

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

Präbiotische Synthese der Pyrimidinnukleoside sowie Entwicklung
eines neuen Mechanismus zur Stickstofffixierung aus redox-
neutraler Atmosphäre

Stefan Alban Wiedemann

aus

Mindelheim, Deutschland

2022

Erklärung:

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

Eidesstattliche Versicherung:

Diese Dissertation wurde eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 20.10.2022

.....
(Wiedemann Stefan)

Dissertation eingereicht am 04.11.2022

Erstgutachter: Prof. Dr. Thomas Carell

Zweitgutachter: Dr. Pavel Kielkowski

Mündliche Prüfung am 09.12.2022

Publikationsliste

Im Laufe dieser Promotion war ich an der Erstehung folgender Publikationen beteiligt:

Hidenori Okamura, Sidney Becker, Niklas Tiede, Stefan Wiedemann, Jonas Feldmann and Thomas Carell, A one-pot, water compatible synthesis of pyrimidine nucleobases under plausible prebiotic conditions, *Chem. Commun.*, **2019**, 55, 1939-1942

Sidney Becker#, Jonas Feldmann#, Stefan Wiedemann#, Hidenori Okamura, Christina Schneider, Katharina Iwan, Antony Crisp, Martin Rossa, Tynchtyk Amatov, Thomas Carell, Unified prebiotically plausible synthesis of pyrimidine and purine RNA ribonucleotides, *Science*, **2019**, 366, 76-82.

Unveröffentlichte Manuskripte:

Jonas Feldmann#, Stefan Wiedemann#, Sidney Becker and Thomas Carell, The Origin of Biomolecules Under Early Earth Conditions (eingereicht).

Diese Autoren haben zu gleichen Teilen beigetragen.

Konferenzbeiträge

- 08/2021 J. Feldmann, S. Wiedemann, S. Becker, T. Carell, A Redox-Neutral Atmosphere Allows Prebiotic Formation of Biomolecules, Posterpräsentation, Molecular Origins of Life 2021 – CAS Conference (Online), München.
- 10/2018 S. Becker, S. Wiedemann, J. Feldmann, T. Carell, Prebiotic Origin of all Four RNA Building Blocks, Posterpräsentation, Molecular Origins of Life 2018 – CAS Conference, München.

Inhalt

1. Zusammenfassung.....	1
2. Summary.....	5
3. Einleitung.....	9
3.1. LUCA	9
3.2. RNA Welt	10
3.3. Präbiotische Chemie.....	12
3.3.1 Präbiotisch plausible Bedingungen	12
3.3.2 Präbiotische Reaktion.....	13
3.4 Atmosphäre	29
3.4.1 Einschlagsszenario.....	30
3.4.2 Andere Modelle.....	33
4. Zielsetzung.....	36
5. Resultate.....	38
5.1 Unified prebiotically plausible synthesis of pyrimidine and purine RNA ribonucleotides.....	38
5.2 The Origin of Biomolecules Under Early Earth Conditions (unveröffentlicht)	47
5.3 Nicht publizierte Arbeiten	60
5.3.1 Reaktionen in Gesteinsreaktionsgefäßen.....	60
5.3.2 Synthese von Threose-Nukleosiden	72
5.3.3 Entwicklung eines Reaktionspfads zur Synthese von Thymidin-Nukleosiden	76
6. Abkürzungsverzeichnis	80
7. Abbildungsverzeichnis.....	82
8. Tabellenverzeichnis	84
9. Schemataverzeichnis	85
10. Literaturverzeichnis	86

11. Anhänge.....	93
Anhang A.....	94
Anhang B	133
Anhang C	200

*Ich mag verdammen was du sagst, aber ich werde
mein Leben dafür geben, dass du es sagen darfst.*

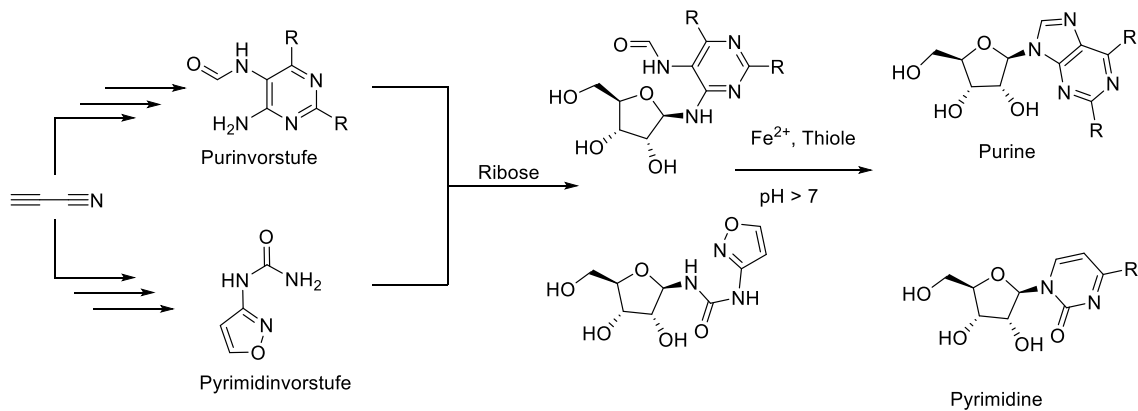
(Voltaire)

1. Zusammenfassung

Eine der größten ungelösten Fragen der Menschheit ist: Wer sind wir und wo kommen wir her? Diese Frage wurde durch Charles Darwin teilweise beantwortet, indem er erklärte wie aus einfachem Leben immer komplexeres Leben entstehen kann. Allerdings konnte bisher nie final beantwortet werden, wie Leben erstmals entstehen konnte. Die heutzutage meist genannte Theorie hierzu ist die RNA-Welt Hypothese. Diese besagt, dass sich Leben aus ersten einfachen, sich selbst replizierenden RNA-Oligomeren gebildet hat. Durch chemische Evolution wurden diese Systeme dann immer komplexer, bis sich ein so komplexer Mechanismus gebildet hat, der als erste lebende Zelle bezeichnet werden kann. Als Grundvoraussetzung für diese Theorie gilt die präbiotische Entstehung von RNA aus unbelebter Materie auf der frühen Erde, wofür die Bildung der Grundbausteine der Watson-Crick Basenpaare A:U und C:G unabdingbar ist.

Zu Beginn dieser Arbeit wurden bereits für alle vier erwähnten Nukleoside präbiotische Bildungswege entwickelt, allerdings konnten nur jeweils A und G oder U und C unter bestimmten vorherrschenden Bedingungen entstehen. Zur Bildung sich selbst replizierender Systeme ist allerdings die Möglichkeit der Ausbildung der Watson-Crick Basenpaare unabdingbar, sodass die Notwendigkeit zur präbiotischen Synthese aller vier kanonischen RNA-Nukleoside am selben Ort besteht. Deshalb wurde in dieser Arbeit ein neuer präbiotischer Syntheseweg für Pyrimidine entwickelt, welcher kompatibel war zu der zuvor publizierten Purin-Synthese^[1]. Somit gibt es nun erstmals die Möglichkeit alle für die RNA-Welt notwendigen Nukleoside am selben Ort unter gleichen Bedingungen zu synthetisieren (Schema 1).

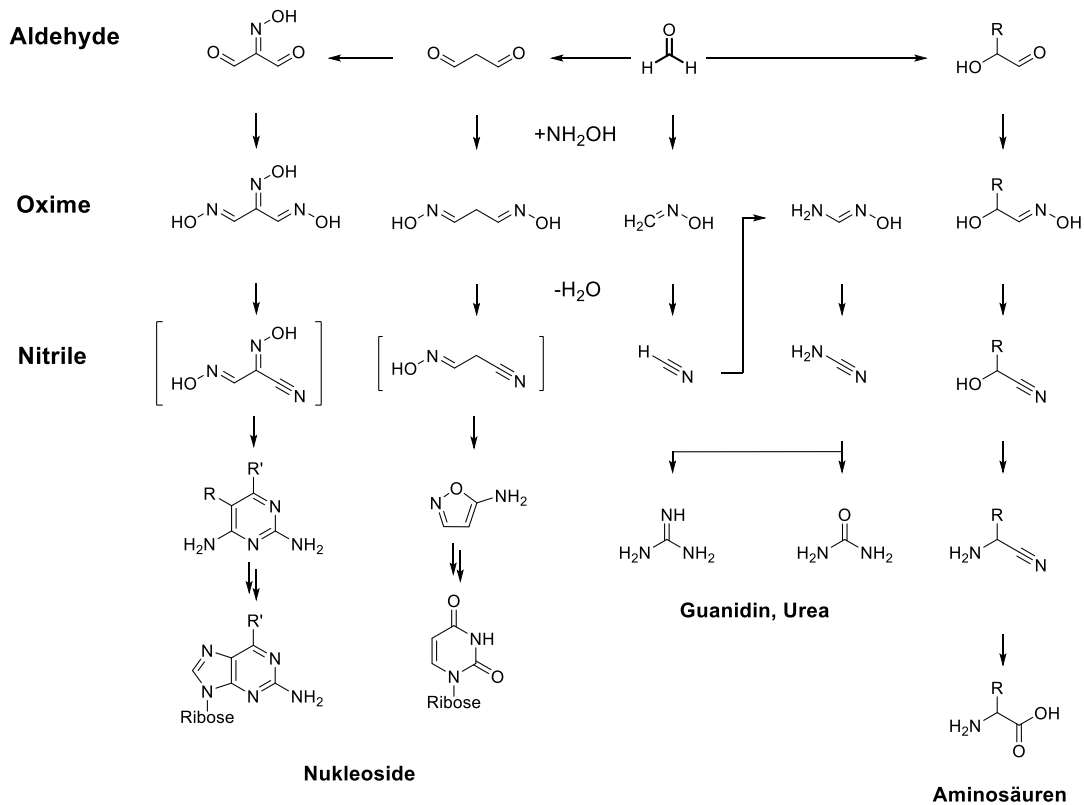
1. Zusammenfassung



Schema 1: Neuer Bildungsweg der Pyrimidine (unten) und der dazu kompatible Bildungsweg der Purine (oben).

Nachdem bei der Veröffentlichung des zuvor erwähnten Bildungsweges aller kanonischen Nucleoside die Verwendung von Cyanoacetylen als Startmaterial kritisiert wurde, stellten wir fest, dass die in der überwiegenden Mehrheit aller präbiotischen Synthesen verwendeten reduzierten Kohlenstoff-Stickstoff Verbindungen als Startmaterialien fragwürdig sind. Dies liegt daran, dass sich Geologen einig sind, dass die, auch von Urey und Miller verwendete, reduzierende Atmosphäre auf der frühen Erde niemals existierte. Sie konnte maximal durch extreme Ereignisse, wie gigantische Meteoriteneinschläge, für aus geologischer Sicht kurze Zeiträume entstehen. Um dieses Paradox, der für die präbiotische Chemie notwendigen Atmosphäre und den von Geologen angenommen Zuständen aufzulösen, haben wir einen neuen Reaktionsweg entwickelt, welcher die Bildung von biologisch wertvollen Produkten aus der geologisch plausibleren redox-neutralen Atmosphäre ermöglicht. Kernpunkt dieser neuen Idee war, dass sich in solch einer Atmosphäre Hydroxylamin bilden kann, welches mit dort ebenfalls gebildeten Aldehyden, welche aus Formaldehyd zugänglich sind, schnell und sauber zu Oximen reagiert. Diese Oxime lassen sich nun unter verschiedensten Bedingungen dehydratisieren um Nitrile zu formen, womit eine Vielzahl an Intermediaten aus bereits publizierten Bildungswegen gebildet werden kann. Gleichzeitig ergibt sich auch die Möglichkeit neue Syntheserouten zur Bildung von Biomolekülen zu beschreiten (Schema 2).

1. Zusammenfassung



Schema 2: Bildungswege verschiedener Biomoleküle aus Aldehyden und Formaldehyd. Umklammerte Strukturen zeigen Zwischenprodukte, die direkt zum nächsten Produkt weiterreagieren konnten.

Diese neue Möglichkeit der Nitrilsynthese unter redox-neutraler Atmosphäre ermöglicht es, Biomoleküle zu jeder Zeit auf der frühen Erde synthetisieren zu können ohne von bestimmten Ereignissen wie Meteoriteneinschlägen abhängig zu sein.

Zusätzlich wurde eine Apparatur zu entwickelt, in welcher der komplette zuvor erwähnte Bildungsweg für Pyrimidine mit minimalen Eingriffen von außen ablaufen kann. Nachdem zuerst eine Glasapparatur (Abbildung 1) entwickelt worden war, wurde beschlossen auf Reaktionsgefäße aus Gesteinen, welche auf der frühen Erde höchstwahrscheinlich präsent waren, umzusteigen. Dies hatte den Hintergrund, dass die Erdoberfläche der frühen Erde auch nicht aus inerten Materialien wie Glas bestand, sondern aus chemisch aktiven Oberflächen, wie sie Mineralien oder Gesteine besitzen, bestehen. Hierbei wurde ein Aufbau mit Reaktionsgefäßen aus Basalt oder Gneiss-Quadern mit Reaktionsmulden (Abbildung 2) entwickelt, in welchem die zuvor beschriebene neue Pyrimidinsynthese ablaufen kann. Zudem wurde dieser Bildungsweg auf die neuartige Reaktionsumgebung optimiert.

