

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

Untersuchung und Entwicklung präbiotisch  
plausibler Reaktionspfade zu Peptiden und  
Organophosphaten in flüssigem Schwefeldioxid

Constanze Sydow

aus

Bergisch Gladbach, Deutschland

2022



## Erklärung

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, 19.12.2022

.....  
(Constanze Sydow)

Dissertation eingereicht am	24.10.2022
1. Gutachterin/ 1. Gutachter:	Prof. Dr. Oliver Trapp
2. Gutachterin/ 2. Gutachter:	Prof. Dr. Anja Hoffmann-Röder
Mündliche Prüfung am	15.12.2022



## Publikationen und Posterpräsentationen

Teile dieser Arbeit wurden bereits in Fachjournalen veröffentlicht oder auf Konferenzen vorgestellt:

### Publikationen

C. Sydow, F. Sauer, A. F. Siegle, O. Trapp, *ChemSystemsChem* **2022**, e202200034; Iron-mediated peptide formation in water and liquid sulfur dioxide under prebiotically plausible conditions.

C. Sydow, C. Seiband, A. F. Siegle, O. Trapp, *Commun. Chem.* **2022**, 5, 143; Phosphorylation in liquid sulphur dioxide under prebiotically plausible conditions.

F. Sauer, M. Haas, C. Sydow, A. F. Siegle, C. A. Lauer, O. Trapp, *Nat. Commun.* **2021**, 12; 7182; From amino acid mixtures to peptides in liquid sulphur dioxide on early earth.

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

### Posterpräsentationen

Molecular Origins of Life Conference, August 2021, online, Peptide formation as on the early earth: from amino acid mixtures to peptides in sulphur dioxide.

CE-Forum, Dezember 2019, Waldbronn (Deutschland); A robust sheath-flow CE-ESI-MS interface for high sensitivity analyses.

Science of Early Life Conference, November 2019, Seeon (Deutschland); Exploring the origin of life by Miller-type experiments.



## Danksagung

In erster Linie möchte ich mich bei PROF. OLIVER TRAPP für die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis sowie die Betreuung dieser Arbeit bedanken. Darüber hinaus danke ich Dir neben den interessanten Fragestellungen und dem fachlichen Austausch auch für deine mitreißende Begeisterungsfähigkeit, die positive Arbeitsatmosphäre sowie das Vertrauen in meine Arbeit.

Ein herzlicher Dank gilt FRAU PROF. ANJA HOFFMANN-RÖDER für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Besonders danken möchte ich außerdem dem gesamten Arbeitskreis TRAPP für die freundliche Aufnahme in München. Insbesondere seien hier MAREN, ELINA und FABIAN genannt. Vielen Dank MAREN für die herzliche Aufnahme in die Laborbox, die fortwährende Versorgung mit Nervennahrung, die vielen (fachlichen) Gespräche sowie vor allem für die wunderbare Freundschaft, die daraus entstanden ist. Meinem zweiten Laborpartner MARIAN möchte ich für die Erkenntnis danken, dass auch aus dem Chaos Schönes entstehen kann. Vielen Dank für die vielen schönen Ansichten zahlreicher Kristalle, deinen unermüdlichen Ideenfluss und dafür, dass wir unsere Begeisterung für Maronengerichte teilen können. Bei MAREN, ELINA und LAURA möchte ich mich außerdem für die zahlreichen Spieleabende bedanken, die immer für gute Laune gesorgt haben. Im Rahmen dieser Arbeit habe ich versucht mich an die Wortauswahl des Dudens zu halten, eine Reihe von Substantivaneinanderreihungen mit mehr als fünf Wortbausteinen ist aber bereits in Vorbereitung für die nächste Runde. Zusammen mit MAREN, ELINA, LENA und CHRISTOPH durfte ich außerdem zahlreiche Ausflüge in die Berge unternehmen. Ob bei Dauerregen oder im Schnee, ihr wart immer dabei. Danke für diese schöne Zeit! An dieser Stelle sei auch ALEX gedankt für die Auskundschaftung des bestens Kaiserschmarrns. LENA und CHRISTOPH danke ich außerdem für die zahlreichen Pausen mit diversen Heißgetränken. Ich hoffe, dass wir auch weiterhin in den Genuss heißer Schokolade kommen! Des Weiteren möchte ich JAN für das mir entgegengebrachte Vertrauen, seine Weingläser zu benutzen, danken. Danke auch für die vielen gemeinsamen Stunden beim Schreiben, du hast mich immer wieder motiviert.

Ein großer Dank gilt des Weiteren M<sup>2</sup> sowie MAREN. Danke, dass ihr euch immer wieder Zeit genommen habt und mir das Arbeiten mit Druckapparaturen und Gasen nahegebracht habt. Bei FABIAN, ALEX und MAREN möchte ich mich für die zahlreichen Diskussionen zu analytischen und Peptidfragestellungen bedanken. Danke, dass ich so viel von euch lernen durfte, und dass ihr mich auf meinem Weg begleitet habt.

Danken möchte ich auch meinen Bachelorandinnen, IRENE und CHRISTIANE. Vielen Dank für euren Einsatz und die Begeisterung für meine Forschungsthemen.

Meinen fleißigen Korrekturlesern ALEX, MAREN, LAURA, MAX B. und MAX gilt ein besonderer Dank. Danke für eure unermüdliche Fehlerjagd und die vielen hilfreichen Diskussionen zu Abbildungen und Ähnlichem!

Des Weiteren danke ich den Mitarbeitern der chemischen Institute der Ludwig-Maximilians-Universität, die das wissenschaftliche Arbeiten durch die Bereitstellung der Labor- sowie bürokratischen Infrastruktur erst ermöglichten. Mein besonderer Dank gilt hierbei den Mitarbeitern der Feinmechanik für die Anfertigung individueller Druck- sowie anderer Metallapparaturen. An dieser Stelle möchte ich mich vor allem ganz herzlich bei CARRIE LEWIS bedanken. Danke für deine unentwegte Unterstützung bei der Instandhaltung der Orbitrap und deine unerschütterlich positive Art, die so manch einen Arbeitstag bereichert hat.

Außerdem möchte ich mich bei EVA für die wunderbare Aufnahme in ihre WG bedanken. Ohne dich und all die gemeinsamen Abende in unserer Küche wäre ich am Anfang in München wohl ziemlich verloren gewesen. Ich danke dir und JULIAN für die herzliche Freundschaft und die zuverlässige Versorgung mit vitaminreicher Nahrung. Darüber hinaus danke ich SONJA, BIANCA und CLAUDIA für die unzähligen abendfüllenden Telefonate, während denen doch nicht alles erzählt werden konnte. Danke, dass ihr immer für mich da seid!

Danken möchte ich darüber hinaus meiner Familie MECHTHILD, WOLFANG, KASIMIR, CHRISTINA und HARTMUT. Ohne euch und eure unermüdliche Unterstützung wäre diese Arbeit so nicht möglich gewesen. Danke, dass ihr während meines gesamten Studiums und in jeder Lebenslage immer hinter mir gestanden habt und steht.

Abschließend möchte ich insbesondere meinem Freund MAX danken. Danke für deine Zuversicht, deinen Glauben in mich, deine unermüdliche Unterstützung und deine Fähigkeit mich in fast jeder Lebenslage zum Lachen zu bringen. Danke für alles.

## Kurzzusammenfassung

Auf der Suche nach einem besseren Verständnis der grundlegenden chemischen Prozesse am Ursprung des Lebens erhalten insbesondere Untersuchungen zu ersten abiotischen Phosphorylierungsreaktionen und Peptidbildungen große Beachtung. Kernfähigkeiten, die mit dem Begriff Leben assoziiert werden, wie Informationsspeicherung, -transport, Kompartimentbildung, Stoffwechselaktivität und Katalyse werden erst durch die Gegenwart von Organophosphaten und Biopolymeren ermöglicht. Da diese in Kondensationsreaktionen dargestellt werden, ist deren Bildung in Wasser, das in Bezug auf Leben allgegenwärtig ist, jedoch thermodynamisch unvorteilhaft. Erschwerend kommt hinzu, dass zwitterionisch vorliegende Aminosäuren und elektrophile Phosphorzentren mit hoher benachbarter negativer Ladung die Umsetzungen zu den Kondensationsprodukten kinetisch inhibieren können. Auf der frühen Erde mengenmäßig dominante, aber nahezu unlösliche Phosphatminerale verkomplizieren Phosphorylierungsreaktionen darüber hinaus.

Vor dem Hintergrund der thermodynamischen Reaktionsbarriere in Wasser, werden in der vorliegenden Arbeit Metall-vermittelte Peptidbildungen und Phosphorylierungsreaktionen in flüssigem Schwefeldioxid als wasserentziehendem Lösungsmittel untersucht. Letzteres agiert dabei in Kombination mit reduzierten Verbindungen gleichzeitig auch als Oxidationsmittel und ermöglicht so die Bildung einer Vielzahl an präbiotisch relevanten Verbindungen. Die Reaktionen wurden zunächst an kleinen Modellsystemen erprobt und charakterisiert. Anschließend wurden präbiotisch plausible große Mischungen an Aminosäuren und Nucleosiden eingesetzt.

Der erste Abschnitt dieser Arbeit behandelt Metall-vermittelte Peptidbildungen in flüssigem Schwefeldioxid. Zunächst konnte die im präbiotischen Kontext essenzielle Robustheit der bei Raumtemperatur verlaufenden Kupfer-vermittelten Aminosäurekondensation anhand einer Variation der Reaktionsparameter festgestellt werden. Aufgrund des eingeschränkten Kupfervorkommens auf der frühen Erde wurde anschließend eine Peptidsynthese ausgehend von auf der frühen Erde deutlich weiter verbreitetem Eisen entwickelt. Diese weist infolgedessen ein hohes Potenzial zur Anwendung in einer Vielzahl präbiotischer Szenarien auf. Dabei lieferten Aminosäuren bei Raumtemperatur in Gegenwart von mit Essigsäure aktiviertem Eisen innerhalb von 29 Tagen Pentapeptide. Bereits geringe Eisenkonzentrationen waren ausreichend für die Bildung von Peptiden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass dieser neue Synthesepfad eine hohe Selektivität bezüglich der Bildung von Peptiden gegenüber Nebenprodukten aufweist und mit allen 20 proteinogenen Aminosäuren kompatibel ist. Dabei wurden all diese in Dipeptide eingebaut, wenn auch mit unterschiedlicher Präferenz. Insgesamt konnte die präbiotische Plausibilität der Aminosäurekondensation in

flüssigem Schwefeldioxid vulkanischen Ursprungs durch Peptidbildungen mit im Hadaikum verfügbaren Kupfer- und Eisenmineralien unterstrichen werden.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde das Szenario präbiotischer Umsetzungen in flüssigem Schwefeldioxid auf Phosphorylierungsreaktionen erweitert. Die besten Ergebnisse konnten dabei mit Phosphonsäure als Phosphorylierungsreagenz erzielt werden. Schwefeldioxid übt hierbei eine Doppelfunktion als Reaktionsmedium und Oxidationsmittel aus. In letztgenannter Rolle überführt es die *H*-Phosphonatkondensationsprodukte in die gewünschten Phosphate. Die identifizierte, robuste Phosphorylierungsreaktion lieferte bei Raumtemperatur in einem Reaktionsschritt Nukleosidmonophosphate, -diphosphate und -triphosphate sowie Dinukleotide. Hierbei ergab ein Vergleich der verschiedenen kanonischen Nukleoside jedoch große Reaktivitätsunterschiede. Anhand massenspektrometrischer Untersuchungen der Produktmischungen konnte ein ganzes Netzwerk an verschiedenen Reaktionspfade identifiziert werden. Darüber hinaus konnten auch weitere präbiotisch relevante Substrate phosphoryliert werden. Im Fall der Phosphorylierung von Serin begünstigte das Phosphorylierungsreagenz gleichzeitig dessen Eigenkondensation. Der identifizierte Reaktionspfad kann somit einen Weg für die simultane Bildung verschiedener Biopolymere darstellen.

## Abstract

Toward a deeper understanding of the fundamental chemical processes at the origin of life investigations on the first abiotic phosphorylation reactions and peptide formations receive great attention. Core features associated with the term life, including information storage and transfer, compartment formation, metabolism and catalysis can only be enabled in the presence of organophosphates and biopolymers. Since both are obtained from condensation reactions their formation in water, which is ubiquitous in all facets of life, is thermodynamically unfavourable. Kinetic inhibition by zwitterionic amino acids and electrophilic phosphorus centres with high adjacent negative charge further complicates the formation of condensation products. In addition, the almost insoluble phosphate minerals that had been the quantitatively dominant phosphorus source on the early earth hamper phosphorylation reactions.

With the thermodynamic reaction barrier in water in mind, metal mediated peptide formations and phosphorylation reactions in liquid sulphur dioxide as a hygroscopic reaction medium are investigated in this work. In combination with reduced compounds, this solvent simultaneously acts as an oxidation agent and enables the formation of various prebiotically relevant compounds in this way. At first, synthetic pathways were tested and characterised using small model systems. Second, large amino acid and nucleoside mixtures which are prebiotically more plausible were applied.

The first part of this thesis deals with metal mediated peptide formations in liquid sulphur dioxide. At first, the prebiotically essential robustness of copper mediated amino acid condensation at room temperature was shown by varying different reaction parameters. Since the availability of copper had been limited on early earth a peptide synthesis mediated by abundantly existing iron was developed, which shows great potential for application to various prebiotically plausible scenarios. In this context, amino acid condensation at room temperature subsequent to iron activation by acetic acid provided pentapeptides within 29 days. Even small iron quantities were sufficient for product formation. In addition, the synthetic pathway is highly selective with respect to the formation of peptides over by-products and tolerates all proteinogenic amino acids. All of them were incorporated into dipeptides, albeit with different preference. Overall, the prebiotic plausibility of amino acid condensations in liquid sulphur dioxide originating from volcanic outgassing could be emphasized by peptide formations mediated by Hadean copper and iron minerals.

Furthermore, the prebiotic scenario of liquid sulphur dioxide as reaction medium was extended to phosphorylation reactions in the second part of the dissertation. Best results were obtained with phosphorous acid as phosphorylation agent. In this process sulphur dioxide

conducts a double role as solvent and oxidation agent. The latter function enables conversion of the resulting *H*-phosphonates to the desired phosphates. The identified, robust phosphorylation reaction provides nucleoside monophosphates, diphosphates, triphosphates and dinucleotides in one step at ambient temperature. However, the different canonical nucleosides showed large variations in reactivity. Mass spectrometric investigations of product mixtures allowed identification of a network consisting of various reaction pathways. In addition to the nucleosides, further prebiotically relevant substrates were successfully phosphorylated. In the case of serine phosphorylation, the phosphorylation reagent simultaneously promoted the self-condensation of the substrate. Thus, the identified reaction route presents a pathway for the simultaneous formation of different biopolymers.

## Abkürzungen

A	Adenosin
A <sub>2</sub>	Alanylalanin
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
AcOH	Essigsäure
Äq.	Äquivalente
AG	Alanylglycin
AmTP	Amidotriphosphat
AS	Aminosäure
BA	Adenin
BC	Cytosin
BFS	<i>bare fused silica</i> (blankes Quarzglas)
BG	Guanin
BGE	<i>background electrolyte</i> (Hintergrundpuffer)
BIS-TRIS	Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan
BT	Thymin
BU	Uracil
C	Cytidin
c	Konzentration
CDI	Carbonyldiimidazol
CE	<i>capillary electrophoresis</i> (Kapillarelektrophorese)
COS	Carbonylsulfid
CS <sub>2</sub>	Kohlenstoffdisulfid
CZE	<i>capillary zone electrophoresis</i> (Kapillarzonenelektrophorese)
d	Tag
dA	2'-Desoxyadenosin
DAMN	Diaminomaleonitril
DAP	Diamidophosphat
dC	2'-Desoxycytidin
dG	2'-Desoxyguanosin
DKP	Diketopiperazin
dN	Desoxynukleosid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dT	2'-Desoxythymidin
ICP-OES	<i>inductively coupled plasma optical emission spectrometry</i> (optische Emissionsspektrometrie mittels induktiv gekoppelten Plasmas)

## Abkürzungen

---

ID	<i>internal diameter</i> (Innendurchmesser)
<i>i</i> -PrOH	Isopropanol
EDAC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EIE	<i>extracted ion electropherogram</i> (extrahiertes Ionenelektropherogramm)
EOF	elektroosmotischer Fluss
ESI	Elektrospray-Ionisation
<i>et al.</i>	und andere
GA	Glycylalanin
Ga	Jahrmilliarde (Gigaannum)
GC	Gaschromatographie
GCA	Glyceraldehyd
G	Guanosin
G <sub>2</sub>	Glycylglycin
G <sub>3</sub>	Glycylglycylglycin
GL	Glycerin
GOE	<i>great oxidation event</i> (große Sauerstoffkatastrophe)
h	Stunde
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> (Hochleistungsflüssigkeits- chromatographie)
4-HP	4-Hydroxyprolin
HR	<i>high resolution</i> (hochauflösend)
Kat	Katalysator
kPa	Kilopascal
λ	Wellenlänge
l	Länge
Lc	Lactat
LPA	lineares Polyacrylamid
LUCA	<i>last universal common ancestor</i> (Urvorfahr)
MAP	Monoamidophosphat
mbar	Millibar
mig	Migration
min	Minute
MISS	mikrobiell induzierte Sedimentstrukturen
MMP	monomeres Monophosphat
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
X	

---

<i>m/z</i>	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
N	Nukleosid
n. b.	nicht bestimmt
NCA	<i>N</i> -Carboxyanhydrid
OD	<i>outer diameter</i> (Außendurchmesser)
Ox.	Oxidation
p	Druck
ppm	<i>parts per million</i> (Anteile pro Million)
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
Rib	Ribose
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SIPF	<i>salt induced peptide formation</i> (Salz-induzierte Peptidbildung)
SL	<i>sheath-liquid</i>
t	Zeit
T	Temperatur
TEMED	<i>N, N, N', N'</i> -Tetramethylethylendiamin
TIC	<i>total ion current</i> (Gesamtionenstrom)
tRNA	transfer-RNA
U	Uridin
UV	ultraviolett
v/v	Volumenprozent
γ-MAPS	3-(Trimethoxysilyl)propylmethacrylat

## Aminosäuren

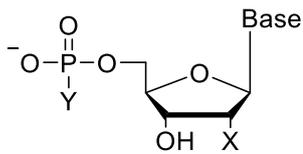
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Iso	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

## Phosphorverbindungen

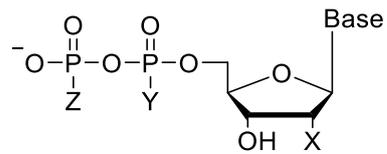
Für die Mehrheit der phosphorylierten Produkte erfolgte keine Bestimmung der Konstitutionsisomere. Ein Großteil der möglichen Phosphonat- und Phosphatverknüpfungen wird mithilfe der Benennungen und Abkürzungen veranschaulicht. Diese nehmen Bezug auf die Gesamtheit der entstandenen Isomere.

cNMP	<i>cyclic nucleoside monophosphate</i> (zyklisches Nucleosidmonophosphat)
NDP	Nucleosiddiphosphat
NMP/ N-p <sup>V</sup>	Nucleosidmonophosphat
N-p <sup>III</sup>	Nucleosidmonophosphonat
N-p <sup>III</sup> (S)	Nucleosidthiophosphonat
N-p <sup>III</sup> -N	Dinucleosidphosphonat
N-p <sup>V</sup> -N	Dinucleosidphosphat
N-p <sup>III</sup> -p <sup>III</sup>	Nucleosiddiphosphonat
p <sup>III</sup> -N-p <sup>III</sup>	
N-p <sup>V</sup> -p <sup>III</sup>	Phosphor(III), Phosphor(V) gemischtes diphosphoryliertes
p <sup>V</sup> -N-p <sup>III</sup>	Nucleosid
p <sup>V</sup> -N-cp <sup>V</sup>	gemischtes (α-)zyklisches Nucleosiddiphosphat
N-cp <sup>V</sup> -p <sup>V</sup>	
N-p <sup>V</sup> -p <sup>III</sup> (S)	Thiophosphonat/ Thiophosphat-Derivat eines Phosphor(III),
p <sup>III</sup> -N-p <sup>V</sup> (S)	Phosphor(V) gemischten diphosphorylierten Nucleosids
p <sup>V</sup> -N-p <sup>III</sup> (S)	
p <sup>III</sup> -N-p <sup>III</sup> -N	Dinucleosiddiphosphonat
N-p <sup>III</sup> -p <sup>III</sup> -N	
p <sup>V</sup> -N-p <sup>V</sup> -N	Dinucleotid
N-p <sup>V</sup> -p <sup>V</sup> -N	
p <sup>III</sup> -N-p <sup>V</sup> -N	Phosphor(III), Phosphor(V) gemischtes Dinucleotid
N-p <sup>III</sup> -p <sup>V</sup> -N	
NTP	Nucleosidtriphosphat
N-p <sup>V</sup> -p <sup>V</sup> -p <sup>III</sup>	Phosphor(III), Phosphor(V) gemischtes triphosphoryliertes
p <sup>III</sup> -N-p <sup>V</sup> -p <sup>V</sup>	Nucleosid
p <sup>III</sup> -N(p <sup>V</sup> )-p <sup>V</sup>	
p <sup>V</sup> -p <sup>V</sup> -N-cp <sup>V</sup>	gemischtes (α-)zyklisches Nucleosidtriphosphat
p <sup>V</sup> -N-cp <sup>V</sup> -p <sup>V</sup>	
p <sup>III</sup> -p <sup>V</sup> -N-cp <sup>V</sup>	Phosphor(III), Phosphor(V) gemischtes (α-)zyklisches
p <sup>III</sup> -N-cp <sup>V</sup> -p <sup>V</sup>	Nucleosidtriphosphat
p <sup>V</sup> -p <sup>V</sup> -N-cp <sup>III</sup>	
5'-p <sup>V</sup> -A-3'-p <sup>V</sup> -5'-A	5'-Adenylsäure-3', 5'-adenosinphosphat

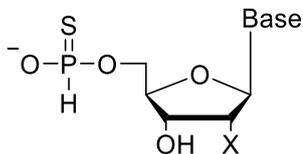
Exemplarische Strukturen der Phosphorverbindungen



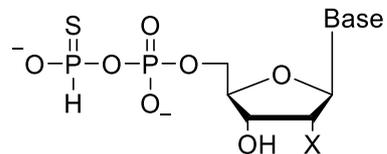
**N-p<sup>III</sup>** Y = H  
**N-p<sup>V</sup>** Y = O<sup>-</sup>



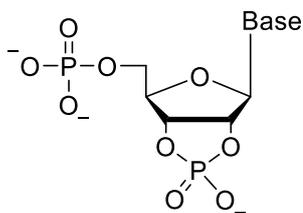
**N-p<sup>III</sup>-p<sup>III</sup>** Y = Z = H  
**N-p<sup>V</sup>-p<sup>III</sup>** Y = O<sup>-</sup>, Z = H



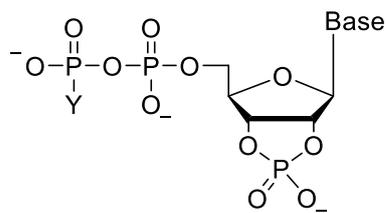
**N-p<sup>III</sup>(S)**



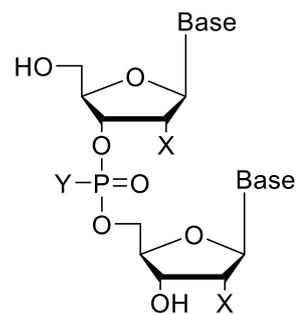
**N-p<sup>V</sup>-p<sup>III</sup>(S)**



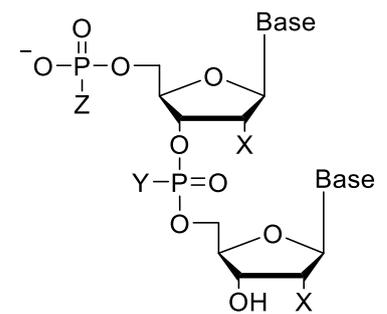
**p<sup>V</sup>-N-cp<sup>V</sup>**



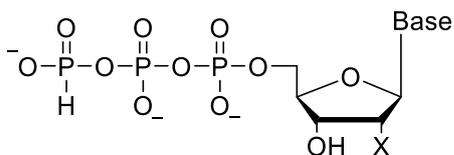
**p<sup>V</sup>-p<sup>V</sup>-N-cp<sup>V</sup>** Y = O<sup>-</sup>  
**p<sup>III</sup>-p<sup>V</sup>-N-cp<sup>V</sup>** Y = H



**N-p<sup>III</sup>-N** Y = H  
**N-p<sup>V</sup>-N** Y = O<sup>-</sup>



**p<sup>III</sup>-N-p<sup>III</sup>-N** Y = Z = H  
**p<sup>III</sup>-N-p<sup>V</sup>-N** Y = O<sup>-</sup>, Z = H  
**p<sup>V</sup>-N-p<sup>V</sup>-N** Y = Z = O<sup>-</sup>



**N-p<sup>V</sup>-p<sup>V</sup>-p<sup>III</sup>**

Exemplarische Strukturen der Phosphorverbindungen (Ribonukleoside: X = OH, Desoxyribonukleoside: X = H). Für die Mehrheit der phosphorylierten Produkte erfolgte keine Bestimmung der Konstitutionsisomere. Ein Großteil der möglichen Phosphonat- und Phosphatverknüpfungen wird mithilfe der Benennungen und Abkürzungen veranschaulicht. Diese nehmen Bezug auf die Gesamtheit der entstandenen Isomere.

**Mineralien**

Akaganeit	$\beta\text{-FeO(OH,Cl)}$
Apatit	$\text{Ca}_5[(\text{PO}_4)_3(\text{F,Cl,OH})]$
Brucit	$\text{Mg(OH)}_2$
Childrenit	$\text{FeAlPO}_4(\text{OH})_2 \times \text{H}_2\text{O}$
Chromit	$\text{FeCr}_2\text{O}_4$
Covellin	$\text{CuS}$
Goethit	$\alpha\text{-FeO(OH)}$
Hämatit	$\text{Fe}_2\text{O}_3$
Kaolinit	$\text{Al}_4[\text{Si}_4\text{O}_{10}](\text{OH})_8$
Magnetit	$\text{Fe}_3\text{O}_4$
Markasit	$\text{FeS}_2$ (orthorhombische Modifikation)
Perryit	$(\text{Ni,Fe})_8(\text{Si,P})_3$
Pyrit	$\text{FeS}_2$ (kubische Modifikation)
Quarz	$\text{SiO}_2$
Schreibersit	$(\text{Fe,Ni,Cr})_3\text{P}$
Serpentin	$\text{Mg}_{2.85}\text{Fe}_{0.15}\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$
Siderit	$\text{FeCO}_3$
Whitlockit	$\text{Ca}_9\text{Mg}(\text{PO}_4)_6(\text{PO}_3\text{OH})$
Wüstit	$\text{FeO}$



---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2 Kenntnisstand</b>	<b>5</b>
<b>2.1 Der Ursprung des Lebens</b>	<b>7</b>
2.1.1 Die frühe Erde	7
2.1.2 Reaktionen in und mit Schwefeldioxid	14
2.1.3 Konzepte zur Entstehung von Leben	16
<b>2.2 Präbiotische Peptidkondensationen</b>	<b>19</b>
<b>2.3 Präbiotische Phosphorylierungsreaktionen</b>	<b>30</b>
<b>2.4 Kapillarelektrophorese zur Trennung komplexer Mischungen</b>	<b>40</b>
2.4.1 Kapillarelektrophorese-Massenspektrometrie Kopplung (CE-MS)	42
<b>3 Zielsetzung</b>	<b>45</b>
<b>4 Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>49</b>
<b>4.1 Metall-vermittelte Peptidbildung in flüssigem Schwefeldioxid</b>	<b>51</b>
4.1.1 Kupfer-vermittelte Peptidbildung	51
4.1.2 Eisen-vermittelte Peptidbildung	58
<b>4.2 Phosphorylierung in flüssigem Schwefeldioxid</b>	<b>72</b>
4.2.1 Untersuchung der Reaktionsbedingungen	73
4.2.2 Phosphorylierung der kanonischen Nukleoside	86
4.2.3 Phosphorylierung einer Nukleosidmischung	88
4.2.4 Phosphorylierung anderer präbiotisch relevanter Substrate	90
<b>5 Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>95</b>
<b>6 Experimenteller Teil</b>	<b>103</b>
<b>6.1 Allgemeine Angaben</b>	<b>105</b>
6.1.1 Chemikalien und Lösungsmittel	105
6.1.2 CE	105
6.1.3 CE-MS-Interface	106
6.1.4 Kugelmühle	106

6.1.5 Elementaranalyse	106
<b>6.2 Reaktionen in flüssigem Schwefeldioxid</b>	<b>107</b>
6.2.1 Druckapparaturen für die Reaktionen in flüssigem Schwefeldioxid	107
<b>6.3 Metall-vermittelte Peptidbildung in flüssigem Schwefeldioxid</b>	<b>108</b>
6.3.1 Kupfer-vermittelte Peptidbildung	108
6.3.2 Eisen-vermittelte Peptidbildung mit Glycin und L-Alanin	109
6.3.3 Eisen-vermittelte Peptidbildung mit der Aminosäuremischung	109
6.3.4 CE-MS-Messungen der Peptidmischungen	110
6.3.5 Belegen der Kapillaren mit LPA	110
6.3.6 Quantifizierung der Glycin- und L-Alanin-basierten Dipeptide an der CE	111
<b>6.4 Phosphorylierung in flüssigem Schwefeldioxid</b>	<b>111</b>
6.4.1 CE-MS-Analyse der phosphorylierten Verbindungen	112
6.4.2 Quantifizierung der Nukleotide an der CE	112
6.4.3 Identifikation der Schwefel-Spezies an der CE	113
<b>7 Anhang</b>	<b>115</b>
<b>7.1 Metall-vermittelte Peptidbildung in flüssigem Schwefeldioxid</b>	<b>117</b>
7.1.1 Kupfer-vermittelte Peptidbildung	118
7.1.2 Eisen-vermittelte Peptidbildung	125
<b>7.2 Phosphorylierung in flüssigem Schwefeldioxid</b>	<b>141</b>
7.2.1 Versuche mit Adenosin als Modellsubstrat	141
7.2.2 Versuche mit anderen Nukleosiden	155
7.2.3 Versuche mit anderen präbiotisch relevanten Substraten	167
<b>8 Literaturverzeichnis</b>	<b>169</b>

# Kapitel 1

---

**Einleitung**



Die Frage nach der Entstehung des Lebens bewegt die Menschheit seit jeher. Gegenwärtig steht die Thematik nicht zuletzt aufgrund von Expeditionen hinsichtlich der Bewohnbarkeit anderer Planeten sowie der Forschung zu künstlichem Leben im Fokus.<sup>[1-3]</sup>

Intensiver Forschung zum Trotz sind viele Fragen zum Ursprung des Lebens bis heute unbeantwortet. Ursächlich hierfür ist vor allem die Abwesenheit kontaminationsfreier Gesteinsproben aus dem Hadaikum und frühen Archaikum.<sup>[4]</sup> In Konsequenz dessen können die Reaktionsbedingungen der frühen Erde, wie Temperatur, Druck, Verfügbarkeit anorganischer Reaktanden und Atmosphärenzusammensetzung, nicht exakt rekonstruiert werden.<sup>[5-6]</sup> Erschwerend hinzu kommen verschiedene Auffassungen dessen, was Leben ausmacht. Als charakteristische Fähigkeiten lebender Systeme werden in einer Vielzahl von Definitionen Evolution, Selbstreplikation, Stoffwechselaktivität und Kompartimentbildung genannt.<sup>[7]</sup>

Studien verschiedener Forschungsrichtungen, wie der Geowissenschaften oder der Astrophysik, liefern potenzielle Rahmenbedingungen für präbiotische Reaktionen,<sup>[8-10]</sup> in denen anorganische Reaktanden zu ersten kleinen organischen Molekülen umgewandelt werden. Die präbiotische Chemie befasst sich darüber hinaus auch mit dem Folgeschritt, der Oligomerisierung bzw. Polymerisation dieser Monomere zu biochemisch relevanten Polymeren. Eine hohe Kompatibilität dieser Umsetzungen mit verschiedenen präbiotisch plausiblen Szenarien, wie hydrothermalen Quellen,<sup>[11-12]</sup> vulkanischen Umgebungen oder wässrigen Reaktionsorten,<sup>[13-14]</sup> ist erwünscht. Des Weiteren ist eine hohe Toleranz gegenüber anderen Substraten sowie Reaktionspfaden zu verschiedenen Biopolymeren vorteilhaft, da auf der frühen Erde höchstwahrscheinlich komplexe Mischungen vorlagen. Wie die Transformation dieser abiotischen Prozesse hin zu lebenden Organismen ablief, ist ebenfalls unklar.<sup>[15]</sup> Verschiedene Theorien, wie die RNA-Welt- oder die Peptid-Welttheorie, fokussieren oben genannte Fähigkeiten zu Beginn auf eine Stoffklasse.<sup>[16-18]</sup> Dementgegen steht die Metabolismus-Theorie und der *Systems Chemistry* Ansatz.<sup>[19-22]</sup> Bei letzterem soll ein Mehrwert an Funktionalität durch die Koevolution verschiedener Stoffklassen ermöglicht worden sein.<sup>[19]</sup>

Bei einer Vielzahl präbiotisch relevanter Umsetzungen, wie beispielsweise bei Peptidbildungen oder Phosphorylierungsreaktionen, handelt es sich um Kondensationen. Diese sind aufgrund des thermodynamischen Gleichgewichts nur eingeschränkt kompatibel mit potenziellen wässrigen Reaktionsumgebungen auf der frühen Erde.<sup>[23-24]</sup> Aus diesem Grund werden im Rahmen der vorliegenden Arbeit präbiotisch plausible Reaktionspfade zu Kondensationsprodukten in flüssigem Schwefeldioxid als wasserentziehendem Reaktionsmedium untersucht und entwickelt. Im Hadaikum könnten erhöhte Atmosphärendrücke dazu geführt

haben,<sup>[10, 25-29]</sup> dass Schwefeldioxid vulkanischen Ursprungs in flüssiger Form vorlag.<sup>[29-30]</sup> Durch den Einsatz von Metallen und eines neutralen Phosphorylierungsreagenzes soll zudem die kinetische Inhibition nukleophiler Angriffe auf elektrophile Zentren mit hoher benachbarter negativer Ladung überwunden werden.<sup>[24, 31-33]</sup> Dabei werden mögliche Pfade zu Produkten, in denen Schwefeldioxid gleichzeitig als Oxidationsmittel agiert, aufgezeigt.

# Kapitel 2

---

**Kenntnisstand**



## 2.1 Der Ursprung des Lebens

### 2.1.1 Die frühe Erde

Vor 4.56 Milliarden Jahren (Ga) entstand unser Sonnensystem.<sup>[34-35]</sup> Das Alter der Erde wird auf 4.54 Ga datiert.<sup>[36]</sup> Im Anschluss daran soll vor 4.5 Ga eine Kollision mit einem Protoplaneten zur Bildung des Mondes geführt haben.<sup>[35, 37-39]</sup> Die folgende Abkühlung der Erde über einen Zeitraum von Millionen von Jahren führte zur Bildung der Erdkruste und schuf eine wichtige Randbedingung für das Vorhandensein von flüssigem Wasser und somit von Leben.<sup>[40]</sup> Anhand von Untersuchungen der Sauerstoffisotopenverhältnisse in Zirkonen wird von einer Existenz flüssigen Wassers vor bis zu 4.4-4.3 Ga ausgegangen.<sup>[40-42]</sup> Vermehrte Meteoriteneinschläge um 3.9 Ga könnten sich jedoch kontraproduktiv auf die Entstehung von Leben auf der Erde ausgewirkt haben.<sup>[43-46]</sup> Erwärmung und Zerstörung in Folge der Kollisionen könnten zum Verschwinden oberflächennaher Organismen geführt haben, wohingegen ein solches Szenario für Organismen in der Tiefsee eher weniger plausibel erscheint.<sup>[47]</sup>

Isotopisch leichte Graphiteinschlüsse in bis zu 4.1 Ga alten Zirkonen werden als älteste Indizien terrestrischen Lebens genannt.<sup>[48-52]</sup> Als Ursache für das hohe  $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ -Isotopenverhältnis sind neben der enzymatischen Kohlenstofffixierung jedoch auch Prozesse, wie FISCHER-TROPSCH Reaktionen, die Disproportionierung von Siderit ( $\text{FeCO}_3$ ) oder der Einbau meteoritischer Materialien denkbar.<sup>[48, 53]</sup> Ein abiotischer Ursprung kann somit nicht vollständig ausgeschlossen werden. Als verlässlichere Hinweise werden ca. 3.5 Ga alte Sedimentgesteine (Stromatolithen) betrachtet, die in Folge der Stoffwechselaktivität von Mikroorganismen entstanden.<sup>[35, 54-56]</sup> Ein Fund mikrobiell induzierter Sedimentstrukturen (MISS) weist in etwa dasselbe Alter auf.<sup>[57]</sup> Darüber hinaus lassen Mikrofossilien photosynthetische Aktivität vor 3.3-3.5 Ga vermuten.<sup>[58]</sup> Die Entstehung von Biomolekülen ist somit auf einen Zeitraum vor mehr als 3.5 Ga zu datieren. Unter Berücksichtigung der Hinweise zur Existenz von flüssigem Wasser stehen für den Ablauf präbiotischer Reaktionen das späte Hadaikum sowie das frühe Archaikum (4.4-3.5 Ga) zur Verfügung.<sup>[9]</sup>

Die auf der frühen Erde vorherrschenden physikalischen und chemischen Bedingungen in diesem Zeitraum können aufgrund fehlender bzw. sehr seltener Gesteinsproben nicht exakt definiert werden, weshalb verschiedene Gegebenheiten zur Diskussion stehen.<sup>[4-6]</sup> Es wird angenommen, dass die Atmosphäre der frühen Erde einen sauerstoffarmen, schwach reduzierenden Charakter hatte. Als Hauptkomponenten werden Kohlenstoffdioxid, Stickstoff, Wasser und Wasserstoff in Betracht gezogen.<sup>[4-5, 25, 59]</sup> Kohlenstoffmonoxid, Methan,

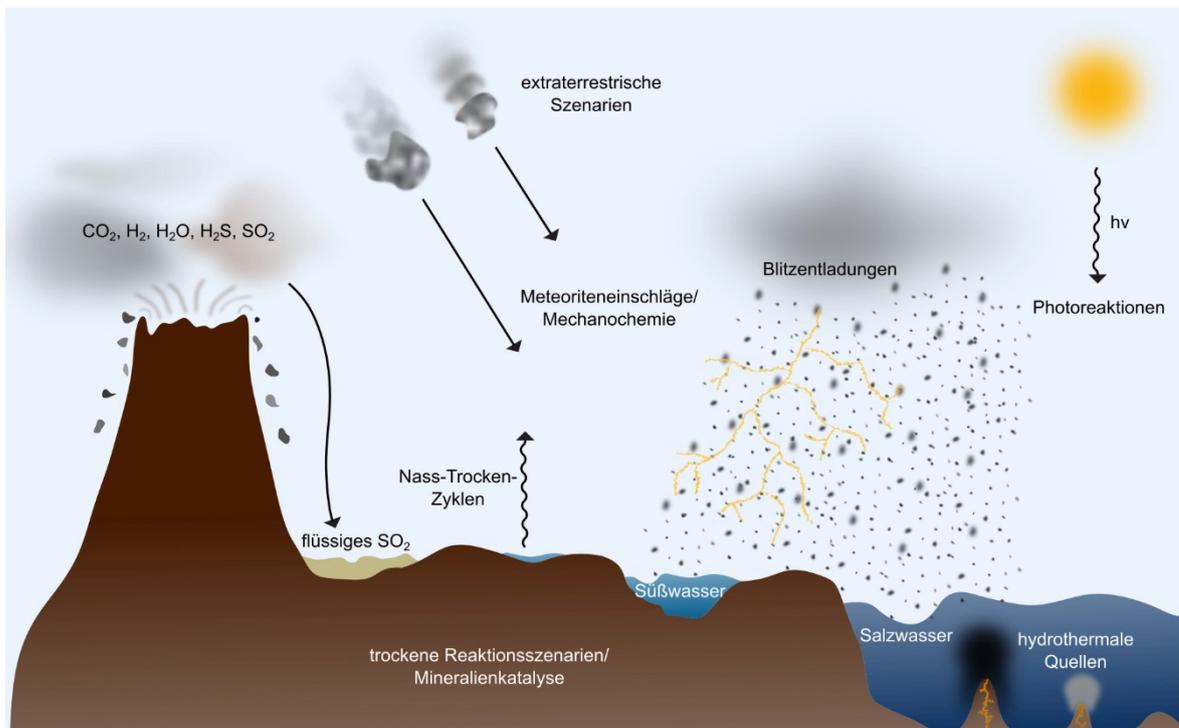
Schwefelwasserstoff, Schwefeldioxid und Ammoniak könnten in kleineren Konzentrationen vorgelegen haben.<sup>[5, 25, 59]</sup> Auch ist nicht bekannt, welcher Druck vorherrschte. Im Gespräch sind erhöhte Drücke bis hin zu 200 bar für Kohlenstoffdioxid und bis zu 2-3 bar für Stickstoff.<sup>[10, 25-29]</sup> Ungeklärt ist darüber hinaus auch über welchen Zeitraum es im Anschluss durch Verwitterung und Carbonatbildung zu einem Druckabfall kam.<sup>[25, 27, 60]</sup> Ein starker Anstieg der Sauerstoffkonzentration wird für den Zeitraum von vor 2.5-2.0 Ga angenommen.<sup>[61-62]</sup> Ursächlich für die große Sauerstoffkatastrophe (GOE: *great oxidation event*) waren vermutlich verstärkte photosynthetische Aktivität sowie ein geringeres Angebot an Reduktionsmitteln aus dem Erdmantel, verursacht durch die Entstehung der Kontinente.<sup>[62]</sup>

Die Frage nach der Beschaffenheit der frühen Atmosphäre spielt auch bei der Erforschung der Temperatur zum Zeitpunkt der Entstehung des Lebens eine große Rolle.<sup>[63-64]</sup> Die junge Sonne wies eine ca. 30% geringere Strahlungsleistung auf, was unter Annahme der modernen Atmosphärenzusammensetzung in einem Eis bedeckten Planeten resultieren würde.<sup>[10, 60]</sup> Dementgegen steht die Existenz flüssigen Wassers, was als Paradoxon der jungen Sonne bezeichnet wird.<sup>[60]</sup> Temperaturen oberhalb des Gefrierpunktes sind in Modellen mit verschiedenen Treibhausgasen erreichbar.<sup>[63-64]</sup> Außerdem wird ein Schmelzen der Ozeane in Folge von Meteoriteneinschlägen diskutiert, bei dem in tieferen, möglicherweise flüssigen, Ozeanschichten gespeicherte Gase an die Oberfläche gelangen konnten.<sup>[60]</sup> Diese könnten wiederum das Gefrieren der Ozeane zwischen mehreren Einschlägen verhindert haben.<sup>[60]</sup> Darüber hinaus erscheinen lokale Temperaturunterschiede wahrscheinlich. So ist zum Beispiel eine Unterbrechung der Eisdecke in räumlich begrenzten Gebieten um Vulkane vorstellbar.<sup>[25]</sup>

Weiterhin ist auch die Zusammensetzung der Lithosphäre von großer Bedeutung für die präbiotische Chemie. Nach der Bildung primärer chondritischer Mineralien vor über 4.55 Ga kam es zur Modifikation, Metamorphose und Differenzierung der Planetesimale.<sup>[9]</sup> Die folgende Mineralentwicklung beruht auf der Überarbeitung der Erdkruste sowie des Erdmantels. So beeinflussen etwa Vulkanismus und Ausgasen das Mineralienspektrum und es kommt zur Granitbildung.<sup>[9]</sup> Plattentektonische Auswirkungen auf die Mineralienvielfalt werden frühestens vor 3.0 Ga erwartet.<sup>[9, 65]</sup> Jedoch ist unklar, wann Plattentektonik sowie Subduktion erstmals auftraten, weshalb auch der Zeitpunkt der Bildung von Kontinenten weiterhin diskutiert wird.<sup>[9, 66]</sup> Zusätzlich nahmen bis zum Eintreten des GOE anoxische, abiotische und biotische Prozesse Einfluss auf Mineralien. Das Mineralienspektrum auf der frühen Erde wird somit wesentlich kleiner gewesen sein als das auf der modernen Erde, da ein Großteil der heutigen Mineralienwelt auf Wechselwirkungen mit Lebewesen zurückzuführen ist.<sup>[9]</sup> Des Weiteren wurde die Mineralienvielfalt auf der frühen Erde auch durch den Charakter der Atmosphäre beeinflusst.<sup>[8]</sup> So sind unter anoxischen neutralen Bedingungen

Verbindungen mit Metallen in niedrigen Oxidationsstufen stabil, sodass unter anderem die Existenz reduzierter Eisenspezies denkbar ist.<sup>[8]</sup> Obwohl prinzipiell von einer sauerstoffarmen Atmosphäre ausgegangen wird,<sup>[5, 35, 62, 67]</sup> können auch bei der Betrachtung der Sauerstoffkonzentration lokale Unterschiede nicht ausgeschlossen werden.<sup>[8]</sup> So könnten abiotische Prozesse wie die Photodissoziation von Wasser, Vulkanismus, Photooxidation oder Ionisation in Folge von Blitzentladungen für eine vermehrte Sauerstoffbildung verantwortlich sein.<sup>[68]</sup> Eine vorläufige Zusammenstellung weit verbreiteter bzw. volumentechnisch signifikanter Mineralien des Hadaikums weist unter anderem Elemente und Legierungen, Carbide, Nitride, Phosphide, Silizide, Sulfide, Arsenide, Halogenide, Oxide, Hydroxide, Carbonate, Phosphate und Silikate auf.<sup>[8]</sup>

Zusätzlich zum mineralischen Inventar der frühen Erde waren für präbiotische Reaktionen wahrscheinlich auch kleine organische Moleküle extraterrestrischen Ursprungs verfügbar. So konnten Aminosäuren in interplanetarem Staub und auf Meteoriten nachgewiesen werden.<sup>[69-71]</sup> Letztere beinhalten darüber hinaus Carbonsäuren, Amine, Amide, Sulfon- sowie Phosphonsäuren, Alkohole, Nukleobasen sowie Fettsäuren.<sup>[70-72]</sup> Kometen wiederum weisen unter anderem Ammoniak, Acetylen, Ameisensäure, Formamid und Formaldehyd auf.<sup>[69]</sup>



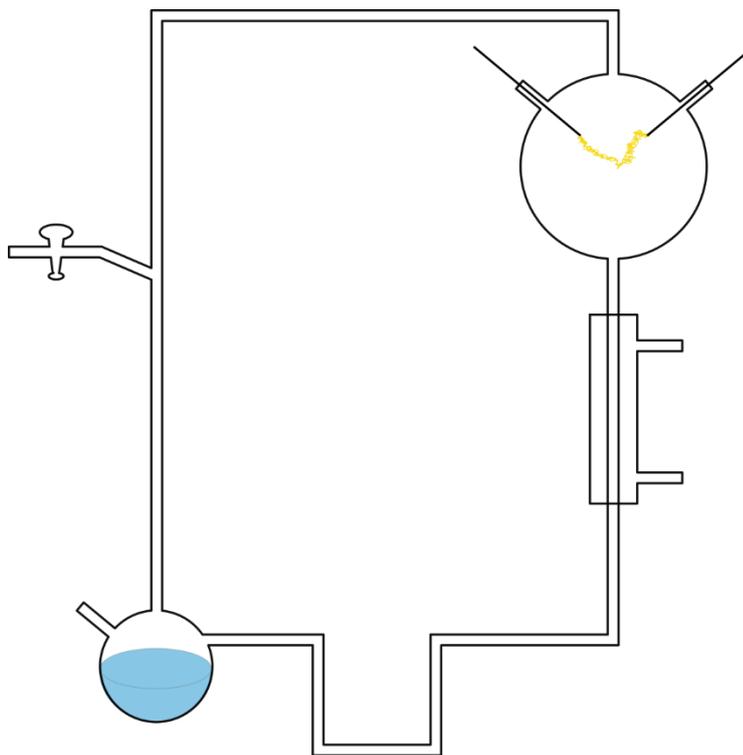
**Abbildung 1:** Schematische Darstellung der für die frühe Erde diskutierten Reaktionsszenarien.

Zusätzlich zu global diskutierten Bedingungen induzieren abiotische Prozesse lokal sowie temporär unterschiedliche Gegebenheiten.<sup>[8, 27, 35]</sup> Darüber hinaus liegen Jahreszeiten sowie Mikrohabitate im Bereich des Möglichen.

Die Unklarheit bezüglich der Bedingungen auf der frühen Erde spiegelt sich in der Vielfalt an Theorien zur Entstehung erster biologisch relevanter Verbindungen wider. Abbildung 1 gibt eine Übersicht über die diskutierten Reaktionsszenarien auf der frühen Erde.

### Ursuppe

DARWIN schlug 1871 einen „warmen kleinen Teich“ als Ursprungsort des Lebens vor.<sup>[13]</sup> Ein Energieeintrag, z. B. durch Licht oder Elektrizität, sollte die Entstehung erster organischer Moleküle aus im Wasser gelösten Ammonium- und Phosphatsalzen herbeiführen. 1953 simulierte MILLER ein solches Szenario im Labor. Die Einwirkung von Koronaentladungen auf eine Gasmischung bestehend aus Methan, Ammoniak, Wasserdampf und Wasserstoff führte zur Bildung proteinogener und nicht-proteinogener Aminosäuren (Abbildung 2).<sup>[73-74]</sup>



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung der Versuchsanordnung des MILLER-Experiments.<sup>[74]</sup>

Mechanistische Untersuchungen von Miller ergaben, dass in Folge der Entladungen Aldehyde und Blausäure gebildet wurden. Diese können bekannterweise laut der STRECKER-Synthese zu Amino- und Hydroxynitrilen reagieren. Deren Hydrolyse liefert abschließend Amino- und Hydroxysäuren.<sup>[75]</sup> Schwefelhaltige Aminosäuren waren in Experimenten mit reduzierenden, schwefelwasserstoffhaltigen Atmosphären zugänglich.<sup>[76-77]</sup> Die von MILLER und UREY angenommene stark reduzierende Atmosphärenzusammensetzung ist,<sup>[73, 78]</sup> wie oben beschrieben, jedoch nach heutigem Wissenstand überholt. Experimente mit weniger stark reduzierenden bzw. neutralen Modellatmosphären lieferten ebenfalls Aminosäuren sowie weitere kleine Moleküle, allerdings in geringeren Ausbeuten.<sup>[79-80]</sup> Darüber hinaus

wurde der Einsatz verschiedenster präbiotisch plausibler Energiequellen, wie z. B. ultravioletter (UV) und Protonenstrahlung erprobt.<sup>[76, 81]</sup> Letztgenanntes Experiment stellt eines der wenigen dar, in denen sogar Nukleobasen nachgewiesen werden konnten.<sup>[81-82]</sup>

Als wässrige Reaktionsorte auf der frühen Erde kommen des Weiteren auch salzwasserhaltige Ozeane in Frage. Der Urozean wies vermutlich eine höhere Salzkonzentration sowie einen niedrigen pH-Wert (~ 5.8) als die modernen Ozeane auf.<sup>[83-84]</sup> In Entladungsexperimenten konnten auch mit Salzzusätzen sowie bei verschiedenen pH-Werten Aminosäuren erhalten werden.<sup>[85-87]</sup>

### Hydrothermale Quellen

Ozeane stellen nicht nur in Bezug auf die Ursuppen-Theorie eine potenzielle Umgebung für die Entstehung von Leben dar. Hydrothermale Quellen am Meeresboden unterstützen die Idee eines autotrophen Lebensursprungs.<sup>[11-12]</sup> Als schwarze Raucher werden hydrothermale Quellen bezeichnet, die sich unmittelbar über Verbreiterungszonen am mittelozeanischen Rücken befinden. Sie entstehen in Folge vulkanischer Aktivität durch Lavaaustritt aus Magmakammern.<sup>[11]</sup> Kaltes Ozeanwasser tritt durch Risse im ozeanischen Boden in die Kruste ein und wird beim Passieren der Magmakammern aufgeheizt. Konvektionsgetrieben steigt das Wasser auf, um an der Schlotöffnung mit einer Temperatur von ca. 400 °C auf das kalte Meerwasser zu treffen.<sup>[88-89]</sup> Die ausströmende Flüssigkeit (pH 2-3) beinhaltet gelöste Eisen(II)- und Mangan(II)-Salze und ist in Folge der vulkanischen Aktivität reich an Kohlenstoffdioxid, Schwefelwasserstoff, Wasserstoff und Methan.<sup>[88-89]</sup> Somit führt das Aufeinandertreffen der heißen Hydrothermalflüssigkeit mit dem kalten Meerwasser zu Sulfat- und Sulfidniederschlägen.<sup>[88]</sup> Neben den schwarzen Rauchern sind seit Anfang des Jahrtausends auch weiße Raucher bekannt.<sup>[90]</sup> Diese befinden sich nicht unmittelbar an der Verbreiterungszone, sondern mehrere Kilometer davon entfernt. Vergleichbar zu den schwarzen Rauchern fließt Meerwasser durch die Kruste, passiert aber nicht unmittelbar magmatische Kammern, sodass lediglich Temperaturen von ca. 200 °C erreicht werden.<sup>[11]</sup> Das durchflossene magnesium- und eisenhaltige Olivingestein reagiert dabei mit dem Meerwasser zu Serpentin ( $\text{Mg}_{2.85}\text{Fe}_{0.15}\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$ ), Magnetit ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), Brucit ( $\text{Mg}(\text{OH})_2$ ), Wasserstoff sowie Kohlenwasserstoffen.<sup>[90]</sup> Der bei der als Serpentinisierung bezeichneten Reaktion freigesetzte Wasserstoff kann wiederum Kohlenstoffdioxid aus dem Mantelgestein zu Kohlenwasserstoffen reduzieren.<sup>[11, 91]</sup> Neben der Konvektion trägt auch die exotherm verlaufende Serpentinisierung zur Zirkulation und schließlich zum Austritt des vergleichsweise kühlen Wassers (40-91 °C) bei.<sup>[90, 92]</sup> Die hydrothermale Flüssigkeit der weißen Raucher ist alkalisch (pH 9-11) und enthält hauptsächlich Wasserstoff und Methan.<sup>[90-91]</sup> Kohlenstoffdioxid und gelöste Metalle sind nur in niedrigen Konzentrationen

enthalten.<sup>[88]</sup> Beim Zusammentreffen des ausströmenden heißen Wassers mit dem kalten Meereswasser werden Carbonate ausgefällt, wodurch die Kaminstrukturen an Größe gewinnen.<sup>[92]</sup> Hydrothermale Quellen stellen somit eine extreme Umgebung für Leben dar. Nichtsdestotrotz geben 3.25 Ga alte Pyritfilamente, bei denen es sich um Mikroorganismenrückstände handeln könnte, Hinweise auf einen sehr alten chemotrophen, hydrothermalen Lebensraum.<sup>[93]</sup> Zudem sind Archaeen, die ihre Replikation bei bis zu ca. 121 °C aufrecht erhalten können, an extreme Bedingungen angepasst.<sup>[94]</sup> Damit im Einklang steht, dass die Schnittstelle an weißen Rauchern, an der Hydrothermalflüssigkeit und Meerwasser aufeinander treffen, Methan bzw. Schwefel oxidierenden Bakterien einen Lebensraum bietet.<sup>[11]</sup>

In Folge der Unterschiede zwischen Hydrothermalflüssigkeit und Meerwasser liegen an den Quellen sowohl chemische als auch Temperaturgradienten vor.<sup>[21]</sup> An weißen Rauchern wird aufgrund des alkalischen Ausstoßes zusätzlich auch ein pH-Gradient hervorgerufen.<sup>[12]</sup> Denkbar ist, dass frühe Lebewesen über Adenosintriphosphat (ATP)-Synthasen verfügten und so geochemische Protonengradienten in nutzbare chemische Energie umwandeln konnten.<sup>[12, 22]</sup> Abiotische Gradienten könnten als Vorlage für später auftretende biotische Prozesse zum Potentialaufbau gedient haben.<sup>[12, 22]</sup>

Eng verbunden mit dem Szenario der Hydrothermalquellen ist die von WÄCHTERSHÄUSER postulierte Eisen-Schwefel-Welt.<sup>[20]</sup> In dieser werden durch die Bildung von Pyrit ( $\text{FeS}_2$ ) aus FeS und Schwefelwasserstoff Reduktionsäquivalente für die Kohlenstoffdioxidfixierung zur Verfügung gestellt. Deren anionische Produkte könnten sich wiederum an die positiv geladene Pyritoberfläche anlagern, wodurch sich dort ein Stoffwechsel entwickeln könnte.<sup>[20, 95-96]</sup>

### **Extraterrestrischer Ursprung**

Im Gegensatz zu den beschriebenen irdischen Entstehungsszenarien sieht die Panspermie-Theorie die Entstehung von Leben an einem beliebigen Ort im Universum vor, der geeignete Rahmenbedingungen aufweist.<sup>[97]</sup> In der Vergangenheit wurden hierfür z. B. der Mars oder der Jupitermond Europa vorgeschlagen.<sup>[98]</sup> Im Anschluss soll sich das Leben durch das Universum ausgebreitet haben. Als Transportmittel wurden hierbei Meteoriten vorgeschlagen.<sup>[97]</sup> Allerdings werden weiterhin mehrere zentrale Aspekte diskutiert. So setzten im Weltall herrschende Strahlung, extreme Temperaturen und Hochvakuum extreme Lebensformen voraus und es ist nach wie vor fraglich,<sup>[99]</sup> ob Organismen robust genug für eine längere Reise in dieser Umgebung wären.<sup>[97]</sup> Die Lebenszeit spielt auch bei der Frage nach der Einfangwahrscheinlichkeit der Meteoriten eine entscheidende Rolle. Berechnungen zeigen, dass diese sehr gering ist.<sup>[100]</sup> Ein längeres Bestehen der Organismen unter den Extrembedingungen würde eine längere Reise ermöglichen und somit auch die

Einfangswahrscheinlichkeit positiv beeinflussen.<sup>[100-101]</sup> Um die Reisezeit in dieser lebensfeindlichen Umgebung zu minimieren sind zudem hohe Geschwindigkeiten des Transportmittels wünschenswert.<sup>[101]</sup> Dem gegenüber steht jedoch die sinkende Überlebensrate der Organismen beim Aufprall.<sup>[98, 100]</sup> Gegner der Panspermie-Theorie argumentieren außerdem, dass die zentrale Frage nach dem Ursprung des Lebens weiterhin ungeklärt bleibt.<sup>[97]</sup> Aktuelle Studien gehen diesen Fragen nach: So wurden unter anderem vom Mars stammende Meteoriten daraufhin untersucht, ob der Einschlag auf der Erde zu einer thermischen Sterilisation führte.<sup>[102]</sup> Anhand von Langzeitexperimenten wurde zudem versucht die Überlebenswahrscheinlichkeit von Bakteriosporen im Weltraum zu ermitteln.<sup>[99]</sup> Eine andere Herangehensweise liegt in der Abschwächung der Panspermie-Theorie, welche annimmt, dass Organismen die Reise nicht überleben, jedoch das tote Material der Entstehung von Leben auf der Erde zuträglich ist.<sup>[103]</sup>

### **Nass-Trocken-Zyklen und trockene Szenarien**

Bis hierhin wurden lediglich wässrige Szenarien für die frühe Erde diskutiert. Dementgegen steht, dass Reaktionen zur Bildung kleiner biochemisch relevanter Moleküle – und insbesondere deren Polymerisation – oft Kondensationsschritte beinhalten, die in wässriger Lösung thermodynamisch unvorteilhaft sind.<sup>[23-24]</sup> Nass-Trocken-Zyklen, die auf der frühen Erde in Folge von Regen, Gezeiten, Frost, Flut, Tages- sowie Jahreszeiten und aktiven Geysiren und heißen Quellen plausibel erscheinen,<sup>[104-106]</sup> stellen eine Lösung für dieses zentrale Problem dar. Zyklische De- und Rehydratisierung schafft stets Systemzustände fernab vom Gleichgewicht,<sup>[104]</sup> wie es für Leben erforderlich ist.<sup>[11]</sup> In der Dehydratisierungsphase herrschen hohe Konzentrationen, die Moleküle sind jedoch ohne Einfluss von außen nicht mobil. Rehydratisierung führt anschließend zu einer Neuverteilung der Moleküle und ermöglicht so weitere Umsetzungen.<sup>[104]</sup> Ein positiver Effekt von Nass-Trocken-Zyklen wurde für die Polymerisation von Aminosäuren sowie in Phosphorylierungsreaktionen beobachtet.<sup>[107-110]</sup> Außerdem fand das Szenario auch Anwendung bei der präbiotischen Synthese von Nukleosiden und Estern.<sup>[108, 111]</sup> Als problematisch für ein solches Szenario werden unzureichende Hydratisierung sowie zu lange Trockenperioden erachtet.<sup>[105]</sup>

Dauerhaft trockene Szenarien, wie sie z. B. an Stränden oder in Wüstengebieten zu erwarten sind,<sup>[112-113]</sup> wurden in Peptidkondensationen<sup>[112]</sup> sowie bei der Bildung von Kohlenhydraten ebenfalls erprobt.<sup>[114-117]</sup> Mechanochemische Vorgänge, wie Erosionen, Meteoriten- und Kometeneinschläge, diagenetische Abläufe und Verwitterung, sowie Hitze stellen hierbei die erforderliche Energie bereit.<sup>[114-116]</sup>

## Nicht wässrige Reaktionsmedien

Ein spezifisches Problem der in Zusammenhang mit Nass-Trocken-Zyklen genannten Phosphorylierungsreaktionen ist die geringe Wasserlöslichkeit von Phosphatmineralien, wie z. B. Apatit ( $\text{Ca}_5[(\text{PO}_4)_3(\text{F}, \text{Cl}, \text{OH})]$ ),<sup>[118-120]</sup> die den Großteil des Phosphorvorkommens auf der frühen Erde ausgemacht haben.<sup>[8]</sup> Die Existenz verschiedener Reaktionsmedien auf der frühen Erde zusätzlich zu Wasser ist aufgrund der Unklarheit über die Bedingungen auf der frühen Erde denkbar. So könnten Formamid und eutektische Lösungsmittel Phosphate für die Bildung von Organophosphaten zugänglich gemacht haben.<sup>[109, 121-122]</sup> Phosphorylierungsreaktionen in mehreren Amidlösungsmittel sowie auch in eutektischen Medien verliefen erfolgreich.<sup>[122-124]</sup> Darüber hinaus wurde 3',5'-zyklisches Guanosinmonophosphat in (Dimethyl-)Formamid polymerisiert.<sup>[125]</sup>

## Vulkanische Reaktionsumgebungen

Zusätzlich zu den bereits beschriebenen Szenarien sind auch vulkanische Umgebungen interessante Schauplätze für den Ursprung des Lebens. YAMAGATA *et al.* konnten zeigen, dass in Wasser unlösliche Phosphatsalze durch vulkanische Aktivität in Polyphosphate höherer Löslichkeit überführt werden können.<sup>[14]</sup> Des Weiteren wurden vulkanische Gebiete auch für die Bildung von Hydroxy- und Aminosäuren vorgeschlagen.<sup>[126]</sup>

### 2.1.2 Reaktionen in und mit Schwefeldioxid

Vulkane stellen jedoch nicht nur eine potenzielle präbiotische Reaktionsumgebung dar, sie sind zugleich Lieferant von Schwefeldioxid und Schwefelwasserstoff auf der frühen Erde.<sup>[29-30]</sup> Da für diese im Vergleich zur modernen Erde eine erhöhte tektonische Aktivität erwartet wird, wird angenommen, dass die Schwefeldioxidemission von Vulkanen die heutige um etwa den Faktor drei überstieg.<sup>[29-30]</sup> Weiterhin wird von einer kontinuierlichen Emission der schwefelhaltigen Gase ausgegangen, da die Ausgasungen größtenteils nicht während der Eruptionsphasen erfolgten.<sup>[29]</sup> Um eine Aussage über die Verfügbarkeit von Schwefeldioxid auf der frühen Erde tätigen zu können, müssen neben der Beschaffenheit vulkanischer Ausgasungen auch mögliche Abbauege betrachtet werden. So könnten Regen oder Hydrolyse in den Ozeanen aber auch Oberflächenablagerungen zu einer Verringerung der atmosphärischen Schwefeldioxidkonzentration geführt haben.<sup>[29-30]</sup> Zusätzlich könnten photochemisch erzeugte Hydroxyl- und Sauerstoffradikale die Oxidation von Schwefeldioxid bewirkt haben.<sup>[29-30]</sup> BRIMBLECOMBE *et al.* berechneten, dass Schwefeldioxid 3.6 Tage stabil gegenüber der Oxidation durch Hydroxylradikale ist.<sup>[30]</sup> Photochemisch ist außerdem die Reduktion zu elementarem Schwefel möglich.<sup>[29]</sup> Die Fragestellung, welches Gewicht photochemische Reaktionen in Hinblick auf den gesamten Prozess der Entstehung von Leben

hatten, ist jedoch komplex, da UV-Strahlung als Energiequelle für die Entstehung organischer Verbindungen sowie auch für deren Abbau denkbar ist.<sup>[29]</sup>

Basierend auf diesen Überlegungen gehen KASTING *et al.* bei einem Oberflächendruck von 2.9 atm von einem Schwefeldioxidpartialdruck von  $5.8 \times 10^{-9}$  atm aus.<sup>[29]</sup> Auf  $1.3 \times 10^{-8}$  bestimmten HALVEY *et al.* den oberen Grenzwert für das Partialdruckverhältnis von Schwefeldioxid zu Kohlenstoffdioxid.<sup>[127]</sup> Außerdem werden mikromolare Konzentrationen schwefelhaltiger Anionen, welche in Folge der Hydrolyse von Schwefeldioxid und Schwefelwasserstoff auftreten, erwartet.<sup>[128]</sup>

Auch wenn aufgrund der Unklarheit über die auf der frühen Erde herrschenden Bedingungen die exakte Schwefeldioxidkonzentration nicht bekannt ist, sollte dieses prinzipiell verfügbar gewesen sein. Präbiotische Studien greifen diese Gegebenheit durch den Einsatz von (Hydrogen-)Sulfitsalzen auf.<sup>[129]</sup> Das Hydrolyseprodukt von Schwefeldioxid wurde hierbei vor allem als Reduktionsmittel verwendet. Beispiele sind die partielle Reduktion von Nitrit zu Hydroxylamin oder photochemische Reaktionen in Gegenwart von Eisen(II)-Salzen,<sup>[130]</sup> wie die reduktive HCN-Homologisierung oder die Reduktion von Glykolnitril.<sup>[131-132]</sup> Außerdem erzeugten CHEN *et al.* ausgehend von Schwefeldioxid oder alternativ von (Hydrogen-)Sulfiten in Kombination mit dem präbiotisch plausiblen Oxidationsmittel Kaliumhexacyanoferrat ( $K_3[Fe(CN)_6]$ ) ein Schwefeltrioxid-Intermediat, welches nucleophil von der Carboxylgruppe einer Aminosäure angegriffen werden kann. Nucleophile Substitution am Carbonylkohlenstoffatom mit einer zweiten Aminosäure führt zu Peptidbildung und Verdrängung von Sulfat.<sup>[133]</sup> Die Speicherung von Formaldehyd stellt eine weitere mögliche präbiotische Anwendung von Hydrogensulfiten dar.<sup>[134]</sup> Die reversible Reaktion mit Hydrogensulfiten zu Hydroxymethansulfonaten verhindert CANNIZZARO-Produkte und macht gleichzeitig in Folge der langsamen Rückreaktion Formaldehyd für präbiotische Umsetzungen verfügbar.<sup>[134]</sup>

Auch außerhalb des präbiotischen Kontextes findet Schwefeldioxid Anwendung in organischen und anorganischen Synthesen: So wird es in der Herstellung von Sulfonen und Sulfinensäuren aber auch als Ligand in Komplexen verwendet.<sup>[135-139]</sup> Schwefeldioxid ist darüber hinaus mit einem Siedepunkt von  $-10$  °C bei Atmosphärendruck sowie einem niedrigen Dampfdruck ( $\sim 3$  bar bei  $20$  °C) auch ein attraktives,<sup>[140-142]</sup> aprotisches,<sup>[140, 143]</sup> polares Lösungsmittel mit hoher Ionisationskraft, das leicht recycelt werden kann.<sup>[140, 144]</sup> Besonders gut löslich sind Anionen sowie kovalente n- und  $\pi$ -Elektronendonoren.<sup>[143, 145-146]</sup> Jedoch ist im Vergleich zu Wasser aufgrund der geringeren Dielektrizitätskonstante die Löslichkeit ionischer Verbindungen reduziert.<sup>[143]</sup> Darüber hinaus kann sich der Einsatz von Schwefeldioxid als Lösungsmittel positiv auf die Bildung von Nebenprodukten auswirken, da aufgrund

des niedrigen Schmelzpunktes von  $-75\text{ °C}$  Umsetzungen bei geringen Temperaturen möglich sind.<sup>[143]</sup> Flüssiges Schwefeldioxid wurde bereits in Ringschluss- sowie Ringöffnungsreaktionen,<sup>[140, 147]</sup> Komplexbildungsreaktionen,<sup>[148]</sup> Alkylierungs- sowie Alkoxylierungs- und Umlagerungsreaktionen als Lösungsmittel eingesetzt.<sup>[144, 149]</sup> Die LEWIS-Azidität des Lösungsmittels wird außerdem in Glykolysierungsreaktionen mit Glykosylfluoriden sowie in der RITTER-Reaktion ausgenutzt.<sup>[150-151]</sup> Letztere läuft in Schwefeldioxid ohne LEWIS-saure Additive ab.<sup>[151]</sup> Ein weiteres Anwendungsbeispiel stellen Polymerisationsreaktionen dar. In Letztgenannten kann Schwefeldioxid außerdem auch die Funktion des (Co-)Initiators, Aktivators oder eines Monomers einnehmen.<sup>[143]</sup>

Zwar wurde flüssiges Schwefeldioxid bis jetzt noch nicht als Lösungsmittel in präbiotischen Reaktionen eingesetzt, jedoch ist dessen Präsenz auf der frühen Erde angesichts des diskutierten erhöhten Atmosphärendrucks bei mit Raumtemperatur vergleichbaren Umgebungstemperaturen plausibel.<sup>[10, 25-29]</sup> Auch lokal bzw. temporär vorherrschende niedrige Temperaturen könnten die Existenz von flüssigem Schwefeldioxid begünstigt haben.

### 2.1.3 Konzepte zur Entstehung von Leben

Einen wesentlichen Schritt in der Entstehung von Leben stellt der Übergang von zuvor beschriebenen abiotischen Prozessen hin zu lebenden Organismen und schließlich dem LAST UNIVERSAL COMMON ANCESTOR (LUCA) dar. Die Transformation ist Gegenstand aktueller Forschung. Diese beschäftigt sich vor allem damit, in welcher Reihenfolge Replikation, Stoffwechsel und Kompartimentbildung auftraten und welche Stoffklasse diese Funktionen initial ermöglichte.<sup>[15]</sup> Darüber hinaus ist strittig, welcher Natur erste Abläufe waren. Verliehen diese heterotroph oder autotroph?<sup>[15]</sup> Verschiedene Konzepte, die sich mit diesen zentralen Fragestellungen befassen, sollen im Folgenden vorgestellt werden.

