bei RT gerührt und dann filtriert. Das Filtrat wurde in vacuo konzentriert und in gekühltem Diethylether ausgefällt. Die Suspension wurde für 10 min bei 60 000 rpm zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Der Waschvorgang wurde vier Mal wiederholt mit Diethylether. Der weiße Feststoff wurde in H<sub>2</sub>O gelöst und lyophilisiert. Die Ausbeuten und Analytik der synthetisierten Dipeptide sind in Tabelle 6.1 aufgeführt.

	Ausbeute (%)	Berechnete Masse	Gefundene Masse
L-ValGly	36	m/z 175.1007, berechnet für	<i>m</i> / <i>z</i> 175.1007
		$[C_7H_{15}N_2O_3]^+ (M{+}H^+)$	
L-Val-L-Val	2	m/z 217.1547, berechnet für	<i>m</i> / <i>z</i> 217.1546
		$[C_{10}H_{21}N_2O_3]^+ (M{+}H^+)$	
Gly-L-Val	8	m/z 175.1007, berechnet für	<i>m</i> / <i>z</i> 175.1007
		$[C_7H_{15}N_2O_3]^+ (M{+}H^+)$	

 Tabelle 6.1: Ausbeuten und Analytik der mithilfe des Peptidsynthesizers hergestellten Dipeptide.

							Prog	ram R	eport				
Nar Cor	me: Er mment	itschu : Val-(	etzen-ma Siy-Synth	nuelleAS				RV Size : 40	•			· · · · · ·	Date: 2018 Mar 1: Inst: Tribut
	Ste	p		Action		Bottle	Vol (uL)	Vol Inc	Mix Type	Time	Temp	Drain	Reps
	. 1			RV_Top	. *	2	5000	10	N2-Vrtx Mix	00:00:30	25	Y	6
	2			RV_Top		1	5000	10 .	N2-Vrbx Mix	00:00:50	25	Y	4
	3			RV_Top_Vent_Wash		1	5000	10	N2-Vrtx Mix	00:00:30		Y	1
	4			RV_Top		3	5000	10	N2-Vrtx Mix	00:12:00	25	Y	2
	5			RV_Top_Vent_Wash		1	5000	10	N2-Vrtx Mix	00:00:30		Y	1
	6			RV_Top		1	5000	10	N2-Vrtx Mix	00:00:30	25	Y P	4
	7			RV Top		2	5000	10	N2-Vrtx Mix	00:00:30	25	Y	2

Abbildung 6.1: Programm 1 des Peptidsynthesizers.

				Program Report								
Name	e: manu ment: Va	ell-AA-Deliv I-Gly-Synth	ery-Entschuetzen nese				RV Size : 10		5.5	a <sup>a</sup> c	·	Date: 2018 Mar 1 Inst: Tribut
	Step		Action	2	Bottle	Vol (uL)	Vol Inc	Mix Type	Time	Temp	Drain	Reps
-	1		Mix				·	N2-Vrtx Mix	01:00:00	25	Y	1. St. 1.
	2		RV_Top_Vent_Wash		1	5000	10	N2-Vrtx Mix	00:00:30		Y	1
	3		RV_Top		1	5000	10	N2-Vrtx Mix	00:00:30	25	Y	4
	4		RV_Top		2	5000	10	N2-Vrtx Mix	00:00:30	25	Y	2
	5		RV_Top		3	5000	10	N2-Vrtx Mix	00:12:00	25	Y	2
	6		RV_Top		2	5000	10	N2-Vrtx Mix	00:00:30	25	Y	2
	7		RV_Top		1	5000	10	N2-Vrtx Mix	00:00:30	25	Y	4
	8		RV_Top_Vent_Wash		1	5000	10	N2-Vrtx Mix	00:00:30		Y	1
	9		RV_Top		2	5000	10	N2-Vrtx Mix	00:00:50	25	Y	5
	10		Drain-Dry						00:02:00			

Abbildung 6.2: Programm 2 des Peptidsynthesizers.

#### 6.2.2. Beschichtung der Kapillaren

Die LPA-Beschichtung der Kapillaren wurde ähnlich einem Verfahren von Zhu *et al.* durchgeführt.<sup>[281]</sup> Dabei wurde eine BFS-Kapillare (3.7 m) zunächst für 10 h bei 200 °C und einem 30 kPa N<sub>2</sub>-Fluss in einem Ofen eines Thermo Focus GC ausgeheizt. Für die darauffolgenden Spülvorgänge wurde eine Druckapparatur mit mindestens 5 bar N<sub>2</sub>-Druck verwendet. Dort wurde die Kapillare mit 0.1 M NaOH (1.5 h), H<sub>2</sub>O (0.5 h), 0.1 M HCl (5 h), H<sub>2</sub>O (0.5 h) und über Nacht mit N<sub>2</sub> gespült. Für die Silanisierung wurde die Kapillare mit einer 50% igen Lösung aus  $\gamma$ -MAPS in Methanol gespült (0.5 h), versiegelt und im Wasserbad für 6 h erwärmt (45 °C). Danach folgte ein erneuter Spülvorgang mit Methanol (1.5 h), H<sub>2</sub>O (1.5 h) und über Nacht mit N<sub>2</sub>. Für die Polymerisation wurde eine wässrige Acrylamidlösung (120 mg in 3 mL) und Ammoniumpersulfatlösung (20.0 mg in 4 mL) vorbereitet. 10.0 µL der Ammoniumpersulfatlösung wurden zu der Acrylamidlösung gegeben und mit einem Vortexmischer 1 min vermischt. 700 µL der Mischung wurden für 10 min mit N<sub>2</sub> entgast und die Kapillare daraufhin mit dieser gespült (0.5 h), versiegelt und im Wasserbad für 0.5 h erwärmt (50 °C). Nach einem finalen Spülvorgang mit H<sub>2</sub>O (1.5 h) und N<sub>2</sub> (2 h) war die Beschichtung abgeschlossen.

## 6.2.3. Analysen mittels Kapillarelektrophorese

Für die CE-Trennungen wurden eine wässrige Essigsäurelösung (2 M) als BGE und BFS-Kapillaren einer Länge von 80 cm (effektive Länge: 71.5 cm) verwendet. Vor dem ersten Gebrauch wurden diese mit Wasser (2 min), gefolgt von 0.1 M NaOH (5 min), Wasser (2 min) und BGE (2 min) konditioniert. Alle Flüssigkeiten wurden mit einem Druck von 1 bar injiziert. Zwischen den Messungen wurden die die Kapillaren mit 0.1 M NaOH (30 s), Wasser (1 min) und BGE (2 min) gespült (1 bar Druck). Falls nicht anders erwähnt, betrug die Aminosäurekonzentration der Proben 1 mM. Diese wurden hydrodynamisch mit 30 mbar für 10 s injiziert. Die Analysen wurden bei 25 °C im Positivmodus (+ 30 kV) durchgeführt und die Detektion erfolgte mithilfe eines Leitfähigkeitdetektors.

#### 6.2.4. Analysen mittels Kapillarelektrophorese-Massenspektrometrie

Zur Analyse der Aminosäure- und Peptidmischungen wurden neben den BFS-Kapillaren auch Kapillaren mit PVA- oder LPA-Beschichtung verwendet. In allen Fällen betrug die Länge der Kapillaren 80 cm, wobei das MS-Ende der Kapillaren um ca. 2 mm abgebrannt wurde. Entsprechend der Kapillare wurden verschiedene BGEs und Konditionierungsmethoden verwendet: **BFS:** Es wurde wässrige Essigsäurelösung (2 M) als BGE verwendet. Die Konditionierung und das Spülen der Kapillaren erfolgte wie in Kapitel 6.2.3 beschrieben.

**PVA:** Es wurde wässrige Essigsäurelösung (1 M) als BGE verwendet. Vor dem ersten Gebrauch wurden die Kapillaren mit Wasser (2 min), gefolgt von 10 mM  $H_3PO_4$  (5 min), Wasser (2 min) und BGE (2 min) konditioniert. Alle Flüssigkeiten wurden mit einem Druck von 1 bar injiziert. Zwischen den Messungen wurden die die Kapillaren mit 10 mM  $H_3PO_4$  (30 s), Wasser (1 min) und BGE (2 min) gespült (1 bar Druck). Außerdem wurde ein unterstützender Druck von 10-30 mbar an der CE angelegt.

**LPA:** Es wurde wässrige Essigsäurelösung (2 M) als BGE verwendet. Vor dem ersten Gebrauch wurden die Kapillaren mit Wasser (2 min), gefolgt von 10 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (5 min), Wasser (2 min) und BGE (2 min) konditioniert. Alle Flüssigkeiten wurden mit einem Druck von 1 bar injiziert. Zwischen den Messungen wurden die die Kapillaren mit 10 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (30 s), Wasser (1 min) und BGE (2 min) gespült (1 bar Druck). Außerdem wurde ein unterstützender Druck von 10-30 mbar an der CE angelegt.

Falls nicht anders erwähnt, betrug die Aminosäurekonzentration der Proben 1 mM. Diese wurden hydrodynamisch mit 30 mbar für 10 s injiziert und die Analysen wurden bei 25 °C im Positivmodus (+ 30 kV) durchgeführt. Als *sheath liquid* wurde eine Lösung aus 50 % v/v Isopropanol in Wasser mit 0.05 % Ameisensäure bei einer Flussrate von meist 3  $\mu$ L/min verwendet. Größtenteils betrug die Spannung der externen ESI-Spannungsquelle 3.1 kV.

Der Eingang des Massenspektrometers war grundsätzlich geerdet und es wurde ein minimaler Fluss an *sweep gas* angewendet. Für optimale Elektrospraybedingungen wurde vor jeder Messung die Distanz zwischen Emitterspitze und Massenspektrometer über die (x-y-z)-Bühne variiert und betrug ca. 2 mm. Die massenspektrometrischen Daten wurden im Positivmodus über einen Messbereich von m/z 122-750 und einer Auflösung von 70000 aufgenommen. Zur Erstellung der MS/MS-Spektren der verschiedenen Aminosäuren und Peptide wurden Inklusionslisten mit den jeweiligen exakten Massen angefertigt. Das minimale AGC target zur Aufnahme der MS/MS-Spektren betrug 8.00e3. Dabei wurden die Verbindungen mit einer normalisierten Kollisionsenergie von 30 % fragmentiert und die Spektren mit einer Auflösung von 17500 aufgenommen. Weiterhin wurde ein Isolationsfenster von 0.5 m/z ohne Versatz angewendet. Um einer Kontamination des Massenspektrometers durch Kupfer- oder Eisenionen vorzubeugen, wurde die Massendetektion zeitversetzt von der CE-Messung gestartet.