1. Zusammenfassung



Abbildung 1: Glasapparatur bestehend aus drei verschiedenen Reaktionsgefäßen, welche über Sandbäder erwärmt werden können. Durch Umlenken des Stickstoffflusses können Reaktionslösungen von einem Reaktionskolben in den nächsten befördert werden. Die Tropftrichter können zwischenzeitlichen Regen oder das geflutet werden eines Reaktionsortes simulieren.



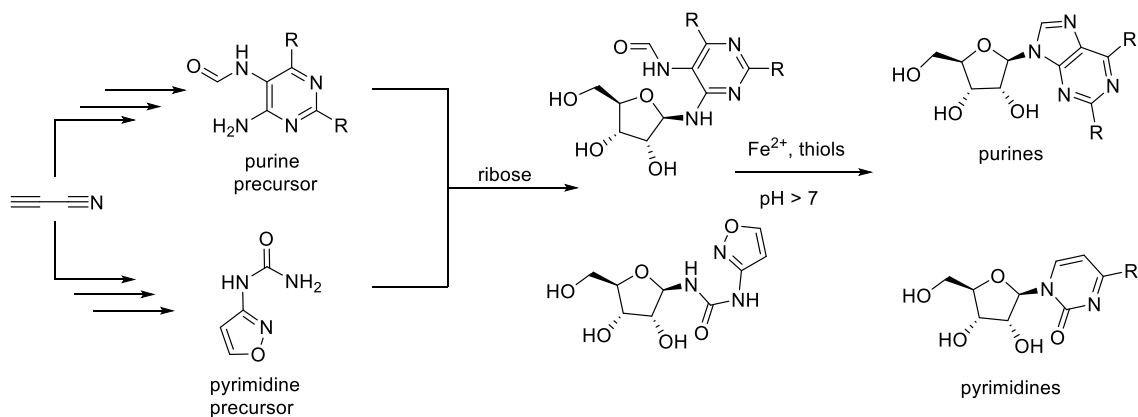
Abbildung 2: Bild der Gesteinsreaktoren aus Basalt (links) und aus Gneiss (rechts) mit Reaktionsmulden.

2. Summary

One of the greatest questions of mankind is, who are we and where do we come from? This question was partially answered by *Charles Darwin* by explaining how complicated life can be formed from more simple forms. However, his explanation could never answer the question how life formed for the first time. The most often mentioned theory explaining the origin of life today is the RNA world hypothesis. This states that life formed from first simple, self-replicating RNA polymers. Through a process called chemical evolution, these systems then could have become more and more complex until such a complex system was formed that can be called a living being. The basic premise for this theory is the prebiotic formation of RNA from inanimate matter on early Earth, for which the prebiotic formation of the basic building blocks of the Watson-Crick base pairs A:U and C:G is necessary.

At the beginning of this work, prebiotic formation pathways already existed for all four mentioned nucleosides, but only A and G or U and C could form under certain prevailing conditions. However, for the formation of self-replicating systems, the possibility for formation of both Watson-Crick base pairs is essential, creating a need for prebiotic synthesis of all four canonical RNA nucleosides at the same place under the same conditions. Therefore, a new prebiotic synthetic pathway for pyrimidines was developed in this work, which is compatible with the previously published purine synthesis. Thus, for the first time, there is now the possibility to synthesize all necessary nucleosides for the RNA world at the same place and under the same conditions (Schema 3).

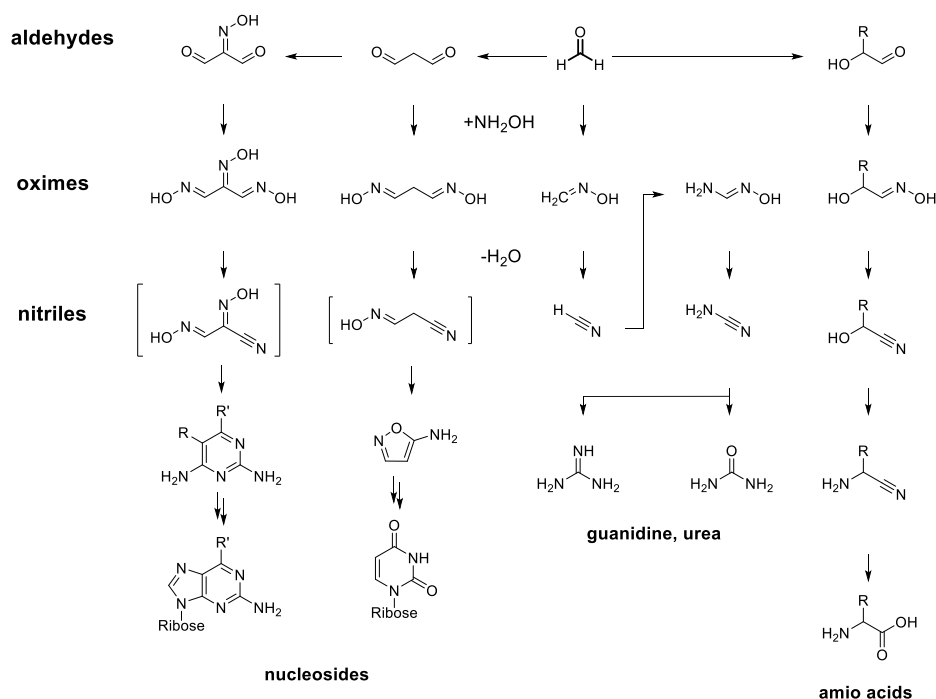
2. Summary



Schema 3: The new prebiotic synthesis pathway for pyrimidine nucleosides (bottom) and the compatible purin synthesis pathway (top).

After the use of cyanoacetylene as starting material was criticized during the publication process of the previously mentioned formation pathway of all four canonical nucleosides, we found that the reduced carbon-nitrogen species used as starting materials in the vast majority of all prebiotic syntheses are questionable as starting materials from a prebiotic point of view. This is because geologists agree that the reducing atmosphere used by *Urey* and *Miller* to form these materials has never been present at the beginning of the Earth, but could have only formed by extreme events, such as giant meteorite impacts, for short periods of time on geologist`s timescales. In order to solve the paradox that chemists need a reducing atmosphere to do productive chemistry and the conditions assumed by geologists, we considered a way to form biologically valuable products from the redox-neutral atmosphere. The key point of this new idea was that hydroxylamine can be formed from such an atmosphere, which can react quickly and cleanly with aldehydes, which are accessible from formaldehyde, to form oximes. These oximes can then be dehydrated under a wide variety of conditions to form nitriles, allowing synthesis of a variety of intermediates from previously published prebiotic pathways but also new synthetic routes to form biomolecules (Schema 4).

2. Summary



Schema 4: Formation pathways of various biomolecules from aldehydes and formaldehyde. Clasped structures show intermediates in a One-Pot reaction to the next structure.

This new possibility of nitrile synthesis from products of a redox-neutral atmosphere makes it possible to synthesize biomolecules on the early Earth at all time without being dependent on specific events such as meteorite impacts.

Additionally, it was attempted to develop an apparatus in which the complete formation pathway for pyrimidines could proceed in an interconnected setup with minimal external intervention necessary to perform the reactions. After developing a glass apparatus (Abbildung 3), it was decided to switch to reaction vessels made of stones, which were most likely present on early Earth. The background was that the surface of the early Earth also did not consist of inert materials like glass, but of chemically active surfaces, like minerals or stones.

Here, Basalt and Gneiss reaction wells (Abbildung 4) were developed in which the previously described novel pyrimidine synthesis can indeed proceed. In addition, this formation pathway was optimized for the novel reaction environments.

2. Summary

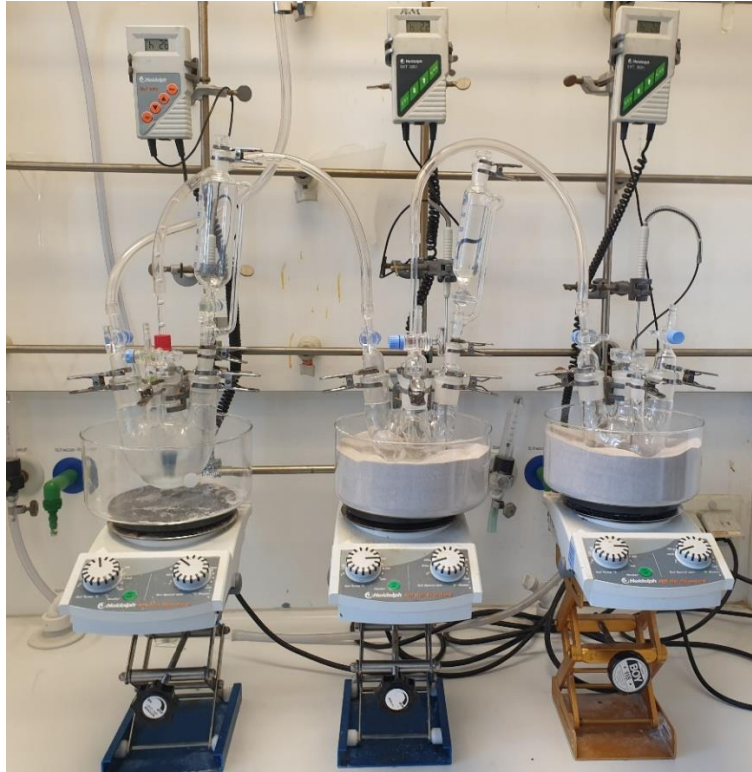


Abbildung 3: The glass apparatus for the synthesis consisting of three different reaction vessels which can be heated via sand baths. By changing the nitrogen flow, reaction solutions can be transported from one reaction vessel to the next. The dropping funnels can simulate intermediate rain or the flooding of a reaction pot.

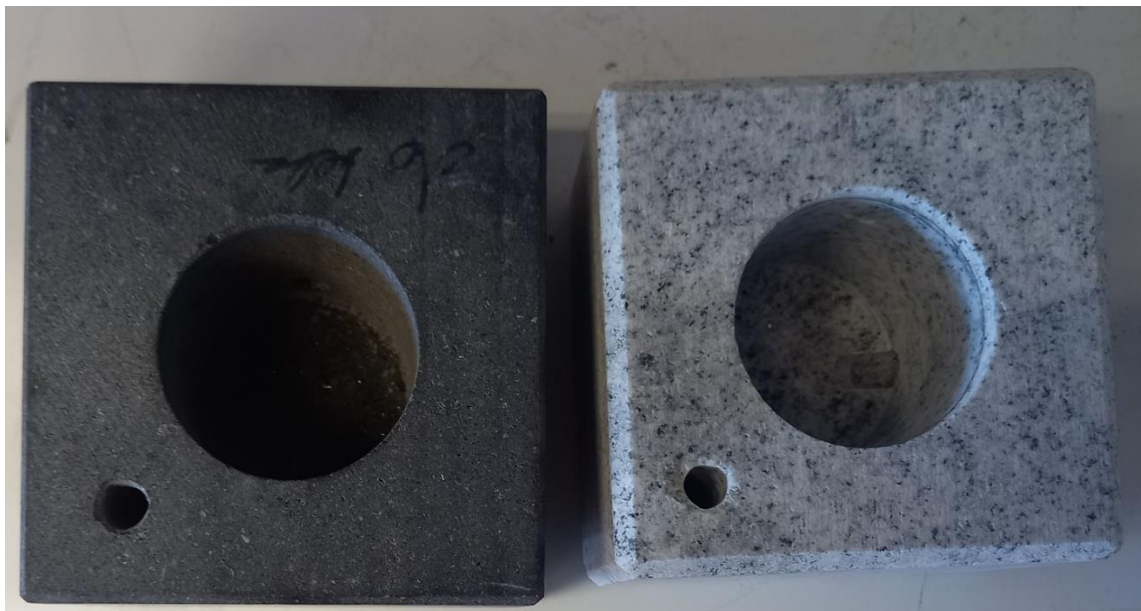


Abbildung 4: Picture of the reaction vessels made out of basalt (left) and gneiss (right).