#### RNA-Welt

Das Konzept der Ribonukleinsäure- (RNA: *ribonucleic acid*) Welt stammt aus den 1960er Jahren und beruht auf der Vorstellung,<sup>[16-17]</sup> dass RNA zu Beginn sowohl die Funktionen von Desoxyribonukleinsäure (DNA: *deoxyribonucleic acid*) als auch von Proteinen ausführte und diese sich erst anschließend entwickelten.<sup>[152-154]</sup> Ca. 20 Jahre später führte die Entdeckung von katalytischen RNA-Fragmenten,<sup>[155-157]</sup> sogenannten Ribozymen, zur Stärkung der Theorie. Essenziell in einer hypothetischen RNA-Welt ist die Selbstreplikation von RNA, wobei Mutation und Rekombination neue Funktionen und somit die Entwicklung des Systems ermöglichen.<sup>[152]</sup> Hierbei werden für die RNA-Replikation verschiedene, möglicherweise nicht isoliert auftretende Szenarien diskutiert. Neben der nicht-enzymatischen Polymerisation anhand einer Vorlage, bei welcher vor allem die Produkt-Inhibition ein Problem

darstellt, ist auch eine RNA-Polymerase-basierte Reaktion im Gespräch.<sup>[153]</sup> Letztere eröffnet eine Möglichkeit zur Autokatalyse und die Fähigkeit der Polymerase unterschiedliche Substrate zu replizieren, könnte zu einem Netzwerk aus Ribozymen führen. Da jedoch die präbiotische Entstehung einer komplexen Polymerase unwahrscheinlich erscheint, wird auch ein Netzwerk vieler kurzer RNA-Stränge diskutiert, in dem die verschiedenen Bestandteile wechselseitig ihren Aufbau katalysieren, sodass das Verhalten des Gesamtnetzwerkes autokatalytisch ist.<sup>[153]</sup> Im Anschluss an die Replikation wird durch Kombination mit Kofaktoren eine Vielzahl enzymatischer Möglichkeiten freigeschaltet und es kommt außerdem zur Bildung von RNA-Adaptermolekülen.<sup>[152, 158]</sup> Deren Fähigkeit aktivierte Aminosäuren zu binden, ermöglicht anschließend die Entstehung von Proteinen. Letztere übernehmen die enzymatische Rolle der RNA, da sie effizientere und schnellere Katalysen ermöglichen. Umgekehrte Transkription der RNA führt zur Bildung von DNA, die wiederum einen stabilen Informationsspeicher darstellt und somit diese Rolle der RNA übernimmt.<sup>[152]</sup>

Jedoch gibt es auch Kritik zu mehreren Annahmen der Theorie. So wird vorausgesetzt, dass es eine abiotische Quelle für aktivierte  $\beta$ -D-Nukleotide gab oder dass die Replikation selektiv erfolgte.<sup>[154]</sup> Auch bleibt unklar, welche thermodynamische Triebkraft die Replikation ermöglichte und welcher Mechanismus der Polynukleotidbildung zu Grunde lag.<sup>[153-154]</sup> Einen weiteren Kritikpunkt stellt darüber hinaus die Instabilität von RNA in bestimmten wässrigen präbiotischen Szenarien dar.<sup>[18, 153]</sup>

### **Peptid-Welt**

Die Idee, dass die ersten informationstragenden und replizierenden Systeme aus Peptiden aufgebaut waren, ist hingegen weniger populär.<sup>[18]</sup> Der Hypothese liegt die Annahme zugrunde, dass Peptide im Vergleich zu RNA effizientere und weniger fehlerbehaftete Replikatoren darstellen. Darüber hinaus wird argumentiert, dass Peptide abiotisch zuerst und leichter zugänglich waren und sie eine größere Stabilität in für die frühe Erde diskutierten Szenarien zeigen.<sup>[18]</sup> Gestützt wird die Theorie einer Peptid-Welt durch Studien, die belegen, dass Peptide zur (Selbst-)Replikation befähigt sind.<sup>[159-161]</sup> Diese Eigenschaft steht im engen Zusammenhang mit der durch Selbstorganisation erzielten übergeordneten räumlichen Struktur der Peptide. So beobachteten CHMIELEWSKI *et al.* an einem Peptid-Templat, das im Sauren eine *Coiled-Coil* Struktur ausbildet und im Neutralen in einer zufälligen *Coil*-Struktur vorliegt, pH-Wert abhängiges Replikationsverhalten. Der Kopiervorgang verlief bei niedrigen pH-Werten autokatalytisch, wohingegen ein solches Verhalten im Neutralen nicht beobachtet werden konnte.<sup>[159]</sup> Die übergeordneten räumlichen Strukturen der Peptide werden durch Wasserstoffbrückenbindungen,  $\pi$ - $\pi$  *Stacking* sowie elektrostatische, hydrophobe und van-der-Waals-Wechselwirkungen ermöglicht.<sup>[23]</sup> BRACK beobachtete für

Peptide, deren Sequenz alternierend hydrophobe und hydrophile Aminosäureseitenketten aufweist, eine  $\beta$ -Faltblattstruktur und erachtete darauf aufbauend die Ausbildung einer Doppelschicht als wahrscheinlich.<sup>[162]</sup> Des Weiteren werden in der Literatur Peptid-basierte Nanoröhren, Fäden und Vesikel beschrieben.<sup>[163-164]</sup> Teilweise erfolgt die Ausbildung der Strukturen bereits ausgehend von sehr kurzen Peptiden mit einstelliger Aminosäurezahl.<sup>[165-167]</sup> Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Proteinoid-Kügelchen die Bildung von Di- und Trinukleotiden begünstigen. Proteinoid-Kügelchen, die zusätzlich auch Poly(A) enthalten, können in Gegenwart von ATP außerdem zu Peptidbildungen führen.<sup>[168]</sup> Infolgedessen ist es denkbar, dass Peptid-Membrane bereits zu Beginn der Entstehung des Lebens räumlich abgesteckte Reaktionsräume zur Verfügung stellten.<sup>[15, 164, 169]</sup>

Neben dem Peptid-basierten Replikationssystem ist ein Peptid-Protometabolismus im Gespräch. In einem initialen Peptid-Pool unterliegen Peptidbildung sowie -hydrolyse Rückkopplungsmechanismen, wodurch die Selektion bestimmter Eigenschaften möglich ist. Darüber hinaus wird vorgeschlagen, dass (auto-)katalytische Aktivität innerhalb des Peptid-Pools auftreten könnte und es zur Selbstorganisation kommen könnte.<sup>[170]</sup> Experimente mit Dipeptiden im synthetisch organischen sowie präbiotischen Kontext zeigen, dass diese als Katalysatoren in Aldol-Reaktionen,<sup>[171-173]</sup> konjugierten Additionen und bei der Kondensation von RNA wirken können.<sup>[173-174]</sup> Peptid-katalysierte Reaktionen könnten somit zur Selektion bestimmter Spezies beigetragen haben.<sup>[171]</sup>

### Weitere Konzepte

Analog zur Peptid-Welt beruht auch das Konzept einer Lipid-Welt auf dem Gedanken, dass Selbstorganisation Komplexität und schließlich Funktion schafft. Die autokatalytische Hydrolyse wasserunlöslicher Tensidvorläufer in Gegenwart von Vesikeln führt zur Selbstreplikation letzterer.<sup>[175]</sup> Die Beobachtung von abiotisch induziertem Wachstum und Teilung von Vesikeln unterstützt die Theorie.<sup>[176]</sup>

Des Weiteren sind auch alternative Replikationssysteme im Gespräch: Diskutiert werden unter anderem azyklische Nukleosidbausteine basierend auf Glycerin oder Acrolein,<sup>[177]</sup> Nukleoside verschiedener Zucker in unterschiedlichen Konstitutionen sowie Nukleinsäuren auf Peptidbasis.<sup>[154, 178-179]</sup>

Ähnlichen Bekanntheitsgrad wie die RNA-Welt Hypothese weist indessen die Metabolismus-basierte Theorie auf. Sie stellt die Kohlenstoffdioxidfixierung in den Mittelpunkt,<sup>[22]</sup> weshalb ein enger Zusammenhang zu WÄCHTERSCHÄUSERS Eisen-Schwefel Welt besteht.<sup>[20, 95-96]</sup> Als mögliches Szenario für diesen Prozess werden die oben beschriebenen hydrothermalen Quellen betrachtet.<sup>[22]</sup> Für die Theorie spielt neben anderen Kohlenstofffixierungs-

wegen vor allem der Acetyl-CoA Pfad eine zentrale Rolle,<sup>[22]</sup> da er Acetogenen und Methanogenen zusätzlich auch zum Aufbau eines Ionengradienten dient und somit ATP zur Verfügung stellen kann.<sup>[21-22, 180-181]</sup> (Zwischen-)Produkte verschiedener Stoffwechselzyklen, unter anderem auch des Acetyl-CoA Pfades, sind abiotisch zugänglich,<sup>[182-183]</sup> weshalb abiotische Prozesse als Vorläufer des modernen Enzym-basierten Metabolismus denkbar sind.<sup>[22, 184]</sup>

Neben den beschriebenen Hypothesen, die ein initiales Vorläufersystem postulieren, wird auch die Möglichkeit der Koevolution verschiedener Systeme diskutiert.<sup>[23, 185-187]</sup> Verknüpft mit dieser Vorstellung ist der *Systems Chemistry* Ansatz. Dieser beschäftigt sich mit der Erforschung komplexer Systeme ähnlich zu lebenden Organismen, die sich fernab des Gleichgewichts befinden und in denen Funktionen beobachtbar sind, die die Gesamtheit der Einzelfunktionalitäten übersteigen. Supramolekulare Interaktionen, Rückkopplungsmechanismen sowie Molekülauf- und Abbau ermöglichen die Kopplung von Einzelsystemen.<sup>[19, 188]</sup>

## 2.2 Präbiotische Peptidkondensationen

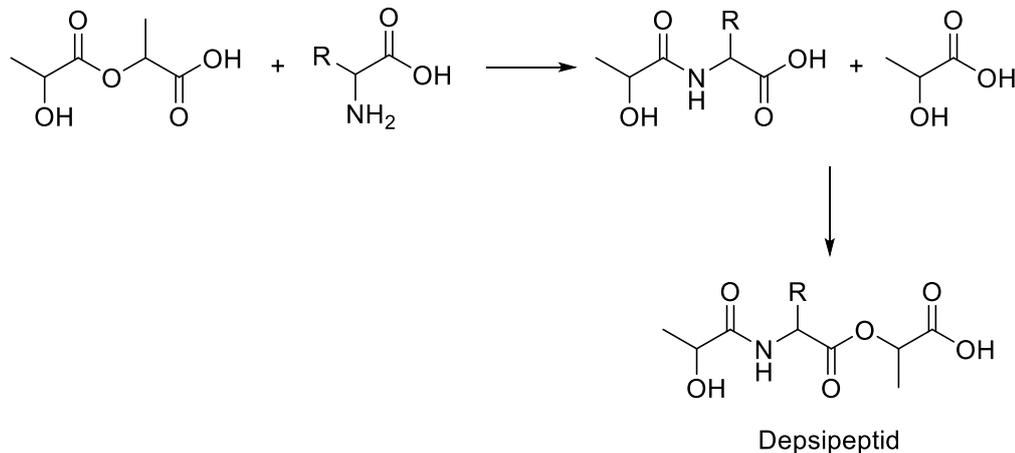
Für die frühe Erde wird allgemein angenommen, dass Peptide durch die nicht-enzymatische Polymerisation von Aminosäuren bzw. deren aktivierten Vorläufern entstanden.<sup>[23]</sup> Eine abiotische Quelle für Aminosäuren stellt das zuvor beschriebene MILLER-UREY-Experiment dar.<sup>[73-74]</sup> Verschiedene Studien zeigen jedoch, dass auch hydrothermale Quellen, für die hohe Temperaturen, Mineralienoberflächen, erhöhter Druck sowie der Austritt (kohlen)wasserstoffhaltiger Flüssigkeiten charakteristisch sind,<sup>[11, 88-91]</sup> als Umgebungen für die abiotische Aminosäurebildung in Frage kommen.<sup>[189-192]</sup> Durch Reduktion der im Meerwasser gelösten Nitrite, Nitrate sowie des Stickstoffes an Mineralien und Metallen werden reaktive Stickstoffverbindungen für die Synthese organischer Verbindungen zur Verfügung gestellt.<sup>[193-194]</sup> Neben proteinogenen Aminosäuren konnten auch nicht-proteinogene Aminosäuren und Amine beobachtet werden.<sup>[189-190]</sup> Dass letztere Aminosäurevorläufer darstellen können, zeigt die Umwandlung von Ethanolamin zu Glycin unter hydrothermalen Bedingungen.<sup>[191]</sup> Aufgrund der harschen Bedingungen wird neben der Bildung von Aminosäuren allerdings auch deren Abbau beobachtet.<sup>[190]</sup> Zusätzlich stellen Meteoriten und interplanetarer Staub extraterrestrische Aminosäurequellen dar.<sup>[69-71]</sup> Vorkommen von nicht-proteinogenen Aminosäuren sowie das Auftreten von Racematen werden als Hinweis darauf angesehen, dass die meteoritischen Aminosäuren abiotischen Ursprungs sind.<sup>[195-196]</sup> Enantiomerenüberschüsse proteinogener Aminosäuren zu Gunsten des L-Enantiomers hingegen werden als biologische Kontaminationen interpretiert.<sup>[196]</sup> In Folge des Fundes nicht-racemischer,

nicht-proteinogener Aminosäuren in Kombination mit racemischen proteinogenen Aminosäuren werden extraterrestrische Quellen als Ursprung der Homochiralität diskutiert.<sup>[195, 197]</sup>

Insgesamt zeigen Untersuchungen zu abiotischen Aminosäurequellen im Vergleich untereinander recht heterogene Produktverteilungen.<sup>[198]</sup> Gemein ist jedoch allen die Dominanz von Glycin bezüglich der Häufigkeit des Auftretens und der Konzentration.<sup>[198-199]</sup> Darüber hinaus stellt das Fehlen eines Entstehungspfadens für Glutamin und Tryptophan sowie die unzureichende Erforschung potenzieller Funktionen nicht-proteinogener Aminosäuren eine weitere Überschneidung dar.<sup>[198, 200]</sup> Infolgedessen fällt eine Einschätzung, welche Aminosäuren auf der frühen Erde relevante Rollen eingenommen haben könnten schwer.<sup>[198]</sup> PUDRITZ *et al.* veröffentlichten eine umfassende Analyse diverser präbiotischer Aminosäurequellen. Diese lässt vermuten, dass zu Beginn vor allem Glycin, Alanin, Asparagin- und Glutaminsäure, Valin, Serin, (Iso-)Leucin, Prolin und Threonin verfügbar waren.<sup>[199]</sup>

Die anschließende Kondensationsreaktion zu Peptiden ist in Wasser nicht nur thermodynamisch unvorteilhaft, sondern ist aufgrund des zwitterionischen Charakters der Monomere auch kinetisch gehemmt.<sup>[31]</sup> Wie genau diese Barrieren auf der frühen Erde ohne enzymatischen Beistand überwunden wurden, ist Gegenstand aktueller Forschung. Auf den ersten Blick scheint eine wasserfreie bzw. wasserarme Aminosäureschmelze am naheliegendsten.<sup>[114, 201]</sup> Jedoch ist hierfür ein Überschuss der sauren Aminosäuren Asparagin- und Glutaminsäure erforderlich, um dem Abbau neutraler Aminosäuren vorzubeugen.<sup>[114, 202]</sup> In Anbetracht der vorangehenden Ausführungen erscheint dies allerdings präbiotisch wenig plausibel.<sup>[199]</sup> Zusätzlich zeigen NMR-Studien, dass die thermischen Produkte nicht-proteinogene  $\beta$ - und  $\gamma$ -Verknüpfungen aufweisen.<sup>[203]</sup> YAMAMOTO *et al.* wandelten den beschriebenen Ansatz ab und kondensierten Aminosäuren in einer Harnstoffschmelze, welche als polares und wasserentziehendes Reaktionsmedium die Peptidbildung begünstigt. Neben Peptiden konnten auch *N*-Carbamoylpeptide sowie Peptide mit *N*-terminalem Hydantoin-Ring detektiert werden.<sup>[204]</sup> Thermische Energie stellt jedoch nicht die einzige mögliche Energiequelle für Peptidbildungen in trockenen Reaktionsszenarien dar. HÉRNANDEZ *et al.* erzeugten mechanochemisch Peptidoligomere. Als Nebenprodukt wurden zyklische Dipeptide, sogenannte Diketopiperazine (DKPs), beobachtet. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit von Mineralien einen positiven Effekt auf die Polymerisationsreaktion hat.<sup>[117]</sup> Zudem haben auch Nass-Trocken-Zyklen einen positiven Einfluss auf Peptidbildungsreaktionen, wobei auch hier DKPs beobachtet wurden.<sup>[110]</sup> In den folgenden Abschnitten wird deutlich, dass dieses präbiotische Szenario häufig mit anderen Strategien zur Aminosäurekondensation kombiniert wird.<sup>[105, 107, 205]</sup> So wurden diese unter anderem auf hydroxy- und aminosäurehaltige Reaktionsmischungen angewendet.<sup>[108, 206]</sup> Die resultierenden Depsipeptide, welche Amid- und Esterverknüpfungen enthalten (Abbildung 3),

sind als mögliche Peptidvorläufer auf der frühen Erde im Gespräch.<sup>[207]</sup> Ester-Amid-Austauschreaktionen, Esterhydrolyse sowie Ringöffnungsreaktionen an Dilactonen und zyklischen gemischten Aminosäure-Hydroxysäure-Dimeren vereinfachen die Knüpfung von Amidbindungen.<sup>[108, 207]</sup> Infolgedessen kann mit steigender Zyklanzahl eine sukzessive Zunahme des Aminosäureanteils in den Polymeren beobachtet werden.<sup>[108]</sup> In Austrocknungsexperimenten mit einer Mischung aus (nicht-)proteinogenen Aminosäuren sowie Hydroxysäuren wurden zudem vorzugsweise proteinogene Aminosäuren polymerisiert.<sup>[207]</sup>



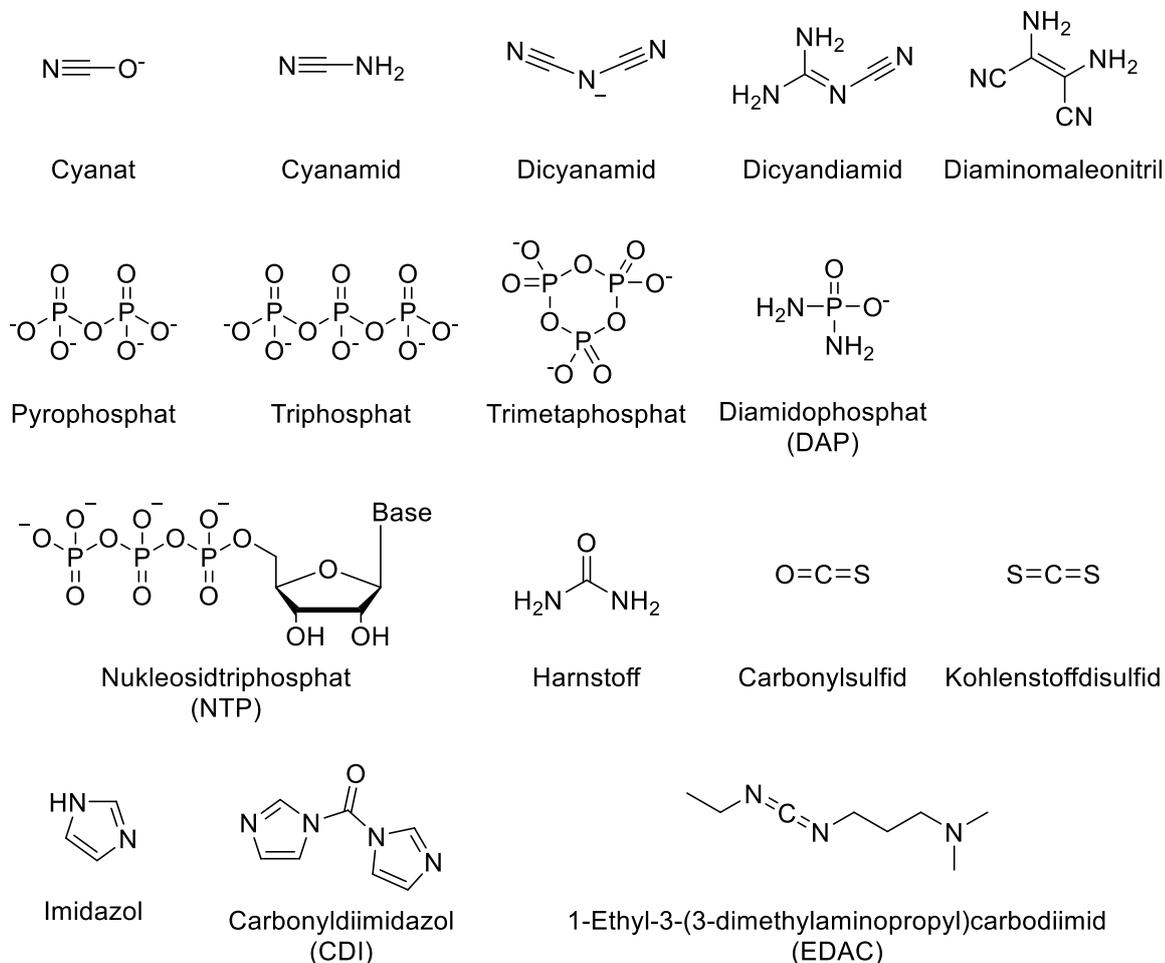
**Abbildung 3:** Depsipeptidbildung am Beispiel von Milchsäure und  $\alpha$ -Aminosäuren nach GROVER *et al.*<sup>[206]</sup>

### Kondensationsreagenzien

Eine weitere Strategie, um nicht-enzymatische Aminosäurekupplungen zu realisieren, stellt der Einsatz von Kondensationsreagenzien dar. Deren Hydrolyse entzieht dem System Wasser und die dabei freiwerdende Energie steht für die Kupplungsreaktion zur Verfügung.<sup>[23, 118, 208]</sup> Das in den vergangenen Jahrzehnten getestete breite Spektrum präbiotisch diskutierter Kondensationsmittel umfasst: Cyanamid,<sup>[209-210]</sup> Cyanat,<sup>[211]</sup> Carbodiimide,<sup>[212]</sup> Dicyanamid,<sup>[213]</sup> Dicyandiamid,<sup>[214-215]</sup> Diaminomaleonitril (DAMN),<sup>[216]</sup> Harnstoff,<sup>[217]</sup> Diamidophosphat (DAP),<sup>[218]</sup> Carbonylsulfid (COS),<sup>[219-220]</sup> Imidazol,<sup>[212, 221-222]</sup> Kohlenstoffdisulfid (CS<sub>2</sub>),<sup>[223]</sup> Schwefeldioxid/(Hydrogen-)sulfite in Kombination mit Kaliumhexacyanoferrat (K<sub>3</sub>[Fe(CN<sub>6</sub>)]) sowie zyklische und azyklische Polyphosphate (darunter auch Nukleosidtriphosphate (NTP)) (Abbildung 4).<sup>[133, 224-227]</sup>

In Aminosäurekupplungen ausgehend von Glycin und Trimetaphosphat wurde außer verschiedenen Peptiden auch Glycin-*N*-phosphat detektiert.<sup>[225]</sup> Ausgehend davon schlugen RABINOWITZ *et al.* vor, dass es zunächst durch den nukleophilen Angriff der Aminogruppe von Glycin auf das zyklische Kondensationsreagenz zu einer Ringöffnung kommt. Das dabei entstehende Glycin-*N*-triphosphat kann anschließend in einer Ringschlussreaktion Pyrophosphat abspalten. Das fünfgliedrige zyklische Acylphosphoramidat kann entweder

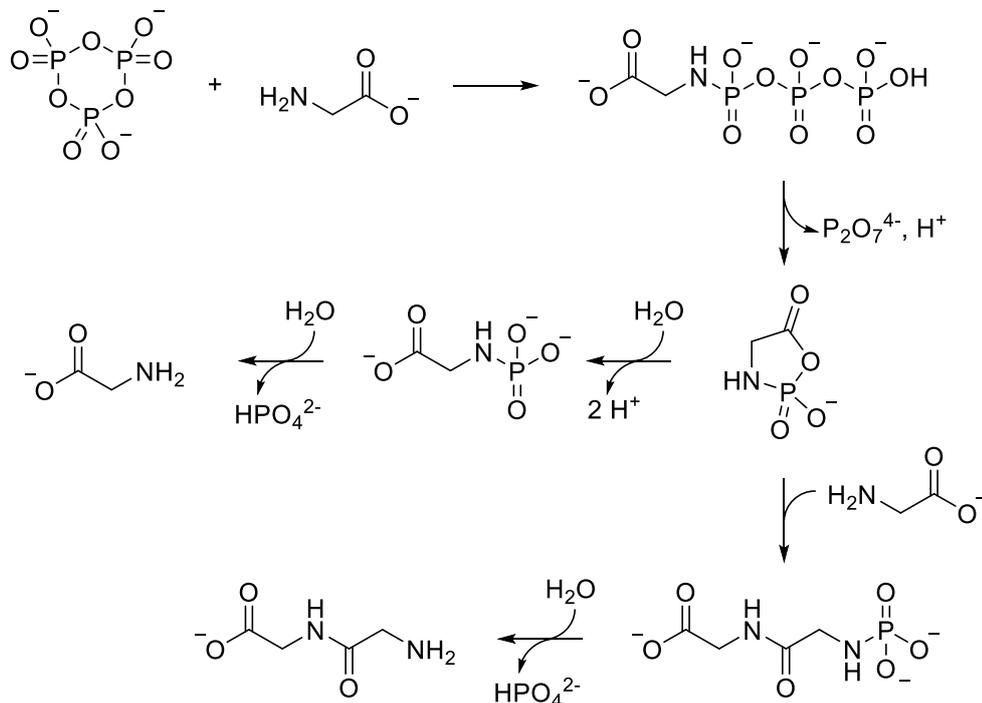
schrittweise von Wasser zur Aminosäure hydrolysiert werden oder durch den nukleophilen Angriff eines zweiten Glycinmoleküls zu Diglycin-*N*-phosphat, welches ebenfalls detektiert wurde, abreagieren (Abbildung 5). Dessen Hydrolyseprodukt Diglycin kann anschließend ebenfalls mit dem zyklischen Acylphosphoramidat reagieren, wodurch die Kette verlängert wird.<sup>[225]</sup>



**Abbildung 4:** Übersicht über im präbiotischen Kontext diskutierte Kondensationsreagenzien.

Alternativ zu einem zyklischen Acylphosphoramidat wurden außerdem azyklische Acylphosphat-Intermediate, welche durch nukleophilen Angriff der Carboxylgruppe auf Trimetaphosphat bzw. Glycin-*N*-triphosphat gebildet werden könnten, vorgeschlagen.<sup>[208, 228]</sup> In Analogie dazu wird weiterhin angenommen, dass die Umsetzung von Aminosäuren mit NTPs in Gegenwart von Imidazol ebenfalls über Aminoacylphosphat-Verbindungen erfolgt.<sup>[226-227]</sup> Besonders interessant ist hierbei die Ähnlichkeit zur Proteinbiosynthese, in der die Aminoacylierung der transfer-RNA (tRNA) einen zentralen Schritt darstellt.<sup>[226]</sup> Für Peptidbildungen in Gegenwart von DAP werden ebenfalls Acylphosphoramidate als Intermediate vorgeschlagen.<sup>[218]</sup>

Kritik, an der durch Kondensationsreagenzien unterstützten, abiotischen Peptidbildung bezieht sich häufig auf die geringe Bandbreite getesteter Aminosäuren sowie auf die geringe präbiotische Verfügbarkeit des jeweiligen Kondensationsreagenz.<sup>[23, 31, 208, 229]</sup>

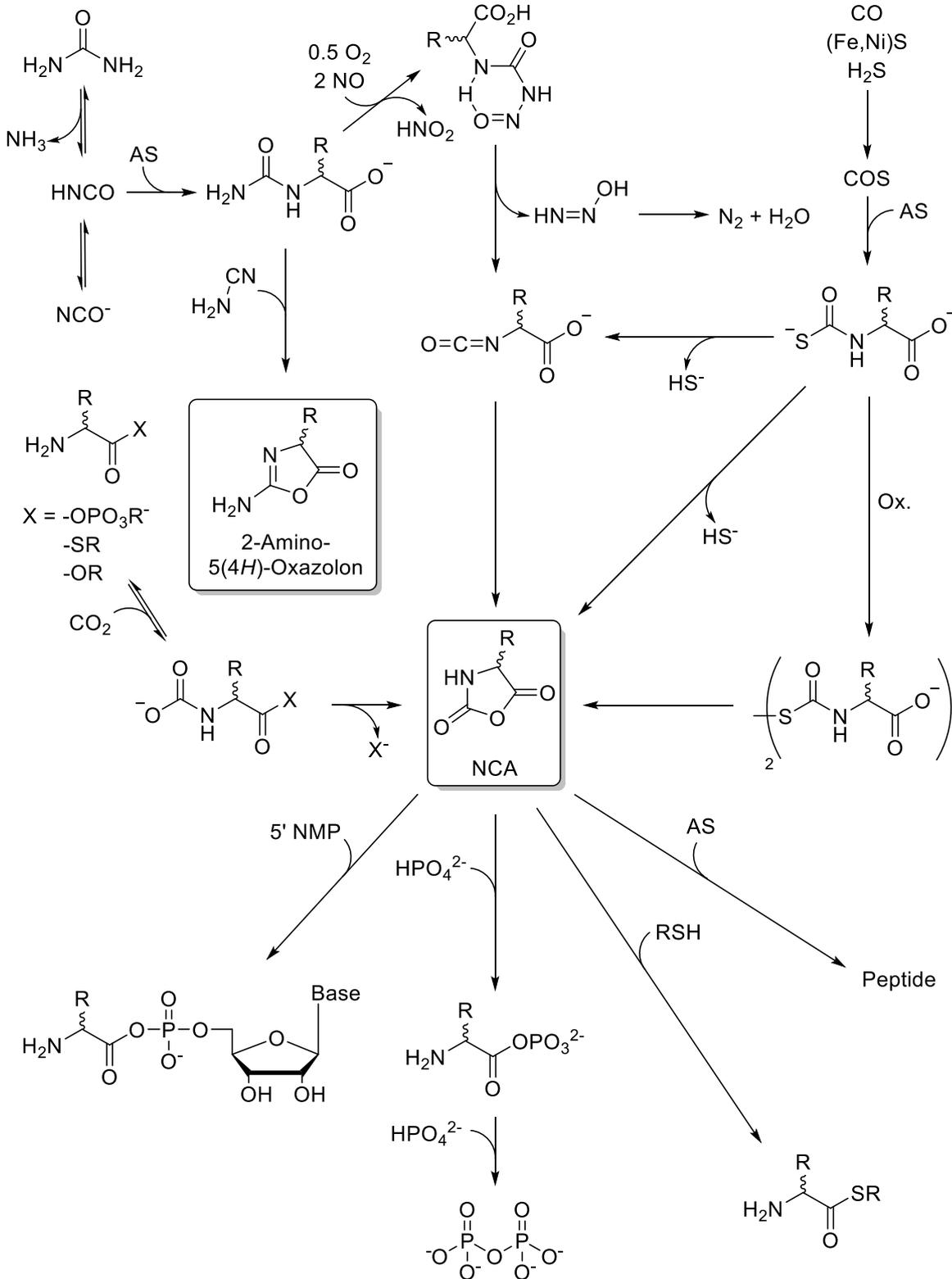


**Abbildung 5:** Von RABINOWITZ *et al.* vorgeschlagener Mechanismus der Trimetaphosphat-vermittelten Peptidbildung am Beispiel von Glycin.<sup>[225]</sup>

### Aktivierte Vorläufermoleküle

Aktivierte Aminosäurederivate, welche anstelle von Aminosäuren polymerisiert werden, eröffnen einen weiteren plausiblen, abiotischen Pfad zu Peptiden. Viele von ihnen treten außerdem als Intermediate der Kondensationsmittel-basierten Peptidbildungsreaktionen aus dem vorherigen Abschnitt auf.<sup>[212, 219, 221, 230]</sup> Die wohl am häufigsten in der Literatur beschriebenen Derivate stellen die LEUCHS'schen Anhydride, die auch als *N*-Carboxyanhydride (NCAs) bekannt sind, dar.<sup>[23, 231]</sup> Diese äußerst effizienten gemischten Anhydride – hypothetisch gebildet aus Aminosäuren und Kohlenstoffdioxid – erfüllen eine Doppelfunktion:<sup>[232-233]</sup> Schutz der Aminogruppe und infolgedessen Unterbinden von DKP-Nebenprodukten sowie zeitgleich Begünstigung eines nukleophilen Angriffs aufgrund der aktivierten Carboxylfunktion.<sup>[23, 232]</sup> Ausgehend von COS, das im vorherigen Abschnitt als Kondensationsreagenz aufgeführt wurde und für das ein hydrothermaler Ursprung auf (Fe,Ni)S-Oberflächen plausibel ist,<sup>[220, 234]</sup> treten diese als intermediäre Zwischenstufen auf. Ein nukleophiler Angriff einer Aminosäure auf das Kondensationsreagenz führt zur *N*-Thiocarbamoylamino-säure, welche in einer intramolekularen Ringschlussreaktion das NCA-Intermediat bilden kann. Hydrogensulfid stellt jedoch eine schlechte Abgangsgruppe dar, weshalb es sich

hierbei um den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt handelt.<sup>[219]</sup> Zugabe von Oxidations- sowie Alkylierungsmitteln oder von Metallionen wertet die Abgangsgruppe auf und beschleunigt somit die Reaktion (Abbildung 6).



**Abbildung 6:** NCA-Bildungsreaktionen sowie Pfade zu präbiotisch relevanten Verbindungen über aktivierte NCA-Derivate.<sup>[23, 217, 219]</sup>

Der Ringschluss kann alternativ auch über eine Isocyanat-Zwischenstufe ablaufen, die in Gegenwart von Aminosäuren zu geringen Mengen Harnstoff-verbrückter Kondensationsprodukte abreagieren kann.<sup>[219, 235]</sup> Isocyanat-Intermediate, die anschließend zur NCA-Bildung führen, sind auch in Cyanat- und Harnstoff-unterstützten Kondensationen erreichbar,<sup>[217]</sup> wenn das initial gebildete *N*-Carbamoyladdukt nitrosiert wird.<sup>[236]</sup> Darüber hinaus können *N*-Carbamoylaminosäuren mit Cyanamid bzw. Carbodiimiden zu einem weiteren wichtigen aktivierten Intermediat, den 2-Amino-5(4*H*)-Oxazolonen reagieren.<sup>[230]</sup> Zusätzlich zu den bereits genannten Kondensationsmitteln wird auch für die CDI-basierte Peptidbildung ein Mechanismus über ein NCA-Intermediat vorgeschlagen.<sup>[212, 221]</sup>

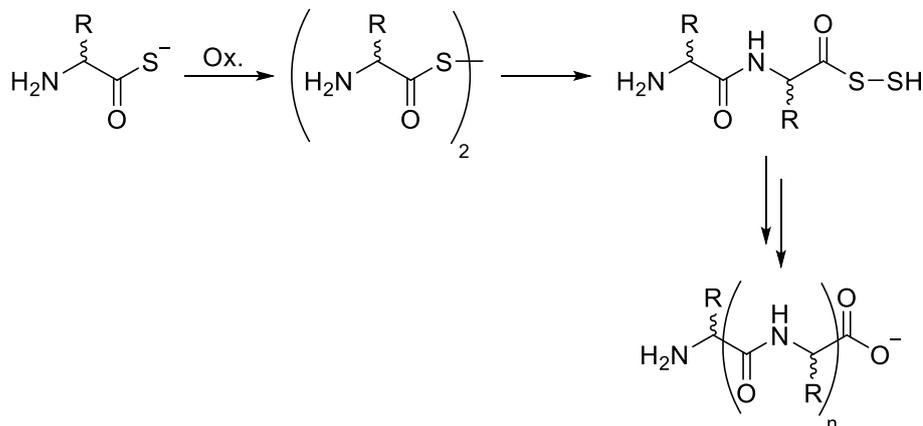
Neben Schutzgruppen- und Aktivator-Funktion können intermediäre NCAs während der Peptidbildung einen Beitrag zur chemischen Selektion proteinogener Aminosäuren leisten.<sup>[233, 237]</sup> So verlaufen Kondensationen bevorzugt über fünfgliedrige Intermediate, welche in Umsetzungen von Kondensationsreagenzien mit  $\alpha$ -Aminosäuren zugänglich sind. Sechs- und siebengliedrige Intermediate, die ausgehend von  $\beta$ - und  $\gamma$ -Aminosäuren erreichbar sind, sind weniger wahrscheinlich. Auch ist die Kondensation proteinogener Aminosäuren gegenüber von am  $\alpha$ -Kohlenstoffatom mehrfach substituierten Analoga bevorzugt, da die sterische Hinderung während der Ringschlussreaktion geringer ist.<sup>[233, 237]</sup>

Interessant ist darüber hinaus auch, dass NCA-basierte Kondensationen eine Möglichkeit zum abiotischen Symmetriebruch aufzeigen. So konnten BONNER *et al.* in Folge von stereoselektivem Einbau sowie erhöhter Stabilität gegen Hydrolyse eines Enantiomers dessen Anreicherung in den polymeren Produkten beobachten.<sup>[238]</sup>

In der Frage nach präbiotisch plausiblen Kondensationsreaktionen auf der frühen Erde nehmen NCAs eine zentrale Position ein, da sie nicht nur mit Aminosäuren zu Peptiden reagieren können, sondern auch eine Möglichkeit für die Aktivierung anorganischer Phosphate bieten.<sup>[235, 239]</sup> Die Umsetzung mit diesen liefert Aminoacylphosphate, die in Gegenwart eines zusätzlichen Phosphat-Moleküls die Bildung reaktiver Pyrophosphate ermöglichen können (Abbildung 6).<sup>[235]</sup> Wird anstelle eines anorganischen Phosphates ein Mononukleotid (NMP) eingesetzt, so werden die bereits im vorherigen Abschnitt thematisierten Aminoacylnukleotide erhalten.<sup>[235, 240]</sup> Als weitere Stoffklasse sind mit Hydrogen-/Alkylsulfiden auch  $\alpha$ -Aminothiosäuren bzw.  $\alpha$ -Aminothioester zugänglich.<sup>[221, 241]</sup>

5(4*H*)-Oxazolone, die anstelle einer Aminofunktion Alkylreste an der 2-Position aufweisen, sind Intermediate der Peptidbildung ausgehend von *N*-Acylaminosäuren in Gegenwart von Cyanamid bzw. Carbodiimiden.<sup>[242]</sup> Es wurde vorgeschlagen, dass die rasche Epimerisierung der von *N*-Acylaminosäuren abstammenden Zwischenstufen in Peptidbildungsreaktionen mit racemischen Edukt-pools einen Symmetriebruch induziert haben könnte.<sup>[242-244]</sup>

Ein anderer Ansatz startet mit  $\alpha$ -Aminothiosäuren als aktivierten Derivaten. Deren Oxidation im sauren Milieu liefert Disulfide. Diese durchlaufen einen intramolekularen Acyltransfer, wodurch es zur Ausbildung von Amidbindungen kommt (Abbildung 7).<sup>[245]</sup>

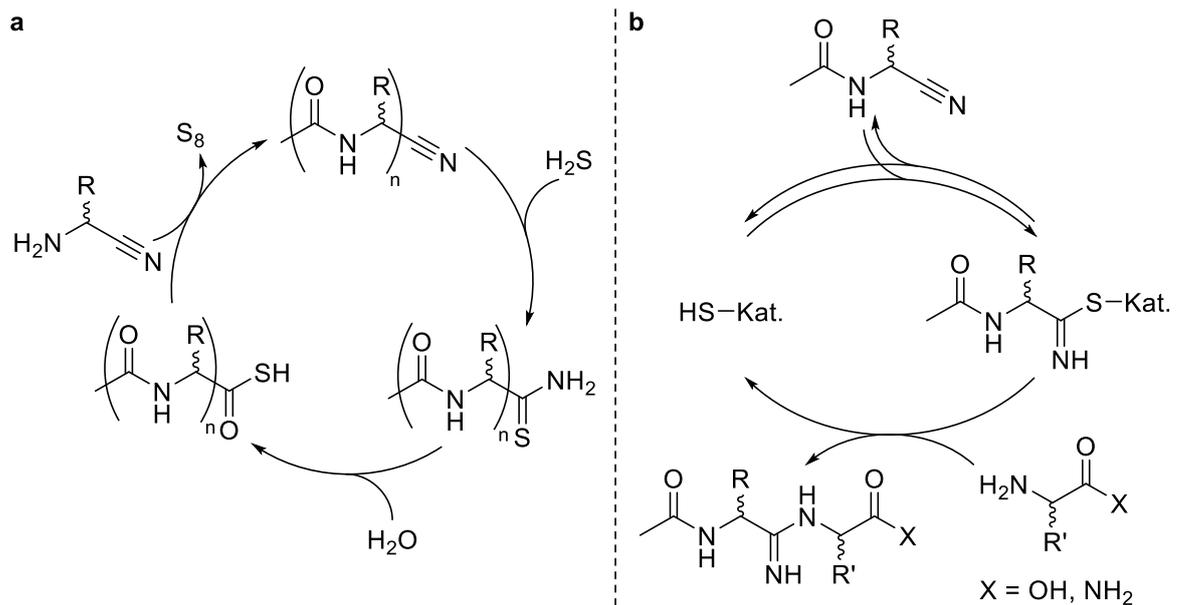


**Abbildung 7:** Peptidbildung ausgehend von  $\alpha$ -Aminothiosäuren nach KAJIHARA *et al.*<sup>[245]</sup>

POWNER *et al.* hingegen nutzen  $\alpha$ -Aminonitrile als aktivierte Derivate (Abbildung 8a).<sup>[246]</sup> Diese werden in einem ersten Schritt in Gegenwart von  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$  mit Thiosäuren oxidativ aktiviert. Die resultierenden  $\alpha$ -Amidonitrile, die das Auftreten von DKP-Nebenprodukten verhindern, werden im Anschluss mit Schwefelwasserstoff in die analogen Thioamide überführt. Hydrolyse liefert  $\alpha$ -Amidothiosäuren, deren Kette mit einer neuen  $\alpha$ -Aminonitrileinheit im nächsten Kupplungsschritt oxidativ verlängert werden kann. Vorteilhaft an diesem Syntheseweg ist, dass die Reaktion bei neutralem pH-Wert abläuft und selektiv  $\alpha$ -Aminonitrile eingebaut werden. Von Nachteil ist jedoch, dass stöchiometrische Konzentrationen an Schwefelwasserstoff sowie Oxidationsmittel erforderlich sind. Für diese müssen zudem separate abiotische Quellen zur Verfügung stehen, die die Reaktion abwechselnd speisen, da beide ansonsten miteinander abreagieren würden.<sup>[246]</sup>

Um die Problematik zu lösen, entwickelten POWNER *et al.* eine katalytisch verlaufende reversible Addition von Thiolen an  $\alpha$ -Amidonitrile (Abbildung 8b). Als Thiolverbindungen wurden hierbei *N*-Acetylcystein aber auch 3-Mercaptopropionsäure getestet. Der nukleophile Angriff der Aminogruppe einer  $\alpha$ -Aminosäure bzw. eines  $\alpha$ -Aminoamides auf das Imid-Kohlenstoffatom führt zur Regeneration des Thiol-Katalysators sowie zur Bildung eines Amidinproduktes, dessen Kette in weiteren Katalysezyklen verlängert werden kann.<sup>[247]</sup>

DKPs stellen gängige Nebenprodukte in präbiotisch plausiblen Peptidbildungsreaktionen dar,<sup>[110, 117, 218, 226]</sup> was die Frage aufwirft, ob es sich bei diesen um eine Sackgasse handelt oder ob sie sogar vielmehr aktivierte Verbindungen darstellen.<sup>[117, 248]</sup>



**Abbildung 8:** Aminonitril-basierte Ansätze nach POWNER *et al.* [246-247]

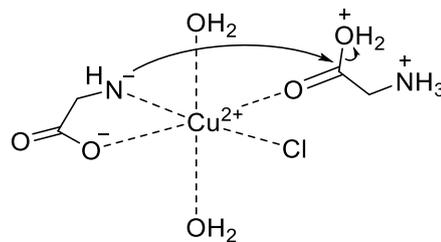
Die energetisch günstigste Konformation in linearen Peptiden ist dadurch charakterisiert, dass alle Amidbindungen in *trans*-Konformation vorliegen. DKPs hingegen weisen *cis*-Amidbindungen auf. Ringöffnung in Folge eines nukleophilen Angriffs durch die Aminogruppe einer Aminosäure bzw. eines Peptides könnte deshalb einen Energiebeitrag zur Ausbildung einer Peptidbindung liefern.<sup>[248]</sup> So ist es wenig erstaunlich, dass in Ansätzen mit DKPs und Aminosäuren bzw. Peptiden um zwei Einheiten verlängerte Produkte zu beobachten sind.<sup>[117, 248]</sup>

Eine weitere Gruppe aktivierter Aminosäurederivate stellen nach SUTHERLAND *et al.* *N*-Acetylaminosäuren dar. In Kombination mit Methylisonitril werden Imidoylacetylaminosäuren gebildet, deren Imid-Kohlenstoffatom nukleophil von einer Aminogruppe angegriffen werden kann. Acyltransfer im resultierenden gemischten Anhydrid führt zur Ausbildung einer Peptidbindung. Die selektive Inkorporation von  $\alpha$ -Aminosäuren erfolgt jedoch nur in relativ sauren Reaktionsumgebungen (pH 3).<sup>[249]</sup>

### **Metall- und Mineralien-unterstützte Kondensationen**

Im präbiotischen Kontext stellt die Kupfer-katalysierte salzinduzierte Peptidbildung (SIPF: *salt induced peptide formation*) nach RODE *et al.* die bekannteste Metall-vermittelte Aminosäure/Peptid-Kondensation dar.<sup>[229]</sup> Es wird davon ausgegangen, dass für Organismen ausreichende Kupfer(II)-Konzentrationen ab einem Sauerstoffpartialdruck von  $10^{-35}$  atm vorliegen.<sup>[67]</sup> Zentral für die Peptidbildung nach RODE ist die Ausbildung intermediärer Chlorocuprat-Komplexe,<sup>[250-252]</sup> in denen eine Aminosäure als Chelatligand auftritt und eine zweite über die Carboxylfunktion *end-on* an das Metallzentrum koordiniert ist. So wird nicht nur die

räumliche Distanz zwischen den Reaktanden verringert, sondern diese sind auch bereits für die Ausbildung einer Amidbindung vorausgerichtet.<sup>[252]</sup> Hohe Natriumchloridkonzentrationen in der wässrigen Reaktionslösung garantieren die Koordination eines Chloridliganden und verhindern so die Bildung von katalytisch inaktiven Bisglycinato-Chelatkomplexen (Abbildung 9).<sup>[250-252]</sup> Darüber hinaus wirken die hohen Salzkonzentrationen dehydratisierend und ermöglichen es so die thermodynamische Barriere der Kondensationsreaktion zu bezwingen.<sup>[229]</sup> Die gebildeten Peptide koordinieren weniger stark an das Kupfer(II)-Zentrum, sodass diese freigesetzt werden können.<sup>[252]</sup>



**Abbildung 9:** Kupfer(II)-katalysierte Peptidbildung nach RODE *et al.*<sup>[252-253]</sup>

Werden Peptide als Edukte eingesetzt, so koordinieren diese *end-on* an das Metallzentrum und treten deshalb im Produkt als *N-terminaler* Baustein auf.<sup>[31]</sup> Die salzinduzierte Kupfer(II)-katalysierte Peptidbildung verläuft bei Temperaturen von 70-80 °C optimal.<sup>[251]</sup> Nass-Trocken-Zyklen haben einen zusätzlichen positiven Effekt auf die Peptidbildung.<sup>[251]</sup> Als Nebenprodukt der SIPP-Reaktion konnten DKPs beobachtet werden.<sup>[250]</sup> In Versuchsreihen mit anderen Katalysatoren konnten lediglich mit wenigen alternativen Metallionen, darunter Eisen(II), geringe Dipeptidmengen detektiert werden.<sup>[229, 251]</sup> Diese Resultate sind allerdings denen der Kupfer(II)-katalysierten Reaktion unterlegen.<sup>[251]</sup> Weitergehende Studien von RODE *et al.* zeigen, dass die erzielten Peptidsequenzen unter anderem durch die Elektrophilie und Sterik der Aminosäuren beeinflusst werden.<sup>[254]</sup> Zudem wurde festgestellt, dass Glycin und Histidin eine katalytische Wirkung auf die Peptidbildung haben.<sup>[253, 255-257]</sup> In Bezug auf die frühe Erde sind darüber hinaus der präferierte Einbau von  $\alpha$ -Aminosäuren,<sup>[258]</sup> die bevorzugte Entstehung homochiraler Produkte sowie höhere Ausbeuten ausgehend vom L-Enantiomer von Bedeutung.<sup>[259]</sup> Die Versuche zur Stereoselektivität wurden am Beispiel von Alanin durchgeführt.<sup>[259]</sup>

Die Idee der Mineralien-unterstützten Peptidbildung geht auf BERNAL zurück, der erstmals die Oberflächen von (Ton-)Mineralien als Reaktionsorte für Polymerisationen auf der frühen Erde ins Gespräch brachte.<sup>[205, 260-261]</sup> Die thermodynamische Barriere der Aminosäure-/Peptidkupplung kann mithilfe von Mineralienoberflächen überwunden werden, vorausgesetzt die Adsorption des Kondensationsproduktes zeigt eine größere negative freie Energie als die Adsorption der beiden Edukte.<sup>[260, 262]</sup> Daraus folgt, dass die Oberflächen-

unterstützte Kondensation mit zunehmendem Polymerisationsgrad unattraktiver wird und Produkte irreversibel adsorbiert werden.<sup>[260]</sup> Um diese Probleme zu vermeiden, werden Mineralien-basierte Reaktionspfade häufig mit Trocknungsschritten kombiniert, die die Peptidkondensation thermodynamisch begünstigen und somit ohne starke Produktadsorption auskommen.<sup>[260]</sup> Letztere ist ebenfalls nicht erforderlich, wenn die Kondensationsreaktion mit einem Energie freisetzenden Prozess kombiniert wird.<sup>[260]</sup>

Mechanistisch wird für Mineralien-unterstützte Peptidbildungen die Positionierung sowie Aktivierung der Aminosäuren gegenüber einem nukleophilen Angriff durch Wechselwirkung mit LEWIS- bzw. BRÖNSTEDT-aziden Zentren auf der Oberfläche diskutiert.<sup>[263-267]</sup> Des Weiteren könnten Aminogruppen auf basischen Oberflächen durch Deprotonierung aktiviert werden.<sup>[263]</sup>

Studien von RODE *et al.* zeigen, dass Tonminerale, wie Montmorillonit, die Polymerisation kurzer Peptide begünstigen,<sup>[268-269]</sup> wohingegen Siliziumdioxid und Aluminium besser geeignet sind, um Dipeptide aus Aminosäuren aufzubauen.<sup>[264]</sup>

Von großem Interesse für Metall-katalysierte und Oberflächen-basierte Peptidbildungen ist die Verfügbarkeit der Metalle und Mineralien auf der frühen Erde. Kupfer stellt auf der frühen Erde mit einer angenommenen durchschnittlichen Häufigkeit in der Erdkruste von 50 ppm ein eher seltenes Element dar.<sup>[8]</sup> Im Gegensatz dazu wird die Eisenhäufigkeit auf 41000 ppm geschätzt.<sup>[8]</sup> Aufgrund dieses großen Reservoirs bieten sich Eisen und seine Verbindungen für präbiotische Umsetzungen an.<sup>[6, 8]</sup> Wird wie oben beschrieben eine anoxische Atmosphäre vorausgesetzt,<sup>[4-5, 25, 59]</sup> so ist mit einer Koexistenz von reduzierten Eisenverbindungen und Eisen(III)-Spezies auf der frühen Erde zu rechnen.<sup>[8, 66-67, 270]</sup> OCHIAI berechnete, dass Sauerstoffpartialdrücke  $> 10^{-68}$  atm erforderlich sind, damit zugleich Eisen(II)- und Eisen(III)-Verbindungen anwesend sind.<sup>[67]</sup> Eisen(II)-Mineralien waren in Folge der Verwitterung der basalt- und komatiithaltigen Erdkruste präsent.<sup>[271]</sup> Elementares Eisen stand auf der frühen Erde durch Serpentinisierung von mafischem Gestein und durch Meteoriteneintrag zur Verfügung.<sup>[9, 272-274]</sup>

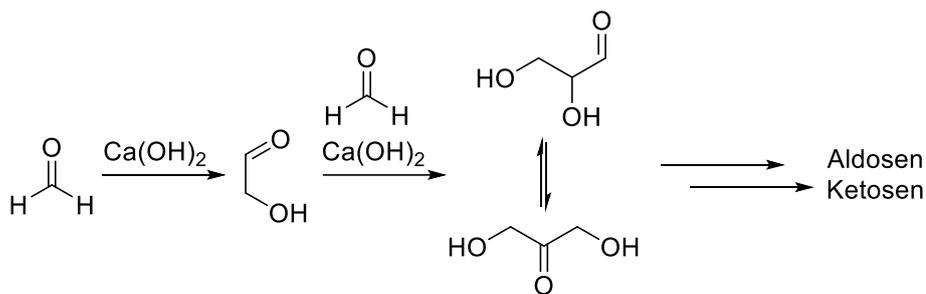
Trotz des umfangreichen Eisenvorkommens der Erde werden Eisenmineral-basierte Peptidbildungen in nur wenigen Studien thematisiert. Diese nutzen teils synthetisch hergestellte Eisen(III)-haltige Mineralien wie Goethit ( $\alpha$ -FeO(OH)),<sup>[205, 275]</sup> Akaganeit ( $\beta$ -FeO(OH,Cl)),<sup>[275-276]</sup> Hämatit ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) oder Magnetit und gemischte Metallferrite.<sup>[262, 275-278]</sup> Vereinzelt wird hierbei auch mit Nanopartikeln gearbeitet.<sup>[276-277]</sup> Aufgrund der sehr unterschiedlichen Reaktionsbedingungen fällt ein Vergleich der Versuchsreihen untereinander sowie auch mit anderen Mineralien schwer.<sup>[262, 278]</sup> Eine Gegenüberstellung der Eisen-basierten Ansätze zeigt jedoch, dass die Aminosäurekupplung bevorzugt im trockenen Zustand und bei

erhöhter Temperatur vorgenommen wird.<sup>[262, 275, 277-278]</sup> Zusätzlich stellten ZAIA *et al.* für ihr System fest, dass Nass-Trocken-Zyklen die Peptidbildung im Vergleich zu trockenen Bedingungen noch weiter begünstigen.<sup>[205]</sup> In den beschriebenen Studien wurden so ausgehend von Eisenoxiden und Eisenoxidhydroxiden bis zu zwei Kupplungsschritte je Molekülkette beobachtet.<sup>[205, 262, 275-278]</sup> Häufig wurden dabei DKPs als Nebenprodukte detektiert.<sup>[205, 262, 275-278]</sup> Nicht mit einbezogen in diese Zusammenfassung wurde die Arbeit von NAKA *et al.*, da sich diese Studie durch den Einsatz kolloidaler Lösungen sowie von 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDAC) als zusätzlichem Kondensationsmittel deutlich von den vorangehenden Publikationen unterscheidet.<sup>[279]</sup>

## 2.3 Präbiotische Phosphorylierungsreaktionen

### Entstehung von Nukleosiden

Eine weitere zentrale Fragestellung der präbiotischen Chemie stellt die Entstehung von Organophosphaten dar. Im Fokus steht hierbei vor allem die Phosphorylierung von Nukleosiden sowie von Zuckern. Letztere sind präbiotisch unter anderem durch die Formose-Reaktion zugänglich (Abbildung 10).<sup>[280]</sup>



**Abbildung 10:** Formose-Reaktion nach BUTLEROW und BRESLOW.<sup>[280-281]</sup>

Die Umpolung von Formaldehyd und dessen anschließende Dimerisierung in Gegenwart einer Base führt zu Glykolaldehyd. Dieses kann Aldol-Reaktionen mit sich selbst oder mit Formaldehyd durchlaufen. Das Produkt der letztgenannten Umsetzung, Glyceraldehyd, kann zu Dihydroxyaceton tautomerisieren. Weitere (Retro-)Aldol-Reaktionen resultieren in komplexen Mischungen von Aldosen und Ketosen.<sup>[281]</sup> Neben der fehlenden Selektivität stellt die Umpolung von Formaldehyd unter präbiotisch plausiblen Bedingungen einen zentralen Kritikpunkt dar.<sup>[281]</sup> Vorgestellte Lösungsansätze bewältigen diesen Reaktionsschritt beispielsweise photochemisch oder umgehen ihn durch Zugabe von Glykolaldehyd als Katalysator.<sup>[281-282]</sup> Alternativ zur Formose-Reaktion könnten Zucker auf der frühen Erde durch eine präbiotische Variante der KILIANI-FISCHER-Synthese verfügbar gewesen sein.<sup>[283-285]</sup> Photoredox-Prozesse ermöglichen hierbei die Reduktion von Blausäure. Sukzessive

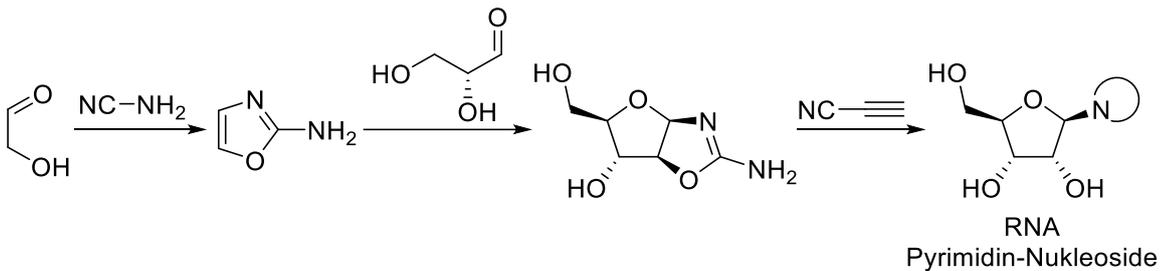
Hydrolyse, Addition von Blausäure und Reduktion liefern verschiedene Zuckerverbindungen.<sup>[285-286]</sup>

MILLER-artige Reaktionsszenarien sowie Eintrag durch Meteoriten wurden bereits zu Beginn als Quellen für Nucleobasen auf der frühen Erde genannt.<sup>[69, 81-82]</sup> Zusätzlich ist die Bildung der Pyrimidin-Base Cytosin (BC) und dessen Hydrolyseprodukt Uracil (BU) nach ORGEL *et al.* auch in wässrigen Lösungen ausgehend von Cyanoacetylen und Cyanat möglich.<sup>[287]</sup> Da Cyanoacetylen und Cyanat jedoch hydrolyseempfindlich sind,<sup>[287-289]</sup> schlugen MILLER *et al.* die Entstehung von Cytosin ausgehend von Cyanoacetaldehyd, dem Hydrolyseprodukt von Cyanoacetylen, in einer Harnstofflösung vor.<sup>[288]</sup> Alternativ kann Harnstoff auch durch Guanidin ersetzt werden.<sup>[289]</sup> Ein neuer Reaktionspfad zu den Pyrimidin-Basen von CARELL *et al.* basiert hingegen auf der Speicherung von Cyanoacetylen in Form eines Acrylnitril-Derivates.<sup>[290]</sup> Die Purin-Basen könnten auf der frühen Erde zusätzlich durch Polymerisation von Blausäure zur Verfügung gestanden haben.<sup>[291]</sup> ORGEL *et al.* beschrieben die Bildung von Purin-Basen über Imidazolintermediate, welche ausgehend vom Blausäure-Trimer (Aminomalononitril) und -Tetramer (DAMN) gebildet werden können.<sup>[292-293]</sup>

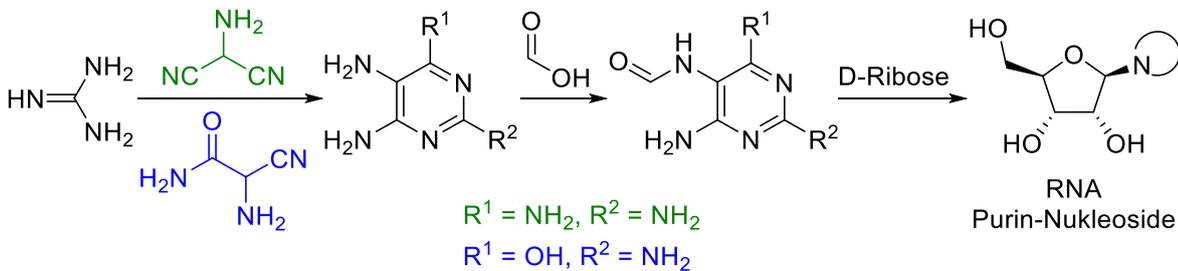
Um zu RNA-Nucleosiden zu gelangen ist abschließend die Knüpfung einer glykosidischen Bindung zwischen D-Ribose und den Nucleobasen erforderlich. Dies birgt jedoch eine Vielzahl von Problemen: Die Formose-Reaktion verläuft nicht nur unselektiv mit geschätzten D-Riboseausbeuten von unter 1%,<sup>[281, 294]</sup> letztere ist auch instabil in wässrigen Lösungen.<sup>[295-296]</sup> Zusätzlich wurden sowohl Studien von ORGEL *et al.* ausgehend von D-Ribose, Cyanamid und Cyanoacetylen sowie in direkten Umsetzungen von D-Ribose mit Purin-Basen Produktmischungen, die außer den natürlichen  $\beta$ -Furanosylverbindungen auch die entsprechenden  $\alpha$ -Anomere, Pyranosylverbindungen und regioisomere Produkte enthielten, erzielt.<sup>[297-300]</sup> Die Umsetzungen mit Purin-Basen lieferten häufig nur geringe Ausbeuten,<sup>[298, 300]</sup> Reaktionen mit Pyrimidin-Basen waren zudem nicht erfolgreich.<sup>[299]</sup> Um diese Probleme zu umgehen, entwickelten SUTHERLAND *et al.* eine Route zu Pyrimidin-basierten RNA-Nucleosiden ausgehend von Glykolaldehyd und Cyanamid (Abbildung 11).<sup>[301]</sup> Das resultierende 2-Aminooxazol reagiert anschließend mit Glyceraldehyd zu verschiedenen Aminooxazolin-Derivaten. Lyxo- und Xylo-Isomer treten nur in geringem Maße auf.<sup>[301]</sup> Die Ribo-Verbindung kann in Phosphat-Puffer zum Arabino-Derivat isomerisieren, welches für die Bildung der gewünschten  $\beta$ -D-Furanoside benötigt wird.<sup>[301-302]</sup>

Weiterentwicklungen des Reaktionspfades nehmen Bezug auf komplexe präbiotische Szenarien: Die Reaktion komplexer Zuckermischungen führt ohne schrittweise Zugabe der Reaktanden zu Ribonucleotiden.<sup>[303]</sup> Außerdem wurde ein einheitlicher Weg zu Pyrimidin- und 8-Oxo-Purin-Nucleotiden vorgeschlagen.<sup>[304]</sup>

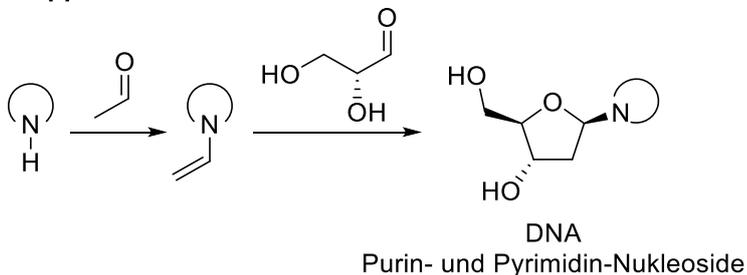
**Sutherland 2009**



**Carell 2016**



**Trapp 2019**



**Abbildung 11:** Präbiotisch plausible Reaktionspfade zu RNA- und DNA-Nucleosiden.<sup>[301, 305-306]</sup>

Studien von CARELL *et al.* zeigen einen Weg zu den Purin-basierten RNA-Nucleosiden auf. Aus der Umsetzung von Guanidin mit dem Blausäure-Trimer Aminomalononitril oder wahlweise dessen Hydrolyseprodukt Aminocyanoacetamid resultierende Aminopyrimidine liefern mit Ameisensäure Formamidopyrimidine (FaPys).<sup>[305]</sup> Diese können mit D-Ribose zu  $\alpha$ - $\beta$ -Furanosiden und Pyranosiden umgesetzt werden. Die  $\beta$ -Anomere überwiegen hierbei.<sup>[305]</sup> Neuere Arbeiten der Forschungsgruppe setzen den Lösungsansatz in einen größeren präbiotischen Kontext und zeigen zudem einen einheitlichen Weg für Purin- und Pyrimidin-Nucleoside auf.<sup>[111, 130]</sup>

Zuletzt erzielten TRAPP *et al.* durch sukzessiven Aufbau der D-Desoxyribose-Einheit an den DNA-Nucleobasen die entsprechenden DNA-Nucleoside. Mit Acetaldehyd gebildete Vinyl-nucleobasen liefern hierbei mit D-Glyceraldehyd  $\beta$ -Desoxyribonucleoside. Für die Reaktion konnte eine hohe Regio- sowie Stereoselektivität beobachtet werden.<sup>[306]</sup>

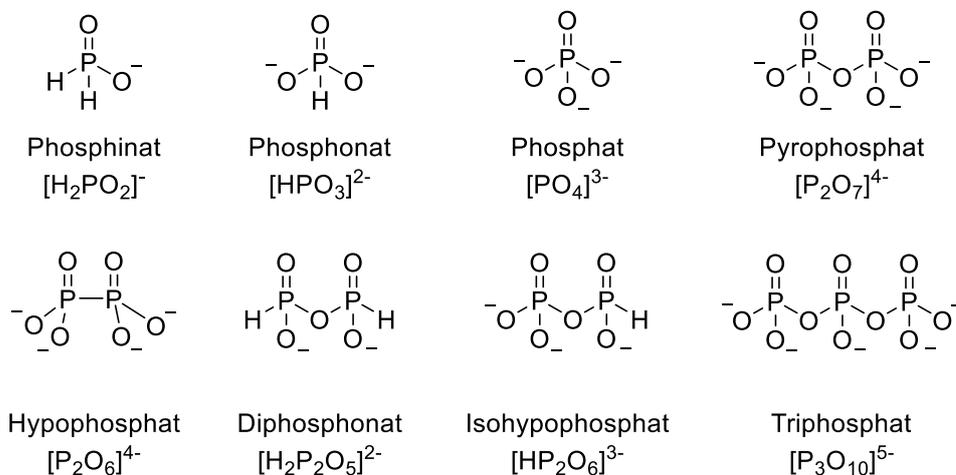
## Bedingungen für Phosphorylierungen auf der frühen Erde

Ausgehend von Nucleosiden bedarf es abschließend eines Phosphorylierungsschrittes, um zu Nucleotiden zu gelangen. Die Bildung von Organophosphaten auf der frühen Erde erfordert jedoch das Überwinden mehrerer Hindernisse. Phosphorylierungen sind Kondensationsreaktionen. In wässriger Lösung ist somit eine thermodynamische Barriere zu bezwingen.<sup>[24, 119]</sup> Hinzu kommt, dass das Phosphorinventar der Erde im Hadaikum - wie auch auf der modernen Erde - vor allem aus in Wasser nahezu unlöslichen Phosphatmineralien, wie beispielsweise Apatit oder Whitlockit ( $\text{Ca}_9\text{Mg}(\text{PO}_4)_6(\text{PO}_3\text{OH})$ ), bestand.<sup>[8, 119-120]</sup> Zusätzlich sind nukleophile Angriffe auf Phosphate durch die negative Ladung in unmittelbarer Nähe zum elektrophilen Zentrum kinetisch gehemmt,<sup>[24, 32]</sup> was jedoch gleichzeitig die hydrolytische Stabilität und den Verbleib von Biomolekülen in Kompartimenten gewährleistet.<sup>[32, 307]</sup>

Die Überwindung dieser Barrieren ist Gegenstand aktueller Forschung. Um die Bandbreite der Lösungsansätze in den präbiotischen Kontext einordnen zu können, ist es unabdingbar einen genaueren Blick auf das Phosphorinventar der frühen Erde und somit auf möglicherweise in geringen Mengen vertretene reduzierte Phosphorspezies zu werfen. So könnten vorwiegend vorliegende Phosphatverbindungen auf der frühen Erde durch abiotische Prozesse zu Phosphiten reduziert worden sein. Verschiedene Forschungsarbeiten konnten zeigen, dass dies mithilfe von elektrischen Entladungen, welche beispielsweise in Folge von vulkanischer Aktivität auftreten können, möglich ist.<sup>[308-310]</sup> Eine weitere Studie untersuchte erfolgreich die Phosphatreduktion durch Eisen(II),<sup>[311]</sup> welches in den Urozeanen in hohen Konzentrationen vermutet wird.<sup>[6]</sup> Als weiteres Produkt neben Phosphit konnte hierbei Pyrophosphat beobachtet werden.<sup>[311]</sup> Reduzierte Phosphorverbindungen könnten jedoch nicht nur durch Reduktion von terrestrischen Phosphaten vorgelegt haben, sondern könnten auch auf Meteoriten auf die frühe Erde transportiert worden sein. Meteorite sowie auch interplanetare Staubwolken enthalten Phosphide, wie beispielsweise Schreibersit ( $(\text{Fe},\text{Ni},\text{Cr})_3\text{P}$ ), Nickelphosphid ( $\text{Ni}_3\text{P}$ ) oder Perryit ( $(\text{Ni},\text{Fe})_8(\text{Si},\text{P})_3$ ).<sup>[8, 312]</sup> Zusätzlich konnten, wie bereits zu Beginn erwähnt, auf dem MURCHISON-Meteorit Alkylphosphonsäuren ausgemacht werden.<sup>[72]</sup> Schätzungen geben für die Menge reduzierter Phosphorverbindungen, die während des *late heavy bombardments* durch extraterrestrische Quellen auf die frühe Erde gebracht wurden, einen Wert von  $10^{15}$  bis  $10^{18}$  kg an.<sup>[120]</sup> Eine Studie von GERASIMOV *et al.* legt zudem nahe, dass mit den Meteoriteneinschlägen einhergehende Schmelz- und Verdampfungsprozesse zusätzlich zur Reduktion terrestrischer Phosphate geführt haben könnten.<sup>[313]</sup>

Zahlreiche Forschungsarbeiten beschäftigen sich mit der Korrosion von Schreibersit in Gegenwart von Wasser bzw. wässrigen Lösungen mit verschiedenen Additiven.<sup>[314-319]</sup> Hierbei wird häufig auf das synthetische Analogon  $\text{Fe}_3\text{P}$  zurückgegriffen.<sup>[314-315, 317, 319]</sup> Phosphonate

und Phosphate stellen die Hauptprodukte der Korrosion dar.<sup>[314-315, 317]</sup> Außerdem konnten auch Hypo- sowie Pyrophosphat, Diphosphonat, Isohypophosphat und Triphosphat beobachtet werden (Abbildung 12).<sup>[314-319]</sup> Anwesender Sauerstoff hat keinen Einfluss auf das Produktspektrum, jedoch ermöglicht dieser höhere Ausbeuten als solche, die in Versuchen unter Schutzgasatmosphäre erzielt wurden.<sup>[315]</sup> Nennenswert sind außerdem auch Korrosionsversuche von KEE *et al.*, in denen unter Sauerstoffausschluss mithilfe von UV-Strahlung Phosphinate beobachtet werden konnten.<sup>[314]</sup> LAURETTA und PASEK konnten außerdem feststellen, dass in Gegenwart organischer Substrate die Bildung organischer Phosphorverbindungen möglich ist.<sup>[315, 319]</sup> Mechanistisch wird von einer radikalischen Reaktion ausgegangen. Initial könnten sich durch Reaktion des Schreibersits mit Wasser Phosphonat-Radikale bilden. Diese könnten durch (wiederholte) Rekombination sowie Kettenfortpflanzung zu den verschiedenen Korrosionsprodukten führen.<sup>[319]</sup>



**Abbildung 12:** Produkte der Korrosion von Fe<sub>3</sub>P.<sup>[314-319]</sup>

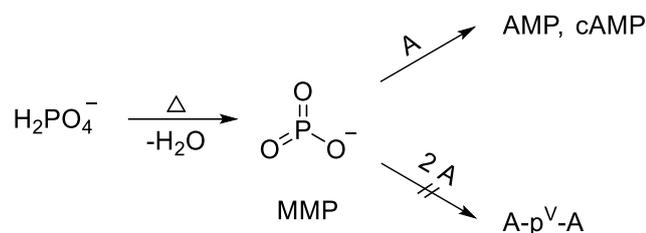
Damit im Einklang steht der Fund von Phosphiten in ozeanischen Carbonaten, die dem frühen Archaikum zugeordnet werden,<sup>[320]</sup> sowie in geothermalen Quellen und in Fulguriten.<sup>[318, 321-322]</sup> Thermodynamisch sind Phosphonate instabil, jedoch weisen sie eine gewisse kinetische Stabilität auf,<sup>[311, 315]</sup> sodass davon ausgegangen wird, dass diese sich auf der frühen Erde anreichern konnten.<sup>[311]</sup> Entscheidend bei der Oxidation von Phosphonaten ist die Anwesenheit von Radikalen. Sie ermöglichen die Spaltung der Phosphor-Wasserstoff-Bindung, die den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt.<sup>[120]</sup> Erfolgt die Phosphonat-Oxidation in einer reduzierenden Atmosphäre (p(H<sub>2</sub>) = 0.1 bar) durch UV-Photolyse, so schätzt PASEK die Halbwertszeit auf 10<sup>8</sup> bis 10<sup>10</sup> Jahre.<sup>[120]</sup> Eine jüngere experimentelle Studie von PASEK *et al.* geht hingegen von einer abiotischen Phosphonat-Halbwertszeit von ca. 6 x 10<sup>5</sup> bis 10<sup>8</sup> Jahren in einer sauerstoffarmen Umgebung (10<sup>-5</sup> x modernes Sauerstofflevel) und in Abwesenheit von Radikalbildnern, wie beispielsweise Eisen, aus.<sup>[311]</sup>

## Thermische Organophosphatbildung

Vergleichbar zur oben beschriebenen Peptidbildung wurde auch in Phosphorylierungsreaktionen versucht die thermodynamische Barriere thermisch zu überwinden. So wurden beispielsweise Verdampfungsexperimente bei 90 °C mit Thymidin und Apatit als Phosphorylierungsreagenz durchgeführt. In Gegenwart von Oxalat, welches die Calciumionen chelatisiert und somit die verfügbare Phosphatmenge positiv beeinflusst, konnte die Bildung monophosphorylierter sowie höherer Produkte erzielt werden.<sup>[323]</sup> Des Weiteren konnten MACK *et al.* durch Erhitzen nukleosid- und phosphathaltiger Lyophilisate auf 160 °C verschiedene Monophosphate sowie Dinukleosidphosphate (N-p<sup>V</sup>-N)<sup>1</sup> beobachten.<sup>[113]</sup> Präbiotisch plausible Verdampfungsszenarien und Nass-Trocken-Zyklen finden sich darüber hinaus in der Literatur auch häufig in Kombination mit den im Folgenden beschriebenen Ansätzen.<sup>[324-326]</sup>

## Phosphorylierung in nicht-wässrigen Reaktionsmedien

Nicht-wässrige Reaktionsmedien können Phosphorylierungsreaktionen erleichtern. Vor diesem Hintergrund untersuchten SCHOFFSTALL *et al.* Amide als alternative Reaktionsmedien mit besonderem Fokus auf Formamid. Mit Phosphatsalzen konnte auf diese Weise die Bildung von Nukleosiddiphosphaten (NDP) und verschiedener azyklischer sowie zyklischer Monophosphate festgestellt werden.<sup>[123, 327-328]</sup> Jedoch wurden keine N-p<sup>V</sup>-N gebildet.<sup>[123, 328]</sup> Darüber hinaus kommt es sowohl zur Isomerisierung phosphorylierter Produkte als auch zu deren Zersetzung.<sup>[123, 327]</sup> In Harnstoff-Lösungen wurden zusätzlich Harnstoffaddukte detektiert.<sup>[123]</sup> Als reaktive Spezies der Phosphorylierung in Formamid wurde monomeres Monophosphat (MMP) vorgeschlagen (Abbildung 13).<sup>[123]</sup> In weitergehenden Studien wurde sowohl der Einsatz von kondensierten Phosphaten als auch von Phosphatmineralien erfolgreich erprobt.<sup>[122, 328]</sup>



**Abbildung 13:** Vorgeschlagener Mechanismus der Phosphorylierung in Formamid nach SCHOFFSTALL *et al.*<sup>[123]</sup>

Alternativ kommen häufig eutektische Lösungen zum Einsatz. So gelang in Harnstoff/Cholinchlorid-Lösungen (2:1) ausgehend von Phosphatsalzen und -mineralien die Phosphorylierung von Glycerin, Glukose, Ethanolamin, Cholinchlorid, Adenosin (A) und Uridin (U). Für

<sup>1</sup> Die Benennung der Phosphorverbindungen ist im Abkürzungsverzeichnis erläutert.