## 6.2.5. Charakterisierung des Interfaces

Für die Charakterisierung des Interfaces wurden eine wässrige Essigsäurelösung (2 M) als BGE und BFS-Kapillaren einer Länge von 80 cm verwendet. Die Polyimidbeschichtung der Kapillaren wurde am MS-Ende um ca. 2 mm abgebrannt. Die Konditionierung und das Spülen der Kapillaren erfolgte wie in Kapitel 6.2.3 beschrieben. Weiterhin wurde hydrodynamisch mit 30 mbar für 10 s injiziert und die Analysen wurden bei 25 °C im Positivmodus (+ 30 kV) durchgeführt. Als *sheath liquid* wurde eine Lösung aus 50 % v/v Isopropanol in Wasser mit 0.05 % Ameisensäure verwendet.

Der Eingang des Massenspektrometers war grundsätzlich geerdet und es wurde ein minimaler Fluss an *sweep gas* angewendet. Für optimale Elektrospraybedingungen wurde vor jeder Messung die Distanz zwischen Emitterspitze und Massenspektrometer über die (x-y-z)-Bühne variiert und betrug ca. 2 mm. Die massenspektrometrischen Daten wurden im Positivmodus über einen Messbereich von m/z 450-1300 und einer Auflösung von 70000 aufgenommen.

## 6.2.6. Entfernung von Kupfer

Vor der Verwendung des Ionentauschers Amberlite IRC-748 (Partikelgröße 0.5-0.65 mm, Na<sup>+</sup>-Form) wurde dieser mit Wasser, 2 M Salzsäure und anschließend wieder Wasser gewaschen (bis pH-neutral) und in die H<sup>+</sup>-Form überführt. Um die Kupferionen aus der Reaktionsmischung vollständig zu entfernen, wurde die Probe pro 2.2 mg Kupfer zwei Mal für 2 h mit 30 mg Ionentauscher bei Raumtemperatur gerührt.

## 6.3. Kupferkatalysierte Peptidkondensation

## 6.3.1. Herstellung der komplexen Mischungen

Die jeweiligen Aminosäuren wurden in äquimolaren Mengen zusammengegeben und in der Planetenkugelmühle in 20 mL Edelstahl-Mahlbechern mit zehn 10 mm Edelstahl-Kugeln bei 400 rpm für 10 min homogenisiert.

**Unpolare Mischung:** L-Alanin (267 mg, 3.00 mmol, 1.00 Äq.), L-Isoleucin (394 mg, 3.00 mmol, 1.00 Äq.), L-Leucin (394 mg, 3.00 mmol, 1.00 Äq.), L-Methionin (448 mg, 3.00 mmol, 1.00 Äq.), L-Phenylalanin (496 mg, 3.00 mmol, 1.00 Äq.), L-Prolin (345 mg, 3.00 mmol, 1.00 Äq.), L-Tryptophan (616 mg, 3.00 mmol, 1.00 Äq) und L-Valin (351 mg, 3.00 mmol, 1.00 Äq.).

**Polare Mischung:** L-Asparagin (529 mg, 4.00 mmol, 1.00 Äq.), L-Cystein (485 mg, 4.00 mmol, 1.00 Äq.), L-Glutamin (585 mg, 4.00 mmol, 1.00 Äq.), Glycin (300 mg, 4.00 mmol, 1.00 Äq.), L-Serin (420 mg, 4.00 mmol, 1.00 Äq.), L-Threonin (477 mg, 4.00 mmol, 1.00 Äq.) und L-Tyrosin (725 mg, 4.00 mmol, 1.00 Äq.).

**Basische Mischung:** L-Arginin (1.31 g, 7.50 mmol, 1.00 Äq.), L-Histidin (1.16 g, 7.50 mmol, 1.00 Äq.) und L-Lysin (1.10 g, 7.50 mmol, 1.00 Äq.).

**Saure Mischung:** L-Asparaginsäure (1.66 g, 12.5 mmol, 1.00 Äq.) und L-Glutaminsäure (1.84 g, 12.5 mmol, 1.00 Äq.).

**Präbiotische Mischung:** L-Alanin (267 mg, 3.00 mmol, 1.00 Äq.), L-Asparaginsäure (399 mg, 3.00 mmol, 1.00 Äq.) und L-Glutaminsäure (441 mg, 3.00 mmol, 1.00 Äq.) Glycin (225 mg, 3.00 mmol, 1.00 Äq.), L-Isoleucin (394 mg, 3.00 mmol, 1.00 Äq.), L-Leucin (394 mg, 3.00 mmol, 1.00 Äq.), L-Prolin (345 mg, 3.00 mmol, 1.00 Äq.), L-Serin (315 mg, 3.00 mmol, 1.00 Äq.), L-Threonin (357 mg, 3.00 mmol, 1.00 Äq.) und L-Valin (351 mg, 3.00 mmol, 1.00 Äq.).

**Gesamtmischung:** L-Alanin (116 mg, 1.30 mmol, 1.00 Äq.), L-Arginin (227 mg, 1.30 mmol, 1.00 Äq.), L-Asparagin (172 mg, 1.30 mmol, 1.00 Äq.), L-Asparaginsäure (173 mg, 1.30 mmol, 1.00 Äq.), L-Cystein (158 mg, 1.30 mmol, 1.00 Äq.), L-Glutamin (190 mg, 1.30 mmol, 1.00 Äq.), L-Glutaminsäure (191 mg, 1.30 mmol, 1.00 Äq.), Glycin (97.6 mg, 1.30 mmol, 1.00 Äq.), L-Histidin (202 mg, 1.30 mmol, 1.00 Äq.), L-Isoleucin (171 mg, 1.30 mmol, 1.00 Äq.), L-Leucin (171 mg, 1.30 mmol, 1.00 Äq.), L-Lysin (190 mg, 1.30 mmol, 1.00 Äq.), L-Methionin (194 mg, 1.30 mmol, 1.00 Äq.), L-Phenylalanin (215 mg, 1.30 mmol, 1.00 Äq.), L-Methionin (194 mg, 1.30 mmol, 1.00 Äq.), L-Phenylalanin (215 mg, 1.30 mmol, 1.00 Äq.), L-Methionin (194 mg, 1.30 mmol, 1.00 Äq.), L-Phenylalanin (215 mg, 1.30 mmol, 1.00 Äq.), L-Methionin (194 mg, 1.30 mmol, 1.00 Äq.), L-Phenylalanin (215 mg, 1.30 mmol, 1.00 Äq.), L-Methionin (194 mg, 1.30 mmol, 1.00 Äq.), L-Phenylalanin (215 mg, 1.30 mmol, 1.00 Äq.), L-Methionin (194 mg, 1.30 mmol, 1.00 Äq.), L-Phenylalanin (215 mg, 1.30 mmol, 1.00 Äq.), L-Phenylalanin (215 mg, 1.30 mmol, 1.00 Äq.), L-Methionin (194 mg, 1.30 mmol, 1.00 Äq.), L-Phenylalanin (215 mg, 1.30 mmol, 1.00 Mg), L-Phenylalanin (215 mg, 1.30 mmol, 1.00 Mg), L-Phenylalanin (215 mg), L-Phenylalanin (2

1.30 mmol, 1.00 Äq.), L-Prolin (150 mg, 1.30 mmol, 1.00 Äq.), L-Serin (137 mg, 1.30 mmol, 1.00 Äq.), L-Threonin (155 mg, 1.30 mmol, 1.00 Äq.), L-Tryptophan (267 mg, 1.30 mmol, 1.00 Äq.), L-Tyrosin (236 mg, 1.30 mmol, 1.00 Äq.) und L-Valin (152 mg, 1.30 mmol, 1.00 Äq.).

#### 6.3.2. Peptidkondensationen bei konstantem Reaktionsvolumen



Die Peptidkondensationen bei konstanten Reaktionsvolumina wurden in 4 mL Schraubdeckelgläsern aus Glas mit Magnetrührer durchgeführt. Dafür wurde die entsprechende Aminosäure(mischung) (1.20 mmol insgesamt, 1.00 Äq.) gegebenenfalls zusammen mit Harnstoff (72.1 mg, 1.20 mmol, 1.00 Äq.) und/oder einer zusätzlichen katalytischen Aminosäure (1/N Äq.) in das Reaktionsgefäß eingewogen und mit wässrigen Stammlösungen von NaCl (2.64 mL, 5.00 M) und CuCl<sub>2</sub> (360 µL, 3.33 M) aufgefüllt (*N* entspricht der Anzahl verschiedener Aminosäuren der jeweiligen Mischung). Die Vials wurden mit Parafilm versiegelt, verschlossen und in einen Heizblock bei 85 °C überführt. Falls nicht anders erwähnt, wurden die Proben nach 7 und 21 d entnommen und vor der Analyse durch einen Spritzenfilter (Celluloseacetat) filtriert. Falls nicht anders erwähnt wurden die Ansätze mittels CE-MS analysiert (siehe Kapitel 6.2.4). Alle Experimente wurden zwei Mal wiederholt und jeweils zwei Mal analysiert.

#### 6.3.3. Verdunstungsexperimente



Für die Reaktionsmischung wurde die Aminosäure L-Val oder L-Ala (40 mM) zusammen mit der katalytisch aktiven Aminosäure/Peptid (Gly/Gly<sub>2</sub>/L- His; 5 oder 20 mM) in einer wässrigen Lösung aus CuCl<sub>2</sub> (40 mM) und NaCl (500 mM) gelöst. 1 mL dieser Lösung wurde in ein 1 mL GC-Vial mit Magnetrührer überführt und in einem Heizblock bei 85 °C den Verdunstungszyklen ausgesetzt (Abbildung 6.3). Falls nicht anders erwähnt, wurden die Proben nach 4, 7, 12 und 14 d entnommen und vor der Analyse durch einen Spritzenfilter (Celluloseacetat) filtriert. Falls nicht anders erwähnt wurden die Ansätze mittels CE analysiert (siehe Kapitel 6.2.3). Jedes Experiment wurde zwei Mal wiederholt.



Abbildung 6.3: Zeitliche Abfolge der Nass-Trocken-Zyklen.