3. Einleitung

Aufgrund des hoch entwickelten Bewusstseins der Menschheit, besitzt diese die Fähigkeit ihre eigene Herkunft zu hinterfragen. Allerdings wurde zuerst versucht diese Frage nicht wissenschaftlich, sondern spirituell zu beantworten.^[2] Die spätere wissenschaftliche Betrachtungsweise dieser Frage führte zur Darwins Evolutionstheorie. Diese Theorie beantwortet, wie das vielfältige Leben, von einfachen Einzellern über Pflanzen bis zu intelligenten Lebensformen wie dem Menschen, welches wir auf der heutigen Erde kennen, hat entstehen können. Allerdings beantwortet sie nicht, wie das erste Leben auf der Erde entstanden sein könnte.^[3] Aus dieser biologischen Evolutionstheorie lässt sich die Deszendenztheorie ableiten, welche besagt, dass es einen letzten gemeinsamen Vorfahren allen Lebens auf der Erde geben muss, aus welchem alles heute bekannte Leben entstanden sein muss.^[4] Dieser wird LUCA („**L**ast **U**niversal **C**ommon **A**ncestor“ oder zu Deutsch letzter allgemeiner gemeinsamer Vorfahre) genannt.

3.1. LUCA

Obwohl es für LUCA wahrscheinlich keine fossilen Hinweise auf dessen Struktur gibt^[5], kann über Analysen des Genoms der heutigen Lebewesen, den Nachfahren LUCAs, und deren Gemeinsamkeiten auf den Aufbau und die Fähigkeiten LUCAs geschlossen werden. Anhand dieser Rückschlüsse konnte eine Studie aus dem Jahr 2016 bis zu 355 Gene identifizieren,^[5, 6] welche höchstwahrscheinlich in LUCA präsent waren. Aus diesem Genom lässt sich schließen, dass LUCA ein komplexes Lebewesen war, welches bereits in der Lage war DNA zu RNA zu transkribieren und letztere in Proteine zu translatieren. Diese Studien schließen zusätzlich, dass LUCA ein thermophiler Tiefseebewohner war. Aufgrund der bereits vorhandenen Komplexität LUCAs, darf dieses jedoch nicht mit der ersten lebenden Zelle oder dem ersten Leben gleichgesetzt werden.^[7] Viel wahrscheinlicher ist, dass sich LUCA erst durch Evolution aus der ersten lebenden Zelle entwickelt hat. Dies beinhaltet auch die Möglichkeit, dass LUCA sich erst im Laufe der

Zeit an die Bedingungen der Tiefsee angepasst haben könnte und, dass das Leben nicht dort entstanden sein muss.

Denn die erste gebildete Lebensform der Erde muss vermutlich weitaus weniger komplex als LUCA aufgebaut gewesen sein, sodass diese sich spontan aus unbelebter Materie bilden konnten, ohne eine komplett unmögliche erscheinende Wahrscheinlichkeit für dieses Szenario zu erhalten. Für die direkte Entstehung von LUCA mit zuvor erwähnten Fähigkeiten aus unbelebter Materie, müssten nämlich DNA, RNA und Proteine simultan am selben Ort gebildet worden sein oder unter den richtigen Bedingungen zum richtigen Zeitpunkt zueinander gefunden haben. Aufgrund der geringen Wahrscheinlichkeit dieser Szenarien, stellt sich stattdessen die Frage, welches dieser Biopolymere zuerst entstanden ist oder ob sie tatsächlich zur selben Zeit entstanden sein könnten. Gab es nun die katalytischen Fähigkeiten der Proteine oder die informationsspeichernden Fähigkeiten der DNA zuerst?

3.2. RNA Welt

Diese Frage erinnert an das Rätsel, ob das Huhn oder das Ei zuerst entstanden ist. Eine einfachere Antwort hierauf wurde jedoch durch die Entdeckung der Ribozyme durch *Altman* 1978^[8] und *Cech* 1982^[9] gefunden. Dies sind katalytisch aktive RNA Stränge, welche die Funktionen von DNA und Proteinen in nur einem Biopolymer vereinen können. Aus dieser Erkenntnis entwickelte *Gilbert* 1986^[10] die *RNA Welt Hypothese*, obwohl ähnliche Theorien schon früher aufgestellt wurden^[11-14]. Diese Hypothese besagt, dass die ersten Lebewesen nur auf RNA als Biopolymer zurückgriffen und sich erst im Laufe der Zeit durch Evolution DNA und Proteine gebildet haben^[15,11,16.]. Die RNA Welt Theorie schließt das Vorhanden sein von Peptiden bei der Entstehung des Lebens nicht grundsätzlich aus. Allerdings schließt diese eine durch Ribozyme oder Vorläufer katalysierte Synthese von Polypeptiden zur damaligen Zeit aus.^[15] Ein Indiz dafür, dass Aminosäure bei der Entstehung des Lebens beteiligt gewesen sein könnten, sind die Vielzahl an Variationen der kanonischen RNA Nukleobasen. Etliche davon sind mit Aminosäuren modifiziert und diese sind auch heute noch in RNA zu finden. Besonders viele dieser Basenmodifikationen treten bei heutigen Lebewesen im Umfeld von Ribozymaktivitäten auf, als bekanntestes Beispiel hierfür dient das Ribosom mit seiner

3.2. RNA Welt

rRNA.^[17] Dies ist besonders interessant, da Ribozyme als eine Art Überbleibsel einer der heutigen DNA-Peptid Welt vorausgegangenen RNA-Welt angesehen werden können^[18-21].

Die RNA Welt Hypothese vereinfacht nun die Suche nach der Entstehung des Lebens soweit, dass nur noch die Frage nach der Entstehung der RNA beantwortet werden muss, und nicht die nach mehreren Biopolymeren. Hierfür muss aber immer noch geklärt werden, wie die Ribonukleoside und daraus wiederum Oligomere entstanden sein konnten und dies ausgehend von einer unbelebten Umwelt ohne Hilfe durch Proteinkatalyse.

Da RNA immer noch ein relativ kompliziert aufgebautes Oligomer ist, gibt es auch Kritik an der RNA Welt Hypothese.⁽²²⁻²⁴⁾ Ein großer Anteil dieser Kritik betrifft die Notwendigkeit des Vorhandenseins von reiner Ribose, einem bei physiologischen Bedingungen nicht sehr stabilen Molekül, um RNA aufbauen zu können.^[25] Allerdings können auch verschiedene andere Zucker Oligonukleotide ausbilden, welche die Fähigkeit besitzen miteinander Basenpaaren zu können.^[26-28] Die Möglichkeit der Verwendung von anderen, zum Teil einfacheren Zucker zum Aufbau eines informationskodierenden Polymers, führt neben einigen anderen Überlegungen zur Theorie einer *prä*-RNA Welt.^[29, 30] Diese besagt, dass die Entstehung der RNA schon ein biologischer Evolutionsschritt war, und das Leben aus einfacheren Molekülen entstanden sein muss. Allerdings wird hier im weiteren Verlauf der Einleitung nur auf die präbiotische Herstellung der Nukleoside für die RNA-Welt Hypothese eingegangen, da trotz aller Kritik dieser nur andere Hypothesen und keine verbesserten, einfacheren Theorien zur Entstehung des Lebens aufgestellt werden konnten.^[31] Zusätzlich gibt es die Möglichkeit für viele der in nächsten Abschnitten erwähnten Nukleosid-Bildungswege die Möglichkeit Ribose problemlos durch andere Zucker zu substituieren.

3.3. Präbiotische Chemie

3.3.1 Präbiotisch plausible Bedingungen

Bevor über die präbiotische Synthese von Molekülen diskutiert werden kann, muss zunächst definiert werden, welche Reaktionsbedingungen als präbiotisch plausibel angesehen werden können. Generell ist festzustellen, dass die Bedingungen auf der frühen Erde nicht exakt rekonstruiert werden können, somit sollten die Bedingungen für eine präbiotisch plausible Reaktion nicht zu eng definiert werden. Trotzdem gibt es einige generelle Anhaltspunkte die eingehalten werden sollten:^[32]

- Sauerstoff war maximal als Spurenelement in der Atmosphäre vertreten.
- Als Lösemittel kommen Wasser oder eventuell Formamid (1) in Frage. Sonst sind nur Reaktionen unter lösemittelfreien Bedingungen möglich.
- Es muss plausibel erklärbar sein, wie die Startmaterialien einer Reaktion in ausreichenden Mengen am Reaktionsort zur Verfügung stehen konnten.
- Zur Aktivierung oder als Katalysator stehen nur Wärme, Licht, Mineralien, Säuren und Basen oder präbiotisch plausible kleine Moleküle zur Verfügung.

Eine engere Definition der Rahmenbedingungen ergibt keinen Sinn, da diese aufgrund der Unsicherheiten über klimatische und geologische Verhältnisse zur damaligen Zeit nicht nachvollziehbar möglich ist. Zusätzlich waren die Bedingungen zur damaligen Zeit, analog zu heute, auf der Erde nicht einheitlich. So sind in der Nähe vulkanischer Aktivität mehrere 100 °C möglich, während in der Tiefsee Temperaturen von 4 °C realistisch sind. Aufgrund dieser Verschiedenheit lassen sich eine große Menge präbiotischer Reaktionsorte mit den passenden Eigenschaften plausibel erklären. Hierbei stört es auch nicht, wenn die Bedingungen für eine Reaktion inkompatibel für eine andere sind, da sich zwischendurch durch verschiedene Vorgänge die Umweltfaktoren geändert haben können. Als Beispiel können die Reaktionsprodukte einer Reaktion im trockenen Zustand durch Regen weggeschwemmt werden und an einem anderen Ort unter anderen Bedingungen mit anderen Ausgangsverbindungen, die dort vorliegen, interagieren. Auch kann die Art wie zwei Reaktionspartner miteinander reagieren von der Umwelt

maßgeblich beeinflusst werden. So reagieren NH_3 und HCN bei hohen Konzentrationen zu polymeren Strukturen^[33], zum Teil auch zu Nucleobasen, während sie bei verdünnten Bedingungen unter UV-Strahlung zu Harnstoff oder Guanidin reagieren.^[34]

3.3.2 Präbiotische Reaktion

Nachdem nun die Rahmenbedingungen für präbiotische Synthesen abgeklärt sind, gilt es zu betrachten, was bisher auf diesem Feld erreicht wurde. Präbiotische Chemie als separater Teilbereich der Chemie wurde erst bekannt, nachdem die Ergebnisse des heute weltbekannten *Urey-Miller* Experiments publiziert wurden.^[35] Trotzdem gab es davor schon einige Synthesen, welche im Nachgang als präbiotische Reaktionen betrachtet werden können. Diese sind durchaus bis heute von höchster Bedeutung, wie etwa die Formosereaktion von *Butlerov*^[36] oder die Entladungsexperimente von *Löb*^[37, 38]. Als die Arbeiten im Teilbereich der präbiotischen Chemie intensiviert wurden, wurde bewusst nach präbiotischen Synthesen für einzelne Biomoleküle und deren Monomere gesucht, wie unter anderem für Zucker, Nucleobasen, Nucleoside und Aminosäuren.

3.3.2.1. Nucleobasen

Erste Erfolge im Gebiet der präbiotische Nucleobasen-Synthese gelang *Oro* 1960,^[33] als es ihm gelang Adenin (**2**) aus Blausäure (HCN (**3**)) herzustellen. Er konnte die Bildung aus wässriger Ammoniumcyanid Lösung beobachten. Aufgrund seiner Struktur kann Adenin als Pentamer des HCN (**3**) betrachtet werden, zusätzlich hierzu beobachtete *Oro* noch Purinvorstufen, wie 4-Aminoimidazol-5-carboxamid, Formamid (**1**) und Formamidin. Anhand dieser Zwischenprodukte wurde ein möglicher Mechanismus (Abbildung 5) für die Bildung von Adenin (**2**) entwickelt.^[39, 40] Zusätzlich konnten später auch weitere Purine unter diesen Bedingungen synthetisiert und nachgewiesen werden. So konnten mit verbesserten Analysemethoden Guanosin (**4**), welches sich entweder direkt oder über Diaminopurin (**5**) mit anschließender Hydrolyse bilden kann^[41]. Auch Hypoxantin^[42] konnte nachgewiesen werden. In weiteren Analysen konnten dann noch die Purine Xanthin und Inosin detektiert werden.^[43]

3.3.2 Präbiotische Reaktion

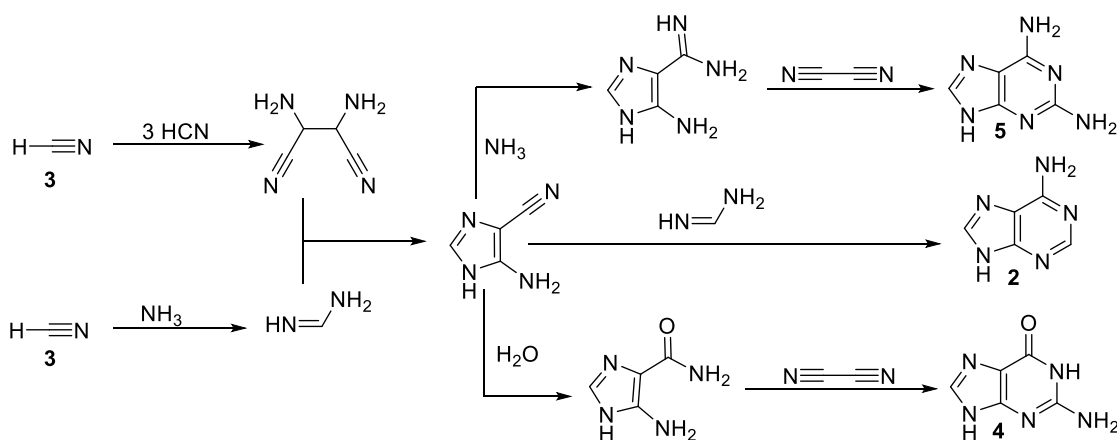


Abbildung 5: Synthese der Purinbasen ausgehend von HCN oder einer NH_4CN Lösung.