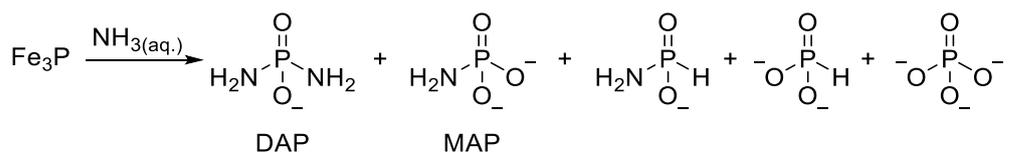
die Nucleoside konnten auch die entsprechenden Di- und Triphosphate detektiert werden.<sup>[124]</sup> Eutektische Lösungen von Glycerin und Cholinchlorid zeigen außerdem in Gegenwart von Phosphatsalz bzw. -mineral oder von Trimetaphosphat monophosphorylierte Produkte der Lösungsmittelbestandteile.<sup>[329]</sup> Die Entstehung oligomerer Nucleotide bis hin zu Trimeren konnten MENOR-SALVÁN *et al.* ausgehend von Dinatriumhydrogenphosphat in einer eutektischen Lösung aus Harnstoff, Ammoniumformiat und Wasser, die beim Erhitzen Formamid bildet, beobachten.<sup>[109]</sup> Versuche mit Phosphatmineralien in diesem Reaktionsmedium führten zudem zur Bildung sekundärer Mineralien, wodurch die Verfügbarkeit von Phosphat verbessert werden konnte.<sup>[109]</sup>

### Kondensationsreagenzien

In analoger Weise zur Aminosäurekondensation könnten Kondensationsreagenzien auch zur Phosphorylierung von organischen Molekülen auf der frühen Erde beigetragen haben. Dementsprechend ist es wenig erstaunlich, dass verschiedene Studien ein breites Spektrum an Kondensationsmitteln aufzeigen. Dieses beinhaltet: Dicyandiamid,<sup>[323]</sup> Harnstoff,<sup>[109, 112, 323-324, 330-331]</sup> Cyanogen,<sup>[332]</sup> Cyanamid,<sup>[330, 333-334]</sup> Dicyanamid,<sup>[213]</sup> Cyanat,<sup>[333]</sup> Cyanid sowie COS in Gegenwart von Aminosäuren (Abbildung 6).<sup>[235, 335]</sup> Für die Phosphorylierung in Gegenwart von Harnstoff wurden hierbei unter anderem Phosphoramidate und Carbamoylphosphate als aktive Intermediate vorgeschlagen.<sup>[109, 112]</sup>

### Aktivierete Phosphate

Bei der nukleophilen Substitution an Phosphorzentren aktivierter Phosphate wird im Gegensatz zur Reaktion mit Phosphat kein Wasser als Abgangsgruppe freigesetzt. In wässrigen Lösungen ist somit aufgrund der Seltenheit der Abgangsgruppe im System die Reaktion mit den aktivierten Verbindungen thermodynamisch begünstigt. Funktionelle Seitengruppen, die einen starken elektronenentziehenden Effekt auf das elektrophile Phosphorzentrum ausüben, wirken sich zusätzlich positiv auf die Phosphorylierungsreaktion aus.<sup>[118]</sup>



**Abbildung 14:** Produkte der Schreibersit-Korrosion in wässriger Ammoniak-Lösung nach KRISHNAMURTHY *et al.*<sup>[336]</sup>

Eine bekannte Klasse aktivierter Phosphate stellen Amidophosphate dar. Zwar sind keine entsprechenden mineralischen Vorkommen bekannt,<sup>[118]</sup> jedoch sind diese durch Inkubation von Schreibersit, Polyphosphaten oder Phosphonaten in wässriger Ammoniak-Lösung

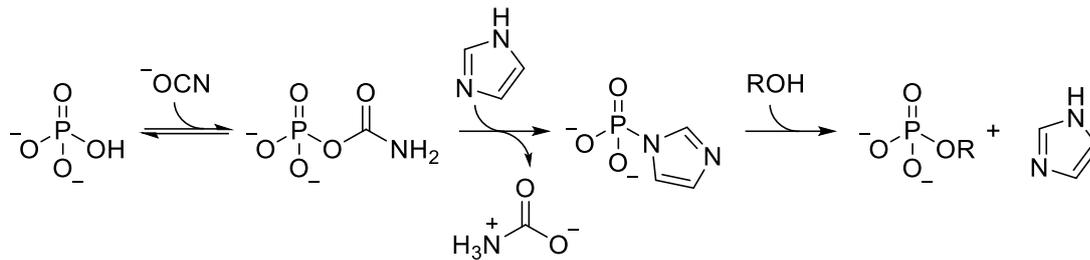
zugänglich (Abbildung 14).<sup>[336]</sup> Vorteil des gebildeten DAP ist dessen im Vergleich zu Phosphaten erhöhte Löslichkeit in Wasser in Anwesenheit zweiwertiger Metallsalze. Ursächlich hierfür ist die geringere negative Ladung, die intensivere Ausfällung verhindert.<sup>[336]</sup>

KRISHNAMURTHY *et al.* setzten DAP erfolgreich in der Phosphorylierung von RNA-Nucleosiden ein. Umsetzungen pastöser Reaktionsmischungen sowie in wässriger Lösung mit und ohne Imidazol als Additiv lieferten hauptsächlich 2', 3'-zyklische Phosphate.<sup>[218]</sup> In wässrigen Reaktionen ausgehend von 5'-NMPs wurden 5'-Nucleosidamidodiphosphate sowie -triphosphate detektiert. Pastöse Reaktionsmischungen führten außer zu den monomeren Produkten auch zu Oligomeren bis hin zu Tetrameren, welche terminal 2', 3'-zyklische Phosphatgruppen aufweisen. Es wird angenommen, dass ein nukleophiler Angriff der Hydroxylgruppen des Nucleosids zur Bildung von Monophosphoramidaten führt. Diese können in einer weiteren nukleophilen Substitution das zyklische Organophosphat bilden.<sup>[218]</sup> In Anwesenheit von Imidazol kondensiert DAP zunächst mit dem Additiv zu einem Imidazolamidophosphat. Dieses kann anschließend nukleophil von den Hydroxylgruppen der Nucleoside angegriffen werden.<sup>[218]</sup> Kurze Zeit später konnte ausgehend von DAP auch die Phosphorylierung von DNA-Nucleosiden in Gegenwart von Imidazol gezeigt werden.<sup>[337]</sup> Als Produkte konnten 5'-amidophosphorylierte Desoxynucleoside erhalten werden. Ausgehend von diesen werden bevorzugt 3'-5'-verknüpfte Oligomere erzeugt.<sup>[337]</sup>

Ausgehend von Amidophosphaten konnten auch Phosphorylierungen weiterer präbiotisch relevanter Verbindungen erzielt werden. So gelang ESCHENMOSER *et al.* die Phosphorylierung von Glykolaldehyd mit Amidotriphosphat (AmTP).<sup>[338]</sup> Es wurde angenommen, dass zunächst das Carbonylkohlenstoffatom nukleophil durch die Aminogruppe angegriffen wird. Das resultierende Triphosphat könnte mit Pyrophosphat als Abgangsgruppe ein zyklisches Phosphoramidat bilden, welches anschließend durch Abspaltung von Ammoniak das Glykolaldehydphosphat liefert.<sup>[338]</sup> Im Einklang mit diesem Mechanismusvorschlag steht eine spätere Studie, welche die regioselektive Phosphorylierung verschiedener Aldosen in  $\alpha$ -Position zeigt.<sup>[339]</sup> Des Weiteren nutzten POWNER *et al.* DAP und AmTP zur Phosphorylierung von Glykol- und Glycerinaldehyd, um Phosphoenolpyruvat zu erzeugen.<sup>[340]</sup> Darüber hinaus wird DAP in der Literatur auch zur Phosphorylierung von Glycerin, Aminosäuren und Aminonitrilen sowie zur Bildung von Phospholipiden eingesetzt.<sup>[218, 341]</sup>

HUCK *et al.* hingegen bedienen sich Carbamoylphosphaten, um effektive, präbiotisch plausible Phosphorylierungsreaktionen zu ermöglichen.<sup>[325]</sup> Nach deren Bildung aus Phosphaten in Gegenwart von Cyanat werden diese in thermodynamisch instabile Imidazolphosphate überführt. Letztere können jedoch aufgrund ihrer kinetischen Stabilität in der Lösung angereichert werden und reagieren erst nach einem Trocknungsschritt mit verschiedenen

organischen Substraten (Abbildung 15). Nicht abreagiertes Phosphat ist nach erneutem Lösen in Gegenwart von Cyanat verfügbar.<sup>[325]</sup>



**Abbildung 15:** Carbamoylphosphate als aktivierte Phosphat-Verbindungen nach Huck *et al.*<sup>[325]</sup>

Polyphosphate stellen eine weitere Klasse aktivierter Phosphate dar. Problematisch im präbiotischen Kontext ist jedoch der sehr geringe Mineralbestand, der sich auf einen einzelnen Vertreter der Klasse beschränkt.<sup>[118]</sup> Jedoch zeigt eine Studie von YAMAGATA *et al.*, wie oben beschrieben, dass die Entstehung von Polyphosphaten in vulkanischen Umgebungen möglich sein könnte.<sup>[14]</sup> Des Weiteren stellt die Oxidation von Phosphonaten und Hypophosphonaten mit Hydroxyl-Radikalen eine weitere präbiotisch plausible Quelle für Polyphosphate dar.<sup>[342]</sup> Unter der Annahme, dass Polyphosphate auf der frühen Erde verfügbar waren, konnten PASEK *et al.* in Phosphorylierungsreaktionen mit Pyrophosphat zyklische und azyklische Monophosphate sowie N-p<sup>V</sup>-N erzeugen.<sup>[331]</sup> In einer Vielzahl von Forschungsarbeiten wurde außerdem mit Trimetaphosphat oder linearem Triphosphat gearbeitet, was ebenfalls in der Bildung zyklischer und azyklischer Monophosphate sowie der Entstehung von NTP resultierte.<sup>[326, 343-344]</sup> Magnesiumionen können hierbei durch Koordination des Nucleosids und der Phosphatspezies katalytisch wirken.<sup>[344]</sup> Neben der Phosphorylierung von Nucleosiden wird in der Literatur außerdem auch die Bildung von Amphiphilen ausgehend von  $\beta$ -Hydroxy-*n*-Alkylaminen und Trimetaphosphat beschrieben.<sup>[345]</sup>

### Mineralien-basierte Phosphorylierung

Auch die Anwesenheit von Mineralien, wie Silikaten, kann Phosphorylierungsreaktionen begünstigen: Mit Kaolinit ( $\text{Al}_4[(\text{OH})_6\text{Si}_4\text{O}_{10}]$ ) und Quarz ( $\text{SiO}_2$ ) konnten höhere Ausbeuten bei der Phosphorylierung von Glycerin erzielt werden und auf amorphen Silika ist ausgehend von Adenin (BA), Ribose und Phosphat die Bildung von Adenosinmonophosphat (AMP) möglich.<sup>[329, 346]</sup> Letzteres kann auch durch die Adsorption auf Mordenit, einem Zeolith, erreicht werden.<sup>[347]</sup> Silikate unterstützen darüber hinaus auch die Phosphorylierung von Glukose und Glycerin unter hydrothermalen Bedingungen.<sup>[348-349]</sup> Ebenfalls förderlich wirken in dieser Reaktion Hämatit sowie Perlit.<sup>[348]</sup>

Des Weiteren kann auch die Korrosion von Schreibersit in wässrigen Lösungen organischer Substrate zu deren Phosphorylierung führen. Denkbar ist hierbei eine energetische

Kopplung der Kondensation mit der exergonen Korrosionsreaktion.<sup>[336, 350]</sup> Versuchsreihen von PASEK *et al.* zeigen auf diese Weise sowohl die Phosphorylierung von Nucleosiden als auch von Glycerin und Essigsäure.<sup>[315, 320, 350]</sup>

### Phosphorylierung mit reduzierten Phosphorverbindungen

Vergleichbar zur Schreibersit-Korrosion und der Hydrolyse verschiedener aktivierter Phosphate verläuft auch die Oxidation von Phosphonaten in Wasser exergon,<sup>[118, 336]</sup> sodass sich auch diese als Phosphorylierungsreagenzien für organische Substrate anbieten.<sup>[118]</sup> Tetrakoordinierte Phosphonate weisen im Vergleich zu Phosphaten eine geringere negative Ladung in unmittelbarer Nachbarschaft zum elektrophilen Phosphorzentrum auf. Aus diesem Grund übertrifft die Geschwindigkeit nukleophiler Angriffe auf Phosphonate die auf höher oxidierte Analoga.<sup>[32-33]</sup> Dieser Vorteil in Kombination mit der geringen Oxidationsempfindlichkeit im Vergleich zu trikoordinierten Phosphiten wurde Mitte der 1980er Jahre erstmals zur synthetischen Herstellung von Nucleotidoligomeren genutzt.<sup>[33, 351-353]</sup> Neben den beschriebenen Reaktivitätseigenschaften ist für die präbiotische Chemie auch die im Vergleich zu Phosphaten erhöhte Löslichkeit von Phosphor(III)-Salzen in Wasser von Bedeutung, da letztere somit verfügbar für Umsetzungen auf der frühen Erde waren.<sup>[308, 311, 354]</sup>

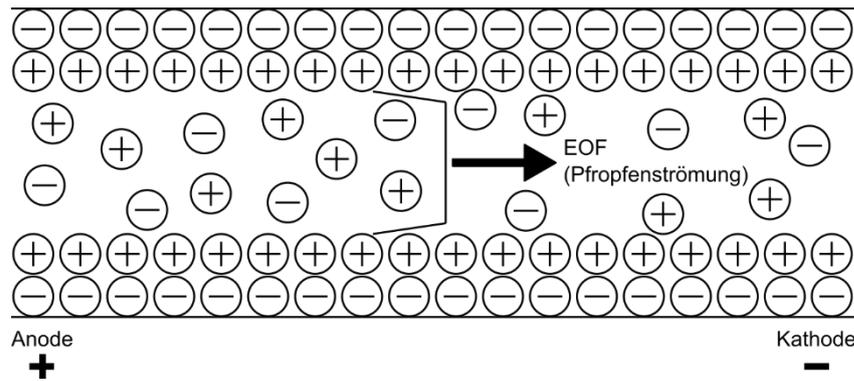
Im Einklang damit steht der erfolgreiche Einsatz von Phosphor(III)-Verbindungen in präbiotischen Studien wie der von SCHWARTZ *et al.*, in der Ammoniumphosphit als Phosphorylierungsreagenz dient.<sup>[355]</sup> Umsetzung mit Uridin bei 60 °C lieferte binnen eines Tages 20% des 5'-Monophosphonatproduktes, wohingegen in der Reaktion mit dem entsprechenden Phosphor(V)-Analogon auch nach längerer Reaktionszeit nahezu keine Produkte detektiert werden konnten.<sup>[355]</sup> Im Einklang damit steht eine jüngere Studie, in der ausgehend von Phosphonsäure (H<sub>3</sub>PO<sub>3</sub>) die Bildung von Nucleosid-, Glukose-, Cholin- und Glycerin-Monophosphonaten gelang.<sup>[124]</sup> Monophosphate sind in beiden Forschungsarbeiten in Abwesenheit eines Oxidationsmittels nicht zugänglich.<sup>[124, 355]</sup> Darüber hinaus konnten lediglich in erstgenannter Studie ungeladene *H*-Phosphonatdiester beobachtet werden.<sup>[355]</sup> Eine mögliche Erklärung hierfür ist deren hohe Hydrolyseempfindlichkeit.<sup>[24, 356]</sup> PEYSER *et al.* sahen in dieser zudem ein Hindernis für Phosphonat-Verbindungen als präbiotische Vorläufer moderner Phosphat-basierter Biopolymere.<sup>[356]</sup> *H*-Phosphonatdiester sind jedoch im Vergleich zu *H*-Phosphonatmonoestern leicht oxidierbar, was deren Hydrolyse auf der frühen Erde durch Überführung in die entsprechenden Phosphatdiester verhindert haben könnte.<sup>[355-357]</sup> Unterstützt wird diese Hypothese durch experimentelle Studien von LÖNNBERG.<sup>[358-359]</sup> In einer vergleichbaren Geschwindigkeit zu ihrer Hydrolyse werden *H*-Phosphonatdiester in Gegenwart von elementarem Schwefel oxidativ in die entsprechenden Thiophosphat-Derivate überführt.<sup>[358-359]</sup> In Reaktionen mit Thymidin konnten so bis zu Nucleotid-Pentamere

mit Thiophosphatverknüpfung detektiert werden. Möglicherweise stellt die raschere Oxidation der Diester hierbei die Triebkraft der Oligomerbildung dar.<sup>[358]</sup> Nachteilig sind jedoch die harschen Reaktionsbedingungen sowie, dass abschließend ein zusätzlicher Desulfurierungsschritt unabdingbar ist, um zu den gewünschten Phosphaten zu gelangen.<sup>[358]</sup>

## 2.4 Kapillarelektrophorese zur Trennung komplexer Mischungen

Produktmischungen in der präbiotischen Chemie können recht komplex ausfallen,<sup>[115, 360]</sup> da im Gegensatz zur klassischen Synthesechemie keine gerichtete Umsetzung erfolgt, sondern ausgehend von den Edukten verschiedenste Reaktionen ablaufen und Kombinationen gebildet werden können. In Zahlen ausgedrückt bedeutet dies, dass allein ausgehend von den zwanzig proteinogenen Aminosäuren 400 verschiedene Dipeptidkombinationen zugänglich sind. Analog können aus den RNA- und DNA-Nukleotiden 64 verschiedene Dinukleotide gebildet werden.

Da sowohl Aminosäuren und Peptide als auch Nukleotide in Lösung geladen vorliegen können, bietet sich neben der chromatographischen Trennung in Form der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) deren kapillarelektrophoretische Trennung an.<sup>[361-368]</sup> Deren einfachste Form, die Kapillarzonenelektrophorese (CZE: *capillary zone electrophoresis*), beruht auf unterschiedlichen elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeiten in Abhängigkeit der Ladung sowie des hydrodynamischen Radius der zu analysierenden Ionen in einem elektrischen Feld.<sup>[366]</sup> Zusätzlich zur elektrophoretischen Wanderung von geladenen Verbindungen kann bei elektrophoretischen Verfahren auch immer Elektroosmose beobachtet werden.<sup>[369]</sup> Die üblicherweise in der Kapillarelektrophorese (CE: *capillary electrophoresis*) verwendeten *bare fused silica* (BFS)-Kapillaren weisen nach Deprotonierung der Silanol-Gruppen, beispielsweise mit Natriumhydroxid-Lösung, eine negativ geladene Oberfläche auf. Anlagerung positiv geladener Ionen aus der Elektrolytlösung führt zur Ausbildung einer Doppelschicht, welche unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes zur Kathode wandert.<sup>[366, 369]</sup> Infolgedessen wird aufgrund der schmalen Kapillargeometrie der gesamte Kapillarinhalt zu diesem Pol transportiert, wodurch eine Pfropfenströmung und somit scharfe Signale resultieren (Abbildung 16).<sup>[366, 369]</sup> Der sogenannte elektroosmotische Fluss (EOF) übt keine Trennwirkung aus, sondern wirkt sich gleichermaßen auf ungeladene und geladene Moleküle in der Kapillare aus. Die observierbare Mobilität eines Analyten stellt dementsprechend in Bezug auf Größe und Richtung die Summe aus der elektrophoretischen Mobilität des Analyten ( $\mu_{ei}$ ) und der Mobilität des EOF ( $\mu_{EOF}$ ) dar.<sup>[366, 369]</sup> Beide Komponenten sind vom pH-Wert des Hintergrundpuffers (BGE: *background electrolyte*) abhängig, da dieser zum einen die Ladung der Analyten und zum anderen den Ladungszustand der Kapillarwand bestimmt.<sup>[366, 369]</sup>



**Abbildung 16:** Der EOF bewirkt eine Pfropfenströmung in der CE-Kapillare. Abbildung in Anlehnung an ENGELHARDT *et al.*<sup>[366]</sup>

Eine Variation der Stärke und Richtung des EOF ist durch Modifikation der Kapillaroberfläche möglich.<sup>[369-370]</sup> Gleichzeitig kann so die Adsorption von Analyten, wie beispielsweise Peptiden, auf der Kapillaroberfläche unterbunden und auf diese Weise eine Auftrennung hoher Qualität gewährleistet werden.<sup>[371-373]</sup> Modifizierte Kapillaroberflächen können dabei sowohl durch dynamische als auch permanente Beschichtung mit Polymeren erhalten werden.<sup>[370]</sup> Erfolgt die Belegung der Kapillare dabei rein durch Adsorption von Polymeren, so wird von einer dynamischen Beschichtung gesprochen. Diese zeichnen sich vor allem durch ihre simple Herstellung aus, erfordern jedoch in gewissen Zeitabständen regenerative Maßnahmen.<sup>[370]</sup> Im Gegensatz dazu weisen permanente Beschichtungen, bei denen die Belegung durch kovalente Bindungsknüpfung erfolgt, bei geringen Instandhaltungsaufwand eine längere Haltbarkeit auf. Die reproduzierbare Beschichtung der Kapillaren ist jedoch durch einen hohen Schwierigkeitsgrad gekennzeichnet.<sup>[370]</sup> Um reproduzierbare sowie qualitativ hochwertige permanente Beschichtungen zu erreichen, ist es sinnvoll die BFS-Kapillaren im Vorfeld mit Natriumhydroxid und Salzsäure zu aktivieren.<sup>[370, 374]</sup> Durch abschließendes Ausheizen soll der Oberfläche verbliebenes Wasser entzogen werden.<sup>[370, 374]</sup> Dies vereinfacht die Aufbringung bifunktioneller Silane, wie beispielsweise 3-(Trimethoxysilyl)propylmethacrylat ( $\gamma$ -MAPS),<sup>[372]</sup> die häufig den ersten Schritt in der Herstellung permanenter Kapillarbelegungen darstellt.<sup>[370]</sup> Während über die Silan-Einheit die Bindung an die Kapillarwand hergestellt wird, kann die zweite funktionelle Gruppe in einer Polymerisationsreaktion mit einem Monomer zur Belegung der Kapillare führen.<sup>[370]</sup> Beispielsweise kann das über die Methoxysilan-Gruppen an die Kapillarwand geknüpfte  $\gamma$ -MAPS an der Doppelbindung mit Acrylamid in einer radikalischen Polymerisationsreaktion in Gegenwart eines Persulfats und *N, N, N', N'*-Tetramethylethylendiamin (TEMED) zu linearem Polyacrylamid (LPA) umgesetzt werden.<sup>[372]</sup> Eine verbesserte Reproduzierbarkeit der Polymerisation erzielten DOVICH *et al.* in Abwesenheit von TEMED durch thermische Initiation.<sup>[375]</sup>

### 2.4.1 Kapillarelektrophorese-Massenspektrometrie Kopplung (CE-MS)

Weitverbreitet in kapillarelektrophoretischen Untersuchungen ist die *on-column* Detektion der Analyte durch UV-Absorption, Fluoreszenz- aber auch Leitfähigkeitsmessungen.<sup>[366, 369]</sup> Für eine sichere Zuordnung der Signale sind jedoch Referenzsubstanzen erforderlich, was mit Hinblick auf die komplexen Produktspektren in der präbiotischen Chemie nicht oder nur in Verbindung mit erheblichem Aufwand möglich ist. Aus diesem Grund sind Trennverfahren mit gekoppelter hochauflösender (HR: *high resolution*) massenspektrometrischer Detektion von großer Bedeutung für die Erforschung chemischer Prozesse auf der frühen Erde.<sup>[115-116, 362, 365]</sup>

Die große Herausforderung bei der Kopplung von CE und Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) ist die Handhabung zweier elektrischer Kreisläufe am *CE-Outlet*, an dem die Analytlösung die Kapillare verlässt. An diesem muss nicht nur der elektrische Kreislauf der CE-Trennung vervollständigt werden, sondern gleichzeitig auch der Betrieb des Elektrosprays durch einen entsprechenden elektrischen Kontakt sichergestellt werden.<sup>[376-377]</sup> Erschwerend kommt hinzu, dass beide Kreisläufe sich bezüglich der Größenordnung, und je nach Experiment, auch in der Richtung der Spannung unterscheiden.<sup>[376]</sup>

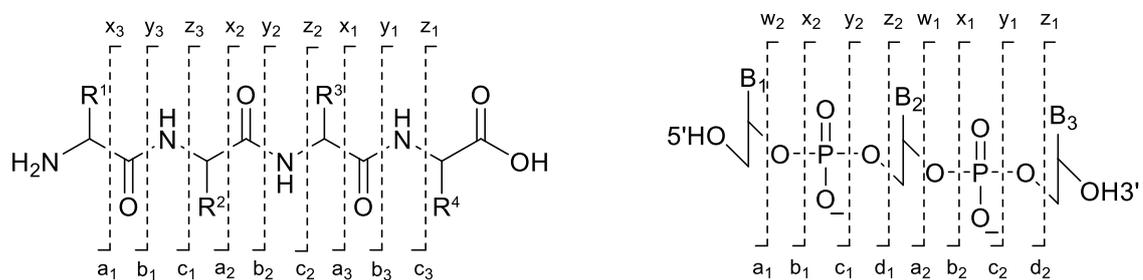
Ansätze zur Bewerkstelligung der Kopplung von CE und ESI-MS können entsprechend der gewählten Lösungsstrategie in zwei Kategorien eingeteilt werden: *Sheath-flow*- und *sheathless*-Interfaces. Häufigste Ausführungsvariante des erstgenannten ist das koaxiale *sheath-flow*-Interface, welches als sehr robust gilt und bereits kommerzialisiert wurde.<sup>[376-381]</sup> Eine koaxial zur Trennkapillare strömende Flüssigkeit – das sogenannte *sheath-liquid* (SL) - gewährleistet den elektrischen Kontakt zwischen der Elektrolytflüssigkeit und dem Elektrospray-Emitter, der gleichzeitig als CE-Elektrode fungiert.<sup>[376-377, 382]</sup> Weiterer Vorteil des *sheath-flow*-Setups ist die Loslösung der Spray-Eigenschaften von der Beschaffenheit des BGE sowie des EOF.<sup>[376, 381-382]</sup> Die Beschaffenheit des Sprays wird in diesem Aufbau durch das SL bestimmt.<sup>[376]</sup> Nachteilig hingegen ist der mit der Verdünnung durch das SL einhergehende Sensitivitätsverlust sowie die Peakverbreiterung in Folge der am Kapillarende auftretenden Sogwirkung.<sup>[376-377]</sup>

*Sheathless*-Interfaces hingegen zeichnen sich durch eine hohe Sensitivität aus, da auf ein verdünnend wirkendes SL verzichtet wird.<sup>[382]</sup> Um auch in Abwesenheit eines solchen einen konstanten elektrischen Kontakt zu gewährleisten, wurden vielfältige Strategien, wie beispielsweise die Applikation metallischer Trennkapillarenüberzüge,<sup>[383]</sup> die Verwendung poröser Kapillarenspitzen oder das Einführen eines Golddrahtes in die Trennkapillare,<sup>[384-385]</sup>

erprobt. Von Nachteil bleibt jedoch die hohe Komplexität sowie geringe Reproduzierbarkeit der Herstellungsprozesse.<sup>[382]</sup>

### Tandem-Massenspektrometrie von Peptiden und Nukleotiden

Eine unkomplizierte Analysemöglichkeit der Primärsequenz von Peptiden und Proteinen bietet die Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS).<sup>[386]</sup> Ohne vorherige Aufreinigung der Proben kann anhand charakteristischer Fragmente die Aminosäureabfolge bestimmt werden.<sup>[386]</sup> Die Identifikation unbekannter Polymere kann dabei durch Datenbankabgleich der detektierten Fragmente erleichtert werden.<sup>[368]</sup> Die Benennung der Fragmente geht auf ROEPSTORFF zurück: N-terminale Fragmente werden je nach Bruchstelle mit a, b oder c bezeichnet. C-terminale Bruchstücke heißen analogerweise x-, y- oder z-Fragment.<sup>[387]</sup> Die tiefgestellte Zahl gibt zudem Auskunft über die Aminosäureanzahl des Fragmentes (Abbildung 17).<sup>[387]</sup> Auch möglich ist die Abspaltung von Wasser, Ammoniak und Seitenketten.<sup>[388]</sup>



**Abbildung 17:** Nomenklatur der Peptid-Fragmente nach ROEPSTORFF *et al.* und der Nukleotid-Fragmente nach MCLUCKEY *et al.*<sup>[387, 389]</sup>

Im Vergleich zu Peptiden weisen Nukleotide mehr potenzielle Bruchstellen pro monomerer Einheit auf,<sup>[387, 389]</sup> was zu komplexen Spektren führt.<sup>[390-391]</sup> Zusätzlich ist auch die Abspaltung einzelner oder mehrerer Basen möglich.<sup>[389]</sup> Ähnlich zur Peptidnomenklatur werden 5'OH-terminale Fragmente mit a, b, c oder d benannt. 3'OH-terminale Fragmente heißen hingegen w, x, y oder z. Die Basenanzahl gezählt vom jeweiligen Terminus aus wird durch die tiefgestellte Zahl angegeben.<sup>[389]</sup>



# Kapitel 3

---

**Zielsetzung**



Eine Vielzahl essenzieller Biomoleküle, wie Peptide oder Organophosphate, stellen Kondensationsprodukte dar. Bedingt durch den Reaktionstyp ist deren Entstehung in Wasser jedoch thermodynamisch unvorteilhaft. Zusätzlich können zwitterionisch vorliegende Aminosäuren sowie elektrophile Zentren mit benachbarter negativer Ladung die Umsetzungen kinetisch beeinträchtigen. Mit diesen Hürden sind im präbiotischen Kontext diskutierte Reaktionspfade konfrontiert. Aus diesem Anlass sollen im Rahmen der vorliegenden Arbeit präbiotisch plausible Syntheserouten in flüssigem Schwefeldioxid als alternativem Reaktionsmedium entwickelt und untersucht werden. In Folge vulkanischer Aktivität war Schwefeldioxid auf der frühen Erde vorhanden und bereits ein geringfügig erhöhter Atmosphärendruck, wie er auch für die frühe Erde diskutiert wird, ist ausreichend damit es in flüssiger Form vorliegt.

Bei der Erforschung möglicher präbiotischer Reaktionsrouten stellen Robustheit, Verfügbarkeit der Ausgangsstoffe sowie kurze Reaktionssequenzen wesentliche Kriterien dar. In diesem Zusammenhang sollen im ersten Teil dieser Arbeit Peptidbildungsreaktionen in flüssigem Schwefeldioxid untersucht werden. Zunächst soll die Robustheit einer Kupfer-vermittelten Peptidbildungsreaktion anhand einer Variation verschiedener Reaktionsparameter quantifiziert werden. Motiviert durch die geringe Verfügbarkeit von Kupfer soll anschließend ein Eisen-basierter Reaktionspfad zu Peptiden in flüssigem Schwefeldioxid entwickelt werden. Hierbei sollen reduzierte Eisenverbindungen, welche unter anoxischen Bedingungen mit Eisen(III)-Spezies auf der frühen Erde koexistierten, als Ausgangsmaterialien verwendet werden. Neben der Robustheit des Reaktionspfades soll auch die Vereinbarkeit der Syntheseroute mit einem präbiotisch plausiblen komplexeren Szenario untersucht werden. Abschließend soll die präbiotische Plausibilität beider Metall-vermittelter Aminosäurekupplungen anhand des Einsatzes von Mineralien, welche dem Hadaikum zugeordnet werden können, evaluiert werden.

Im zweiten Teil soll das präbiotische Szenario von flüssigem Schwefeldioxid als Reaktionsmedium für Phosphorylierungsreaktionen bewertet werden. Hierbei soll Phosphonsäure, deren Existenz unter anderem in Folge der Korrosion meteoritischer Schreibersits plausibel ist, als Phosphorylierungsreagenz dienen, um kinetischer Inhibition, wie sie beim Einsatz von Phosphorelektrophilen mit hoher benachbarter negativer Ladung beobachtet wird, vorzubeugen. Mit Adenosin als Modellsubstrat soll erprobt werden, ob mithilfe der Oxidationskraft des Lösungsmittels separate Schritte zur Bildung von Organophosphaten verzichtbar sind. Ausgehend davon sollen mögliche Produktpfade der Syntheseroute identifiziert und untersucht werden. Abschließend soll sowohl die Vereinbarkeit mit weiteren biochemisch relevanten Substraten sowie auch die Anwendung in einem präbiotisch plausiblen, komplexeren Szenario getestet werden.



# Kapitel 4

---

**Ergebnisse und Diskussion**

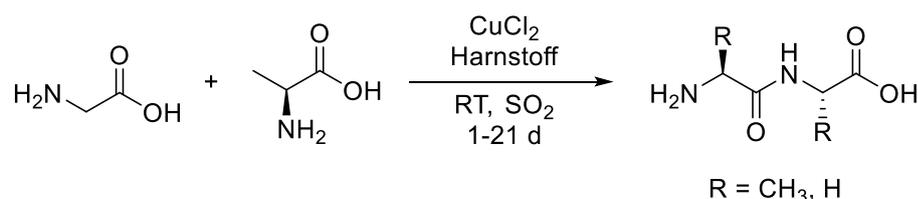


## 4.1 Metall-vermittelte Peptidbildung in flüssigem Schwefeldioxid

Die Ergebnisse zur Kupfer-vermittelten Peptidbildung wurden in F. Sauer, M. Haas, C. Sydow *et al.*, *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 7182, <https://www.nature.com/articles/s41467-021-27527-7> veröffentlicht.<sup>[392]</sup> Die Darstellung der adaptierten und übersetzten Abbildungen und Tabellen ist durch die Creative Commons Attribution 4.0 International License CC BY, <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/> gestattet. Die Ergebnisse zur Eisen-vermittelten Peptidbildung wurden in C. Sydow *et al.*, *ChemSystemsChem* **2022**, e202200034, <https://chemistry-europe.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/syst.202200034> veröffentlicht.<sup>[393]</sup> Die Darstellung der adaptierten und übersetzten Abbildungen und Tabellen erfolgt mit der Erlaubnis des Wiley-Verlags (Creative Commons Attribution 4.0 International License CC BY-NC, <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>). Die Methode zur kapillarelektrophoretischen Auftrennung von Aminosäuren und Peptiden wurde von DR. MAREN HAAS und DR. FABIAN SAUER optimiert.<sup>[394-395]</sup>

### 4.1.1 Kupfer-vermittelte Peptidbildung

In Anlehnung an die SIPF-Reaktion nach RODE *et al.* wurde in der Arbeitsgruppe TRAPP von DR. MAREN HAAS ein Kupfer-vermittelter Reaktionspfad zu Peptiden in flüssigem Schwefeldioxid entwickelt (Abbildung 18).<sup>[229, 394]</sup> Während in der SIPF-Reaktion hohe Natriumchloridkonzentrationen dehydratisierend wirken,<sup>[229]</sup> übt in letztgenanntem Ansatz das hygroskopische Lösungsmittel einen wasserentziehenden Effekt aus.<sup>[394]</sup> Somit kann auf hohe Natriumchloridkonzentrationen verzichtet werden. Diese hemmen die Reaktion sogar.<sup>[394]</sup> In Gegenwart von Harnstoff konnte auf diese Weise bei Raumtemperatur mit äquimolaren Mengen von Glycin, L-Alanin und Kupfer(II)chlorid (je 400 mM) bereits nach einem Tag die Bildung von Dipeptiden beobachtet werden. Eine Reaktionsdauer von sieben Tagen war ausreichend, um mithilfe von CE-ESI-MS-Messungen Tripeptidspuren zu detektieren.<sup>[394]</sup>

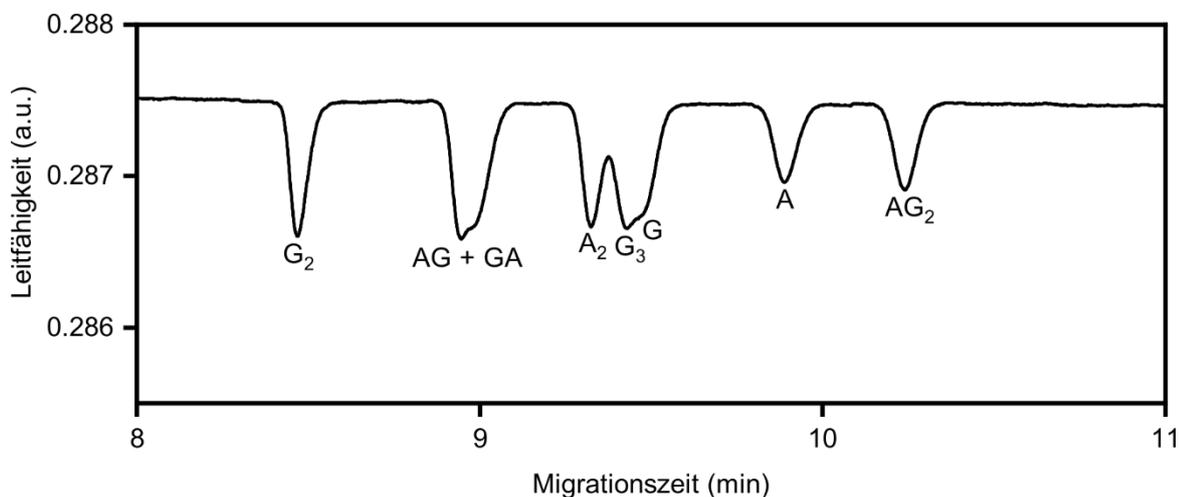


**Abbildung 18:** Kupfer-vermittelte Aminosäurekondensation in flüssigem Schwefeldioxid.

Die bisherigen Untersuchungen sind jedoch rein qualitativer Natur. In der vorliegenden Arbeit wurden die Ergebnisse dieses Modellsystems quantifiziert, um die Robustheit der

Reaktion besser bewerten zu können. Eine weitergehende Betrachtung der präbiotischen Plausibilität erfolgte durch die Substitution des Kupfersalzes mit einem Kupfermineral.

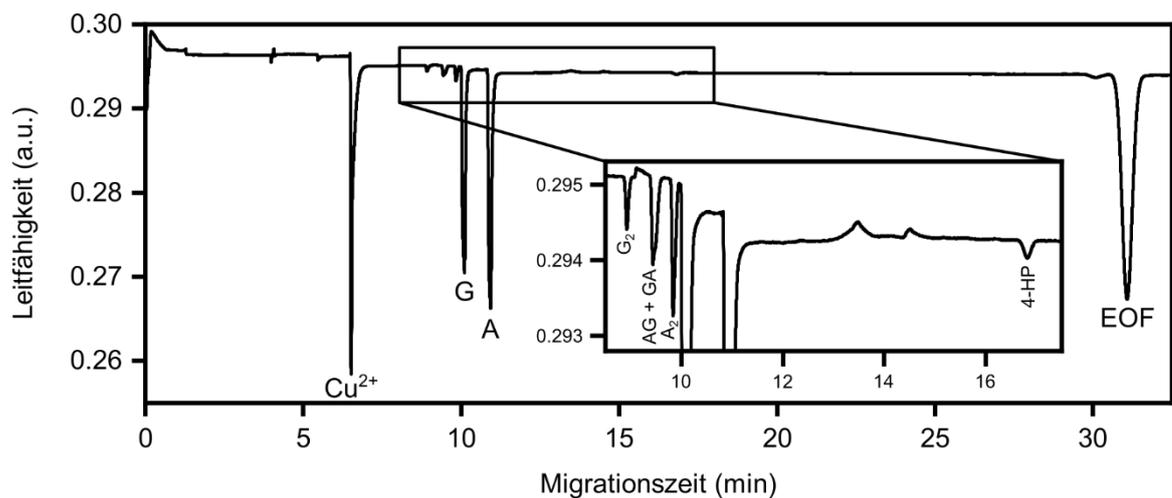
Da sich die CE für die Trennung geladener Analyte anbietet, erfolgte die Quantifizierung der Peptide mithilfe dieser Analysetechnik. Die Analyse wurde auf einer unbehandelten BFS-Kapillare mit Essigsäure (2 M) als BGE durchgeführt. Glycin, L-Alanin sowie die aus ihnen aufgebauten Di- und Tripeptide liegen somit während der Auftrennung als Kationen vor, was bei einer positiven Trennungsspannung kurze Messzeiten garantiert. Da weder die Analyte noch der BGE UV-aktiv sind, wurde die Leitfähigkeit der Analytlösung gemessen, um die Reaktionskomponenten zu detektieren. Die Analyse einer Testmischung bestehend aus Glycin, L-Alanin, Glycylglycin ( $G_2$ ), Alanylglycin (AG), Glycylalanin (GA), Glycylglycylglycin ( $G_3$ ) und Alanylglycylglycin ( $AG_2$ ) zeigt, dass die Dipeptide mit Ausnahme der gemischten Verbindungen getrennt werden konnten (Abbildung 19).  $A_2$  und  $G_3$  können so zwar nur angetrennt werden, dies ist jedoch nicht von Nachteil für die Quantifizierung, da die Konzentration der gebildeten Tripeptide zu gering war, um diese mithilfe des Leitfähigkeitsdetektors zu erfassen. Somit ist auch die Überlappung von  $G_3$  und Glycin nicht hinderlich.



**Abbildung 19:** Elektropherogramm einer Mischung von Glycin, L-Alanin,  $G_2$ , AG, GA,  $A_2$ ,  $G_3$  und  $AG_2$  (je 100  $\mu$ M). Die Auftrennung erfolgte auf einer BFS-Kapillare (80 cm, 30 kV, 2 M AcOH (pH 2.0), 25 °C).

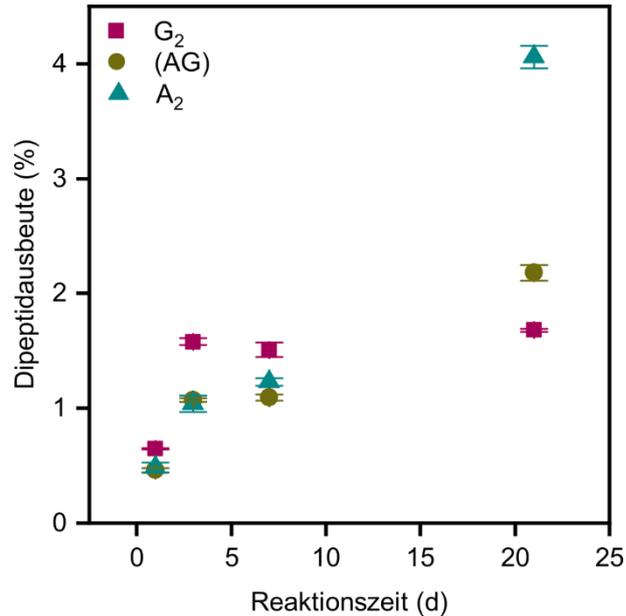
Die Aminosäurekondensationen in flüssigem Schwefeldioxid wurden in Druckapparaturen durchgeführt (Abbildung 51). Die Reaktandmischungen wurden zunächst in die Edelstahlapparaturen eingebracht bevor im Anschluss an Evakuieren und Fluten mit Stickstoff, Schwefeldioxid einkondensiert wurde. Die Reaktionsmischungen wurden nach Ablauf der Reaktionszeit im Vakuum getrocknet und als Feststoff bei  $-18$  °C gelagert. Vor der Analyse der Proben wurde der Feststoff in Wasser aufgenommen und mit einem internen Standard versetzt, um die Reproduzierbarkeit der Messungen zu überwachen. Hierfür wurde 4-Hydroxyprolin (4-HP) ausgewählt, da dieses wesentlich langsamer als die zu analysierenden Spezies migriert und somit die Messung nicht beeinträchtigt. Gleichzeitig zeigt die Verbin-

dung große strukturelle Ähnlichkeit zu den Analyten und sollte deshalb mit diesen vergleichbar sein. Die Probe wurde dabei auf eine Konzentration von 10 mM in Bezug auf die ursprüngliche Konzentration einer Aminosäure verdünnt. Reproduzierbare 4-HP-Peakflächen sowie Peakflächenverhältnisse von Analyt zu 4-HP zeigen die Stabilität der Auftrennungen (Abbildung 53-55, Tabelle 8-21 ab s. 118). Die Auftragung dieses Verhältnisses gegen die Analytkonzentration zeigt ein lineares Verhalten und die Bestimmung der Dipeptidkonzentrationen in den Proben ist anhand von Eichgeraden möglich. Die minimal quantifizierbare Konzentration der einzelnen Dipeptidprodukte betrug dabei 7.5  $\mu\text{M}$ . In Abbildung 20 ist beispielhaft die Auftrennung einer Probenmischung gezeigt.



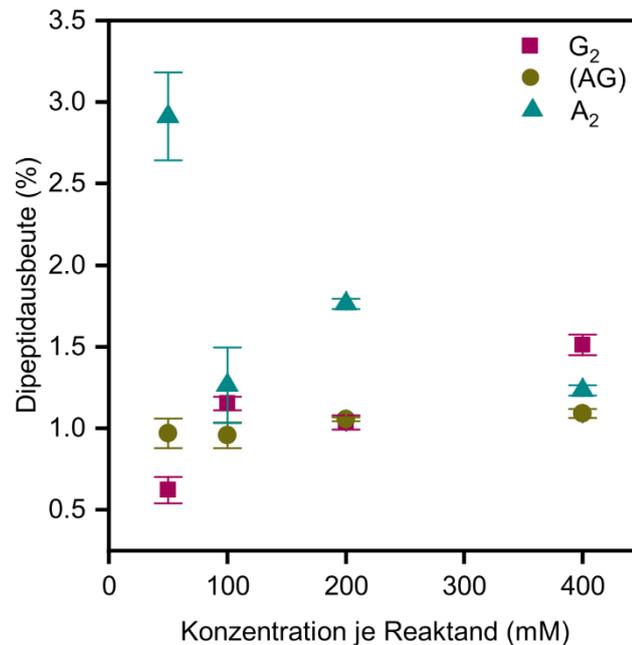
**Abbildung 20:** Elektropherogramm der Reaktion von Glycin, L-Alanin,  $\text{CuCl}_2$  und Harnstoff (je 400 mM) in flüssigem Schwefeldioxid für 21 d bei Raumtemperatur. Die Auftrennung erfolgte auf einer BFS-Kapillare mit 4-HP (100  $\mu\text{M}$ ) als internem Standard (80 cm, 30 kV, 2 M AcOH (pH 2.0), 25 °C).

Bereits nach einem Tag liegen quantifizierbare Dipeptidausbeuten vor (Abbildung 21). Diese steigen mit zunehmender Reaktionsdauer an. Lediglich die  $\text{G}_2$ -Ausbeute nimmt ab einer Reaktionsdauer von drei Tagen einen nahezu konstanten Wert ein. Einen möglichen Grund hierfür könnte dessen rascher Einbau in Tripeptide darstellen, die nach sieben Tagen mithilfe sensitiverer *sheath flow* CE-ESI-MS-Analysen detektiert werden konnten.<sup>[394]</sup>



**Abbildung 21:** Von der Reaktionszeit abhängige Dipeptidausbeuten der Reaktion von Glycin, L-Alanin, CuCl<sub>2</sub> und Harnstoff (je 400 mM). In Klammern dargestellte Produkte beziehen sich auf die Gesamtheit der gebildeten Isomere. Als Fehler ist die Standardabweichung aus zwei CE-Messungen abgebildet.

Aus präbiotischer Sicht ist es zudem wichtig, dass Reaktionen auch bei zunehmender Verdünnung verlässlich ablaufen, da viele der Reaktionsorte, die für den Ursprung des Lebens in Erwägung gezogen werden, keine größeren Reaktandvorkommen aufweisen. Die Bestimmung der Dipeptidausbeuten einer Versuchsreihe mit unterschiedlichen Reaktandkonzentrationen zeigt, dass bereits mit niedrigen Ausgangskonzentrationen quantifizierbare Dipeptidkonzentrationen gebildet werden (Abbildung 22). Während die Ausbeute der gemischten Dipeptide über den getesteten Konzentrationsbereich konstant bleibt, bricht die G<sub>2</sub>-Ausbeute bei Reaktandkonzentrationen von 50 mM gegenüber 100 mM ein. Dementgegen können ausgehend von geringsten Reaktandkonzentrationen maximale A<sub>2</sub>-Ausbeuten erhalten werden.

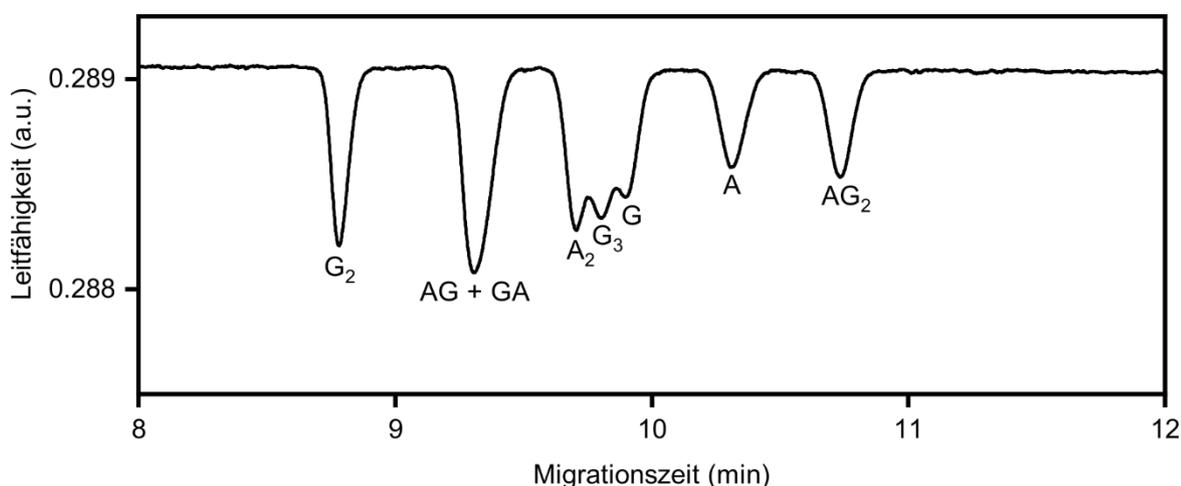


**Abbildung 22:** Von den Reaktandkonzentrationen abhängige Dipeptidausbeuten der Reaktion von äquimolaren Mengen Glycin, L-Alanin, CuCl<sub>2</sub> und Harnstoff nach 7 d. In Klammern dargestellte Produkte beziehen sich auf die Gesamtheit der gebildeten Isomere. Als Fehler ist die Standardabweichung aus zwei CE-Messungen abgebildet.

Anstelle des zur Erprobung des Reaktionspfades in flüssigem Schwefeldioxid verwendeten synthetischen Kupfer(II)chlorids müssen auf der frühen Erde Mineralien die Rolle des Vermittlers eingenommen haben. Um die präbiotische Kompatibilität der Reaktion weiter zu untersuchen, wurde Kupfer(II)chlorid durch Covellin (CuS) ersetzt. HAZEN ordnet dieses als Mineral des Hadaikums ein und geht von einem hydrothermalen Ursprung aus.<sup>[8]</sup> Bevor das Mineral in der Peptidbildungsreaktion zum Einsatz kam, wurde zunächst dessen Zusammensetzung bestimmt, die Ergebnisse sind in Tabelle 7 auf s. 117 abgebildet. Die Reaktionsmischung der Umsetzung von Glycin und L-Alanin mit dem Mineral in Gegenwart von Harnstoff zeigte nach kapillarelektrophoretischer Auftrennung keine Produkte bei der Analyse mit dem Leitfähigkeitsdetektor.

Um festzustellen, ob die Reaktion tatsächlich nicht abläuft oder ob die Dipeptidkonzentration lediglich zu gering ist für die Analyse mit dem Leitfähigkeitsdetektor, wurde die Probe im Anschluss an die kapillarelektrophoretische Auftrennung mithilfe eines *sheath flow* CE-ESI-MS-Interfaces massenspektrometrisch analysiert.<sup>[396]</sup> Stabile Messungen konnten mithilfe eines SL-Flusses von 3 µL/min erzielt werden. Das SL bestand dabei aus Isopropanol (*i*-PrOH) und Wasser, versetzt mit geringen Mengen Ameisensäure (1:1 + 0.05% v/v) und konnte zusammen mit dem CE-Eluent durch Anlegen einer Spannung von 3.2 kV am Edelstahlmitter versprüht werden. Im Gegensatz zu den vorherigen CE-Messungen wurde anstelle einer BFS-Kapillare eine LPA-beschichtete Kapillare verwendet. Vorgehende Arbeiten veranschaulichen, dass diese insbesondere in Hinblick auf langsam migrierende

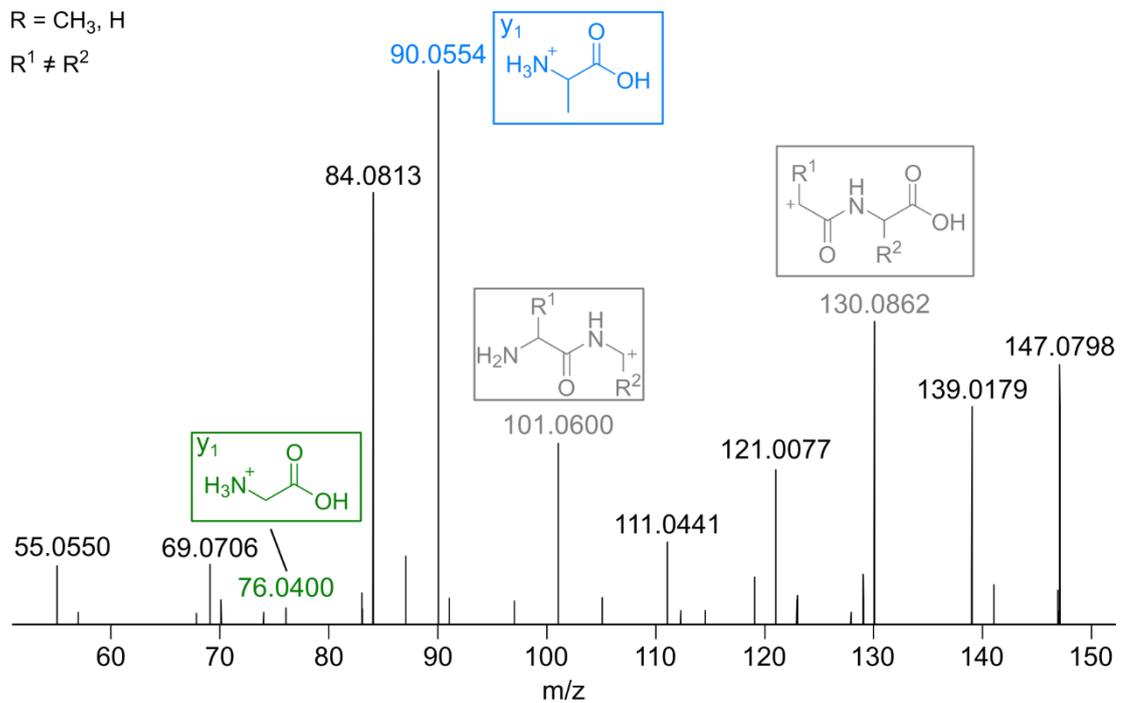
Komponenten größerer Aminosäuremischungen, die im weiteren Verlauf dieser Arbeit untersucht werden, eine bessere Trennleistung aufweisen.<sup>[394-395]</sup> Ursächlich hierfür ist vermutlich die durch die Beschichtung verringerte Interaktion der Analyte mit der Kapillarwand.<sup>[371-373]</sup> Die beschriebene Quantifizierung wurde nicht auf LPA-Kapillaren durchgeführt, da die erforderlichen hohen Probenkonzentrationen deren Lebensdauer auf sehr wenige Messungen verkürzten. Der Einsatz von LPA-Kapillaren in den Messungen mit massenspektrometrischer Analyse ist hingegen aufgrund der größeren Sensitivität der Detektionsmethode und den damit verbundenen geringeren Probenkonzentrationen praktikabel. Für die im Vergleich zu anderen Aminosäuren rasch migrierenden Komponenten der oben beschriebenen Testmischung konnten auf BFS- und mit LPA belegten Kapillaren ähnliche Ergebnisse erzielt werden (Abbildung 23).



**Abbildung 23:** Elektropherogramm einer Mischung von Glycin, L-Alanin, G<sub>2</sub>, A<sub>2</sub>, G<sub>3</sub> und AG<sub>2</sub> (je 100  $\mu$ M). Die Auftrennung erfolgte auf einer nach DOVICH *et al.* mit LPA belegten Kapillare (80 cm, 30 kV, 2 M AcOH (pH 2.0), 25 °C, 30 mbar).

Um zeitlich angemessene Auftrennungen auf der belegten Kapillare mit unterdrücktem EOF zu realisieren, wurden diese druckassistent durchgeführt. Nach dem Belegen der Kapillaren wurde deren Trennleistung mit einer Mischung der 20 proteinogenen Aminosäuren getestet. Abbildung 56 auf s. 124 zeigt beispielhaft eine solche Auftrennung. Vor der CE-ESI-MS-Messung wurde die Probe der Covellin-vermittelten Reaktion auf eine Konzentration von 5 mM bezogen auf die anfängliche Konzentration einer Aminosäure verdünnt. Um das Massenspektrometer nicht mit Metallionen zu kontaminieren, wurde die Elution der Kupfer(II)-Ionen ( $t_{\text{mig}} \sim 7$  min) abgewartet bevor die Sprayspannung am Emitter angelegt und die massenspektrometrische Detektion gestartet wurde. Nach sieben Tagen waren HR-MS-Signale sämtlicher möglichen Dipeptidkombinationen beobachtbar. Die gemischten Dipeptide konnten zwar nicht kapillarelektrophoretisch aufgetrennt werden, jedoch gibt ein MS/MS-Spektrum Hinweise darauf, dass beide Isomere entstanden sind (Abbildung 24). Zu erkennen sind jeweils die  $\gamma_1$ -Fragmente von AG (grün) und von GA (blau). Zusätzlich

konnten  $m/z$  Werte detektiert werden, die isomeren Fragmenten beider Dipeptidsequenzen zugeordnet werden können (grau).



**Abbildung 24:** MS/MS-Spektrum des Signals der gemischten Dipeptidprodukte ( $m/z = 147.0764$ ) der Covellin-vermittelten (Aminosäuren/Mineral-Verhältnis: 20.9 mmol/g) Reaktion von Glycin und L-Alanin in Gegenwart von Harnstoff (je 400 mM) nach sieben Tagen. AG Fragmentationen: grün, GA Fragmentationen: blau,  $m/z$  Werte, die isomeren Fragmenten beider Sequenzen zuordenbar sind: grau. Die kollisionsinduzierte Dissoziation erfolgte bei einer relativen Fragmentierungsenergie von 30%.

Die mithilfe massenspektrometrischer Experimente nachgewiesene Bildung jeder möglichen Dipeptidkombination in Gegenwart des präbiotisch plausiblen Minerals Covellin unterstreicht die präbiotische Plausibilität des Reaktionspfades. Eine vulkanische Umgebung ist dementsprechend prinzipiell denkbar für Peptidbildungen auf der frühen Erde. Darüber hinaus zeigt die Quantifizierung der Dipeptidausbeuten, dass es sich bei der Kupfer-vermittelten Aminosäurekondensation in flüssigem Schwefeldioxid um eine robuste Reaktion handelt.

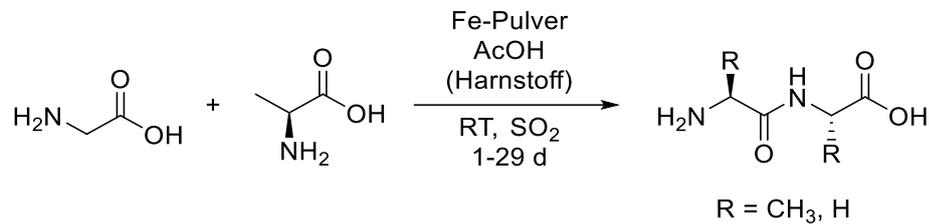
### 4.1.2 Eisen-vermittelte Peptidbildung

Ein wichtiges Kriterium für Syntheserouten im präbiotischen Kontext stellt die Verfügbarkeit der Reaktanden auf der frühen Erde dar. Die präbiotische Plausibilität der beschriebenen Kupfer-vermittelten Peptidbildung in flüssigem Schwefeldioxid ist somit durch das geringe Kupfervorkommen auf der frühen Erde limitiert.<sup>[8]</sup> Eisen hingegen war mit einer geschätzten durchschnittlichen Häufigkeit von 41000 ppm in der Erdkruste eines der am meisten vertretenen Elemente auf der frühen Erde.<sup>[8]</sup> Wird von einer anoxischen Atmosphäre im Hadaikum ausgegangen,<sup>[4-5, 25, 59]</sup> so könnten sowohl Eisen(III)- als auch reduzierte Eisenverbindungen, wie elementares Eisen und Eisen(II)-Mineralien, vorgelegen haben.<sup>[8, 66-67, 270]</sup> So geht HAZEN davon aus, dass im Hadaikum neben elementarem Eisen diverse Eisen(II)- und Eisen(III)-Mineralien, wie beispielsweise Pyrit und Markasit ( $\text{FeS}_2$ ), Chromit ( $\text{FeCr}_2\text{O}_4$ ), Wüstit ( $\text{FeO}$ ), Childrenit ( $\text{FeAlPO}_4(\text{OH})_2 \times \text{H}_2\text{O}$ ), Magnetit, Hämatit und Goethit zur Verfügung standen.<sup>[8]</sup> Abweichend von diesen Studien finden sich in der Literatur vor allem Eisen(III)-basierte Peptidbildungen. Diese erfordern hohe Reaktionstemperaturen und häufig wurden DKPs als Nebenprodukte beobachtet.<sup>[205, 262, 275-278]</sup> Eisen(II)-Verbindungen wurden hingegen lediglich in COS-basierten Aminosäurekupplungen als Additiv bzw. in Peptidbildungsreaktionen mit Kohlenstoffmonoxid und Schwefelwasserstoff als Oberflächenmaterial eingesetzt.<sup>[219-220]</sup> In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb ein Eisen-vermittelter Synthesepfad zu Peptiden ausgearbeitet, der reduzierte Eisenverbindungen als Intermediate berücksichtigt. Da flüssiges Schwefeldioxid sich bereits in der Kupfer-vermittelten Peptidsynthese als geeignetes Lösungsmittel erwies und es Umsetzungen bei milden Reaktionstemperaturen ermöglicht, wurde auch die Eisen-vermittelte Aminosäurekondensation in diesem Reaktionsmedium untersucht.

#### Modellsystem aus Glycin und L-Alanin

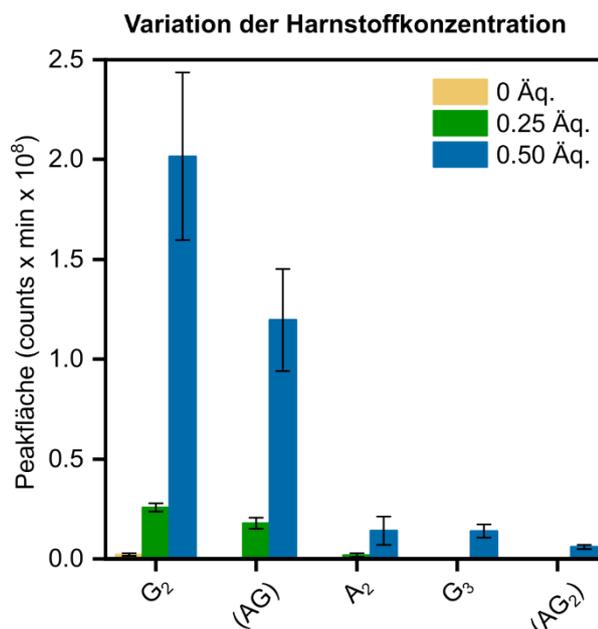
Da aufgrund der für das Hadaikum diskutierten anoxischen Atmosphäre bereits die Existenz elementaren Eisens plausibel ist,<sup>[8, 66, 270]</sup> wurden zur Peptidbildung zunächst Eisenpulver und Aminosäuren mit Essigsäure inkubiert. Letztere kann auf der frühen Erde durch Kohlenstoffdioxid-Reduktion auf Eisenoberflächen oder photochemisch mit Hydrogensulfit als Elektronendonator entstehen.<sup>[129, 182, 234, 397]</sup> Ausschlaggebend für den Zusatz von Essigsäure war der Ansatz, dass diese die Korrosion des elementaren Eisens zu Eisen(II)-Spezies beschleunigt,<sup>[398]</sup> welche dann ähnlich zu den Kupfer(II)-Spezies in der SIPF-Reaktion als Intermediate agieren könnten.<sup>[252-253]</sup> Im Anschluss an die Inkubation wurde die Reaktionsmischung bei Raumtemperatur für mehrere Tage in flüssigem Schwefeldioxid gerührt (Abbildung 25). Die Reaktion wurde zunächst anhand eines einfachen Modellsystems bestehend aus Glycin und L-Alanin getestet, optimiert und untersucht bevor deren Kompatibilität mit

allen proteinogenen Aminosäuren erprobt wurde. Umsetzung der Aminosäuren (je 400 mM, insgesamt 1.00 Äq.) mit Eisenpulver (0.50 Äq.) und Essigsäure (0.05 Äq.) lieferte nach sieben Tagen Spuren von G<sub>2</sub>, die jedoch zu gering für eine Quantifizierung mithilfe des Leitfähigkeitsdetektors waren und nur massenspektrometrisch detektiert werden konnten.



**Abbildung 25:** Eisen-vermittelte Peptidbildung in flüssigem Schwefeldioxid.

Im Folgenden wurde der Einfluss von Harnstoff untersucht, um die Peptidbildung zu optimieren. Dessen Existenz auf der frühen Erde gilt als gesichert und als Additiv begünstigt dieser nicht nur Phosphorylierungsreaktionen,<sup>[79, 109, 331]</sup> sondern unterstützt auch die Kupfer-vermittelte Peptidbildung in flüssigem Schwefeldioxid.<sup>[394]</sup> Welcher Mechanismus dem positiven Effekt in beiden Kondensationsreaktionen zugrunde liegt, ist ungeklärt. Jedoch sind für Phosphorylierungsreaktionen, die bei erhöhter Temperatur durchgeführt wurden, aktive Intermediate, wie Phosphoramidate oder Carbamoylphosphate,<sup>[109, 112]</sup> sowie die Hydrolyse von Harnstoff im Gespräch.<sup>[118]</sup> Darüber hinaus ist bekannt, dass Harnstoff die Löslichkeit von Peptiden in wässriger Lösung verbessert und Proteine denaturiert, wobei innerhalb der ersten Hydrathülle Dehydratisierung auftritt.<sup>[399]</sup>



**Abbildung 26:** CE-MS-Peakflächen der Peptidprodukte ausgehend von Glycin, L-Alanin (je 400 mM, insgesamt 1.00 Äq.), Eisenpulver (0.50 Äq.) und Essigsäure (0.05 Äq.) nach 7 d in Abhängigkeit der Harnstoffkonzentration. In Klammern dargestellte Produkte beziehen sich auf die Gesamtheit der gebildeten isomeren Sequenzen. Als Fehler ist die Standardabweichung aus drei CE-MS-Messungen abgebildet.

Die oben beschriebene Reaktionsmischung wurde um 0.25 Äq. Harnstoff ergänzt. Infolgedessen konnte eine Vergrößerung der Produktpalette beobachtet werden: neben  $G_2$  wurden auch  $(AG)_2^2$  und Spuren von  $A_2$  detektiert. Allerdings waren die entstandenen Dipeptidkonzentrationen immer noch nicht ausreichend, um die Ausbeute der Produkte zu quantifizieren (wie auch bei der Kupfer-vermittelten Peptidbildung beträgt die minimal quantifizierbare Konzentration der einzelnen Dipeptide  $7.5 \mu\text{M}$ ). Neben der erweiterten Produktpalette zeigen die  $G_2$ -Peakflächen der Analyse via CE-MS in Abbildung 26, dass auch die  $G_2$ -Konzentration in Gegenwart von Harnstoff zugenommen hat.

Wird die Harnstoffkonzentration weiter erhöht auf 0.50 Äq., so nehmen die Dipeptidkonzentrationen weiter zu. Die  $G_2$ - (0.5%) sowie die  $(AG)$ - (0.1%) Ausbeuten konnten bestimmt werden. Darüber hinaus konnten anhand MS/MS-Analyse sowohl  $AG$  als auch  $GA$  nachgewiesen werden (Tabelle 39, s. 135). Die Quantifizierung von  $A_2$  war, wie auch in den folgenden Reaktionen über ein bis sieben Tage, nicht möglich. Vergleich der  $A_2$ -Peakflächen zeigt jedoch eine Zunahme des Produktes mit zunehmenden Harnstoffäquivalenten. Eine Abschätzung der  $A_2$ -Ausbeute durch Vergleich der entsprechenden Peakfläche mit denen der anderen Dipeptide ist aufgrund der unterschiedlichen Ionisationswahrscheinlichkeiten jedoch nicht möglich.

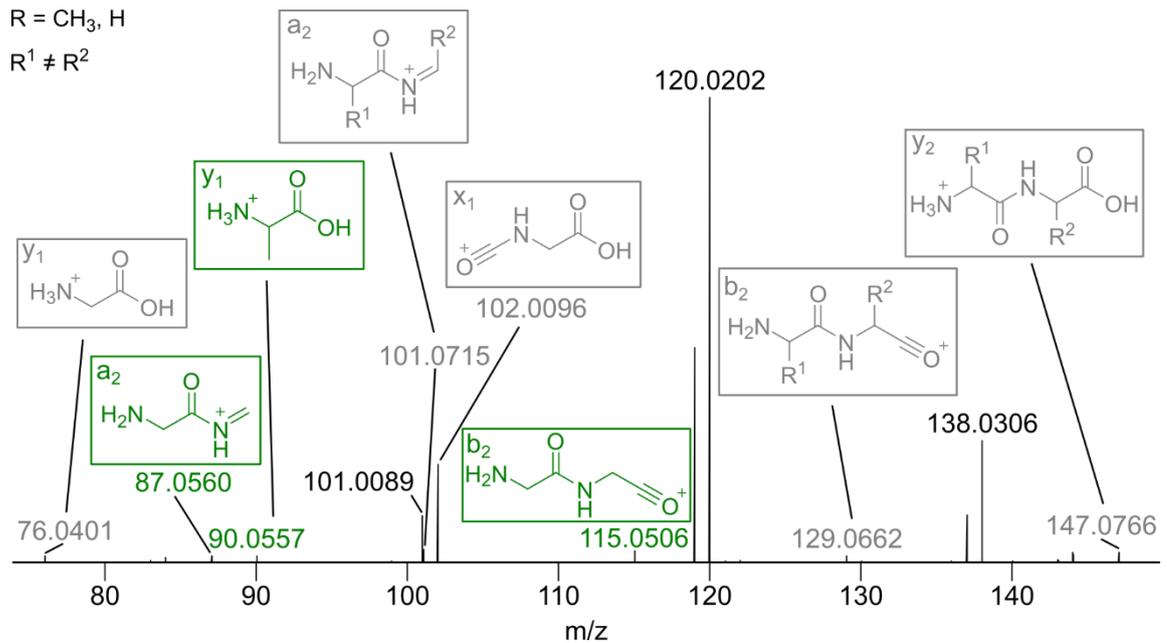
Zusätzlich zur Zunahme der Dipeptidkonzentrationen konnte in Gegenwart von 0.50 Äq. Harnstoff auch die Bildung von Tripeptiden beobachtet werden. Das MS/MS-Spektrum des gemischten Tripeptids ( $AG_2$ ) lieferte charakteristische Signale für das Isomer mit der Sequenz  $G_2A$  (Abbildung 27, grün dargestellt).

Darüber hinaus konnten, wie bereits auch im Fall von  $(AG)$ ,  $m/z$  Werte detektiert werden, die isomeren Fragmenten verschiedener Sequenzen zuordenbar sind. Die grau markierten Fragmente  $a_2$ ,  $x_1$ ,  $b_2$  und  $y_1$  können sowohl auf  $AG_2$  als auch auf  $GAG$ , nicht aber auf  $G_2A$  zurückgeführt werden. Somit muss zumindest eines der beiden Tripeptide mit C-terminaler Glycineinheit vorliegen.

Als Ursache für die Begünstigung der Eisen-vermittelten Peptidbildung innerhalb des getesteten Reaktionszeitraums sollte der Zerfall von Harnstoff keine Rolle spielen, da dieser bei  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  mit einer Halbwertszeit von 40 a sehr langsam vonstättengeht.<sup>[400]</sup> Im Hadaikum hingegen standen weitaus größere Zeitspannen für präbiotische Umsetzungen zur Verfügung, sodass der Zerfall von Harnstoff bei mit Raumtemperatur vergleichbaren Umgebungstemperaturen in Hinblick auf die frühe Erde durchaus einen Einfluss gehabt haben könnte.

---

<sup>2</sup> In Klammern dargestellte Produkte beziehen sich auf die Gesamtheit der gebildeten Sequenzisomere.



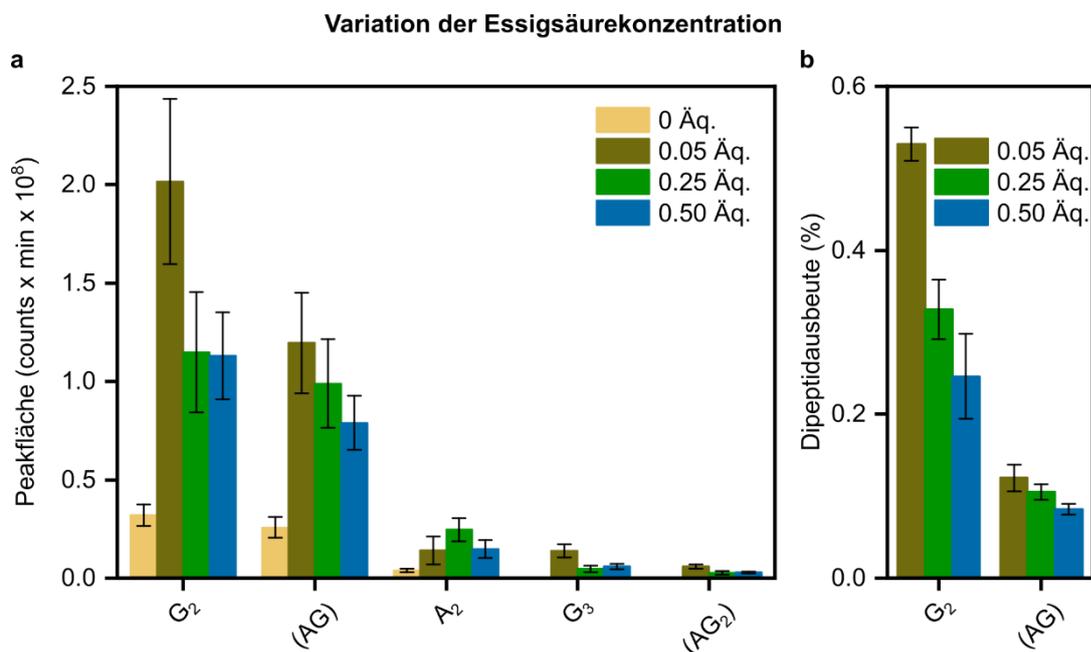
**Abbildung 27:** MS/MS-Spektrum des Signals der (AG<sub>2</sub>) Tripeptide ( $m/z = 204.0979$ ) ausgehend von Glycin, L-Alanin (je 400 mM, insgesamt 1.00 Äq.), Eisenpulver, Harnstoff (je 0.50 Äq.) und Essigsäure (0.05 Äq.) nach 7 d. G<sub>2</sub>A Fragmentationen: grün,  $m/z$  Werte, die isomeren Strukturen verschiedener Sequenzen zuordnen sind: grau. Die kollisionsinduzierte Dissoziation erfolgte bei einer relativen Fragmentierungsenergie von 30%.

Des Weiteren ist eine Aussage über die Bildung von Harnstoffaddukten als aktive Intermediate der begünstigten Peptidbildungsreaktion nur bedingt möglich, da Massenspektren aufgrund eines durch das SL erzeugten intensiven Signal bei  $m/z$  121.1223 ( $[2 \textit{i-PrOH} + \textit{H}]^+$ ) aus Sensitivitätsgründen in einem Massenbereich von  $m/z$  129-750 bzw.  $m/z$  122-750 aufgezeichnet wurden. Harnstoffaddukte der Aminosäuren mit  $m/z < 122$  konnten deshalb nicht untersucht werden. Auch ist es unklar, ob die aktiven Intermediate unter den gewählten Reaktionsbedingungen ausreichend stabil sind, um detektiert werden zu können. Harnstoffderivate der Peptidprodukte mit  $m/z > 122$  konnten nach einer Reaktionszeit von sieben Tagen nicht detektiert werden. Die Bildung von Harnstoffaddukten erscheint somit zwar unwahrscheinlich, kann aber aufgrund der aufgeführten Argumente nicht vollends ausgeschlossen werden. Zuletzt müssen auch die oben beschriebenen physikochemischen Eigenschaften von Harnstoff als Ursache für dessen positiven Effekt in Erwägung gezogen werden.

Da in Gegenwart von 0.50 Äq. Harnstoff die besten Ergebnisse erzielt wurden, wurden die anderen Reaktionsparameter unter diesen Bedingungen variiert und untersucht.

Zunächst wurden die Auswirkungen verschiedener Essigsäurekonzentrationen auf die Produktbildung untersucht. Bereits in Abwesenheit von Essigsäure konnte die Bildung der Dipeptide G<sub>2</sub>, GA und A<sub>2</sub> nach sieben Tagen beobachtet werden (Abbildung 28a). Dies ist vor allem im präbiotischen Kontext interessant, da vermutet wird, dass Umsetzungen auf der frühen Erde häufig durch geringe verfügbare Reaktandkonzentrationen limitiert waren.

Mit Ausnahme von  $A_2$  zeigt der Vergleich der Peakflächen eines ausgewählten Produktes bei unterschiedlichen Essigsäurekonzentrationen maximale Produktkonzentrationen in Anwesenheit von 0.05 Äq. Essigsäure. Damit im Einklang stehen die erzielten  $G_2$ - und (AG)-Ausbeuten (Abbildung 28b).

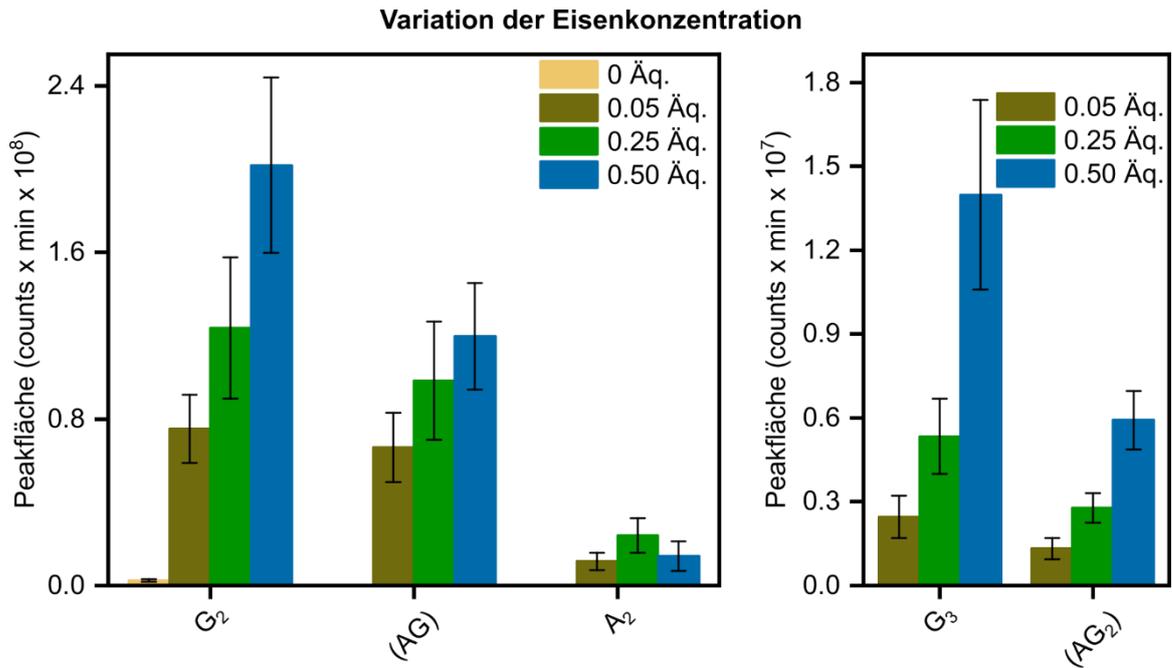


**Abbildung 28:** CE-MS-Peakflächen der Peptidprodukte (a) und Dipeptidausbeuten (b) ausgehend von Glycin, L-Alanin (je 400 mM, insgesamt 1.00 Äq.), Eisenpulver und Harnstoff (je 0.50 Äq.) nach 7 d in Abhängigkeit der Essigsäurekonzentration. In Klammern dargestellte Produkte beziehen sich auf die Gesamtheit der gebildeten isomeren Sequenzen. Als Fehler der CE-MS-Peakflächen ist die Standardabweichung aus drei, als Fehler der Ausbeuten die Standardabweichung aus zwei Messungen abgebildet.

Di- und Tripeptidsequenzen, die anhand von Fragmenten eindeutig zugeordnet werden konnten, sind in Tabelle 39 auf s. 135 aufgeführt. Ausgehend von 0.25 Äq. Essigsäure konnten zusätzlich Fragmente ( $a_2$ ,  $b_2$ ,  $y_1$ ), die für beide Sequenzen,  $AG_2$  und  $GAG$ , charakteristisch sind, detektiert werden. Eine Unterscheidung der beiden Sequenzen war jedoch nicht möglich. Dieselben charakteristischen Fragmente der Peptide mit C-terminaler Glycinseinheit konnten auch mit 0.50 Äq. Essigsäure beobachtet werden. Anhand seines  $y_2$ -Fragments konnte  $AG_2$  eindeutig identifiziert werden.

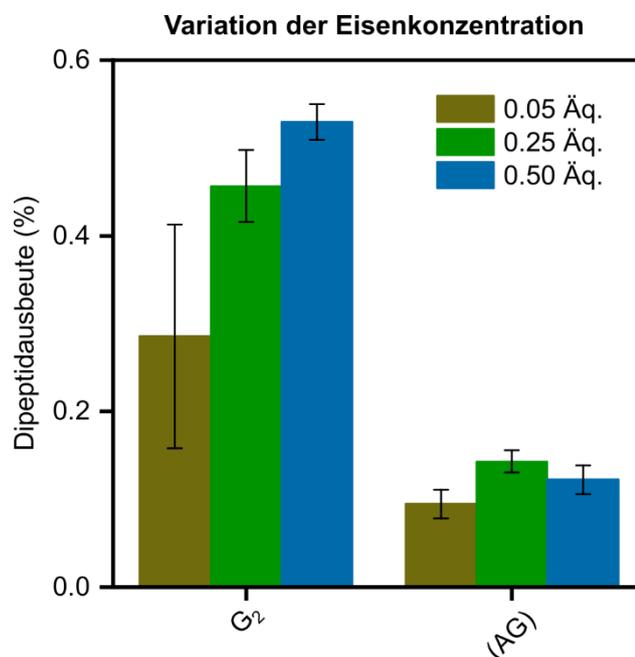
Die Untersuchung der Reaktion hinsichtlich der Eisenäquivalente zeigte hingegen, dass bei höheren Eisenkonzentrationen vermehrte Peptidbildung eintritt (Abbildung 29). Nichtsdestotrotz konnten bereits ab 0.05 Äq. Eisenpulver Tripeptidspuren beobachtet werden.

Des Weiteren lieferte die Reaktion ausgehend von 0.05 Äq. Eisenpulver 0.3%  $G_2$  und 0.1% (AG) (Abbildung 30). Erstaunlich ist außerdem, dass sogar in Abwesenheit von Eisenpulver Spuren von  $G_2$  detektiert, werden konnten.



**Abbildung 29:** CE-MS-Peakflächen der Peptidprodukte ausgehend von Glycin, L-Alanin (je 400 mM, insgesamt 1.00 Äq.), Harnstoff (0.50 Äq.) und Essigsäure (0.05 Äq.) nach 7 d in Abhängigkeit der Eisenkonzentration. In Klammern dargestellte Produkte beziehen sich auf die Gesamtheit der gebildeten isomeren Sequenzen. Als Fehler ist die Standardabweichung aus drei Messungen abgebildet.

Dieses Reaktionsverhalten unterstreicht zusammen mit den Beobachtungen für geringe Essigsäurekonzentrationen die präbiotische Plausibilität des vorgestellten Syntheseweges. Eindeutig zuordenbare Sequenzen der Peptide sind in Tabelle 39 auf s. 135 zusammengefasst.



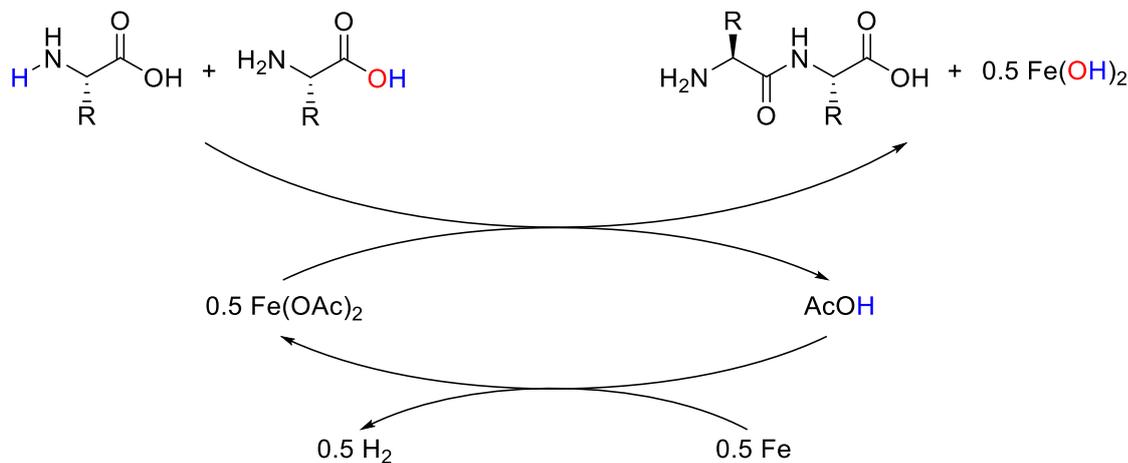
**Abbildung 30:** Dipeptidausbeuten ausgehend von Glycin, L-Alanin (je 400 mM, insgesamt 1.00 Äq.), Harnstoff (0.50 Äq.) und Essigsäure (0.05 Äq.) nach 7 d in Abhängigkeit der Eisenkonzentration. In Klammern dargestellte Produkte beziehen sich auf die Gesamtheit der gebildeten isomeren Sequenzen. Als Fehler ist die Standardabweichung aus zwei Messungen abgebildet.