## 6.4. Eisenkatalysierte Peptidkondensation

## 6.4.1. Allgemeine Vorgehensweise



Die eisenkatalysierten Peptidkondensationen wurden bei konstanten Reaktionsvolumina in 4 mL Schraubdeckelgläsern aus Glas durchgeführt. Die Reaktionsbedingungen wurden im Verlauf der Arbeit variiert, die folgende Vorschrift gilt für die optimierten Reaktionsbedingungen. Dafür wurde eine Aminosäuremischung aus äquimolaren Anteilen von Ala, Gly und Gly<sub>2</sub> (800 mg, 8.10 mmol insgesamt, 1.00 Äq.) zusammen mit Eisenpulver (30.2 mg, 0.54 mmol, 0.07 Äq.) in das Reaktionsgefäß eingewogen. Daraufhin wurden Essigsäure (61.8  $\mu$ L, 1.08 mmol, 0.14 Äq.) und H<sub>2</sub>O (973  $\mu$ L, 54.0 mmol, 6.67 Äq.) hinzugefügt. Die Vials wurden mit Parafilm versiegelt, verschlossen und in einen Heizblock bei 70 °C auf einer Schüttelplatte überführt. Falls nicht anders erwähnt, wurden die Proben nach 1, 3, 7 und 21 d entnommen. Dazu wurde zu der Reaktionsmischung 10 mL H<sub>2</sub>O hinzugefügt und 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Die Mischung wurde daraufhin durch einen Spritzenfilter (Celluloseacetat) filtriert und für die Analyse mittels CE-MS und LPA-beschichteten Kapillaren (siehe Kapitel 6.2.4) auf eine Aminosäurekonzentration von 5 mM verdünnt. Alle Experimente wurden zwei Mal wiederholt und jeweils zwei Mal analysiert.

## 6.4.2. Quantifizierung

Die linearen Kalibrierfunktionen von AlaGly+GlyAla, Ala<sub>3</sub> und Gly<sub>3</sub> wurden drei Mal mittels CE-MS und LPA-beschichteter Kapillaren aufgenommen (siehe Kapitel 6.2.4). Dabei wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen der jeweiligen Peakflächen bestimmt und die Kalibriergerade mit OriginPro 2018G erstellt (Abbildungen 6.4-6.6). Die Auswertung der entsprechenden Peakflächen aus den Peptidkondensationen und Bestimmung der Ausbeuten sind in den Tabellen 6.2-6.5 dargestellt.



**Abbildung 6.4:** Kalibriergerade der Dipeptide AlaGly + GlyAla (m = 1.72238E7 ± 1.13257E6, R<sup>2</sup> = 0.99143) nach elektrophoretischer Trennung einer Standardmischung bestehend aus AlaGly, GlyAla, Ala<sub>3</sub> und Gly<sub>3</sub>. LPA-Kapillare, 80 cm; BGE, Essigsäure (2 M); *sheath liquid*, 50 % v/v wässrige Isopropanollösung mit 0.05 % Ameisensäure; *sheath*-Flussrate 3.0  $\mu$ L/min; Probe mit 30 mbar für 10 s injiziert; CE-Inlet, 30 kV; Emitter, 3.1 kV; MS-Einlasskapillare, 140 °C; Messbereich: *m/z* 122-750.



**Abbildung 6.5:** Kalibriergerade des Tripeptids Ala<sub>3</sub> (m = 2.43208E7 ± 815609.85093, R<sup>2</sup> = 0.99776) nach elektrophoretischer Trennung einer Standardmischung bestehend aus AlaGly, GlyAla, Ala<sub>3</sub> und Gly<sub>3</sub>. LPA-Kapillare, 80 cm; BGE, Essigsäure (2 M); *sheath liquid*, 50 % v/v wässrige Isopropanollösung mit 0.05 % Ameisensäure; *sheath*-Flussrate 3.0  $\mu$ L/min; Probe mit 30 mbar für 10 s injiziert; CE-Inlet, 30 kV; Emitter, 3.1 kV; MS-Einlasskapillare, 140 °C; Messbereich: *m/z* 122-750.



**Abbildung 6.6:** Kalibriergerade des Tripeptids Gly<sub>3</sub> (m = 1.71833E7 ± 739709.80568, R<sup>2</sup> = 0.99631) nach elektrophoretischer Trennung einer Standardmischung bestehend aus AlaGly, GlyAla, Ala<sub>3</sub> und Gly<sub>3</sub>. LPA-Kapillare, 80 cm; BGE, Essigsäure (2 M); *sheath liquid*, 50 % v/v wässrige Isopropanollösung mit 0.05 % Ameisensäure; *sheath*-Flussrate 3.0  $\mu$ L/min; Probe mit 30 mbar für 10 s injiziert; CE-Inlet, 30 kV; Emitter, 3.1 kV; MS-Einlasskapillare, 140 °C; Messbereich: *m/z* 122-750.

Тая	Integral	CProbevial	CReaktionsgefäß	Ausbeute
Tag	(counts·min)	( <b>µM</b> )	( <b>mM</b> )	(%)
1	$3.49 \cdot 10^{6}$	0.20	0.11	0.01
3	$1.56 \cdot 10^7$	0.90	0.47	0.04
7	$4.29 \cdot 10^7$	2.49	1.31	$0.1 \pm 0.01$
21	$1.25 \cdot 10^8$	7.27	3.81	$0.29 \pm 0.04$

**Tabelle 6.2:** Peakflächen und daraus resultierende Konzentrationen in Probe- und Reaktionsgefäß und Ausbeuten der Peptide AlaGly/GlyAla aus der eisenkatalysierten Peptidkondensation in Abhängigkeit von der Reaktionszeit.

**Tabelle 6.3:** Peakflächen und daraus resultierende Konzentrationen in Probe- und Reaktionsgefäß und Ausbeuten des Tripeptids Gly<sub>3</sub> aus der eisenkatalysierten Peptidkondensation in Abhängigkeit von der Reaktionszeit. Für die Ausbeutebestimmung wurde angenommen, dass Gly<sub>3</sub> aus jeweils einem Molekül Gly und Gly<sub>2</sub> (und nicht drei Molekülen Gly) entsteht.

Тад	Integral	CProbevial	CReaktionsgefäß	Ausbeute
Tag	(counts·min)	( <b>µM</b> )	( <b>mM</b> )	(%)
1	$1.17 \cdot 10^8$	6.80	3.60	$0.3 \pm 0.1$
3	$3.14 \cdot 10^8$	18.26	9.60	$0.7 \pm 0.1$
7	$7.98 \cdot 10^8$	46.42	24.4	$1.9 \pm 0.1$
21	$1.73 \cdot 10^{9}$	100.86	52.9	$4.1 \pm 0.4$

Тад	Integral	CProbevial	CReaktionsgefäß	Ausbeute	
Tag	(counts·min)	( <b>µM</b> )	( <b>mM</b> )	(%)	
7	$4.95 \cdot 10^{7}$	2.87	0.90	$0.12 \pm 0.01$	
14	$1.17 \cdot 10^{8}$	6.77	2.13	$0.27 \pm 0.02$	
21	$1.98 \cdot 10^{8}$	11.49	3.61	$0.46 \pm 0.17$	

**Tabelle 6.4:** Peakflächen und daraus resultierende Konzentrationen in Probe- und Reaktionsgefäß und Ausbeuten der Peptide AlaGly/GlyAla aus der eisenkatalysierten Peptidkondensation mit zusätzlichem Gly<sub>3</sub> und Ala<sub>2</sub> als Reaktanten in Abhängigkeit von der Reaktionszeit.

**Tabelle 6.5:** Peakflächen und daraus resultierende Konzentrationen in Probe- und Reaktionsgefäß und Ausbeuten des Tripeptids Ala<sub>3</sub> aus der eisenkatalysierten Peptidkondensation mit zusätzlichem Gly<sub>3</sub> und Ala<sub>2</sub> als Reaktanten in Abhängigkeit von der Reaktionszeit. Für die Ausbeutebestimmung wurde angenommen, dass Ala<sub>3</sub> aus jeweils einem Molekül Ala und Ala<sub>2</sub> (und nicht drei Molekülen Ala) entsteht.

Tag	Integral	CProbevial	CReaktionsgefäß	Ausbeute
Tag	(counts·min)	( <b>µM</b> )	( <b>mM</b> )	(%)
7	$7.24 \cdot 10^{7}$	2.98	0.94	$0.12 \pm 0.01$
14	$8.92 \cdot 10^{7}$	3.67	1.15	$0.15 \pm 0.02$
21	$1.05 \cdot 10^{8}$	4.32	1.36	$0.17 \pm 0.01$

# 7. Anhang

	Produkt	Tag 7	Tag 14	Tag 21	Tag 28
c(Val) = 40  mM,	Val <sub>2</sub>				
$c(CuCl_2) = 40 \text{ mM},$	ValGly				
c(Gly) = 20  mM,	GlyVal				
c(NaCl) = 500  mM	Gly <sub>2</sub>				
c(Val) = 100  mM	Val <sub>2</sub>				
$c(CuCl_2) = 100 \text{ mM},$	ValGly				
c(Gly) = 50  mM,	GlyVal				
c(NaCl) = 1.3 M	Gly <sub>2</sub>				
c(Val) = 250  mM.	Val <sub>2</sub>			×	×
$c(CuCl_2) = 250 \text{ mM},$	ValGly				
c(Gly) = 125  mM,	GlyVal				
c(NaCl) = 3.1 M	Gly <sub>2</sub>	×	×	×	×
c(Val) = 400  mM.	Val <sub>2</sub>		×	×	×
$c(CuCl_2) = 400 \text{ mM},$	ValGly				
c(Gly) = 200  mM,	GlyVal				
c(NaCl) = 5 M	Gly <sub>2</sub>	×	×	×	×

**Tabelle 7.1**: Peptidkondensation von Val und Gly unter SIPF-Bedingungen und unterschiedlichen Eduktkonzentrationenin Abhängigkeit von der Reaktionszeit. × symbolisiert die erfolgreiche Detektion des entsprechenden Peptids.



#### 7.1 Dipeptidproduktspektren

Abbildung 7.1: Detektierte Dipeptide der Peptidkondensation unter SIPF-Bedingungen ausgehend von der unpolaren Aminosäuremischung mit Gly ( = bestätigt durch MS/MS, = Spuren, = nicht detektiert).



#### **C-Terminus**

Abbildung 7.2: Detektierte Dipeptide der Peptidkondensation unter SIPF-Bedingungen ausgehend von der unpolaren Aminosäuremischung mit His ( = bestätigt durch MS/MS, = Spuren, = nicht detektiert, = Migrationszeit außerhalb der Messzeit).



Abbildung 7.3: Detektierte Dipeptide der Peptidkondensation unter SIPF-Bedingungen ausgehend von der unpolaren Aminosäuremischung mit Asp ( = bestätigt durch MS/MS, = Spuren, = nicht detektiert).



#### **C-Terminus**

Abbildung 7.4: Detektierte Dipeptide der Peptidkondensation unter SIPF-Bedingungen ergänzt durch Harnstoff ausgehend von der unpolaren Aminosäuremischung mit Gly ( = bestätigt durch MS/MS, = Spuren, = nicht detektiert).



Abbildung 7.5: Detektierte Dipeptide der Peptidkondensation unter SIPF-Bedingungen ergänzt durch Harnstoff ausgehend von der unpolaren Aminosäuremischung mit His (= bestätigt durch MS/MS, = Spuren, = nicht detektiert, = Migrationszeit außerhalb der Messzeit).