Bei genauerer Auswertung dieser Ammoniumcyanid Reaktionen konnten neben den zuvor erwähnten Purinen auch Pyrimidinbasen wie etwa Orotsäure, 5-Hydroxyluracil und 4,5-Dihydroxypyrimidin nachgewiesen werden, die kanonischen Pyrimidinnukleobasen Cytosin (**6**) und Uracil (**7**) hingegen nicht. Letzteres konnte erstmals 2002 in einer Reaktion ausgehend von einer NH_4CN Lösung nachgewiesen werden, nachdem diese für 27 Jahre bei $-78\text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt worden war.^[43] Allerdings war die Ausbeute mit $0,0017\%$ **7**, neben einer Vielzahl weiterer Heterozyklen, vernachlässigbar gering, während **6** weiterhin nicht detektiert werden konnte. Cytosin (**6**) konnte jedoch bereits 1968 aus einer Reaktion von Cyanat mit Cyanoacetylen (**8**), dem zweithäufigsten Produkt einer Gasphasenentladung in einer Atmosphäre aus Stickstoff und Methan^[44], unter Idealbedingungen in Ausbeuten von $6\text{-}7\%$ hergestellt werden.^[45] Die Ausbeute an **6** konnte 1995 durch die Verwendung von Cyanoacetaldehyd (**9**) und Harnstoff (**10**) in einer „dry down“ Reaktion auf über 50% gesteigert werden.^[46] Durch die mögliche Hydrolyse von Cytosin (**6**) zu Uracil (**7**), wurde hiermit eine Möglichkeit gefunden beide kanonische Pyrimidinbasen präbiotisch herzustellen.

Eine weitere Möglichkeit zur Herstellung der Pyrimidinbasen, sowohl der kanonischen als auch von modifizierten Versionen wurde 2019 von Carell publiziert (Abbildung 6).^[47] Hierbei wurden **8** oder **9**, nacheinander zuerst mit Dimethylamin (**11**), dann mit Ammoniumsulfat und schließlich *N*-methyl-*N*-nitroso-Harnstoff (**12**) umgesetzt, um 4-Thiomethyl-Cytosin (**13**) zu erhalten. **13** kann dann durch verschiedene nukleophile Verbindungen in andere Pyrimidinbasen umgewandelt werden.

3.3.2 Präbiotische Reaktion

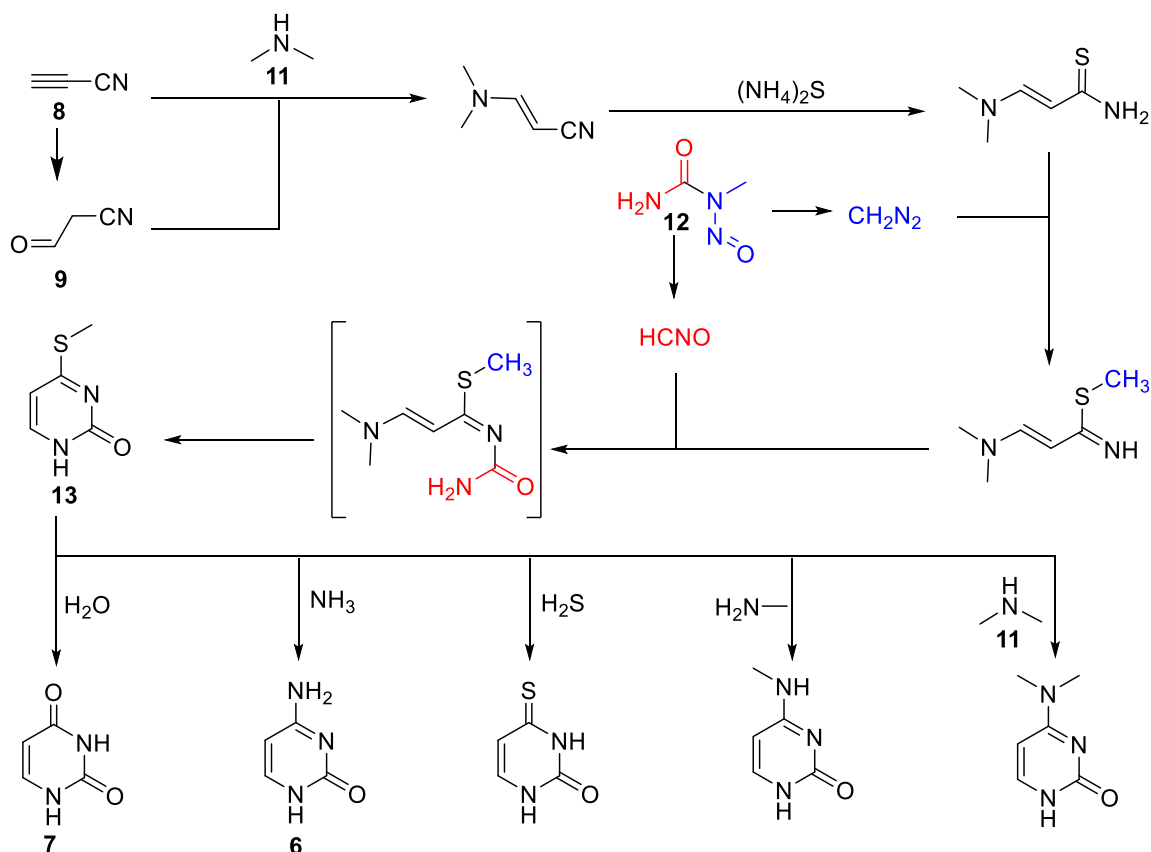


Abbildung 6: Reaktionsfolge zur Herstellung kanonischer und modifizierter Pyrimidin-Basen nach Carell.^[47]

Allerdings geht diese Pyrimidinnukelobasensynthese mit **8** oder **9** von den gleichen Startmaterialien aus, wie auch bisher publizierte Synthesen. Durch den mehrstufigen Aufbau ist sie den bisherigen Synthesen für kanonische Pyrimidinbasen in Bezug auf Komplexität unterlegen, sie bietet jedoch eine elegante Möglichkeit um in Position 4 modifizierte Pyrimidinbasen zu erzeugen.

Die Synthese der Nukleobasen in großen Mengen und guter Ausbeute ist nur ein Teilbereich davon, den Ursprung von Nukleosiden oder Nukleinsäuren zu erklären, was später im Abschnitt 3.3.2.3 (präbiotische Synthese der Nukleoside) erläutert wird. Aber bevor Nukleoside überhaupt synthetisiert werden können, wird zuerst ein präbiotischer Ursprung für die Zucker oder genauer dem Zucker Ribose benötigt.

3.3.2.2 Zucker

Die erste präbiotische Zuckersynthese war die schon 1865 von *Butlerov* entdeckte Formosereaktion^[36], bei der Formaldehyd (**14**) unter basischen Bedingungen, welche durch Zugabe von $\text{Ca}(\text{OH})_2$ erhalten wurden, zu verschiedensten Zuckermolekülen reagiert. Der notwendige Formaldehyd entsteht durch elektrische Entladung in einer wässrigen, CO_2 -reichen Atmosphäre.^[48] Im nächsten Schritt wird Glykolaldehyd (**15**) gebildet, der dann mit weiterem **14** oder anderen Zwischenprodukten der Formosereaktion zu komplizierteren Produkten weiterreagieren kann. Dies führt zu einer Vielzahl an verschiedenen Molekülen, welche gebildet werden, da zeitgleich Aldol-, Cannizzaro- und Lobry-de-Bruyn-van-Eckstein-Reaktionen stattfinden können.^[49] Schlussendlich führt diese Vielzahl an möglichen Reaktionspfaden dazu, dass die Ausbeute an gebildeter Ribose (**16**) $< 1\%$ liegt und zusätzlich dazu eine Vielzahl verzweigter und linearer Zucker, mit unterschiedlichen Anzahl an Kohlenstoffatomen, gebildet werden.

Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Gesamtreaktion ist hierbei die erste Dimerisierung von **14** zu **15**, da durch das Fehlen von α -Protonen durch Deprotonierung keine Polarisierungsumkehr eines Kohlenstoffes erfolgen kann, um letztlich eine Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindung auszubilden. Da dieser Schritt zur ersten Ausbildung einer C-C-Bindung notwendig ist, wird hierfür wird oft Hydroxymethylen (**17**) (Abbildung 7) als Lösung vorgeschlagen, welches als Konstitutionsisomer aus **14** durch UV-Strahlung gebildet werden kann.^[50]

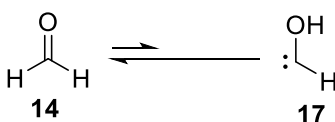


Abbildung 7: Struktur von Hydroxymethylen (rechts) und Formaldehyd (links).

Hier kann das freie Elektronenpaar des Hydroxymethylen (**17**) am Formaldehyd (**14**) angreifen, sodass **15** entsteht. **17** wurde bereits 1921 erstmals in Bezug zur Zuckerbildung genannt,^[51] seine erstmalige Herstellung und Charakterisierung erfolgte hingegen erst 2008.^[52] Ein Problem hierbei war die geringe Stabilität des Hydroxymethylens (**17**) selbst bei tiefsten Temperaturen, da es aufgrund von Tunneleffekten ohne die Überwindung einer Aktivierungsenergie zurück zum Formaldehyd isomerisieren kann.^[52] Trotzdem

konnte 2018 die Bildung von **15** und Glycerinaldehyd (**18**) aus **14** und **17** basen- und lösemittelfrei unter kyrogenen Temperaturen durchgeführt werden.^[50]

Auch wenn diese Bedingungen eher interstellaren Verhältnissen entsprechen, zeigte sich bei Atmosphärenexperimenten, unabhängig vom redox-Zustand der verwendeten Atmosphäre, dass neben Formaldehyd immer auch geringe Mengen Glycolaldehyd (**15**) gebildet werden.^[53] Diese geringe Mengen reichen jedoch aus um die Formosereaktion zu starten, da diese durch **15** katalysiert ist (Abbildung 8).^[54]

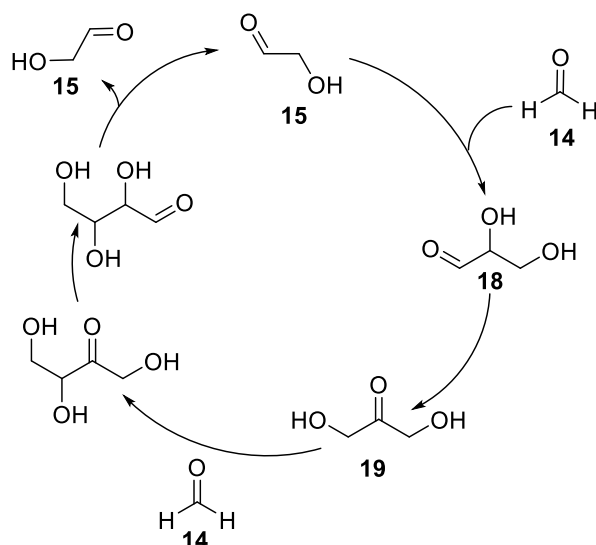


Abbildung 8: Ursprünglicher postulierter Mechanismus der Glycolaldehyd katalysierten Formose Reaktion nach Breslow^[49].