Die Untersuchung der Einflüsse der Reaktionsparameter lässt mehrere Schlüsse zu. Die Peptidbildung in Abwesenheit von Essigsäure weist darauf hin, dass möglicherweise bereits elementares Eisen die Reaktion begünstigen kann. Ein Blick auf die Redox-Potenziale der Reaktionsteilnehmer in Tabelle 1 zeigt,<sup>[398]</sup> dass auch die Aminosäuren, das Lösungsmittel oder in Folge der Kondensationsreaktion freigesetztes Wasser das Eisenpulver korrodieren können. Eisen(II)-Verbindungen sollten somit auch in Abwesenheit von Essigsäure zur Verfügung gestanden haben. Da für flüssiges Schwefeldioxid keine Redox-Potenziale tabelliert sind, wurden näherungsweise die Potenziale für saure wässrige Lösungen herangezogen.

**Tabelle 1:** Redox-Potenziale in wässriger Lösung bei pH = 0 und T = 298.15 K nach BRATSCHE.<sup>[398]</sup>

Redox-Paar	H <sup>+</sup> /H <sub>2</sub>	Fe <sup>2+</sup> /Fe	Fe <sup>3+</sup> /Fe <sup>2+</sup>	SO <sub>2</sub> , H <sup>+</sup> /HS <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>-</sup>	SO <sub>2</sub> , H <sup>+</sup> /S <sub>8</sub>	SO <sub>2</sub> , H <sup>+</sup> /S <sub>4</sub> O <sub>6</sub> <sup>2-</sup>	SO <sub>2</sub> , H <sup>+</sup> /HS <sub>2</sub> O <sub>4</sub> <sup>-</sup>
E <sup>0</sup> (V)	0.00	-0.44	0.77	0.43	0.45	0.54	0.07

Basierend darauf, dass Eisenpulver in Ab- und in Anwesenheit von Essigsäure zu Eisen(II) korrodiert wird, wird der in Abbildung 31 dargestellte Mechanismus postuliert.

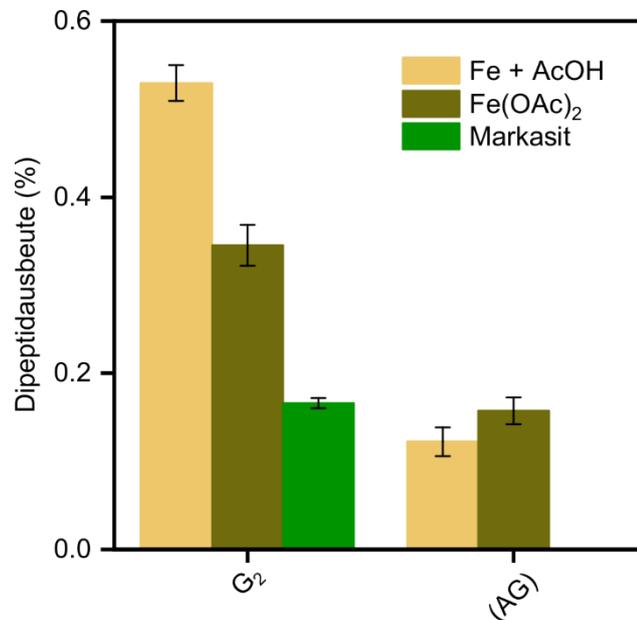


**Abbildung 31:** Postulierter Mechanismus der Eisen-vermittelten Peptidbildung am Beispiel zweier Aminosäuren.

Zunächst tritt die Korrosion des Eisenpulvers, bevorzugt durch Reaktion mit Essigsäure, ein. Es kommt unter Freisetzung von Wasserstoff zur Bildung von Eisen(II)acetat. Koordination der Aminosäuren am Eisen(II)-Zentrum könnte räumliche Nähe sowie eine Vorausrichtung zwischen diesen herbeiführen und so die Knüpfung einer Peptidbindung begünstigen. Regeneration der Essigsäure durch in der Kondensationsreaktion freigesetztes Wasser könnte neben der Präsenz anderer Oxidationsmittel dazu führen, dass bereits geringe Essigsäurekonzentrationen ausreichend sind, um die Eisenkorrosion zu beschleunigen. Unter der Voraussetzung, dass dem System ausreichend Protonen durch Wasserstoff-

bildung entzogen wurden, ist bei hinreichend hohem pH Wert denkbar, dass Eisenpulver durch Bildung von Eisen(II)hydroxid dehydratisierend wirkt.

Eine mögliche Erklärung für die verminderte Produktbildung bei höheren Essigsäurekonzentrationen liefert eine Studie von GOODMAN *et al.*<sup>[401]</sup> In dieser wird der Bruch von Peptidbindungen in trifluoressigsäurehaltigen Lösungen am Beispiel von *N*-terminal acetylierten sowie *C*-terminal geschützten Peptiden beschrieben.<sup>[401]</sup> Mechanistisch wird im Anschluss an die Protonierung einer Amid-Carbonylgruppe die Bildung eines zyklischen Intermediates vorgeschlagen. Dieses entsteht durch den nukleophilen Angriff des benachbarten Amid-Sauerstoffatoms auf das in Folge der Protonierung aktivierte Carbonylkohlenstoffatom. Protonentransfer und Abspaltung der *C*-terminalen Aminosäure führt anschließend zum Peptidbindungsbruch.<sup>[401]</sup> Möglicherweise begünstigt Essigsäure den Bruch von Peptidbindungen in der beschriebenen Peptidbildungsreaktion auf ähnliche Weise.

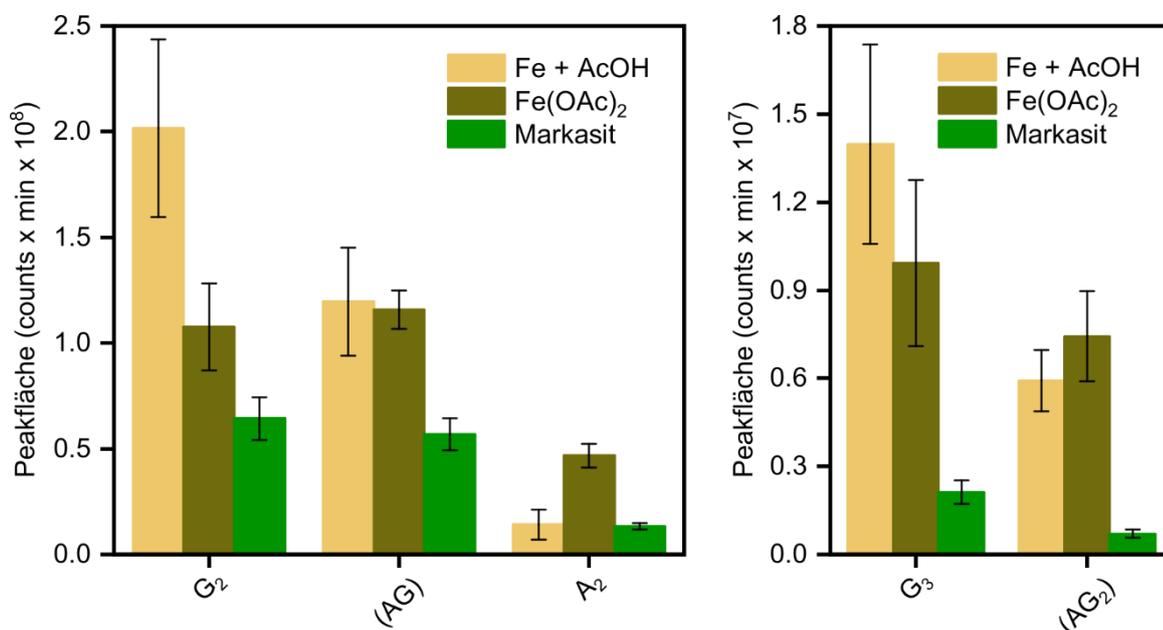


**Abbildung 32:** Dipeptidausbeuten ausgehend von Glycin, L-Alanin (je 400 mm, insgesamt 1.00 Äq.), Harnstoff (0.50 Äq.) und wahlweise Eisenpulver (0.50 Äq.) + Essigsäure (0.05 Äq.), Fe(OAc)<sub>2</sub> (0.05 Äq.) oder Markasit (Aminosäuren/Mineral-Verhältnis: 20.9 mmol/g) nach 7 d. In Klammern dargestellte Produkte beziehen sich auf die Gesamtheit der gebildeten isomeren Sequenzen. Als Fehler ist die Standardabweichung aus zwei Messungen abgebildet.

Die Beobachtung von Di- und Tripeptidprodukten in Gegenwart Eisen(II)acetat mit Harnstoff als Additiv bekräftigt die Hypothese, dass Eisen(II)-Verbindungen die Peptidbildung begünstigen. Nach sieben Tagen konnten fast 0.4% G<sub>2</sub> und 0.2% (AG) erhalten werden (Abbildung 32). Zusätzlich konnten Spuren von A<sub>2</sub>, G<sub>3</sub> und (AG<sub>2</sub>) und somit ein ähnliches Produktspektrum wie in der Reaktion ausgehend von Eisen und Essigsäure beobachtet werden (Abbildung 33). Im Fall des gemischten Tripeptids konnte die Sequenz G<sub>2</sub>A eindeutig identifiziert werden. Detektion der für die beiden isomeren Sequenzen identischen a<sub>2</sub>, b<sub>2</sub> und y<sub>1</sub>

Fragmente zeigt darüber hinaus, dass zudem mindestens eines der beiden ebenfalls vorliegen muss.

Im Einklang damit steht die Kondensation von Aminosäuren in Gegenwart von Markasit. Es wird angenommen, dass dieses in Folge von hydrothermalen Prozessen und Metamorphose bei niedrigen Temperaturen bereits im Hadaikum vorhanden war.<sup>[6]</sup> Mit Harnstoff als Additiv konnten, wie auch mit Eisen(II)acetat, fast 0.2%  $G_2$  erhalten werden (Abbildung 32). Zusätzlich sind Spuren von  $GA$ ,  $A_2$ ,  $G_3$  und  $(AG_2)$  zugegen (Abbildung 33). Eindeutig zuordenbare Sequenzen sind in Tabelle 39 (s. 135) aufgeführt. Im Vergleich zur Reaktion mit elementarem Eisen konnten zwar geringere Konzentrationen erhalten werden, das Produktspektrum ist hingegen vergleichbar. In Anbetracht dessen, dass neben elementarem Eisen auch ein natürlich vorkommendes Eisen(II)-Mineral die Peptidbildung begünstigen kann, ist die Umsetzung des beschriebenen Reaktionspfades auf der frühen Erde plausibel.

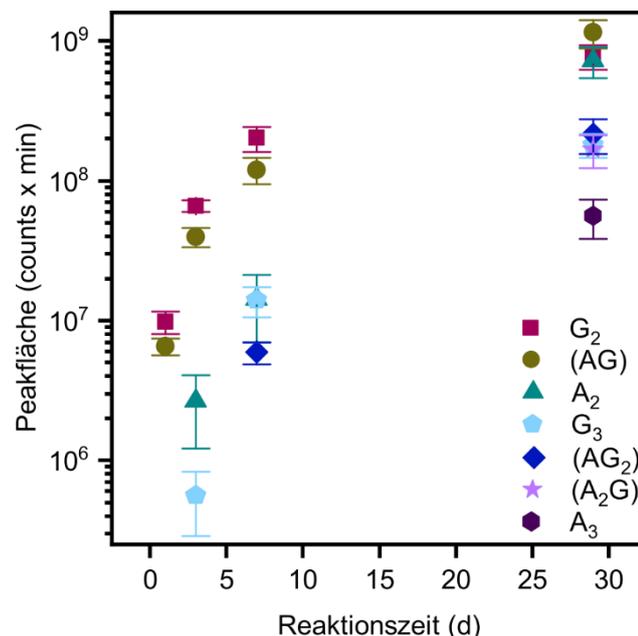


**Abbildung 33:** CE-MS-Peakflächen der Di- und Tripeptidprodukte ausgehend von Glycin, L-Alanin (je 400  $\mu$ M, insgesamt 1.00  $\mu$ M), Harnstoff (0.50  $\mu$ M) und wahlweise Eisenpulver (0.50  $\mu$ M) + Essigsäure (0.05  $\mu$ M),  $Fe(OAc)_2$  (0.05  $\mu$ M) oder Markasit (Aminosäuren/Mineral-Verhältnis: 20.9 mmol/g) nach 7 d. In Klammern dargestellte Produkte beziehen sich auf die Gesamtheit der gebildeten isomeren Sequenzen. Als Fehler ist die Standardabweichung aus drei Messungen abgebildet.

Zum Vergleich wurde auch die Aminosäurekondensation mit Eisen(III)-Mineralien, die in der Literatur verwendet wurden,<sup>[262, 275-276]</sup> erprobt. Reaktionen ausgehend von Akaganeit ( $\beta$ - $Fe(O(OH,Cl))$ ) und Hämatit in Gegenwart von Harnstoff lieferten deutlich geringere Dipeptidausbeuten als die Kondensation mit Markasit. So konnte im Gegensatz zur Reaktion mit Markasit in Gegenwart keines der beiden Eisen(III)-Mineralien die  $G_2$ -Ausbeute quantifiziert werden. Auch die Detektion von Tripeptiden war nicht möglich. Die Ergebnisse der Versuche mit Eisenverbindungen verschiedener Oxidationsstufen in Abwesenheit von

Essigsäure bestätigen somit die Vermutung, dass Eisen(II)-Verbindungen die Hauptrolle in der Aminosäurekondensation zukommt.

Neben dem Einfluss der Reaktanden wurde auch die Peptidbildung in Abhängigkeit der Reaktionszeit untersucht. Unter Anwendung der optimierten Reaktionsbedingungen (Glycin und L-Alanin (je 400 mM, insgesamt 1.00 Äq.), Eisenpulver und Harnstoff (je 0.50 Äq.) und Essigsäure (0.05 Äq.) konnten innerhalb eines Tages Spuren von  $G_2$  und GA detektiert werden (Abbildung 34). Nach sieben Tagen konnten die  $G_2$ - und die (AG)-Ausbeute erstmals quantifiziert werden. Diese steigen über einen Zeitraum von 29 Tagen kontinuierlich auf 2.5% ( $G_2$ ) und 1.4% ((AG)) an. Nach dreitägiger Reaktionszeit treten zudem erstmals  $A_2$ - und  $G_3$ -Spuren auf. Die  $A_2$ -Konzentration nach 29 Tagen betrug 1.5%. Zudem wurde das bereits oben beschriebene Produktspektrum nach 7 Tagen innerhalb von 29 Tagen um die Tripeptide  $A_3$  und ( $A_2G$ ) ergänzt. Eine eindeutige Sequenzbestimmung war nach 29 Tagen für die Tripeptide  $AG_2$ ,  $G_2A$ ,  $A_2G$  und  $GA_2$  möglich (s. Tabelle 39 auf s. 135). Die detektierten  $y_2$ ,  $a_2$ ,  $b_2$  und  $y_1$  Fragmente der Tripeptide AGA und GAG stimmen mit isomeren Fragmenten eindeutig identifizierter inverser Vorläufermoleküle überein, weshalb über die Gegenwart dieser beiden Tripeptide keine Aussage gemacht werden kann.



**Abbildung 34:** CE-MS-Peakflächen der Di- und Tripeptidprodukte ausgehend von Glycin, L-Alanin (je 400 mM, insgesamt 1.00 Äq.), Eisenpulver und Harnstoff (0.50 Äq.) und Essigsäure (0.05 Äq.) in Abhängigkeit der Reaktionszeit. In Klammern dargestellte Produkte beziehen sich auf die Gesamtheit der gebildeten isomeren Sequenzen. Als Fehler ist die Standardabweichung aus drei Messungen abgebildet.

Darüber hinaus konnten nach Ablauf von 29 Tagen Spuren verschiedener Tetra- und Pentapeptide detektiert werden (Tabelle 38 auf s. 134). Eindeutig identifiziert werden konnten folgende Tetra- und Pentapeptidsequenzen:  $AG_3$ ,  $G_3A$ ,  $A_2G_2$ ,  $G_2A_2$ ,  $AG_4$ ,  $G_4A$ ,  $A_2G_3$  und  $G_3A_2$ . Vorwiegend detektierte a, b und y Fragmente anderer Sequenzen sind massengleich

zu isomeren Fragmenten eindeutig identifizierter Peptide. Eine Aussage über die Präsenz dieser Sequenzen ist somit nicht möglich. MS/MS-Spektren der Tetra- und Pentapeptidsignale sowie die Zuordnung der Signale sind in Abbildung 63-66 und Tabelle 40-43 ab s. 136 dargestellt. Dieses Resultat zeigt eindrucksvoll, dass ausgehend von den Aminosäuren drei bzw. vier Kondensationsschritte ablaufen können. In Eisen(III)-basierten Studien konnte dies bisher nicht beobachtet werden.<sup>[205, 262, 275-278]</sup> Es ist jedoch unklar, ob die in den jeweiligen Arbeiten verwendeten Analysemethoden eine vergleichbar hohe Sensitivität wie die im Rahmen der vorliegenden Arbeit beschriebenen CE-MS-Messungen aufwiesen. Somit ist es möglich, dass Spuren langkettiger Peptide zwar gebildet wurden, jedoch nicht detektiert werden konnten.

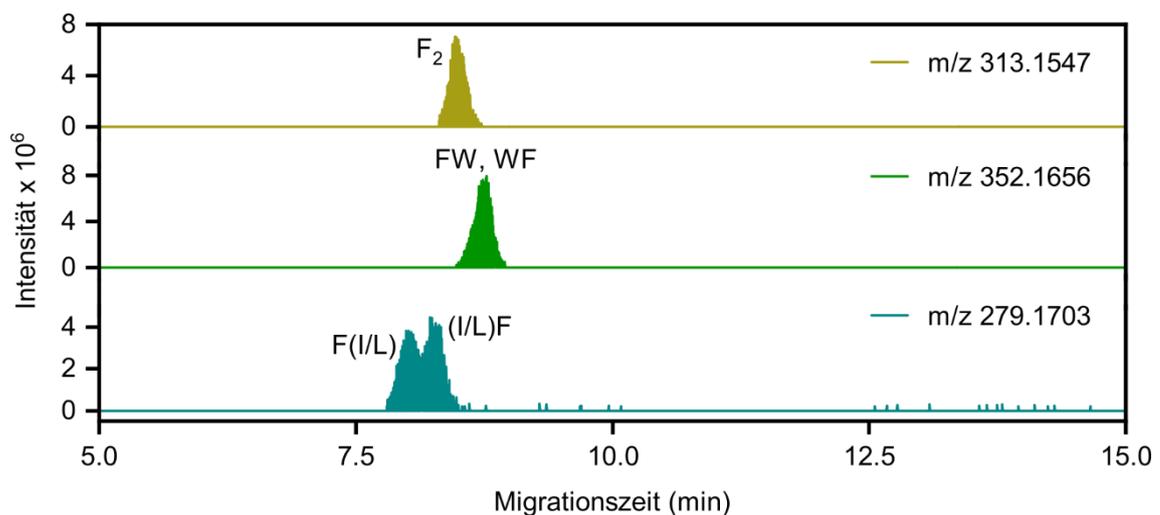
Im Gegensatz zu vielen literaturbekannten Eisen(III)-vermittelten Reaktionen, die bei erhöhter Temperatur ablaufen,<sup>[205, 262, 275, 277-278]</sup> konnten innerhalb von 29 Tagen keine DKP-Nebenprodukte ausgemacht werden. In Gegenwart von Essigsäure ist zusätzlich auch die Bildung von acetylierten Peptiden denkbar. Auch diese konnten massenspektrometrisch nicht nachgewiesen werden.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die beschriebene Eisen-vermittelte Peptidbildungsreaktion in flüssigem Schwefeldioxid bei Raumtemperatur bis zu vier Kuppelungsschritte je Kette ermöglicht. Darüber hinaus verläuft die Peptidbildung bei mildereren Reaktionstemperaturen und mit höherer Selektivität als literaturbekannte Eisen(III)-vermittelte Kondensationen, da keine DKP-Nebenprodukte erhalten werden. Die Reaktionsroute, die sich einfacher Reaktanden bedient, ermöglicht zudem bereits bei geringen Eisen- und Essigsäurekonzentrationen Produktbildung. Dieses robuste Verhalten in Kombination mit dem großen Eisenvorkommen der frühen Erde lässt eine hohe Vereinbarkeit mit verschiedenen präbiotischen Reaktionsszenarien und -orten, wie zum Beispiel auch Eisenmeteoriten, erwarten. Des Weiteren unterstreicht der Einsatz eines natürlich vorkommenden Minerals die präbiotische Plausibilität des Reaktionspfades.

### **Mischung der 20 proteinogenen Aminosäuren**

Abschließend wurde die Vereinbarkeit des beschriebenen Reaktionspfades mit einem komplexen Szenario, wie es auch auf der frühen Erde aufgetreten sein könnte, untersucht. Hierzu wurde eine Reaktionsmischung bestehend aus allen 20 proteinogenen Aminosäuren (je 20 mM) eingesetzt. Nach Ablauf von sieben Tagen wurde die Produktmischung auf die Bildung von Dipeptiden untersucht. Die Auftrennung und Analyse erfolgte dabei wie bereits bei den Glycin- und L-Alanin-basierten Versuchen und Studien größerer Mischungen im Zusammenhang mit der Kupfer-vermittelten Peptidbildung in vorangehenden Arbeiten *via* CE-MS auf LPA-beschichteten Kapillaren.<sup>[394-395]</sup> Um einer Kontamination des Massen-

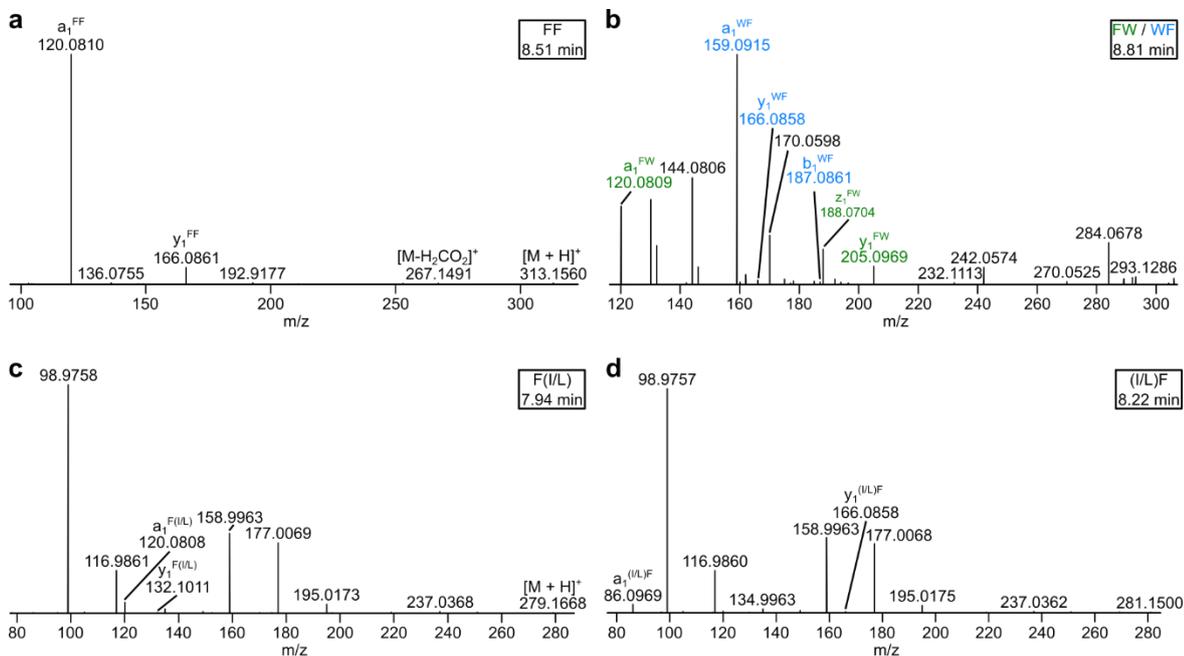
spektrometers vorzubeugen, wurde erst nach der Elution der Metallspezies (nach ca. sechs Minuten) die Sprayspannung am Emitter angelegt sowie die Detektion gestartet. Dipeptidprodukte wurden zunächst mithilfe von HR-MS identifiziert und anschließend anhand von MS/MS-Experimenten sequenziert. Die Mehrheit konstitutionsisomerer Sequenzen gemischter Dipeptide migrierte gleich schnell, sodass für diese analog zu den Homodimeren nur ein Signal erhalten wurde. In mehreren Fällen waren die Konstitutionsisomere gemischter Dipeptide jedoch auch angetrennt, wie das Beispiel von F(I/L) und (I/L)F zeigt (Abbildung 35). Anhand verschiedener phenylalaninhaltiger Dipeptide soll im Folgenden beispielhaft die Auswertung des Versuchs genauer erläutert werden.



**Abbildung 35:** Beispielhafte extrahierte Ionenelektropherogramme (EIEs) der Produktmischung aus der Reaktion der Aminosäuremischung (äquimolar, insgesamt 400 mM, 1.00 Äq.) mit Eisenpulver, Harnstoff (je 1.00 Äq.) und Essigsäure (0.10 Äq.) nach 7 d. Die Auftrennung erfolgte auf einer LPA-Kapillare (80 cm, 30 kV, 2 M AcOH, 30 mbar, 25 °C). *Full scan* Massenspektren wurden in einem Bereich von  $m/z$  129-750 und datenabhängige MS/MS-Spektren wurden bei einer relativen Fragmentierungsenergie von 30% aufgezeichnet.

Das MS/MS-Spektrum des Vorläuferions mit  $m/z$  313.1547 bei einer Migrationszeit von 8.51 min zeigt das  $a_1$  sowie das  $y_1$  Fragment von  $F_2$  und bestätigt so die Zuordnung des Signals im extrahierten Ionenelektropherogramm (EIE) (Abbildung 36a). Im Fall der nicht aufgetrennten gemischten Dipeptide FW und WF liefert das MS/MS-Experiment wichtige Informationen für die Zuordnung des Signals zu den massengleichen Sequenzisomeren. Da Fragmente beider Isomere vorhanden sind (Abbildung 36b), kann das Signal auf beide zurückgeführt werden. Das MS/MS-Spektrum wird hierbei, wie auch Spektren ausgehend von anderen Dipeptidvorläufern, von den  $a$ ,  $b$ ,  $y$  und  $z$  Fragmenten dominiert. Die Massenspur des gemischten Dipeptids aus einem Phenylalanin- und Leucin- bzw. Isoleucinbaustein weist zwei nicht Basislinien-getrennte Signale auf. Das MS/MS-Spektrum des vorderen Signals bei 7.94 min zeigt das  $a_1$  und  $y_1$  Fragment des Sequenzisomers mit  $N$ -terminalem Phenylalaninrest, wohingegen das MS/MS-Spektrum des hinteren Peaks bei 8.22 min die analogen Fragmente des Dipeptids mit inverser Sequenz aufweist (Abbildung 36c

und d). Somit können beide Signale eindeutig jeweils einem der beiden Sequenzisomere zugeordnet werden. Da keine Fragmentierung der Leucin- bzw Isoleucinseitenkette beobachtet werden konnte, war eine Unterscheidung dieser beiden Aminosäurebausteine nicht möglich.

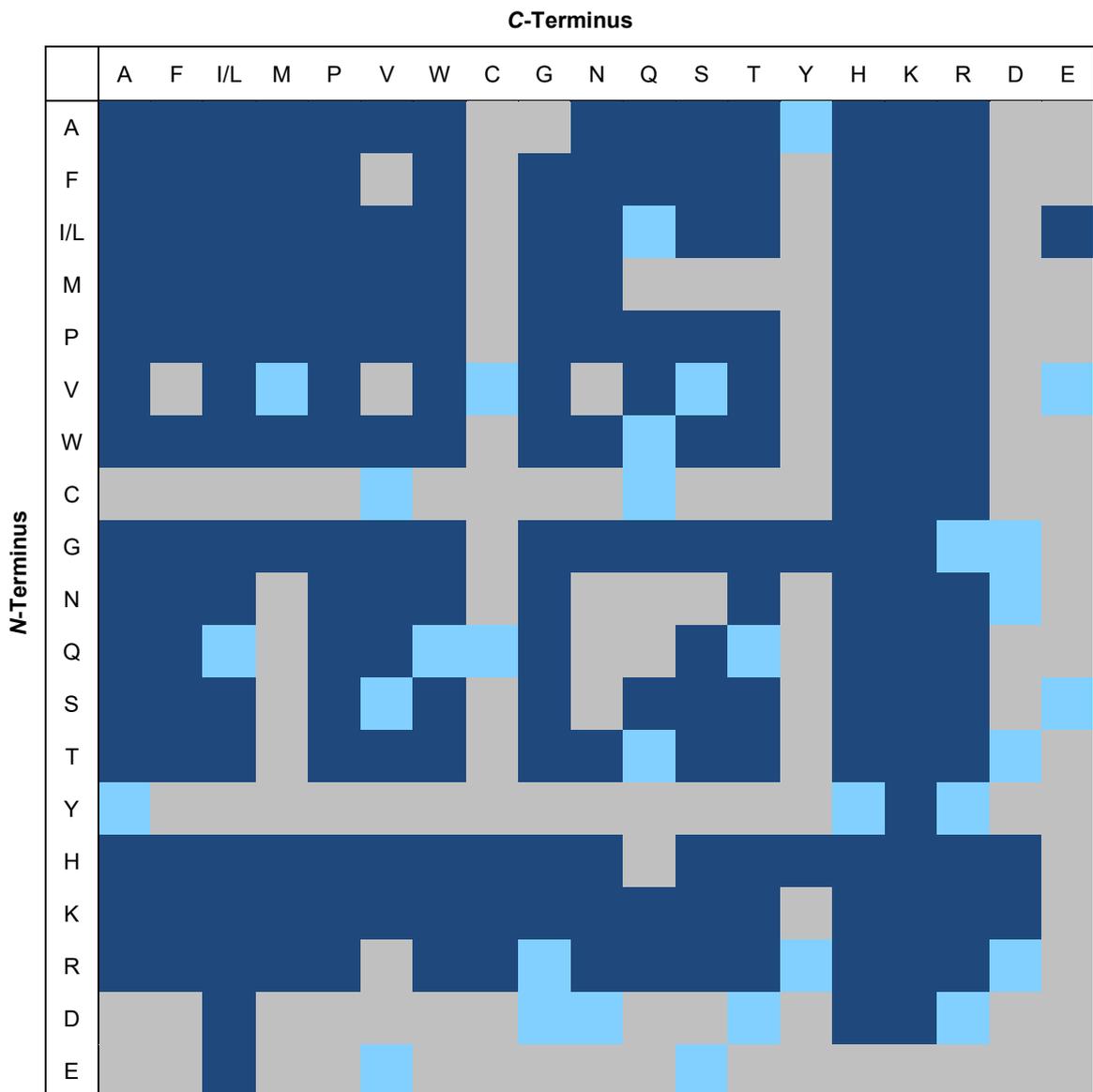


**Abbildung 36:** MS/MS-Spektren der Signale von F<sub>2</sub> ( $m/z = 313.1547$ ) (a), FW, WF ( $m/z = 352.1656$ ) (b), F(I/L) (relative Intensität  $m/z$  132.1011: 0.22%) (c) und (I/L)F ( $m/z = 279.1703$ ) (relative Intensität  $m/z$  166.0858: 0.48%) (d) aus der Reaktion der Aminosäuremischung (äquimolar, insgesamt 400 mM, 1.00 Äq.) mit Eisenpulver, Harnstoff (je 1.00 Äq.) und Essigsäure (0.01 Äq.) nach 7 d. Die kollisionsinduzierte Dissoziation erfolgte bei einer relativen Fragmentierungsenergie von 30%.

Aufgrund des großen Produktspektrums (400 mögliche Dipeptidkombinationen) wurde auf eine Quantifizierung verzichtet. Stattdessen wurde eine qualitative Auswertung vorgenommen. Detektierte Dipeptide wurden dabei in zwei Kategorien eingeteilt: Produkte, die nur in Spuren vorlagen und deshalb nur mithilfe von HR-MS identifiziert werden konnten und Produkte, die in ausreichend hohen Konzentrationen präsent waren, um zusätzlich eine Sequenzbestimmung zu ermöglichen.

Bei Betrachtung des in Abbildung 37 dargestellten Produktspektrums wird deutlich, dass alle Aminosäuren, wenn auch mit unterschiedlicher Präferenz, in Dipeptide eingebaut wurden. Besonders auffällig ist dabei die Detektion zahlreicher Dipeptide mit Aminosäurebausteinen, die über eine basische Seitenkette verfügen (Histidin, Lysin und Arginin). Lediglich drei Dipeptidsequenzen (HQ, RV und KY) konnten nicht beobachtet werden. Ursächlich hierfür könnte entweder deren im Vergleich bessere Ionisierbarkeit oder eine größere Reaktivität der Aminosäuren mit basischer Seitenkette sein. Im Gegensatz dazu zeigen Tyrosin und die Aminosäuren mit saurer Seitenkette (Asparagin- und Glutaminsäure) die geringste Reaktivität. Ferner konnte im Gegensatz zur Kupfer-vermittelten Peptidbildung

keine Oxidation von Cystein zu dem entsprechenden Disulfid Cystin beobachtet werden.<sup>[394]</sup> In Hinblick auf potenzielle Funktionen kurzer Peptide ist außerdem die gute Reaktivität von Prolin von Bedeutung. So konnten WENNEMERS *et al.* zeigen, dass Prolin-basierte Tri- und Tetrapeptide konjugierte Additions- sowie Aldolreaktionen katalysieren.<sup>[173, 402]</sup> Neben unterschiedlichen Löslichkeiten könnte ähnlich wie bei der SIPF Reaktion auch die Elektrophilie und die Sterik eine mögliche Koordination der jeweiligen Aminosäuren am Metallzentrum und somit deren Einbau in Dipeptide beeinflussen.<sup>[254, 392]</sup>



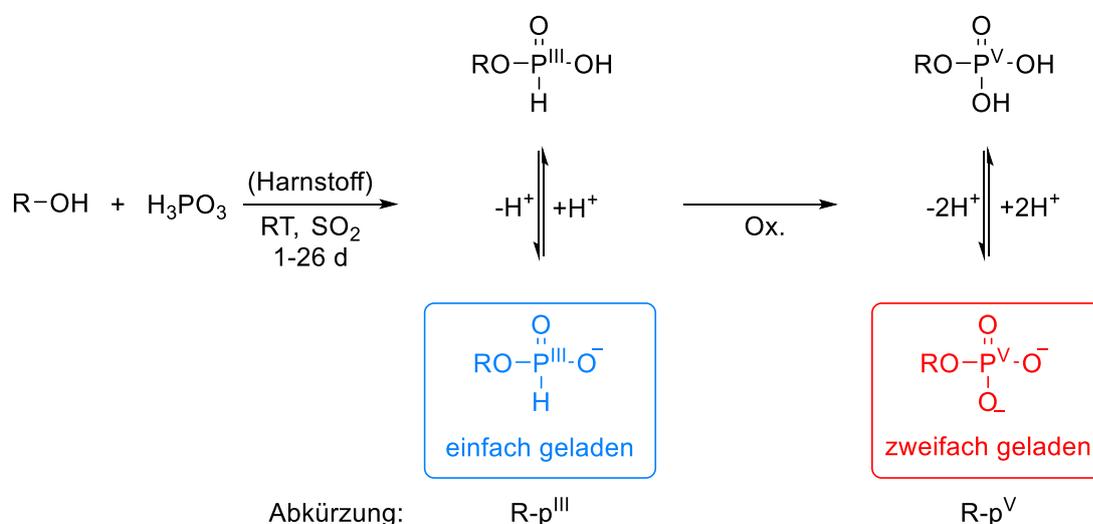
**Abbildung 37:** Produktspektrum der Reaktion der 20 proteinogenen Aminosäuren (äquimolar, insgesamt 400 mM, 1.00 Äq.) in Gegenwart von Eisenpulver, Harnstoff (je 1.00 Äq.) und Essigsäure (0.10 Äq.) nach 7 d. ■ durch MS/MS-Spektrum bestätigt, ■ in Spuren vorhanden, ■ nicht detektiert.

Als Fazit kann festgehalten werden, dass der Reaktionspfad mit allen proteinogenen Aminosäuren kompatibel ist und somit dessen Einsatz in komplexen Szenarien auf der frühen Erde denkbar ist.

## 4.2 Phosphorylierung in flüssigem Schwefeldioxid

Die Ergebnisse dieses Kapitels wurden in C. Sydow *et al.*, *Commun. Chem.* 2022, 5, 143, <https://www.nature.com/articles/s42004-022-00761-w> veröffentlicht.<sup>[403]</sup> Die Darstellung der adaptierten und übersetzten Abbildungen und Tabellen ist durch die Creative Commons Attribution 4.0 International License CC BY, <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/> gestattet.

Im zweiten Abschnitt dieser Arbeit wurde untersucht, ob hygroskopisches Schwefeldioxid außer für Peptidbildungsreaktionen auch für eine andere präbiotisch essenzielle Kondensationsreaktion, die Phosphorylierung biochemisch relevanter Moleküle, ein geeignetes Reaktionsmedium darstellt. Als Phosphorylierungsreagenz wurde Phosphonsäure eingesetzt, da der nukleophile Angriff auf Phosphor(V)-Zentren mit hoher benachbarter negativer Ladung kinetisch gehemmt ist.<sup>[24, 32]</sup> Obwohl die präbiotische Existenz von Phosphor(III)-Verbindungen als gesichert gilt,<sup>[120, 308, 311, 315]</sup> befassten sich in der Vergangenheit nur wenige Studien mit deren Rolle in präbiotischen Phosphorylierungsreaktionen.<sup>[124, 355, 358]</sup> Diese zeigen, dass Phosphor(III)-Verbindungen ein großes Potenzial als Phosphorylierungsreagenzien für organische Substrate aufweisen. Die Umsetzungen verlaufen jedoch bei erhöhter Temperatur und ein zusätzlicher Reaktionsschritt ist unumgänglich, um Organophosphate und häufig auch, um phosphorylierte Dimere zu erhalten.<sup>[124, 355, 358]</sup> Davon motiviert, wurde untersucht, ob die Kondensationsreaktion in Schwefeldioxid bei milden Temperaturen möglich ist und ob, zeitgleich aufgrund der Redox-Eigenschaften des Lösungsmittels ein zusätzlicher Oxidationsschritt verzichtbar ist. (Abbildung 38).

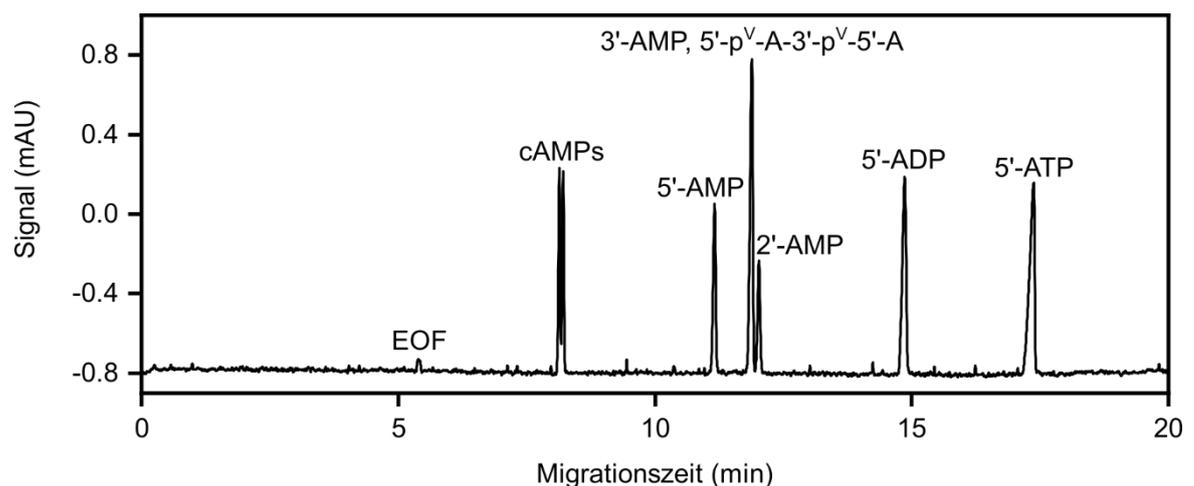


**Abbildung 38:** Phosphorylierung in flüssigem Schwefeldioxid mit Phosphonsäure als Phosphorylierungsreagenz.

Mit Adenosin als Substrat wurde die Reaktion zunächst optimiert sowie mögliche Pfade zu verschiedenen Produkten aufgezeigt.

#### 4.2.1 Untersuchung der Reaktionsbedingungen

Zu Beginn wurden Adenosin (100 mM) und Phosphonsäure im Verhältnis 1:1 in der Druckapparatur vorgelegt (Abbildung 51). Unter inerten Bedingungen wurde anschließend Schwefeldioxid einkondensiert. Nach Ablauf einer Reaktionszeit von sieben Tagen, während der die Reaktionsmischung bei Raumtemperatur gerührt wurde, wurde das Lösungsmittel entfernt und die Proben bis zur Analyse bei  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Die Auftrennung der resultierenden Phosphorverbindungen erfolgte kapillarelektrophoretisch anhand einer von RODRÍGUEZ-GONZALO *et al.* entwickelten Methode für Ribonukleosid-5'-monophosphate.<sup>[367]</sup> Für die Separation der Probenbestandteile auf BFS-Kapillaren wurde Ammoniumformiat ( $\text{NH}_4\text{FA}$ ) (30 mM) als BGE verwendet. Dessen pH-Wert wurde auf 9.5 eingestellt. Folglich lagen die Analyten als Anionen vor und eluierten bei der angelegten positiven Trennung langsamer als der EOF. Abbildung 39 zeigt beispielhaft die Auftrennung verschiedener phosphorylierter Adenosinderivate. Monophosphorylierte Verbindungen migrieren wie erwartet schneller als die höher geladenen Di- und Triphosphate. Die UV-Spur bei 254 nm zeigt scharfe Signale für die Analyten, welche größtenteils Basislinien-getrennt vorliegen.



**Abbildung 39:** Kapillarelektrophoretische Auftrennung phosphorylierter Adenosinderivate. Die Struktur der 5'-Adenylsäure-3', 5'-adenosinphosphat-Referenz ( $5'\text{-p}^{\text{V}}\text{-A-3'-p}^{\text{V}}\text{-5'-A}$ ) ist in Abbildung 67 auf s. 141 dargestellt. Die Auftrennung erfolgte auf einer BFS-Kapillare ( $l = 80\text{ cm}$ ,  $30\text{ kV}$ ,  $30\text{ mm NH}_4\text{FA}$  ( $\text{pH } 9.5$ ),  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Die Analyten wurden bei  $254\text{ nm}$  detektiert.

Zusätzlich wurden die kapillarelektrophoretischen Auftrennungen auch in Kombination mit HR-ESI-MS-Detektion durchgeführt, um auch Produkte identifizieren zu können, für die keine Referenz erhältlich war (Abbildung 71 und 72 auf s. 150 zeigen beispielhaft die Auftrennung einer Reaktionsmischung). Wie auch bei der Analyse der Peptidbildungsreaktionen kam dafür ein *sheath-flow* CE-ESI-MS-Interface zum Einsatz. Als SL wurden *i*PrOH

und Wasser mit Ameisensäure (1:1 + 0.05% v/v) mit einem Fluss von 3  $\mu\text{L}/\text{min}$  verwendet. Anlegen einer Spannung von  $-4.5\text{ kV}$  am Edelmetallemitter ermöglichte das Versprühen der Lösung.

Durch Kombination der Detektionsmethoden konnte für die Reaktion ausgehend von äquimolaren Mengen Adenosin und Phosphonsäure nicht nur die Bildung des Adenosinmonophosphonates (A-p<sup>III</sup>)<sup>3</sup>, sondern auch von Monophosphaten beobachtet werden. Zwar sind für Schwefeldioxidlösungen keine Redox-Potenziale tabelliert, werden jedoch näherungsweise die Potenziale in saurer wässriger Lösung für eine Abschätzung herangezogen, so wird deutlich, dass die Oxidation von Phosphonaten mit Schwefeldioxid unter inerten Bedingungen möglich sein sollte. Die entsprechenden Redox-Potenziale sind in Tabelle 2 zusammengefasst:

**Tabelle 2:** Redox-Potenziale in wässriger Lösung bei  $\text{pH} = 0$  und  $T = 298.15\text{ K}$  nach BRATSCHE.<sup>[398]</sup>

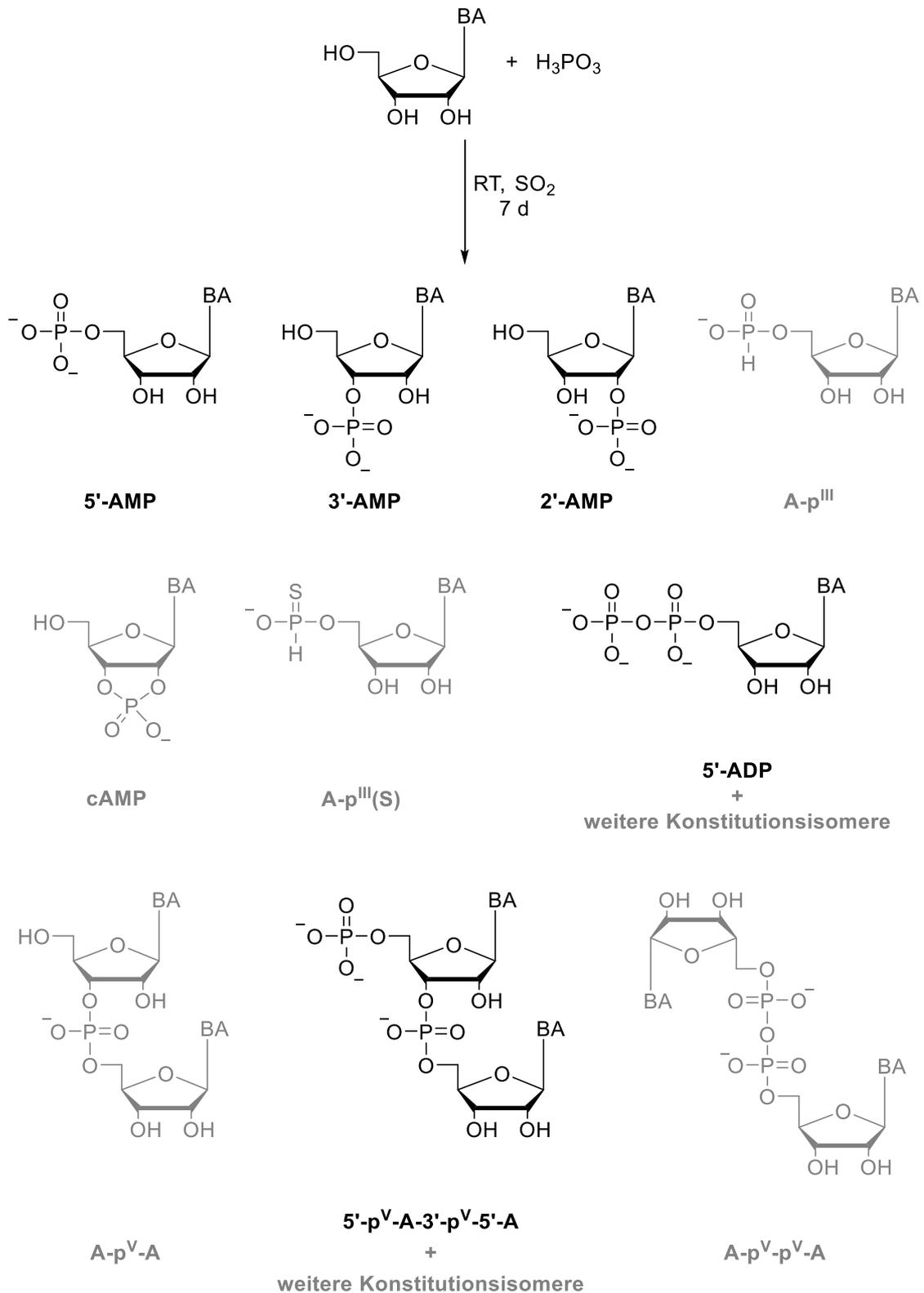
Redox-Paar	$\text{H}_3\text{PO}_4, \text{H}^+ / \text{H}_3\text{PO}_3$	$\text{H}_4\text{P}_2\text{O}_6, \text{H}^+ / \text{H}_3\text{PO}_3$	$\text{SO}_2, \text{H}^+ / \text{HS}_2\text{O}_3^-$	$\text{SO}_2, \text{H}^+ / \text{S}_8$	$\text{SO}_2, \text{H}^+ / \text{S}_4\text{O}_6^{2-}$	$\text{SO}_2, \text{H}^+ / \text{HS}_2\text{O}_4^-$
$E^0\text{ (V)}$	-0.30	0.30	0.43	0.45	0.54	0.07

Neben allen drei azyklischen Regioisomeren (5'-, 3'- und 2'-AMP) wurden auch Spuren von cAMP gefunden. Darüber hinaus konnte die Bildung von Diphosphaten festgestellt werden. Ko-Injektion einer Referenz bestätigte die Präsenz von 5'-Adenosindiphosphat (5'-ADP). Drei Signale in der ADP-Massenspur lassen jedoch vermuten, dass neben dem 5'-Isomer noch andere Isomere entstanden sind. Reproduzierbare CE-Trennungen mit UV-Detektion bei 254 nm ermöglichten die Bestimmung der 5'-AMP- (7.8%) und der 5'-ADP-Ausbeute (0.4%). Die minimal quantifizierbare Konzentration betrug dabei für 5'-AMP  $5\text{ }\mu\text{M}$  und für 5'-ADP  $3\text{ }\mu\text{M}$ . Die entsprechenden Eichgeraden der Referenzsubstanzen sind in Abbildung 68 und 69 ab s. 141 dargestellt. Eine Quantifizierung des 3'-AMP-Produktes konnte aufgrund der Überlagerung mit dem natürlich vorkommenden Dinukleotid nicht erfolgen.

Als dimere Produkte konnten Diadenosinphosphat (A-p<sup>V</sup>-A) und Dinukleotide (p<sup>V</sup>-A-p<sup>V</sup>-A/ A-p<sup>V</sup>-p<sup>V</sup>-A) massenspektrometrisch detektiert werden (Abbildung 40, Tabelle 72 auf s. 151). Während die Massenspur von A-p<sup>V</sup>-A lediglich ein Signal beinhaltet, sind für letztgenanntes Produkt ein Signal ( $t_{\text{mig}} \sim 9.9\text{ min}$ ) und mehrere überlagernde Signale ( $t_{\text{mig}} \sim 12.4\text{ min}$ ) zu erkennen. Für beide Produkte sind verschiedene regioisomere Verknüpfungen der Nukleosidbausteine über Phosphatgruppen möglich. Phosphate übertreffen Alkohole jedoch in

<sup>3</sup> Die Benennung der Phosphorverbindungen ist im Abkürzungsverzeichnis erläutert. Für die Mehrheit der phosphorylierten Produkte erfolgte keine Bestimmung der Konstitutionsisomere. Mögliche Phosphonat- und Phosphatverknüpfungen werden mithilfe der Benennungen und Abkürzungen veranschaulicht. Diese nehmen Bezug auf die Gesamtheit der entstandenen Isomere. Identifizierte Regioisomere enthalten eine Positionsangabe für die Phosphatgruppe(n).

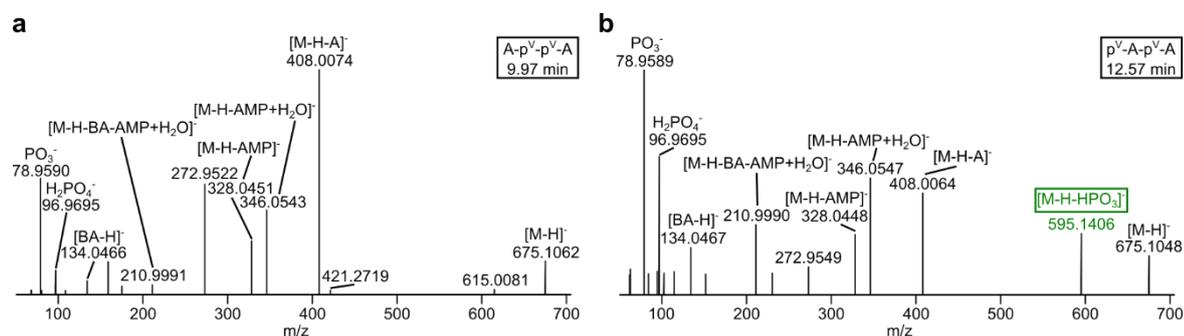
der Rolle des Nucleophils,<sup>[24]</sup> weshalb im Fall des Dinucleotids zusätzlich die Verbrückung über einen Pyrophosphat-Linker wahrscheinlich ist.



**Abbildung 40:** Exemplarische Strukturformeln der Produkte ausgehend von Adenosin (100 mM) und Phosphonsäure (1.00 Äq.) nach 7 d. Für die grau dargestellten Produkte erfolgte keine Bestimmung der Konstitutionsisomere. Die Konstitution der in schwarz dargestellten Produkte wurde anhand von Referenzmessungen bestätigt.

Um die Verknüpfung der Adenosineinheiten genauer zu untersuchen, wurden MS/MS-Experimente für solche Signalpaare durchgeführt.

Hierbei zeigten MS/MS-Spektren beider Signale Fragmente, wie  $[M-H-A]^-$  und  $[M-H-AMP]^-$ , die beiden Verknüpfungen zugeordnet werden können (Abbildung 41). Zusätzlich konnte für die langsamer migrierenden Komponenten ein  $[M-H-HPO_3]^-$  Fragment mit  $m/z$  595.1406 detektiert werden. Dieses entspricht dem  $[M-H]^-$ -Ion von A-p<sup>V</sup>-A und ist somit charakteristisch für das Phosphat-verbrückte Dinukleotid. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der MS/MS-Experimente steht die Ko-Injektion einer 5'-p<sup>V</sup>-A-3'-p<sup>V</sup>-5'-A-Referenz, die mit der gleichen Geschwindigkeit wie eines der überlagernden Signale migriert. Anhand der Ergebnisse wird das zuerst eluierende Signal Pyrophosphat-basierten Dinukleotiden zugeschrieben. Die überlagernden, langsamer migrierenden Signale sind vermutlich auf verschiedene regioisomere Dinukleotide mit Phosphat-Linker zurückzuführen.



**Abbildung 41:** MS/MS-Spektren der Adenosindinukleotide ( $m/z = 675.1083$ ) bei  $t_{mig} = 9.97$  min (**a**) und bei  $t_{mig} = 12.57$  min (**b**). Für p<sup>V</sup>-A-p<sup>V</sup>-A charakteristische Fragmente sind grün dargestellt. Die kollisionsinduzierte Dissoziation erfolgte bei einer relativen Fragmentierungsenergie von 30%.

Obwohl das Produktspektrum A-p<sup>III</sup> umfasst, konnten jedoch keine Mono- und Diphosphonat-verbrückten Adenosineinheiten (A-p<sup>III</sup>-A und p<sup>III</sup>-A-p<sup>III</sup>-A/ A-p<sup>III</sup>-p<sup>III</sup>-A) detektiert werden. Eine mögliche Erklärung dafür liefert eine Untersuchung von GAREGG *et al.*, die zeigt, dass Phosphonatdiester leichter oxidierbar sind als entsprechende Monoester.<sup>[357]</sup> Darüber hinaus könnte die Abwesenheit von Phosphonatdiestern auch in deren Hydrolyseempfindlichkeit begründet sein.<sup>[356]</sup>

Vergleichbar zu anderen nicht-enzymatischen Ansätzen werden verschiedene regioisomere Produkte erhalten.<sup>[122, 331, 335, 365]</sup> SZOSTAK *et al.* berichteten jedoch, dass auch in Gegenwart von 2'-5'-Verknüpfungen im RNA-Rückgrat deren Faltung weiterhin möglich ist und infolgedessen deren katalytische Eigenschaften nicht gefährdet sind.<sup>[404]</sup> Langsamere Kopiervorgänge über 2'-5'-Verknüpfungen sowie deren größere Hydrolyseempfindlichkeit verglichen mit den natürlich vorkommenden 3'-5'-verknüpften Einheiten sollten des Weiteren zu deren sukzessiven Austausch durch diese beitragen.<sup>[405-406]</sup> Basierend auf diesen Studien stellt die Präsenz nicht-kanonischer Verknüpfungen somit kein Problem für einen fol-

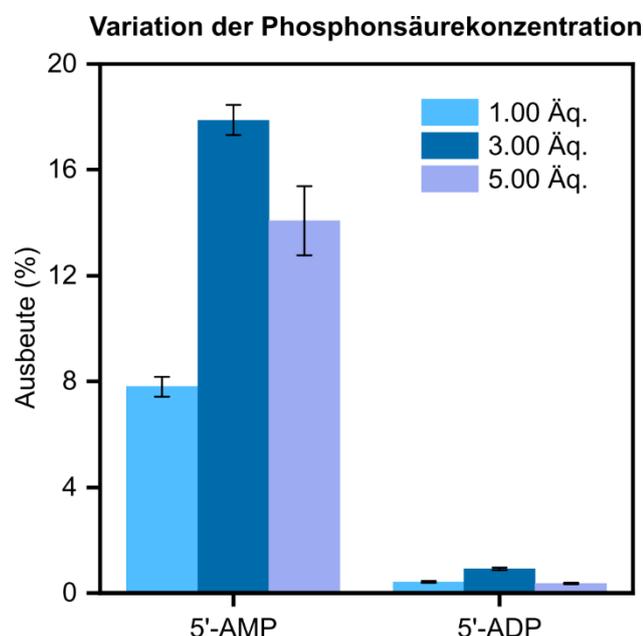
genden Replikationsschritt dar. Und mehr noch, die verminderte thermische RNA-Duplexstabilität in Folge des Auftretens von 2'-5'-Verknüpfungen könnte sich förderlich auf eine Templat-basierte Replikation auswirken.<sup>[404, 407]</sup> Im Gegensatz zur Arbeit mit thermisch stabileren, kanonischen Templaten werden inhibierende Templat-Produkt-Wechselwirkungen unterbunden.<sup>[404, 407]</sup>

In ähnlicher Weise sollte auch die Entstehung von Pyrophosphat-Verknüpfungen unproblematisch sein. So können 3'-5'-Pyrophosphat-Verknüpfungen, die auch durch Bruch eines RNA-Stranges gefolgt von Primererweiterung entstehen können, als Templat für kanonische 3'-5'-Verknüpfungen dienen.<sup>[408]</sup> Da die Geschwindigkeit des Kopiervorgangs jedoch geringer ist als mit natürlichen 3'-5'-Phosphatverknüpfungen und die Pyrophosphate weniger resistent gegenüber anwesenden Magnesiumionen sind, könnten diese laut SZOSTAK *et al.* zeitlich limitiert einen Beitrag zur Reparatur beschädigter RNA-Stränge leisten.<sup>[408]</sup>

Basierend auf diesen ersten Ergebnissen, die darauf hindeuten, dass Schwefeldioxid nicht nur ein geeignetes Reaktionsmedium für die Phosphorylierungsreaktion ist, sondern auch die Rolle des Oxidationsmittels einnimmt, wurde der Einfluss verschiedener Reaktionsparameter analysiert.

### Variation der Phosphonsäurekonzentration

Die Untersuchung der Konzentration des Phosphorylierungsreagenz zeigt, dass Überschüsse an Phosphonsäure (3.00 Äq.) zu einer Verbesserung der 5'-AMP- und 5'-ADP-Ausbeuten führen (Abbildung 42).



**Abbildung 42:** 5'-AMP- und 5'-ADP-Ausbeuten ausgehend von Adenosin (100 mM) nach 7 d in Abhängigkeit von der Phosphonsäurekonzentration. Als Fehler ist die Standardabweichung aus zwei Messungen abgebildet.

Auch auf das Produktspektrum hat die höhere Phosphonsäurekonzentration einen positiven Einfluss. Im Gegensatz zu der Reaktion in Gegenwart von äquimolaren Mengen Phosphorylierungsreagenz konnte zwar kein cAMP detektiert werden, dafür wurde die Produktpalette um Adenosindiphosphonat ( $A-p^{III}-p^{III}/ p^{III}-A-p^{III}$ ), Phosphor(III), Phosphor(V) gemischte diphosphorylierte Adenosinderivate ( $A-p^V-p^{III}/ p^{III}-A-p^V$ ), ATP und gemischtes (a-)zyklisches Diphosphat ( $A-cp^V-p^V/ p^V-A-cp^V$ ) ergänzt (siehe Tabelle 72 auf s. 151). Der Einsatz von 5.00 Äq. Phosphonsäure resultiert in einem Produktspektrum, das dem der Reaktion mit 3.00 Äq. Phosphorylierungsreagenz ähnelt. Zusätzlich konnten erstmals auch Spuren des Phosphor(III), Phosphor(V) gemischten Dinukleotids ( $A-p^{III}-p^V-A/ p^{III}-A-p^V-A$ ) beobachtet werden konnten (siehe Tabelle 72 auf s. 151).

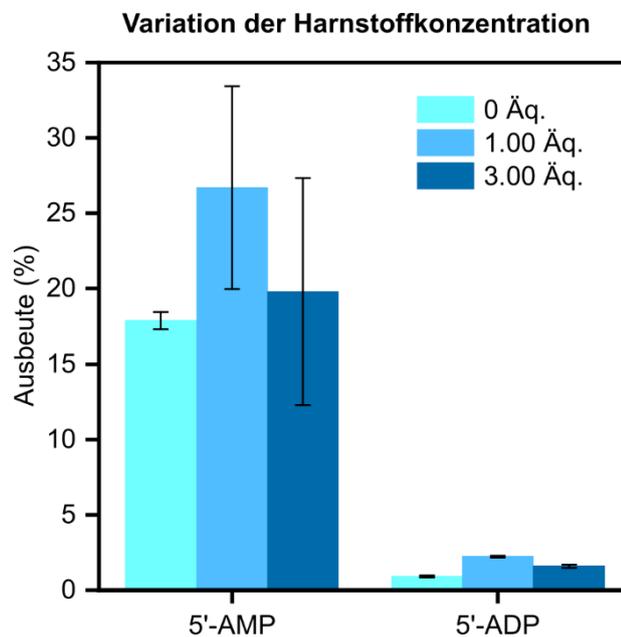
Prinzipiell ist es denkbar, dass die gebildeten Phosphonatdiester in Gegenwart von Schwefeldioxid oxidativ in die entsprechenden Phosphatdiester überführt werden und so deren Hydrolyse verhindert wird.<sup>[355-356]</sup> LÖNNBERG stellte basierend darauf, dass Phosphonatdiester einfacher zu oxidieren sind als Phosphonatmonoester,<sup>[357]</sup> die Hypothese auf, dass die Oxidation von Phosphonatestern die Triebkraft bei der Bildung von Oligonukleotiden darstellen könnte.<sup>[358]</sup>

Bei Betrachtung der 5'-AMP- und 5'-ADP-Ausbeuten in Abhängigkeit der Konzentration des Phosphorylierungsreagenzes wird deutlich, dass maximale Produktkonzentrationen mit 3.00 Äq. Phosphonsäure erzielt wurden. Der Rückgang der Ausbeuten in Anwesenheit höherer Konzentrationen des Phosphorylierungsreagenzes ist womöglich auf den in Folge der höheren Säurekonzentration niedrigeren pH-Wert zurückzuführen. Es ist bekannt, dass saure Reaktionsbedingungen die Hydrolyse von AMP begünstigen.<sup>[409]</sup>

### **Harnstoff als Additiv**

Wie bereits im Abschnitt zur Eisen-vermittelten Peptidbildung beschrieben, begünstigt Harnstoff Phosphorylierungsreaktionen.<sup>[109, 331]</sup> Basierend auf diesem Wissen wurde getestet, ob die Zugabe von Harnstoff auch einen positiven Effekt auf die untersuchte Phosphorylierungsreaktion in flüssigem Schwefeldioxid zeigt. Hierzu wurde Adenosin mit 3.00 Äq. Phosphonsäure in Gegenwart verschiedener Harnstoffkonzentrationen umgesetzt. Die Auswertung der CE-MS-Analysen zeigt, dass die Anwesenheit des Additivs keinen wesentlichen Einfluss auf die Produktpalette ausübt (siehe Tabelle 72 auf s. 151). Gleiches gilt jedoch nicht für die 5'-AMP- und 5'-ADP-Ausbeuten. Für diese kann in Gegenwart von Harnstoff ein Zuwachs verzeichnet werden. Maximale Produktkonzentrationen wurden dabei mit 1.00 Äq. Harnstoff erzielt (Abbildung 43).

In der Literatur für die Begünstigung von Phosphorylierungsreaktionen durch Harnstoff vorgeschlagene aktive Intermediate, wie Carbamoylphosphate oder Phosphoramidate,<sup>[109, 112]</sup> konnten massenspektrometrisch nicht nachgewiesen werden. Allerdings ist es unklar, ob Harnstoffaddukte der Phosphat- bzw. Phosphonatspezies unter den gewählten Reaktionsbedingungen ausreichend stabil sind, als dass deren Detektion möglich ist. Ein Mechanismus über die diskutierten Intermediate erscheint somit unwahrscheinlich, kann jedoch nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Darüber hinaus wird aufgrund der geringen Geschwindigkeit des Harnstoffzerfalls bei Raumtemperatur davon ausgegangen, dass dieser keine wesentliche Rolle für die Begünstigung der untersuchten Phosphorylierungsreaktion spielt.<sup>[400]</sup> Eine weitere mögliche Erklärung für die Begünstigung der Kondensationsreaktion durch Harnstoff stellen die physikochemischen Eigenschaften des Additivs dar. So können Nukleobasen nicht-kovalente Wechselwirkungen mit Harnstoff eingehen und ähnlich zu wässrigen Peptidlösungen beeinflusst das Additiv die Löslichkeit von Nukleosiden in diesem Reaktionsmedium positiv.<sup>[410-411]</sup>



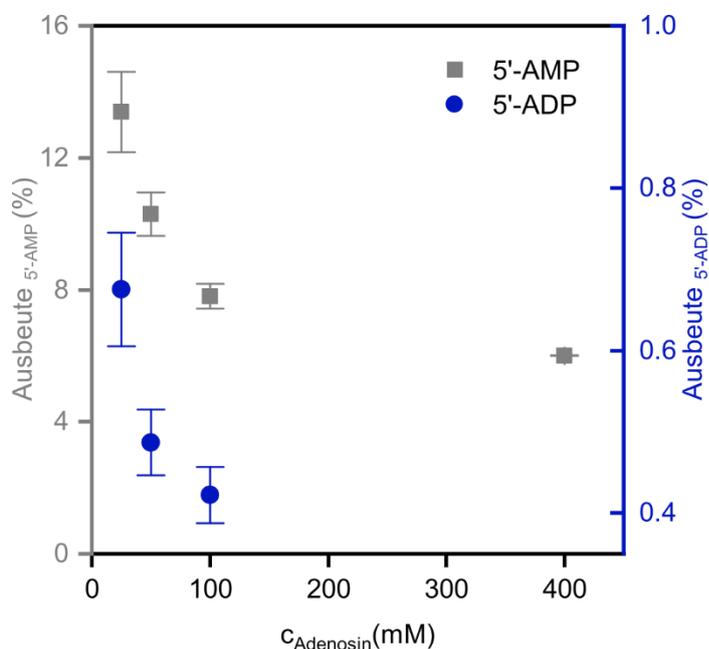
**Abbildung 43:** 5'-AMP- und 5'-ADP-Ausbeuten ausgehend von Adenosin (100 mM) und Phosphonsäure (3.00 Äq.) nach 7 d in Abhängigkeit von der Harnstoffkonzentration. Als Fehler ist die Standardabweichung aus zwei Messungen abgebildet.

Zum Vergleich wurde die optimierte Phosphorylierung von Adenosin (100 mM) mit Phosphonsäure (3.00 Äq.) in Gegenwart von Harnstoff (1.00 Äq.) auch in Wasser durchgeführt. Unter anoxischen Bedingungen wurden dabei jedoch lediglich A-p<sup>III</sup>- und AMP-Spuren erhalten (siehe Tabelle 74 auf s. 153). Die Bildung von Spuren oxidierter Produkte stimmt mit den Erwartungen überein, da die Oxidation von Phosphonaten in saurer wässriger Lösung auch in Abwesenheit von Sauerstoff unter Bildung von Wasserstoff möglich ist (s. Tabelle 2 auf s. 74). Die Potenzialdifferenz ist allerdings geringer als für die Oxidation durch Schwe-

feldioxid.<sup>[398]</sup> Somit ist die Reaktion in Wasser ebenfalls möglich. Flüssiges Schwefeldioxid stellt jedoch aufgrund der wasserentziehenden Eigenschaft das überlegene Reaktionsmedium dar, was sich in den guten Ausbeuten sowie dem breiten Produktspektrum äußert.

### Abhängigkeit von der Substratkonzentration

Neben diesen positiven Eigenschaften ist im präbiotischen Kontext die zuverlässige Produktbildung über einen großen Bereich von Reaktionsbedingungen und insbesondere bei geringen Reaktandkonzentrationen von Interesse. Ausschlaggebend hierfür ist, dass für viele Reaktionsszenarien auf der frühen Erde mit einer hohen Verdünnung gerechnet wird. Die Phosphorylierung von Adenosin in Gegenwart von stöchiometrischen Phosphonsäurekonzentrationen lieferte maximale Ausbeuten bei niedrigen Substratkonzentrationen (Abbildung 44). Mit steigender Adenosinkonzentration nehmen diese ab. Bei einer Substratkonzentration von 400 mM läuft die Phosphorylierungsreaktion immer noch ab, jedoch ist die erhaltene 5'-ADP-Konzentration zu gering für eine Quantifizierung.



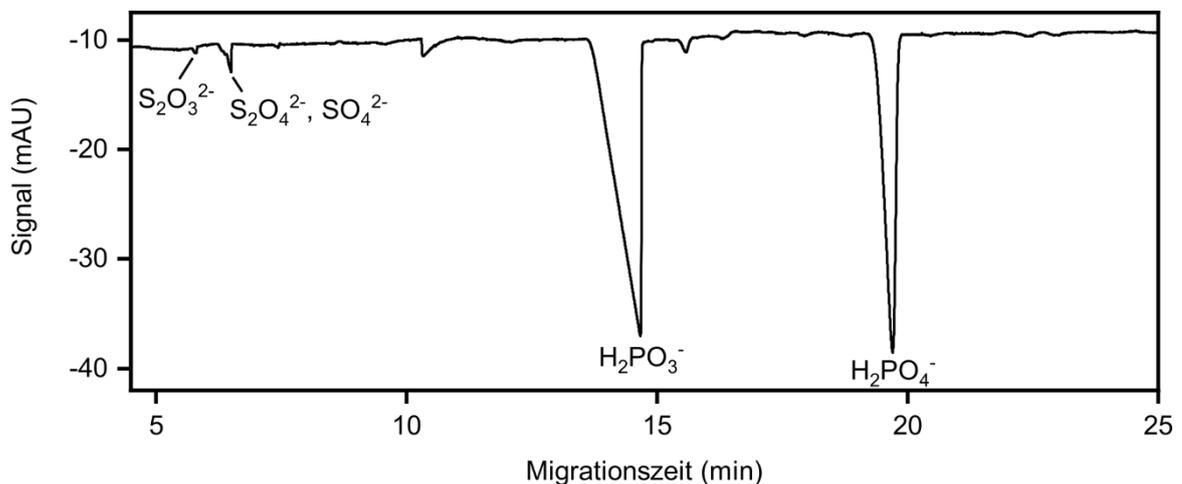
**Abbildung 44:** 5'-AMP- und 5'-ADP-Ausbeuten der Reaktion von Adenosin mit Phosphonsäure im Verhältnis 1:1 nach 7 d in Abhängigkeit von der Adenosinkonzentration. Als Fehler ist die Standardabweichung aus zwei Messungen abgebildet.

Im Einklang mit diesen Ergebnissen steht auch die größere Produktvielfalt bei niedrigeren Substratkonzentrationen. So wurde das Produktspektrum der Reaktion ausgehend von 25 mM Adenosin im Vergleich zu dem der eingangs beschriebenen stöchiometrischen Reaktion mit 100 mM Adenosin um die Produkte  $p^{\text{III}}\text{-A-p}^{\text{V}}\text{-A}$ /  $\text{A-p}^{\text{V}}\text{-p}^{\text{III}}\text{-A}$ ,  $\text{A-p}^{\text{III}}\text{-p}^{\text{III}}$ /  $p^{\text{III}}\text{-A-p}^{\text{III}}$ ,  $\text{A-p}^{\text{V}}\text{-p}^{\text{III}}$ /  $p^{\text{III}}\text{-A-p}^{\text{V}}$  und  $\text{A-cp}^{\text{V}}\text{-p}^{\text{V}}$ /  $p^{\text{V}}\text{-A-cp}^{\text{V}}$  erweitert (siehe Tabelle 72 auf s. 151). Die Reaktion mit 400 mM Adenosin liefert hingegen dasselbe Produktspektrum wie die Phosphorylierung von 100 mM Adenosin. Die beschriebene Umsetzung mit Phosphonsäure in flüssigem

Schwefeldioxid stellt somit einen robusten Reaktionspfad zu phosphorylierten Produkten dar.

### Schwefeldioxid als Oxidationsmittel

Nachdem die Eignung von Schwefeldioxid als Reaktionsmedium für präbiotisch plausible Phosphorylierungsreaktionen ausgehend von Phosphonsäure veranschaulicht werden konnte, wurde überprüft, ob das Lösungsmittel tatsächlich auch als Oxidationsmittel fungiert. Sollte Schwefeldioxid diese Rolle übernehmen, so wird es selbst reduziert. In diesem Fall sollte mindestens eines der folgenden möglichen Reduktionsprodukte erhalten werden: Thiosulfat ( $S_2O_3^{2-}$ ), Dithionit ( $S_2O_4^{2-}$ ), Tetrathionat ( $S_4O_6^{2-}$ ) oder elementarer Schwefel (s. Tabelle 2 auf s. 74).<sup>[398]</sup> Ein Indiz für die Anwesenheit des letztgenannten Reduktionsproduktes könnte die gelbliche Verfärbung des eingangs farblosen Feststoffes nach der Umsetzung in flüssigem Schwefeldioxid darstellen (Abbildung 73 auf s. 154 zeigt den Feststoff eines Blank-Versuchs mit Phosphonsäure vor und nach der Zugabe von flüssigem Schwefeldioxid). Darüber hinaus konnte die Entstehung von Thiosulfat und Dithionit mithilfe von CE-Messungen verifiziert werden (Abbildung 45).



**Abbildung 45:** Kapillarelektrophoretische Auftrennung der Reaktionsmischung ausgehend von Adenosin (100 mM), Phosphonsäure und Harnstoff (je 3.00 Äq.). Die Probe wurde bezogen auf die anfängliche Adenosinkonzentration auf 10 mM verdünnt. Die Auftrennung erfolgte auf einer BFS-Kapillare ( $l = 80$  cm, 30 kV, 30 mM BIS-TRIS + 20 mM Salicylsäure (pH 6.0), 25 °C). Die Analyten wurden indirekt bei 214 nm detektiert.

Hierzu wurde auf eine von TRAPP *et al.* entwickelte Trennmethode zurückgegriffen, die durch den Einsatz eines UV-aktiven BGEs bestehend aus Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan (BIS-TRIS) und Salicylsäure (pH = 6.0) die indirekte Detektion der Analyten ermöglicht.<sup>[317]</sup> Abbildung 45 zeigt beispielhaft das resultierende Elektropherogramm der Reaktion von Adenosin (100 mM) mit Phosphonsäure in Gegenwart von Harnstoff (je 3.00 Äq.). Durch Ko-Injektion konnten neben der eingesetzten Phosphonsäure

auch deren anorganisches Oxidationsprodukt sowie Thiosulfat als Schwefeldioxid Reduktionsprodukt zugeordnet werden.

Bei der Komponente, die nur geringfügig langsamer migriert als das Thiosulfat, könnte es sich laut Referenzmessungen sowohl um Dithionit als auch um Sulfat handeln, welches in Folge von Disproportionierungsreaktionen entstanden sein könnte. Die massenspektrometrische Analyse der Reaktionsmischung ergab, dass beide Schwefelverbindungen anwesend waren. Des Weiteren konnte Thiosulfat als Produkt bestätigt werden. Zusätzlich zu den monoisotopischen Signalen bekräftigen Isotopenpeaks (M+2), die auf das <sup>34</sup>S-Isotop des Schwefels (relative Häufigkeit: 4.4%) zurückzuführen sind, die Präsenz der jeweiligen Schwefelverbindungen (Tabelle 3).

Die anfängliche Vermutung, dass Schwefeldioxid in der beschriebenen Reaktion eine Doppelfunktion als Lösungs- und als Oxidationsmittel zukommt, konnte somit durch zwei voneinander unabhängige Analysemethoden bestätigt werden.