#### **C-Terminus**

Abbildung 7.6: Detektierte Dipeptide der Peptidkondensation unter SIPF-Bedingungen ergänzt durch Harnstoff ausgehend von der unpolaren Aminosäuremischung mit Asp ( = bestätigt durch MS/MS, = Spuren, = nicht detektiert).



 Y
 Abbildung 7.7: Detektierte Dipeptide der Peptidkondensation unter SIPF-Bedingungen ausgehend von der polaren Ami





Abbildung 7.8: Detektierte Dipeptide der Peptidkondensation unter SIPF-Bedingungen ergänzt durch Harnstoff ausgehend von der polaren Aminosäuremischung ( = bestätigt durch MS/MS, = Spuren, = nicht detektiert).

#### **C-Terminus**



Abbildung 7.9: Detektierte Dipeptide der Peptidkondensation unter SIPF-Bedingungen ergänzt durch Harnstoff ausgehend von der polaren Aminosäuremischung mit His ( = bestätigt durch MS/MS, = Spuren, = nicht detektiert, = Migrationszeit außerhalb der Messzeit).



**C-Terminus** 

Abbildung 7.10: Detektierte Dipeptide der Peptidkondensation unter SIPF-Bedingungen ergänzt durch Harnstoff ausgehend von der polaren Aminosäuremischung mit Asp ( = bestätigt durch MS/MS, = Spuren, = nicht detektiert).



C-Terminus

Abbildung 7.11: Detektierte Dipeptide der Peptidkondensation unter SIPF-Bedingungen ergänzt durch Harnstoff ausgehend von der Gesamtaminosäuremischung nach 21 d ( = bestätigt durch MS/MS, = Spuren, = nicht detektiert).







#### **C-Terminus**

Abbildung 7.13: Detektierte Dipeptide der kupferkatalysierten Peptidkondensation in SO<sub>2</sub> ausgehend von der polaren Aminosäuremischung ( $\blacksquare$  = bestätigt durch MS/MS,  $\blacksquare$  = Spuren,  $\square$  = nicht detektiert,  $\bigotimes$  = Cystinpeptide bestätigt durch MS/MS,  $\boxtimes$  = Spuren an Cystinpeptiden).



Abbildung 7.14: Detektierte Dipeptide der kupferkatalysierten Peptidkondensation in SO<sub>2</sub> ausgehend von der basischen Aminosäuremischung ( = bestätigt durch MS/MS, = Spuren, = nicht detektiert).

#### **C-Terminus**



Abbildung 7.15: Detektierte Dipeptide der kupferkatalysierten Peptidkondensation in SO<sub>2</sub> ausgehend von der sauren Aminosäuremischung ( = bestätigt durch MS/MS, = Spuren, = nicht detektiert).



Abbildung 7.16: Detektierte Dipeptide der kupferkatalysierten Peptidkondensation in SO<sub>2</sub> ausgehend von der präbiotischen Aminosäuremischung ( = bestätigt durch MS/MS, = Spuren, = nicht detektiert).



C-Terminus

Abbildung 7.17: Detektierte Dipeptide der kupferkatalysierten Peptidkondensation in SO<sub>2</sub> nach 7 d ausgehend von der gesamten Aminosäuremischung ( $\square$  = bestätigt durch MS/MS,  $\square$  = Spuren,  $\square$  = nicht detektiert).



**Abbildung 7.18:** Detektierte Dipeptide der kupferkatalysierten Peptidkondensation in SO<sub>2</sub> nach 21 d ausgehend von der gesamten Aminosäuremischung ( $\square$  = bestätigt durch MS/MS,  $\square$  = Spuren,  $\square$  = nicht detektiert,  $\square$  = Spuren an Cystinpeptiden).


C-Terminus





C-Terminus

Abbildung 7.20: Detektierte Dipeptide der Peptidkondensation unter SIPF-Bedingungen ergänzt durch Harnstoff ausgehend von der 50 mM Gesamtaminosäuremischung nach 7 d ( = bestätigt durch MS/MS, = Spuren, = nicht detektiert).



C-Terminus

Abbildung 7.21: Detektierte Dipeptide der Peptidkondensation unter SIPF-Bedingungen ergänzt durch Harnstoff ausgehend von der 50 mM Gesamtaminosäuremischung nach 21 d ( = bestätigt durch MS/MS, = Spuren, = nicht detektiert).

## 8. Danksagung

Viele Personen haben meine Promotionszeit maßgeblich beeinflusst, wofür ich sehr dankbar bin:

Zuallererst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. *Oliver Trapp* bedanken, der mich – nach einem Triathlon zur Qualifikation – in seinen Arbeitskreis aufgenommen und mir die Bearbeitung der interessanten Fragestellungen ermöglicht hat. Vielen Dank für den kreativen Austausch und vor allem für deine positive und inspirierende Persönlichkeit, die mich sehr motiviert haben.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei Prof. Dr. *Paul Knochel* für die Übernahme des Zweitgutachtens, sowie bei Prof. Dr. *Gerhard Winter*, Dr. *Sabine Schneider*, Prof. Dr. *Philip Tinnefeld* und Prof. Dr. *Christian Ochsenfeld* für die Teilnahme an meiner Prüfungskommission.

Weiterhin gilt mein Dank den Mitarbeitern der Ludwig-Maximilians-Universität und ganz besonders den Angestellten unseres Arbeitskreises und der Feinmechanik, die neben vielen kleineren Arbeiten dem entwickelten Interface ein stabiles und professionelles Fundament konstruierten.

Ein ganz großer Dank geht außerdem an *Carrie*, für ihre unermüdliche Unterstützung bei der Instandhaltung der Orbitrap und ihr energiegeladenes, ständig gut gelauntes Naturell.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei meinen Forschungspraktikanten *Arnelle, Sebastian* und *Christoph* bedanken. Dafür, dass sie sich von meinem Thema begeistern ließen und mich mit viel Fleiß, Hingabe und Motivation im Labor unterstützt haben.

Vielen Dank *Alex, Anna, Papa* und *Sabrina* für das sorgfältige Korrekturlesen dieser Arbeit. Wie versprochen ist ein extra großer Anteil des Freibiers für euch reserviert!

Vielen Dank an *Conny*, *Maren* und *Alex* für die motivierende Zusammenarbeit und die unterhaltsamen Konferenzen. Außerdem ein großes Dankeschön an das komplette Labor F3.017 – *Flo, Jenny, Max, Nathalie* und *Anna*. Dadurch, dass ihr mir immer eine lebendige Arbeitsatmosphäre inklusive wohl sortierter, abwechslungsreicher und geschmackvoller Musikauswahl in Aussicht gestellt habt, war das morgendliche Aufstehen nie schwerer als es das für mich immer ist. Meine Promotion war für mich eine tolle, prägende, aber vor allem sehr unterhaltsame Zeit. Dementsprechend möchte ich mich besonders bei allen ehemaligen und aktuellen AK-Mitgliedern bedanken, die mich auf diesem Weg begleitet haben. Darüber hinaus geht ein riesiges Dankeschön an Anna. Du hast mich von Anfang an auf allen Höhen und Tiefen dieser Promotion begleitet, hattest immer ein offenes Ohr, warst für jegliche Unternehmungen zu haben und ein maßgeblicher Grund für meine gute Laune im Labor. Ebenso an Team M<sup>2</sup>: Ohne euch und die vielen packenden Duelle wäre mein Einstieg in den AK nie so leicht gewesen - wir wissen alle wer die Sieger der Herzen sind! An Max Leopold, für deine Ausgeglichenheit, deinen Humor und die eindrucksvolle Palette an mustergültigen Dad-Jokes. An Max Siebert, für viele sportliche, musikalische und sonstige Eskapaden, die motivierenden, inspirierenden und immer ehrlichen Diskussionen, und nicht zuletzt für deine extrem effektiven Wingman-Fähigkeiten. An Jan Felix, für wilde kulinarische Abenteuer, aber vor allem für deine beeindruckend offene und positive Art und dafür, dass mir dein Lachen immer sicher war. An Alex: Du warst eine ständig geduldige Anlaufstelle für wertvolle und produktive Diskussionen und hattest immer eine Lösung parat. Ich durfte sehr viel von dir lernen und ohne dich hätte ich wohl nicht meine Passion für die Analytik entdeckt. Vielen Dank Sassi für unterhaltsame Zugfahrten und Buchvorschläge und Jenny für deine lebenslustige Art und die geteilte Leidenschaft für große Löffel und Septen. Außerdem ein besonderer Dank an Max Bechtel, für den perfekten Ausgleich zum Laboralltag, viele fordernde und befreiende Wandertouren mit ehrlichen und persönlichen Konversationen. Ich hoffe, dass wir auch in Zukunft noch genug Zeit finden, um deine Wand mit weiteren Abenteuern zu füllen.

Außerdem darf auch der Ausgleich durch die Whiskyrunde – *Max, Max, Jan Felix* – und den jährlichen Leistungsnachweis inklusive der zugehörigen Vorbereitung – *Alex, Jan Felix, Max* – nicht unerwähnt bleiben. Auch hier hoffe ich, dass noch viele gemeinsame Events mit Schmerz, Tränen, Testosteron, Endorphinen, Genuss und Enthusiasmus in der Zukunft kommen werden.

Mein größter Dank gilt *Sabrina*: Du bringst mir unablässig deine bedingungslose Unterstützung und dein Verständnis entgegen und selbst in den chaotischsten Phasen zeigst du mir, was wirklich wichtig ist. Du bist immer da, wenn ich dich brauche und ich bin dankbar für jeden strahlenden Moment mit dir!

Zuletzt möchte ich mich zutiefst bei meiner Familie – *Mama, Papa, Carla, Chris* und *Freddy* – bedanken, für den uneingeschränkten Rückhalt, das Interesse an meiner Arbeit, die ständige Unterstützung und für die Bereitschaft, jegliche noch so kleine Errungenschaft ausgiebig zu feiern. Vielen Dank!