Dieser Katalyse Mechanismus ist nicht unumstritten. So wurde von *Benner*^[55] festgestellt, dass bei sehr hohen Formaldehydkonzentrationen (350 mM) kein Dihydroxyaceton (**19**) nachgewiesen werden kann. Später wurden diese Ergebnisse unter gleichen Bedingungen bestätigt. Bei anderen Startbedingungen konnte jedoch **19** nachgewiesen werden, sowie alle anderen von *Breslow*^[49] vorhergesagten Intermediate.^[56] Daraus lässt sich schließen, dass es mehrere mögliche Mechanismen gibt, nach denen die Reaktion ablaufen kann, inklusive der Möglichkeit von Hydridverschiebungen^[56]. Sicher ist nur, dass die Zugabe von Glycolaldehyd (**15**), selbst in kleinsten Mengen (3 ppm), die Reaktion von **14** zu Zuckern deutlich beschleunigt oder überhaupt erst ermöglicht.^[57] Allerdings liefert die Formosereaktion weiterhin ein breites Gemisch an verschiedenen Zuckern, nicht aber die für RNA notwendige Ribose (**16**) in großen Mengen. Auch andere

Zucker, welche als Zuckergrundgerüst für basenpaarungsfähige Nucleinsäuren dienen könnten, wurden nicht überdurchschnittlich gebildet. [26]

3.3.2.3 Ribose

16 konnte lange nur in sehr geringen Mengen durch Verwendung sehr hoher Formaldehyd (**14**) Startkonzentrationen^[58] oder überhaupt nicht in der Formosereaktion nachgewiesen werden.^[59] Deshalb wurde die Formosereaktion vielfach modifiziert in der Absicht, die Bildung von **16** zu begünstigen.^[60-62] Besonders stechen hier die Versuche von *Benner*^[54, 63] hervor. Ihm gelang es durch Zugabe von Boraten die Herstellung von Zucker mit *cis*-Diolen wie Ribose (**16**) zu bevorzugen. *Furukawa* und *Kakegawa* stellten daraufhin sogar die Theorie auf, dass sich Ribose aufgrund der Borat-Stabilisierung schließlich als Zucker der Nucleinsäuren durchsetzen konnte.^[64] Als Gegenpunkt hierzu ist anzuführen, dass die Präsenz von Bor in der präbiotischen Welt umstritten ist.^[65]

Gute Selektivität für die Herstellung von Pentosen (ca. 65 %) konnte durch die Durchführung der Reaktion mit Formaldehyd in Mizellen erreicht werden.^[66] Allerdings werden hier alle möglichen Pentosen gebildet und nicht etwa bevorzugt Ribose. Andere Möglichkeiten zur Herstellung von größerer Mengen **16** oder generell an Pentosen beruhen meistens auf Reaktionen mit anderen Startmaterialien als Formaldehyd, versetzt mit katalytischen Mengen an Glycolaldehyd (**15**), analog der klassischen Reaktion nach *Bulterov*. So führt die Verwendung von Glycolaldehyd-phosphat, zugänglich aus **15** und Amindotriphosphat^[67] oder Diamidophosphat^[68] als C2 Baustein und **14** als C1 Baustein zur Herstellung von Ribopyranose-2,4-phosphat in 16 % Ausbeute^[69]. Allerdings wird hier nur die nichtbenötigte Pyranose-Form der Ribose (**16**) gebildet, nicht die in Nucleinsäuren verwendete Furanose-Form.

Ein anderer Ansatz geht von einem 10:1 Verhältnis von Formaldehyd (**14**) und Glycolaldehyd (**15**) aus, welche unter Einfluss des Minerals Hydroxylapatit ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$) nach 42 h annähernd quantitativ zu Dihydroxyaceton (**19**) reagieren. Letzteres kann durch Zugabe von weiterem **15** zu zwei möglichen Ketosen, namentlich Ribulose (**20**) und Xylulose (**21**), weiterreagieren. Nach Isomerisierung dieser Ketosen konnte **16** in 20 % Ausbeute erhalten werden. Interessanterweise konnte keine Arabinose nachgewiesen werden, woraus sich schlussfolgern lässt, dass Hydroxyapatit **20** selektiv

3.3.2 Präbiotische Reaktion

zu **16** isomerisieren kann. Auch die beiden anderen möglichen Aldopentosen Xylose und Lyxose konnten nicht nachgewiesen werden, welche durch Isomerisierung aus **21** (11 %) geformt werden könnten (Abbildung 9). Dies lässt auf eine stark selektive Isomerisierungsfähigkeit des Hydroxylapatits zu Gunsten der Ribose zurückschließen.^[70]

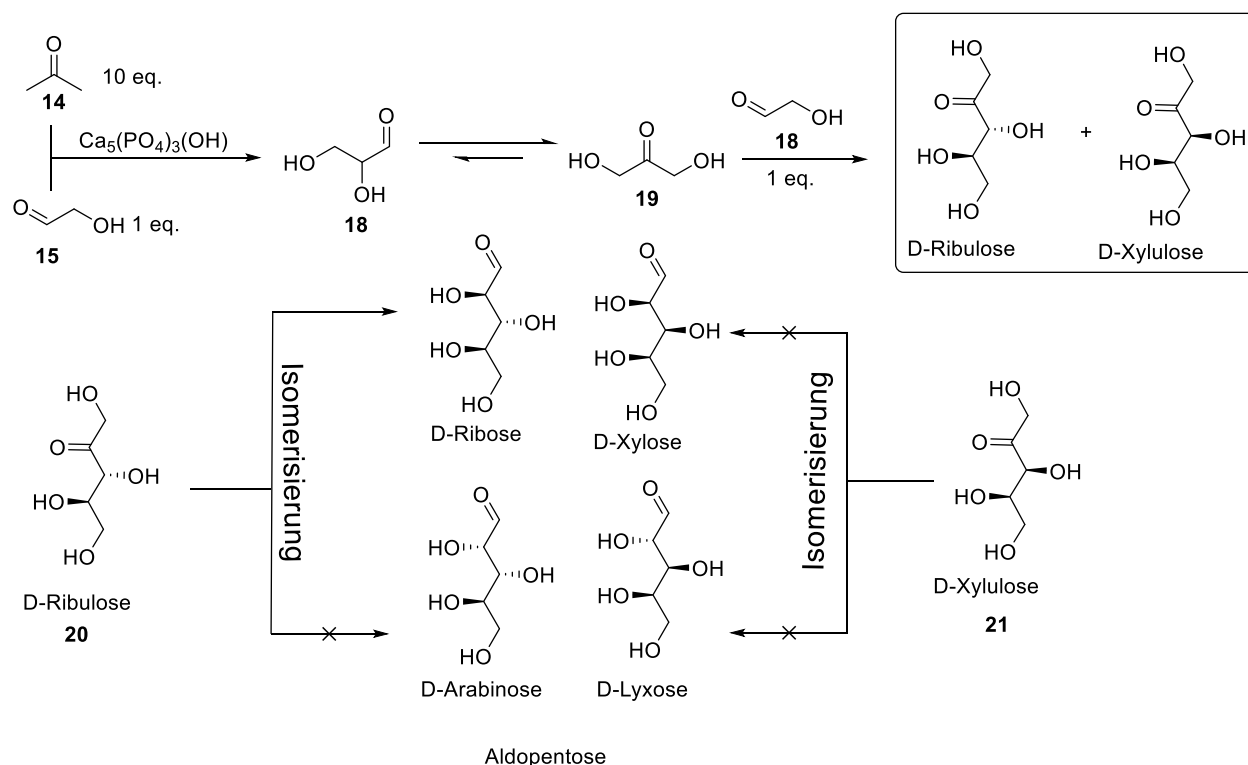


Abbildung 9: Hydroxylapatit katalysierte Reaktion von Formaldehyd **14** und **15** zu **19**. Reaktion mit einem weiteren Äquivalent **15** ergibt die beiden Ketopentosen **20** und **21**. Von diesen beiden Substanzen kann nur Ribulose zu einer Aldopentose isomerisieren, und auch nur selektiv zu Ribose (20%). Weitere Reaktionsprodukte sind Xylulose (11 %), Dihydroxyaceton (20 %), Glykolsäure (40 %) und Ribulose (8 %).^[70]

Ein anderer Ansatz geht davon aus, dass sich Pentosen in der Formosereaktion bevorzugt bilden, wenn C2- und C3-Bausteine direkt miteinander reagieren. So konnten durch die Verwendung solcher Bausteine als Startmaterialien Pentosen in 46 % Ausbeute gebildet werden.^[71]

Obwohl deutliche Verbesserungen in der Zuckersynthese durch die Formosereaktion erzielt wurden, ist diese in Teilen der präbiotischen Gemeinschaft weiterhin stark in der Kritik. So wird die mangelnde Selektivität zu **16** bemängelt. Dieser Kritikpunkt konnte aber durch die Verwendung von Zink-Prolin-Komplexen bei der Reaktion von **15** mit **18**, was einer Reaktion eines C2- mit einem C3-Bausteines entspricht, teilweise entkräftet werden.

3.3.2 Präbiotische Reaktion

Hierbei entstehen als Hauptprodukte Ribose (**16**) (19 %) und Lyxose (21 %), während Arbinose (14 %) und Lyxose (9 %) in geringeren Ausbeuten entstehen.^[72] Allerdings entstehen bei dieser Reaktion auch Hexosen (14 %) und Tetrosen (20 %) durch homo-Aldolkondensation. Bei den Tetrosen zeigt sich, dass der Prolin-Komplex auch hier die Bildung eines Isomers bevorzugt, so wird Threose (**22**) in 13 % erhalten, Erythrose (**23**) nur in 7 %.^[72]

Ein weiterer Kritikpunkt ist, dass die verwendeten Startmaterialien Glycerinaldehyd (**18**) und dessen Isomer Dihydroxyaceton (**19**), bisher selbst nur über die Formose Reaktion zugänglich sind und diese aufgrund ihrer Instabilität weiterreagieren würden anstatt angereicht zu werden. Zusätzlich ist die Bildung ausreichender Mengen **15** für stöchiometrischen Einsatz durch Atmosphärenprozesse nach aktuellem Wissen ausgeschlossen.^[73] Ein Ansatz dieses Problem zu lösen, ist die von *Sutherland* publizierte Möglichkeit, dass größere Mengen **15** und **18** über Photoredoxchemie in Kombination mit Cyanid entstehen können.^[74, 75] Generell eignet sich diese Methode Zucker mit jedem Zyklus um ein Kohlenstoffatom zu verlängern (Abbildung 10).

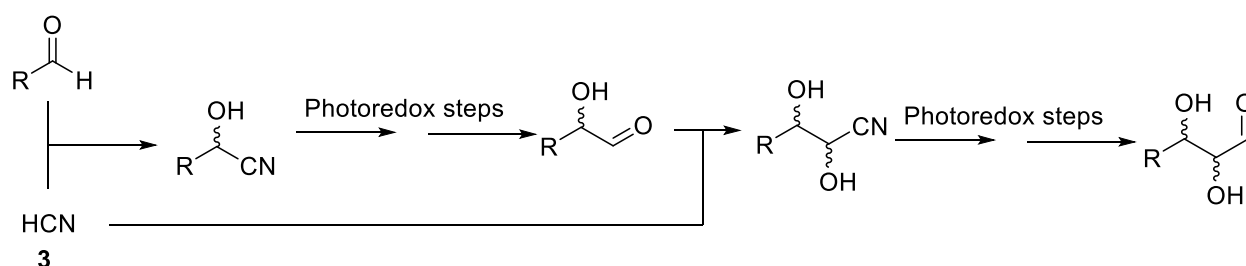


Abbildung 10: Mechanismus der Zuckerverlängerung nach *Sutherland*.^[74] Die Photoredoxschritte werden durch einen Cu(I)-Cu(II)-Mechanismus angetrieben. Als Reduktionsmittel dient ebenfalls **3**, welches zu Dicyan oxidiert wird. Auch das einfachste mögliche Startmaterial Formaldehyd (**14**) kann durch Reduktion aus **3** gewonnen werden.

Das Problem der geringen Stabilität von Glycolaldehyde (**15**) und Glycerinaldehyd (**18**) konnte von *Powner* 2017 gelöst werden.^[76] Dieser stabilisierte diese mittels einer Aminalbildung. Zusätzlich konnten Glycolaldehyd und Glycerinaldehyd unter diesen Bedingungen sogar angereichert werden.

Trotz all dieser Fortschritte ist die präbiotische Herstellung von Ribose weiterhin ein Problem, auch wenn die Hydroxyapatit-katalysierte Reaktion, welche als einzige Aldopentose Ribose erzeugt, Hoffnung macht, dass das Problem der selektiven

Ribose-Herstellung, gelöst werden kann. Allerdings kann dieses die Frage der selektiven Entstehung der Ribose als D-Zucker immer noch nicht beantworten.

Wegen all dieser Problematiken wurden auch Ansätze zur Riboseherstellung unabhängig von der Formosereaktion verfolgt.

So konnte *Meierhenrich* zeigen, dass sich **16** aus interstellaren Eisanaloga bestehend aus NH₃, MeOH und Wasser durch UV-Strahlung bilden kann.^[77] Aber auch dieser Ansatz kann, neben dem Problem der Ausbeute und der präbiotischen Plausibilität, das Problem der Stereochemie nicht lösen, so liegen Zucker in der Natur in den Nucleinsäuren immer in D-Form vor, all diese präbiotischen Ansätze erzeugen jedoch racemische D-L-Gemische.

Eine häufig formulierte Möglichkeit für die Entstehung eines Enantiomeren-Überschusses ist zirkulär polarisiertes Licht.^[78, 79] Weitere Ansätze sind die bevorzugte Bildung eines Enantiomers durch chirale Mineralien^[79-81] oder die lokale Anreicherung eines Enantiomers aus einem racemischen Gemisch^[79, 81-83].

Nachdem nun Zucker und Nucleobasen erzeugt wurden, können in einem nächsten Schritt nun Nucleoside entstehen, das Kondensationsprodukt ebendieser.