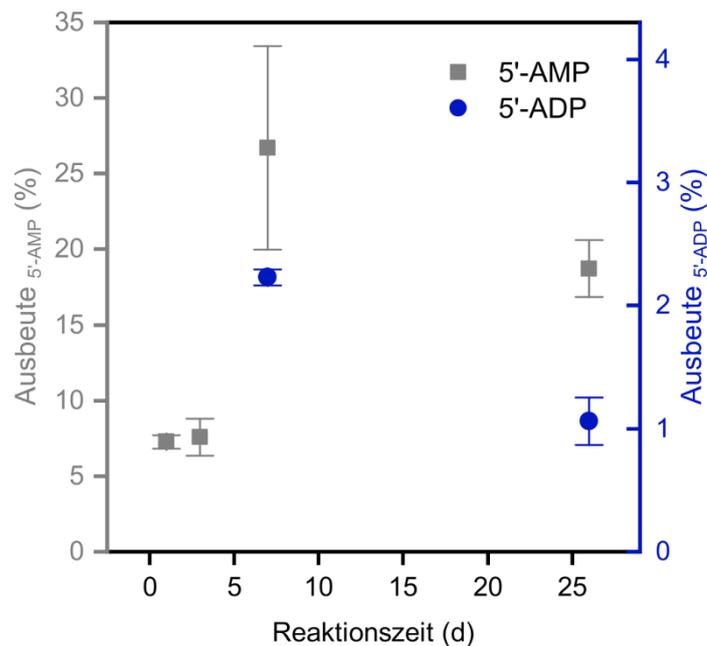
**Tabelle 3:** Übersicht über die nach direkter Injektion massenspektrometrisch detektierten Schwefelverbindungen der Reaktion von Adenosin (100 mM) mit Phosphonsäure und Harnstoff (je 3.00 Äq.) nach 7 d. Bezogen auf die anfängliche Adenosinkonzentration wurde die Probe auf eine Konzentration von 1 mM verdünnt. Gewählte Messbedingungen: *m/z* 95-1425, Auflösung 140000, Sprayspannung -4.0 kV, Kapillartemperatur 320 °C, S-lens RF Wert 50.

Analyt		<i>m/z</i> <sub>(berechnet)</sub>	<i>m/z</i> <sub>(gefunden)</sub>	Relative Intensität Isotopensignal (%)
Thiosulfat	H <sup>32</sup> S <sup>32</sup> SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	112.9372	112.9372	
	H <sup>32</sup> S <sup>34</sup> SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	114.9330	114.9329	8.5
Dithionit	H <sup>32</sup> S <sup>32</sup> SO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	128.9321	128.9318	
	H <sup>32</sup> S <sup>34</sup> SO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	130.9279	130.9273	7.3
Sulfat	H <sup>32</sup> SO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	96.9601	96.9601	
	H <sup>34</sup> SO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	98.9559	98.9559	4.4

### Untersuchung möglicher Reaktionspfade

Abschließend wurden am Beispiel von Adenosin mögliche Pfade zu Produkten untersucht. Hierfür wurde zunächst die Phosphorylierung des Substrates in Abhängigkeit der Reaktionszeit betrachtet. Bereits nach Ablauf eines Tages hatten sich zusätzlich zu monophosphorylierten Produkten (5'-, 3'- und 2'-AMP, A-p<sup>III</sup> und cAMP) auch diphosphorylierte Verbindungen (ADP, A-p<sup>III</sup>-p<sup>III</sup>/p<sup>III</sup>-A-p<sup>III</sup>, A-p<sup>V</sup>-p<sup>III</sup>/p<sup>III</sup>-A-p<sup>V</sup>, p<sup>V</sup>-A-cp<sup>V</sup>/A-cp<sup>V</sup>-p<sup>V</sup>), Diadenosinphosphat (A-p<sup>V</sup>-A) und sogar Dinukleotide (p<sup>V</sup>-A-p<sup>V</sup>-A/ A-p<sup>V</sup>-p<sup>V</sup>-A, p<sup>III</sup>-A-p<sup>V</sup>-A/ A-p<sup>III</sup>-p<sup>V</sup>-A) gebildet (Tabelle 73 auf s.152). Die innerhalb eines Tages erzielte 5'-AMP-Ausbeute von 7.3% wuchs nach Ablauf von sieben Tagen auf 26.7% an (Abbildung 46). ADP konnte zwar bereits nach einem Tag qualitativ nachgewiesen werden, die 5'-ADP-Konzentration war je-

doch erst nach einer Woche hoch genug für eine Ausbeutebestimmung. Ebenfalls nach Ablauf einer Woche konnte ATP detektiert werden. Der Trend der ersten Reaktionstage setzte sich jedoch nicht über einen größeren Reaktionszeitraum von 26 d fort. Neben einem Abfall der Ausbeuten in Abbildung 46 ist auch eine Verkleinerung der Produktpalette zu beobachten. Im Vergleich zu den kürzeren Reaktionszeiten fehlen nach Ablauf von 26 d die Phosphor(III)-basierten Produkte  $p^{III}\text{-A-p}^V\text{-A}$ /  $\text{A-p}^V\text{-p}^{III}\text{-A}$  und  $\text{A-p}^{III}\text{-p}^{III}$ /  $p^{III}\text{-A-p}^{III}$ . Als Ursache für beide Beobachtungen muss, die in Konkurrenz zur Kondensation stehende Hydrolyse in Betracht gezogen werden. Im Fall der Phosphor(III)-Produkte erscheint darüber hinaus auch die fortschreitende Oxidation zu den entsprechenden Phosphor(V)-Analoga plausibel.



**Abbildung 46:** 5'-AMP- und 5'-ADP-Ausbeuten ausgehend von Adenosin (100 mM), Phosphonsäure (3.00 Äq.) und Harnstoff (1.00 Äq.) in Abhängigkeit der Reaktionszeit. Als Fehler ist die Standardabweichung aus zwei Messungen abgebildet.

Aufgrund der Vielzahl beobachteter Phosphor(III)-basierter Produkte in den ersten Reaktionstagen wird vermutet, dass Adenosin zunächst unter Abspaltung von Wasser mit der Phosphonsäure reagiert und das Kondensationsprodukt im Anschluss oxidiert wird. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurde die Phosphorylierung von Adenosin mit Phosphorsäure in An- und in Abwesenheit von Harnstoff im Verhältnis 1:1:1 getestet. Die Bildung von lediglich AMP-Spuren steht im Einklang mit der obigen Hypothese (Tabelle 74 auf s. 153), dass Adenosin erst mit Phosphonsäure kondensiert und anschließend eine Oxidation von Phosphor(III) zu Phosphor(V) stattfindet. Darüber hinaus zeigten Reaktionen mit äquimolaren Konzentrationen Diammoniumhydrogenphosphat ( $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ) sowie der Natriumsalze der aktivierten Polyphosphate Pyrophosphat ( $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7$ ) und Trimetaphosphat ( $\text{Na}_3\text{P}_3\text{O}_9$ ) keinerlei Produktbildung. In Gegenwart von Dinatriumhydrogenphosphit ( $\text{Na}_2\text{HPO}_3$ ) konnten hingegen AMP-Spuren beobachtet werden. Die im Vergleich zu den

Umsetzungen mit den entsprechenden freien Säuren verminderte Produktbildung könnte der negativen Ladung in unmittelbarer Nachbarschaft zum elektrophilen Zentrum geschuldet sein. Diese hat einen negativen Einfluss auf die Geschwindigkeit des nukleophilen Angriffs am Phosphorzentrum.<sup>[32, 356, 412]</sup> Eine andere Erklärung für die geringe Reaktivität der getesteten Phosphorverbindungen könnte aber auch deren möglicherweise schlechte Löslichkeit im aprotischen Lösungsmittel darstellen.<sup>[143, 413]</sup> Auch die phosphorylierten Produkte 5'-AMP und 5'-ADP weisen in Abwesenheit von Phosphonsäure eine geringe Reaktivität auf. So konnten ausgehend von einer Mischung äquimolarer Mengen Adenosin, 5'-AMP und Harnstoff keine weiteren phosphorylierten Verbindungen beobachtet werden. Ein analoges Experiment mit 5'-ADP lieferte vor allem das Hydrolyseprodukt 5'-AMP (3.4%). Zusätzlich konnte, vermutlich in Folge von Phosphattransfer, 5'-ATP detektiert werden. Wird 5'-AMP (100 mM) jedoch als Substrat der Reaktion mit Phosphonsäure (3.00 Äq.) in Gegenwart von Harnstoff (1.00 Äq.) eingesetzt, so konnte A-p<sup>V</sup>-p<sup>III</sup>/p<sup>III</sup>-A-p<sup>V</sup> beobachtet werden (Tabelle 73 auf s. 152). Somit stellen Phosphor(III)-Kondensationsprodukte auch die Intermediate der Phosphorylierung von Nukleotiden dar. Anschließende Oxidation führt zu verschiedenen ADP-Isomeren. Darüber hinaus konnte auch die Bildung von ATP-Isomeren festgestellt werden. Die kapillarelektrophoretische Auftrennung der Produktmischung zeigt außerdem, dass unter den Reaktionsbedingungen keine isomeren Monophosphate gebildet wurden. Ein Vergleich der Ausbeuten 5'-substituierter Produkte, die mit derselben Anzahl an Kondensationsschritten erzielt wurden, veranschaulicht die Überlegenheit der Reaktion ausgehend von Adenosin (Tabelle 4).

**Tabelle 4:** Produktausbeuten der Phosphorylierung verschiedener Adenosin-basierter Substrate (100 mM) in Gegenwart von Phosphonsäure (3.00 Äq.) und Harnstoff (1.00 Äq.) nach 7 d. Als Fehler ist die Standardabweichung aus zwei Messungen angegeben.

	5'-AMP	5'-ADP	5'-ATP
A	(26.7 ± 6.7)%	(2.2 ± 0.1)%	Spuren <sup>a</sup>
5'-AMP	-	(2.0 ± 0.3)%	(0.4 ± 0.2)% <sup>b</sup>
5'-ADP	(68.8 ± 3.7)%	-	(1.1 ± 0.1)% <sup>b</sup>

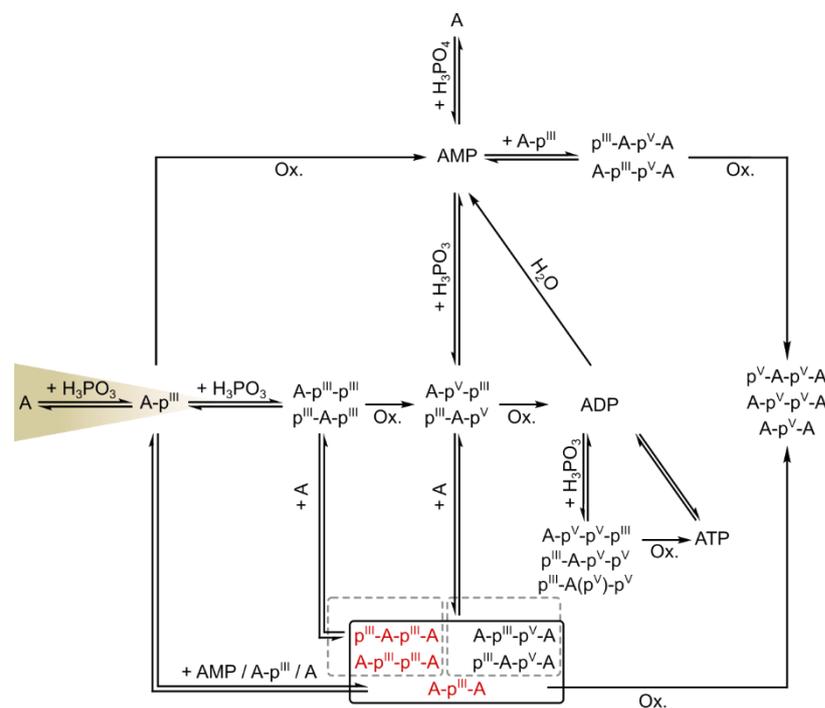
<sup>a</sup> Die Konstitution der ATP-Isomere wurde nicht bestimmt.

<sup>b</sup> Die minimal quantifizierbare 5'-ATP-Konzentration betrug 2.5 µM.

Auch in der Phosphorylierungsreaktion von 5'-ADP konnte A-p<sup>V</sup>-p<sup>III</sup>/p<sup>III</sup>-A-p<sup>V</sup> detektiert werden. Es wird angenommen, dass dieses durch Kondensation des in hohem Maße auftretenden Hydrolyseproduktes von 5'-ADP, 5'-AMP, mit Phosphonsäure gebildet wird. Auf diese Weise kommt es zur Isomerisierung von 5'-ADP, die anhand mehrerer Signale in der entsprechenden Massenspur zu beobachten ist. Ausgehend von den verschiedenen ADP-Isomeren sowie auch vom Hydrolyseprodukt 5'-AMP kann durch Kondensations- und Oxidationsschritte die Bildung von ATP erreicht werden. Als Intermediat wurde hierbei Phos-

phor(III), Phosphor(V) gemischtes triphosphoryliertes Adenosin ( $A\text{-p}^{\text{V}}\text{-p}^{\text{V}}\text{-p}^{\text{III}}$  /  $p^{\text{III}}\text{-A-p}^{\text{V}}\text{-p}^{\text{V}}$  /  $p^{\text{III}}\text{-A(p}^{\text{V}}\text{)-p}^{\text{V}}$ ) detektiert. Abbildung 47 gibt einen Überblick über die beschriebenen möglichen Reaktionspfade. In Rot dargestellte Verbindungen konnten nicht detektiert werden.

Als Fazit kann festgehalten werden, dass es initial zur Kondensation des Substrates mit der Phosphonsäure kommt. Organophosphate werden anschließend oxidativ aus den Phosphonat-Intermediaten erhalten. Während Kondensationsschritte reversibel sind, zeichnet sich der anschließende Oxidationsschritt in Folge der Redox-Eigenschaften von Schwefeldioxid durch seine Irreversibilität aus. Lebende Systeme werden unter anderem durch ihre Stoffwechselaktivität charakterisiert.<sup>[7]</sup> Hierfür ist nicht nur die Bildung von Organophosphaten, sondern auch deren Abbau sowie Isomerisierung, wie sie unter den beschriebenen Reaktionsbedingungen beobachtet werden kann, unabdingbar.<sup>[19, 118]</sup>



**Abbildung 47:** Mögliche Reaktionspfade der Phosphorylierung in flüssigem Schwefeldioxid. Da die Konstitution der Produkte nicht bestimmt wurde, beziehen sich die Benennungen auf die Gesamtheit der gebildeten Isomere. *m/z* Wert gefunden: schwarz; *m/z* Wert nicht gefunden: rot. Kästen grenzen ein, welche Produkte auf welchem Weg entstehen könnten. Auf die Darstellung der inversen Reaktionsabfolge für die Umsetzung von  $A\text{-p}^{\text{V}}\text{-p}^{\text{III}}$  /  $p^{\text{III}}\text{-A-p}^{\text{V}}$  zu  $A\text{-p}^{\text{V}}\text{-p}^{\text{V}}\text{-p}^{\text{III}}$  /  $p^{\text{III}}\text{-A-p}^{\text{V}}\text{-p}^{\text{V}}$  /  $p^{\text{III}}\text{-A(p}^{\text{V}}\text{)-p}^{\text{V}}$  wurde zur Vereinfachung der Abbildung verzichtet. Das entsprechende Intermediat  $A\text{-p}^{\text{V}}\text{-p}^{\text{III}}\text{-p}^{\text{III}}$  /  $p^{\text{III}}\text{-A-p}^{\text{V}}\text{-p}^{\text{III}}$  /  $p^{\text{III}}\text{-A(p}^{\text{V}}\text{)-p}^{\text{III}}$  konnte nicht beobachtet werden.

Die Untersuchung und Optimierung der Phosphorylierungsreaktion mit Phosphonsäure in flüssigem Schwefeldioxid zeigt, dass bei milden Temperaturen eine robuste Umsetzung zu phosphonat- und phosphathaltigen Produkten erreicht werden kann. Gute Adenosinmonophosphatausbeuten können bereits in einem Reaktionsschritt erzielt werden. Neben der kurzen Reaktionssequenz ermöglicht das redox-aktive Reaktionsmedium die unmittelbare Bildung dimerer Produkte, da die entsprechenden *H*-Phosphonatdiester-Vorläufer oxidativ vor Hydrolyse geschützt werden.<sup>[355-356]</sup> Somit kann auf zusätzliche Oxidations- bzw. De-

sulfurierungsschritte verzichtet werden. Diese sowie auch erhöhte Temperaturen sind in literaturbekannten Phosphorylierungen mit Phosphor(III)-Reagenzien unabdingbar, um Organophosphate zu erhalten.<sup>[124, 355, 358]</sup>

#### 4.2.2 Phosphorylierung der kanonischen Nucleoside

Im Anschluss an die Untersuchung und Optimierung der Phosphorylierungsreaktion am Beispiel des Modellsubstrates Adenosin, wurde die Kompatibilität der Umsetzung mit den anderen kanonischen Nucleosiden überprüft. Die Phosphorylierung der Ribonucleoside unter den optimierten Reaktionsbedingungen (3.00 Äq. Phosphonsäure, 1.00 Äq. Harnstoff) lieferte für die Substrate Cytidin (C) und Uridin gute 5'-NMP- und 5'-NDP-Ausbeuten in der gleichen Größenordnung wie sie bereits für das Modellsubstrat Adenosin beschrieben wurden (Tabelle 5). Die 5'-Guanosinmonophosphat- (5'-GMP) Ausbeute beträgt hingegen lediglich ein Drittel bis ein Viertel der anderen 5'-NMP-Ausbeuten. Die minimal quantifizierbare Konzentration der phosphorylierten Produkte betrug jeweils 3 µM. Des Weiteren konnte zwar unter mehreren anwesenden Isomeren 5'-Guanosindiphosphat durch Ko-Injektion mit einer Referenz identifiziert werden, aufgrund der niedrigen Konzentration war dessen Quantifizierung jedoch nicht möglich.

**Tabelle 5:** Produktausbeuten der Phosphorylierung verschiedener Ribonucleoside (100 mM) mit Phosphonsäure (3.00 Äq.) in Gegenwart von Harnstoff (1.00 Äq.) nach 7 d. Als Fehler ist die Standardabweichung aus zwei Messungen angegeben.

	5'-NMP	5'-NDP	NTP
Adenosin	(26.7 ± 6.7)%	(2.2 ± 0.1)%	Spuren
Cytidin	(23.2 ± 2.4)%	(3.0 ± 0.3)%	Spuren
Guanosin	(7.1 ± 1.6)%	Spuren	Spuren
Uridin	(29.6 ± 2.5)%	(1.5 ± 0.0)%	Spuren

Ein ähnlicher Trend konnte für die Produktspektren ausgemacht werden. In den Reaktionen mit Cytidin und Uridin konnten breite Produktpaletten erhalten werden. In diesen sind zwar im Gegensatz zur Phosphorylierung von Adenosin unter optimierten Bedingungen N-p<sup>V</sup>-N Verbindungen abwesend, dafür wurden neben den entsprechenden Analoga der anderen Produkte zusätzliche triphosphorylierte Verbindungen beobachtet. So enthalten die Produktspektren der beiden Pyrimidin-basierten Nucleoside gemischte Phosphor(III), Phosphor(V) triphosphorylierte Spezies (N-p<sup>V</sup>-p<sup>V</sup>-p<sup>III</sup>/ p<sup>III</sup>-N-p<sup>V</sup>-p<sup>V</sup>/ p<sup>III</sup>-N(p<sup>V</sup>)-p<sup>V</sup>). Darüber hinaus wird die Produktmischung der Cytidin-basierten Reaktion durch gemischte (α-)zyklische triphosphorylierte Verbindungen (p<sup>V</sup>-p<sup>V</sup>-C-cp<sup>V</sup>/ p<sup>V</sup>-C-cp<sup>V</sup>-p<sup>V</sup> und p<sup>III</sup>-p<sup>V</sup>-C-cp<sup>V</sup>/ p<sup>III</sup>-C-cp<sup>V</sup>-p<sup>V</sup>/ p<sup>V</sup>-p<sup>V</sup>-C-cp<sup>III</sup>) komplettiert (siehe auch Tabelle 85 auf s. 166). Im Vergleich dazu wurde mit Guanosin (G) als Substrat ein kleineres Produktspektrum erzielt. Zwar konnte G-p<sup>V</sup>-G de-

tektiert werden, jedoch sind im Gegensatz zu den Phosphorylierungen der Pyrimidin-Nukleoside cNMP, Phosphor(III), Phosphor(V) gemischte Dinukleotide und Phosphor(III), Phosphor(V) gemischte triphosphorylierte Verbindungen abwesend. Die Massenspuren der reinen Phosphor(V)-Dinukleotide zeigten jeweils ein separates Signal und zusätzlich bei höheren Migrationszeiten mehrere überlagernde Signale. Analog zur Reaktion mit Adenosin konnten im Fall von Cytidin und Uridin in MS/MS-Experimenten des separaten Signals sowie auch der überlagernden Signale Fragmente detektiert werden, die sowohl Phosphat- als auch Pyrophosphat-verknüpften Konstitutionsisomeren zuordenbar sind. Fragmente, wie  $[M-H-HPO_3]^-$ , die charakteristisch für das Phosphat-verbrückte Produkt sind, konnten hingegen nur für die langsamer migrierenden, überlagernden Signale beobachtet werden. Aus diesem Grund wird angenommen, dass das diskrete, schneller eluierende Signal pyrophosphathaltigen Produkten ( $N-p^V-p^V-N$ ) zugeordnet werden kann. Die langsamer migrierenden, überlagernden Signale sind auf Verbindungen mit Phosphat-Linker ( $p^V-N-p^V-N$ ) zurückzuführen. Abbildung 82-85 ab s. 162 zeigen die entsprechenden MS/MS-Spektren. Die geringe Intensität der Signale der Guanosin-basierten Dinukleotide verhinderte die Aufzeichnung von MS/MS-Spektren und somit auch die Analyse der Phosphatverknüpfungen.

Unterschiedliche Reaktivitäten konnten bei der Phosphorylierung der Desoxyanaloga für die Purin- und Pyrimidin-Nukleoside festgestellt werden. Während ausgehend von den Purin-Nukleosiden lediglich NMP- sowie  $N-p^{III}$ -Spuren detektiert werden konnten, lieferten die Kondensationsreaktionen ausgehend von den Pyrimidin-Nukleosiden die höchsten 5'-Mono- und Diphosphatausbeuten (Tabelle 6). Mit verantwortlich für letztere Beobachtung könnte die im Vergleich zu den Ribonukleotiden geringere Anzahl zugänglicher Regioisomere sein. Die minimal quantifizierbare Konzentration lag für 5'-Desoxycytidinmonophosphat (5'-dCMP) sowie für 5'-Desoxythymidinmonophosphat (5'-dTMP) bei  $5 \mu M$  und für 5'-Desoxythymidindiphosphat (5'-dTDP) bei  $3.2 \mu M$ .

Die Produktspektren der Reaktion mit Desoxycytidin (dC) und Desoxythymidin (dT) zeigen eine hohe Übereinstimmung mit den Produktmischungen der Ribonukleoside (siehe Tabelle 85 auf s. 166). Auffällig ist vor allem, dass im Gegensatz zu den Umsetzungen der Ribonukleoside eine geringere Vielfalt diphosphorylierter Produkte erhalten wurde. So konnten weder mit Desoxycytidin noch mit -thymidin  $N-p^{III}-p^{III}/p^{III}-N-p^{III}$  und  $N-cp^V-p^V$  erhalten werden. Das  $p^V-N-cp^V$ -Isomer des letztgenannten Produktes kann bedingt durch die Desoxyfunktionalität der Edukte von vorneherein ausgeschlossen werden.

Eine weitere Gemeinsamkeit mit den Produktmischungen der Ribonukleosidversuche stellt das Auftreten eines separaten Signals sowie zusätzlich mehrerer überlagernder Signale in der Massenspur der Phosphor(V)-basierten Dinukleotide dar. Auch im Fall von Desoxycy-

tidin und -thymidin zeigen MS/MS-Spektren des separaten Signals sowie der Signalgruppe Fragmente, die sowohl für Pyrophosphat- als auch für Phosphat-verbrückte Produkte charakteristisch sind. Dementgegen konnten für das Phosphat-verbrückte Konstitutionsisomer charakteristische  $[M-H-HPO_3]^-$  Fragmente lediglich in MS/MS-Experimenten der langsamer migrierenden, überlagernden Signale detektiert werden (siehe Abbildung 86-89 ab s. 164). Infolgedessen wird angenommen, dass das schneller migrierende Signal auch im Fall der Desoxynukleotide auf pyrophosphathaltige Konstitutionsisomere zurückzuführen ist. Die später eluierenden überlagernden Signale werden Phosphat-verbrückten Verbindungen zugeordnet.

**Tabelle 6:** Produktausbeuten der Phosphorylierung verschiedener Desoxyribonukleoside (100 mM) mit Phosphonsäure (3.00 Äq.) in Gegenwart von Harnstoff (1.00 Äq.) nach 7 d. Als Fehler ist die Standardabweichung aus zwei Messungen angegeben.

	5'-dNMP	5'-dNDP	dNTP
Desoxyadenosin	Spuren <sup>a</sup>	-	-
Desoxycytidin	(32.6 ± 5.5)%	nicht bestimmt <sup>b</sup>	Spuren <sup>c</sup>
Desoxyguanosin	Spuren <sup>a</sup>	-	-
Desoxythymidin	(31.7 ± 9.4)%	(3.6 ± 0.2)%	Spuren <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Die Konstitution des dNMP-Isomers wurde nicht bestimmt.

<sup>b</sup> Ko-Injektion mit 5'-dCDP bestätigte die Bildung des 5'-Isomers. Zusätzlich ist mindestens ein weiteres Isomer anwesend.

<sup>c</sup> Das 5'-dNTP-Isomer konnte durch Ko-Injektion einer Referenz identifiziert werden. Zusätzlich sind weitere Isomere anwesend.

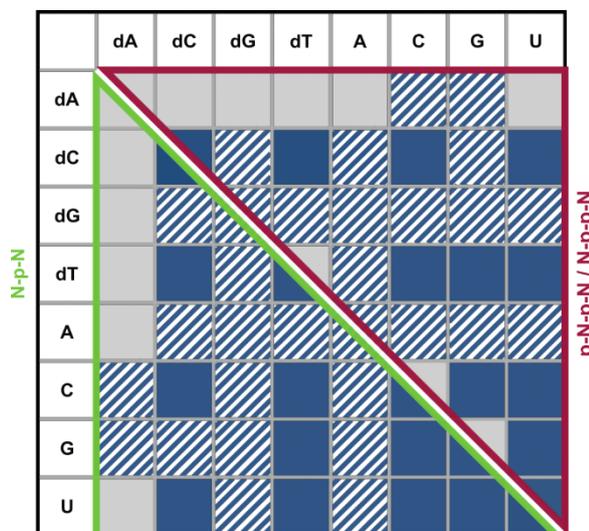
In den Phosphorylierungsreaktionen ausgehend von Adenosin, Cytidin, Uridin, Guanosin und Desoxythymidin konnte zusätzlich die Bildung schwefelhaltiger Nebenprodukte beobachtet werden. So konnten *via* CE-MS-Analyse Thiophosphonate bzw. Thiophosphate (N-p<sup>III</sup>(S) und bzw. oder N-p<sup>V</sup>-p<sup>III</sup>(S)/ p<sup>III</sup>-N-p<sup>V</sup>(S)/ p<sup>V</sup>-N-p<sup>III</sup>(S)) detektiert werden. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit Studien von LÖNNBERG, in denen *H*-Phosphonatdiester in Gegenwart von elementarem Schwefel oxidativ in Thiophosphate und *H*-Phosphonatmonoester in Thiophosphonate überführt werden.<sup>[358-359]</sup>

Es kann zusammengefasst werden, dass alle kanonischen Nukleoside in flüssigem Schwefeldioxid in Gegenwart von Phosphonsäure phosphoryliert werden konnten. Je nach Substrat konnten allerdings große Unterschiede bezüglich der Ausbeute, des Produktspektrums sowie der Kettenlänge der Produkte beobachtet werden.

### 4.2.3 Phosphorylierung einer Nukleosidmischung

Als Nächstes wurde in Analogie zur Eisen-vermittelten Peptidbildung untersucht, ob der beschriebene Reaktionspfad auf ein aus präbiotischer Sicht denkbare, komplexes Szenario

rio anwendbar ist. Zu diesem Zweck wurde eine Mischung der kanonischen Nucleoside erstellt, welche anschließend unter den optimierten Reaktionsbedingungen in flüssigem Schwefeldioxid mit Phosphonsäure umgesetzt wurde. Die resultierende Produktmischung wurde zunächst kapillarelektrophoretisch aufgetrennt. Im Anschluss an die Separation der Probenbestandteile konnten massenspektrometrisch Signale vieler N-p<sup>V</sup>-N und p<sup>V</sup>-N-p<sup>V</sup>-N/ N-p<sup>V</sup>-p<sup>V</sup>-N detektiert werden (Abbildung 48). Eine eindeutige Identifikation der Nucleosidbausteine war für die überwiegende Zahl der Desoxycytidin-, Desoxythymidin-, Cytidin-, Guanodin- und Uridin-basierten Dimere anhand des für das jeweilige Nucleosidpaar charakteristischen *m/z* Wertes möglich. Für die verbleibenden Produkte, die *m/z* Werte aufweisen, die mehreren Dimeren zuordenbar sind, konnte keine Aussage bezüglich der Nucleosidbausteine getroffen werden, da aufgrund der niedrigen Konzentrationen keine aussagekräftigen MS/MS-Spektren erhalten werden konnten.



**Abbildung 48:** Produktspektrum der Phosphorylierung einer Nucleosid-Mischung (A, C, G, U, dA, dG, dC, dT) (je 25 mM, insgesamt 1.00 Äq.) mit Phosphonsäure (3.00 Äq.) in Gegenwart von Harnstoff (1.00 Äq.) nach 7 d. ■ via CE-MS detektiert, ■ nicht detektiert, ▨ der detektierte *m/z* Wert des Produktes kann auf verschiedene Nucleosidpaarungen zurückgeführt werden, weshalb das Signal nicht eindeutig einer Kombination von Nucleosidbausteinen zugewiesen werden konnte. Die Massenspuren wurden mit einer Abweichung von 5 ppm extrahiert

Die Massenspuren der Dinucleotidprodukte (p<sup>V</sup>-N-p<sup>V</sup>-N/ N-p<sup>V</sup>-p<sup>V</sup>-N) beinhalteten jeweils zwei Signalgruppen. Zwar konnten keine aussagekräftigen MS/MS-Spektren der Dinucleotidsignale erhalten werden, das beobachtete Signalmuster steht jedoch im Einklang mit denen analoger Produkte der Versuche der einzelnen Nucleoside, weshalb vermutet wird, dass es sich um die jeweiligen Pyrophosphat- und Phosphat-verbrückten Konstitutionsisomere handelt.

Auch die im Vergleich zu (Desoxy-)Cytidin, Desoxythymidin, Guanodin und Uridin geringe Reaktivität von Desoxyadenosin (dA) stimmt mit den Ergebnissen der Umsetzungen der isolierten Nucleoside überein. So waren lediglich in zwei der betreffenden Massenspuren

Signale auszumachen. Hierbei muss jedoch bedacht werden, dass diese neben den dime-  
ren Produkten von Desoxyadenosin mit Cytidin und Guanosin auch auf andere Nukleosid-  
kombinationen zurückzuführen sein könnten. In Frage kommen für erstgenannten  $m/z$  Wert  
folgende Paarungen: Adenosin-Desoxycytidin und Desoxyguanosin (dG)-Desoxycytidin  
sowie für letztgenannten: Adenosin-Desoxyguanosin, Desoxyguanosin-Desoxyguanosin,  
Adenosin-Adenosin. Die Reaktivität von Desoxyadenosin kann im Vergleich zu dessen Ri-  
bonukleosidanalogen sowie Desoxyguanosin aus oben genannten Gründen nicht bewertet  
werden.

Nukleotidstränge, die eine Mischung von RNA- und DNA-Bausteinen beinhalten, bilden in  
Folge von Rückgratinhomogenität, bedingt durch verschiedene Zuckerkonformationen,  
Doppelhelices geringerer Stabilität aus als Einzelstränge, die aus Nukleosiden eines Zu-  
ckers aufgebaut sind.<sup>[414]</sup> Dies kann sich, wie auch die Anwesenheit nicht-kanonischer Ver-  
knüpfungen, positiv auf die Templat-basierte Replikation auswirken, da im Vergleich zu ei-  
nem kanonischen Templat schwächere Wechselwirkungen mit dem Substrat eingegangen  
werden und so eine Inhibition vereitelt werden kann.<sup>[414-415]</sup>

Ein weiteres Charakteristikum der gemischten Einzelstränge stellt die bevorzugte Bindung  
homogener Polymere dar.<sup>[415]</sup> Darüber hinaus nehmen KRISHNAMURTHY *et al.* an, dass die  
Information der Nukleobasenabfolge gemischter Stränge vererbt werden kann.<sup>[415]</sup> In einer  
hypothetischen heterogenen Welt, welche als Gegenentwurf zu einer homogenen RNA-  
Welt im Gespräch ist,<sup>[16-17, 186]</sup> koexistieren RNA und DNA.<sup>[186]</sup> Ohne selektive Prozesse ist  
in einer solchen Welt die Anwesenheit gemischter Nukleotidstränge vorstellbar.<sup>[414]</sup>  
KRISHNAMURTHY *et al.* schlagen basierend auf dem beobachteten Verhalten gemischter  
Nukleotidstränge in Replikationsvorgängen eine sukzessive Akkumulation homogener Ver-  
bindungen ausgehend von heterogenen Templaten vor.<sup>[414]</sup> In analoger Weise könnten die  
im Rahmen der beschriebenen Umsetzung einer Nukleosidmischung beobachteten ge-  
mischten Dimere in den präbiotischen Kontext eingeordnet werden.

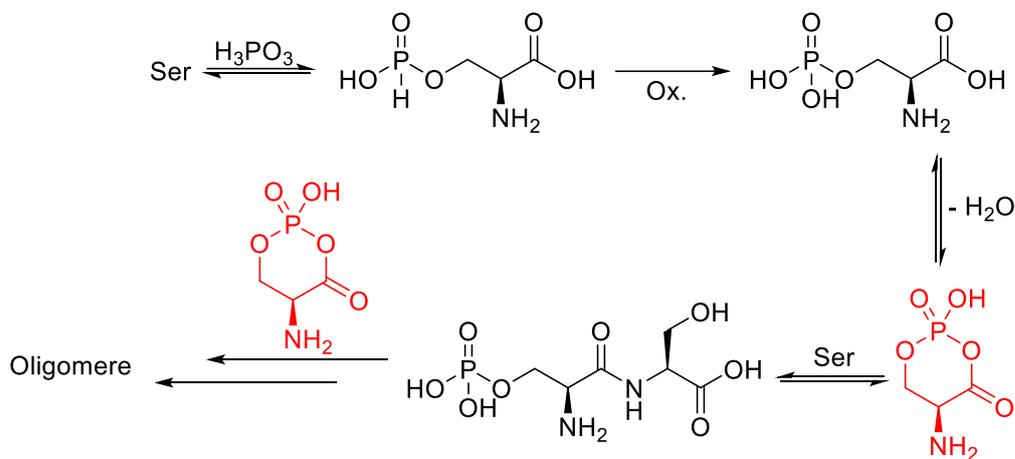
#### 4.2.4 Phosphorylierung anderer präbiotisch relevanter Substrate

Abgesehen von den bisher untersuchten Nukleotiden spielen in lebenden Organismen  
phosphorylierte Derivate von Carbon- und Aminosäuren, Zuckern sowie Alkoholen eine be-  
deutende Rolle als Stoffwechselbestandteile oder bei der Bildung von Amphiphilen.<sup>[416-417]</sup>  
Aus diesem Grund wurde untersucht, ob der beschriebene Reaktionspfad mit Substraten  
dieser Stoffklassen vereinbar ist. Hierzu wurde die Phosphorylierung ausgewählter Stell-  
vertreter der verschiedenen Stoffklassen unter den am Beispiel von Adenosin optimierten  
Reaktionsbedingungen getestet. Die Auswahl der getesteten Substrate umfasste folgende

Verbindungen: Glycerin (GL), Glyceraldehyd (GCA), D-Ribose (Rib), L-Lactat (Lc), L-Serin (Ser).

Mit Ausnahme der Reaktion mit Ribose konnten mit einem Überschuss an Phosphonsäure (3.00 Äq.) und in Gegenwart von Harnstoff (1.00 Äq.) nach Ablauf von sieben Tagen *H*-Monophosphonatprodukte (R-p<sup>III</sup>) sämtlicher Substrate erhalten werden (siehe auch Tabelle 86 auf s. 167). Somit kann angenommen werden, dass die Phosphorylierung nicht nur im Fall der Nukleosidsubstrate durch einen initialen Kondensationsschritt mit der Phosphonsäure eingeleitet wird. Oxidation der *H*-Phosphonate durch das Reaktionsmedium führte anschließend zur Bildung azyklischer Monophosphate (R-p<sup>V</sup>) sämtlicher getesteten Substrate. Hierbei konnten durch Ko-Injektion mit den entsprechenden Referenzsubstanzen folgende Konstitutionsisomere eindeutig identifiziert werden: Glycerin-1- und Glycerin-2-phosphat, Ribose-5-phosphat und *O*-Phosphoserin. Die Massenspur des Ribosemonophosphates wies jedoch weitere Signale auf, was vermuten lässt, dass zusätzlich auch andere Isomere vorlagen. Dementgegen konnten zyklische Monophosphatprodukte (R-cp<sup>V</sup>) lediglich ausgehend von Glycerin und Lactat beobachtet werden. Zusätzlich zu den monomeren Verbindungen konnten in den Reaktionen mit Glycerin, Glyceraldehyd, Lactat und Serin auch monophosphorhaltige Substratdimere beobachtet werden. Mit Ausnahme von Glyceraldehyd, ausgehend von welchem das *H*-Phosphonat-verbrückte Dimer des Substrates (GCA-p<sup>III</sup>-GCA) detektiert werden konnte, handelt es sich jedoch um phosphathaltige Dimere der Substrate. Eine weitere Besonderheit der Umsetzung von Glyceraldehyd unter den gewählten Bedingungen ist, dass neben der Phosphonsäure auch das Substrat als Reduktionsmittel agiert, sodass Spuren von Glycerinsäure erhalten wurden. Dimere Verbindungen, wie p<sup>V</sup>-R-p<sup>V</sup>-R/ R-p<sup>V</sup>-p<sup>V</sup>-R konnten alleinig bei der Phosphorylierung von Glycerin und Serin ausgemacht werden. Da Phosphate als Kondensationsreagenzien Peptidbildung begünstigen können,<sup>[133, 224-227]</sup> ist für letztgenanntes Substrat neben der Bildung der bereits genannten Konstitutionsisomere auch die Entstehung isomerer diphosphorylierter Dipeptide vorstellbar. Analoges gilt auch für die Konstitution des monophosphorylierten Substratdimers. Eine Analyse der Reaktionsmischung auf Selbstkondensationsprodukte der Aminosäure unterstützt diese Möglichkeit, da unter den gewählten Reaktionsbedingungen Diserin entsteht. In Kapitel 2 wurde die Trimetaphosphat-unterstützte Peptidbildung über Aminosäure-*N*-Triphosphat- und zyklische Acylphosphoramidat-Zwischenstufen oder alternativ über lineare Acylphosphat-Intermediate beschrieben.<sup>[208, 225, 228]</sup> Da bei der Phosphorylierung in Schwefeldioxid jedoch *O*-Phosphoserin als einziges monophosphoryliertes Produkt mit einer Serineinheit detektiert wurde, wurde ein geringfügig modifizierter Mechanismus für die Bildung von Serin-basierten Peptiden vorgeschlagen. Eingangs kommt es zur Kondensation der Hydroxylgruppe der Serin-Seitenkette mit Phosphonsäure (Abbildung 49). Oxidation des *H*-Phosphonates und intramolekulare Kondensation des resultierenden

Phosphates könnten zur Bildung eines zyklischen Intermediates führen. Anschließend Ringöffnung in Folge des nukleophilen Angriffs der Aminogruppe eines zweiten Serinmoleküls auf das Carbonylkohlenstoffatom könnte unter Ausbildung einer Amidbindung O-Phosphodiserin liefern. Die Bildung langkettiger Serin-Peptide ist durch den Angriff der Aminogruppe von O-Phosphodiserin oder auch längerer Analoga auf das Carbonylkohlenstoffatom des zyklischen Intermediates vorstellbar. Weitere Aminosäuren wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Während Aminosäuren mit nukleophilen Seitenketten, wie beispielsweise Threonin oder Tyrosin, mit dem vorgeschlagenen Mechanismus vereinbar sein sollten, ist dieser nicht auf Aminosäuren ohne eine solche anwendbar. Sollte mit diesen jedoch die Phosphorylierung der Amino- bzw. Carboxylgruppe möglich sein, so ist die Bildung von Peptiden über die von RABINOWITZ *et al.* beschriebenen Intermediate vorstellbar.<sup>[208, 225, 228]</sup>



**Abbildung 49:** Mechanismuvorschlag für die Bildung von Serinpeptiden in Gegenwart von Phosphonsäure in Anlehnung an RABINOWITZ *et al.* *m/z* Wert gefunden: schwarz; *m/z* Wert nicht gefunden: rot. Als längstes Peptid wurde Diserin detektiert.<sup>[225]</sup>

Die Umsetzung von Serin lieferte darüber hinaus bis zu triphosphorylierte Produkte mit einer Serineinheit. Gleiches konnte nur für die Phosphorylierung von Lactat beobachtet werden. Dementgegen wurden mit der Bildung eines Oligomers bestehend aus drei Substrat- sowie Phosphateinheiten ausgehend von Glycerin die meisten Kondensationschritte innerhalb eines Produktmoleküls erzielt.

Als Ergebnis kann die Vereinbarkeit des Reaktionspfades mit einem breiten Spektrum biochemisch relevanter Substrate, die verschiedenen Stoffklassen angehören, festgehalten werden. Hervorzuheben ist hierbei insbesondere die Bildung von Diserin. Präbiotische Reaktionen unterscheiden sich von zielgerichteten Laborsynthesen insofern, dass mit der Anwesenheit verschiedenster präbiotisch plausibler Verbindungen gerechnet werden muss. Infolgedessen ist die Toleranz der Reaktionspfade gegenüber anderen Substraten bzw. Reaktionsrouten zu verschiedenen biochemisch relevanten Verbindungen unabdingbar. Im

Fall der beschriebenen Reaktionsroute trifft dies zu: Serin wird nicht nur als Substrat der Phosphorylierungsreaktion toleriert, sondern gleichzeitig begünstigen die Reaktionsbedingungen dessen Eigenkondensation.



# Kapitel 5

---

**Zusammenfassung und Ausblick**



Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden im Kontext der präbiotischen Chemie Syntheserouten zu Peptiden und Organophosphaten in flüssigem Schwefeldioxid als hygroskopischem Lösungsmittel untersucht und entwickelt. Auf diese Weise wurden Kondensationsreaktionen realisiert, die in wässriger Lösung thermodynamisch unvorteilhaft sind. Zusätzlich wurde das präbiotische Szenario flüssiger Schwefeldioxidlösungen in Bezug auf Phosphorylierungsreaktionen getestet. Schwefeldioxid war auf der frühen Erde als Bestandteil vulkanischer Ausgasungen verfügbar. Unter den für das Hadaikum diskutierten Atmosphärendrücken könnte es bereits bei milden Temperaturen als flüssiges Reaktionsmedium zur Verfügung gestanden haben. Die Produktmischungen der Umsetzungen in flüssigem Schwefeldioxid wurden kapillarelektrophoretisch aufgetrennt und massenspektrometrisch sowie mithilfe verschiedener *on-column* Detektionsmethoden analysiert.

Der erste Abschnitt der Arbeit widmete sich Metall-vermittelten Peptidbildungsreaktionen in flüssigem Schwefeldioxid. Zunächst wurde eine Kupfer-vermittelte Aminosäurekondensation auf ihre Robustheit in Bezug auf die Variation der Reaktionsparameter untersucht. Eine quantitative Analyse der Dipeptidprodukte in einem Modellsystem bestehend aus Glycin und L-Alanin führte zur Beobachtung stabiler Ausbeuten über größere Konzentrationsbereiche der Reaktanden. Über einen längeren Reaktionszeitraum stiegen die Produktkonzentrationen an. Die erzielten Ausbeuten betragen nach 21 Tagen zwischen 1.7 und 4.1%. Bei der Bewertung von Reaktionspfaden im Kontext der präbiotischen Chemie spielt neben deren Robustheit auch die Verfügbarkeit der Reaktanden auf der frühen Erde eine entscheidende Rolle. Das eher geringe Kupfervorkommen im Hadaikum reduziert somit die präbiotische Plausibilität dieses Reaktionspfades. Aus diesem Grund wurde ein Reaktionspfad ausgehend von reduzierten Eisenverbindungen unter den vorteilhaften Bedingungen in flüssigem Schwefeldioxid entwickelt. Eisen war auf der frühen Erde reichlich vorhanden und die Koexistenz der entsprechenden reduzierten Verbindungen mit Eisen(III)-Spezies, auf die sich bisherige Studien zur Peptidbildung konzentrieren, ist unter anoxischen Bedingungen plausibel. Ausgehend von Glycin und L-Alanin konnte in Gegenwart von mit Essigsäure aktiviertem Eisenpulver Diglycin gebildet werden und so das Potenzial reduzierter Eisenverbindungen für die Peptidbildung gezeigt werden. Auf dieser Basis wurden anschließend die Reaktionsbedingungen optimiert. Dabei konnte festgestellt werden, dass sich die Anwesenheit von Harnstoff positiv auf die Produktbildung auswirkt. Neben einem Anstieg der Dipeptidkonzentrationen wurde auch eine Erweiterung des Produktspektrums um die weiteren Dipeptidkombinationen sowie mehrere Tripeptide beobachtet. Weiterhin wurde die Robustheit der Eisen-vermittelten Peptidbildung bezüglich der Reaktionsparameter untersucht. Bereits ausgehend von geringen Konzentrationen des Metalls wurden dabei Di- und Tripeptide gebildet. Darüber hinaus resultierte die Aktivierung von Eisen mit geringen Essigsäurekonzentrationen in maximalen Peptidkonzentrationen. Auch in Abwesenheit der

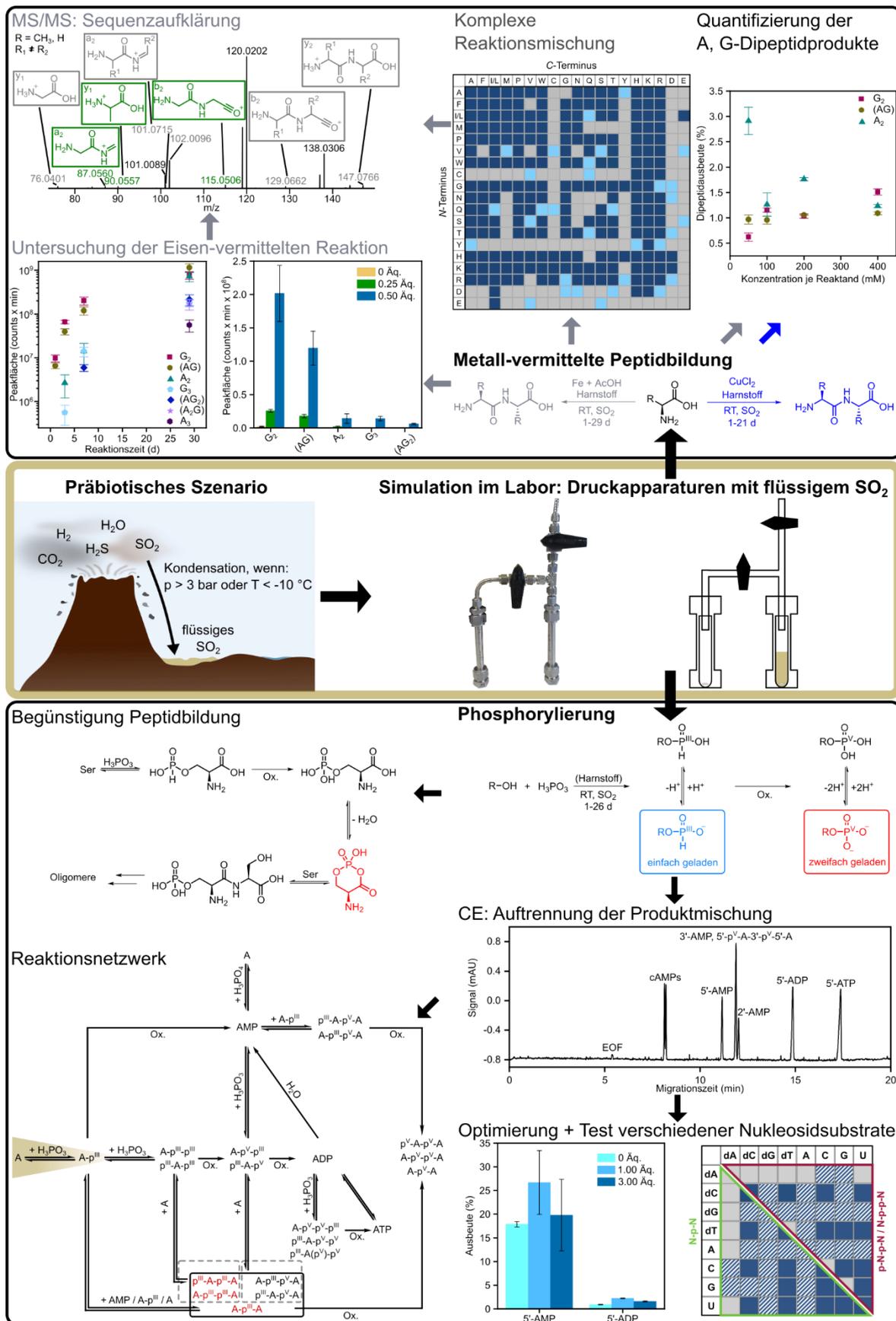
Essigsäure und somit ohne beschleunigte Eisenkorrosion konnte noch in geringem Maße Produktbildung beobachtet werden. Die Ursache hierfür kann neben der Eisenkorrosion durch die Aminosäuren oder durch das Reaktionsmedium auch eine geringfügige Aktivität des elementaren Eisens als Vermittler der Kondensationsreaktion darstellen. Diese Ergebnisse verdeutlichen somit die Unempfindlichkeit der Reaktionsroute in Bezug auf die verfügbare Eisen- sowie Essigsäuremenge. Experimente mit Eisenreagenzien verschiedener Oxidationsstufen ergaben, dass Eisen(II)-Verbindungen eine zentrale Rolle in dem identifizierten Reaktionspfad übernehmen. Des Weiteren konnte im Rahmen einer zeitabhängigen Versuchsreihe unter optimierten Reaktionsbedingungen Dipeptidbildung binnen eines Tages festgestellt werden. Größere Reaktionszeiträume resultierten in einem stabilen Anstieg der Produktkonzentrationen sowie einer Verbreiterung des Produktspektrums. So lieferte die Umsetzung von Glycin und L-Alanin über einen Zeitraum von 29 Tagen Dipeptidausbeuten von bis zu 2.5% und Kondensationsprodukte bis hin zu Pentapeptiden, wodurch die Effizienz der identifizierten Reaktionsroute veranschaulicht werden konnte. Diese Reaktionsroute zeichnet sich durch die Bildung langkettiger Produkte bei im Vergleich zu literaturbekannten Eisen(III)-basierten Pfaden milden Temperaturen aus. Zusätzlich ist sie in Folge der Abwesenheit prominenter Nebenprodukte, wie der Diketopiperazine, durch eine hohe Selektivität gekennzeichnet. Bezogen auf die präbiotische Chemie weist die Reaktionsroute außerdem aufgrund ihrer Robustheit, der einfachen Reaktanden und des großen Eisenvorkommens ein großes Potenzial hinsichtlich der Vereinbarkeit mit einer Vielzahl präbiotisch plausibler Szenarien auf. Die Simulation eines komplexeren Szenarios, in dem alle 20 proteinogenen Aminosäuren vorliegen, zeigte durch den Einbau sämtlicher Monomere in Dipeptide die Kompatibilität des Ansatzes mit bunt zusammengesetzten präbiotischen Szenarien. Des Weiteren konnte anhand von Eisen- und Kupfermineral-vermittelten Aminosäurekondensationen die Möglichkeit eines vulkanischen Reaktionsszenarios für Metall-vermittelte Peptidbildungen auf der frühen Erde bestätigt werden.

Ausgehend davon, dass es sich auch bei Phosphorylierungsreaktionen um Kondensationen handelt, befasste sich der zweite Abschnitt dieser Arbeit mit der Evaluation von flüssigem Schwefeldioxid als Lösungsmittel für die präbiotische Phosphorylierung organischer Substrate. Mit dem Ziel die kinetische Beeinträchtigung im Zusammenhang mit nukleophilen Angriffen auf Phosphor(V)-Zentren mit hoher benachbarter negativer Ladung zu umgehen, wurde ausgehend von Phosphonsäure ein Reaktionspfad zu Organophosphaten entwickelt und untersucht. Begründet durch die Korrosion meteoritischer Schreibersits sowie verschiedene Reduktionsprozesse für Phosphate gilt die Existenz reduzierter Phosphorverbindungen auf der frühen Erde als gesichert. Anhand von Adenosin als Modellsubstrat konnte die effiziente Bildung von Organophosphaten bei Raumtemperatur gezeigt werden und so die Eignung von Schwefeldioxid als Reaktionsmedium für die Einführung der

Phosphatfunktion demonstriert werden. Zusätzlich zu Monophosphatprodukten konnten auch Di- und Triphosphate sowie Dinukleotide erhalten werden. Eine Analyse des Redox-Systems führte zur Identifikation der Schwefeldioxid Reduktionsprodukte Thiosulfat und Dithionit. Demnach kommt Schwefeldioxid eine Doppelrolle als Lösungs- und Oxidationsmittel in der Phosphorylierungsreaktion zu. In der Folge kann die Bildung von Organophosphaten im Gegensatz zu bisherigen Phosphor(III)-basierten Ansätzen in einem Reaktionsschritt sowie bei milderen Temperaturen realisiert werden. Die Optimierung des Reaktionspfades zeigte einen positiven Einfluss von Harnstoff auf die Produktausbeuten. So konnten in Gegenwart des Additivs 26.7% 5'-Adenosinmonophosphat erhalten werden. Darüber hinaus konnte über einen größeren Konzentrationsbereich des Adenosinsubstrates robuste Produktbildung beobachtet werden. Der Erhalt maximaler Produktausbeuten sowie breiterer Produktspektren ausgehend von den geringsten Substratkonzentrationen zeigt eindrucksvoll die Vereinbarkeit des Reaktionspfades mit potenziellen präbiotischen Szenarien mit einem limitierten Angebot an Ausgangsverbindungen. In einem weiteren Schritt ermöglichten massenspektrometrische Produktanalysen in Kombination mit zeitabhängigen Versuchen die Identifikation verschiedener Produktpfade im Reaktionsnetzwerk. Die Detektion verschiedener Phosphonatprodukte deutete darauf hin, dass es zunächst zur Kondensation zwischen dem Substrat und der Phosphonsäure kommt. Die anschließende - aufgrund der Redox-Aktivität von Schwefeldioxid - irreversible Oxidation der Phosphonatintermediate liefert die gewünschten Organophosphate. Diese können auf dem beschriebenen Reaktionspfad innerhalb eines Tages gebildet werden. Über längere Zeiträume können die Phosphatprodukte unter den gewählten Reaktionsbedingungen jedoch auch wieder abgebaut werden. Demzufolge ist der initiale Kondensationsschritt reversibel. Der festgestellte Abbau und die Isomerisierung von als Substrat eingesetzten Organophosphaten bestätigen dies. Die Beobachtung der genannten Prozesse zeigt darüber hinaus, dass neben der Phosphorylierungsreaktion auch weitere stoffwechselrelevante Umsetzungen unter den beschriebenen Reaktionsbedingungen ablaufen können. Neben der Umsetzung von Adenosin gelang auch die Phosphorylierung der anderen kanonischen Nukleoside sowie weiterer präbiotisch relevanter Moleküle, wie beispielsweise Glycerinaldehyd, Glycerin und Ribose. Im Zuge der Phosphorylierung von Serin konnte dabei gleichzeitig die Eigenkondensation des Substrates beobachtet werden. Somit wird unter den gewählten Reaktionsbedingungen ein Reaktionspfad zu einer anderen Klasse von Biomolekülen nicht nur toleriert, sondern sogar begünstigt, was in komplexen Szenarien auf der frühen Erde in Abwesenheit zielgerichteter synthetisch-chemischer Voraussetzungen von Vorteil sein kann. Die Detektion einer Vielzahl von Dinukleotiden ausgehend von einer Mischung bestehend aus allen kanonischen Nukleosiden deutet ebenfalls auf die Vereinbarkeit dieses identifizierten Reaktionspfades mit solchen komplexen Szenarien im Zusammenhang mit dem Ursprung des Lebens hin.

Zukünftige Studien, die sich mit Schwefeldioxid als Reaktionsmedium im Zusammenhang mit der Entstehung von Leben beschäftigen, sollten die Toleranz verschiedener Monomere sowie die beobachtete simultane Bildung verschiedener Biomoleküle ausnutzen, um durch deren Kombination zu Funktionen lebender Organismen zu gelangen. So könnte beispielsweise eine Mischung aus Nukleosiden und Aminosäuren in Gegenwart von Phosphonsäure umgesetzt werden. Auf diese Weise könnte möglicherweise in einem Reaktionsschritt neben der Bildung von Peptiden und Nukleotiden auch die Aminoacylierung letzterer, die einen zentralen Schritt in der Proteinbiosynthese darstellt, erprobt werden. Darüber hinaus sollte mit Fokus auf die Isomerisierung und den Abbau der phosphorylierten Produkte der Aufbau eines stoffwechselähnlichen Reaktionsnetzwerkes in flüssigem Schwefeldioxid versucht werden. Denkbar wäre jedoch auch zunächst die Bildung verschiedener Kondensationsprodukte in Schwefeldioxid gefolgt von deren anschließender Überführung in eine lebensfreundlichere Reaktionsumgebung. Mit Blick auf die frühe Erde ist dies beispielsweise durch Verdampfen des Lösungsmittels in Folge eines Temperaturanstiegs bzw. eines Druckabfalls denkbar. Im Anschluss ist die Umsetzung der entstandenen Biomoleküle sowohl in trockenen als auch wässrigen Reaktionsumgebungen vorstellbar. Die Untersuchung der entsprechenden Reaktionssequenzen könnte einen weiteren Gegenstand zukünftiger Forschungsvorhaben darstellen.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation konnten somit Reaktionspfade in flüssigem Schwefeldioxid entwickelt werden, die den in wässriger Lösung thermodynamisch unvorteilhaften Aufbau von Peptiden und Organophosphaten erlauben. Dabei wurde das Szenario präbiotischer Umsetzungen in flüssigem Schwefeldioxid auf Phosphorylierungsreaktionen erweitert. In diesen übernimmt das Reaktionsmedium eine Doppelrolle, indem es gleichzeitig das Oxidationsmittel für das präbiotisch plausible, reduzierte Phosphorylierungsreagenz darstellt. Die Charakteristika der untersuchten Reaktionspfade wie Kompatibilität mit einer Vielzahl an Substraten, kurze Reaktionssequenzen und Umsetzung bei milden Reaktionstemperaturen begründen eine hohe präbiotische Plausibilität.



**Abbildung 50:** Graphische Zusammenfassung der Untersuchung und Entwicklung präbiotisch plausibler Reaktionspfade in flüssigem Schwefeldioxid. Oben: Metall-vermittelte Peptidbildung; unten: Phosphorylierung mit Phosphonsäure als Phosphorylierungsreagenz. Adaptierte und übersetzte Abbildung nach [392-393, 403] mit Erlaubnis des Wiley-Verlags (Creative Commons Attribution 4.0 International License CC BY & CC BY-NC).



# Kapitel 6

---

**Experimenteller Teil**



## 6.1 Allgemeine Angaben

Die in der vorliegenden Arbeit thematisierten Forschungsprojekte wurden zum Teil in Kooperation durchgeführt.

Das CE-MS-Interface wurde in Zusammenarbeit mit PROF. DR. OLIVER TRAPP und DR. FABIAN SAUER entwickelt und erprobt.<sup>[396]</sup> Die Peptidanalyse *via* CE-MS wurde von DR. MAREN HAAS und DR. FABIAN SAUER entwickelt.<sup>[394-395]</sup>

Die Druckapparaturen für Reaktionen in flüssigem Schwefeldioxid wurden von DR. MAREN HAAS und PROF. DR. OLIVER TRAPP entwickelt. Peptidbildungen in flüssigem Schwefeldioxid ausgehend von Kupfer(II)chlorid, Glycin und L-Alanin wurden von DR. MAREN HAAS durchgeführt.<sup>[394]</sup> Die Quantifizierung der Produkte aus diesen Reaktionen erfolgte im Rahmen der vorliegenden Arbeit.

Im Rahmen ihrer Bachelorarbeit testete CHRISTIANE SEIBAND unter meiner Anleitung die Trennung von Nukleotiden an der CE und führte erste Phosphorylierungsversuche in flüssigem Schwefeldioxid durch.

### 6.1.1 Chemikalien und Lösungsmittel

Chemikalien wurden von Abcr, Alfa Aesar, Carbosynth, Jena Bioscience, Metabion, Sigma Aldrich, TCI Chemicals, Thermo Fisher Scientific und VWR sowie von der Chemikalienausgabe der Chemischen Institute erworben und wenn nicht anders vermerkt ohne weitere Aufreinigung eingesetzt. Covellin (Fundort: Polen), Akaganeit (Fundort: Deutschland) und Hämatit (Fundort: Italien) wurden von Seltene Mineralien GUNNAR FÄRBER (Samswegen, Deutschland) bezogen. Markasit (Fundort: unbekannt) wurde von Alfa Aesar erhalten.

Für analytische Zwecke wurden HPLC *grade* bzw. HPLC-MS *grade* Lösungsmittel verwendet. Destilliertes Wasser wurde zusätzlich mithilfe eines VWR Puranity PU 15 Gerätes aufgereinigt.

SO<sub>2</sub> N38 (99.98%) wurde von Air Liquide (Deutschland) erworben. Reaktionen in flüssigem Schwefeldioxid wurden unter Luftausschluss in einer Stickstoffatmosphäre durchgeführt.

### 6.1.2 CE

Elektrophoretische Auftrennungen wurden an einer Agilent CE 7100 mit einem Diodenarray-Detektor (Waldbronn, Deutschland) vorgenommen. Die Gerätesteuerung erfolgte mithilfe der ChemStation Software (Version C.01.07). Die verwendeten Quarzglaskapillaren

(ID = 50  $\mu\text{m}$ , OD = 360  $\mu\text{m}$ ) wurden von MicroQuartz (München, Deutschland) erhalten. Proben wurden vor der Analyse filtriert (Filtermaterial: Celluloseacetat, Porengröße: 0.45  $\mu\text{m}$ ). Elektropherogramme wurden mithilfe von CEval 0.6g und OriginPro 2018G ausgewertet.<sup>[418]</sup>

### 6.1.3 CE-MS-Interface

Die Standard Ion Max ESI-Quelle eines Orbitrap Q Exactive Plus Massenspektrometers der Firma Thermo Fisher Scientific wurde durch ein spezialangefertigtes CE-MS-Interface ausgetauscht. Dieses bestand aus einem Edelstahlgerüst mit einer (x-y-z)-Bühne von Thorlabs (Dachau, Deutschland). Auf dieser befand sich ein PEEK T-Stück, in dem der Emitter sowie die Kapillare befestigt wurden. Für die Herstellung der Emitter wurden Rohrstücke aus Edelstahl (OD = 1/16", ID = 0.5 mm) von Altmann Analytik KG (München, Deutschland) erworben. Die Emitterspitze wurde anschließend mit einem Dremel 8100 (Racine, USA) angefertigt. Zur Kontrolle der Emitterqualität diente ein Kruess MSZ5600 Mikroskop (Hamburg, Deutschland). Die äußere Polyimidschicht der Quarzglaskapillaren wurde am *Outlet* entfernt und die Kapillare wurde so im Emitter positioniert, dass sie minimal hervorstand. Das CE-*Outlet* wurde so ausgerichtet, dass es sich auf gleicher Höhe wie das geerdete *Inlet* der Ionentransfer-Kapillare ( $T = 140^\circ\text{C}$ ) befand. Ein stabiles Elektrospray wurde durch Anlegen einer externen Spannung (Spannungsquelle von Phywe Systeme KG, Göttingen, Deutschland) und eines coaxialen SL-Fluss ( $\text{H}_2\text{O}/i\text{-PrOH}$  1:1 + 0.05% v/v Ameisensäure) von 3  $\mu\text{L}/\text{min}$  gewährleistet. Um eine optimale Sprayqualität zu erzielen, wurde die Position der Emitterspitze vor jeder Messung mithilfe der (x-y-z)-Bühne eingestellt. Proben wurden vor der Analyse filtriert (Filtermaterial: Celluloseacetat, Porengröße: 0.45  $\mu\text{m}$ ).

### 6.1.4 Kugelmühle

Die Aminosäuremischung wurde in einer Planeten-Mikromühle des Typs PULVERISETTE 7 premium line der Firma Fritsch (Idar-Oberstein, Deutschland) mit Edelstahl-Mahlbechern (20 mL) und Edelstahl-Kugeln ( $d = 10$  mm, zehn Stück je Mahlbecher) homogenisiert.

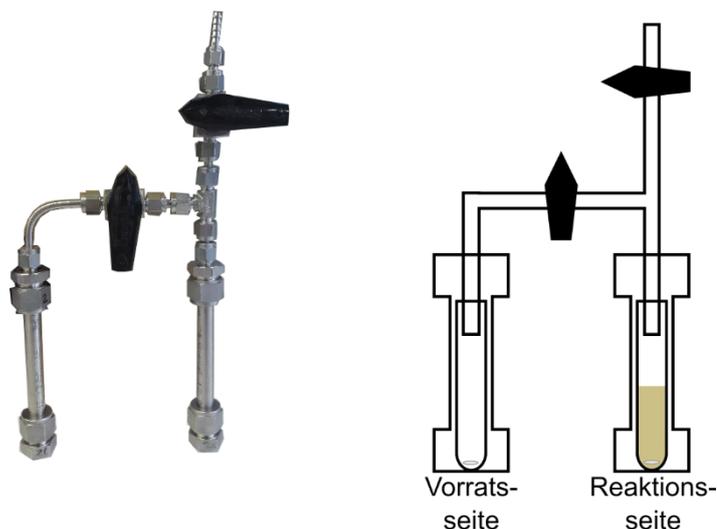
### 6.1.5 Elementaranalyse

Mineralien wurden vor ihrem Einsatz am Anorganisch Chemischen Institut der LMU München von JARKA OBEL, SOPHIE GUTENTHALER und PHILIPP MAIER in Mikrowellenversuchen aufgeschlossen und emissionsspektrometrisch auf ihre Zusammensetzung hin untersucht. Die emissionsspektrometrischen Messungen mittels induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-

OES: *inductively coupled plasma optical emission spectrometry*) wurden an einem Varian Vista Simultan Spektrometer vorgenommen.

## 6.2 Reaktionen in flüssigem Schwefeldioxid

### 6.2.1 Druckapparaturen für die Reaktionen in flüssigem Schwefeldioxid



**Abbildung 51:** Druckapparatur für die Reaktionen in flüssigem Schwefeldioxid. Vorrats- und Reaktionsseite sind jeweils mit Reagenzglas und Rührfisch ausgestattet. Übersetzte und adaptierte Abbildung nach F. Sauer, M. Haas, C. Sydow *et al.*, *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 7182, <https://www.nature.com/articles/s41467-021-27527-7>.<sup>[392]</sup> Die Darstellung ist durch die Creative Commons Attribution 4.0 International License CC BY, <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/> gestattet.

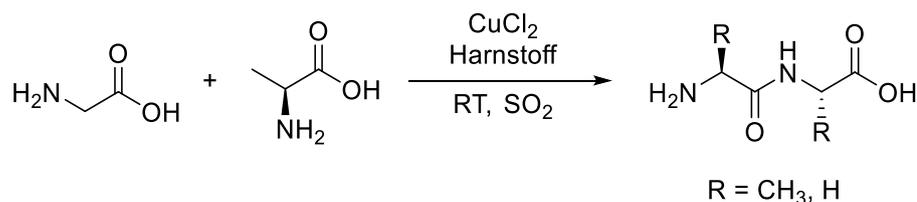
Im Vorfeld der Experimente wurden die Druckapparaturen (Abbildung 51) abwechselnd drei Mal evakuiert und mit Stickstoff geflutet sowie anschließend auf der Vorratsseite unter Kühlung ( $T = -76\text{ °C}$ ) mit flüssigem Schwefeldioxid befüllt. Anhand der Einwaage der leeren und befüllten Apparaturen konnte das Schwefeldioxid-Füllvolumen ermittelt werden. Das maximale Füllvolumen betrug 3.5 mL. Reaktionen wurden bis zu einem Minimalvolumen von einem Milliliter durchgeführt. Spätestens nach fünf Reaktionen wurden die Druckapparaturen gereinigt und neu befüllt.



**Abbildung 52:** Druckmessung bei Raumtemperatur in einer der Edelstahlapparaturen, die mit 3.7 g Schwefeldioxid befüllt ist ( $p = 3.2 \text{ bar}$ ). Adaptierte Abbildung nach C. Sydow *et al.*, *Commun. Chem.* 2022, 5, 143, <https://www.nature.com/articles/s42004-022-00761-w>.<sup>[403]</sup> Die Darstellung ist durch die Creative Commons Attribution 4.0 International License CC BY, <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/> gestattet.

## 6.3 Metall-vermittelte Peptidbildung in flüssigem Schwefeldioxid

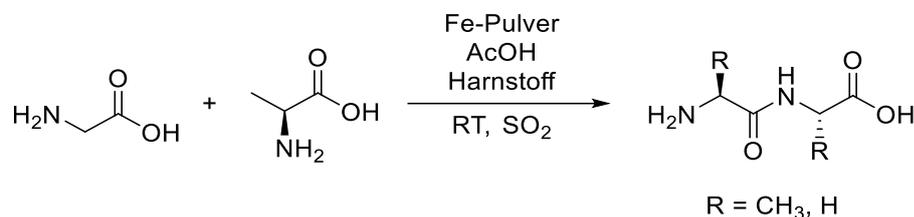
### 6.3.1 Kupfer-vermittelte Peptidbildung



Glycin (90.1 mg, 1.20 mmol), L-Alanin (107 mg, 1.20 mmol) (2.40 mmol insgesamt, 1.00 Äq.), Harnstoff (72.1 mg, 1.20 mmol, 0.50 Äq.) und  $\text{CuCl}_2$  (161 mg, 1.20 mmol, 0.50 Äq.) oder wahlweise Covellin ( $\text{CuS}$ ) (115 mg, Aminosäuren/Mineral-Verhältnis 20.9 mmol/g) wurden auf der Reaktionsseite in die Druckapparatur eingebracht und abwechselnd drei Mal evakuiert und mit Stickstoff geflutet (Abbildung 51). Anschließend wurde die Reaktionskammer auf  $-76 \text{ }^\circ\text{C}$  gekühlt und Schwefeldioxid (3.0 mL) aus der Vorratsseite einkondensiert. Nach Schließen des Hahns zwischen den beiden Kammern und Entfernen der Kühlung wurde die Reaktionsmischung für 1 bis 21 d bei Raumtemperatur gerührt. Am Ende der Reaktionszeit wurde Schwefeldioxid auf der Vorratsseite kondensiert. Der Feststoff wurde *in vacuo* getrocknet und bis zur Probenmessung bei  $-18 \text{ }^\circ\text{C}$  aufbewahrt.

Peptidbildungen ausgehend von  $\text{CuCl}_2$ , Glycin und L-Alanin wurden von DR. MAREN HAAS durchgeführt.<sup>[394]</sup>

### 6.3.2 Eisen-vermittelte Peptidbildung mit Glycin und L-Alanin



Glycin (90.1 mg, 1.20 mmol), L-Alanin (107 mg, 1.20 mmol) (2.40 mmol insgesamt, 1.00 Äq.), Harnstoff (72.1 mg, 1.20 mmol, 0.50 Äq.) und Eisenpulver (67.2 mg, 1.20 mmol, 0.50 Äq.) wurden gemischt. Eisenpulver wurde optional durch ein Eisenmineral (115 mg, Aminosäuren/Mineral-Verhältnis 20.9 mmol/g) oder  $\text{Fe}(\text{OAc})_2$  (20.9 mg, 120  $\mu\text{mol}$ , 0.05 Äq.) ersetzt. Reaktionsmischungen mit Eisenpulver wurden zunächst 2 h mit Essigsäure (6.90  $\mu\text{L}$ , 120  $\mu\text{mol}$ , 0.05 Äq.) inkubiert, bevor diese in der Reaktionsseite der Druckapparatur positioniert wurden (Abbildung 51). Nach dreimaligem Evakuieren und Fluten mit Stickstoff wurde die Reaktionsseite auf  $-76\text{ }^\circ\text{C}$  gekühlt und Schwefeldioxid (3.0 mL) aus der Vorratsseite auf die Reaktionsseite kondensiert. Nach Schließen des Hahns zwischen den beiden Kammern und Entfernen der Kühlung wurde die Reaktionsmischung für 1 bis 29 d bei Raumtemperatur gerührt, bevor die Reaktion durch Kondensation des Schwefeldioxids auf die Vorratsseite beendet wurde. Der Feststoff wurde *in vacuo* getrocknet und bis zur Probenmessung bei  $-50\text{ }^\circ\text{C}$  aufbewahrt.

### 6.3.3 Eisen-vermittelte Peptidbildung mit der Aminosäuremischung

Für die Aminosäuremischung wurden je proteinogener Aminosäure 1.3 mmol eingewogen. Anschließend wurde die Mischung in der Kugelmühle für zehn Minuten bei einer Drehzahl von 400 rpm homogenisiert. Die Lagerung der Aminosäuremischung erfolgte bei  $-18\text{ }^\circ\text{C}$ . Die Aminosäuremischung (1.20 mmol, 1.00 Äq.), Harnstoff (72.1 mg, 1.20 mmol, 1.00 Äq.) und Eisenpulver (67.2 mg, 1.20 mmol, 1.00 Äq.) wurden zunächst für 2 h mit Essigsäure (6.90  $\mu\text{L}$ , 120  $\mu\text{mol}$ , 0.10 Äq.) inkubiert. Die Mischung wurde auf der Reaktionsseite der Druckapparatur positioniert und es wurde abwechselnd drei Mal evakuiert und mit Stickstoff geflutet bevor auf  $-76\text{ }^\circ\text{C}$  gekühlt wurde. 3.0 mL Schwefeldioxid von der Vorratsseite wurden auf die Mischung kondensiert und diese wurde anschließend 7 d bei Raumtemperatur gerührt. Am Ende der Reaktionszeit wurde Schwefeldioxid wieder zurück auf die

Vorratsseite kondensiert. Der Feststoff wurde *in vacuo* getrocknet und bis zur Probenmessung bei  $-50\text{ °C}$  aufbewahrt.

### 6.3.4 CE-MS-Messungen der Peptidmischungen

Proben der Glycin- und L-Alanin-basierten Versuche wurden vor der Analyse auf 5 mM in Bezug auf die anfängliche Konzentration einer Aminosäure verdünnt. Die Probe ausgehend von der Aminosäuremischung wurde auf 1 mM in Bezug auf die anfängliche Konzentration einer Aminosäure verdünnt. Alle Auftrennungen erfolgten druckassistent ( $p = 30\text{ mbar}$ ) bei einer Spannung von 30 kV und einer Temperatur von  $25\text{ °C}$ . Als Trennkapillaren wurden mit LPA-beschichtete Quarzglas kapillaren ( $l = 80\text{ cm}$ ) verwendet. Zu Beginn eines Messtages wurden die Kapillaren mit Wasser, 10 mM Phosphorsäure, Wasser (jeweils fünf Minuten) und abschließend drei Minuten mit BGE (2 M AcOH) konditioniert. Zwischen den Messungen wurde zudem mit Wasser, 10 mM Phosphorsäure, Wasser (jeweils 2 min) und mit BGE (3 min) gespült. Die Injektion der Proben erfolgte druckgetrieben (30 mbar für 10 s). Am Emitter wurde eine Sprayspannung von 3.2 kV angelegt. *Full scan* Massenspektren ( $m/z$  129-750 bzw.  $m/z$  122-750) wurden im positiven Modus bei einer Auflösung von 70000 aufgezeichnet. Um eine Kontamination des Massenspektrometers durch Metallspezies zu vermeiden, wurde erst zeitverzögert zur CE-Auftrennung nach der Elution der Metallionen die Sprayspannung am Emitter angelegt sowie die Aufnahme der Massenspektren gestartet. Das S-Lens Level wurde hierbei auf 50 eingestellt. Die Sequenzbestimmung der Peptide erfolgte mithilfe von MS/MS-Experimenten. Daten-abhängige MS/MS-Spektren wurden ab einem minimalen AGC *target* von  $8 \times 10^3$  mit einer Auflösung von 17500 anhand von Inklusionslisten, welche alle möglichen Dipeptidkombinationen enthielten, aufgenommen. Das Isolationsfenster betrug  $0.4\text{ }m/z$  und die relative Fragmentierungsenergie wurde auf 30% gesetzt. Die erhaltenen Massenspektren wurden mithilfe der Thermo Xcalibur Software 4.1 ausgewertet. Die Extraktion der einzelnen Massenspuren erfolgte hierbei mit einer Abweichung von 3 ppm.