## 9. Literaturverzeichnis

- [1] G. F. Joyce, The RNA World: Life before DNA and Protein in *Extraterrestrials: Where Are They?* (Eds.: B. Zuckerman, M. H. Hart), Cambridge University Press, Cambridge, **1995**, p. 139-151.
- [2] C. F. Chyba, G. D. McDonald, Annu. Rev. Earth Planet. Sci. 1995, 23, 215-249.
- [3] N. Lahav, *Biogenesis Theories of Life's Origin*, Oxford University Press USA, New York, **1999**.
- [4] G. B. Dalrymple, *Geological Society, London, Special Publications* **2001**, *190*, 205-221.
- [5] W. F. Bottke, D. Vokrouhlický, S. Marchi, T. Swindle, E. R. D. Scott, J. R. Weirich, H. Levison, *Science* **2015**, *348*, 321-323.
- [6] D. Herwartz, A. Pack, B. Friedrichs, A. Bischoff, *Science* **2014**, *344*, 1146-1150.
- [7] S. A. Wilde, J. W. Valley, W. H. Peck, C. M. Graham, *Nature* **2001**, *409*, 175-178.
- [8] S. J. Mojzsis, T. M. Harrison, R. T. Pidgeon, *Nature* **2001**, *409*, 178-181.
- [9] E. G. Nisbet, N. H. Sleep, *Nature* **2001**, *409*, 1083-1091.
- [10] A. C. Allwood, M. R. Walter, B. S. Kamber, C. P. Marshall, I. W. Burch, *Nature* **2006**, *441*, 714-718.
- [11] M. R. Walter, R. Buick, J. S. R. Dunlop, *Nature* **1980**, 284, 443-445.
- [12] D. Liesemer, *MaxPlanckForschung* **2015**, *3*, 70-77.
- [13] N. H. Sleep, Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2010, 2, a002527.
- [14] D. Trail, E. B. Watson, N. D. Tailby, *Nature* **2011**, *480*, 79-82.
- [15] K. Zahnle, N. Arndt, C. Cockell, A. Halliday, E. Nisbet, F. Selsis, N. H. Sleep, *Space Sci. Rev.* 2007, 129, 35-78.
- [16] J. Kasting, Science **1993**, 259, 920-926.
- [17] F. Tian, O. B. Toon, A. A. Pavlov, H. De Sterck, *Science* 2005, *308*, 1014-1017.
- [18] K. Zahnle, L. Schaefer, B. Fegley, Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2010, 2, a004895.
- [19] T. W. Lyons, C. T. Reinhard, N. J. Planavsky, *Nature* **2014**, *506*, 307-315.
- [20] C. Sagan, G. Mullen, *Science* **1972**, *177*, 52-56.
- [21] J. L. Bada, C. Bigham, S. L. Miller, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1994**, *91*, 1248-1250.
- [22] T. M. Harrison, Annu. Rev. Earth Planet. Sci. 2009, 37, 479-505.
- [23] E.-I. Ochiai, Orig. Life Evol. Biosph. **1978**, 9, 81-91.
- [24] H. D. Holland, Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 2006, 361, 903-915.
- [25] G. H. Shaw, *Geochemistry* **2008**, *68*, 235-264.
- [26] J. H. Carver, *Nature* **1981**, *292*, 136-138.
- [27] H. Ohmoto, *Geology* **1996**, *24*, 1135-1138.
- [28] J. L. Eigenbrode, K. H. Freeman, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2006, 103, 15759-15764.
- [29] R. M. Hazen, Am. J. Sci. 2013, 313, 807-843.
- [30] S. Pizzarello, G. W. Cooper, G. J. Flynn, The Nature and Distribution of the Organic Material in Carbonaceous Chondrites and Interplanetary Dust Particles in *Meteorites and the Early Solar System II* (Eds.: D. S. Lauretta, H. Y. McSween Jr.), The University of Arizona Press, **2006**, p. 625-651.
- [31] A. Brack, Extraterrestrial Delivery of Organic Compounds in *Encyclopedia of Astrobiology* (Eds.: R. Amils, M. Gargaud, J. Cernicharo Quintanilla, H. J. Cleaves, W. M. Irvine, D. Pinti, M. Viso), Springer, Berlin, Heidelberg, **2014**, p. 1-8.
- [32] A. I. Oparin, *The origin of life on the earth*, Oliver & Boyd, Edinburgh & London, **1957**.
- [33] J. W. Morse, F. T. Mackenzie, Aquat. Geochem. 1998, 4, 301-319.
- [34] J. Peretó, J. L. Bada, A. Lazcano, Orig. Life Evol. Biosph. 2009, 39, 395-406.
- [35] B. Burcar, M. Pasek, M. Gull, B. J. Cafferty, F. Velasco, N. V. Hud, C. Menor-Salván, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 13249-13253.
- [36] W. Martin, J. Baross, D. Kelley, M. J. Russell, Nat. Rev. Microbiol. 2008, 6, 805-814.
- [37] A. Koschinsky, D. Garbe-Schönberg, S. Sander, K. Schmidt, H.-H. Gennerich, H. Strauss, *Geology* **2008**, *36*, 615-618.

- [38] Deborah S. Kelley, a. John A. Baross, J. R. Delaney, Annu. Rev. Earth Planet. Sci. 2002, 30, 385-491.
- [39] K. L. Von Damm, M. D. Lilley, W. C. Shanks, M. Brockington, A. M. Bray, K. M. O'Grady, E. Olson, A. Graham, G. Proskurowski, *Earth Planet. Sci. Lett.* 2003, 206, 365-378.
- [40] G. Proskurowski, M. D. Lilley, J. S. Seewald, G. L. Früh-Green, E. J. Olson, J. E. Lupton, S. P. Sylva, D. S. Kelley, *Science* 2008, *319*, 604-607.
- [41] V. Sojo, B. Herschy, A. Whicher, E. Camprubí, N. Lane, Astrobiology 2016, 16, 181-197.
- [42] Z. Minic, *Symbiosis* **2009**, *47*, 121-132.
- [43] G. Wächtershäuser, *Syst. Appl. Microbiol.* **1988**, *10*, 207-210.
- [44] G. Wächtershäuser, *Microbiol. Rev.* **1988**, *52*, 452-484.
- [45] G. Wächtershäuser, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1990, 87, 200-204.
- [46] G. Wächtershäuser, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **1992**, *58*, 85-201.
- [47] C. de Duve, S. L. Miller, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1991**, 88, 10014-10017.
- [48] A. D. Keefe, S. L. Miller, G. McDonald, J. Bada, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1995**, *92*, 11904-11906.
- [49] T. A. Jakschitz, B. M. Rode, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 5484-5489.
- [50] M. P. Robertson, S. L. Miller, *Nature* **1995**, *375*, 772-774.
- [51] B. C. Clark, Orig. Life Evol. Biosph. 1988, 18, 209-238.
- [52] B. C. Clark, V. M. Kolb, *Life* **2018**, *8*, 12.
- [53] V. R. Oberbeck, H. Aggarwal, Orig. Life Evol. Biosph. 1991, 21, 317-338.
- [54] N. Lahav, D. White, S. Chang, *Science* **1978**, *201*, 67-69.
- [55] S. Becker, C. Schneider, H. Okamura, A. Crisp, T. Amatov, M. Dejmek, T. Carell, *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 163.
- [56] R. Lohrmann, L. E. Orgel, *Science* **1971**, *171*, 490-494.
- [57] C. Bolm, J. G. Hernandez, *ChemSusChem* **2018**, *11*, 1410-1420.
- [58] S. Lamour, S. Pallmann, M. Haas, O. Trapp, *Life* **2019**, *9*, 52.
- [59] M. Haas, S. Lamour, S. B. Christ, O. Trapp, Commun. Chem. 2020, 3, 140.
- [60] R. Saladino, C. Crestini, S. Pino, G. Costanzo, E. Di Mauro, *Phys. Life Rev.* **2012**, *9*, 84-104.
- [61] J. E. Šponer, J. Šponer, O. Nováková, V. Brabec, O. Šedo, Z. Zdráhal, G. Costanzo, S. Pino, R. Saladino, E. Di Mauro, *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 3572-3586.
- [62] C. Menor-Salván, M. R. Marín-Yaseli, *Chem. Soc. Rev.* 2012, 41, 5404-5415.
- [63] M. Gull, M. Zhou, F. M. Fernández, M. A. Pasek, J. Mol. Evol. 2014, 78, 109-117.
- [64] C. Huber, W. Eisenreich, G. Wächtershäuser, *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 1069-1071.
- [65] Y. Yamagata, H. Watanabe, M. Saitoh, T. Namba, *Nature* 1991, 352, 516-519.
- [66] W. F. Giggenbach, Chemical Composition of Volcanic Gases in *Monitoring and Mitigation of Volcano Hazards* (Eds.: R. Scarpa, R. I. Tilling), Springer, Berlin, Heidelberg, **1996**, p. 221-256.
- [67] G. Montegrossi, F. Tassi, O. Vaselli, A. Buccianti, K. Garofalo, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 3709-3715.
- [68] F. W. Bergstrom, J. Phys. Chem. 1922, 26, 876-894.
- [69] F. W. Bergstrom, J. Phys. Chem. 1922, 26, 358-376.
- [70] E. Marcq, J.-L. Bertaux, F. Montmessin, D. Belyaev, Nat. Geosci. 2013, 6, 25-28.
- [71] J. F. Kasting, K. J. Zahnle, J. P. Pinto, A. T. Young, Orig. Life Evol. Biosph. 1989, 19, 95-108.
- [72] I. Halevy, D. P. Schrag, *Geophys. Res. Lett.* 2009, *36*, L23201.
- [73] J. Xu, D. J. Ritson, S. Ranjan, Z. R. Todd, D. D. Sasselov, J. D. Sutherland, *Chem. Commun.* 2018, 54, 5566-5569.
- [74] J. Kawai, D. C. McLendon, H. J. Kim, S. A. Benner, *Astrobiology* **2019**, *19*, 506-516.
- [75] S. Becker, J. Feldmann, S. Wiedemann, H. Okamura, C. Schneider, K. Iwan, A. Crisp, M. Rossa, T. Amatov, T. Carell, *Science* **2019**, *366*, 76-82.
- [76] F. Chen, D. Yang, Orig. Life Evol. Biosph. 2007, 37, 47-54.
- [77] D. J. Ritson, C. Battilocchio, S. V. Ley, J. D. Sutherland, *Nat. Commun.* 2018, 9, 1821.