3.3.2.4 Synthese der Nucleoside

Für die Synthese der Nucleoside ist der einfachste und aus retrosynthetischer Perspektive zunächst schlüssigste Schritt die Kondensationsreaktion der Nucleobase mit dem Zucker. Dieser Reaktionsablauf wurde auch ausgiebig von *Orgel* untersucht mit dem Ergebnis, dass Purine mit Ribose unter Säurekatalyse reagieren. Allerdings wurden als Hauptprodukte Kondensationsverbindungen mit den exocyclischen Aminen festgestellt. So konnten trotz weiterer Optimierungen die natürlichen N-9 β -Isomere nur in geringen Mengen hergestellt werden (Inosin 8 %, Adenosin 4 % und Guanosin 9 %)^[84]. Bei gleicher Reaktionsdurchführung mit den Pyrimidinbasen Cytosin (**6**), Uracil (**7**) und Thymin (**24**) konnten im Gegensatz dazu überhaupt keine Nucleoside detektiert werden.^[85]

Hauptursache hierfür ist eine in beiden Fällen zu geringe Nucleophilie der Basen bzw. des Ringstickstoffes N9 der Purine. Eine mögliche Lösung ist die Substitution der Ribose durch aktivierte Ribosespezies um diesen Mangel an geeigneter Nucleophilie auszugleichen. Berechnungen hierzu zeigten, dass dadurch die freie Enthalpie der gesamt Reaktion meist negativ wird, im Gegensatz zur Reaktion mit Ribose.^[86, 87]

3.3.2 Präbiotische Reaktion

So konnte *Zare* zeigen, dass sich Ribose-1-phosphat in Mikrotröpfchen aus Ribose und Phosphorsäure bilden kann. Wird Ribose-1-phosphat in der Gegenwart von Mg^{2+} mit den Basen umgesetzt, bilden sich die Nukleoside in geringen Ausbeuten. So konnten Adenosin (2,5 %), Cytidin (0,7 %), Inosin (1,7 %) und Uridin (2,5 %) nachgewiesen werden. Guanosin konnte jedoch nicht detektiert werden. Dies ist wahrscheinlich auf die schlechte Löslichkeit von Guanin in Wasser zurückzuführen. [86, 88] Später gelang es *Benner* durch die Verwendung von Ribose-1,2-cyclo-phosphat, welches aus **16** und Diamidophosphat zugänglich ist^[68], selektiv nur die natürlichen β -Furanose-Isomere herzustellen. Hierbei konnten Adenosin (15 %), Inosin (14 %) sowie das Diaminopurinnukleosid (12 %) nachgewiesen werden. Die Synthese von Guanosin konnte wiederum nicht detektiert werden. Zusätzlich konnten hier auch keine kanonischen Pyrimidin-Nukleoside nachgewiesen werden, nur für die Pyrimidin Base 2-Pyrimidion konnte das zugehörige Nukleosid (30 %) gefunden werden.^[89] 2-Pyrimidion ist jedoch deutlich nukleophiler als die kanonischen Pyrimidine und kann auch durch Reaktion mit Ribose (**16**) die zugehörigen Nukleoside ausbilden.^[90] Später gelang es jedoch durch Erhöhung der Temperatur und durch die Verwendung von Ca^{2+} Ionen Cytidin (7 %) herzustellen. Auch Uridin und Guanosin konnten durch dieses Verfahren in geringen Ausbeuten hergestellt werden.^[91]

Saladino et al. konnten die Bildung der Nukleoside aus der Nucleobase und **16** in reinem Formamid (**1**) unter wasserfreien Bedingungen zeigen und so Adenosin in 5,6 % Ausbeute herstellen. Allerdings benötigten sie hierfür die Hilfe von Protonenbestrahlung. Durch Zugabe von Meteoritenpulver konnte die Ausbeute an Adenosin auf 20 % gesteigert werden.^[92] Zuvor konnte schon die Bildung aller kanonischer Nucleosiden in Spuren unter diesen Bedingungen mit Meteoritenpulver gezeigt werden.^[93]

Dennoch sind für all diese Synthese die Ausbeuten über alle Schritte sehr gering und es wird nicht nur reine **16** benötigt, sondern auch eine weitere Reaktion zur Aktivierung der Ribose oder unrealistische Energiequellen wie Protonenstrahlung und gleichzeitig komplette Wasserfreiheit benötigt.

Deshalb wurden andere Ansätze entwickelt, welche den Zucker nicht mit der fertigen Base umsetzen, sondern mit reaktiveren Basenvorläufern, welche durch weitere Reaktionen in das Nucleosid überführt werden.

3.3.2 Präbiotische Reaktion

Der erste Ansatz hierzu wurde 1970 von *Orgel* veröffentlicht. Hier konnten Pyrimidinnukleoside durch die Umsetzung von Ribose-5-phosphat und Cyanamid (**25**) erhalten werden, nachdem das gebildete Aminooxazolin-Derivat (**26**) mit Cyanoacetylen (**8**) zu Cytidin reagiert. Allerdings wird hauptsächlich das α -Anomer gebildet, welches sich in geringen Ausbeuten durch Photoisomerisierung in das natürliche β -Anomer umwandeln lässt.^[94] 2009 gelang es *Sutherland* auf der Synthese von *Orgel* aufbauend, einen Bildungsweg für aktivierte Pyrimidinnukleoside zu formulieren (Abbildung 11).^[95]

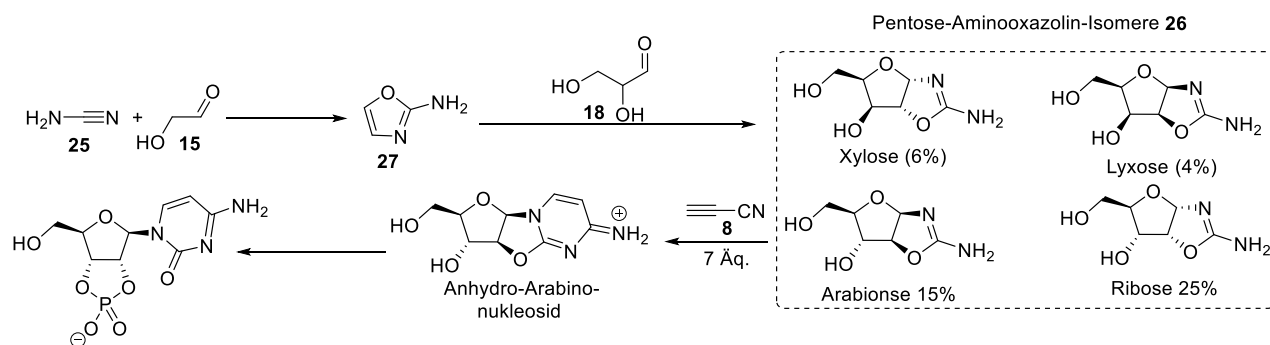


Abbildung 11: Syntheseroute der Pyrimidinnukleoside nach *Sutherland*. Hierbei reagiert von den vier gebildeten Aminooxazolin-Isomere nur das Arabio-Isomere zu den Ribose-Nukleosiden.^[95]

In einem ersten Schritt reagieren Cyanamid (**25**) und Glykolaldehyd (**15**) in einem 1 M Phosphatpuffer zu 2-Aminooxazol (**27**), welches mit Glycerinaldehyd (**18**) zu den Pentose-Aminooxazolin (**26**) mit 50 % Ausbeute für alle gebildeten Isomere (Abbildung 11) reagiert. Die Notwendigkeit der zeitversetzten Zugabe des C2 und C3 Bausteines des Zuckers konnte später durch *Powner* gelöst werden, indem er die Bausteine als Aminale stabilisierte.^[76] Dennoch bleibt das Problem der Isomerenmischung bestehen, denn es entstehen weiterhin alle vier Pentose-Aminooxazolin-Isomere (**26**) (Abbildung 11) neben Eliminierungsprodukten (20 %). In einem nächsten Schritt kann nun ausschließlich das Arabionse Produkt (15 %) mit **8** zum Anhydro-Arabino-Nukleosid umgesetzt werden^[96], welches anschließend durch einen nukleophilen Angriff des Phosphates (1 M) zu Cytidin-2',3'-cyclo-phosphat umgesetzt wird.

Die hier umgangene Notwendigkeit von **16** für andere Nukleosidsynthesen wurde von *Sutherland* immer wieder aufgrund der nicht geklärten Verfügbarkeit und ihrer Instabilität kritisiert.^[75, 95, 97] Dieser Punkt konnte hier zwar durch die Zugabe von **15** und **18** zur Ribosesynthese elegant gelöst werden, dennoch benötigt *Sutherland* im vorletzten Schritt der Synthese Cyanoacetylen (**8**). Dies ist ein hochreaktives Molekül, welches deutlich

3.3.2 Präbiotische Reaktion

instabiler als Ribose (**16**) ist. Zusätzlich werden sieben Äquivalente davon benötigt. Aufgrund dessen könnte es zu einem Verfügbarkeitsproblem von **8** in diesen großen Mengen zum genau richtigen Zeitpunkt der Synthese kommen. Deshalb entwickelte *Sutherland* auch noch einen weiteren Mechanismus zur Bildung von **8**, neben zuvor erwähnten Entstehung in der Atmosphäre. Hierbei wird Cyanoacetylen (**8**) durch eine Art Kupfer(II) katalysierten Kreuzkupplung aus Ethin und HCN (**3**) in Wasser hergestellt.^[97] Zusätzlich wird **8** hierbei als Kupferkomplex in einer stabileren Form erhalten, aus welcher es durch **3** freigesetzt werden kann.^[98]

Allerdings ist die Verfügbarkeit der notwendigen Startmaterialien und **3** auch umstritten, worauf später im Detail eingegangen wird.

Daneben ist die notwendige Phosphatkonzentration ein Kritikpunkt, da eine Konzentration über 1 mM schon als unrealistisch unter präbiotischen Umständen gilt.^[99] 2020 veröffentlichte *Sutherland* auch hierfür einen Lösungsansatz, der besagte das phosphid-reiche Meteoriten, sogenannte Enstatit-Chondriten, die Phosphatkonzentration erhöhen konnten. Zuerst muss das Phosphid aber noch zu Phosphat oxidiert werden, was unter UV Katalyse mit Hydrogensulfid selektiv durchgeführt werden kann.^[100] Dieser Mechanismus kann lokal zweifellos die Phosphatkonzentration erhöhen, aber ob und wie die notwendigen organischen Vorstufen die Auswirkungen der Einschläge der Meteoritenmenge für eine 1 M Phosphatkonzentration überstehen, ist weiterhin ungeklärt.

Aller Kritik zum Trotz stellte dieser Ansatz zum damaligen Zeitpunkt den einzigen möglichen Bildungsweg für kanonische Pyrimidinnukleoside dar. Dieser Ansatz wurde im Laufe der Zeit weiter optimiert, so konnte *Sutherland* auch das Ribose-Aminooxazolin (**26**), mit 25 % das Hauptprodukt der vier gebildeten Isomere,^[95] für eine Reaktion zu Cytidin zugänglich machen (Abbildung 12). Hierfür überführte er das durch Reaktion mit **8** gebildete Anhydro-Ribose-Cytidin durch einen nukleophilen Angriff von Schwefelwasserstoff (H₂S) in α -2-Thiocytidin. Allerdings konnte diese Reaktion nur in wässrigem Formamid (**1**) und nicht wie alle anderen Schritte im reinen Wasser durchgeführt werden. α -2-Thiocytidin konnte durch UV-Strahlung in guter Ausbeute (76 %) in das β -Isomer überführt werden und anschließend zu Cytidin hydrolysiert werden.^[101]

3.3.2 Präbiotische Reaktion

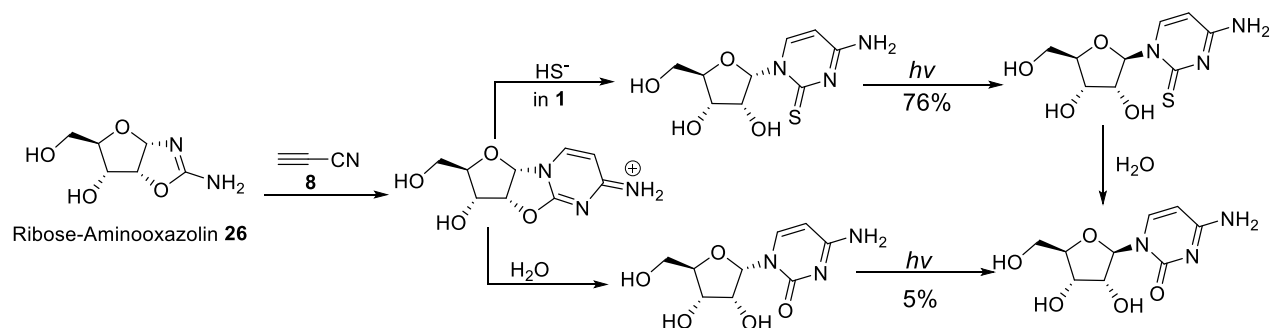


Abbildung 12: Synthese von Cytidin über 2-Thiocytidin nach Sutherland.^[101]

Entscheidend ist hier die Überführung in die Thioverbindung, da sich α -Cytidin nur in schlechter Ausbeute (5 %) zu β -Cytidin isomerisieren lässt.^[94] Die Ausbeute kann aber auch durch vorherige Acetylierung auf 22% gesteigert werden.^[102]

Nachdem viele Versuche scheiterten, von diesem Syntheseweg ausgehend oder kompatibel zu diesem Purin-Nukleoside herzustellen^[103], gelang es *Powner* 2017 schließlich 8-oxo-Purinnukleoside^[104] herzustellen. *Sutherland* gelang es kürzlich schließlich noch Purindeoxyribonukleoside, wenn auch nur für Adenosin und Inosin, zu synthetisieren.^[105] Die Synthese von kanonischen RNA Purinen nach diesem Syntheseweg ist aber bis heute noch nicht möglich.