### 6.3.5 Belegen der Kapillaren mit LPA

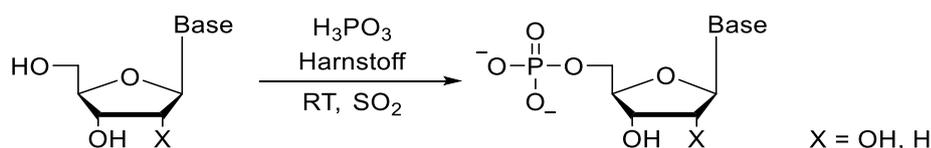
BFS-Kapillaren wurden anhand einer von DOVICH *et al.* entwickelten und von DR. MAREN HAAS und DR. FABIAN SAUER modifizierten Methode mit einer LPA-Schicht belegt.<sup>[375, 394-395, 419]</sup> Zunächst wurde die BFS-Kapillare für 10 h bei  $200\text{ °C}$  und einem Stickstoffdruck von 30 kPa in einem Thermo Focus GC Ofen ausgeheizt. Anschließend wurde die BFS-Kapillare druckassistent (5 bar Stickstoff) mit 0.1 M NaOH (2 h), Wasser (1 h), 0.1 M Salzsäure (24 h) und Wasser (1 h) konditioniert und 5 h im Stickstoffstrom getrocknet. Danach wurden die Kapillaren für 10 min mit einer Lösung aus  $\gamma$ -MAPS und Methanol (1:1) gespült. Die

Kapillare wurde mit Septen verschlossen und für 14 h im Wasserbad auf 45 °C erwärmt bevor sie mit Methanol (1 h) und Wasser (1 h) gespült und im Stickstoffstrom für 1.5 h getrocknet wurde. Im nächsten Schritt wurde die Kapillare 10 min mit einer Acrylamidlösung (120 mg in 3 mL Wasser), welche mit 10 µL Ammoniumpersulfatlösung (c = 5 mg/mL) versetzt und entgast wurde, gespült. Im Anschluss wurde die Kapillare erneut mit Septen verschlossen und bei 50 °C für 30 min im Wasserbad erwärmt. Im Anschluss an einen Spülschritt mit Wasser (1 h) und Trocknen im Stickstoffstrom für 15 min wurde die belegte Kapillare für 10 h bei 100 °C und einem Stickstoffdruck von 30 kPa ausgeheizt. Die belegten LPA-Kapillaren wurden vor ihrer Benutzung mit einer Mischung bestehend aus allen 20 proteinogenen Aminosäuren (je 100 µM) auf ihre Trennleistung hin getestet (Abbildung 56).

### 6.3.6 Quantifizierung der Glycin- und L-Alanin-basierten Dipeptide an der CE

Proben der Glycin- und L-Alanin-basierten Versuche wurden vor der Analyse, wenn nicht anders beschrieben, auf eine Konzentration von 10 mM in Bezug auf die anfängliche Konzentration einer Aminosäure verdünnt. Die verwendeten BFS-Kapillaren (l = 80 cm) wurden zu Beginn eines Messtages jeweils fünf Minuten mit Wasser, 0.1 M NaOH, Wasser und drei Minuten mit BGE (2 M AcOH) konditioniert. Zwischen den Messungen wurde ebenfalls mit Wasser, 0.1 M NaOH, Wasser (jeweils 2 min) und BGE (3 min) konditioniert. Die Trennungen erfolgten bei einer Spannung von 30 kV und 25 °C. Die Injektion der Analyten erfolgte druckgetrieben (30 mbar für 10 s) und die Detektion wurde mithilfe eines Leitfähigkeitsdetektor realisiert. Als interner Standard diente hierbei 4-HP (100 µM). Eichgeraden der Dipeptide (G<sub>2</sub>, AG+GA, A<sub>2</sub>) wurden in dreifacher Ausführung aufgenommen. Proben wurden je zwei Mal an der CE analysiert.

## 6.4 Phosphorylierung in flüssigem Schwefeldioxid



Adenosin (80.2 mg, 300 µmol, 1.00 Äq.) oder ein anderes zu phosphorylierendes Edukt, Phosphonsäure (73.8 mg, 900 µmol, 3.00 Äq.) und Harnstoff (18.0 mg, 300 µmol, 1.00 Äq.) wurden in der Reaktionskammer der Druckapparatur vorgelegt und drei Mal evakuiert und mit Stickstoff geflutet. Anschließend wurde die Reaktionskammer auf -76 °C gekühlt und Schwefeldioxid (3.0 mL) aus der Vorratskammer auf der Reaktionsseite kondensiert. Nach Schließen des Hahns zwischen den beiden Kammern und Entfernen der Kühlung wurde die Reaktionsmischung für 1 bis 26 d bei Raumtemperatur gerührt. Am Ende der

Reaktionszeit wurde die Vorratsseite auf  $-76\text{ }^{\circ}\text{C}$  gekühlt und Schwefeldioxid dorthin zurück kondensiert. Der Feststoff wurde *in vacuo* getrocknet und bis zur Probenmessung bei  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

Für die Reaktion der Nucleosidmischung wurden Adenosin, Cytidin, Guanosin, Uridin, Desoxyadenosin, Desoxycytidin, Desoxyguanosin und Desoxythymidin (äquimolar, insgesamt  $600\text{ }\mu\text{mol}$ ,  $1.00\text{ }\text{Äq.}$ ), Phosphonsäure ( $148\text{ mg}$ ,  $1.80\text{ mmol}$ ,  $3.00\text{ }\text{Äq.}$ ) und Harnstoff ( $36.0\text{ mg}$ ,  $600\text{ }\mu\text{mol}$ ,  $1.00\text{ }\text{Äq.}$ ) in der Druckapparatur vorgelegt.

#### 6.4.1 CE-MS-Analyse der phosphorylierten Verbindungen

Proben der Phosphorylierungsversuche wurden vor der Analyse auf eine Konzentration von  $5\text{ mM}$  in Bezug auf die anfängliche Konzentration eines Nucleosids verdünnt. Alle Auftrennungen erfolgten bei einer Trennungsspannung von  $25\text{ kV}$  und einer Temperatur von  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Zu Beginn eines Messtages wurden die verwendeten BFS-Kapillaren ( $l = 80\text{ cm}$ ) jeweils fünf Minuten mit Wasser,  $0.1\text{ M NaOH}$ , Wasser und abschließend drei Minuten mit BGE ( $30\text{ mM NH}_4\text{FA}$ ,  $\text{pH} = 9.5$ ) konditioniert. Zwischen den Messungen wurde ebenfalls mit Wasser,  $0.1\text{ M NaOH}$ , Wasser (jeweils  $2\text{ min}$ ) und mit BGE ( $3\text{ min}$ ) konditioniert. Die Probeninjektion erfolgte druckgetrieben ( $30\text{ mbar}$  für  $10\text{ s}$ ). Die Sprayspannung am Emitter betrug  $-4.5\text{ kV}$ . *Full scan* Massenspektren ( $m/z$   $50-750$  bzw.  $m/z$   $80-1200$ ) wurden im negativen Modus bei einer Auflösung von  $140000$  aufgenommen. Das S-Lens Level wurde hierbei auf  $50$  eingestellt. Die erhaltenen Massenspektren wurden mithilfe der Thermo Xcalibur Software 4.1 ausgewertet. Pyrophosphate und Produktdimere mit alternierenden Phosphat- und Nucleosideinheiten wurden anhand von MS/MS-Experimenten unterschieden. Datenabhängige MS/MS-Spektren wurden ab einem *AGC-target* von  $1 \times 10^5$  mit einer Auflösung von  $17500$  aufgenommen. Die Fragmentierung erfolgte anhand von Inklusionslisten bei einem Isolationsfenster von  $0.4\text{ } m/z$  sowie  $30\%$  relativer Fragmentierungsenergie.

#### 6.4.2 Quantifizierung der Nucleotide an der CE

Proben der Phosphorylierungsversuche wurden vor der Analyse auf eine Konzentration von  $0.2$  bis  $1\text{ mM}$  in Bezug auf die anfängliche Konzentration des jeweiligen Substrates verdünnt. Die verwendeten BFS-Kapillaren ( $l = 80\text{ cm}$ ) wurden zu Beginn eines Messtages jeweils fünf Minuten mit Wasser,  $0.1\text{ M NaOH}$ , Wasser und drei Minuten mit BGE ( $30\text{ mM NH}_4\text{FA}$ ,  $\text{pH} = 9.5$ ) konditioniert. Zwischen den Messungen wurde mit Wasser,  $0.1\text{ M NaOH}$ , Wasser (jeweils  $2\text{ min}$ ) und BGE ( $3\text{ min}$ ) konditioniert. Die Produktmischungen wurden druckgetrieben injiziert ( $30\text{ mbar}$  für  $10\text{ s}$ ) und mithilfe einer Spannung von  $30\text{ kV}$  bei  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufgetrennt. Die Detektion der Analyten erfolgte bei  $\lambda = 254\text{ nm}$ . Die Kapillarlänge bis zum

Detektor betrug 71.5 cm. Eichgeraden der 5'-NMPs, 5'-NDPs sowie von 5'-ATP wurden in dreifacher Ausführung aufgezeichnet. Die Proben wurden je zwei Mal an der CE analysiert.

#### **6.4.3 Identifikation der Schwefel-Spezies an der CE**

Proben der Phosphorylierungsversuche wurden vor der Analyse auf eine Konzentration von 10 mM in Bezug auf die anfängliche Adenosinkonzentration verdünnt. Die verwendeten BFS-Kapillaren ( $l = 80$  cm) wurden zu Beginn eines Messtages jeweils fünf Minuten mit Wasser, 0.1 M NaOH, Wasser und drei Minuten mit BGE (30 mM BIS-TRIS + 20 mM Salicylsäure, pH = 6.0) konditioniert. Zwischen den Messungen wurde mit BGE (3 min) konditioniert. Die Probeninjektion erfolgte druckgetrieben bei 20 mbar für 10 s. Anschließend wurden die Proben durch Anlegen einer Spannung von  $-30$  kV am *CE-Inlet* aufgetrennt. Die Messungen wurden druckassistent (40 mbar) durchgeführt. Die Detektion der Analyten erfolgte indirekt bei  $\lambda = 214$  nm. Die Kapillarlänge bis zum Detektor betrug 71.5 cm.



# Kapitel 7

---

**Anhang**



Adaptierte und übersetzte Abbildungen und Tabellen im Anhang zur Kupfer-vermittelten Peptidbildung nach F. Sauer, M. Haas, C. Sydow *et al.*, *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 7182, <https://www.nature.com/articles/s41467-021-27527-7> und zur Phosphorylierung nach C. Sydow *et al.*, *Commun. Chem.* **2022**, *5*, 143, <https://www.nature.com/articles/s42004-022-00761-w>.<sup>[392, 403]</sup> Die Darstellung der adaptierten und übersetzten Abbildungen und Tabellen ist durch die Creative Commons Attribution 4.0 International License CC BY, <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/> gestattet. Adaptierte und übersetzte Abbildungen und Tabellen im Anhang zur Eisen-vermittelten Peptidbildung nach C. Sydow *et al.*, *ChemSystemsChem* **2022**, *e202200034*, <https://chemistry-europe.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/syst.202200034>.<sup>[393]</sup> Die Darstellung der adaptierten und übersetzten Abbildungen und Tabellen erfolgt mit der Erlaubnis des Wiley-Verlags (Creative Commons Attribution 4.0 International License CC BY-NC, <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

## 7.1 Metall-vermittelte Peptidbildung in flüssigem Schwefeldioxid

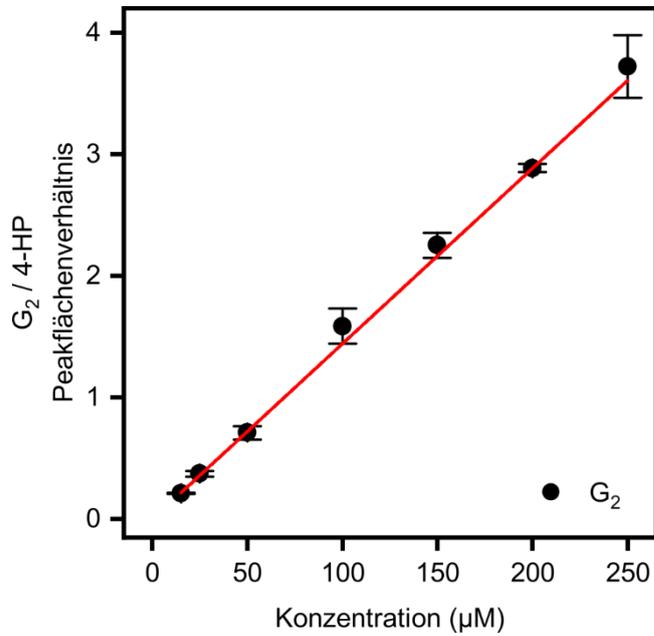
### ICP-OES-Analysen der Mineralien

**Tabelle 7:** Mit ICP-OES bestimmte Zusammensetzung der verwendeten Mineralien. Welche Elemente jeweils bestimmt wurden, wurde anhand begleitend auftretender Mineralien entschieden.

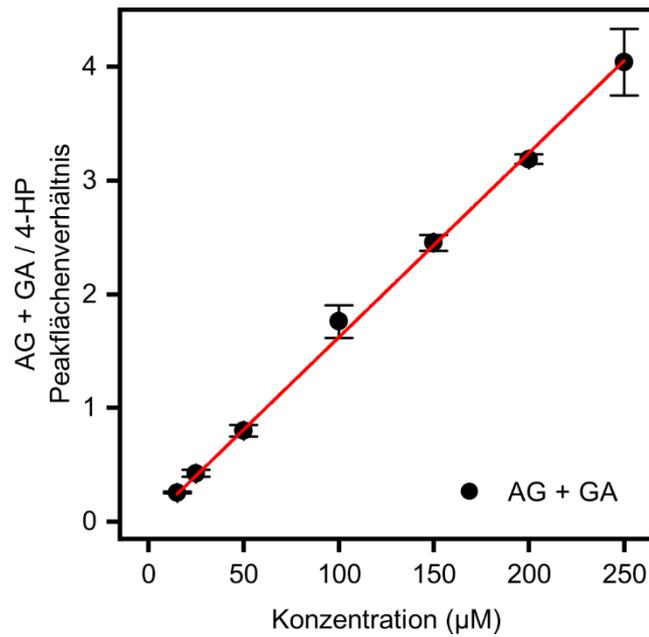
mg/g	Covellin (CuS)	Markasit (FeS <sub>2</sub> )	Akaganeit (β-FeO(OH,Cl))	Hämatit (Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )
Al	3.8	n. b.	1.8	0.3
Ba	0.1	n. b.	0.5	-
Ca	12.7	7.1	30.2	0.2
Co	0.2	n. b.	0.5	-
Cu	585.7	n. b.	-	-
Fe	2.3	448.0	288.2	657.3
Mg	6.9	7.3	10.7	0.1
Mn	0.3	n. b.	0.4	-
Na	1.2	n. b.	22.6	0.3
S	284.9	475.0	26.6	-
Si	4.9	1.9	4.2	2.1

### 7.1.1 Kupfer-vermittelte Peptidbildung

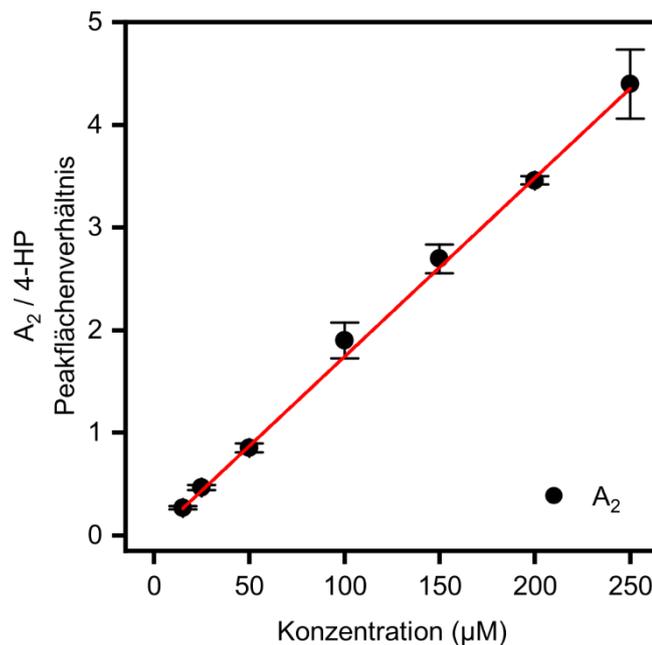
#### Eichgeraden



**Abbildung 53:** G<sub>2</sub>-Eichgerade ( $m = 0.01443 \pm 9.89762 \times 10^{-5}$ ,  $R^2 = 0.99972$ ). Die Messbedingungen für die elektrophoretische Auftrennung einer Dipeptidmischung bestehend aus G<sub>2</sub>, AG, GA und A<sub>2</sub> wurden wie folgt gewählt: BGE: 2 M AcOH (pH = 2.0), BFS-Kapillare l = 80 cm; T = 25 °C, druckgetriebene Probeninjektion (30 mbar für 10 s), CE-*Inlet*: 30 kV. 4-HP (100 µM) diente als interner Standard. Die Elektropherogramme wurden mithilfe eines Leitfähigkeitsdetektors in dreifacher Ausführung aufgezeichnet.



**Abbildung 54:** AG + GA-Eichgerade ( $m = 0.01621 \pm 1.8585 \times 10^{-4}$ ,  $R^2 = 0.99921$ ). Die Messbedingungen für die elektrophoretische Auftrennung einer Dipeptidmischung bestehend aus  $G_2$ , AG, GA und  $A_2$  wurden wie folgt gewählt: BGE: 2 M AcOH (pH = 2.0), BFS-Kapillare  $l = 80$  cm;  $T = 25$  °C, druckgetriebene Probeninjektion (30 mbar für 10 s), CE-*Inlet*: 30 kV. 4-HP (100 µM) diente als interner Standard. Die Elektropherogramme wurden mithilfe eines Leitfähigkeitsdetektors in dreifacher Ausführung aufgezeichnet.



**Abbildung 55:**  $A_2$ -Eichgerade ( $m = 0.01741 \pm 1.48436 \times 10^{-4}$ ,  $R^2 = 0.99956$ ). Die Messbedingungen für die elektrophoretische Auftrennung einer Dipeptidmischung bestehend aus  $G_2$ , AG, GA und  $A_2$  wurden wie folgt gewählt: BGE: 2 M AcOH (pH = 2.0), BFS-Kapillare  $l = 80$  cm;  $T = 25$  °C, druckgetriebene Probeninjektion (30 mbar für 10 s), CE-*Inlet*: 30 kV. 4-HP (100 µM) diente als interner Standard. Die Elektropherogramme wurden mithilfe eines Leitfähigkeitsdetektors in dreifacher Ausführung aufgezeichnet.

## Ausbeuteberechnung

**Tabelle 8:** Kupfer-vermittelte Aminosäurekondensation ausgehend von Glycin, L-Alanin, CuCl<sub>2</sub> und Harnstoff (je 400 mM) nach 1 d (erste Auftrennung).

	Peakfläche (10 <sup>-5</sup> a.u. x min)	Dipeptid / 4-HP	C <sub>Probe</sub> (μM)	C <sub>Reaktion</sub> (mM)	Ausbeute (%)
G <sub>2</sub>	1.8195	0.4705	32.61	1.30	0.65
AG + GA	2.9733	0.7689	47.43	1.90	0.48
A <sub>2</sub>	1.5277	0.3950	22.69	0.91	0.45
4-HP	3.8672				

**Tabelle 9:** Kupfer-vermittelte Aminosäurekondensation ausgehend von Glycin, L-Alanin, CuCl<sub>2</sub> und Harnstoff (je 400 mM) nach 1 d (zweite Auftrennung).

	Peakfläche (10 <sup>-5</sup> a.u. x min)	Dipeptid / 4-HP	C <sub>Probe</sub> (μM)	C <sub>Reaktion</sub> (mM)	Ausbeute (%)	Ø Ausbeute (%)
G <sub>2</sub>	1.7081	0.4657	32.27	1.29	0.65	0.65 ± 0.00
AG + GA	2.6678	0.7273	44.87	1.79	0.45	0.47 ± 0.02
A <sub>2</sub>	1.6427	0.4479	25.73	1.03	0.51	0.48 ± 0.04
4-HP	3.6680					

**Tabelle 10:** Kupfer-vermittelte Aminosäurekondensation ausgehend von Glycin, L-Alanin, CuCl<sub>2</sub> und Harnstoff (je 400 mM) nach 3 d (erste Auftrennung).

	Peakfläche (10 <sup>-5</sup> a.u. x min)	Dipeptid / 4-HP	C <sub>Probe</sub> (μM)	C <sub>Reaktion</sub> (mM)	Ausbeute (%)
G <sub>2</sub>	4.7800	1.1547	80.02	3.20	1.60
AG + GA	7.1281	1.7219	106.22	4.25	1.06
A <sub>2</sub>	3.5616	0.8604	49.42	1.98	0.99
4-HP	4.1396				

**Tabelle 11:** Kupfer-vermittelte Aminosäurekondensation ausgehend von Glycin, L-Alanin, CuCl<sub>2</sub> und Harnstoff (je 400 mM) nach 3 d (zweite Auftrennung).

	Peakfläche (10 <sup>-5</sup> a.u. x min)	Dipeptid / 4-HP	C <sub>Probe</sub> (μM)	C <sub>Reaktion</sub> (mM)	Ausbeute (%)	Ø Ausbeute (%)
G <sub>2</sub>	4.4932	1.1250	77.96	3.12	1.56	1.58 ± 0.03
AG + GA	6.9818	1.7481	107.84	4.31	1.08	1.07 ± 0.01
A <sub>2</sub>	3.7850	0.9477	54.43	2.18	1.09	1.04 ± 0.07
4-HP	3.9940					

**Tabelle 12:** Kupfer-vermittelte Aminosäurekondensation ausgehend von Glycin, L-Alanin, CuCl<sub>2</sub> und Harnstoff (je 400 mM) nach 7 d (erste Auftrennung).

	Peakfläche (10 <sup>-5</sup> a.u. x min)	Dipeptid / 4-HP	C <sub>Probe</sub> (μM)	C <sub>Reaktion</sub> (mM)	Ausbeute (%)
G <sub>2</sub>	4.0689	1.1210	77.69	3.11	1.55
AG + GA	6.5202	1.7963	110.81	4.43	1.11
A <sub>2</sub>	3.8237	1.0534	60.51	2.42	1.21
4-HP	3.6298				

**Tabelle 13:** Kupfer-vermittelte Aminosäurekondensation ausgehend von Glycin, L-Alanin, CuCl<sub>2</sub> und Harnstoff (je 400 mM) nach 7 d (zweite Auftrennung).

	Peakfläche (10 <sup>-5</sup> a.u. x min)	Dipeptid / 4-HP	C <sub>Probe</sub> (μM)	C <sub>Reaktion</sub> (mM)	Ausbeute (%)	Ø Ausbeute (%)
G <sub>2</sub>	3.9564	1.0579	73.31	2.93	1.47	1.51 ± 0.06
AG + GA	6.5119	1.7412	107.42	4.30	1.08	1.10 ± 0.02
A <sub>2</sub>	4.0827	1.0917	62.71	2.51	1.25	1.23 ± 0.03
4-HP	3.7398					

**Tabelle 14:** Kupfer-vermittelte Aminosäurekondensation ausgehend von Glycin, L-Alanin, CuCl<sub>2</sub> und Harnstoff (je 400 mM) nach 21 d (erste Auftrennung).

	Peakfläche (10 <sup>-4</sup> a.u. x min)	Dipeptid / 4-HP	C <sub>Probe</sub> (μM)	C <sub>Reaktion</sub> (mM)	Ausbeute (%)
G <sub>2</sub>	0.4475	1.2099	83.85	3.35	1.68
AG + GA	1.3327	3.6031	222.28	8.89	2.22
A <sub>2</sub>	1.3274	3.5887	206.13	8.25	4.12
4-HP	0.3699				

**Tabelle 15:** Kupfer-vermittelte Aminosäurekondensation ausgehend von Glycin, L-Alanin, CuCl<sub>2</sub> und Harnstoff (je 400 mM) nach 21 d (zweite Auftrennung).

	Peakfläche (10 <sup>-4</sup> a.u. x min)	Dipeptid / 4-HP	C <sub>Probe</sub> (μM)	C <sub>Reaktion</sub> (mM)	Ausbeute (%)	Ø Ausbeute (%)
G <sub>2</sub>	0.4592	1.2133	84.08	3.36	1.68	1.68 ± 0.00
AG + GA	1.3102	3.4621	213.58	8.54	2.14	2.18 ± 0.06
A <sub>2</sub>	1.3166	3.4790	199.83	7.99	4.00	4.06 ± 0.08
4-HP	0.3784					

**Tabelle 16:** Kupfer-vermittelte Aminosäurekondensation ausgehend von Glycin, L-Alanin, CuCl<sub>2</sub> und Harnstoff (je 50 mM) nach 7 d (erste Auftrennung). Die Probe wurde vor der Auftrennung auf 9.9 mM in Bezug auf die anfängliche Konzentration einer Aminosäure verdünnt.

	Peakfläche (10 <sup>-5</sup> a.u. x min)	Dipeptid / 4-HP	C <sub>Probe</sub> (μM)	C <sub>Reaktion</sub> (mM)	Ausbeute (%)
G <sub>2</sub>	1.6406	0.4854	33.64	0.17	0.68
AG + GA	5.5947	1.6552	102.11	0.52	1.04
A <sub>2</sub>	9.0355	2.6732	153.54	0.78	3.10
4-HP	3.3801				

**Tabelle 17:** Kupfer-vermittelte Aminosäurekondensation ausgehend von Glycin, L-Alanin, CuCl<sub>2</sub> und Harnstoff (je 50 mM) nach 7 d (zweite Auftrennung). Die Probe wurde vor der Auftrennung auf 9.9 mM in Bezug auf die anfängliche Konzentration einer Aminosäure verdünnt.

	Peakfläche (10 <sup>-5</sup> a.u. x min)	Dipeptid / 4-HP	C <sub>Probe</sub> (μM)	C <sub>Reaktion</sub> (mM)	Ausbeute (%)	Ø Ausbeute (%)
G <sub>2</sub>	1.6073	0.4044	28.02	0.14	0.57	0.63 ± 0.08
AG + GA	5.7663	1.4507	89.49	0.45	0.90	0.97 ± 0.10
A <sub>2</sub>	9.3272	2.3465	134.78	0.68	2.72	2.91 ± 0.27
4-HP	3.9749					

**Tabelle 18:** Kupfer-vermittelte Aminosäurekondensation ausgehend von Glycin, L-Alanin, CuCl<sub>2</sub> und Harnstoff (je 100 mM) nach 7 d (erste Auftrennung).

	Peakfläche (10 <sup>-5</sup> a.u. x min)	Dipeptid / 4-HP	C <sub>Probe</sub> (μM)	C <sub>Reaktion</sub> (mM)	Ausbeute (%)
G <sub>2</sub>	2.6907	0.8112	56.22	0.56	1.12
AG + GA	5.4373	1.6392	101.12	1.01	1.01
A <sub>2</sub>	4.1186	1.2416	71.32	0.71	1.43
4-HP	3.3171				

**Tabelle 19:** Kupfer-vermittelte Aminosäurekondensation ausgehend von Glycin, L-Alanin, CuCl<sub>2</sub> und Harnstoff (je 100 mM) nach 7 d (zweite Auftrennung).

	Peakfläche (10 <sup>-5</sup> a.u. x min)	Dipeptid / 4-HP	C <sub>Probe</sub> (μM)	C <sub>Reaktion</sub> (mM)	Ausbeute (%)	Ø Ausbeute (%)
G <sub>2</sub>	3.1807	0.8514	59.00	0.59	1.18	1.15 ± 0.04
AG + GA	5.4662	1.4632	90.27	0.90	0.90	0.96 ± 0.08
A <sub>2</sub>	3.5716	0.9561	54.92	0.55	1.10	1.27 ± 0.23
4-HP	3.7358					

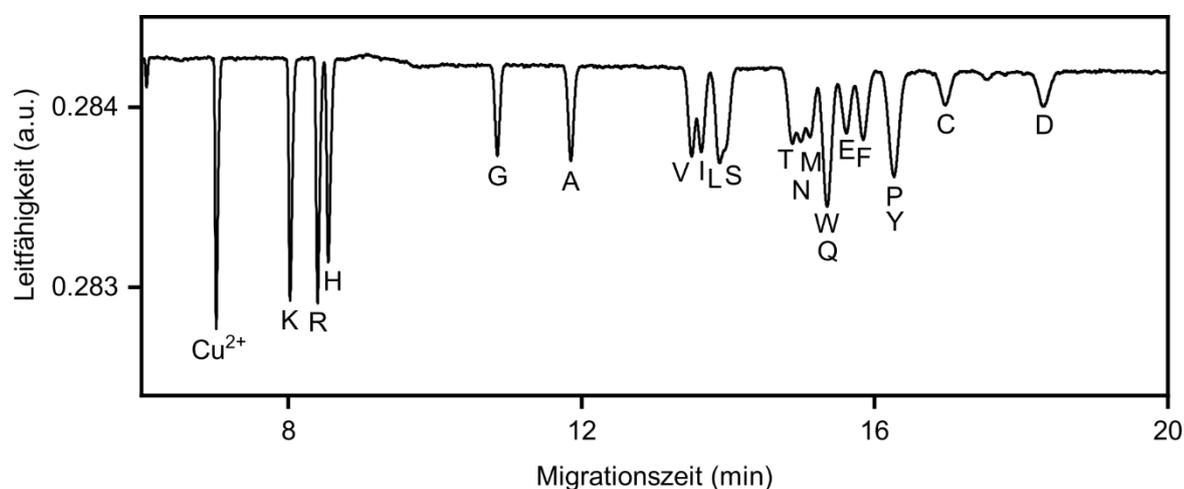
**Tabelle 20:** Kupfer-vermittelte Aminosäurekondensation ausgehend von Glycin, L-Alanin, CuCl<sub>2</sub> und Harnstoff (je 200 mM) nach 7 d (erste Auftrennung).

	Peakfläche (10 <sup>-5</sup> a.u. x min)	Dipeptid / 4-HP	C <sub>Probe</sub> (μM)	C <sub>Reaktion</sub> (mM)	Ausbeute (%)
G <sub>2</sub>	2.6990	0.7693	53.31	1.07	1.07
AG + GA	6.0124	1.7137	105.72	2.11	1.06
A <sub>2</sub>	5.4487	1.5530	89.20	1.78	1.78
4-HP	3.5085				

**Tabelle 21:** Kupfer-vermittelte Aminosäurekondensation ausgehend von Glycin, L-Alanin, CuCl<sub>2</sub> und Harnstoff (je 200 mM) nach 7 d (zweite Auftrennung).

	Peakfläche (10 <sup>-5</sup> a.u. x min)	Dipeptid / 4-HP	C <sub>Probe</sub> (μM)	C <sub>Reaktion</sub> (mM)	Ausbeute (%)	∅ Ausbeute (%)
G <sub>2</sub>	2.5762	0.7255	50.28	1.01	1.01	1.04 ± 0.04
AG + GA	6.0699	1.7095	105.46	2.11	1.06	1.06 ± 0.00
A <sub>2</sub>	5.3851	1.5166	87.11	1.74	1.74	1.76 ± 0.03
4-HP	3.5508					

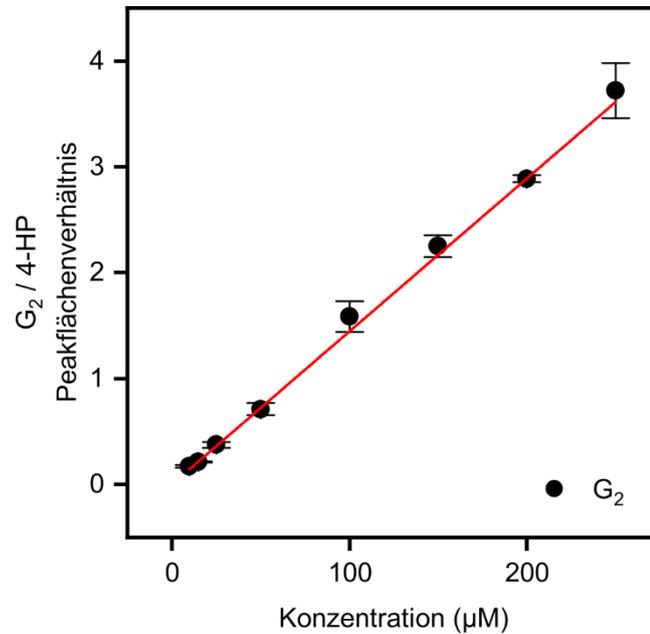
### Auftrennung der Aminosäuremischung auf einer LPA-Kapillare



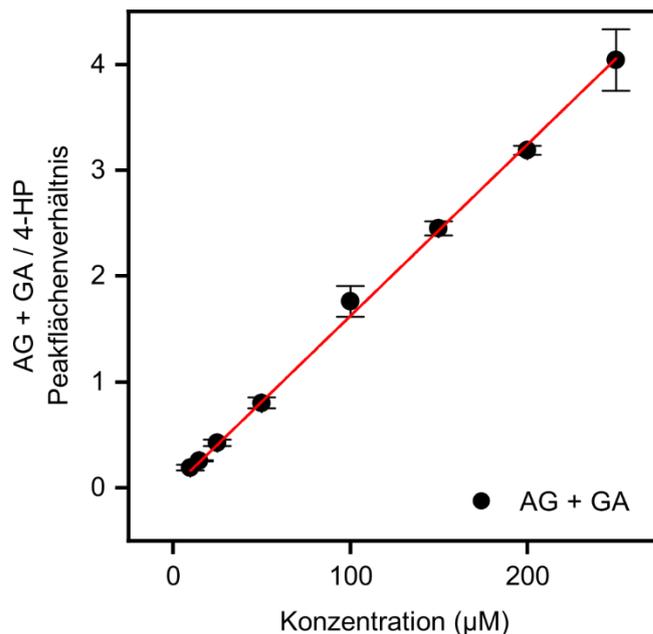
**Abbildung 56:** Elektropherogramm einer Mischung der 20 proteinogenen Aminosäuren und CuCl<sub>2</sub> (je 100 μM). Die Auftrennung erfolgte auf einer LPA-Kapillare (80 cm, 30 kV, 2 M AcOH, 30 mbar, 25 °C).

## 7.1.2 Eisen-vermittelte Peptidbildung

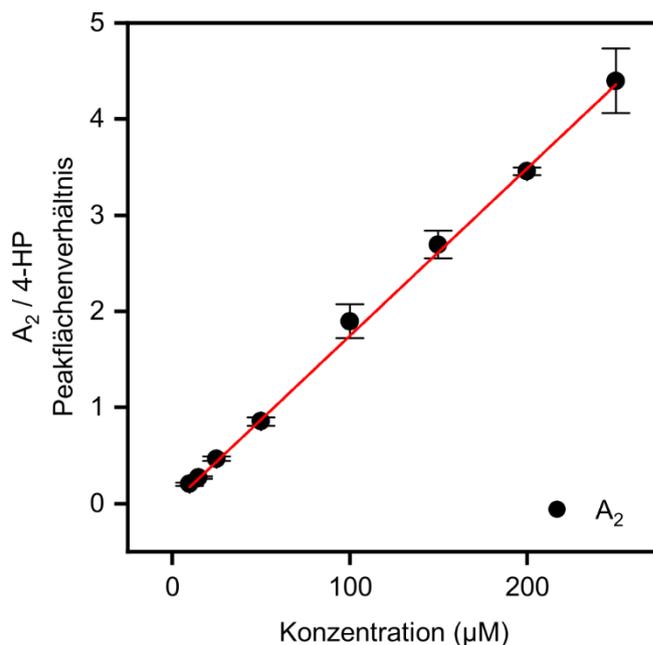
### Eichgeraden



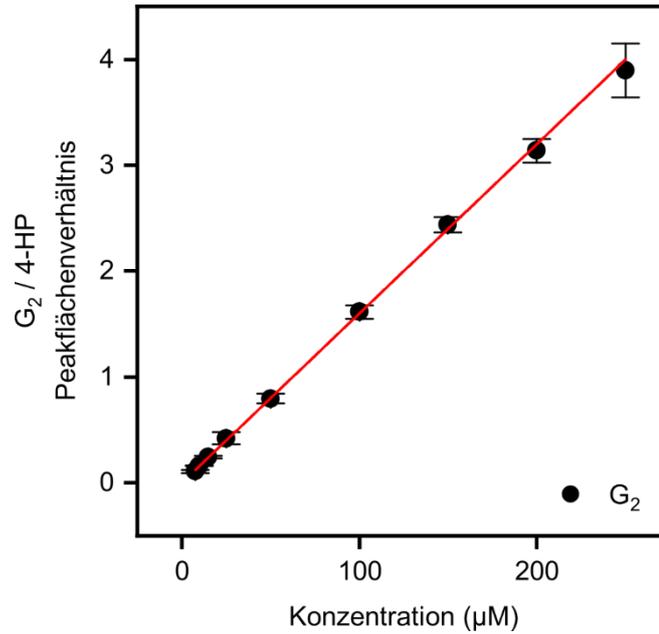
**Abbildung 57:** G<sub>2</sub>-Eichgerade ( $m = 0.01445 \pm 1.37762 \times 10^{-4}$ ,  $R^2 = 0.99936$ ) (Kapillare 1). Die Messbedingungen für die elektrophoretische Auftrennung einer Dipeptidmischung bestehend aus G<sub>2</sub>, AG, GA und A<sub>2</sub> wurden wie folgt gewählt: BGE: 2 M AcOH (pH = 2.0), BFS-Kapillare l = 80 cm; T = 25 °C, druckgetriebene Probeninjektion (30 mbar für 10 s), CE-Inlet: 30 kV. 4-HP (100 µM) diente als interner Standard. Die Elektropherogramme wurden mithilfe eines Leitfähigkeitsdetektors in dreifacher Ausführung aufgezeichnet.



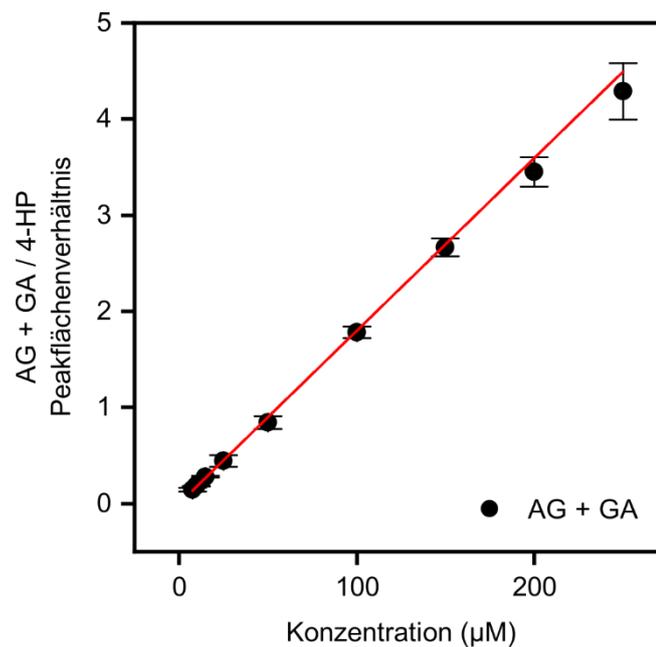
**Abbildung 58:** AG + GA-Eichgerade ( $m = 0.01622 \pm 1.84574 \times 10^{-4}$ ,  $R^2 = 0.99909$ ) (Kapillare 1). Die Messbedingungen für die elektrophoretische Auftrennung einer Dipeptidmischung bestehend aus G<sub>2</sub>, AG, GA und A<sub>2</sub> wurden wie folgt gewählt: BGE: 2 M AcOH (pH = 2.0), BFS-Kapillare l = 80 cm; T = 25 °C, druckgetriebene Probeninjektion (30 mbar für 10 s), CE-*Inlet*: 30 kV. 4-HP (100 µM) diente als interner Standard. Die Elektropherogramme wurden mithilfe eines Leitfähigkeitsdetektors in dreifacher Ausföhrung aufgezeichnet.



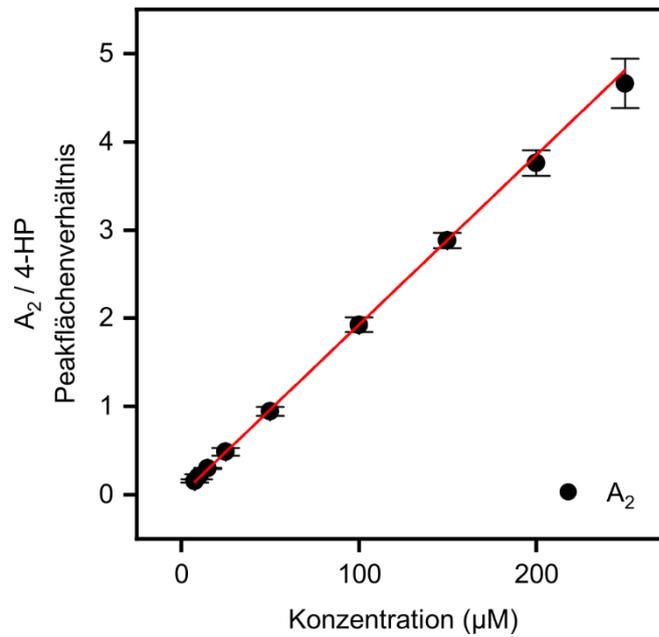
**Abbildung 59:** A<sub>2</sub>-Eichgerade ( $m = 0.01744 \pm 1.73462 \times 10^{-4}$ ,  $R^2 = 0.99931$ ) (Kapillare 1). Die Messbedingungen für die elektrophoretische Auftrennung einer Dipeptidmischung bestehend aus G<sub>2</sub>, AG, GA und A<sub>2</sub> wurden wie folgt gewählt: BGE: 2 M AcOH (pH = 2.0), BFS-Kapillare l = 80 cm; T = 25 °C, druckgetriebene Probeninjektion (30 mbar für 10 s), CE-*Inlet*: 30 kV. 4-HP (100 µM) diente als interner Standard. Die Elektropherogramme wurden mithilfe eines Leitfähigkeitsdetektors in dreifacher Ausföhrung aufgezeichnet.



**Abbildung 60:** G<sub>2</sub>-Eichgerade ( $m = 0.01600 \pm 7.73474 \times 10^{-5}$ ,  $R^2 = 0.99981$ ) (Kapillare 2). Die Messbedingungen für die elektrophoretische Auftrennung einer Dipeptidmischung bestehend aus G<sub>2</sub>, AG, GA und A<sub>2</sub> wurden wie folgt gewählt: BGE: 2 M AcOH (pH = 2.0), BFS-Kapillare l = 80 cm; T = 25 °C, druckgetriebene Probeninjektion (30 mbar für 10 s), CE-*Inlet*: 30 kV. 4-HP (100 µM) diente als interner Standard. Die Elektropherogramme wurden mithilfe eines Leitfähigkeitsdetektors in dreifacher Ausführung aufgezeichnet.



**Abbildung 61:** AG + GA-Eichgerade ( $m = 0.01798 \pm 1.77922 \times 10^{-4}$ ,  $R^2 = 0.99922$ ) (Kapillare 2). Die Messbedingungen für die elektrophoretische Auftrennung einer Dipeptidmischung bestehend aus G<sub>2</sub>, AG, GA und A<sub>2</sub> wurden wie folgt gewählt: BGE: 2 M AcOH (pH = 2.0), BFS-Kapillare l = 80 cm; T = 25 °C, druckgetriebene Probeninjektion (30 mbar für 10 s), CE-*Inlet*: 30 kV. 4-HP (100 µM) diente als interner Standard. Die Elektropherogramme wurden mithilfe eines Leitfähigkeitsdetektors in dreifacher Ausführung aufgezeichnet.



**Abbildung 62:** A<sub>2</sub>-Eichgerade ( $m = 0.01925 \pm 1.56253 \times 10^{-4}$ ,  $R^2 = 0.99947$ ) (Kapillare 2). Die Messbedingungen für die elektrophoretische Auftrennung einer Dipeptidmischung bestehend aus G<sub>2</sub>, AG, GA und A<sub>2</sub> wurden wie folgt gewählt: BGE: 2 M AcOH (pH = 2.0), BFS-Kapillare l = 80 cm; T = 25 °C, druckgetriebene Probeninjektion (30 mbar für 10 s), CE-Inlet: 30 kV. 4-HP (100 µM) diente als interner Standard. Die Elektropherogramme wurden mithilfe eines Leitfähigkeitsdetektors in dreifacher Ausführung aufgezeichnet.

**Ausbeuteberechnung**
**Tabelle 22:** Eisen-vermittelte Aminosäurekondensation ausgehend von Glycin, L-Alanin (je 400 mM, insgesamt 1.00 Äq.), Eisenpulver, Harnstoff (je 0.50 Äq.) und AcOH (0.05 Äq.) nach 7 d (erste Auftrennung, Kapillare 1).

	Peakfläche ( $10^{-5}$ a.u. x min)	Dipeptid / 4-HP	C <sub>Probe</sub> ( $\mu$ M)	C <sub>Reaktion</sub> (mM)	Ausbeute (%)
G <sub>2</sub>	1.3878	0.3722	25.76	1.03	0.52
AG + GA	0.6707	0.1799	11.09	0.44	0.11
A <sub>2</sub>	-	-	-	-	-
4-HP	3.7287				

**Tabelle 23:** Eisen-vermittelte Aminosäurekondensation ausgehend von Glycin, L-Alanin (je 400 mM, insgesamt 1.00 Äq.), Eisenpulver, Harnstoff (je 0.50 Äq.) und AcOH (0.05 Äq.) nach 7 d (zweite Auftrennung, Kapillare 2).

	Peakfläche ( $10^{-5}$ a.u. x min)	Dipeptid / 4-HP	C <sub>Probe</sub> ( $\mu$ M)	C <sub>Reaktion</sub> (mM)	Ausbeute (%)	Ø Ausbeute (%)
G <sub>2</sub>	1.4458	0.4351	27.19	1.09	0.55	0.54 ± 0.02
AG + GA	0.8009	0.2410	13.40	0.54	0.14	0.13 ± 0.02
A <sub>2</sub>	-	-	-	-	-	-
4-HP	3.3231					

**Tabelle 24:** Eisen-vermittelte Aminosäurekondensation ausgehend von Glycin, L-Alanin (je 400 mM, insgesamt 1.00 Äq.), Eisenpulver, Harnstoff (je 0.50 Äq.) und AcOH (0.25 Äq.) nach 7 d (erste Auftrennung, Kapillare 2).

	Peakfläche ( $10^{-5}$ a.u. x min)	Dipeptid / 4-HP	C <sub>Probe</sub> ( $\mu$ M)	C <sub>Reaktion</sub> (mM)	Ausbeute (%)
G <sub>2</sub>	0.8000	0.2417	15.11	0.60	0.30
AG + GA	0.5866	0.1772	9.86	0.39	0.10
A <sub>2</sub>	-	-	-	-	-
4-HP	3.3099				

**Tabelle 25:** Eisen-vermittelte Aminosäurekondensation ausgehend von Glycin, L-Alanin (je 400 mM, insgesamt 1.00 Äq.), Eisenpulver, Harnstoff (je 0.50 Äq.) und AcOH (0.25 Äq.) nach 7 d (zweite Auftrennung, Kapillare 2).

	Peakfläche ( $10^{-5}$ a.u. x min)	Dipeptid / 4-HP	C <sub>Probe</sub> ( $\mu$ M)	C <sub>Reaktion</sub> (mM)	Ausbeute (%)	Ø Ausbeute (%)
G <sub>2</sub>	0.9499	0.2830	17.69	0.71	0.36	0.33 ± 0.04
AG + GA	0.6751	0.2012	11.19	0.45	0.11	0.11 ± 0.01
A <sub>2</sub>	-	-	-	-	-	-
4-HP	3.3564					

**Tabelle 26:** Eisen-vermittelte Aminosäurekondensation ausgehend von Glycin, L-Alanin (je 400 mM, insgesamt 1.00 Äq.), Eisenpulver, Harnstoff und AcOH (je 0.50 Äq.) nach 7 d (erste Auftrennung, Kapillare 2).

	Peakfläche ( $10^{-5}$ a.u. x min)	Dipeptid / 4-HP	C <sub>Probe</sub> ( $\mu$ M)	C <sub>Reaktion</sub> (mM)	Ausbeute (%)
G <sub>2</sub>	0.7355	0.2263	14.14	0.57	0.29
AG + GA	0.4668	0.1436	7.99	0.32	0.08
A <sub>2</sub>	-	-	-	-	-
4-HP	3.2507				

**Tabelle 27:** Eisen-vermittelte Aminosäurekondensation ausgehend von Glycin, L-Alanin (je 400 mM, insgesamt 1.00 Äq.), Eisenpulver, Harnstoff und AcOH (je 0.50 Äq.) nach 7 d (zweite Auftrennung, Kapillare 2).

	Peakfläche ( $10^{-5}$ a.u. x min)	Dipeptid / 4-HP	C <sub>Probe</sub> ( $\mu$ M)	C <sub>Reaktion</sub> (mM)	Ausbeute (%)	Ø Ausbeute (%)
G <sub>2</sub>	0.6048	0.1677	10.48	0.42	0.21	0.25 ± 0.06
AG + GA	0.5777	0.1602	8.91	0.36	0.09	0.09 ± 0.01
A <sub>2</sub>	-	-	-	-	-	-
4-HP	3.6071					

**Tabelle 28:** Eisen-vermittelte Aminosäurekondensation ausgehend von Glycin, L-Alanin (je 400 mM, insgesamt 1.00 Äq.), Harnstoff (0.50 Äq.), Eisenpulver und AcOH (je 0.05 Äq.) nach 7 d (erste Auftrennung, Kapillare 2).

	Peakfläche ( $10^{-5}$ a.u. x min)	Dipeptid / 4-HP	C <sub>Probe</sub> ( $\mu$ M)	C <sub>Reaktion</sub> (mM)	Ausbeute (%)
G <sub>2</sub>	0.4513	0.1565	9.78	0.39	0.20
AG + GA	0.4323	0.1499	8.34	0.33	0.08
A <sub>2</sub>	-	-	-	-	-
4-HP	2.8833				

**Tabelle 29:** Eisen-vermittelte Aminosäurekondensation ausgehend von Glycin, L-Alanin (je 400 mM, insgesamt 1.00 Äq.), Harnstoff (0.50 Äq.), Eisenpulver und AcOH (je 0.05 Äq.) nach 7 d (zweite Auftrennung, Kapillare 2).

	Peakfläche ( $10^{-5}$ a.u. x min)	Dipeptid / 4-HP	C <sub>Probe</sub> ( $\mu$ M)	C <sub>Reaktion</sub> (mM)	Ausbeute (%)	Ø Ausbeute (%)
G <sub>2</sub>	0.7913	0.3007	18.79	0.75	0.38	0.29 ± 0.13
AG + GA	0.5039	0.1915	10.65	0.43	0.11	0.10 ± 0.02
A <sub>2</sub>	-	-	-	-	-	-
4-HP	2.6315					

**Tabelle 30:** Eisen-vermittelte Aminosäurekondensation ausgehend von Glycin, L-Alanin (je 400 mM, insgesamt 1.00 Äq.), Harnstoff (0.50 Äq.), Eisenpulver (0.25 Äq.) und AcOH (0.05 Äq.) nach 7 d (erste Auftrennung, Kapillare 2).

	Peakfläche ( $10^{-5}$ a.u. x min)	Dipeptid / 4-HP	C <sub>Probe</sub> ( $\mu$ M)	C <sub>Reaktion</sub> (mM)	Ausbeute (%)
G <sub>2</sub>	1.3583	0.3884	24.27	0.97	0.49
AG + GA	0.9569	0.2736	15.22	0.61	0.15
A <sub>2</sub>	-	-	-	-	-
4-HP	3.4976				

**Tabelle 31:** Eisen-vermittelte Aminosäurekondensation ausgehend von Glycin, L-Alanin (je 400 mM, insgesamt 1.00 Äq.), Harnstoff (0.50 Äq.), Eisenpulver (0.25 Äq.) und AcOH (0.05 Äq.) nach 7 d (zweite Auftrennung, Kapillare 2).

	Peakfläche ( $10^{-5}$ a.u. x min)	Dipeptid / 4-HP	C <sub>Probe</sub> ( $\mu$ M)	C <sub>Reaktion</sub> (mM)	Ausbeute (%)	Ø Ausbeute (%)
G <sub>2</sub>	1.0130	0.3419	21.37	0.85	0.43	0.46 ± 0.04
AG + GA	0.7152	0.2414	13.43	0.54	0.14	0.15 ± 0.01
A <sub>2</sub>	-	-	-	-	-	-
4-HP	2.9625					

**Tabelle 32:** Eisen-vermittelte Aminosäurekondensation ausgehend von Glycin, L-Alanin (je 400 mM, insgesamt 1.00 Äq.), Harnstoff (0.50 Äq.) und Fe(OAc<sub>2</sub>) (0.05 Äq.) nach 7 d (erste Auftrennung, Kapillare 2).

	Peakfläche ( $10^{-5}$ a.u. x min)	Dipeptid / 4-HP	C <sub>Probe</sub> ( $\mu$ M)	C <sub>Reaktion</sub> (mM)	Ausbeute (%)
G <sub>2</sub>	0.9203	0.2895	18.09	0.72	0.36
AG + GA	0.8398	0.2642	14.69	0.59	0.15
A <sub>2</sub>	-	-	-	-	-
4-HP	3.1788				

**Tabelle 33:** Eisen-vermittelte Aminosäurekondensation ausgehend von Glycin, L-Alanin (je 400 mM, insgesamt 1.00 Äq.), Harnstoff (0.50 Äq.) und Fe(OAc)<sub>2</sub> (0.05 Äq.) nach 7 d (zweite Auftrennung, Kapillare 2).

	Peakfläche ( $10^{-5}$ a.u. x min)	Dipeptid / 4-HP	C <sub>Probe</sub> ( $\mu$ M)	C <sub>Reaktion</sub> (mM)	Ausbeute (%)	Ø Ausbeute (%)
G <sub>2</sub>	0.8826	0.2633	16.46	0.66	0.33	0.35 ± 0.02
AG + GA	1.0136	0.3024	16.82	0.67	0.17	0.16 ± 0.01
A <sub>2</sub>	-	-	-	-	-	-
4-HP	3.3517					

**Tabelle 34:** Eisen-vermittelte Aminosäurekondensation ausgehend von Glycin, L-Alanin (je 400 mM, insgesamt 1.00 Äq.), Harnstoff (0.50 Äq.) und Markasit (FeS<sub>2</sub>) (20.9 mmol/g) nach 7 d (erste Auftrennung, Kapillare 2).

	Peakfläche (10 <sup>-5</sup> a.u. x min)	Dipeptid / 4-HP	C <sub>Probe</sub> (µM)	C <sub>Reaktion</sub> (mM)	Ausbeute (%)
G <sub>2</sub>	0.3806	0.1297	8.11	0.32	0.16
AG + GA	-	-	-	-	-
A <sub>2</sub>	-	-	-	-	-
4-HP	2.9335				

**Tabelle 35:** Eisen-vermittelte Aminosäurekondensation ausgehend von Glycin, L-Alanin (je 400 mM, insgesamt 1.00 Äq.), Harnstoff (0.50 Äq.) und Markasit (FeS<sub>2</sub>) (20.9 mmol/g) nach 7 d (zweite Auftrennung, Kapillare 2).

	Peakfläche (10 <sup>-5</sup> a.u. x min)	Dipeptid / 4-HP	C <sub>Probe</sub> (µM)	C <sub>Reaktion</sub> (mM)	Ausbeute (%)	Ø Ausbeute (%)
G <sub>2</sub>	0.4569	0.1361	8.51	0.34	0.17	0.17 ± 0.01
AG + GA	-	-	-	-	-	-
A <sub>2</sub>	-	-	-	-	-	-
4-HP	3.3574					

**Tabelle 36:** Eisen-vermittelte Aminosäurekondensation ausgehend von Glycin, L-Alanin (je 400 mM, insgesamt 1.00 Äq.), Eisenpulver, Harnstoff (je 0.50 Äq.) und AcOH (0.05 Äq.) nach 29 d (erste Auftrennung, Kapillare 1).

	Peakfläche (10 <sup>-5</sup> a.u. x min)	Dipeptid / 4-HP	C <sub>Probe</sub> (µM)	C <sub>Reaktion</sub> (mM)	Ausbeute (%)
G <sub>2</sub>	7.7758	2.0105	139.13	5.57	2.79
AG + GA	9.5649	2.4730	152.47	6.10	1.53
A <sub>2</sub>	5.4845	1.4180	81.31	3.25	1.63
4-HP	3.8677				

**Tabelle 37:** Eisen-vermittelte Aminosäurekondensation ausgehend von Glycin, L-Alanin (je 400 mM, insgesamt 1.00 Äq.), Eisenpulver, Harnstoff (je 0.50 Äq.) und AcOH (0.05 Äq.) nach 29 d (erste Auftrennung, Kapillare 2).

	Peakfläche ( $10^{-5}$ a.u. x min)	Dipeptid / 4-HP	C <sub>Probe</sub> ( $\mu$ M)	C <sub>Reaktion</sub> (mM)	Ausbeute (%)	Ø Ausbeute (%)
G <sub>2</sub>	5.8698	1.7238	107.74	4.31	2.16	2.48 ± 0.45
AG + GA	7.4464	2.1868	121.63	4.87	1.22	1.38 ± 0.22
A <sub>2</sub>	4.3633	1.2814	66.57	2.66	1.33	1.48 ± 0.21
4-HP	3.4051					

### Peakflächen der Tetra- und Pentapeptide

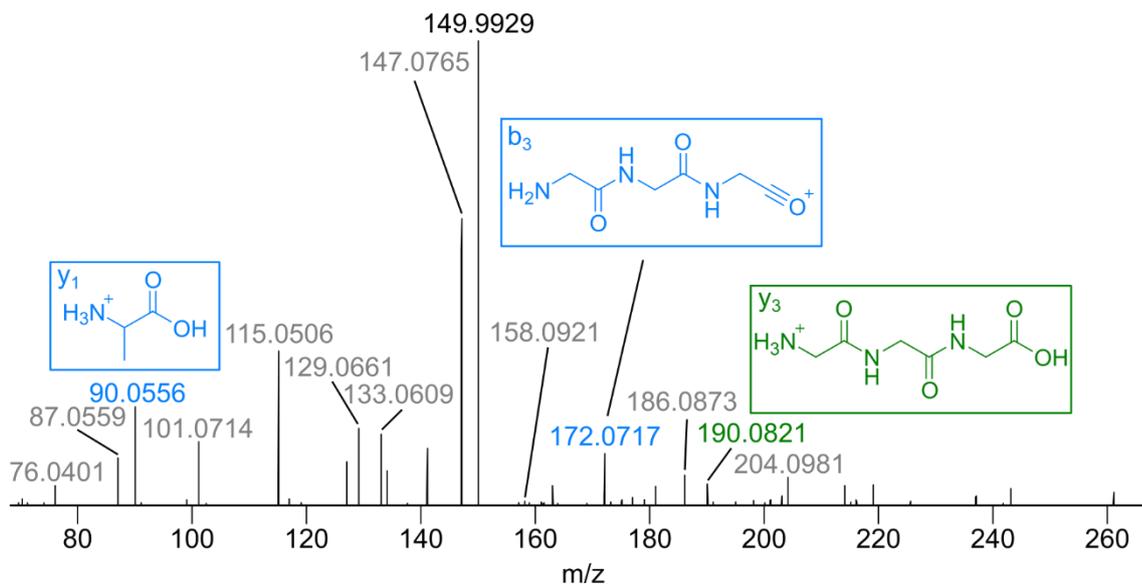
**Tabelle 38:** CE-MS-Peakflächen von Tetra- und Pentapeptidprodukten der Reaktion ausgehend von Glycin, L-Alanin (je 400 mM, insgesamt 1.00 Äq.), Eisenpulver, Harnstoff (je 0.50 Äq.) und AcOH (0.05 Äq.) nach 29 d. Bei Produkten in Klammern bezieht sich die angegebene Peakfläche auf die Gesamtheit der erhaltenen Sequenzen.

	Peakfläche (counts x min x $10^7$ ) nach 29 d
G <sub>4</sub>	(2.49 ± 0.39)
A <sub>4</sub>	(0.34 ± 0.08)
(AG <sub>3</sub> )	(3.58 ± 0.77)
(A <sub>2</sub> G <sub>2</sub> )	(3.59 ± 0.99)
(A <sub>3</sub> G)	(1.24 ± 0.23)
G <sub>5</sub>	(0.16 ± 0.01)
(AG <sub>4</sub> )	(0.43 ± 0.13)
(A <sub>2</sub> G <sub>3</sub> )	(0.44 ± 0.19)
(A <sub>3</sub> G <sub>2</sub> )	(0.19 ± 0.13)

**Peptidsequenzen im Glycin-, L-Alanin-Modellsystem**
**Tabelle 39:** Zusammenfassung der durch MS/MS-Analyse eindeutig zuordenbaren Peptidsequenzen aus den Reaktionen mit Glycin und L-Alanin (je 400 mM, insgesamt 1.00 Äq.).

Eisenverbindung	AcOH (Äq.)	Harnstoff (Äq.)	Reaktionsdauer (d)	<i>m/z</i>	Sequenzen
Eisenpulver (0.50 Äq.)	0.05	0.25	7	147.0764	-
Eisenpulver (0.50 Äq.)	0.05	0.50	7	147.0764	AG, GA
				204.0979	G <sub>2</sub> A
Eisenpulver (0.50 Äq.)	0.25	0.50	7	147.0764	AG, GA
				204.0979	G <sub>2</sub> A
Eisenpulver (0.50 Äq.)	0.50	0.50	7	147.0764	GA
				204.0979	AG <sub>2</sub> , G <sub>2</sub> A
Eisenpulver (0.50 Äq.)	-	0.50	7	147.0764	GA
Fe(OAc) <sub>2</sub> (0.05 Äq.)	-	0.50	7	147.0764	GA
				204.0979	G <sub>2</sub> A
Eisenpulver (0.05 Äq.)	0.05	0.50	7	147.0764	GA
Eisenpulver (0.25 Äq.)	0.05	0.50	7	147.0764	AG, GA
Eisenpulver (0.50 Äq.)	0.05	0.50	1	147.0764	GA
Eisenpulver (0.50 Äq.)	0.05	0.50	3	147.0764	GA
Eisenpulver (0.50 Äq.)	0.05	0.50	29	147.0764	AG, GA
				204.0979	AG <sub>2</sub> , G <sub>2</sub> A
				218.1135	A <sub>2</sub> G, GA <sub>2</sub>
				261.1194	AG <sub>3</sub> , G <sub>3</sub> A
				275.1350	A <sub>2</sub> G <sub>2</sub> , G <sub>2</sub> A <sub>2</sub>
				318.1408	AG <sub>4</sub> , G <sub>4</sub> A
				332.1565	A <sub>2</sub> G <sub>3</sub> , G <sub>3</sub> A <sub>2</sub>
Markasit (20.9 mmol/g)	-	0.50	7	147.0764	GA

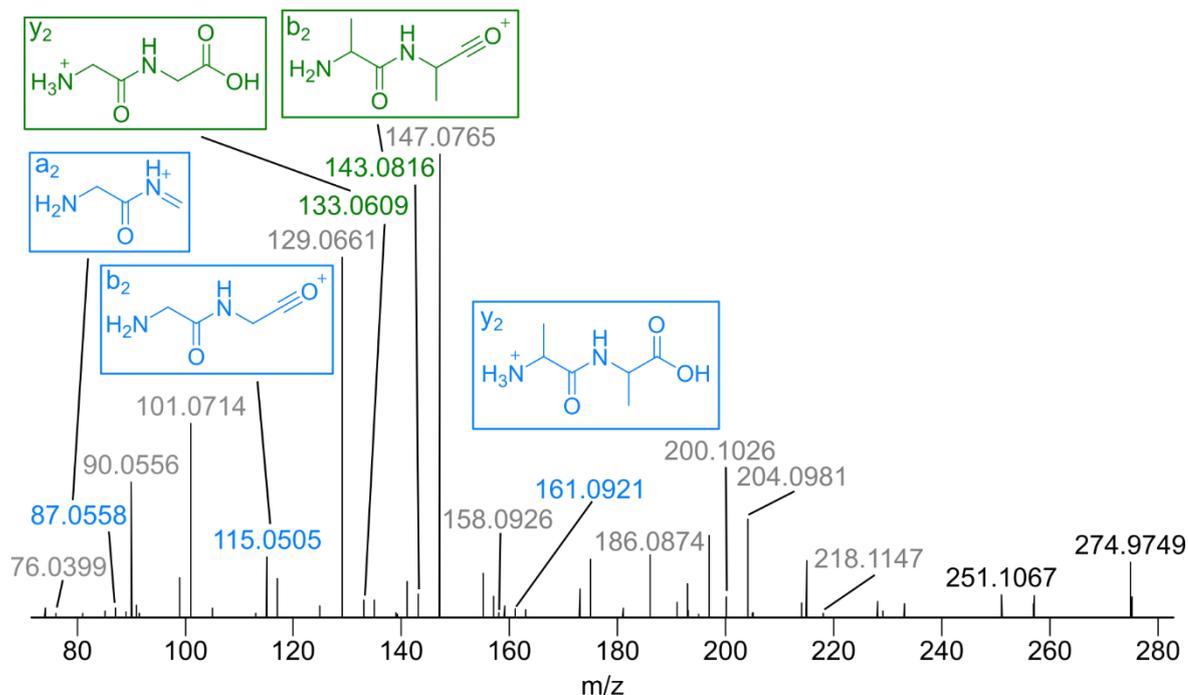
**MS/MS-Spektren der Tetra- und Pentapeptide**



**Abbildung 63:** MS/MS-Spektrum des Signals der (AG<sub>3</sub>)-Tetrapeptide ( $m/z = 261.1194$ ) ausgehend von Glycin, L-Alanin (je 400 mM, insgesamt 1.00 Äq.), Eisenpulver, Harnstoff (je 0.50 Äq.) und Essigsäure (0.05 Äq.) nach 29 d. AG<sub>3</sub>-Fragmentationen: grün. G<sub>3</sub>A-Fragmentationen: blau.  $m/z$  Werte, die isomeren Strukturen verschiedener Sequenzen zuordenbar sind: grau. Die kollisionsinduzierte Dissoziation erfolgte bei einer relativen Fragmentierungsenergie von 30%.

**Tabelle 40:** Zuordnung der grau gekennzeichneten Fragmentationen aus Abbildung 63.

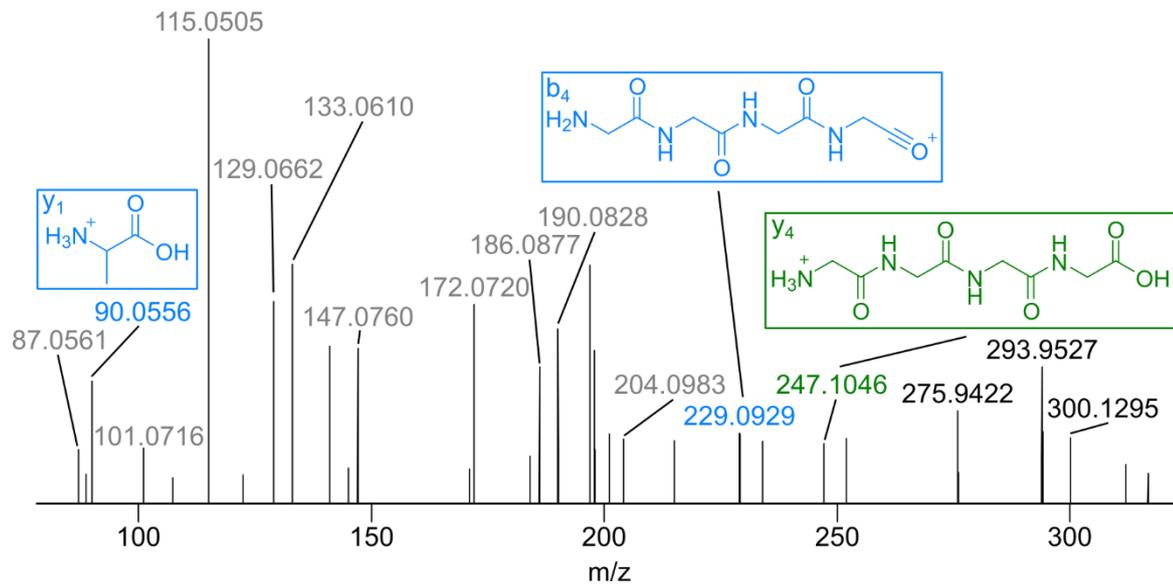
$m/z$ gefunden	AG <sub>3</sub>	GAG <sub>2</sub>	G <sub>2</sub> AG	G <sub>3</sub> A
76.0401	y <sub>1</sub>	y <sub>1</sub>	y <sub>1</sub>	-
87.0559	-	-	a <sub>2</sub>	a <sub>2</sub>
101.0714	a <sub>2</sub>	a <sub>2</sub>	-	-
115.0506	-	-	b <sub>2</sub>	b <sub>2</sub>
129.0661	b <sub>2</sub>	b <sub>2</sub>	-	-
133.0609	y <sub>2</sub>	y <sub>2</sub>	-	-
147.0765	-	-	y <sub>2</sub>	y <sub>2</sub>
158.0921	a <sub>3</sub>	a <sub>3</sub>	a <sub>3</sub>	-
186.0873	b <sub>3</sub>	b <sub>3</sub>	b <sub>3</sub>	-
204.0981	-	y <sub>3</sub>	y <sub>3</sub>	y <sub>3</sub>



**Abbildung 64:** MS/MS-Spektrum des Signals der (A<sub>2</sub>G<sub>2</sub>)-Tetrapeptide ( $m/z = 275.1350$ ) ausgehend von Glycin, L-Alanin (je 400 mM, insgesamt 1.00 Äq.), Eisenpulver, Harnstoff (je 0.50 Äq.) und Essigsäure (0.05 Äq.) nach 29 d. A<sub>2</sub>G<sub>2</sub>-Fragmentationen: grün. G<sub>2</sub>A<sub>2</sub>-Fragmentationen: blau.  $m/z$  Werte, die isomeren Strukturen verschiedener Sequenzen zuordenbar sind: grau. Die kollisionsinduzierte Dissoziation erfolgte bei einer relativen Fragmentierungsenergie von 30%.

**Tabelle 41:** Zuordnung der grau gekennzeichneten Fragmentionen aus Abbildung 64.

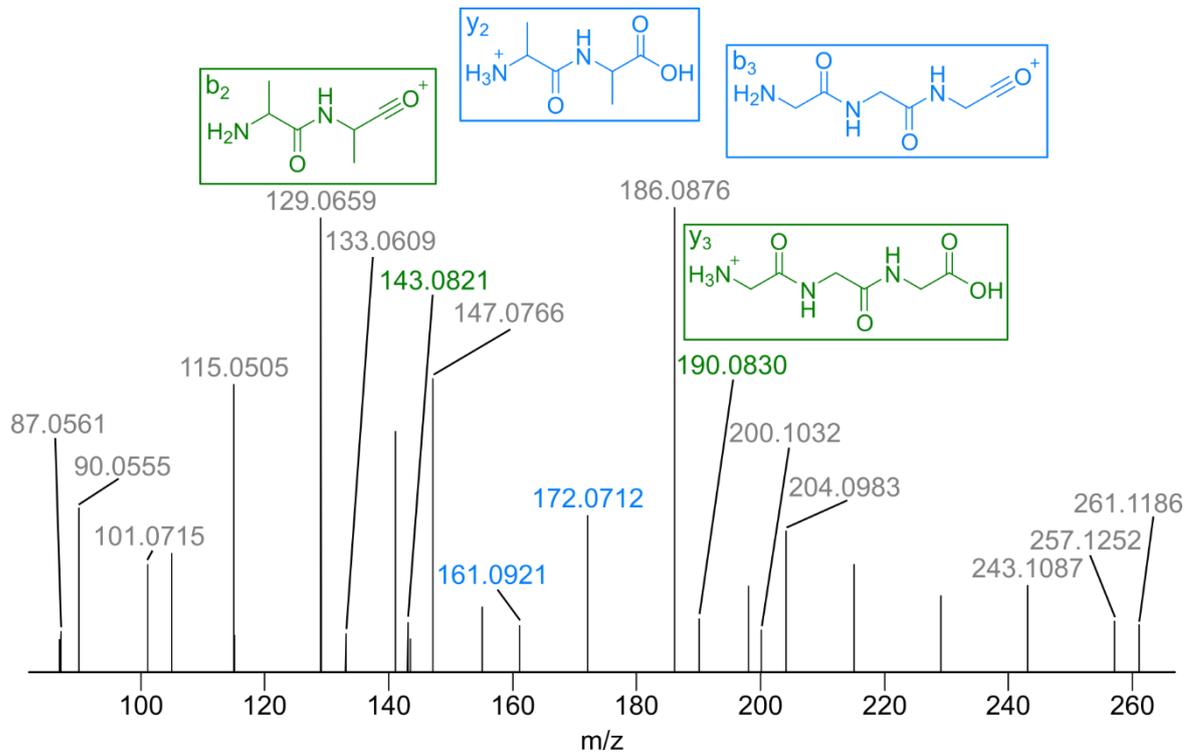
$m/z$ gefunden	A <sub>2</sub> G <sub>2</sub>	AGAG	AG <sub>2</sub> A	GA <sub>2</sub> G	G <sub>2</sub> A <sub>2</sub>	GAGA
76.0399	y <sub>1</sub>	y <sub>1</sub>	-	y <sub>1</sub>	-	-
90.0556	-	-	y <sub>1</sub>	-	y <sub>1</sub>	y <sub>1</sub>
101.0714	-	a <sub>2</sub>	a <sub>2</sub>	a <sub>2</sub>	-	a <sub>2</sub>
129.0661	-	b <sub>2</sub>	b <sub>2</sub>	b <sub>2</sub>	-	b <sub>2</sub>
147.0765	-	y <sub>2</sub>	y <sub>2</sub>	y <sub>2</sub>	-	y <sub>2</sub>
158.0926	-	-	a <sub>3</sub>	-	a <sub>3</sub>	a <sub>3</sub>
186.0874	-	-	b <sub>3</sub>	-	b <sub>3</sub>	b <sub>3</sub>
200.1026	b <sub>3</sub>	b <sub>3</sub>	-	b <sub>3</sub>	-	-
204.0981	y <sub>3</sub>	y <sub>3</sub>	y <sub>3</sub>	-	-	-
218.1147	-	-	-	y <sub>3</sub>	y <sub>3</sub>	y <sub>3</sub>



**Abbildung 65:** MS/MS-Spektrum des Signals der (AG<sub>4</sub>)-Pentapeptide ( $m/z = 318.1408$ ) ausgehend von Glycin, L-Alanin (je 400 mM, insgesamt 1.00 Äq.), Eisenpulver, Harnstoff (je 0.50 Äq.) und Essigsäure (0.05 Äq.) nach 29 d. AG<sub>4</sub>-Fragmentationen: grün. G<sub>4</sub>A-Fragmentationen: blau.  $m/z$  Werte, die isomeren Strukturen verschiedener Sequenzen zuordenbar sind: grau. Die kollisionsinduzierte Dissoziation erfolgte bei einer relativen Fragmentierungsenergie von 30%.

**Tabelle 42:** Zuordnung der grau gekennzeichneten Fragmentationen aus Abbildung 65.

$m/z$ gefunden	AG <sub>4</sub>	GAG <sub>3</sub>	G <sub>2</sub> AG <sub>2</sub>	G <sub>3</sub> AG	G <sub>4</sub> A
87.0561	-	-	a <sub>2</sub>	a <sub>2</sub>	a <sub>2</sub>
101.0716	a <sub>2</sub>	a <sub>2</sub>	-	-	-
115.0505	-	-	b <sub>2</sub>	b <sub>2</sub>	b <sub>2</sub>
129.0662	b <sub>2</sub>	b <sub>2</sub>	-	-	-
133.0610	y <sub>2</sub>	y <sub>2</sub>	y <sub>2</sub>	-	-
147.0760	-	-	-	y <sub>2</sub>	y <sub>2</sub>
172.0720	-	-	-	b <sub>3</sub>	b <sub>3</sub>
186.0877	b <sub>3</sub>	b <sub>3</sub>	b <sub>3</sub>	-	-
190.0828	y <sub>3</sub>	y <sub>3</sub>	-	-	-
204.0983	-	-	y <sub>3</sub>	y <sub>3</sub>	y <sub>3</sub>



**Abbildung 66:** MS/MS-Spektrum des Signals der (A<sub>2</sub>G<sub>3</sub>)-Pentapeptide ( $m/z = 332.1565$ ) ausgehend von Glycin, L-Alanin (je 400  $\mu\text{M}$ , insgesamt 1.00  $\mu\text{M}$ ), Eisenpulver, Harnstoff (je 0.50  $\mu\text{M}$ ) und Essigsäure (0.05  $\mu\text{M}$ ) nach 29 d. A<sub>2</sub>G<sub>3</sub>-Fragmentationen: grün. G<sub>3</sub>A<sub>2</sub>-Fragmentationen: blau.  $m/z$  Werte, die isomeren Strukturen verschiedener Sequenzen zuordenbar sind: grau. Die kollisionsinduzierte Dissoziation erfolgte bei einer relativen Fragmentierungsenergie von 30%.

**Tabelle 43.** Zuordnung der grau gekennzeichneten Fragmentionen aus Abbildung 66.

<i>m/z</i> gefunden	A <sub>2</sub> G <sub>3</sub>	AGAG <sub>2</sub>	AG <sub>2</sub> AG	AG <sub>3</sub> A	G <sub>3</sub> A <sub>2</sub>	GA <sub>2</sub> G <sub>2</sub>	G <sub>2</sub> A <sub>2</sub> G	GAGAG	GAG <sub>2</sub> A	G <sub>2</sub> AGA
87.0561	-	-	-	-	a <sub>2</sub>	-	a <sub>2</sub>	-	-	a <sub>2</sub>
90.0555	-	-	-	y <sub>1</sub>	y <sub>1</sub>	-	-	-	y <sub>1</sub>	y <sub>1</sub>
101.0715	-	a <sub>2</sub>	a <sub>2</sub>	a <sub>2</sub>	-	a <sub>2</sub>	-	a <sub>2</sub>	a <sub>2</sub>	-
115.0505	-	-	-	-	b <sub>2</sub>	-	b <sub>2</sub>	-	-	b <sub>2</sub>
129.0659	-	b <sub>2</sub>	b <sub>2</sub>	b <sub>2</sub>	-	b <sub>2</sub>	-	b <sub>2</sub>	b <sub>2</sub>	-
133.0609	y <sub>2</sub>	y <sub>2</sub>	-	-	-	y <sub>2</sub>	-	-	-	-
147.0766	-	-	y <sub>2</sub>	y <sub>2</sub>	-	-	y <sub>2</sub>	y <sub>2</sub>	y <sub>2</sub>	y <sub>2</sub>
186.0876	-	-	b <sub>3</sub>	b <sub>3</sub>	-	-	b <sub>3</sub>	b <sub>3</sub>	b <sub>3</sub>	b <sub>3</sub>
200.1032	b <sub>3</sub>	b <sub>3</sub>	-	-	-	b <sub>3</sub>	-	-	-	-
204.0983	-	y <sub>3</sub>	y <sub>3</sub>	y <sub>3</sub>	-	y <sub>3</sub>	-	y <sub>3</sub>	y <sub>3</sub>	-
243.1087	-	-	-	b <sub>4</sub>	b <sub>4</sub>	-	-	-	b <sub>4</sub>	b <sub>4</sub>
257.1252	b <sub>4</sub>	b <sub>4</sub>	b <sub>4</sub>	-	-	b <sub>4</sub>	b <sub>4</sub>	b <sub>4</sub>	-	-
261.1186	y <sub>4</sub>	y <sub>4</sub>	y <sub>4</sub>	y <sub>4</sub>	-	-	-	-	-	-

## 7.2 Phosphorylierung in flüssigem Schwefeldioxid

### 7.2.1 Versuche mit Adenosin als Modellsubstrat

#### Struktur der Dinukleotidreferenz

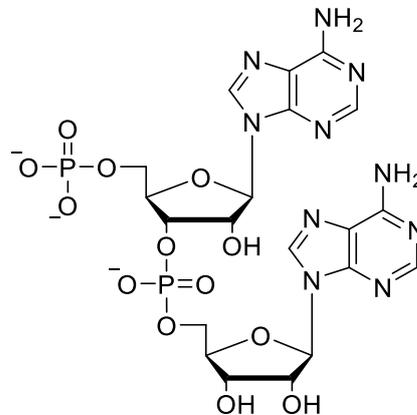


Abbildung 67: Struktur von 5'-Adenylsäure-3', 5'-adenosinphosphat (5'-p<sup>V</sup>-A-3'-p<sup>V</sup>-5'-A).