- [78] B. P. Weiss, J. L. Kirschvink, F. J. Baudenbacher, H. Vali, N. T. Peters, F. A. Macdonald, J. P. Wikswo, *Science* 2000, 290, 791-795.
- [79] N. G. Bochkarev, Astron. Rep. 2017, 61, 307-309.
- [80] J. L. Bada, Earth. Planet. Sci. Lett. 2004, 226, 1-15.
- [81] M. Frenkel-Pinter, M. Samanta, G. Ashkenasy, L. J. Leman, *Chem. Rev.* 2020, 120, 4707-4765.
- [82] R. B. Martin, *Biopolymers* **1998**, *45*, 351-353.
- [83] N. Kitadai, J. Mol. Evol. **2014**, 78, 171-187.
- [84] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, G. J. Gatto jr, L. Stryer, Proteinsynthese in *Stryer Biochemie* (Eds.: J. M. Berg, J. L. Tymoczko, G. J. Gatto jr, L. Stryer), Springer, Berlin, Heidelberg, 2018, p. 1059-1095.
- [85] B. Wittmann-Liebold, Ribosomal Proteins: Their Structure and Evolution in *Structure*, *Function, and Genetics of Ribosomes* (Eds.: B. Hardesty, G. Kramer), Springer, New York, 1986, p. 326-361.
- [86] N. Ban, P. Nissen, J. Hansen, P. B. Moore, T. A. Steitz, *Science* 2000, 289, 905-920.
- [87] P. Nissen, J. Hansen, N. Ban, P. B. Moore, T. A. Steitz, *Science* **2000**, *289*, 920-930.
- [88] J. L. Hansen, T. M. Schmeing, P. B. Moore, T. A. Steitz, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2002, 99, 11670-11675.
- [89] A. Sievers, M. Beringer, M. V. Rodnina, R. Wolfenden, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2004, 101, 7897-7901.
- [90] R. B. Merrifield, J. Am. Chem. Soc. **1963**, 85, 2149-2154.
- [91] S.-Y. Han, Y.-A. Kim, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 2447-2467.
- [92] C. A. G. N. Montalbetti, V. Falque, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 10827-10852.
- [93] A. El-Faham, F. Albericio, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 6557-6602.
- [94] R. M. de Figueiredo, J.-S. Suppo, J.-M. Campagne, *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 12029-12122.
- [95] A. J. Mijalis, D. A. Thomas, M. D. Simon, A. Adamo, R. Beaumont, K. F. Jensen, B. L. Pentelute, *Nat. Chem. Biol.* **2017**, *13*, 464-466.
- [96] J. M. Collins, K. A. Porter, S. K. Singh, G. S. Vanier, Org. Lett. 2014, 16, 940-943.
- [97] S. L. Miller, *Science* **1953**, *117*, 528-529.
- [98] A. P. Johnson, H. J. Cleaves, J. P. Dworkin, D. P. Glavin, A. Lazcano, J. L. Bada, *Science* **2008**, *322*, 404.
- [99] E. T. Parker, H. J. Cleaves, M. P. Callahan, J. P. Dworkin, D. P. Glavin, A. Lazcano, J. L. Bada, *Orig. Life Evol. Biosph.* **2011**, *41*, 201-212.
- [100] E. T. Parker, H. J. Cleaves, J. P. Dworkin, D. P. Glavin, M. Callahan, A. Aubrey, A. Lazcano, J. L. Bada, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2011, 108, 5526-5531.
- [101] E. T. Parker, M. Zhou, A. S. Burton, D. P. Glavin, J. P. Dworkin, R. Krishnamurthy, F. M. Fernández, J. L. Bada, Angew. Chem. Int. Ed. 2014, 53, 8132-8136.
- [102] S. L. Miller, *Biochim. Biophys. Acta* **1957**, *23*, 480-489.
- [103] R. A. Sanchez, J. P. Ferris, L. E. Orgel, *Science* **1966**, *154*, 784-785.
- [104] A. Lazcano, J. L. Bada, Orig. Life Evol. Biosph. 2003, 33, 235-242.
- [105] G. Schlesinger, S. L. Miller, J. Mol. Evol. 1983, 19, 376-382.
- [106] H. J. Cleaves, J. H. Chalmers, A. Lazcano, S. L. Miller, J. L. Bada, Orig. Life Evol. Biosph. 2008, 38, 105-115.
- [107] R. J. C. Hennet, N. G. Holm, M. H. Engel, *Naturwissenschaften* 1992, 79, 361-365.
- [108] W. L. Marshall, Geochim. Cosmochim. Acta 1994, 58, 2099-2106.
- [109] A. D. Aubrey, H. J. Cleaves, J. L. Bada, Orig. Life Evol. Biosph. 2009, 39, 91-108.
- [110] A. S. Burton, J. C. Stern, J. E. Elsila, D. P. Glavin, J. P. Dworkin, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 5459-5472.
- [111] N. Kitadai, S. Maruyama, Geosci. Front. 2018, 9, 1117-1153.
- [112] P. G. Higgs, R. E. Pudritz, *Astrobiology* **2009**, *9*, 483-490.
- [113] E. N. Trifonov, *Res. Microbiol.* **2009**, *160*, 481-486.
- [114] J. D. Bernal, *The physical basis of life*, Routledge and Kegan Paul, London, **1951**.
- [115] J.-F. Lambert, Orig. Life Evol. Biosph. 2008, 38, 211-242.

- [116] D. A. M. Zaia, *Amino Acids* **2004**, *27*, 113-118.
- [117] A. Brack, Clay Minerals and the Origin of Life in *Developments in Clay Science* (Eds.: F. Bergaya, B. K. G. Theng, G. Lagaly), Elsevier, **2006**, p. 379-391.
- [118] R. J. Gillams, T. Z. Jia, *Life* **2018**, *8*.
- [119] D. S. Ross, D. Deamer, *Life* **2016**, *6*.
- [120] D. Ross, D. Deamer, Astrobiology 2019, 19, 517-521.
- [121] E. L. Shock, *Geochim. Cosmochim. Acta* **1992**, *56*, 3481-3491.
- [122] S. W. Fox, K. Harada, *Science* **1958**, *128*, 1214.
- [123] S. W. Fox, K. Harada, J. Am. Chem. Soc. 1960, 82, 3745-3751.
- [124] S. Andini, E. Benedetti, L. Ferrara, L. Paolillo, P. A. Temussi, *Orig. Life Evol. Biosph.* **1975**, *6*, 147-153.
- [125] S. W. Fox, K. Harada, Arch. Biochem. Biophys. 1960, 86, 281-285.
- [126] D. L. Rohlfing, *Science* **1976**, *193*, 68-70.
- [127] C. K. Pant, H. Lata, H. D. Pathak, M. S. Mehata, Int. J. Astrobiol. 2009, 8, 107-115.
- [128] T. L. Porter, M. P. Eastman, M. E. Hagerman, L. B. Price, R. F. Shand, *J. Mol. Evol.* **1998**, 47, 373-377.
- [129] T. D. Campbell, R. Febrian, J. T. McCarthy, H. E. Kleinschmidt, J. G. Forsythe, P. J. Bracher, *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 4508.
- [130] M. Rodriguez-Garcia, A. J. Surman, G. J. T. Cooper, I. Suárez-Marina, Z. Hosni, M. P. Lee, L. Cronin, *Nat. Commun.* 2015, 6, 8385.
- [131] A. J. Surman, M. Rodriguez-Garcia, Y. M. Abul-Haija, G. J. T. Cooper, P. S. Gromski, R. Turk-MacLeod, M. Mullin, C. Mathis, S. I. Walker, L. Cronin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2019, *116*, 5387-5392.
- [132] E.-i. Imai, H. Honda, K. Hatori, A. Brack, K. Matsuno, Science 1999, 283, 831-833.
- [133] M. N. Islam, T. Kaneko, K. Kobayashi, Bull. Chem. Soc. Jpn. 2003, 76, 1171-1178.
- [134] K. Kunio, K. Noriko, M. Yoshimi, *Astrobiology* **2018**, *18*, 1403-1413.
- [135] B. Grégoire, H. C. Greenwell, D. G. Fraser, ACS Earth Space Chem. 2018, 2, 852-862.
- [136] Y. Qian, M. H. Engel, S. A. Macko, S. Carpenter, J. W. Deming, *Geochim. Cosmochim.* Acta **1993**, *57*, 3281-3293.
- [137] T. M. McCollom, Geochim. Cosmochim. Acta 2013, 104, 330-357.
- [138] H. J. Cleaves, A. D. Aubrey, J. L. Bada, Orig. Life Evol. Biosph. 2009, 39, 109-126.
- [139] E. C. Griffith, V. Vaida, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2012**, *109*, 15697-15701.
- [140] A. M. Deal, R. J. Rapf, V. Vaida, J. Phys. Chem. A 2021, 125, 4929-4942.
- [141] H. Mita, S. Nomoto, M. Terasaki, A. Shimoyama, Y. Yamamoto, *Int. J. Astrobiol.* 2005, 4, 145-154.
- [142] T. Stolar, S. Grubešić, N. Cindro, E. Meštrović, K. Užarević, J. G. Hernández, Angew. Chem. Int. Ed. 2021, 60, 12727-12731.
- [143] J. Hulshof, C. Ponnamperuma, Orig. Life Evol. Biosph. 1976, 7, 197-224.
- [144] H. Sawai, L. E. Orgel, J. Mol. Evol. 1975, 6, 185-197.
- [145] C. Ponnamperuma, E. Peterson, *Science* **1965**, *147*, 1572-1574.
- [146] G. Steinman, D. H. Kenyon, M. Calvin, *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* **1966**, *124*, 339-350.
- [147] G. Steinman, D. H. Kenyon, M. Calvin, *Nature* **1965**, *206*, 707-708.
- [148] S. Chang, J. Flores, C. Ponnamperuma, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1969, 64, 1011-1015.
- [149] J. Rabinowitz, J. Flores, R. Krebsbach, G. Rogers, *Nature* **1969**, 224, 795-796.
- [150] C. Gibard, S. Bhowmik, M. Karki, E.-K. Kim, R. Krishnamurthy, *Nat. Chem.* **2018**, *10*, 212-217.
- [151] G. Danger, L. Boiteau, H. Cottet, R. Pascal, J. Am. Chem. Soc. 2006, 128, 7412-7413.
- [152] L. J. Leman, L. E. Orgel, M. R. Ghadiri, *Science* 2004, *306*, 283-286.
- [153] L. J. Leman, Z.-Z. Huang, M. R. Ghadiri, Astrobiology 2015, 15, 709-716.
- [154] C. Huber, G. Wächtershäuser, *Science* **1998**, *281*, 670-672.
- [155] A. L. Weber, J. M. Caroon, J. T. Warden, R. M. Lemmon, M. Calvin, *BioSystems* **1977**, *8*, 277-286.