Die erste regioselective Synthese von N9-Purinnukleosiden gelang *Becker et. al.* 2016, aufbauend auf den Ergebnissen von *Traube*.^[106] Hierbei wurde zunächst nukleophile Basenvorstufen, sogenannte Formamidopyrimidine (FaPys (**28**)), mit Ribose (**16**) umgesetzt (Abbildung 13). Die innermolekulare Symmetrie dieser Moleküle löst das Regioselectivitäts-Problem. Anschließend erfolgt eine Ringschlusskondensation, welche durch Base oder hohe Temperaturen induziert werden kann. Hierbei können Purinnukleoside in bis zu 60 % Ausbeuten erzielt werden.^[1] Durch Verwendung verschiedener FaPys (**28**) konnten so sowohl Adenosin als auch Guanosin dargestellt werden.^[1] Später wurde die Palette möglicher Purinbasen noch um einige nichtkanonische Isomere erweitert, welche alle in heutigen Organismen noch in deren RNA aufzufinden sind.^[107]

3.3.2 Präbiotische Reaktion

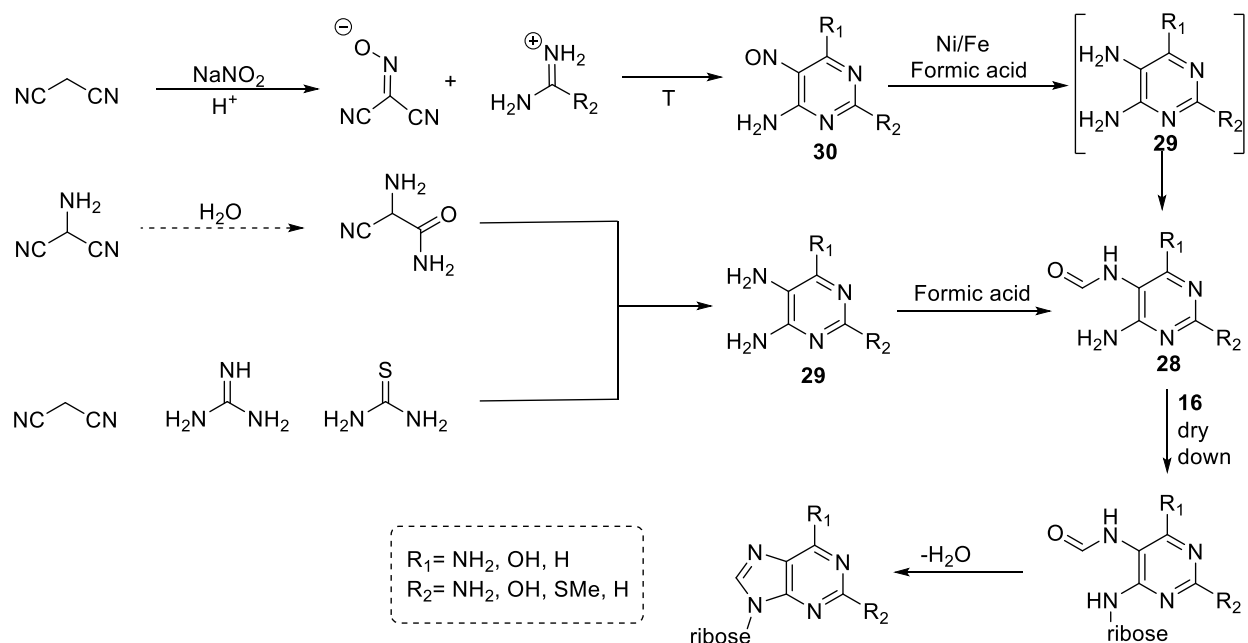


Abbildung 13: Präbiotischer Bildungsweg der Purine nach Becker^[1,107] über die Formamidopyrimidine **28**.

Die Synthese von **28** kann auf unterschiedliche Weise erfolgen. Der zuerst publizierte Weg läuft über Aminopyrimidine (**29**), welche aus Molekülen wie Aminomalononitril oder dessen Hydrolyseprodukt durch Reaktion mit Malonodinitril, Guanidin oder Thioharnstoff zugänglich sind. All diese Startmoleküle können aus Ammoniak, H₂S und HCN gebildet werden.^[1]

Eine später publizierte Alternative läuft über die Zwischenstufe der Nitrosopyrimidine (**30**) ab. Diese besitzen eine sehr schlechte Löslichkeit, woraus eine präbiotische Aufreinigungsmöglichkeit entstehen kann. Anschließend können sie durch Reaktion mit Metallen wie Nickel oder Eisen in Ameisensäure zu Aminopyrimidinen (**29**) reduziert werden, welche direkt mit Ameisensäure zu den FaPys weiterreagieren. Die Nitrosopyrimidine sind durch Erhitzen aus den zuvor abgebildeten Hydroxy(imino)malononitril-Salzen zugänglich (Abbildung 13).^[107]

Dieser Bildungsweg ist für R₁ auf eine Aminogruppe beschränkt, welche aber in jedem Zwischenschritt einfach durch Hydrolyse in eine OH Funktion überführt werden kann.

Dieser neue Purinbildungsweg ist aber nicht mit der Pyrimidin Bildung nach Sutherland^[95] kompatibel, sodass weiterhin kein Szenario zur universellen Entstehung aller kanonischer RNA-Nukleoside postuliert werden konnte.

Dieses universelle Szenario konnte von *Becker et. al.* 2019 postuliert werden, indem eine neue Pyrimidin-Synthese publiziert wurde, welche mit der zuvor publizierten Purin-Synthese kompatibel ist. Hierbei reagiert **16** wiederum mit einer nukleophileren Basenvorstufe, einem Ureaisoxazol. Der Ring des Isoxazols, genauer die Stickstoff-Sauerstoff-Bindung, lässt sich reduktiv öffnen, was zur einer Kaskadenreaktion führt, welche Cytidin als Endprodukt ausbildet. Durch Hydrolyse ist Uridin zugänglich. Das Ureaisoxazol kann durch eine Zn^{2+} -katalysierte Reaktion aus Aminoisoxazol und Harnstoff (**10**) gebildet werden. Aminoisoxazol ist aus Cyanoacetylen (**8**) und Hydroxylamin zugänglich^[108]. Dieser Bildungsweg ist detailliert im Ergebnisteil dargestellt unter Kapitel 5.1 dargestellt.

3.3.2.4 Synthese der Aminosäuren

Die präbiotische Synthese von ersten Aminosäuren gelang schon *Urey* und *Miller* in ihren Gasphasen-Entladungsexperimenten^[35], welches daraufhin weltbekannt wurden. Hierbei wurden elektrische Entladungen in einer reduktiven Atmosphäre, bestehend aus H_2 , CH_4 , H_2O und NH_3 , durchgeführt, wobei als Hauptprodukte Glycin und Alanin identifiziert werden konnten. Spätere detailliertere Analysen zeigten zusätzlich die Synthese von anderen Aminosäure wie Glutaminsäure und Asparaginsäure.^[109, 110] Bei Untersuchung bezüglich des Bildungsmechanismus konnte festgestellt werden, dass dieser über die Reaktion von Aldehyden mit HCN (**3**) abläuft^[109], wie schon in der über 100 Jahre zuvor publizierten Aminosäuresynthese nach *Strecker*.^[111] Hierbei reagiert HCN mit einem Aldehyd zu einem α -Hydroxynitril. Dieses kann mit Ammoniak zu einem Aminonitril weiterreagieren, welches schlussendlich zur α -Aminosäure hydrolysiert werden kann. Jedoch bedingt der Nachweis von β -Alanin in der Reaktionsmischung die Notwendigkeit anderer Syntheserouten. Dies könnte zum Beispiel die Bucherer-Bergs-Reaktion sein, welche Aminosäure aus Hydantoinen herstellen kann, oder die Hydrolyse von zuvor gebildeten HCN -Polymeren.^[112] Später konnte durch *Cleaves* gezeigt werden, dass sich Aminosäuren auch durch Entladung in einer redox-neutralen Atmosphäre bestehend aus N_2 , CO_2 und H_2O bilden können. Die zuerst sehr niedrigen Ausbeuten konnten durch pH-Pufferung und die Verwendung eines Oxidationsschutzes, welche beide die Wirkung der dort ebenfalls entstehenden Nitrite und Nitrate neutralisieren,

3.3.2 Präbiotische Reaktion

deutlich gesteigert werden.^[112] So konnten 2,5 % Ausbeute bezogen auf den eingesetzten Stickstoff N₂ erzielt werden. Bis heute beruhen fast alle weiteren präbiotischen Synthesen auf dem von Strecker entwickelten Synthesemechanismus.^[113] Auch wenn es einige Modifikationen gibt, wie die von *Powner* entwickelte Synthese, bei der das Aldehyd zuerst mit zwei Äquivalenten Amino-Thiazol reagiert, und daraufhin direkt zum Amino-Nitril umgesetzt werden kann.^[76] Eine andere Möglichkeit von *Sutherland* ermöglicht, die Herstellung von komplizierteren Aminosäuren wie Leucin oder Valin. Hierbei wird ein α -Hydroxynitril durch Reaktion mit H₂S in ein α -Hydroxylthioamid überführt. Dieses kann Dehydroxygeniert werden und in einem nächsten Schritt in ein um ein Kohlenstoff verlängertes α -Hydroxyl-Nitril überführt werden (Abbildung 14), wodurch die Kohlenstoffketten von Leucin und Valin hergestellt werden können.^[114] Hierfür wird im ersten Schritt allerdings Aceton als Startmaterial benötigt, um daraus später die Verzweigung im Kohlenstoffgerüst ableiten zu können. Generell lässt sich dieser Mechanismus nutzen um eine α -Hydroxynitril um ein Kohlenstoffatom zu verlängern.

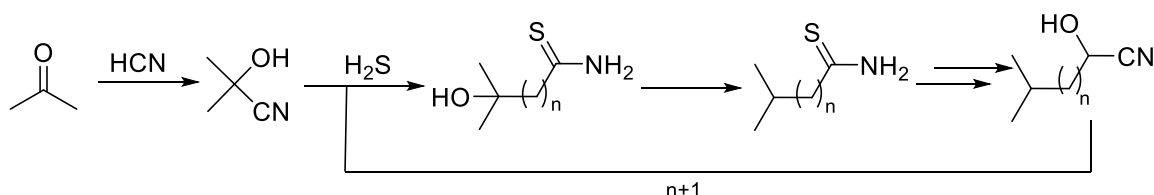


Abbildung 14: Mechanismus zur Kohlenstoffkettenverlängerung von Hydroxynitrilen nach Sutherland.^[114]

Nachdem nun die präbiotische Bildung der Monomere für alle großen Biomoleküle des Lebens gezeigt wurden und wie sie im Laufe der Zeit optimiert werden konnten, ist doch festzustellen, dass all diese Synthesen bisher auf der Verwendung reduzierter Stickstoffverbindungen, wie HCN (**3**), Cyanamid (**25**) oder Cyanoacetylen (**8**), beruhen. Diese lassen sich aus einer reduktiven Atmosphäre, wie von *Urey* und *Miller* in Ihrem weltbekanntesten Experiment verwendet wurde, herstellen. Einzig erwähnte Ausnahme der reduktiven Startmaterialien ist das Entladungsexperiment von *Cleaves* aus redox-neutraler Atmosphäre^[112]. Hier stellt sich doch die Frage warum dieses 55 Jahre nach dem Urey-Miller Experiment durchgeführt und publiziert wurde, obwohl es viel schlechtere Ausbeuten an Aminosäuren als dieses erreicht.