#### Eichgeraden

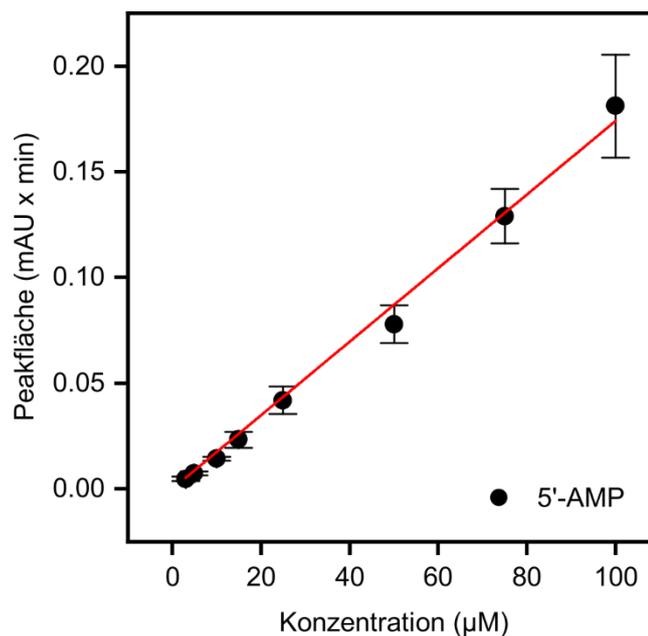
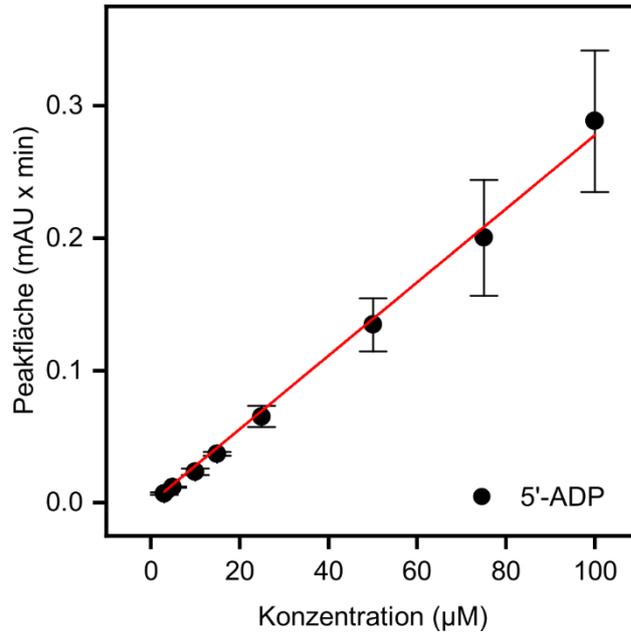
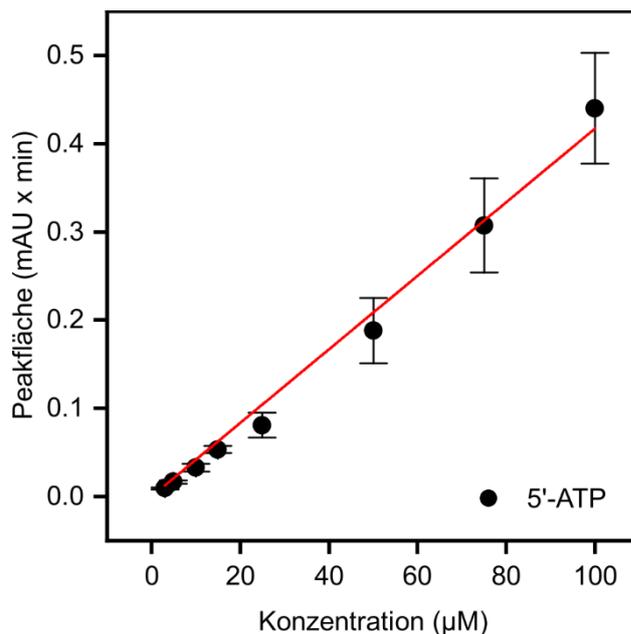


Abbildung 68: 5'-AMP-Eichgerade ( $m = 0.00174 \pm 3.42621 \times 10^{-5}$ ,  $R^2 = 0.9973$ ). Die Messbedingungen für die elektrophoretische Auftrennung wurden wie folgt gewählt: BGE: 30 mM  $\text{NH}_4\text{FA}$  (pH = 9.5), BFS-Kapillare  $l = 80$  cm;  $T = 25$  °C, druckgetriebene Probeninjektion (30 mbar für 10 s), CE-*Inlet*: 30 kV, Detektion durch UV-Absorption bei  $\lambda = 254$  nm. Die Elektropherogramme wurden in dreifacher Ausführung aufgezeichnet.



**Abbildung 69:** 5'-ADP-Eichgerade ( $m = 0.00278 \pm 4.41685 \times 10^{-5}$ ,  $R^2 = 0.99823$ ). Die Messbedingungen für die elektrophoretische Auftrennung wurden wie folgt gewählt: BGE: 30 mM  $\text{NH}_4\text{FA}$  (pH = 9.5), BFS-Kapillare  $l = 80$  cm;  $T = 25$  °C, druckgetriebene Probeninjektion (30 mbar für 10 s), CE-*Inlet*: 30 kV, Detektion durch UV-Absorption bei  $\lambda = 254$  nm. Die Elektropherogramme wurden in dreifacher Ausführung aufgezeichnet.



**Abbildung 70:** 5'-ATP-Eichgerade ( $m = 0.00417 \pm 1.14115 \times 10^{-4}$ ,  $R^2 = 0.99479$ ). Die Messbedingungen für die elektrophoretische Auftrennung wurden wie folgt gewählt: BGE: 30 mM  $\text{NH}_4\text{FA}$  (pH = 9.5), BFS-Kapillare  $l = 80$  cm;  $T = 25$  °C, druckgetriebene Probeninjektion (30 mbar für 10 s), CE-*Inlet*: 30 kV, Detektion durch UV-Absorption bei  $\lambda = 254$  nm. Die Elektropherogramme wurden in dreifacher Ausführung aufgezeichnet.

## Ausbeuteberechnung

**Tabelle 44:** Phosphorylierung von Adenosin (100 mM, 1.00 Äq.) mit  $\text{H}_3\text{PO}_3$  (1.00 Äq.) nach 7 d (erste Auftrennung). Die Probe wurde bezogen auf die anfängliche Nukleosidkonzentration auf 1 mM verdünnt.

	Peakfläche (mAU x min)	$C_{\text{Probe}}$ ( $\mu\text{M}$ )	$C_{\text{Reaktion}}$ (mM)	Ausbeute (%)
5'-AMP	0.1311	75.35	7.54	7.54
5'-ADP	0.0111	3.98	0.40	0.40

**Tabelle 45:** Phosphorylierung von Adenosin (100 mM, 1.00 Äq.) mit  $\text{H}_3\text{PO}_3$  (1.00 Äq.) nach 7 d (zweite Auftrennung). Die Probe wurde bezogen auf die anfängliche Nukleosidkonzentration auf 1 mM verdünnt.

	Peakfläche (mAU x min)	$C_{\text{Probe}}$ ( $\mu\text{M}$ )	$C_{\text{Reaktion}}$ (mM)	Ausbeute (%)	Ø Ausbeute (%)
5'-AMP	0.1403	80.66	8.07	8.07	$7.80 \pm 0.38$
5'-ADP	0.0124	4.46	0.45	0.45	$0.42 \pm 0.03$

**Tabelle 46:** Phosphorylierung von Adenosin (100 mM, 1.00 Äq.) mit  $\text{H}_3\text{PO}_3$  (3.00 Äq.) nach 7 d (erste Auftrennung). In Bezug auf die anfängliche Nukleosidkonzentration wurde die Probe auf 300  $\mu\text{M}$  (zur Bestimmung der 5'-AMP-Ausbeute) bzw. auf 1 mM (zur Bestimmung der 5'-ADP-Ausbeute) verdünnt.

	Peakfläche (mAU x min)	$C_{\text{Probe}}$ ( $\mu\text{M}$ )	$C_{\text{Reaktion}}$ (mM)	Ausbeute (%)
5'-AMP	0.0955	54.87	18.29	18.29
5'-ADP	0.0245	8.81	0.88	0.88

**Tabelle 47:** Phosphorylierung von Adenosin (100 mM, 1.00 Äq.) mit  $\text{H}_3\text{PO}_3$  (3.00 Äq.) nach 7 d (zweite Auftrennung). In Bezug auf die anfängliche Nukleosidkonzentration wurde die Probe auf 300  $\mu\text{M}$  (zur Bestimmung der 5'-AMP-Ausbeute) bzw. auf 1 mM (zur Bestimmung der 5'-ADP-Ausbeute) verdünnt.

	Peakfläche (mAU x min)	$C_{\text{Probe}}$ ( $\mu\text{M}$ )	$C_{\text{Reaktion}}$ (mM)	Ausbeute (%)	Ø Ausbeute (%)
5'-AMP	0.0912	52.42	17.47	17.47	$17.88 \pm 0.58$
5'-ADP	0.0264	9.50	0.95	0.95	$0.92 \pm 0.05$

**Tabelle 48:** Phosphorylierung von Adenosin (100 mM, 1.00 Äq.) mit  $H_3PO_3$  (5.00 Äq.) nach 7 d (erste Auftrennung). In Bezug auf die anfängliche Nukleosidkonzentration wurde die Probe auf 500  $\mu M$  (zur Bestimmung der 5'-AMP-Ausbeute) bzw. auf 1 mM (zur Bestimmung der 5'-ADP-Ausbeute) verdünnt.

	Peakfläche (mAU x min)	C <sub>Probe</sub> ( $\mu M$ )	C <sub>Reaktion</sub> (mM)	Ausbeute (%)
5'-AMP	0.1305	75.02	15.00	15.00
5'-ADP	0.0103	3.72	0.37	0.37

**Tabelle 49:** Phosphorylierung von Adenosin (100 mM, 1.00 Äq.) mit  $H_3PO_3$  (5.00 Äq.) nach 7 d (zweite Auftrennung). In Bezug auf die anfängliche Nukleosidkonzentration wurde die Probe auf 500  $\mu M$  (zur Bestimmung der 5'-AMP-Ausbeute) bzw. auf 1 mM (zur Bestimmung der 5'-ADP-Ausbeute) verdünnt.

	Peakfläche (mAU x min)	C <sub>Probe</sub> ( $\mu M$ )	C <sub>Reaktion</sub> (mM)	Ausbeute (%)	Ø Ausbeute (%)
5'-AMP	0.1144	65.75	13.15	13.15	14.08 ± 1.31
5'-ADP	0.0098	3.52	0.35	0.35	0.36 ± 0.01

**Tabelle 50:** Phosphorylierung von Adenosin (100 mM, 1.00 Äq.) mit  $H_3PO_3$  (3.00 Äq.) in Gegenwart von Harnstoff (1.00 Äq.) nach 7 d (erste Auftrennung). In Bezug auf die anfängliche Nukleosidkonzentration wurde die Probe auf 200  $\mu M$  (zur Bestimmung der 5'-AMP-Ausbeute) bzw. auf 500  $\mu M$  (zur Bestimmung der 5'-ADP-Ausbeute) verdünnt.

	Peakfläche (mAU x min)	C <sub>Probe</sub> ( $\mu M$ )	C <sub>Reaktion</sub> (mM)	Ausbeute (%)
5'-AMP	0.1095	62.91	31.45	31.45
5'-ADP	0.0316	11.38	2.28	2.28

**Tabelle 51:** Phosphorylierung von Adenosin (100 mM, 1.00 Äq.) mit  $H_3PO_3$  (3.00 Äq.) in Gegenwart von Harnstoff (1.00 Äq.) nach 7 d (zweite Auftrennung). In Bezug auf die anfängliche Nukleosidkonzentration wurde die Probe auf 200  $\mu M$  (zur Bestimmung der 5'-AMP-Ausbeute) bzw. auf 500  $\mu M$  (zur Bestimmung der 5'-ADP-Ausbeute) verdünnt.

	Peakfläche (mAU x min)	C <sub>Probe</sub> ( $\mu M$ )	C <sub>Reaktion</sub> (mM)	Ausbeute (%)	Ø Ausbeute (%)
5'-AMP	0.0764	43.90	21.95	21.95	26.70 ± 6.72
5'-ADP	0.0303	10.90	2.18	2.18	2.23 ± 0.07

**Tabelle 52:** Phosphorylierung von Adenosin (100 mM, 1.00 Äq.) mit  $H_3PO_3$  (3.00 Äq.) in Gegenwart von Harnstoff (3.00 Äq.) nach 7 d (erste Auftrennung). In Bezug auf die anfängliche Nukleosidkonzentration wurde die Probe auf 250  $\mu M$  (zur Bestimmung der 5'-AMP-Ausbeute) bzw. auf 1 mM (zur Bestimmung der 5'-ADP-Ausbeute) verdünnt.

	Peakfläche (mAU x min)	$C_{Probe}$ ( $\mu M$ )	$C_{Reaktion}$ (mM)	Ausbeute (%)
5'-AMP	0.1093	62.84	25.14	25.14
5'-ADP	0.0463	16.64	1.66	1.66

**Tabelle 53:** Phosphorylierung von Adenosin (100 mM, 1.00 Äq.) mit  $H_3PO_3$  (3.00 Äq.) in Gegenwart von Harnstoff (3.00 Äq.) nach 7 d (zweite Auftrennung). In Bezug auf die anfängliche Nukleosidkonzentration wurde die Probe auf 250  $\mu M$  (zur Bestimmung der 5'-AMP-Ausbeute) bzw. auf 1 mM (zur Bestimmung der 5'-ADP-Ausbeute) verdünnt.

	Peakfläche (mAU x min)	$C_{Probe}$ ( $\mu M$ )	$C_{Reaktion}$ (mM)	Ausbeute (%)	$\emptyset$ Ausbeute (%)
5'-AMP	0.0630	36.18	14.47	14.47	19.80 $\pm$ 7.54
5'-ADP	0.0424	15.26	1.53	1.53	1.59 $\pm$ 0.10

**Tabelle 54:** Phosphorylierung von Adenosin (25.0 mM, 1.00 Äq.) mit  $H_3PO_3$  (1.00 Äq.) nach 7 d (erste Auftrennung). In Bezug auf die anfängliche Nukleosidkonzentration wurde die Probe auf 500  $\mu M$  (zur Bestimmung der 5'-AMP-Ausbeute) bzw. auf 1 mM (zur Bestimmung der 5'-ADP-Ausbeute) verdünnt.

	Peakfläche (mAU x min)	$C_{Probe}$ ( $\mu M$ )	$C_{Reaktion}$ (mM)	Ausbeute (%)
5'-AMP	0.1090	62.66	3.13	12.53
5'-ADP	0.0174	6.26	0.16	0.63

**Tabelle 55:** Phosphorylierung von Adenosin (25.0 mM, 1.00 Äq.) mit  $H_3PO_3$  (1.00 Äq.) nach 7 d (zweite Auftrennung). In Bezug auf die anfängliche Nukleosidkonzentration wurde die Probe auf 500  $\mu M$  (zur Bestimmung der 5'-AMP-Ausbeute) bzw. auf 1 mM (zur Bestimmung der 5'-ADP-Ausbeute) verdünnt.

	Peakfläche (mAU x min)	$C_{Probe}$ ( $\mu M$ )	$C_{Reaktion}$ (mM)	Ausbeute (%)	$\emptyset$ Ausbeute (%)
5'-AMP	0.1240	71.24	3.56	14.25	13.39 $\pm$ 1.21
5'-ADP	0.0201	7.25	0.18	0.72	0.68 $\pm$ 0.07

**Tabelle 56:** Phosphorylierung von Adenosin (50.0 mM, 1.00 Äq.) mit H<sub>3</sub>PO<sub>3</sub> (1.00 Äq.) nach 7 d (erste Auftrennung). In Bezug auf die anfängliche Nukleosidkonzentration wurde die Probe auf 500 µM (zur Bestimmung der 5'-AMP-Ausbeute) bzw. auf 1 mM (zur Bestimmung der 5'-ADP-Ausbeute) verdünnt.

	Peakfläche (mAU x min)	C <sub>Probe</sub> (µM)	C <sub>Reaktion</sub> (mM)	Ausbeute (%)
5'-AMP	0.0936	53.80	5.38	10.76
5'-ADP	0.0127	4.58	0.23	0.46

**Tabelle 57:** Phosphorylierung von Adenosin (50.0 mM, 1.00 Äq.) mit H<sub>3</sub>PO<sub>3</sub> (1.00 Äq.) nach 7 d (zweite Auftrennung). In Bezug auf die anfängliche Nukleosidkonzentration wurde die Probe auf 500 µM (zur Bestimmung der 5'-AMP-Ausbeute) bzw. auf 1 mM (zur Bestimmung der 5'-ADP-Ausbeute) verdünnt.

	Peakfläche (mAU x min)	C <sub>Probe</sub> (µM)	C <sub>Reaktion</sub> (mM)	Ausbeute (%)	Ø Ausbeute (%)
5'-AMP	0.0855	49.13	4.91	9.83	10.29 ± 0.66
5'-ADP	0.0143	5.16	0.26	0.52	0.49 ± 0.04

**Tabelle 58:** Phosphorylierung von Adenosin (400 mM, 1.00 Äq.) mit H<sub>3</sub>PO<sub>3</sub> (1.00 Äq.) nach 7 d (erste Auftrennung). Die Probe wurde bezogen auf die anfängliche Nukleosidkonzentration auf 1 mM verdünnt.

	Peakfläche (mAU x min)	C <sub>Probe</sub> (µM)	C <sub>Reaktion</sub> (mM)	Ausbeute (%)
5'-AMP	0.1043	59.94	23.97	5.99

**Tabelle 59:** Phosphorylierung von Adenosin (400 mM, 1.00 Äq.) mit H<sub>3</sub>PO<sub>3</sub> (1.00 Äq.) nach 7 d (zweite Auftrennung). Die Probe wurde bezogen auf die anfängliche Nukleosidkonzentration auf 1 mM verdünnt.

	Peakfläche (mAU x min)	C <sub>Probe</sub> (µM)	C <sub>Reaktion</sub> (mM)	Ausbeute (%)	Ø Ausbeute (%)
5'-AMP	0.1047	60.17	24.07	6.02	6.01 ± 0.02

**Tabelle 60:** Phosphorylierung von Adenosin (100 mM, 1.00 Äq.) mit  $\text{H}_3\text{PO}_3$  (1.00 Äq.) in Gegenwart von Harnstoff (1.00 Äq.) nach 1 d (erste Auftrennung). Die Probe wurde bezogen auf die anfängliche Nukleosidkonzentration auf 500  $\mu\text{M}$  verdünnt.

	Peakfläche (mAU x min)	$C_{\text{Probe}}$ ( $\mu\text{M}$ )	$C_{\text{Reaktion}}$ (mM)	Ausbeute (%)
5'-AMP	0.0659	37.86	7.57	7.57

**Tabelle 61:** Phosphorylierung von Adenosin (100 mM, 1.00 Äq.) mit  $\text{H}_3\text{PO}_3$  (1.00 Äq.) in Gegenwart von Harnstoff (1.00 Äq.) nach 1 d (zweite Auftrennung). Die Probe wurde bezogen auf die anfängliche Nukleosidkonzentration auf 500  $\mu\text{M}$  verdünnt.

	Peakfläche (mAU x min)	$C_{\text{Probe}}$ ( $\mu\text{M}$ )	$C_{\text{Reaktion}}$ (mM)	Ausbeute (%)	$\emptyset$ Ausbeute (%)
5'-AMP	0.0604	34.74	6.95	6.95	7.26 $\pm$ 0.44

**Tabelle 62:** Phosphorylierung von Adenosin (100 mM, 1.00 Äq.) mit  $\text{H}_3\text{PO}_3$  (1.00 Äq.) in Gegenwart von Harnstoff (1.00 Äq.) nach 3 d (erste Auftrennung). Die Probe wurde bezogen auf die anfängliche Nukleosidkonzentration auf 500  $\mu\text{M}$  verdünnt.

	Peakfläche (mAU x min)	$C_{\text{Probe}}$ ( $\mu\text{M}$ )	$C_{\text{Reaktion}}$ (mM)	Ausbeute (%)
5'-AMP	0.0585	33.59	6.72	6.72

**Tabelle 63:** Phosphorylierung von Adenosin (100 mM, 1.00 Äq.) mit  $\text{H}_3\text{PO}_3$  (1.00 Äq.) in Gegenwart von Harnstoff (1.00 Äq.) nach 3 d (zweite Auftrennung). Die Probe wurde bezogen auf die anfängliche Nukleosidkonzentration auf 500  $\mu\text{M}$  verdünnt.

	Peakfläche (mAU x min)	$C_{\text{Probe}}$ ( $\mu\text{M}$ )	$C_{\text{Reaktion}}$ (mM)	Ausbeute (%)	$\emptyset$ Ausbeute (%)
5'-AMP	0.0736	42.30	8.46	8.46	7.59 $\pm$ 1.23

**Tabelle 64:** Phosphorylierung von Adenosin (100 mM, 1.00 Äq.) mit  $\text{H}_3\text{PO}_3$  (3.00 Äq.) in Gegenwart von Harnstoff (1.00 Äq.) nach 26 d (erste Auftrennung). In Bezug auf die anfängliche Nukleosidkonzentration wurde die Probe auf 200  $\mu\text{M}$  (zur Bestimmung der 5'-AMP-Ausbeute) bzw. auf 1 mM (zur Bestimmung der 5'-ADP-Ausbeute) verdünnt.

	Peakfläche (mAU x min)	$C_{\text{Probe}}$ ( $\mu\text{M}$ )	$C_{\text{Reaktion}}$ (mM)	Ausbeute (%)
5'-AMP	0.0605	34.78	17.39	17.39
5'-ADP	0.0257	9.23	0.92	0.92

**Tabelle 65:** Phosphorylierung von Adenosin (100 mM, 1.00 Äq.) mit  $\text{H}_3\text{PO}_3$  (3.00 Äq.) in Gegenwart von Harnstoff (1.00 Äq.) nach 26 d (zweite Auftrennung). In Bezug auf die anfängliche Nukleosidkonzentration wurde die Probe auf 200  $\mu\text{M}$  (zur Bestimmung der 5'-AMP-Ausbeute) bzw. auf 1 mM (zur Bestimmung der 5'-ADP-Ausbeute) verdünnt.

	Peakfläche (mAU x min)	$C_{\text{Probe}}$ ( $\mu\text{M}$ )	$C_{\text{Reaktion}}$ (mM)	Ausbeute (%)	$\emptyset$ Ausbeute (%)
5'-AMP	0.0698	40.12	20.06	20.06	18.72 $\pm$ 1.89
5'-ADP	0.0333	11.98	1.20	1.20	1.06 $\pm$ 0.19

**Tabelle 66:** Phosphorylierung von 5'-AMP (100 mM, 1.00 Äq.) mit  $\text{H}_3\text{PO}_3$  (3.00 Äq.) in Gegenwart von Harnstoff (1.00 Äq.) nach 7 d (erste Auftrennung). In Bezug auf die anfängliche 5'-AMP-Konzentration wurde die Probe auf 1 mM verdünnt.

	Peakfläche (mAU x min)	$C_{\text{Probe}}$ ( $\mu\text{M}$ )	$C_{\text{Reaktion}}$ (mM)	Ausbeute (%)
5'-ADP	0.0618	22.22	2.22	2.22
5'-ATP	0.0216	5.18	0.52	0.52

**Tabelle 67:** Phosphorylierung von 5'-AMP (100 mM, 1.00 Äq.) mit  $\text{H}_3\text{PO}_3$  (3.00 Äq.) in Gegenwart von Harnstoff (1.00 Äq.) nach 7 d (zweite Auftrennung). In Bezug auf die anfängliche 5'-AMP-Konzentration wurde die Probe auf 1 mM verdünnt.

	Peakfläche (mAU x min)	$C_{\text{Probe}}$ ( $\mu\text{M}$ )	$C_{\text{Reaktion}}$ (mM)	Ausbeute (%)	$\emptyset$ Ausbeute (%)
5'-ADP	0.0489	17.59	1.76	1.76	1.99 $\pm$ 0.33
5'-ATP	0.0106	2.53	0.25	0.25	0.39 $\pm$ 0.19

**Tabelle 68:** Phosphorylierung von 5'-ADP (100 mM, 1.00 Äq.) mit  $\text{H}_3\text{PO}_3$  (3.00 Äq.) in Gegenwart von Harnstoff (1.00 Äq.) nach 7 d (erste Auftrennung). In Bezug auf die anfängliche 5'-ADP-Konzentration wurde die Probe auf 50  $\mu\text{M}$  (zur Bestimmung der 5'-AMP-Ausbeute) bzw. auf 1 mM (zur Bestimmung der 5'-ATP-Ausbeute) verdünnt.

	Peakfläche (mAU x min)	$C_{\text{Probe}}$ ( $\mu\text{M}$ )	$C_{\text{Reaktion}}$ (mM)	Ausbeute (%)
5'-AMP	0.0576	33.11	66.21	66.21
5'-ATP	0.0430	10.30	1.03	1.03

**Tabelle 69:** Phosphorylierung von 5'-ADP (100 mM, 1.00 Äq.) mit H<sub>3</sub>PO<sub>3</sub> (3.00 Äq.) in Gegenwart von Harnstoff (1.00 Äq.) nach 7 d (zweite Auftrennung). In Bezug auf die anfängliche 5'-ADP-Konzentration wurde die Probe auf 50 µM (zur Bestimmung der 5'-AMP-Ausbeute) bzw. auf 1 mM (zur Bestimmung der 5'-ATP-Ausbeute) verdünnt.

	Peakfläche (mAU x min)	C <sub>Probe</sub> (µM)	C <sub>Reaktion</sub> (mM)	Ausbeute (%)	Ø Ausbeute (%)
5'-AMP	0.0621	35.71	71.43	71.43	68.82 ± 3.69
5'-ATP	0.0479	11.48	1.15	1.15	1.09 ± 0.08

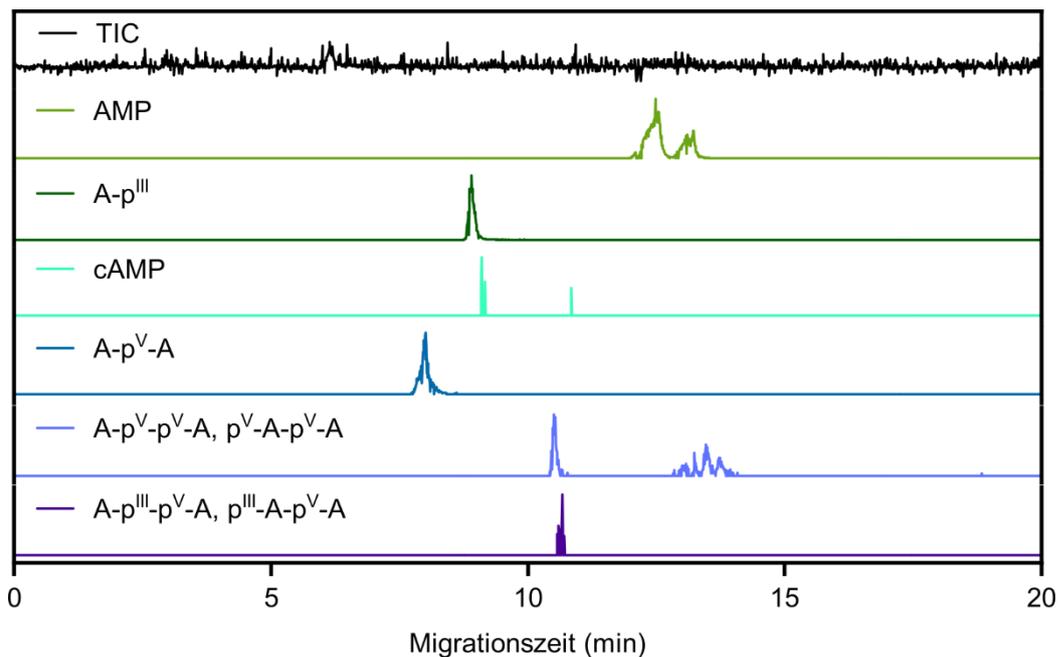
**Tabelle 70:** Reaktion von 5'-ADP (100 mM, 1.00 Äq.), Adenosin und Harnstoff (je 1.00 Äq.) nach 7 d (erste Auftrennung). In Bezug auf die anfängliche 5'-ADP-Konzentration wurde die Probe auf 1 mM verdünnt.

	Peakfläche (mAU x min)	C <sub>Probe</sub> (µM)	C <sub>Reaktion</sub> (mM)	Ausbeute (%)
5'-AMP	0.0549	31.53	3.15	3.15
5'-ATP	0.0196	4.69	0.47	0.47

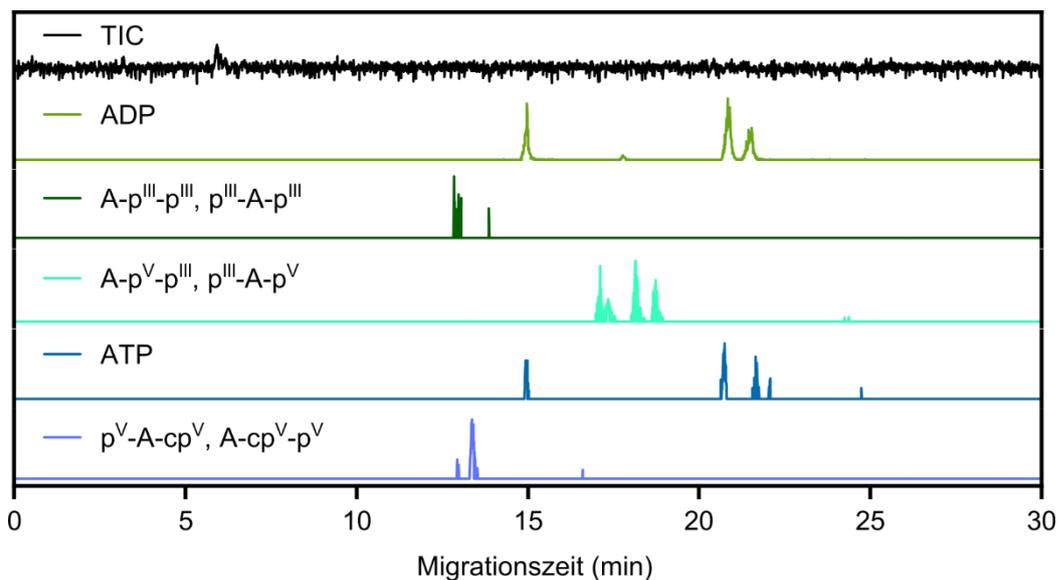
**Tabelle 71:** Reaktion von 5'-ADP (100 mM, 1.00 Äq.), Adenosin und Harnstoff (je 1.00 Äq.) nach 7 d (zweite Auftrennung). In Bezug auf die anfängliche 5'-ADP-Konzentration wurde die Probe auf 1 mM verdünnt.

	Peakfläche (mAU x min)	C <sub>Probe</sub> (µM)	C <sub>Reaktion</sub> (mM)	Ausbeute (%)	Ø Ausbeute (%)
5'-AMP	0.0621	35.69	3.57	3.57	3.36 ± 0.29
5'-ATP	0.0247	5.92	0.59	0.59	0.53 ± 0.09

### CE-MS-Messungen



**Abbildung 71:** CE-MS-Messung der Reaktion von Adenosin (100 mM) mit  $\text{H}_3\text{PO}_3$  (3.00 Äq.) und Harnstoff (1.00 Äq.) nach 7 d. Abgebildet sind der *total ion current* (TIC) ( $m/z$  50-750) und EIEs ( $\Delta = 5.0$  ppm) der phosphorylierten Produkte. Da die Konstitution der Produkte nicht bestimmt wurde, zeigen die Benennungen alle denkbaren Phosphonat- und Phosphatbindungsmöglichkeiten auf. Die Bezeichnungen beziehen sich auf die Gesamtheit der gebildeten Isomere.



**Abbildung 72:** CE-MS-Messung der Reaktion von Adenosin (100 mM) mit  $\text{H}_3\text{PO}_3$  (3.00 Äq.) und Harnstoff (1.00 Äq.) nach 7 d. Abgebildet sind der TIC ( $m/z$  50-750) und EIEs ( $\Delta = 5.0$  ppm) der phosphorylierten Produkte. Da die Konstitution der Produkte nicht bestimmt wurde, zeigen die Benennungen alle denkbaren Phosphonat- und Phosphatbindungsmöglichkeiten auf. Die Bezeichnungen beziehen sich auf die Gesamtheit der gebildeten Isomere.

**Tabelle 72:** Anhand von CE-MS-Messungen detektierte Signale der Adenosin-basierten Versuche nach 7 d. Die Intensität ist in counts angegeben und bezieht sich jeweils auf das intensivste Signal. Die entsprechenden *m/z* Werte wurden, soweit nicht anders angemerkt, mit einer Abweichung von 5 ppm extrahiert.

Produkt Signalanzahl Intensität	AMP	A-p <sup>III</sup>	cAMP	A-p <sup>V</sup> -A	A-p <sup>V</sup> -p <sup>V</sup> -A p <sup>V</sup> -A-p <sup>V</sup> -A	A-p <sup>V</sup> -p <sup>III</sup> -A p <sup>III</sup> -A-p <sup>V</sup> -A	ADP	A-p <sup>III</sup> -p <sup>III</sup> p <sup>III</sup> -A-p <sup>III</sup>	A-p <sup>V</sup> -p <sup>III</sup> p <sup>III</sup> -A-p <sup>V</sup>	ATP	p <sup>V</sup> -A-cp <sup>V</sup> A-cp <sup>V</sup> -p <sup>V</sup>	A-p <sup>III</sup> (S)	A-p <sup>V</sup> -p <sup>III</sup> (S) p <sup>III</sup> -A-p <sup>V</sup> (S) p <sup>V</sup> -A-p <sup>III</sup> (S)
A, H <sub>3</sub> PO <sub>3</sub> (je 100 mM)	3 2.2E7	1 8.8E6	1 1.3E5	1 8.7E5	2 Sets <sup>b</sup> 1.5E5	-	3 2.7E5	-	-	-	-	1 <sup>c</sup> 7.2E6	-
A (100 mM) H <sub>3</sub> PO <sub>3</sub> (3.00 Äq.)	2 <sup>a</sup> 4.1E7	1 1.3E7	-	1 1.7E6	2 Sets <sup>b</sup> 2.8E5	-	4 4.9E6	1 7.8E4	4 5.1E5	2 2.7E5	1 1.6E5	1 <sup>c</sup> 6.2E5	2 <sup>c</sup> 8.9E4
A (100 mM) H <sub>3</sub> PO <sub>3</sub> (5.00 Äq.)	2 <sup>a</sup> 4.3E7	1 2.0E7	1 1.3E5	1 1.0E6	2 Sets <sup>b</sup> 2.3E5	1 7.0E4	4 3.1E6	1 1.8E5	3 5.8E5	2 7.9E4	1 9.3E4	1 <sup>c</sup> 8.2E5	1 <sup>c</sup> 8.0E4
A (100 mM) H <sub>3</sub> PO <sub>3</sub> (3.00 Äq.) (NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO (1.00 Äq.)	2 <sup>a</sup> 7.9E7	1 3.0E7	-	1 3.5E6	2 Sets <sup>b</sup> 9.0E5	1 1.5E5	4 4.5E6	1 6.9E4	4 5.6E5	3 1.9E5	1 2.2E5	1 <sup>c</sup> 1.5E6	1 <sup>c</sup> 7.4E4
A (100 mM) H <sub>3</sub> PO <sub>3</sub> (3.00 Äq.) (NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO (3.00 Äq.)	2 <sup>a</sup> 5.7E7	1 1.6E7	-	1 1.8E6	2 Sets <sup>b</sup> 3.8E5	-	4 3.5E6	-	3 2.8E5	3 2.7E5	1 2.1E5	1 <sup>c</sup> 1.1E7	3 <sup>c</sup> 2.6E5
A, H <sub>3</sub> PO <sub>3</sub> (je 25 mM)	3 3.6E7	1 4.5E7	1 6.4E5	1 5.4E6	2 Sets <sup>b</sup> 5.6E5	1 1.7E5	3 2.0E6	1 2.4E5	3 5.9E5	-	1 1.4E5	1 <sup>c</sup> 3.1E6	-
A, H <sub>3</sub> PO <sub>3</sub> (je 50 mM)	3 3.1E7	1 1.8E7	1 6.9E4	1 1.3E6	2 Sets <sup>b</sup> 3.2E5	1 8.3E4	3 9.2E5	-	-	-	-	1 <sup>c</sup> 9.1E5	-
A, H <sub>3</sub> PO <sub>3</sub> (je 400 mM)	2 <sup>a</sup> 2.3E7	1 7.6E6	1 1.4E5	1 1.3E6	2 1.4E5	-	3 2.5E5	-	-	-	-	1 <sup>c</sup> 1.7E6	-

<sup>a</sup> CE-Messungen zeigen, dass 5' - , 3' - und 2' -AMP vorliegen. Die Signale von 3' - und 2' -AMP sind in der CE-MS-Messung nicht aufgelöst.

<sup>b</sup> 2 Sets: Die Massenspur enthält ein separates Signal sowie mehrere langsamer migrierende, überlagernde Signale (siehe auch Abbildung 71 und 72 auf s. 150).

<sup>c</sup> Die *m/z* Werte der Thioderivate wurden mit einer Abweichung von 16.5 bis 20.0 ppm extrahiert.

**Tabelle 73:** Anhand von CE-MS-Messungen detektierte Signale der Adenosin-basierten Versuche mit H<sub>3</sub>PO<sub>3</sub> (3.00 Äq.) und Harnstoff (1.00 Äq.). Die Intensität ist in counts angegeben und bezieht sich jeweils auf das intensivste Signal. Die entsprechenden *m/z* Werte wurden, soweit nicht anders angemerkt, mit einer Abweichung von 5 ppm extrahiert.

Produkt Signalanzahl Intensität	AMP	A-p <sup>III</sup>	cAMP	A-p <sup>V</sup> -A	A-p <sup>V</sup> -p <sup>V</sup> -A p <sup>V</sup> -A-p <sup>V</sup> -A	A-p <sup>V</sup> -p <sup>III</sup> -A p <sup>III</sup> -A-p <sup>V</sup> -A	ADP	A-p <sup>III</sup> -p <sup>III</sup> p <sup>III</sup> -A-p <sup>III</sup>	A-p <sup>V</sup> -p <sup>III</sup> p <sup>III</sup> -A-p <sup>V</sup>	ATP	p <sup>V</sup> -A-cp <sup>V</sup> A-cp <sup>V</sup> -p <sup>V</sup>	A-p <sup>III</sup> (S)	A-p <sup>V</sup> -p <sup>III</sup> (S) p <sup>III</sup> -A-p <sup>V</sup> (S) p <sup>V</sup> -A-p <sup>III</sup> (S)
A (100 mM) (1 d)	3 3.6E7	1 8.2E7	1 7.0E4	1 2.5E6	2 Sets <sup>b</sup> 1.1E5	1 1.0E5	4 8.7E5	1 1.9E5	3 5.4E5	-	1 7.3E4	1 <sup>c</sup> 7.7E5	-
A (100 mM) (3 d)	2 <sup>a</sup> 2.7E7	1 9.4E7	1 8.6E5	1 1.5E6	2 Sets <sup>b</sup> 2.0E5	1 7.7E4	3 4.1E5	1 2.5E5	3 4.2E5	-	1 8.8E4	1 <sup>c</sup> 6.0E5	-
A (100 mM) (26 d)	2 <sup>a</sup> 3.4E7	1 5.2E6	-	1 7.8E5	2 Sets <sup>b</sup> 2.4E5	-	4 5.9E6	-	4 2.9E5	3 1.8E5	1 6.5E4	1 <sup>c</sup> 3.0E6	3 <sup>c</sup> 1.6E5
A (100 mM) (in H <sub>2</sub> O, 7 d)	1 2.9E5	1 2.1E6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5' -AMP (100 mM) (7 d)	1 1.1E8	1 1.7E5	-	-	-	-	3 4.9E6	-	1 6.7E5	3 1.6E5	-	-	1 <sup>c</sup> 2.6E5
5' -ADP (100 mM) (7 d) <sup>d</sup>	1 9.2E7	-	-	-	1 1.5E5	-	3 2.0E7	-	1 6.1E5	3 3.5E6	-	-	1 <sup>c</sup> 3.5E5

<sup>a</sup> CE-Messungen zeigen, dass 5' -, 3' - und 2' -AMP vorliegen. Die Signale von 3' - und 2' -AMP sind in der CE-MS-Messung nicht aufgelöst.

<sup>b</sup> 2 Sets: Die Massenspur enthält ein separates Signal sowie mehrere langsamer migrierende, überlagernde Signale (siehe auch Abbildung 71 und 72 auf s. 150).

<sup>c</sup> Die *m/z* Werte der Thioderivate wurden mit einer Abweichung von 10.0 bis 20.0 ppm extrahiert.

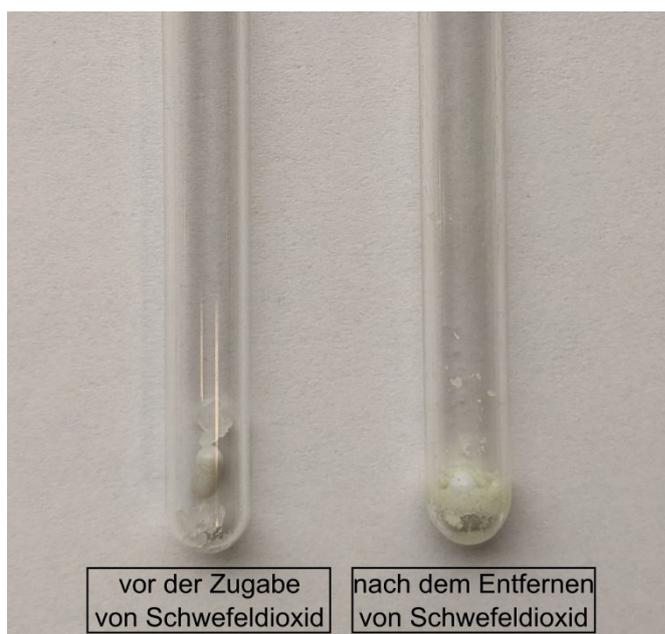
<sup>d</sup> Zusätzlich wurde auch der *m/z* Wert von A-p<sup>V</sup>-p<sup>V</sup>-p<sup>III</sup>/p<sup>III</sup>-A-p<sup>V</sup>-p<sup>V</sup>/p<sup>III</sup>-A(p<sup>V</sup>)-p<sup>V</sup> detektiert (2 Signale; 1.6E5)

**Tabelle 74:** Anhand von CE-MS-Messungen detektierte Signale der Adenosin-basierten Versuche nach 7 d. Die Intensität ist in counts angegeben und bezieht sich jeweils auf das intensivste Signal. Die entsprechenden *m/z* Werte wurden mit einer Abweichung von 5 ppm extrahiert.

Produkt Signalanzahl Intensität	AMP	A-p <sup>III</sup>	cAMP	A-p <sup>V</sup> -A	A-p <sup>V</sup> -p <sup>V</sup> -A p <sup>V</sup> -A-p <sup>V</sup> -A	A-p <sup>V</sup> -p <sup>III</sup> -A p <sup>III</sup> -A-p <sup>V</sup> -A	ADP	A-p <sup>III</sup> -p <sup>III</sup> p <sup>III</sup> -A-p <sup>III</sup>	A-p <sup>V</sup> -p <sup>III</sup> p <sup>III</sup> -A-p <sup>V</sup>	ATP	p <sup>V</sup> -A-cp <sup>V</sup> A-cp <sup>V</sup> -p <sup>V</sup>	A-p <sup>III</sup> (S)	A-p <sup>V</sup> -p <sup>III</sup> (S) p <sup>III</sup> -A-p <sup>V</sup> (S) p <sup>V</sup> -A-p <sup>III</sup> (S)
A, H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (je 100 mM)	1 1.3E5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A, H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , (NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO (je 100mM)	1 1.1E5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A, 5' -ADP, (NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO (je 100 mM)	1 1.3E7	-	-	-	-	-	-	-	-	1 4.2E5	-	-	-
A (100 mM) <sup>a</sup> H <sub>3</sub> PO <sub>3</sub> (3.00 Äq.) (NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO (1.00 Äq.)	1 2.9E5	1 2.1E6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

<sup>a</sup> Reaktion in Wasser.

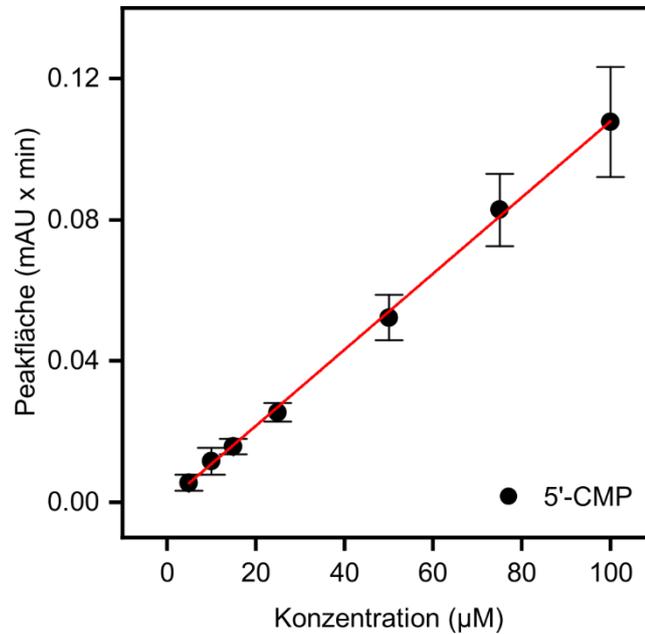
### Reduktion von Schwefeldioxid



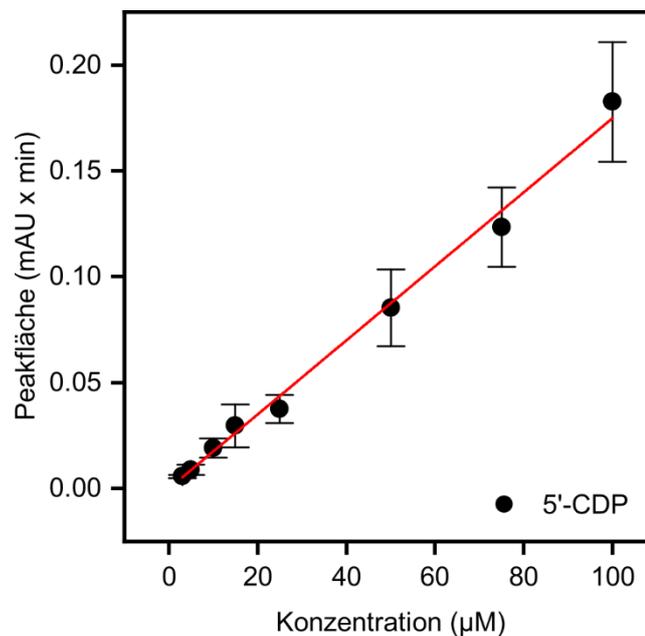
**Abbildung 73:** Blank-Reaktion mit  $\text{H}_3\text{PO}_3$  (300 mM) in flüssigem Schwefeldioxid. Feststoff vor Zugabe von Schwefeldioxid (links) und nach 7 d in flüssigem Schwefeldioxid (rechts).

## 7.2.2 Versuche mit anderen Nukleosiden

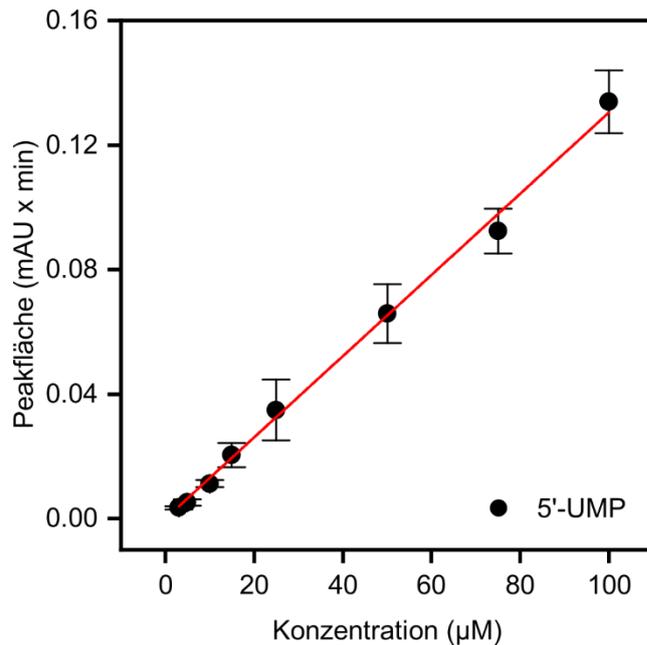
### Eichgeraden



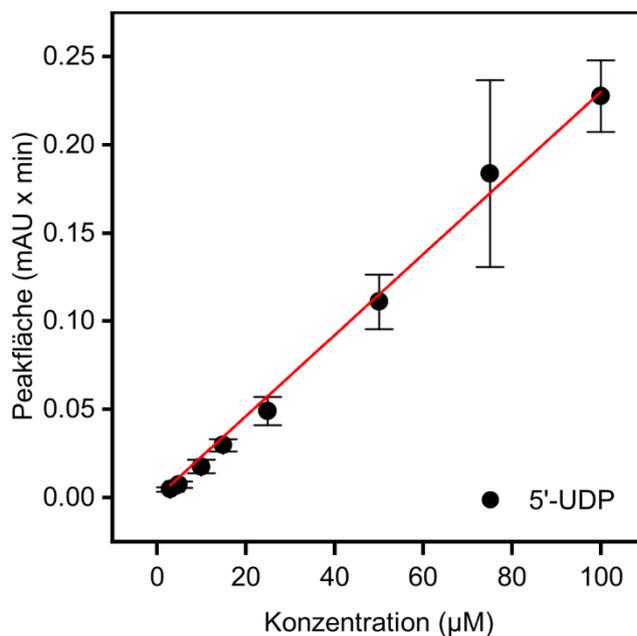
**Abbildung 74:** 5'-CMP-Eichgerade ( $m = 0.00108 \pm 9.19523 \times 10^{-6}$ ,  $R^2 = 0.99956$ ). Die Messbedingungen für die elektrophoretische Auftrennung wurden wie folgt gewählt: BGE: 30 mM  $\text{NH}_4\text{FA}$  (pH = 9.5), BFS-Kapillare  $l = 80$  cm;  $T = 25$  °C, druckgetriebene Probeninjektion (30 mbar für 10 s), CE-*Inlet*: 30 kV, Detektion durch UV-Absorption bei  $\lambda = 254$  nm. Die Elektropherogramme wurden in dreifacher Ausführung aufgezeichnet.



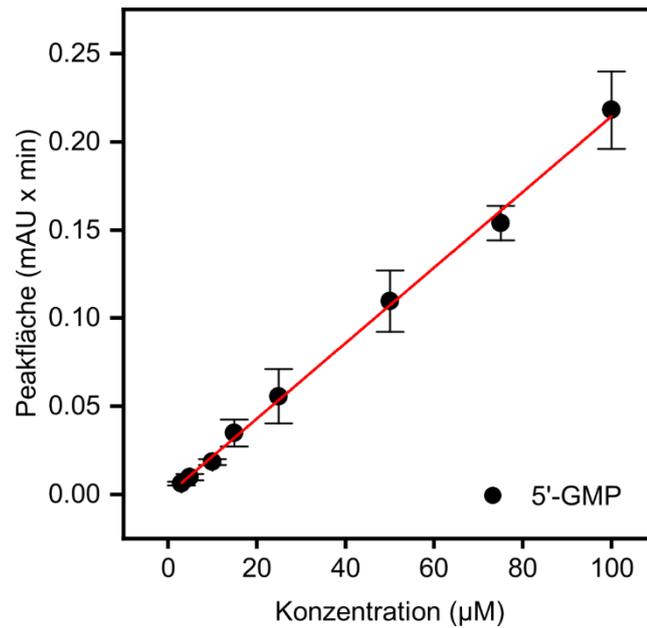
**Abbildung 75:** 5'-CDP-Eichgerade ( $m = 0.00175 \pm 3.63983 \times 10^{-5}$ ,  $R^2 = 0.99698$ ). Die Messbedingungen für die elektrophoretische Auftrennung wurden wie folgt gewählt: BGE: 30 mM  $\text{NH}_4\text{FA}$  (pH = 9.5), BFS-Kapillare  $l = 80$  cm;  $T = 25$  °C, druckgetriebene Probeninjektion (30 mbar für 10 s), CE-*Inlet*: 30 kV, Detektion durch UV-Absorption bei  $\lambda = 254$  nm. Die Elektropherogramme wurden in dreifacher Ausführung aufgezeichnet.



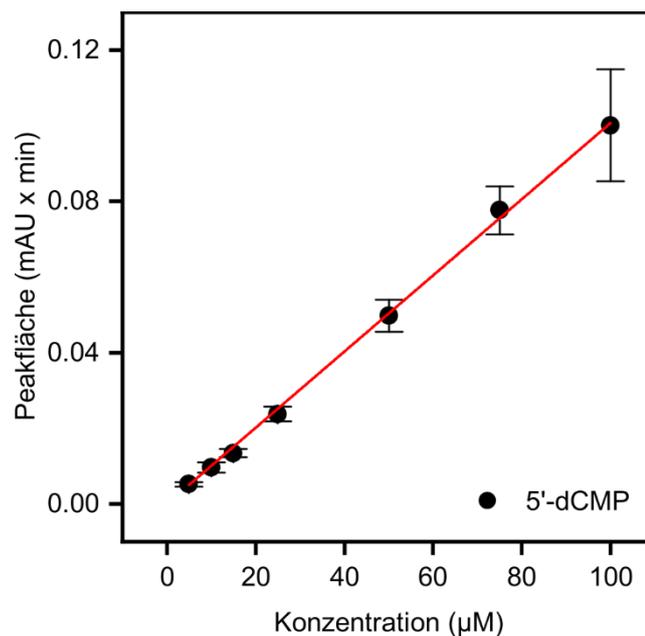
**Abbildung 76:** 5'-UMP-Eichgerade ( $m = 0.0013 \pm 2.00939 \times 10^{-5}$ ,  $R^2 = 0.99834$ ). Die Messbedingungen für die elektrophoretische Auftrennung wurden wie folgt gewählt: BGE: 30 mM  $\text{NH}_4\text{FA}$  ( $\text{pH} = 9.5$ ), BFS-Kapillare  $l = 80$  cm;  $T = 25$  °C, druckgetriebene Probeninjektion (30 mbar für 10 s), CE-*Inlet*: 30 kV, Detektion durch UV-Absorption bei  $\lambda = 254$  nm. Die Elektropherogramme wurden in dreifacher Ausführung aufgezeichnet.



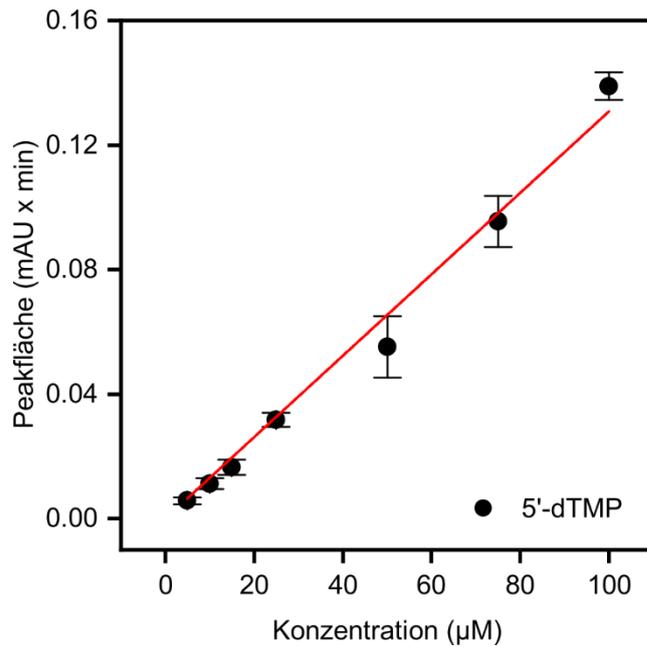
**Abbildung 77:** 5'-UDP-Eichgerade ( $m = 0.0023 \pm 4.66751 \times 10^{-5}$ ,  $R^2 = 0.99712$ ). Die Messbedingungen für die elektrophoretische Auftrennung wurden wie folgt gewählt: BGE: 30 mM  $\text{NH}_4\text{FA}$  ( $\text{pH} = 9.5$ ), BFS-Kapillare  $l = 80$  cm;  $T = 25$  °C, druckgetriebene Probeninjektion (30 mbar für 10 s), CE-*Inlet*: 30 kV, Detektion durch UV-Absorption bei  $\lambda = 254$  nm. Die Elektropherogramme wurden in dreifacher Ausführung aufgezeichnet.



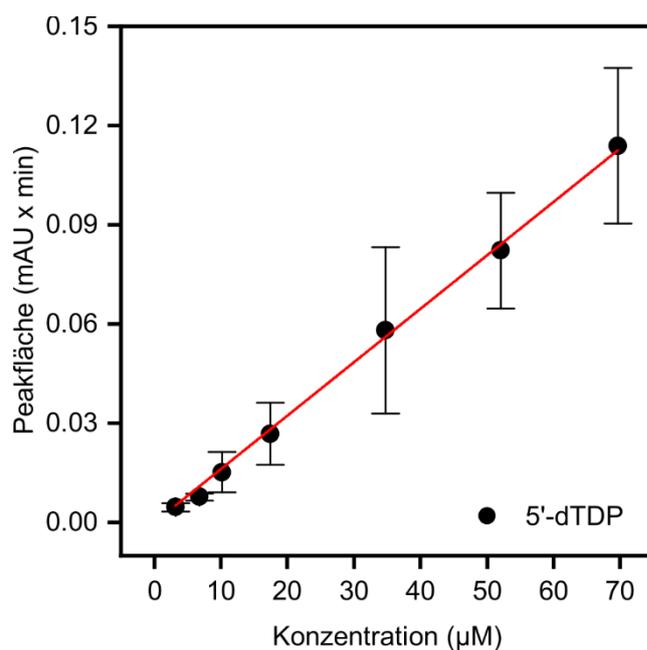
**Abbildung 78:** 5'-GMP-Eichgerade ( $m = 0.00214 \pm 2.57224 \times 10^{-5}$ ,  $R^2 = 0.99899$ ). Die Messbedingungen für die elektrophoretische Auftrennung wurden wie folgt gewählt: BGE: 30 mM  $\text{NH}_4\text{FA}$  (pH = 9.5), BFS-Kapillare  $l = 80$  cm;  $T = 25$  °C, druckgetriebene Probeninjektion (30 mbar für 10 s), CE-*Inlet*: 30 kV, Detektion durch UV-Absorption bei  $\lambda = 254$  nm. Die Elektropherogramme wurden in dreifacher Ausführung aufgezeichnet.



**Abbildung 79:** 5'-dCMP-Eichgerade ( $m = 0.00101 \pm 9.44669 \times 10^{-6}$ ,  $R^2 = 0.99947$ ). Die Messbedingungen für die elektrophoretische Auftrennung wurden wie folgt gewählt: BGE: 30 mM  $\text{NH}_4\text{FA}$  (pH = 9.5), BFS-Kapillare  $l = 80$  cm;  $T = 25$  °C, druckgetriebene Probeninjektion (30 mbar für 10 s), CE-*Inlet*: 30 kV, Detektion durch UV-Absorption bei  $\lambda = 254$  nm. Die Elektropherogramme wurden in dreifacher Ausführung aufgezeichnet.



**Abbildung 80:** 5'-dTMP-Eichgerade ( $m = 0.00131 \pm 4.08834 \times 10^{-5}$ ,  $R^2 = 0.99417$ ). Die Messbedingungen für die elektrophoretische Auftrennung wurden wie folgt gewählt: BGE: 30 mM  $\text{NH}_4\text{FA}$  (pH = 9.5), BFS-Kapillare  $l = 80$  cm;  $T = 25$  °C, druckgetriebene Probeninjektion (30 mbar für 10 s), CE-*Inlet*: 30 kV, Detektion durch UV-Absorption bei  $\lambda = 254$  nm. Die Elektropherogramme wurden in dreifacher Ausführung aufgezeichnet.



**Abbildung 81:** 5'-dTDP-Eichgerade ( $m = 0.00162 \pm 2.08208 \times 10^{-5}$ ,  $R^2 = 0.999$ ). Die Messbedingungen für die elektrophoretische Auftrennung wurden wie folgt gewählt: BGE: 30 mM  $\text{NH}_4\text{FA}$  (pH = 9.5), BFS-Kapillare  $l = 80$  cm;  $T = 25$  °C, druckgetriebene Probeninjektion (30 mbar für 10 s), CE-*Inlet*: 30 kV, Detektion durch UV-Absorption bei  $\lambda = 254$  nm. Die Elektropherogramme wurden in dreifacher Ausführung aufgezeichnet.

## Ausbeuteberechnung

**Tabelle 75:** Phosphorylierung von Cytidin (100 mM, 1.00 Äq.) mit H<sub>3</sub>PO<sub>3</sub> (3.00 Äq.) in Gegenwart von Harnstoff (1.00 Äq.) nach 7 d (erste Auftrennung). In Bezug auf die anfängliche Nukleosidkonzentration wurde die Probe auf 200 µM (zur Bestimmung der 5'-CMP-Ausbeute) bzw. auf 500 µM (zur Bestimmung der 5'-CDP-Ausbeute) verdünnt.

	Peakfläche (mAU x min)	C <sub>Probe</sub> (µM)	C <sub>Reaktion</sub> (mM)	Ausbeute (%)
5'-CMP	0.0537	49.70	24.85	24.85
5'-CDP	0.0287	16.39	3.28	3.28

**Tabelle 76:** Phosphorylierung von Cytidin (100 mM, 1.00 Äq.) mit H<sub>3</sub>PO<sub>3</sub> (3.00 Äq.) in Gegenwart von Harnstoff (1.00 Äq.) nach 7 d (zweite Auftrennung). In Bezug auf die anfängliche Nukleosidkonzentration wurde die Probe auf 200 µM (zur Bestimmung der 5'-CMP-Ausbeute) bzw. auf 500 µM (zur Bestimmung der 5'-CDP-Ausbeute) verdünnt.

	Peakfläche (mAU x min)	C <sub>Probe</sub> (µM)	C <sub>Reaktion</sub> (mM)	Ausbeute (%)	Ø Ausbeute (%)
5'-CMP	0.0463	42.90	21.45	21.45	23.15 ± 2.40
5'-CDP	0.0244	13.96	2.79	2.79	3.04 ± 0.34

**Tabelle 77:** Phosphorylierung von Uridin (100 mM, 1.00 Äq.) mit H<sub>3</sub>PO<sub>3</sub> (3.00 Äq.) in Gegenwart von Harnstoff (1.00 Äq.) nach 7 d (erste Auftrennung). In Bezug auf die anfängliche Nukleosidkonzentration wurde die Probe auf 200 µM (zur Bestimmung der 5'-UMP-Ausbeute) bzw. auf 500 µM (zur Bestimmung der 5'-UDP-Ausbeute) verdünnt.

	Peakfläche (mAU x min)	C <sub>Probe</sub> (µM)	C <sub>Reaktion</sub> (mM)	Ausbeute (%)
5'-UMP	0.0816	62.77	31.38	31.38
5'-UDP	0.0176	7.65	1.53	1.53

**Tabelle 78:** Phosphorylierung von Uridin (100 mM, 1.00 Äq.) mit H<sub>3</sub>PO<sub>3</sub> (3.00 Äq.) in Gegenwart von Harnstoff (1.00 Äq.) nach 7 d (zweite Auftrennung). In Bezug auf die anfängliche Nukleosidkonzentration wurde die Probe auf 200 µM (zur Bestimmung der 5'-UMP-Ausbeute) bzw. auf 500 µM (zur Bestimmung der 5'-UDP-Ausbeute) verdünnt.

	Peakfläche (mAU x min)	C <sub>Probe</sub> (µM)	C <sub>Reaktion</sub> (mM)	Ausbeute (%)	Ø Ausbeute (%)
5'-UMP	0.0725	55.76	27.88	27.88	29.63 ± 2.48
5'-UDP	0.0178	7.76	1.55	1.55	1.54 ± 0.01

**Tabelle 79:** Phosphorylierung von Guanosin (100 mM, 1.00 Äq.) mit H<sub>3</sub>PO<sub>3</sub> (3.00 Äq.) in Gegenwart von Harnstoff (1.00 Äq.) nach 7 d (erste Auftrennung). In Bezug auf die anfängliche Nukleosidkonzentration wurde die Probe auf 200 µM verdünnt.

	Peakfläche (mAU x min)	C <sub>Probe</sub> (µM)	C <sub>Reaktion</sub> (mM)	Ausbeute (%)
5'-GMP	0.0351	16.41	8.20	8.20

**Tabelle 80:** Phosphorylierung von Guanosin (100 mM, 1.00 Äq.) mit H<sub>3</sub>PO<sub>3</sub> (3.00 Äq.) in Gegenwart von Harnstoff (1.00 Äq.) nach 7 d (zweite Auftrennung). In Bezug auf die anfängliche Nukleosidkonzentration wurde die Probe auf 200 µM verdünnt.

	Peakfläche (mAU x min)	C <sub>Probe</sub> (µM)	C <sub>Reaktion</sub> (mM)	Ausbeute (%)	Ø Ausbeute (%)
5'-GMP	0.0255	11.91	5.96	5.96	7.08 ± 1.59

**Tabelle 81:** Phosphorylierung von Desoxycytidin (100 mM, 1.00 Äq.) mit H<sub>3</sub>PO<sub>3</sub> (3.00 Äq.) in Gegenwart von Harnstoff (1.00 Äq.) nach 7 d (erste Auftrennung). In Bezug auf die anfängliche Nukleosidkonzentration wurde die Probe auf 200 µM verdünnt.

	Peakfläche (mAU x min)	C <sub>Probe</sub> (µM)	C <sub>Reaktion</sub> (mM)	Ausbeute (%)
5'-dCMP	0.0738	73.08	36.54	36.54

**Tabelle 82:** Phosphorylierung von Desoxycytidin (100 mM, 1.00 Äq.) mit H<sub>3</sub>PO<sub>3</sub> (3.00 Äq.) in Gegenwart von Harnstoff (1.00 Äq.) nach 7 d (zweite Auftrennung). In Bezug auf die anfängliche Nukleosidkonzentration wurde die Probe auf 200 µM verdünnt.

	Peakfläche (mAU x min)	C <sub>Probe</sub> (µM)	C <sub>Reaktion</sub> (mM)	Ausbeute (%)	Ø Ausbeute (%)
5'-dCMP	0.0580	57.42	28.71	28.71	32.62 ± 5.54

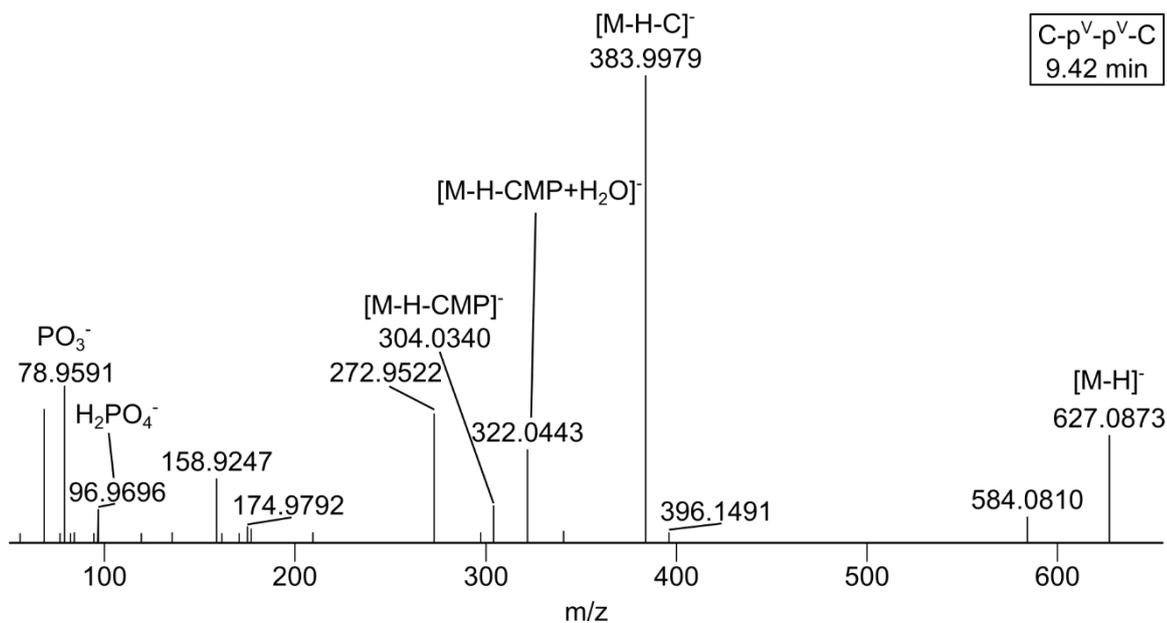
**Tabelle 83:** Phosphorylierung von Desoxythymidin (100 mM, 1.00 Äq.) mit H<sub>3</sub>PO<sub>3</sub> (3.00 Äq.) in Gegenwart von Harnstoff (1.00 Äq.) nach 7 d (erste Auftrennung). In Bezug auf die anfängliche Nukleosidkonzentration wurde die Probe auf 200 µM (zur Bestimmung der 5'-dTMP-Ausbeute) bzw. auf 1 mM (zur Bestimmung der 5'-dTDP-Ausbeute) verdünnt.

	Peakfläche (mAU x min)	C <sub>Probe</sub> (µM)	C <sub>Reaktion</sub> (mM)	Ausbeute (%)
5'-dTMP	0.1004	76.66	38.33	38.33
5'-dTDP	0.0555	34.24	3.42	3.42

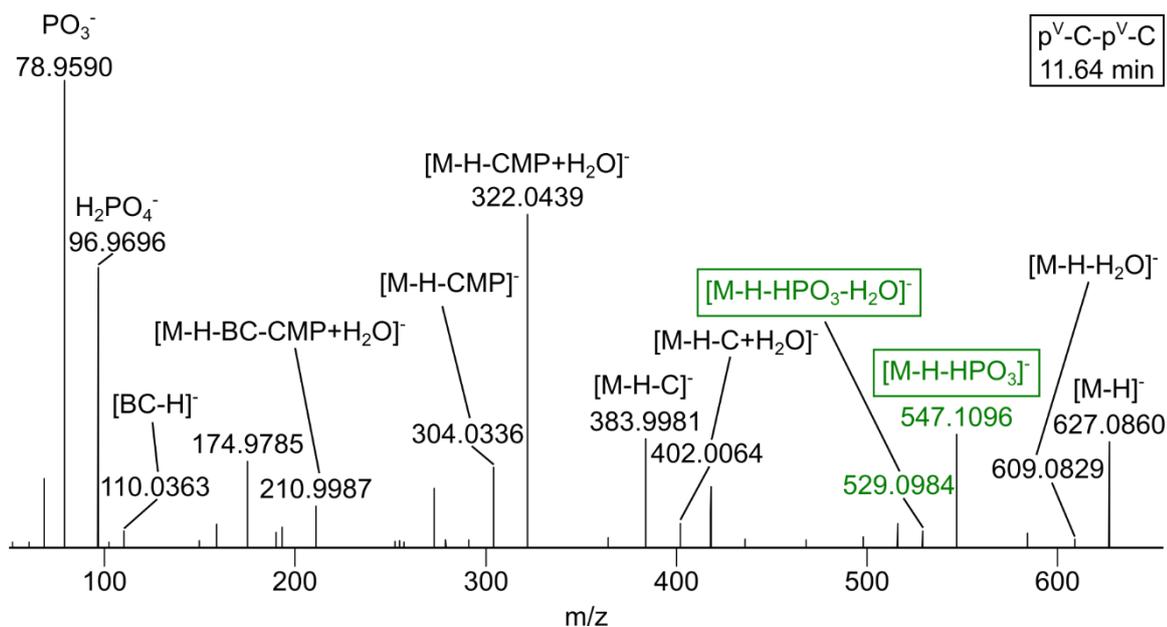
**Tabelle 84:** Phosphorylierung von Desoxythymidin (100 mM, 1.00 Äq.) mit  $\text{H}_3\text{PO}_3$  (3.00 Äq.) in Gegenwart von Harnstoff (1.00 Äq.) nach 7 d (zweite Auftrennung). In Bezug auf die anfängliche Nukleosidkonzentration wurde die Probe auf 200  $\mu\text{M}$  (zur Bestimmung der 5'-dTMP-Ausbeute) bzw. auf 1 mM (zur Bestimmung der 5'-dTDP-Ausbeute) verdünnt.

	Peakfläche (mAU x min)	$C_{\text{Probe}}$ ( $\mu\text{M}$ )	$C_{\text{Reaktion}}$ (mM)	Ausbeute (%)	Ø Ausbeute (%)
5'-dTMP	0.0657	50.13	25.06	25.06	31.70 ± 9.38
5'-dTDP	0.0608	37.56	3.76	3.76	3.59 ± 0.23

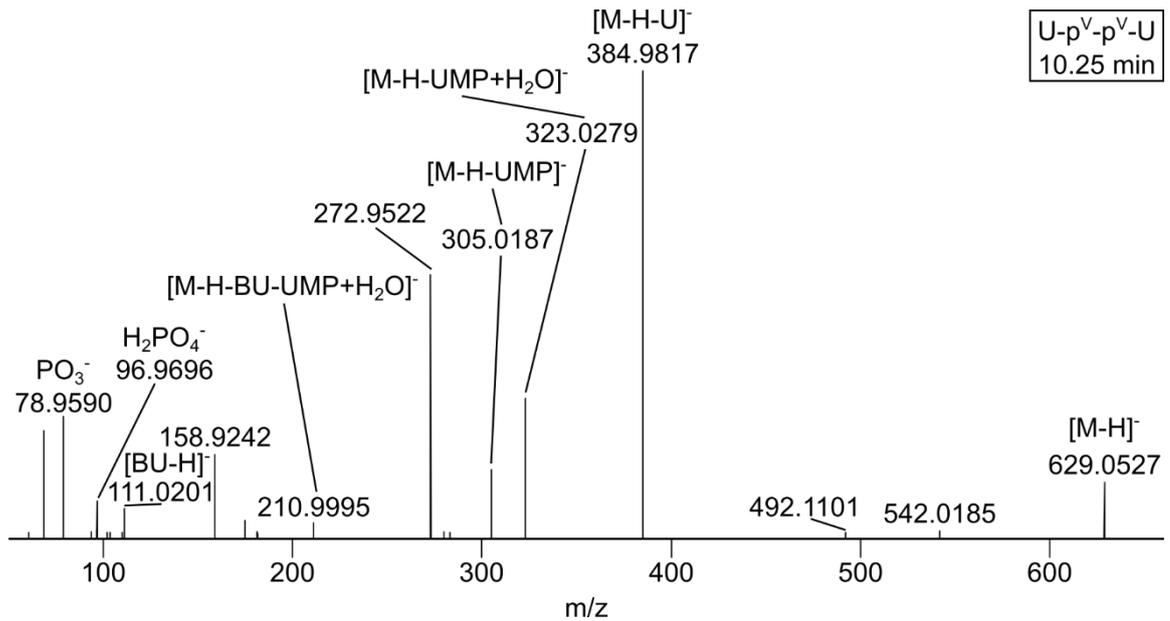
CE-MS-Messungen



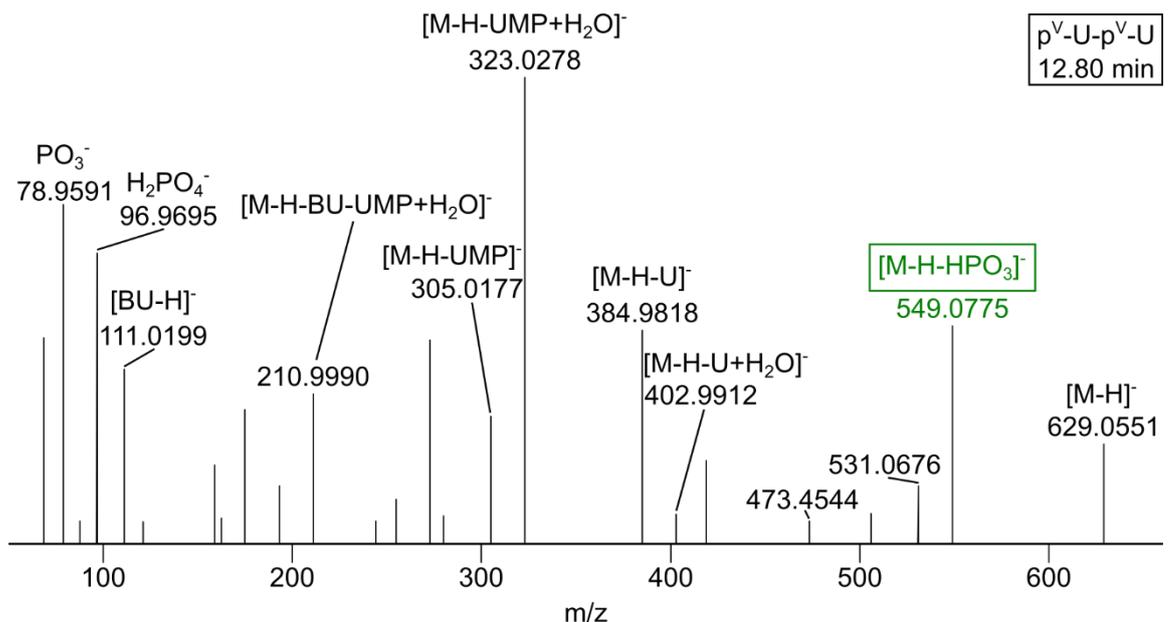
**Abbildung 82:** MS/MS-Spektrum des Signals des Cytidin-basierten Dinukleotides ( $m/z = 627.0858$ ,  $t_{\text{mig}} = 9.42$  min). Cytidin (100 mM) wurde für 7 d mit H<sub>3</sub>PO<sub>3</sub> (3.00 Äq.) in Gegenwart von Harnstoff (1.00 Äq.) umgesetzt. Die kollisionsinduzierte Dissoziation erfolgte bei einer relativen Fragmentierungsenergie von 30%.