- [156] C. Gibard, I. B. Gorrell, E. I. Jiménez, T. P. Kee, M. A. Pasek, R. Krishnamurthy, Angew. Chem. Int. Ed. 2019, 58, 8151-8155.
- [157] R. Liu, L. E. Orgel, Orig. Life Evol. Biosph. **1998**, 28, 47-60.
- [158] J. P. Ferris, A. R. Hill, R. Liu, L. E. Orgel, *Nature* **1996**, *381*, 59-61.
- [159] E. T. Parker, M. Zhou, A. S. Burton, D. P. Glavin, J. P. Dworkin, R. Krishnamurthy, F. M. Fernández, J. L. Bada, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 8132-8136.
- [160] C. Huber, W. Eisenreich, S. Hecht, G. Wächtershäuser, *Science* 2003, 301, 938-940.
- [161] J. Greenwald, M. P. Friedmann, R. Riek, Angew. Chem. Int. Ed. 2016, 55, 11609-11613.
- [162] R. B. Symonds, W. I. Rose, G. J. S. Bluth, T. M. Gerlach, Volcanic-Gas Studies: Methods, Results, and Applications in *Volatiles in Magmas* (Eds.: M. R. Carroll, J. R. Holloway), De Gruyter, Berlin, **2018**, p. 1-66.
- [163] F. Duvernay, T. Chiavassa, F. Borget, J.-P. Aycard, J. Am. Chem. Soc. 2004, 126, 7772-7773.
- [164] S. L. Miller, H. C. Urey, *Science* **1959**, *130*, 245-251.
- [165] E. T. Peltzer, J. L. Bada, *Nature* **1978**, *272*, 443-444.
- [166] 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.
- [167] S.-S. Yu, M. D. Solano, M. K. Blanchard, M. T. Soper-Hopper, R. Krishnamurthy, F. M. Fernández, N. V. Hud, F. J. Schork, M. A. Grover, *Macromolecules* 2017, 50, 9286-9294.
- [168] A. D. McKee, M. Solano, A. Saydjari, C. J. Bennett, N. V. Hud, T. M. Orlando, *ChemBiochem* 2018, 19, 1913-1917.
- [169] M. Frenkel-Pinter, J. W. Haynes, M. C, A. S. Petrov, B. T. Burcar, R. Krishnamurthy, N. V. Hud, L. J. Leman, L. D. Williams, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2019, *116*, 16338-16346.
- [170] H. Leuchs, Ber. Dtsch. Chem. Ges. 1906, 39, 857-861.
- [171] L. J. Leman, L. E. Orgel, M. R. Ghadiri, J. Am. Chem. Soc. 2006, 128, 20-21.
- [172] E. C. Izgu, A. Björkbom, N. P. Kamat, V. S. Lelyveld, W. Zhang, T. Z. Jia, J. W. Szostak, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 16669-16676.
- [173] L. J. Leman, M. R. Ghadiri, Synlett 2017, 28, 68-72.
- [174] H. R. Kricheldorf, α-Aminoacid-N-Carboxy-Anhydrides and Related Heterocycles: Syntheses, Properties, Peptide Synthesis, Polymerization, Springer, Berlin, Heidelberg, 1987.
- [175] R. Pascal, L. Boiteau, A. Commeyras, From the Prebiotic Synthesis of α-Amino Acids Towards a Primitive Translation Apparatus for the Synthesis of Peptides in *Prebiotic Chemistry* (Eds.: P. Walde), Springer, Berlin, Heidelberg, **2005**, p. 69-122.
- [176] J. Taillades, H. Collet, L. Garrel, I. Beuzelin, L. Boiteau, H. Choukroun, A. Commeyras, *J. Mol. Evol.* **1999**, *48*, 638-645.
- [177] J. Oró, Biochem. Biophys. Res. Commun. 1960, 2, 407-412.
- [178] J. Oró, S. S. Kamat, *Nature* **1961**, *190*, 442-443.
- [179] C. N. Matthews, R. E. Moser, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1966, 56, 1087-1094.
- [180] C. N. Matthews, R. D. Minard, Faraday Discuss. 2006, 133, 393-401.
- [181] P. Canavelli, S. Islam, M. W. Powner, *Nature* **2019**, *571*, 546-549.
- [182] C. S. Foden, S. Islam, C. Fernández-García, L. Maugeri, T. D. Sheppard, M. W. Powner, *Science* **2020**, *370*, 865-869.
- [183] R. Okamoto, T. Haraguchi, K. Nomura, Y. Maki, M. Izumi, Y. Kajihara, *Biochemistry* **2019**, *58*, 1672-1678.
- [184] L.-F. Wu, Z. Liu, J. D. Sutherland, Chem. Commun. 2021, 57, 73-76.
- [185] S. M. Steinberg, J. L. Bada, J. Org. Chem. 1983, 48, 2295-2298.
- [186] M. Nagayama, O. Takaoka, K. Inomata, Y. Yamagata, Orig. Life Evol. Biosph. 1990, 20, 249-257.
- [187] A. Shimoyama, R. Ogasawara, Orig. Life Evol. Biosph. 2002, 32, 165-179.
- [188] M. G. Schwendinger, B. M. Rode, Anal. Sci. 1989, 5, 411-414.
- [189] M. G. Schwendinger, B. M. Rode, Orig. Life Evol. Biosph. 1992, 22, 349-359.

- [190] L. P. Knauth, *Nature* **1998**, *395*, 554-555.
- [191] S. Saetia, K. R. Liedl, A. H. Eder, B. M. Rode, Orig. Life Evol. Biosph. 1993, 23, 167-76.
- [192] B. M. Rode, Y. Suwannachot, *Coord. Chem. Rev.* **1999**, *190-192*, 1085-1099.
- [193] B. M. Rode, D. Fitz, T. Jakschitz, *Chem. Biodivers.* **2007**, *4*, 2674-702.
- [194] M. G. Schwendinger, R. Tattler, S. Saetia, K. R. Liedl, R. T. Kroemer, B. M. Rode, *Inorg. Chim. Acta* **1995**, 228, 207-214.
- [195] K. Plankensteiner, A. Righi, B. M. Rode, R. Gargallo, J. Jaumot, R. Tauler, *Inorg. Chim. Acta* **2004**, *357*, 649-656.
- [196] K. Plankensteiner, A. Righi, B. M. Rode, Orig. Life Evol. Biosph. 2002, 32, 225-236.
- [197] H. Reiner, K. Plankensteiner, D. Fitz, B. M. Rode, Chem. Biodivers. 2006, 3, 611-621.
- [198] B. M. Rode, H. L. Son, Y. Suwannachot, J. Bujdak, Orig. Life Evol. Biosph. 1999, 29, 273-286.
- [199] J. G. Lawless, N. Levi, J. Mol. Evol. 1979, 13, 281-286.
- [200] B. Grégoire, H. C. Greenwell, D. G. Fraser, ACS Earth Space Chem. 2018, 2, 852-862.
- [201] B. M. Rode, M. G. Schwendinger, Orig. Life Evol. Biosph. 1990, 20, 401-410.
- [202] J. F. Kasting, Orig. Life Evol. Biosph. 1990, 20, 199-231.
- [203] G. Matrajt, D. Blanot, *Amino Acids* **2004**, *26*, 153-158.
- [204] K. Naka, Y. Tampo, Y. Chujo, J. Organomet. Chem. 2007, 692, 436-441.
- [205] U. Shanker, B. Bhushan, G. Bhattacharjee, Kamaluddin, *Orig. Life Evol. Biosph.* **2012**, *42*, 31-45.
- [206] T. Georgelin, M. Akouche, M. Jaber, Y. Sakhno, L. Matheron, F. Fournier, C. Méthivier, G. Martra, J.-F. Lambert, *Eur. J. Inorg. Chem.* 2017, 198-211.
- [207] N. Kitadai, H. Oonishi, K. Umemoto, T. Usui, K. Fukushi, S. Nakashima, *Orig. Life Evol. Biosph.* **2017**, *47*, 123-143.
- [208] E. G. Baker, G. J. Bartlett, K. L. Porter Goff, D. N. Woolfson, Acc. Chem. Res. 2017, 50, 2085-2092.
- [209] M. Reches, Y. Porat, E. Gazit, J. Biol. Chem. 2002, 277, 35475-35480.
- [210] M. Reches, E. Gazit, *Science* **2003**, *300*, 625-627.
- [211] A. Brack, L. E. Orgel, *Nature* **1975**, *256*, 383-387.
- [212] S. Zhang, Acc. Chem. Res. 2012, 45, 2142-2150.
- [213] W. S. Childers, R. Ni, A. K. Mehta, D. G. Lynn, Curr. Opin. Chem. Biol. 2009, 13, 652-659.
- [214] R. Egel, *Bioessays* **2009**, *31*, 1100-1109.
- [215] M. Lei, S. Xia, J. Wang, Z. Ge, T. Cheng, R. Li, *Chirality* **2010**, *22*, 580-586.
- [216] H. Wennemers, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 12036-12041.
- [217] C. M. Rufo, Y. S. Moroz, O. V. Moroz, J. Stöhr, T. A. Smith, X. Hu, W. F. DeGrado, I. V. Korendovych, *Nat. Chem.* 2014, 6, 303-309.
- [218] T. Schnitzer, M. Wiesner, P. Krattiger, J. D. Revell, H. Wennemers, Org. Biomol. Chem. 2017, 15, 5877-5881.
- [219] B. List, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 5573-5590.
- [220] W. Zou, I. Ibrahem, P. Dziedzic, H. Sundén, A. Córdova, *Chem. Commun.* 2005, 4946-4948.
- [221] S. Pizzarello, A. L. Weber, Orig. Life Evol. Biosph. 2009, 40, 3-10.
- [222] A. L. Weber, S. Pizzarello, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2006, 103, 12713-12717.
- [223] J. E. Hein, E. Tse, D. G. Blackmond, Nat. Chem. 2011, 3, 704-706.
- [224] K. Severin, D. H. Lee, J. A. Martinez, M. R. Ghadiri, Chem. Eur. J. 1997, 3, 1017-1024.
- [225] M. Piraud, C. Vianey-Saban, K. Petritis, C. Elfakir, J.-P. Steghens, D. Bouchu, *Rapid Com*mun. Mass Spectrom. 2005, 19, 1587-1602.
- [226] W. A. H. Waterval, J. L. J. M. Scheijen, M. M. J. C. Ortmans-Ploemen, C. D. Habets-van der Poel, J. Bierau, *Clin. Chim. Acta* 2009, 407, 36-42.
- [227] A. J. Alpert, J. Chromatogr. A 1990, 499, 177-196.
- [228] M. R. Gama, R. G. da Costa Silva, C. H. Collins, C. B. G. Bottoli, *TrAC*, *Trends Anal. Chem.* **2012**, *37*, 48-60.