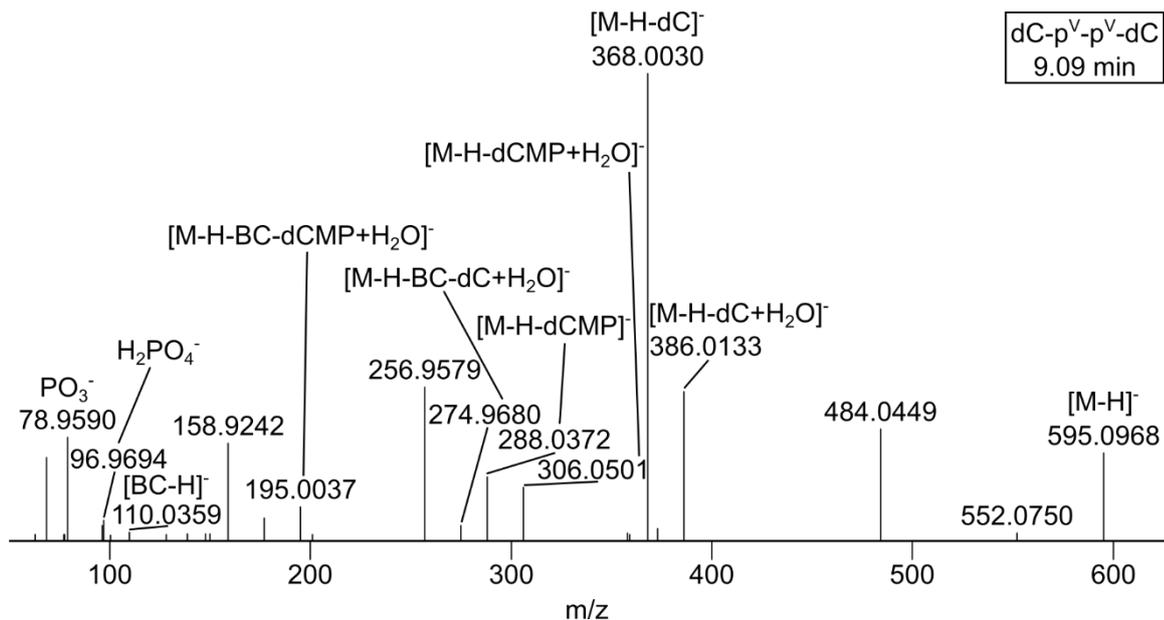
**Abbildung 83:** MS/MS-Spektrum des Signals des Cytidin-basierten Dinukleotides ( $m/z = 627.0858$ ,  $t_{\text{mig}} = 11.64$  min). Cytidin (100 mM) wurde für 7 d mit H<sub>3</sub>PO<sub>3</sub> (3.00 Äq.) in Gegenwart von Harnstoff (1.00 Äq.) umgesetzt. Fragmente, die charakteristisch für das Phosphat-verbrückte Dinukleotid sind, sind grün markiert. Die kollisionsinduzierte Dissoziation erfolgte bei einer relativen Fragmentierungsenergie von 30%.



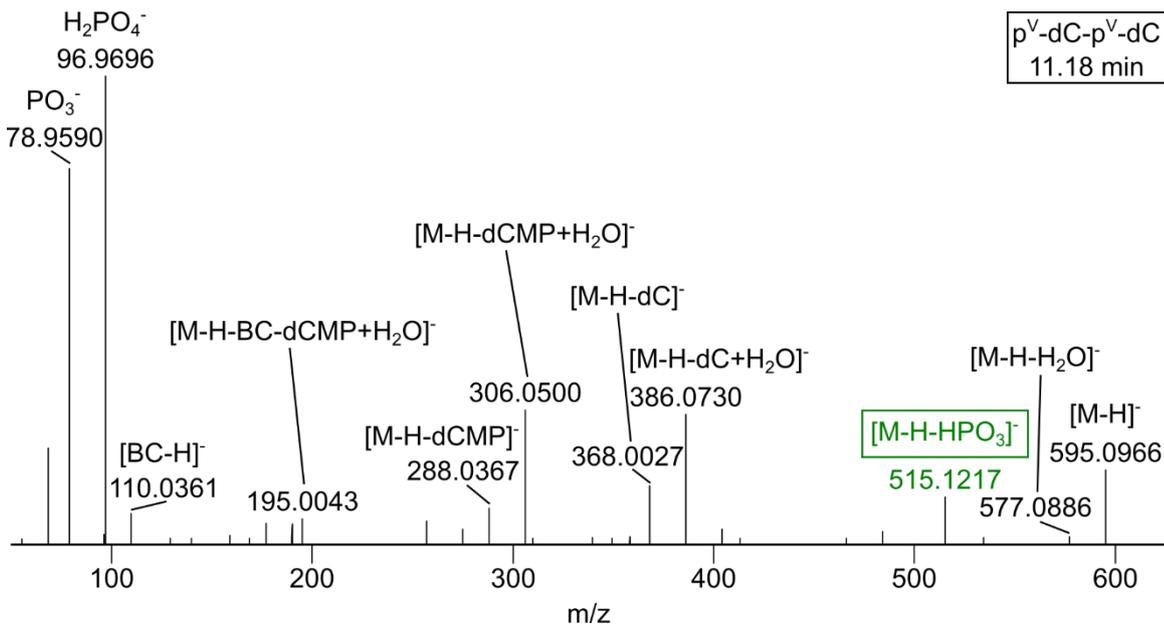
**Abbildung 84:** MS/MS-Spektrum des Signals des Uridin-basierten Dinukleotides ( $m/z = 629.0538$ ,  $t_{\text{mig}} = 10.25$  min). Uridin (100 mM) wurde für 7 d mit  $\text{H}_3\text{PO}_3$  (3.00 Äq.) in Gegenwart von Harnstoff (1.00 Äq.) umgesetzt. Die kollisionsinduzierte Dissoziation erfolgte bei einer relativen Fragmentierungsenergie von 30%.



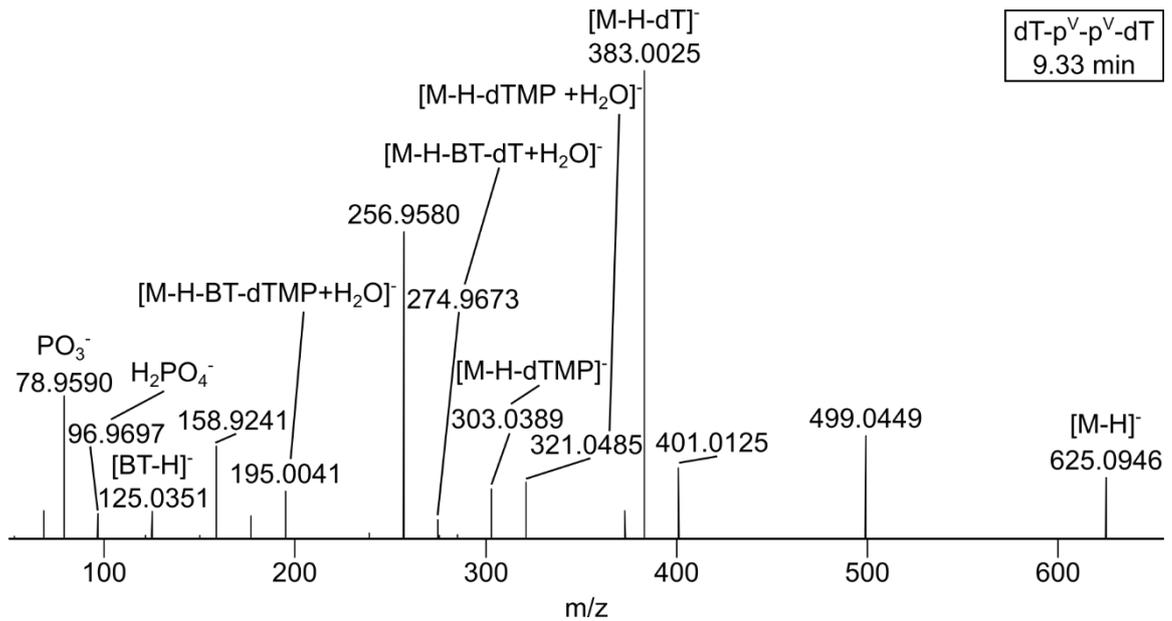
**Abbildung 85:** MS/MS-Spektrum des Signals des Uridin-basierten Dinukleotides ( $m/z = 629.0538$ ,  $t_{\text{mig}} = 12.80$  min). Uridin (100 mM) wurde für 7 d mit  $\text{H}_3\text{PO}_3$  (3.00 Äq.) in Gegenwart von Harnstoff (1.00 Äq.) umgesetzt. Fragmente, die charakteristisch für das Phosphat-verbrückte Dinukleotid sind, sind grün markiert. Die kollisionsinduzierte Dissoziation erfolgte bei einer relativen Fragmentierungsenergie von 30%.



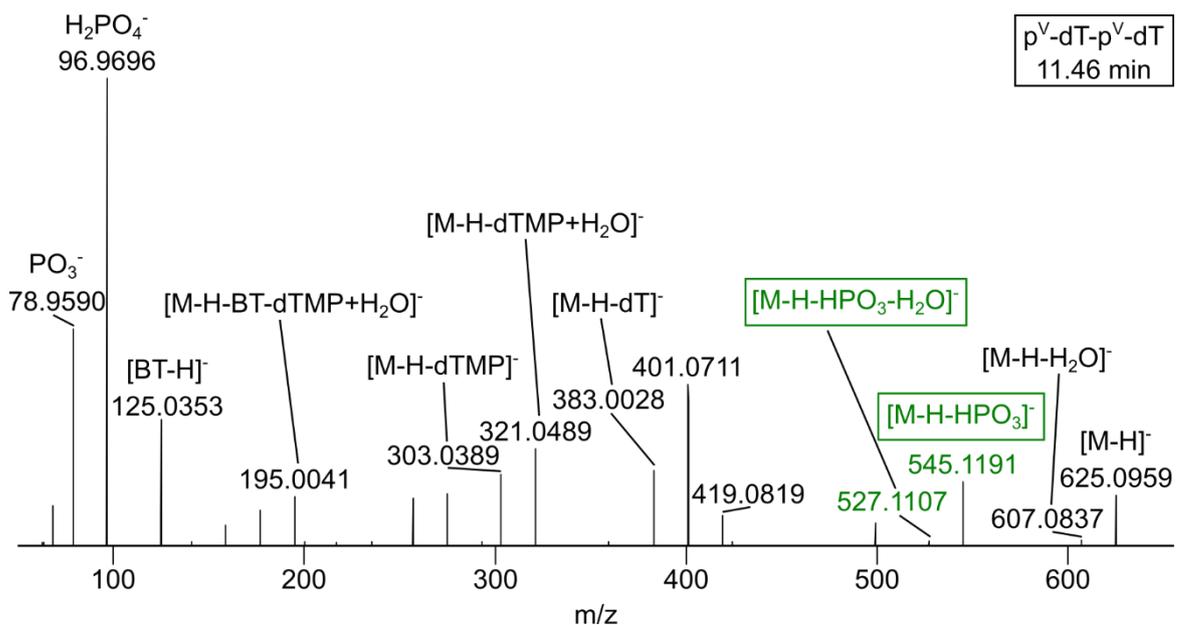
**Abbildung 86:** MS/MS-Spektrum des Signals des Desoxycytidin-basierten Dinucleotides ( $m/z = 595.0960$ ,  $t_{\text{mig}} = 9.09$  min). Desoxycytidin (100 mM) wurde für 7 d mit  $\text{H}_3\text{PO}_3$  (3.00 Äq.) in Gegenwart von Harnstoff (1.00 Äq.) umgesetzt. Die kollisionsinduzierte Dissoziation erfolgte bei einer relativen Fragmentierungsenergie von 30%.



**Abbildung 87:** MS/MS-Spektrum des Signals des Desoxycytidin-basierten Dinucleotides ( $m/z = 595.0960$ ,  $t_{\text{mig}} = 11.18$  min). Desoxycytidin (100 mM) wurde für 7 d mit  $\text{H}_3\text{PO}_3$  (3.00 Äq.) in Gegenwart von Harnstoff (1.00 Äq.) umgesetzt. Fragmente, die charakteristisch für das Phosphat-verbrückte Dinucleotid sind, sind grün markiert. Die kollisionsinduzierte Dissoziation erfolgte bei einer relativen Fragmentierungsenergie von 30%.



**Abbildung 88:** MS/MS-Spektrum des Signals des Desoxythymidin-basierten Dinukleotides ( $m/z = 625.0953$ ,  $t_{\text{mig}} = 9.33$  min). Desoxythymidin (100 mM) wurde für 7 d mit  $\text{H}_3\text{PO}_3$  (3.00 Äq.) in Gegenwart von Harnstoff (1.00 Äq.) umgesetzt. Die kollisionssinduzierte Dissoziation erfolgte bei einer relativen Fragmentierungsenergie von 30%.



**Abbildung 89:** MS/MS-Spektrum des Signals des Desoxythymidin-basierten Dinukleotides ( $m/z = 625.0953$ ,  $t_{\text{mig}} = 11.46$  min). Desoxythymidin (100 mM) wurde für 7 d mit  $\text{H}_3\text{PO}_3$  (3.00 Äq.) in Gegenwart von Harnstoff (1.00 Äq.) umgesetzt. Fragmente, die charakteristisch für das Phosphat-verbrückte Dinukleotid sind, sind grün markiert. Die kollisionssinduzierte Dissoziation erfolgte bei einer relativen Fragmentierungsenergie von 30%.

**Tabelle 85:** Anhand von CE-MS-Messungen detektierte Signale der Nukleosid-basierten Versuche mit H<sub>3</sub>PO<sub>3</sub> (3.00 Äq.) und Harnstoff (1.00 Äq.) nach 7 d. Die Intensität ist in *counts* angegeben und bezieht sich jeweils auf das intensivste Signal. Die entsprechenden *m/z* Werte wurden, soweit nicht anders angemerkt, mit einer Abweichung von 5 ppm extrahiert.

Produkt Signalanzahl Intensität	NMP	N-p <sup>III</sup>	cNMP	N-p <sup>V</sup> -N	N-p <sup>V</sup> -p <sup>V</sup> -N p <sup>V</sup> -N-p <sup>V</sup> -N	N-p <sup>V</sup> -p <sup>III</sup> -N p <sup>III</sup> -N-p <sup>V</sup> -N	NDP	N-p <sup>III</sup> -p <sup>III</sup> p <sup>III</sup> -N-p <sup>III</sup>	N-p <sup>V</sup> -p <sup>III</sup> p <sup>III</sup> -N-p <sup>V</sup>	NTP	p <sup>V</sup> -N-cp <sup>V</sup> N-cp <sup>V</sup> -p <sup>V</sup>	N-p <sup>III</sup> (S)	N-p <sup>V</sup> -p <sup>III</sup> (S) p <sup>III</sup> -N-p <sup>V</sup> (S) p <sup>V</sup> -N-p <sup>III</sup> (S)
C (100 mm) <sup>a</sup>	2 7.6E7	1 3.9E7	2 1.0E5	-	2 Sets <sup>b</sup> 4.3E6	1 1.6E5	4 9.8E6	1 1.0E5	4 9.0E5	4 9.6E5	1 8.8E5	1 <sup>c</sup> 1.1E5	-
U (100 mm) <sup>d</sup>	3 8.3E7	1 1.8E7	2 5.1E4	-	2 Sets <sup>b</sup> 2.3E6	1 6.1E4	3 6.5E6	1 4.5E4	1 4.5E5	3 2.0E6	2 4.1E5	1 <sup>c</sup> 2.8E5	-
G (100 mm) <sup>e</sup>	3 5.8E7	2 7.8E6	-	1 5.2E5	2 Sets <sup>b</sup> 1.8E5	-	4 1.1E7	1 7.4E4	6 3.8E5	3 5.6E5	2 8.5E4	2 <sup>c</sup> 7.4E5	1 <sup>c</sup> 8.1E4
dA (100 mm)	1 3.6E5	1 3.4E5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
dG (100 mm)	3.6E5 <sup>f</sup>	1.8E5 <sup>f</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
dC (100 mm) <sup>g</sup>	1 5.8E7	1 1.3E7	-	2 2.2E6	2 Sets <sup>b</sup> 2.5E6	1 1.3E5	2 8.0E5	-	1 9.6E4	4 1.7E6	-	-	-
dT (100 mm) <sup>h</sup>	1 1.3E8	1 4.5E7	1 1.1E5	-	2 Sets <sup>b</sup> 7.1E6	2 4.2E5	2 2.9E7	-	1 3.0E5	3 3.9E6	-	1 <sup>c</sup> 2.4E5	1 <sup>c</sup> 5.0E4

<sup>a</sup> Zusätzlich wurden auch die *m/z* Werte von C-p<sup>V</sup>-p<sup>V</sup>-p<sup>III</sup>/p<sup>III</sup>-C-p<sup>V</sup>-p<sup>V</sup>/p<sup>III</sup>-C(p<sup>V</sup>)-p<sup>V</sup> (4 Signale; 6.2E4), p<sup>V</sup>-p<sup>V</sup>-C-cp<sup>V</sup>/p<sup>V</sup>-C-cp<sup>V</sup>-p<sup>V</sup>/p<sup>V</sup>-p<sup>V</sup>-C-cp<sup>III</sup> (1 Signal, 5.6E4) und C-p<sup>III</sup>-p<sup>III</sup>(S)/p<sup>III</sup>-C-p<sup>III</sup>(S) (1 Signal; 5.6E4, Δ = 12.5 ppm) detektiert.

<sup>b</sup> 2 Sets: Die Massenspur enthält ein separates Signal sowie mehrere langsamer migrierende, überlagernde Signale (siehe auch Abbildung 71 und 72 auf s. 150).

<sup>c</sup> Die *m/z* Werte der Thioderivate wurden mit einer Abweichung von 12.5 bis 18.5 ppm extrahiert.

<sup>d</sup> Zusätzlich wurde auch der *m/z* Wert von U-p<sup>V</sup>-p<sup>V</sup>-p<sup>III</sup>/p<sup>III</sup>-U-p<sup>V</sup>-p<sup>V</sup>/p<sup>III</sup>-U(p<sup>V</sup>)-p<sup>V</sup> (2 Signale; 7.2E4) detektiert.

<sup>e</sup> Zusätzlich wurde auch der *m/z* Wert von p<sup>V</sup>-p<sup>V</sup>-G-cp<sup>V</sup>/p<sup>V</sup>-G-cp<sup>V</sup>-p<sup>V</sup> (1 Signal, 5.0E4) detektiert.

<sup>f</sup> Breite Signale.

<sup>g</sup> Zusätzlich wurde auch der *m/z* Wert von dC-p<sup>V</sup>-p<sup>V</sup>-p<sup>III</sup>/p<sup>III</sup>-dC-p<sup>V</sup>-p<sup>V</sup>/p<sup>III</sup>-dC(p<sup>V</sup>)-p<sup>V</sup> (2 Signale, 6.6E4) detektiert.

<sup>h</sup> Zusätzlich wurde auch der *m/z* Wert von dT-p<sup>V</sup>-p<sup>V</sup>-p<sup>III</sup>/p<sup>III</sup>-dT-p<sup>V</sup>-p<sup>V</sup>/p<sup>III</sup>-dT(p<sup>V</sup>)-p<sup>V</sup> (1 Signal, 1.6E5) detektiert.

### 7.2.3 Versuche mit anderen präbiotisch relevanten Substraten

**Tabelle 86:** Anhand von CE-MS-Messungen detektierte Signale der Versuche mit anderen präbiotisch relevanten Substraten in Gegenwart von  $H_3PO_3$  (3.00 Äq.) und Harnstoff (1.00 Äq.) nach 7 d. Die angegebene Intensität bezieht sich jeweils auf das intensivste Signal.

Substrat	Produkt	Signalanzahl (Abweichung (ppm))	Intensität (counts)	Produkte bestätigt durch Ko-Injektion
GL	GL Phosphat	2 (10.0)	2.7E7	GL-1-Phosphat GL-2-Phosphat
	zyklisches GL Phosphat	1 (10.0)	5.5E6	
	GL Phosphonat	1 (10.0)	1.2E6	
	GL <sub>2</sub> Phosphat	1 (10.0)	7.7E6	
	GL <sub>2</sub> Diphosphat	3 (10.0)	3.7E6	
	GL <sub>2</sub> Triphosphat	2 (10.0)	1.4E5	
	GL <sub>3</sub> Triphosphat	1 (10.0)	8.7E4	
	gemischtes (a-)zyklisches GL Diphosphat	1 (10.0)	2.3E5	
	gemischtes (a-)zyklisches GL <sub>2</sub> Diphosphat	1 (10.0)	1.9E5	
GCA	GCA Phosphat	1 (6.0)	9.7E4	
	GCA Phosphonat	1 (6.0)	2.0E5	
	GCA <sub>2</sub> Phosphonat	1 (6.0)	2.4E7	
	Glycerinsäure	1 (10.0)	1.8E6	
Rib	Rib Phosphat	3 (5.0)	8.9E5	Rib-5-Phosphat
Lc	Lc Phosphat	1 (6.5)	5.4E6	
	zyklisches Lc Phosphat	1 (6.5)	8.1E4	
	Lc Phosphonat	2 (6.5)	2.9E5	
	Lc Phosphat Phosphonat	1 (6.5)	1.4E5	
	Lc Triphosphonat	1 (6.5)	9.5E4	
	Lc <sub>2</sub> Phosphat	1 (6.5)	2.2E5	
Ser	Ser Phosphat	1 (8.0)	4.5E7	O-Phospho-Ser
	Ser Phosphonat	1 (8.0)	5.6E6	
	Ser Diphosphat	1 (8.0)	1.2E6	
	Ser <sub>2</sub> Phosphat	1 (8.0)	1.1E6	
	Ser <sub>2</sub> Diphosphat	2 (8.0)	5.3E5	
	Ser Triphosphat	1 (8.0)	2.2E5	
	Ser Triphosphonat	1 (8.0)	1.3E5	



# Kapitel 8

---

**Literaturverzeichnis**



- [1] R. Hyodo, T. Usui, *Science* **2021**, 373, 742-742.
- [2] B. L. Ehlmann, F. S. Anderson, J. Andrews-Hanna, D. C. Catling, P. R. Christensen, et al., *J. Geophys. Res.: Planets* **2016**, 121, 1927-1961.
- [3] W. Banzhaf, B. McMullin, Artificial Life in *Handbook of Natural Computing* (Eds.: G. Rozenberg, T. Bäck, J. N. Kok), Springer, Berlin, Heidelberg, **2012**, 1805-1834.
- [4] D. Trail, E. B. Watson, N. D. Tailby, *Nature* **2011**, 480, 79-82.
- [5] J. Kasting, *Science* **1993**, 259, 920-926.
- [6] L. M. Barge, *Nat. Commun.* **2018**, 9, 5170.
- [7] H. Rauchfuß, *Chemische Evolution und der Ursprung des Lebens*, Springer, Berlin, Heidelberg, **2005**.
- [8] R. M. Hazen, *Am. J. Sci.* **2013**, 313, 807-843.
- [9] R. M. Hazen, D. Papineau, W. Bleeker, R. T. Downs, J. M. Ferry, T. J. McCoy, D. A. Sverjensky, H. Yang, *Am. Mineral.* **2008**, 93, 1693-1720.
- [10] K. Zahnle, N. Arndt, C. Cockell, A. Halliday, E. Nisbet, F. Selsis, N. H. Sleep, *Space Sci. Rev.* **2007**, 129, 35-78.
- [11] W. Martin, J. Baross, D. Kelley, M. J. Russell, *Nat. Rev. Microbiol.* **2008**, 6, 805-814.
- [12] W. Martin, *Biol. Unserer Zeit* **2009**, 39, 166-174.
- [13] C. Darwin, *Letter to J. D. Hooker*, **1871**, Letter no. 7471, Darwin Correspondence Project, <https://www.darwinproject.ac.uk/letter/DCP-LETT-7471.xml>, (Stand: 07.07.2022)
- [14] Y. Yamagata, H. Watanabe, M. Saitoh, T. Namba, *Nature* **1991**, 352, 516-519.
- [15] R. Egel, *BioEssays* **2009**, 31, 1100-1109.
- [16] F. H. C. Crick, *J. Mol. Biol.* **1968**, 38, 367-379.
- [17] L. E. Orgel, *J. Mol. Biol.* **1968**, 38, 381-393.
- [18] K. Plankensteiner, H. Reiner, B. M. Rode, *Curr. Org. Chem.* **2005**, 9, 1107-1114.
- [19] G. Ashkenasy, T. M. Hermans, S. Otto, A. F. Taylor, *Chem. Soc. Rev.* **2017**, 46, 2543-2554.
- [20] G. Wächtershäuser, *Proc. Nat. Acad. Sci.* **1990**, 87, 200-204.
- [21] J. A. Baross, S. E. Hoffman, *Orig. Life Evol. Biosph.* **1985**, 15, 327-345.
- [22] W. Martin, M. J. Russell, *Philos. Trans. R. Soc., B* **2007**, 362, 1887-1926.
- [23] M. Frenkel-Pinter, M. Samanta, G. Ashkenasy, L. J. Lemán, *Chem. Rev.* **2020**, 120, 4707-4765.
- [24] D. M. Fialho, T. P. Roche, N. V. Hud, *Chem. Rev.* **2020**, 120, 4806-4830.
- [25] K. Zahnle, L. Schaefer, B. Fegley, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2010**, 2, a004895.
- [26] K. J. Zahnle, *Elements* **2006**, 2, 217-222.
- [27] N. H. Sleep, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2010**, 2, a002527.
- [28] J. F. Kasting, T. P. Ackerman, *Science* **1986**, 234, 1383-1385.
- [29] J. F. Kasting, K. J. Zahnle, J. P. Pinto, A. T. Young, *Orig. Life Evol. Biosph.* **1989**, 19, 95-108.
- [30] J. C. G. Walker, P. Brimblecombe, *Precambrian Res.* **1985**, 28, 205-222.
- [31] T. A. E. Jakschitz, B. M. Rode, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41, 5484.
- [32] F. H. Westheimer, *Science* **1987**, 235, 1173-1178.
- [33] J. Stawinski, A. Kraszewski, *Acc. Chem. Res.* **2002**, 35, 952-960.
- [34] A. Bouvier, M. Wadhwa, *Nat. Geosci.* **2010**, 3, 637-641.
- [35] E. G. Nisbet, N. H. Sleep, *Nature* **2001**, 409, 1083-1091.
- [36] G. B. Dalrymple, *Geological Society, London, Special Publications* **2001**, 190, 205-221.
- [37] W. F. Bottke, D. Vokrouhlický, S. Marchi, T. Swindle, E. R. D. Scott, J. R. Weirich, H. Levison, *Science* **2015**, 348, 321-323.
- [38] D. Herwartz, A. Pack, B. Friedrichs, A. Bischoff, *Science* **2014**, 344, 1146-1150.
- [39] A. N. Halliday, *Philos. Trans. R. Soc., A* **2008**, 366, 4163-4181.
- [40] S. A. Wilde, J. W. Valley, W. H. Peck, C. M. Graham, *Nature* **2001**, 409, 175-178.
- [41] S. J. Mojzsis, T. M. Harrison, R. T. Pidgeon, *Nature* **2001**, 409, 178-181.

- [42] W. H. Peck, J. W. Valley, S. A. Wilde, C. M. Graham, *Geochim. Cosmochim. Acta* **2001**, 65, 4215-4229.
- [43] O. Abramov, S. J. Mojzsis, *Nature* **2009**, 459, 419-422.
- [44] N. H. Sleep, K. Zahnle, *J. Geophys. Res.: Planets* **1998**, 103, 28529-28544.
- [45] O. Abramov, D. A. Kring, S. J. Mojzsis, *Geochemistry* **2013**, 73, 227-248.
- [46] C. F. Chyba, P. J. Thomas, L. Brookshaw, C. Sagan, *Science* **1990**, 249, 366-373.
- [47] N. H. Sleep, K. J. Zahnle, J. F. Kasting, H. J. Morowitz, *Nature* **1989**, 342, 139-142.
- [48] E. A. Bell, P. Boehnke, T. M. Harrison, W. L. Mao, *Proc. Nat. Acad. Sci.* **2015**, 112, 14518-14521.
- [49] Y. Ohtomo, T. Kakegawa, A. Ishida, T. Nagase, M. T. Rosing, *Nat. Geosci.* **2014**, 7, 25-28.
- [50] M. T. Rosing, *Science* **1999**, 283, 674-676.
- [51] M. Schidlowski, *Nature* **1988**, 333, 313-318.
- [52] S. J. Mojzsis, G. Arrhenius, K. D. Mckeegan, T. M. Harrison, A. P. Nutman, C. R. L. Friend, *Nature* **1996**, 384, 55-59.
- [53] E. J. Javaux, *Nature* **2019**, 572, 451-460.
- [54] M. R. Walter, R. Buick, J. S. R. Dunlop, *Nature* **1980**, 284, 443-445.
- [55] A. C. Allwood, M. R. Walter, B. S. Kamber, C. P. Marshall, I. W. Burch, *Nature* **2006**, 441, 714-718.
- [56] G. R. Byerly, D. R. Lower, M. M. Walsh, *Nature* **1986**, 319, 489-491.
- [57] N. Noffke, D. Christian, D. Wacey, R. M. Hazen, *Astrobiology* **2013**, 13, 1103-1124.
- [58] J. Schopf, B. Packer, *Science* **1987**, 237, 70-73.
- [59] F. Tian, O. B. Toon, A. A. Pavlov, H. De Sterck, *Science* **2005**, 308, 1014-1017.
- [60] J. L. Bada, C. Bigham, S. L. Miller, *Proc. Nat. Acad. Sci.* **1994**, 91, 1248-1250.
- [61] T. W. Lyons, C. T. Reinhard, N. J. Planavsky, *Nature* **2014**, 506, 307-315.
- [62] C.-T. A. Lee, L. Y. Yeung, N. R. Mckenzie, Y. Yokoyama, K. Ozaki, A. Lenardic, *Nat. Geosci.* **2016**, 9, 417-424.
- [63] C. Sagan, C. Chyba, *Science* **1997**, 276, 1217-1221.
- [64] C. Goldblatt, M. W. Claire, T. M. Lenton, A. J. Matthews, A. J. Watson, K. J. Zahnle, *Nat. Geosci.* **2009**, 2, 891-896.
- [65] S. B. Shirey, S. H. Richardson, *Science* **2011**, 333, 434-436.
- [66] H. James Cleaves II, A. Michalkova Scott, F. C. Hill, J. Leszczynski, N. Sahai, R. Hazen, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41, 5502.
- [67] E.-I. Ochiai, *Orig. Life* **1978**, 9, 81-91.
- [68] J. H. Carver, *Nature* **1981**, 292, 136-138.
- [69] A. Brack, Extraterrestrial Delivery of Organic Compounds in *Encyclopedia of Astrobiology* (Eds.: M. Gargaud, W. M. Irvine, R. Amils, H. J. Cleaves, D. L. Pinti, J. C. Quintanilla, D. Rouan, T. Spohn, S. Tirard, M. Viso), Springer, Berlin, Heidelberg, **2015**, 821-828.
- [70] 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**, 625-651.
- [71] S. Pizzarello, Y. Huang, L. Becker, R. J. Poreda, R. A. Nieman, G. Cooper, M. Williams, *Science* **2001**, 293, 2236-2239.
- [72] G. W. Cooper, W. M. Onwo, J. R. Cronin, *Geochim. Cosmochim. Acta* **1992**, 56, 4109-4115.
- [73] S. L. Miller, *Science* **1953**, 117, 528-529.
- [74] S. L. Miller, *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, 77, 2351-2361.
- [75] S. L. Miller, *Biochim. Biophys. Acta* **1957**, 23, 480-489.
- [76] C. Sagan, B. N. Khare, *Science* **1971**, 173, 417-420.
- [77] J. E. Van Trump, S. L. Miller, *Science* **1972**, 178, 859-860.
- [78] H. C. Urey, *Proc. Nat. Acad. Sci.* **1952**, 38, 351-363.

- [79] H. J. Cleaves, J. H. Chalmers, A. Lazcano, S. L. Miller, J. L. Bada, *Orig. Life Evol. Biosph.* **2008**, *38*, 105-115.
- [80] G. Schlesinger, S. L. Miller, *J. Mol. Evol.* **1983**, *19*, 376-382.
- [81] S. Miyakawa, H. Yamanashi, K. Kobayashi, H. J. Cleaves, S. L. Miller, *Proc. Nat. Acad. Sci.* **2002**, *99*, 14628-14631.
- [82] M. Ferus, F. Pietrucci, A. M. Saitta, A. Knížek, P. Kubelík, O. Ivanek, V. Shestivska, S. Civiš, *Proc. Nat. Acad. Sci.* **2017**, *114*, 4306-4311.
- [83] J. W. Morse, F. T. Mackenzie, *Aquat. Geochem.* **1998**, *4*, 301-319.
- [84] L. P. Knauth, *Nature* **1998**, *395*, 554-555.
- [85] K. Plankensteiner, H. Reiner, B. M. Rode, *Mol. Diversity* **2006**, *10*, 3-7.
- [86] M. Ruiz-Bermejo, C. Menor-Salván, S. Osuna-Esteban, S. Veintemillas-Verdaguer, *Orig. Life Evol. Biosph.* **2007**, *37*, 507.
- [87] M. Ruiz-Bermejo, L. A. Rivas, A. Palacín, C. Menor-Salván, S. Osuna-Esteban, *Orig. Life Evol. Biosph.* **2011**, *41*, 331-345.
- [88] D. S. Kelley, J. A. Baross, J. R. Delaney, *Annu. Rev. Earth Planet. Sci.* **2002**, *30*, 385-491.
- [89] 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.
- [90] D. S. Kelley, J. A. Karson, D. K. Blackman, G. L. Früh-Green, D. A. Butterfield, et al., *Nature* **2001**, *412*, 145-149.
- [91] 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.
- [92] G. L. Früh-Green, D. S. Kelley, S. M. Bernasconi, J. A. Karson, K. A. Ludwig, D. A. Butterfield, C. Boschi, G. Proskurowski, *Science* **2003**, *301*, 495-498.
- [93] B. Rasmussen, *Nature* **2000**, *405*, 676-679.
- [94] K. Kashefi, D. R. Lovley, *Science* **2003**, *301*, 934-934.
- [95] G. Wächtershäuser, *Microbiol. Rev.* **1988**, *52*, 452-484.
- [96] G. Wächtershäuser, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **1992**, *58*, 85-201.
- [97] L. J. Rothschild, R. L. Mancinelli, *Nature* **2001**, *409*, 1092-1101.
- [98] W. M. Napier, *Mon. Not. R. Astron. Soc.* **2004**, *348*, 46-51.
- [99] G. Horneck, H. Bücker, G. Reitz, *Adv. Space Res.* **1994**, *14*, 41-45.
- [100] I. Ginsburg, M. Lingam, A. Loeb, *ApJL* **2018**, *868*, L12.
- [101] N. G. Bochkarev, *Astron. Rep.* **2017**, *61*, 307-309.
- [102] 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.
- [103] P. S. Wesson, *Space Sci. Rev.* **2010**, *156*, 239-252.
- [104] N. Lahav, S. Chang, *J. Mol. Evol.* **1976**, *8*, 357-380.
- [105] N. Lahav, D. White, S. Chang, *Science* **1978**, *201*, 67-69.
- [106] D. Deamer, B. Damer, *Astrobiology* **2017**, *17*, 834-839.
- [107] S. Saetia, K. R. Liedl, A. H. Eder, B. M. Rode, *Orig. Life Evol. Biosph.* **1993**, *23*, 167-176.
- [108] 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.
- [109] 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.
- [110] 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.
- [111] S. Becker, C. Schneider, H. Okamura, A. Crisp, T. Amatov, M. Dejmek, T. Carell, *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 163.
- [112] R. Lohrmann, L. E. Orgel, *Science* **1971**, *171*, 490-494.
- [113] C. Ponnampereuma, R. Mack, *Science* **1965**, *148*, 1221-1223.
- [114] S. W. Fox, K. Harada, *Science* **1958**, *128*, 1214-1214.
- [115] S. Lamour, S. Pallmann, M. Haas, O. Trapp, *Life* **2019**, *9*, 52.
- [116] M. Haas, S. Lamour, S. B. Christ, O. Trapp, *Commun. Chem.* **2020**, *3*, 140.

- [117] T. Stolar, S. Grubešić, N. Cindro, E. Meštrović, K. Užarević, J. G. Hernández, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 12727-12731.
- [118] M. A. Pasek, *Chem. Rev.* **2020**, *120*, 4690-4706.
- [119] M. Gull, *Challenges* **2014**, *5*, 193-212.
- [120] M. A. Pasek, *Proc. Nat. Acad. Sci.* **2008**, *105*, 853-858.
- [121] J. E. Šponer, J. Šponer, O. Nováková, V. Brabec, O. Šedo, et al., *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 3572-3586.
- [122] G. Costanzo, R. Saladino, C. Crestini, F. Ciciriello, E. Di Mauro, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 16729-16735.
- [123] A. M. Schoffstall, E. M. Laing, *Orig. Life Evol. Biosph.* **1985**, *15*, 141-150.
- [124] M. Gull, M. Zhou, F. M. Fernández, M. A. Pasek, *J. Mol. Evol.* **2014**, *78*, 109-117.
- [125] G. Costanzo, R. Saladino, G. Botta, A. Giorgi, A. Scipioni, S. Pino, E. Di Mauro, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 999-1008.
- [126] C. Huber, W. Eisenreich, G. Wächtershäuser, *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 1069-1071.
- [127] I. Halevy, D. P. Schrag, *Geophys. Res. Lett.* **2009**, *36*, L23201.
- [128] S. Ranjan, Z. R. Todd, J. D. Sutherland, D. D. Sasselov, *Astrobiology* **2018**, *18*, 1023-1040.
- [129] Z. Liu, L.-F. Wu, C. L. Kufner, D. D. Sasselov, W. W. Fischer, J. D. Sutherland, *Nat. Chem.* **2021**, *13*, 1126-1132.
- [130] S. Becker, J. Feldmann, S. Wiedemann, H. Okamura, C. Schneider, et al., *Science* **2019**, *366*, 76-82.
- [131] D. J. Ritson, C. Battilocchio, S. V. Ley, J. D. Sutherland, *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 1821.
- [132] J. Xu, D. J. Ritson, S. Ranjan, Z. R. Todd, D. D. Sasselov, J. D. Sutherland, *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 5566-5569.
- [133] F. Chen, D. Yang, *Orig. Life Evol. Biosph.* **2007**, *37*, 47-54.
- [134] J. Kawai, D. C. Mclendon, H.-J. Kim, S. A. Benner, *Astrobiology* **2019**, *19*, 506-516.
- [135] G. Pelzer, W. Keim, *J. Mol. Catal. A: Chem.* **1999**, *139*, 235-238.
- [136] D. Marković, C. M. R. Volla, P. Vogel, A. Varela-Álvarez, J. A. Sordo, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 5969-5975.
- [137] T. Kitamura, N. Tanaka, A. Mihashi, A. Matsumoto, *Macromolecules* **2010**, *43*, 1800-1806.
- [138] T. Hoffmann, H. Hoffmann, M. Karabit, P. Zdunneck, E. Wenschuh, J. Reinhold, M. Schüler, *Z. anorg. allg. Chem.* **1988**, *565*, 91-105.
- [139] W. A. Schenk, G. H. J. Hilpert, *Chem. Ber.* **1991**, *124*, 433-439.
- [140] J. Lugiņina, J. Uzuleņa, D. Posevins, M. Turks, *Eur. J. Org. Chem.* **2016**, *2016*, 1760-1771.
- [141] F. W. Bergstrom, *J. Phys. Chem.* **1922**, *26*, 876-894.
- [142] F. W. Bergstrom, *J. Phys. Chem.* **1922**, *26*, 358-376.
- [143] B. G. Soares, *Prog. Polym. Sci.* **1997**, *22*, 1397-1430.
- [144] H. Mayr, G. Gorath, B. Bauer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1994**, *33*, 788-789.
- [145] L. J. Andrews, R. M. Keefer, *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, *73*, 4169-4172.
- [146] P. A. D. De Maine, *J. Chem. Phys.* **1957**, *26*, 1036-1041.
- [147] U. Beifuss, D. Schmidt, H. Leutbecher, J. Conrad, I. Klaiber, S. Mika, G. Greiner, *Synlett* **2007**, *2007*, 1725-1729.
- [148] R. Mews, E. Lork, P. G. Watson, B. Görtler, *Coord. Chem. Rev.* **2000**, *197*, 277-320.
- [149] A. Chénéde, I. Fleming, R. Salmon, M. C. West, *J. Organomet. Chem.* **2003**, *686*, 84-93.
- [150] K. Gulbe, J. Lugiņina, E. Jansons, A. Kinens, M. Turks, *Beil. J. Org. Chem.* **2021**, *17*, 964-976.
- [151] D. Posevins, K. Suta, M. Turks, *Eur. J. Org. Chem.* **2016**, *2016*, 1414-1419.
- [152] W. Gilbert, *Nature* **1986**, *319*, 618-618.

- [153] P. G. Higgs, N. Lehman, *Nat. Rev. Genet.* **2015**, *16*, 7-17.
- [154] M. P. Robertson, G. F. Joyce, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2012**, *4*, a003608.
- [155] C. Guerrier-Takada, S. Altman, *Science* **1984**, *223*, 285-286.
- [156] C. Guerrier-Takada, K. Gardiner, T. Marsh, N. Pace, S. Altman, *Cell* **1983**, *35*, 849-857.
- [157] K. Kruger, P. J. Grabowski, A. J. Zaug, J. Sands, D. E. Gottschling, T. R. Cech, *Cell* **1982**, *31*, 147-157.
- [158] H. B. White, *J. Mol. Evol.* **1976**, *7*, 101-104.
- [159] S. Yao, I. Ghosh, R. Zutshi, J. Chmielewski, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 10559-10560.
- [160] B. Rubinov, N. Wagner, H. Rapaport, G. Ashkenasy, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6683-6686.
- [161] B. Rubinov, N. Wagner, M. Matmor, O. Regev, N. Ashkenasy, G. Ashkenasy, *ACS Nano* **2012**, *6*, 7893-7901.
- [162] A. Brack, L. E. Orgel, *Nature* **1975**, *256*, 383-387.
- [163] A. K. Mehta, K. Lu, W. S. Childers, Y. Liang, S. N. Dublin, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 9829-9835.
- [164] S. Santoso, W. Hwang, H. Hartman, S. Zhang, *Nano Lett.* **2002**, *2*, 687-691.
- [165] M. Reches, E. Gazit, *Science* **2003**, *300*, 625-627.
- [166] M. Reches, Y. Porat, E. Gazit, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 35475-35480.
- [167] M. R. Sawaya, S. Sambashivan, R. Nelson, M. I. Ivanova, S. A. Sievers, et al., *Nature* **2007**, *447*, 453-457.
- [168] S. W. Fox, J. R. Jungck, T. Nakashima, *Orig. Life* **1974**, *5*, 227-237.
- [169] W. S. Childers, R. Ni, A. K. Mehta, D. G. Lynn, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, *13*, 652-659.
- [170] G. Danger, R. Plasson, R. Pascal, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 5416.
- [171] A. L. Weber, S. Pizzarello, *Proc. Nat. Acad. Sci.* **2006**, *103*, 12713-12717.
- [172] W. Zou, I. Ibrahim, P. Dziedzic, H. Sundén, A. Córdova, *Chem. Commun.* **2005**, 4946-4948.
- [173] T. Schnitzer, M. Wiesner, P. Krattiger, J. D. Revell, H. Wennemers, *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 5877-5881.
- [174] R. Wieczorek, M. Dörr, A. Chotera, P. L. Luisi, P.-A. Monnard, *ChemBioChem* **2013**, *14*, 217-223.
- [175] P. L. Luisi, P. Walde, T. Oberholzer, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **1999**, *4*, 33-39.
- [176] M. M. Hanczyc, S. M. Fujikawa, J. W. Szostak, *Science* **2003**, *302*, 618-622.
- [177] G. F. Joyce, A. W. Schwartz, S. L. Miller, L. E. Orgel, *Proc. Nat. Acad. Sci.* **1987**, *84*, 4398-4402.
- [178] A. Eschenmoser, *Science* **1999**, *284*, 2118-2124.
- [179] M. Egholm, O. Buchardt, P. E. Nielsen, R. H. Berg, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 1895-1897.
- [180] V. Müller, *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, *69*, 6345-6353.
- [181] G. Fuchs, *FEMS Microbiol. Lett.* **1986**, *39*, 181-213.
- [182] K. B. Muchowska, S. J. Varma, J. Moran, *Nature* **2019**, *569*, 104-107.
- [183] S. J. Varma, K. B. Muchowska, P. Chatelain, J. Moran, *Nat. Ecol. Evol.* **2018**, *2*, 1019-1024.
- [184] K. B. Muchowska, S. J. Varma, E. Chevallot-Beroux, L. Lethuillier-Karl, G. Li, J. Moran, *Nat. Ecol. Evol.* **2017**, *1*, 1716-1721.
- [185] B. H. Patel, C. Percivalle, D. J. Ritson, C. D. Duffy, J. D. Sutherland, *Nat. Chem.* **2015**, *7*, 301-307.
- [186] J. P. Dworkin, A. Lazcano, S. L. Miller, *J. Theo. Biol.* **2003**, *222*, 127-134.
- [187] N. Lahav, *J. Theo. Biol.* **1991**, *151*, 531-539.
- [188] D. Kroiss, G. Ashkenasy, A. B. Braunschweig, T. Tuttle, R. V. Ulijn, *Chem* **2019**, *5*, 1917-1920.

- [189] R. J.-C. Hennet, N. G. Holm, M. H. Engel, *Naturwissenschaften* **1992**, *79*, 361-365.
- [190] W. L. Marshall, *Geochim. Cosmochim. Acta* **1994**, *58*, 2099-2106.
- [191] X. Zhang, G. Tian, J. Gao, M. Han, R. Su, Y. Wang, S. Feng, *Orig. Life Evol. Biosph.* **2017**, *47*, 413-425.
- [192] H. Yanagawa, K. Kobayashi, *Orig. Life Evol. Biosph.* **1992**, *22*, 147-159.
- [193] D. P. Summers, S. Chang, *Nature* **1993**, *365*, 630-633.
- [194] M. Dörr, J. Käßbohrer, R. Grunert, G. Kreisel, W. A. Brand, et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 1540-1543.
- [195] A. S. Burton, J. C. Stern, J. E. Elsila, D. P. Glavin, J. P. Dworkin, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 5459.
- [196] K. Kvenvolden, J. Lawless, K. Pering, E. Peterson, J. Flores, C. Ponnampereuma, I. R. Kaplan, C. Moore, *Nature* **1970**, *228*, 923-926.
- [197] J. R. Cronin, S. Pizzarello, *Science* **1997**, *275*, 951-955.
- [198] D. A. M. Zaia, C. T. B. V. Zaia, H. De Santana, *Orig. Life Evol. Biosph.* **2008**, *38*, 469-488.
- [199] P. G. Higgs, R. E. Pudritz, *Astrobiology* **2009**, *9*, 483-490.
- [200] N. Kitadai, S. Maruyama, *Geosci. Front.* **2018**, *9*, 1117-1153.
- [201] D. L. Rohlffing, *Science* **1976**, *193*, 68-70.
- [202] S. W. Fox, K. Harada, *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 3745-3751.
- [203] S. Andini, E. Benedetti, L. Ferrara, L. Paolillo, P. A. Temussi, *Orig. Life* **1975**, *6*, 147-153.
- [204] H. Mita, S. Nomoto, M. Terasaki, A. Shimoyama, Y. Yamamoto, *Int. J. Astrobiol.* **2005**, *4*, 145.
- [205] J. P. T. Bau, C. E. A. Carneiro, A. C. S. da Costa, D. F. Valezi, E. di Mauro, E. Pilau, D. A. M. Zaia, *Orig. Life Evol. Biosph.* **2021**, *51*, 299-320.
- [206] 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.
- [207] 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. Nat. Acad. Sci.* **2019**, *116*, 16338-16346.
- [208] J. Hulshof, C. Ponnampereuma, *Orig. Life* **1976**, *7*, 197-224.
- [209] C. Ponnampereuma, E. Peterson, *Science* **1965**, *147*, 1572-1574.
- [210] M. Halmann, *Arch. Biochem. Biophys.* **1968**, *128*, 808-810.
- [211] J. J. Flores, J. O. Leckie, *Nature* **1973**, *244*, 435-437.
- [212] J. P. Ferris, A. R. Hill, R. Liu, L. E. Orgel, *Nature* **1996**, *381*, 59-61.
- [213] G. Steinman, D. H. Kenyon, M. Calvin, *Nature* **1965**, *206*, 707-708.
- [214] G. Steinman, R. M. Lemmon, M. Calvin, *Science* **1965**, *147*, 1574-1575.
- [215] G. Steinman, R. M. Lemmon, M. Calvin, *Proc. Nat. Acad. Sci.* **1964**, *52*, 27-30.
- [216] S. Chang, J. Flores, C. Ponnampereuma, *Proc. Nat. Acad. Sci.* **1969**, *64*, 1011-1015.
- [217] G. Danger, L. Boiteau, H. Cottet, R. Pascal, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 7412-7413.
- [218] C. Gibard, S. Bhowmik, M. Karki, E.-K. Kim, R. Krishnamurthy, *Nat. Chem.* **2018**, *10*, 212-217.
- [219] L. Leman, L. Orgel, M. R. Ghadiri, *Science* **2004**, *306*, 283-286.
- [220] C. Huber, G. Wächtershäuser, *Science* **1998**, *281*, 670-672.
- [221] A. L. Weber, *Orig. Life Evol. Biosph.* **2005**, *35*, 421-427.
- [222] A. Brack, *Orig. Life* **1984**, *14*, 229-236.
- [223] L. J. Leman, Z.-Z. Huang, M. R. Ghadiri, *Astrobiology* **2015**, *15*, 709-716.
- [224] J. Rabinowitz, J. Flores, R. Krebsbach, G. Rogers, *Nature* **1969**, *224*, 795-796.
- [225] N. M. Chung, R. Lohrmann, L. E. Orgel, J. Rabinowitz, *Tetrahedron* **1971**, *27*, 1205-1210.
- [226] H. Sawai, R. Lohrmann, L. E. Orgel, *J. Mol. Evol.* **1975**, *6*, 165-184.

- [227] A. L. Weber, J. M. Caroon, J. T. Warden, R. M. Lemmon, M. Calvin, *Biosystems* **1977**, *8*, 277-286.
- [228] J. Rabinowitz, *Helv. Chim. Acta* **1969**, *52*, 2663-2671.
- [229] M. G. Schwendinger, B. M. Rode, *Anal. Sci.* **1989**, *5*, 411-414.
- [230] N. Abou Mrad, G. Ajram, J.-C. Rossi, L. Boiteau, F. Duvernay, R. Pascal, G. Danger, *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 7418-7421.
- [231] H. Leuchs, W. Geiger, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1908**, *41*, 1721-1726.
- [232] R. Pascal, L. Boiteau, A. Commeyras, From the Prebiotic Synthesis of  $\alpha$ -Amino Acids Towards a Primitive Translation Apparatus for the Synthesis of Peptides in *Prebiotic Chemistry* (Ed.: P. Walde), Springer, Berlin, Heidelberg, **2005**, 69-122.
- [233] A. Brack, *Orig. Life Evol. Biosph.* **1987**, *17*, 367-379.
- [234] C. Huber, *Science* **1997**, *276*, 245-247.
- [235] L. J. Leman, L. E. Orgel, M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 20-21.
- [236] J. Taillades, H. Collet, L. Garrel, I. Beuzelin, L. Boiteau, H. Choukroun, A. Commeyras, *J. Mol. Evol.* **1999**, *48*, 638-645.
- [237] A. Brack, *Orig. Life Evol. Biosph.* **1993**, *23*, 3-10.
- [238] N. E. Blair, W. A. Bonner, *Orig. Life* **1981**, *11*, 331-335.
- [239] J.-P. Biron, R. Pascal, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9198-9199.
- [240] J.-P. Biron, A. L. Parkes, R. Pascal, J. D. Sutherland, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 6731-6734.
- [241] L. Leman, M. Ghadiri, *Synlett* **2016**, *28*, 68-72.
- [242] G. Danger, A. Michaut, M. Bucchi, L. Boiteau, J. Canal, R. Plasson, R. Pascal, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 611-614.
- [243] M. Goodman, W. J. Mcgahren, *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 3028-3029.
- [244] D. Beaufils, G. Danger, L. Boiteau, J.-C. Rossi, R. Pascal, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 3100.
- [245] R. Okamoto, T. Haraguchi, K. Nomura, Y. Maki, M. Izumi, Y. Kajihara, *Biochemistry* **2019**, *58*, 1672-1678.
- [246] P. Canavelli, S. Islam, M. W. Powner, *Nature* **2019**, *571*, 546-549.
- [247] C. S. Foden, S. Islam, C. Fernández-García, L. Maugeri, T. D. Sheppard, M. W. Powner, *Science* **2020**, *370*, 865-869.
- [248] M. Nagayama, O. Takaoka, K. Inomata, Y. Yamagata, *Orig. Life Evol. Biosph.* **1990**, *20*, 249-257.
- [249] L.-F. Wu, Z. Liu, J. D. Sutherland, *Chem. Commun.* **2021**, *57*, 73-76.
- [250] M. G. Schwendinger, B. M. Rode, *Orig. Life Evol. Biosph.* **1992**, *22*, 349-359.
- [251] B. M. Rode, M. G. Schwendinger, *Orig. Life Evol. Biosph.* **1990**, *20*, 401-410.
- [252] K. R. Liedl, B. M. Rode, *Chem. Phys. Lett.* **1992**, *197*, 181-186.
- [253] K. Plankensteiner, A. Righi, B. M. Rode, *Orig. Life Evol. Biosph.* **2002**, *32*, 225-236.
- [254] B. M. Rode, A. H. Eder, Y. Yongyai, *Inorg. Chim. Acta* **1997**, *254*, 309-314.
- [255] Y. Suwannachot, B. M. Rode, *Orig. Life Evol. Biosph.* **1998**, *28*, 79-90.
- [256] F. Li, D. Fitz, D. G. Fraser, B. M. Rode, *J. Inorg. Biochem.* **2008**, *102*, 1212-1217.
- [257] D. Fitz, T. Jakschitz, B. M. Rode, *J. Inorg. Biochem.* **2008**, *102*, 2097-2102.
- [258] M. G. Schwendinger, R. Tattler, S. Saetia, K. R. Liedl, R. T. Kroemer, B. M. Rode, *Inorg. Chim. Acta* **1995**, *228*, 207-214.
- [259] K. Plankensteiner, A. Righi, B. M. Rode, R. Gargallo, J. Jaumot, R. Tauler, *Inorg. Chim. Acta* **2004**, *357*, 649-656.
- [260] J.-F. Lambert, *Orig. Life Evol. Biosph.* **2008**, *38*, 211-242.
- [261] J. D. Bernal, *Proc. Phys. Soc., Sect. B* **1949**, *62*, 597-618.
- [262] N. Kitadai, H. Oonishi, K. Umemoto, T. Usui, K. Fukushi, S. Nakashima, *Orig. Life Evol. Biosph.* **2017**, *47*, 123-143.
- [263] J. Bujdák, B. M. Rode, *Orig. Life Evol. Biosph.* **1999**, *29*, 451-461.
- [264] J. Bujdák, B. M. Rode, *J. Mol. Evol.* **1997**, *45*, 457-466.
- [265] V. A. Basiuk, T. Y. Gromovoy, *React. Kinet. Catal. Lett.* **1993**, *50*, 297-303.

- [266] A. Rimola, S. Tosoni, M. Sodupe, P. Ugliengo, *Chem. Phys. Lett.* **2005**, *408*, 295-301.
- [267] A. Rimola, M. Sodupe, P. Ugliengo, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 8333-8344.
- [268] J. Bujdák, H. Slosiarikova, N. Texler, M. Schwendinger, B. M. Rode, *Monatsh. Chem.* **1994**, *125*, 1033-1039.
- [269] J. Bujdák, K. Faybíková, A. Eder, Y. Yongyai, B. M. Rode, *Orig. Life Evol. Biosph.* **1995**, *25*, 431-441.
- [270] S. Morrison, S. Runyon, R. Hazen, *Life* **2018**, *8*, 64.
- [271] A. Meunier, S. Petit, C. S. Cockell, A. El Albani, D. Beaufort, *Orig. Life Evol. Biosph.* **2010**, *40*, 253-272.
- [272] J. F. Kasting, *Orig. Life Evol. Biosph.* **1990**, *20*, 199-231.
- [273] N. G. Holm, A. Neubeck, *Geochem. Trans.* **2009**, *10*, 9.
- [274] A. Smirnov, D. Hausner, R. Laffers, D. R. Strongin, M. A. Schoonen, *Geochem. Trans.* **2008**, *9*, 5.
- [275] U. Shanker, B. Bhushan, G. Bhattacharjee, Kamaluddin, *Orig. Life Evol. Biosph.* **2012**, *42*, 31-45.
- [276] T. Georgelin, M. Akouche, M. Jaber, Y. Sakhno, L. Matheron, F. Fournier, C. Méthivier, G. Martra, J.-F. Lambert, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2017**, *2017*, 198-211.
- [277] M. Iqubal, R. Sharma, S. Jheeta, Kamaluddin, *Life* **2017**, *7*, 15.
- [278] G. Matrajt, D. Blanot, *Amino Acids* **2004**, *26*, 153-158.
- [279] K. Naka, Y. Tampo, Y. Chujo, *J. Organomet. Chem.* **2007**, *692*, 436-441.
- [280] A. Butlerow, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1861**, *120*, 295-298.
- [281] R. Breslow, *Tetrahedron Lett.* **1959**, *1*, 22-26.
- [282] O. Pestunova, A. Simonov, V. Snytnikov, V. Stoyanovsky, V. Parmon, *Adv. Space Res.* **2005**, *36*, 214-219.
- [283] H. Killiani, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1885**, *18*, 3066-3072.
- [284] E. Fischer, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1889**, *22*, 2204-2205.
- [285] D. Ritson, J. D. Sutherland, *Nat. Chem.* **2012**, *4*, 895-899.
- [286] D. J. Ritson, J. D. Sutherland, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 5845-5847.
- [287] J. P. Ferris, R. A. Sanchez, L. E. Orgel, *J. Mol. Biol.* **1968**, *33*, 693-704.
- [288] M. P. Robertson, S. L. Miller, *Nature* **1995**, *375*, 772-774.
- [289] J. P. Ferris, O. S. Zamek, A. M. Altbuch, H. Freiman, *J. Mol. Evol.* **1974**, *3*, 301-309.
- [290] H. Okamura, S. Becker, N. Tiede, S. Wiedemann, J. Feldmann, T. Carell, *Chem. Commun.* **2019**, *55*, 1939-1942.
- [291] J. Oró, A. P. Kimball, *Arch. Biochem. Biophys.* **1961**, *94*, 217-227.
- [292] R. A. Sanchez, J. P. Ferris, L. E. Orgel, *J. Mol. Biol.* **1967**, *30*, 223-253.
- [293] R. A. Sanchez, J. P. Ferris, L. E. Orgel, *J. Mol. Biol.* **1968**, *38*, 121-128.
- [294] R. Shapiro, *Orig. Life Evol. Biosph.* **1988**, *18*, 71-85.
- [295] R. Larralde, M. P. Robertson, S. L. Miller, *Proc. Nat. Acad. Sci.* **1995**, *92*, 8158-8160.
- [296] G. Springsteen, G. F. Joyce, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9578-9583.
- [297] R. A. Sanchez, L. E. Orgel, *J. Mol. Biol.* **1970**, *47*, 531-543.
- [298] W. D. Fuller, R. A. Sanchez, L. E. Orgel, *J. Mol. Evol.* **1972**, *1*, 249-257.
- [299] W. D. Fuller, R. A. Sanchez, L. E. Orgel, *J. Mol. Biol.* **1972**, *67*, 25-33.
- [300] C. Ponnampertuma, C. Sagan, R. Mariner, *Nature* **1963**, *199*, 222-226.
- [301] M. W. Powner, B. Gerland, J. D. Sutherland, *Nature* **2009**, *459*, 239-242.
- [302] M. W. Powner, J. D. Sutherland, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 4641-4643.
- [303] S. Islam, D.-K. Bučar, M. W. Powner, *Nat. Chem.* **2017**, *9*, 584-589.
- [304] S. Stairs, A. Nikmal, D.-K. Bučar, S.-L. Zheng, J. W. Szostak, M. W. Powner, *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 15270.
- [305] S. Becker, I. Thoma, A. Deutsch, T. Gehrke, P. Mayer, H. Zipse, T. Carell, *Science* **2016**, *352*, 833-836.
- [306] J. S. Teichert, F. M. Kruse, O. Trapp, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 9944-9947.

- [307] K. W. Knouse, D. T. Flood, J. C. Vantourout, M. A. Schmidt, I. M. McDonald, M. D. Eastgate, P. S. Baran, *ACS Cent. Sci.* **2021**, *7*, 1473-1485.
- [308] D. Glindemann, R. M. de Graaf, A. W. Schwartz, *Orig. Life Evol. Biosph.* **1999**, *29*, 555-561.
- [309] R. M. de Graaf, A. W. Schwartz, *Orig. Life Evol. Biosph.* **2000**, *30*, 405-410.
- [310] B. L. Hess, S. Piazzolo, J. Harvey, *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 1535.
- [311] B. Herschy, S. J. Chang, R. Blake, A. Lepland, H. Abbott-Lyon, J. Sampson, Z. Atlas, T. P. Kee, M. A. Pasek, *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 1346.
- [312] M. Pasek, D. Lauretta, *Orig. Life Evol. Biosph.* **2008**, *38*, 5-21.
- [313] O. I. Yakovlev, Y. P. Dikov, M. V. Gerasimov, *Geochem. Int.* **2006**, *44*, 847-854.
- [314] D. E. Bryant, T. P. Kee, *Chem. Commun.* **2006**, 2344-2346.
- [315] M. A. Pasek, D. S. Lauretta, *Astrobiology* **2005**, *5*, 515-535.
- [316] N. L. La Cruz, D. Qasim, H. Abbott-Lyon, C. Pirim, A. D. Mckee, T. Orlando, M. Gull, D. Lindsay, M. A. Pasek, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, *18*, 20160-20167.
- [317] S. Pallmann, J. Šteflová, M. Haas, S. Lamour, A. Henß, O. Trapp, *New J. Phys.* **2018**, *20*, 055003.
- [318] H. Pech, M. G. Vazquez, J. Van Buren, K. L. Foster, L. Shi, T. M. Salmassi, M. M. Ivey, M. A. Pasek, *J. Chromatogr. Sci.* **2011**, *49*, 573-581.
- [319] M. A. Pasek, J. P. Dworkin, D. S. Lauretta, *Geochim. Cosmochim. Acta* **2007**, *71*, 1721-1736.
- [320] M. A. Pasek, J. P. Harnmeijer, R. Buick, M. Gull, Z. Atlas, *Proc. Nat. Acad. Sci.* **2013**, *110*, 10089-10094.
- [321] H. Pech, A. Henry, C. S. Khachikian, T. M. Salmassi, G. Hanrahan, K. L. Foster, *Environ. Sci. Tech.* **2009**, *43*, 7671-7675.
- [322] M. Pasek, K. Block, *Nat. Geosci.* **2009**, *2*, 553-556.
- [323] A. W. Schwartz, M. Veen, T. Bisseling, G. J. F. Chittenden, *Orig. Life* **1975**, *6*, 163-168.
- [324] M. J. Bishop, R. Lohrmann, L. E. Orgel, *Nature* **1972**, *237*, 162-164.
- [325] O. R. Maguire, I. B. A. Smokers, W. T. S. Huck, *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 5517.
- [326] C. Cheng, C. Fan, R. Wan, C. Tong, Z. Miao, J. Chen, Y. Zhao, *Orig. Life Evol. Biosph.* **2002**, *32*, 219-224.
- [327] A. M. Schoffstall, R. J. Barto, D. L. Ramos, *Orig. Life* **1982**, *12*, 143-151.
- [328] A. M. Schoffstall, *Orig. Life* **1976**, *7*, 399-412.
- [329] M. Gull, B. Cafferty, N. Hud, M. Pasek, *Life* **2017**, *7*, 29.
- [330] M. Fiore, W. Madanamoothoo, A. Berlioz-Barbier, O. Maniti, A. Girard-Egrot, R. Buchet, P. Strazewski, *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 4231-4240.
- [331] M. Gull, A. Omran, T. Feng, M. A. Pasek, *Life* **2020**, *10*, 122.
- [332] M. Halmann, R. A. Sanchez, L. E. Orgel, *J. Org. Chem.* **1969**, *34*, 3702-3703.
- [333] R. Lohrmann, L. E. Orgel, *Science* **1968**, *161*, 64-66.
- [334] J. D. Ibanez, A. P. Kimball, J. Oró, *Science* **1971**, *173*, 444-446.
- [335] B. Burcar, A. Castañeda, J. Lago, M. Daniel, M. A. Pasek, N. V. Hud, T. M. Orlando, C. Menor-Salván, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 16981-16987.
- [336] C. Gibard, I. B. Gorrell, E. I. Jiménez, T. P. Kee, M. A. Pasek, R. Krishnamurthy, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 8151-8155.
- [337] E. I. Jiménez, C. Gibard, R. Krishnamurthy, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 10775-10783.
- [338] R. Krishnamurthy, G. Arrhenius, A. Eschenmoser, *Orig. Life Evol. Biosph.* **1999**, *29*, 333-354.
- [339] R. Krishnamurthy, S. Guntha, A. Eschenmoser, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 2281-2285.
- [340] A. J. Coggins, M. W. Powner, *Nat. Chem.* **2017**, *9*, 310-317.
- [341] K. Ashe, C. Fernández-García, M. K. Corpinot, A. J. Coggins, D.-K. Bučar, M. W. Powner, *Commun. Chem.* **2019**, *2*, 23.
- [342] M. A. Pasek, T. P. Kee, D. E. Bryant, A. A. Pavlov, J. I. Lunine, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 7918-7920.

- [343] A. Schwartz, C. Ponnampereuma, *Nature* **1968**, *218*, 443-443.
- [344] Y. Yamagata, H. Inoue, K. Inomata, *Orig. Life Evol. Biosph.* **1995**, *25*, 47-52.
- [345] L. B. Mullen, J. D. Sutherland, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 4166-4168.
- [346] M. Akouche, M. Jaber, M.-C. Maurel, J.-F. Lambert, T. Georgelin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 7920-7923.
- [347] F. Rodrigues, T. Georgelin, G. Gabant, B. Rigaud, F. Gaslain, et al., *J. Phys. Chem. Lett.* **2019**, *10*, 4192-4196.
- [348] M. Gull, G. Tian, Y. Wang, C. He, Z. Shi, H. Yuan, S. Feng, *Heteroat. Chem.* **2010**, *21*, 161-167.
- [349] M. Gull, Y. Wang, Y. Wang, Z. Shi, G. Tian, S. Feng, *Heteroat. Chem.* **2011**, *22*, 186-191.
- [350] M. Gull, M. A. Mojica, F. M. Fernández, D. A. Gaul, T. M. Orlando, C. L. Liotta, M. A. Pasek, *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 17198.
- [351] B. C. Froehler, P. G. Ng, M. D. Matteucci, *Nucleic Acids Res.* **1986**, *14*, 5399-5407.
- [352] P. J. Garegg, I. Lindh, T. Regberg, J. Stawinski, R. Strömberg, C. Henrichson, *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 4051-4054.
- [353] S. Roy, M. Caruthers, *Molecules* **2013**, *18*, 14268-14284.
- [354] R. M. De Graaf, J. Visscher, A. W. Schwartz, *Nature* **1995**, *378*, 474-477.
- [355] R. M. De Graaf, A. W. Schwartz, *Orig. Life Evol. Biosph.* **2005**, *35*, 1-10.
- [356] J. R. Peyser, J. P. Ferris, *Orig. Life Evol. Biosph.* **2001**, *31*, 363-380.
- [357] P. J. Garegg, T. Regberg, J. Stawinski, R. Strömberg, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1987**, 1269-1273.
- [358] T. Lönnberg, *Beil. J. Org. Chem.* **2016**, *12*, 670-673.
- [359] T. Lönnberg, *ACS Omega* **2017**, *2*, 5122-5127.
- [360] A. P. Johnson, H. J. Cleaves, J. P. Dworkin, D. P. Glavin, A. Lazcano, J. L. Bada, *Science* **2008**, *322*, 404-404.
- [361] E. T. Parker, H. J. Cleaves, J. P. Dworkin, D. P. Glavin, M. Callahan, A. Aubrey, A. Lazcano, J. L. Bada, *Proc. Nat. Acad. Sci.* **2011**, *108*, 5526-5531.
- [362] 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.
- [363] G. Fiechter, H. K. Mayer, *J. Chromatogr. B* **2011**, *879*, 1361-1366.
- [364] P. Viñas, N. Campillo, G. F. Melgarejo, M. I. Vasallo, I. López-García, M. Hernández-Córdoba, *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 5197-5203.
- [365] M. Bechtel, E. Hümmer, O. Trapp, *ChemSystemsChem* **2022**, e202200020.
- [366] H. Engelhardt, W. Beck, J. Kohr, T. Schmitt, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 659-680.
- [367] E. Rodríguez-Gonzalo, J. Domínguez-Álvarez, M. Mateos-Vivas, D. García-Gómez, R. Carabias-Martínez, *Electrophoresis* **2014**, *35*, 1677-1684.
- [368] Y. Li, P. D. Compton, J. C. Tran, I. Ntai, N. L. Kelleher, *Proteomics* **2014**, *14*, 1158-1164.
- [369] H. Whatley, Basic Principles and Modes of Capillary Electrophoresis in *Clinical and Forensic Applications of Capillary Electrophoresis* (Eds.: J. R. Petersen, A. A. Mohammad), Humana Press, Totowa, NJ, **2001**, 21-58.
- [370] J. Horvath, V. Dolník, *Electrophoresis* **2001**, *22*, 644-655.
- [371] M. Gilges, M. H. Kleemiss, G. Schomburg, *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 2038-2046.
- [372] S. Hjertén, *J. Chromatogr. A* **1985**, *347*, 191-198.
- [373] R. L. C. Voeten, I. K. Ventouri, R. Haselberg, G. W. Somsen, *Anal. Chem.* **2018**, *90*, 1464-1481.
- [374] A. Cifuentes, P. Canalejas, A. Ortega, J. C. Díez-Masa, *J. Chromatogr. A* **1998**, *823*, 561-571.
- [375] G. Zhu, L. Sun, N. J. Dovichi, *Talanta* **2016**, *146*, 839-843.
- [376] P. W. Lindenburg, R. Haselberg, G. Rozing, R. Ramautar, *Chromatographia* **2015**, *78*, 367-377.
- [377] E. J. Maxwell, D. D. Y. Chen, *Anal. Chim. Acta* **2008**, *627*, 25-33.

- [378] A. Staub, S. Rudaz, J.-L. Veuthey, J. Schappler, *J. Chromatogr. A* **2010**, 1217, 8041-8047.
- [379] M. Mokaddem, P. Gareil, J.-E. Belgaied, A. Varenne, *Electrophoresis* **2009**, 30, 1692-1697.
- [380] R. Haselberg, V. Brinks, A. Hawe, G. J. de Jong, G. W. Somsen, *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, 400, 295-303.
- [381] R. D. Smith, C. J. Barinaga, H. R. Udseth, *Anal. Chem.* **1988**, 60, 1948-1952.
- [382] G. Bonvin, J. Schappler, S. Rudaz, *J. Chromatogr. A* **2012**, 1267, 17-31.
- [383] O. Trapp, E. W. Pearce, J. R. Kimmel, O. K. Yoon, I. A. Zuleta, R. N. Zare, *Electrophoresis* **2005**, 26, 1358-1365.
- [384] L. Fang, R. Zhang, E. R. Williams, R. N. Zare, *Anal. Chem.* **1994**, 66, 3696-3701.
- [385] M. Moini, *Anal. Chem.* **2007**, 79, 4241-4246.
- [386] K. Biemann, *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* **1988**, 16, 99-111.
- [387] P. Roepstorff, J. Fohlman, *Biomed. Mass Spectrom.* **1984**, 11, 601-601.
- [388] B. Paizs, S. Suhai, *Mass Spectrom. Rev.* **2005**, 24, 508-548.
- [389] S. A. Mcluckey, G. J. Van Berkel, G. L. Glish, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1992**, 3, 60-70.
- [390] M. G. Bartlett, J. A. McCloskey, S. Manalili, R. H. Griffey, *J. Mass Spectrom.* **1996**, 31, 1277-1283.
- [391] D. Strzelecka, S. Chmielinski, S. Bednarek, J. Jemielity, J. Kowalska, *Sci. Rep.* **2017**, 7, 8931.
- [392] F. Sauer, M. Haas, C. Sydow, A. F. Siegle, C. A. Lauer, O. Trapp, *Nat. Commun.* **2021**, 12, 7182.
- [393] C. Sydow, F. Sauer, A. F. Siegle, O. Trapp, *ChemSystemsChem* **2022**, e202200034.
- [394] M. Haas, Nichtwässrige Reaktionsbedingungen für die Synthese biologisch relevanter Moleküle auf der frühen Erde, Dissertation, LMU München, **2020**.
- [395] F. Sauer, Entwicklung und Untersuchung verschiedener Szenarien der präbiotischen Peptidsynthese und Analyse komplexer Peptidmischungen via Kapillarelektrophorese-Massenspektrometrie, Dissertation, LMU München, **2021**.
- [396] F. Sauer, C. Sydow, O. Trapp, *Electrophoresis* **2020**, 41, 1280-1286.
- [397] M. Preiner, K. Igarashi, K. B. Muchowska, M. Yu, S. J. Varma, et al., *Nat. Ecol. Evol.* **2020**, 4, 534-542.
- [398] S. G. Bratsch, *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1989**, 18, 1-21.
- [399] L. Hua, R. Zhou, D. Thirumalai, B. J. Berne, *Proc. Nat. Acad. Sci.* **2008**, 105, 16928-16933.
- [400] B. P. Callahan, Y. Yuan, R. Wolfenden, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 10828-10829.
- [401] C. J. Creighton, T. T. Romoff, J. H. Bu, M. Goodman, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 6786-6791.
- [402] T. Schnitzer, H. Wennemers, *Synlett* **2017**, 28, 1282-1286.
- [403] C. Sydow, C. Seiband, A. F. Siegle, O. Trapp, *Commun. Chem.* **2022**, 5, 143.
- [404] A. E. Engelhart, M. W. Powner, J. W. Szostak, *Nat. Chem.* **2013**, 5, 390-394.
- [405] C. Giurgiu, L. Li, D. K. O'Flaherty, C. P. Tam, J. W. Szostak, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, 139, 16741-16747.
- [406] D. A. Usher, A. H. McHale, *Proc. Nat. Acad. Sci.* **1976**, 73, 1149-1153.
- [407] P. A. Giannaris, M. J. Damha, *Nucleic Acids Res.* **1993**, 21, 4742-4749.
- [408] T. H. Wright, C. Giurgiu, W. Zhang, A. Radakovic, D. K. O'Flaherty, L. Zhou, J. W. Szostak, *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, 141, 18104-18112.
- [409] Y.-L. Sim, B. Kaur, *Open Chem.* **2019**, 17, 544-556.
- [410] U. D. Priyakumar, C. Hyeon, D. Thirumalai, A. D. Mackerell, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 17759-17761.
- [411] T. T. Herskovits, J. J. Bowen, *Biochemistry* **1974**, 13, 5474-5483.
- [412] G. K. Schroeder, C. Lad, P. Wyman, N. H. Williams, R. Wolfenden, *Proc. Nat. Acad. Sci.* **2006**, 103, 4052-4055.

- [413] *Gmelins Handbuch der anorganischen Chemie, Schwefel Teil B1*, 8th ed., Verlag Chemie GmbH, Weinheim/Bergstraße, **1953**.
- [414] J. V. Gavette, M. Stoop, N. V. Hud, R. Krishnamurthy, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 13204-13209.
- [415] S. Bhowmik, R. Krishnamurthy, *Nat. Chem.* **2019**, *11*, 1009-1018.
- [416] M. M. C. Wamelink, E. A. Struys, C. Jakobs, *J. Inherit. Metab. Dis.* **2008**, *31*, 703-717.
- [417] T. Harayama, H. Riezman, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2018**, *19*, 281-296.
- [418] P. Dubský, M. Ördögová, M. Malý, M. Riesová, *J. Chromatogr. A* **2016**, *1445*, 158-165.
- [419] Z. Zhang, G. Zhu, E. H. Peuchen, N. J. Dovichi, *Microchim. Acta* **2017**, *184*, 921-925.