- [229] R. Guerrasio, C. Haberhauer-Troyer, D. Mattanovich, G. Koellensperger, S. Hann, *Anal. Bioanal. Chem.* **2014**, *406*, 915-922.
- [230] G. Zhou, M. Wang, Y. Li, Y. Peng, X. Li, Amino Acids 2015, 47, 1589-1603.
- [231] H. C. M. T. Prinsen, B. G. M. Schiebergen-Bronkhorst, M. W. Roeleveld, J. J. M. Jans, M. G. M. de Sain-van der Velden, G. Visser, P. M. van Hasselt, N. M. Verhoeven-Duif, J. Inherited Metab. Dis. 2016, 39, 651-660.
- [232] R. Schuster, J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl. 1988, 431, 271-284.
- [233] M. Friedman, J. Agric. Food Chem. 2004, 52, 385-406.
- [234] I. Ilisz, R. Berkecz, A. Péter, J. Pharm. Biomed. Anal. 2008, 47, 1-15.
- [235] C. I. G. Tuberoso, F. Congiu, G. Serreli, S. Mameli, Food Chem. 2015, 175, 29-35.
- [236] H. Kaspar, K. Dettmer, W. Gronwald, P. J. Oefner, Anal. Bioanal. Chem. 2009, 393, 445-452.
- [237] M. Dołowy, A. Pyka, *Biomed. Chromatogr.* 2014, 28, 84-101.
- [238] P. Fürst, L. Pollack, T. A. Graser, H. Godel, P. Stehle, J. Chromatogr. A 1990, 499, 557-569.
- [239] K. Petritis, C. Elfakir, M. Dreux, J. Chromatogr. A 2002, 961, 9-21.
- [240] A. Shallan, R. Guijt, M. Breadmore, Capillary Electrophoresis: Basic Principles in *Ency-clopedia of Forensic Sciences (Second Edition)* (Eds.: J. A. Siegel, P. J. Saukko, M. M. Houck), Academic Press, Waltham, 2013, p. 549-559.
- [241] S. Forcisi, F. Moritz, B. Kanawati, D. Tziotis, R. Lehmann, P. Schmitt-Kopplin, J. Chromatogr. A 2013, 1292, 51-65.
- [242] Z. Zhang, Y. Qu, N. J. Dovichi, TrAC, Trends Anal. Chem. 2018, 108, 23-37.
- [243] C. Pontillo, S. Filip, D. M. Borràs, W. Mullen, A. Vlahou, H. Mischak, *Proteomics Clin. Appl.* **2015**, *9*, 322-334.
- [244] D. Chen, E. N. McCool, Z. Yang, X. Shen, R. A. Lubeckyj, T. Xu, Q. Wang, L. Sun, *Mass Spectrom. Rev.* 2021, 1-26.
- [245] J. A. Olivares, N. T. Nguyen, C. R. Yonker, R. D. Smith, Anal. Chem. 1987, 59, 1230-1232.
- [246] A. Hirayama, M. Wakayama, T. Soga, *Trends Anal. Chem.* 2014, 61, 215-222.
- [247] M. Pioch, S.-C. Bunz, C. Neusüß, *Electrophoresis* **2012**, *33*, 1517-1530.
- [248] A. Stolz, K. Jooß, O. Höcker, J. Römer, J. Schlecht, C. Neusüß, *Electrophoresis* **2019**, *40*, 79-112.
- [249] E. J. Maxwell, D. D. Y. Chen, Anal. Chim. Acta 2008, 627, 25-33.
- [250] P. Schmitt-Kopplin, M. Frommberger, *Electrophoresis* **2003**, *24*, 3837-3867.
- [251] H. J. Issaq, G. M. Janini, K. C. Chan, T. D. Veenstra, J. Chromatogr. A 2004, 1053, 37-42.
- [252] V. Sanz-Nebot, E. Balaguer, F. Benavente, J. Barbosa, *Electrophoresis* 2005, 26, 1457-1465.
- [253] A. D. Zamfir, N. Dinca, E. Sisu, J. Peter-Katalinić, J. Sep. Sci. 2006, 29, 414-422.
- [254] L. Fang, R. Zhang, E. R. Williams, R. N. Zare, Anal. Chem. 1994, 66, 3696-3701.
- [255] P. Cao, M. Moini, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 1997, 8, 561-564.
- [256] M. Moini, Anal. Chem. 2007, 79, 4241-4246.
- [257] E. D. Lee, W. Mück, J. D. Henion, T. R. Covey, J. Chromatogr. 1988, 458, 313-321.
- [258] S. Pleasance, P. Thibault, J. Kelly, J. Chromatogr. **1992**, 591, 325-339.
- [259] R. D. Smith, C. J. Barinaga, H. R. Udseth, Anal. Chem. 1988, 60, 1948-1952.
- [260] M. Mokaddem, P. Gareil, J.-E. Belgaied, A. Varenne, *Electrophoresis* **2009**, *30*, 1692-1697.
- [261] L. Sun, G. Zhu, Z. Zhang, S. Mou, N. J. Dovichi, *Journal of Proteome Research* **2015**, *14*, 2312-2321.
- [262] E. J. Maxwell, X. Zhong, H. Zhang, N. van Zeijl, D. D. Y. Chen, *Electrophoresis* **2010**, *31*, 1130-1137.
- [263] S. Fanali, G. D'Orazio, F. Foret, K. Kleparnik, Z. Aturki, *Electrophoresis* 2006, 27, 4666-4673.

- [264] P. Fang, J.-Z. Pan, Q. Fang, *Talanta* **2018**, *180*, 376-382.
- [265] V. González-Ruiz, S. Codesido, S. Rudaz, J. Schappler, *Electrophoresis* **2018**, *39*, 853-861.
- [266] A. Staub, J. Schappler, S. Rudaz, J.-L. Veuthey, *Electrophoresis* **2009**, *30*, 1610-1623.
- [267] L. Yang, C. S. Lee, S. A. Hofstadler, L. Pasa-Tolic, R. D. Smith, *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 3235-3241.
- [268] M. J. Chalmers, C. L. Mackay, C. L. Hendrickson, S. Wittke, M. Walden, H. Mischak, D. Fliser, I. Just, A. G. Marshall, *Anal. Chem.* 2005, 77, 7163-7171.
- [269] Q. Hu, R. J. Noll, H. Li, A. Makarov, M. Hardman, R. Graham Cooks, *J. Mass Spectrom.* **2005**, *40*, 430-443.
- [270] E. A. Amenson-Lamar, L. Sun, Z. Zhang, P. W. Bohn, N. J. Dovichi, *Talanta* **2019**, 204, 70-73.
- [271] L. Wang, T. Bo, Z. Zhang, G. Wang, W. Tong, D. Da Yong Chen, Anal. Chem. 2018, 90, 9495-9503.
- [272] S. Gusenkov, H. Stutz, *Electrophoresis* **2018**, *39*, 1190-1200.
- [273] S. B. Choi, C. Lombard-Banek, P. Muñoz-Llancao, M. C. Manzini, P. Nemes, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 2018, 29, 913-922.
- [274] A. Shallan, R. Guijt, M. Breadmore, Capillary Electrophoresis: Basic Principles in *Encyclopedia of Forensic Sciences (Second Edition)* (Eds.: J. A. Siegel, P. J. Saukko, M. M. Houck), Academic Press, Waltham, 2013, p. 549-559.
- [275] J. Horvath, V. Dolník, *Electrophoresis* **2001**, *22*, 644-655.
- [276] R. L. C. Voeten, I. K. Ventouri, R. Haselberg, G. W. Somsen, *Anal. Chem.* **2018**, *90*, 1464-1481.
- [277] M. Gilges, M. H. Kleemiss, G. Schomburg, Anal. Chem. 1994, 66, 2038-2046.
- [278] B. L. Karger, W. Goetzinger, Polyvinyl alcohol (PVA) based covalently bonded stable hydrophilic coating for capillary electrophoresis, Patent C25B 9/0, **1998**, 1-20.
- [279] D. Belder, A. Deege, H. Husmann, F. Kohler, M. Ludwig, *Electrophoresis* **2001**, *22*, 3813-3818.
- [280] S. Hjertén, J. Chromatogr. A 1985, 347, 191-198.
- [281] G. Zhu, L. Sun, N. J. Dovichi, *Talanta* **2016**, *146*, 839-843.
- [282] H. Steen, M. Mann, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2004, 5, 699-711.
- [283] P. Roepstorff, J. Fohlman, *Biomed. Mass Spectrom.* 1984, 11, 601-601.
- [284] B. Paizs, S. Suhai, *Mass Spectrom. Rev.* 2005, 24, 508-548.
- [285] V. Vidova, Z. Spacil, Anal. Chim. Acta 2017, 964, 7-23.
- [286] Y. Li, P. D. Compton, J. C. Tran, I. Ntai, N. L. Kelleher, *Proteomics* 2014, 14, 1158-1164.
- [287] S. Xia, L. Zhang, M. Lu, B. Qiu, Y. Chi, G. Chen, *Electrophoresis* 2009, *30*, 2837-2844.
- [288] H. J. Issaq, G. M. Janini, I. Z. Atamna, G. M. Muschik, J. Lukszo, J. Liq. Chromatogr. 1992, 15, 1129-1142.
- [289] M. Hammitzsch-Wiedemann, G. K. E. Scriba, *Electrophoresis* 2007, 28, 2619-2628.
- [290] V. González-Ruiz, S. Codesido, J. Far, S. Rudaz, J. Schappler, *Electrophoresis* 2016, 37, 936-946.
- [291] F. Sauer, C. Sydow, O. Trapp, *Electrophoresis* **2020**, *41*, 1280-1286.
- [292] A. Tycova, J. Prikryl, F. Foret, *Electrophoresis* **2016**, *37*, 924-930.
- [293] M. Wetterhall, O. Klett, K. E. Markides, L. Nyholm, J. Bergquist, *Analyst* 2003, 128, 728-733.
- [294] O. Trapp, E. W. Pearce, J. R. Kimmel, O. K. Yoon, I. A. Zuleta, R. N. Zare, *Electrophoresis* **2005**, *26*, 1358-1365.
- [295] J. E. Knoll, J. Chromatogr. Sci. 1985, 23, 422-425.
- [296] R. Haselberg, C. K. Ratnayake, G. J. de Jong, G. W. Somsen, *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 7605-7611.
- [297] M. N. Hasan, S. H. Park, E. Oh, E. J. Song, E. Ban, Y. S. Yoo, J. Sep. Sci. 2010, 33, 3701-3709.

- [298] L.-C. Lin, R.-S. Juang, Chem. Eng. J. 2005, 112, 211-218.
- [299] Y. Suwannachot, B. M. Rode, Orig. Life Evol. Biosph. 1998, 28, 79-90.
- [300] R. Lohrmann, J. Mol. Evol. 1972, 1, 263-269.
- [301] C. U. Lowe, M. W. Rees, R. Markham, *Nature* **1963**, *199*, 219-222.
- [302] M. Gull, A. Omran, T. Feng, M. A. Pasek, *Life* **2020**, *10*, 122.
- [303] L. Hua, R. Zhou, D. Thirumalai, B. J. Berne, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2008, 105, 16928-16933.
- [304] S. Bellmaine, A. Schnellbaecher, A. Zimmer, *Free Radical Biol. Med.* **2020**, *160*, 696-718.
- [305] H. Mayr, G. Gorath, B. Bauer, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1994, 33, 788-789.
- [306] F. Sauer, M. Haas, C. Sydow, A. F. Siegle, C. A. Lauer, O. Trapp, *Nat. Commun.*, in Revision.
- [307] B. K. D. Pearce, A. S. Tupper, R. E. Pudritz, P. G. Higgs, *Astrobiology* **2018**, *18*, 343-364.
- [308] C. Allègre, G. Manhès, É. Lewin, Earth. Planet. Sci. Lett. 2001, 185, 49-69.
- [309] L. M. Barge, *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 5170.
- [310] S. L. Miller, J. Am. Chem. Soc. 1955, 77, 2351-2361.