3.4 Atmosphäre

Die Antwort warum die Experimente von *Cleaves* publiziert wurden ist, dass es unter Geologen sehr umstritten ist, ob es jemals eine reduktive Atmosphäre gab. Diese gehen heutzutage von einer neutralen bis oxidierenden Atmosphäre aus. Geologen können den Redoxzustand der damaligen Atmosphäre jedoch nicht direkt, sondern nur indirekt bestimmen. Hierbei wird der Redoxzustand des Erdmantels bestimmt, da bekannt ist, dass sich die Atmosphäre durch Ausgasprozesse schnell an diesen angleicht.^[115] Anhand des Ce^{3+}/Ce^{4+} Verhältnis in Zirkonen, mit einem Alter von 4,36 Milliarden Jahren, konnte nachgewiesen werden, dass der Redoxzustand des Erdmantels zur damaligen Zeit vergleichbar mit dem heutigen ist.^[116] Bei einem solchen Redoxzustand sind die Hauptbestandteile, welche aus dem Erdmantel Ausgasen, N_2 , CO_2 und SO_2 sowie H_2O ^[112], was als redox-neutrale Atmosphäre definiert wird. Es wird davon ausgegangen, dass dieser Zustand schon in weniger als 50 Millionen Jahre nach der Bildung des Mondes erreicht wurde.^[117] Der Bildung des Mondes der Erde ging eine Kollision der Erde mit einem anderen Himmelskörper, genannt *Theia*, voraus, welcher den ganzen Erdmantel aufschmolz und somit sterilisierte. Dies führt auch zur Zerstörung der gesamten zuvor gebildete organische Materie, sodass die Bildung organischer Moleküle zur Entstehung des Lebens erst danach beginnen konnte.^[118]

Im Gegensatz zu dieser Erkenntnis können die in den meisten präbiotischen Synthesen, unter anderem die im letzten Kapitel beschriebenen, verwendeten Startmaterialien, welche größtenteils reduzierte Kohlenstoff-Stickstoff-Mehrfachbindungen enthalten, nur mit den gebildeten Produkten einer Wasserstoff- und oder Methan-reichen Atmosphäre gestartet werden.^[119]

Die Plausibilität dieser reduzierten Startmaterialien wurde deshalb lange Zeit damit erklärt, dass sie durch Spektroskopie im interstellaren Raum nachgewiesen werden konnten.^[120] Diese Materialien könnten dann durch eine große Anzahl an kleinen Meteoriten in ausreichenden Mengen auf die frühe Erde gelangt worden sein, um dort in ausreichenden Mengen für präbiotische Chemie vorzuliegen.^[121-124] Diese „Lieferung“ könnte während des sogenannten „*late heavy bombardment*“ stattgefunden haben, welches vor ungefähr 3.8 Milliarden Jahren stattgefunden haben soll.^[125]

Dem Ansatz für die Verwendung solcher reduzierter Verbindungen, welche durch Meteoriten „geliefert“ wurden, fehlt allerdings ein Mechanismus wie diese Substanzen aus dem interstellaren Raum auf die Erde gelangen konnten ohne zerstört zu werden^[73]. Zudem gibt es sogar Experimente, welche eine effektive Umwandlung des Kohlenstoffes in CO und CO₂ während des Einschlages vorhersagen^[126]. Zusätzlich ist es sehr umstritten, ob das „late heavy bombardment“ jemals in benötigter Intensität, welche zu Lieferung der reduktiven Startmaterialien in ausreichenden Mengen notwendig war, stattgefunden hat.^[73, 127]

Da die redox-neutrale Atmosphäre allerdings bisher als unproduktiv für die Entstehung der Grundbausteine des Lebens gesehen wurde, wurden mögliche Szenarien erdacht, welche das Redox-Level der frühen Atmosphäre doch zumindest kurzzeitig in eine „produktive“ reduzierende Atmosphäre umwandeln konnten oder dieses Problem auf andere Weise zu umgehen.

3.4.1 Einschlagsszenario

Eine aktuell weit verbreitete Theorie zum Erreichen einer reduktiven Atmosphäre, ist der Einschlag eines großen Meteoriten (10²³ kg) mit eigenem Eisenkern, welcher durch Reaktion des warmen flüssigen Eisens mit Wasser eine riesige Menge Wasserstoff entstehen lassen konnte. Dieser postulierte Meteorit wird *Moneta* genannt und könnte durch seinen Eisenkern bis zu 3 Ozeanvolumen Wasser zu Wasserstoff reduzieren, was einem Druck von 90 bar H₂ entsprechen würde.^[128] Zusätzlich kann dieses elementare Eisen auch N₂ zu NH₃ und CO₂ zu CO und CH₄ reduzieren. Eine solche Atmosphäre wäre dann in der Lage reduzierte Startmaterialien, wie HCN (**3**) oder Cyanoacetylen (**8**), in ausreichenden Mengen zu produzieren.^[129] Allerdings würde dieser Einschlag auch sämtliches zuvor gebildetes organische Material wieder zerstören, da die Erdkruste aufgeschmolzen werden würde.^[73]

3.4.1.1 Indizien für den Moneta „Impact“

Ein Indiz, dass dieser Einschlag oder ein Einschlag ähnlicher Größe stattgefunden hat, ist das Vorhandensein von siderophilen Elementen in der Erdkruste. Dies sind Elemente, welche sich auf Grund ihrer chemischen Eigenschaften beim Abkühlen eines Planeten im Eisenkern anreichern müssen. Zu diesen Elementen gehören unter anderem Iridium, Osmium, Rhodium, Ruthenium, Rhenium, Platin und Gold.^[73, 130] Aufgrund der Tatsache, dass diese Elemente z. T. auch in gediegener Form in der Erdkruste zu finden sind, lässt sich darauf schließen, dass diese durch einen oder mehrere Meteoriteneinschläge auf die Erde gebracht worden sein müssen, welche nicht den gesamten Planeten wieder aufgeschmolzen haben.^[131-134] Dieses Szenario muss nach dem Einschlag Theas (10^{25} kg)^[73] geschehen sein, da ein Einschlag der Größe Theas den kompletten Planeten aufgeschmolzen hat. Ein komplettes Aufschmelzen des Planeten hat zur Folge, dass sich nach dem Erkalten sämtliche siderophile Elemente wieder im Erdkern angesammelt haben wurden. Diese Abscheidung stellt sich in einem Zeitraum von 50 Millionen Jahren sehr schnell ein.^[135, 136] Durch die chemische inerte Beziehung zwischen Erdmantel und -Kern beeinflusst der Kern den Redoxzustand des Mantels danach nicht mehr.^[117] Somit kann eine maximal mögliche Größe des Impaktors berechnet werden, welcher für die Anlagerung der siderophilen Elemente in der Erdkruste verantwortlich sein kann, ohne dass diese sich nach dem kompletten Aufschmelzen des Planeten wieder im Kern anlagern würden.

Durch die Menge an siderophilen Elementen, welche in der Kruste gefunden werden, lässt sich auch ein Rückschluss auf die tatsächliche Größe des oder der einschlagenden Himmelskörper ziehen und nicht nur auf die maximal mögliche Masse. Wie zuvor erwähnt wurde, besteht auch die Möglichkeit, dass die siderophilen Elemente durch viele kleinere Einschläge auf die Erde gebracht wurden^[137, 138]. Allerdings spricht die Wahrscheinlichkeit für eine sehr geringe Anzahl an Einschlägen, da die Menge an siderophilen Elementen in den jeweiligen Krusten sehr unterschiedlich zwischen Erde und Mond verteilt sind.^[130, 132, 139] Dieser Unterschied ist viel größer, als dieser aufgrund des Verhältnisses der relativen Gravitationsquerschnitte zu erwarten wäre. Dass ein Himmelskörper fast alle siderophilen Elemente erhält und der andere im Vergleich fast keine, hat eine größere statistische Wahrscheinlichkeit, wenn diese nur durch eine geringe Anzahl an Meteoriten geliefert

wurden, wie ein oder maximal zwei. Um die Menge an siderophilen Elementen in der Kruste mit kleineren Meteoriten zu liefern (ca. 10^{21} kg) würden ungefähr 80 dieser Himmelskörper^[73] benötigt, was wiederum für eine statistische Verteilung der Einschläge zwischen Erde und Mond sprechen würde. Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass ein einziger Einschlag eines Meteoriten mit ungefähr 10^{23} kg, genannt „*Moneta Impact*“, die wahrscheinlichste Erklärung für das Vorhandensein der siderophilen Elemente in dieser Menge in der Erdkruste ist.^[73] Allerdings sind dies bisher nur Indizien für den *Moneta Impact*, jedoch kein endgültiger Beweis. Zusätzlich sprechen sämtliche anderen Indizien für einen die Erdoberfläche sterilisierenden Einschlag, welcher aber nicht den kompletten Planeten neu formte wie *Theia*, vor 4.47 Milliarden Jahren. Dieser Einschlag hat als Konsequenz sämtliches zuvor Gebildetes mineralische und somit auch organische Material der Erdkruste zerstört, da es keine älteren Gesteine gibt und auch die Blei-Blei-Datierung für dieses Alter spricht.^[73, 136]

3.4.1.2 Potential der reduktiven Atmosphäre durch den *Moneta Impact*

Obwohl die *Post Moneta* Atmosphäre in der Lage ist, reduzierte Startmaterialien herzustellen, ist dieser Zeitraum stark limitiert. So sollten schon 200 Millionen Jahre genügen, bis sämtlicher gebildeter Wasserstoff, und damit das reduzierende Potential, durch Atmosphärenverluste ans Universum abgegeben worden ist.^[134, 140] Da der *Moneta Impact* den Redoxzustand des Erdmantels nicht signifikant ändern kann, werden auch weiterhin die zuvor genannten Gase CO_2 , N_2 , SO_2 und Wasser ausgegast, welche den Zeitraum der „produktiven“ reduktiven Atmosphäre weiter verringern. So wird angenommen, dass schon nach ungefähr 120 Millionen Jahre wieder eine redox-neutrale Atmosphäre vorgeherrscht hat.^[73] Somit gab es aus geologischer Sicht nur einen sehr knappen Zeitrahmen, indem sämtliche chemische Evolution abgelaufen sein müsste. Zusätzlich wird dieser Zeitrahmen weiter beschränkt durch den Zeitraum nach dem Einschlag, welchen die Erdoberfläche und die Atmosphäre benötigt um soweit abzukühlen, dass dort wieder organische Verbindungen gebildet und gelagert werden können. Ein alleiniges Abkühlen der Atmosphäre reicht hierfür auch nicht aus, da die meisten präbiotisch nützlichen Startmaterialien nach ihrer Bildung in der Atmosphäre spätestens durch Regen auf die Erdoberfläche gelangen würden.^[141]

Generell lässt sich sagen, dass der *Moneta Impact* durchaus ein Zeitfenster geöffnet haben könnte, in welchem die Biomoleküle des Lebens entstanden sein könnten. Dieser Zeitrahmen könnte durch kleinere Meteoriten, welche zu klein waren, um die Erde komplett zu sterilisieren und auch keine heutzutage nachweisbaren Spuren bei den siderophilen Elementen hinterlassen haben, verlängert worden sein. Aber jede Eventualität, wie ein Meteoriteneinschlag, welches ein Modell benötigt um die Entstehung des Lebens zu erklären, verringert die Wahrscheinlichkeit, dass dieses Modell für die Entstehung des Lebens verantwortlich war.^[73] Deshalb wurden simultan auch noch einige weitere Theorien zur Entstehung der reduzierenden Startmaterialien entwickelt.

3.4.2 Andere Modelle

Ein anderer Ansatz geht von einem leicht weniger oxidierten Erdmantel aus, so dass aus diesem neben N₂, CO₂, H₂O und SO₂ auch kleine Mengen CO, Methan und Wasserstoff ausgasen, was zu einer leicht reduzierenden Atmosphäre führt.^[53, 142] Eine andere Möglichkeit eine solche Atmosphäre zu erreichen wäre Serpenisierung. Hierbei entsteht Wasserstoff durch die wässrige Korrosion von Eisensilicaten.^[143]

Eine solche Atmosphäre könnte geringe Mengen an reduzierten Startmaterialien produzieren,^[73] wobei hauptsächlich HCN (**3**) entstehen würde. Dies liegt daran, dass das „kleine“ HCN Molekül verhältnismäßig weniger Reduktionskraft benötigt als größere Moleküle wie Cyanoacetylen (**8**) oder Cyanamid (**25**).^[144, 145] Allerdings sind die aus dieser Atmosphäre gebildeten HCN Mengen nicht ausreichend um Konzentrationen für präbiotische nützliche Reaktion zu erreichen. Es würde die Hydrolyse stark überwiegen. Deshalb wurde eine mögliche Anreicherung von **3** durch Komplexierung mit Metallionen in Sedimenten postuliert. Hierbei wurde sich hauptsächlich auf Ferrocyanide^[146-148] beschränkt, aber es gibt auch andere mögliche Metallionen^[74].

Diese Modelle beruhen darauf, dass sich die geringe Menge an HCN, welches in der Atmosphäre gebildet wird, durch Auswaschen in eine flüssige Umgebung gelangt. Dort kann dann **3** hauptsächlich mit Fe²⁺ Ionen einen Hexacyano-Komplex bilden, welcher mit ein- oder zweiwertigen Kationen unlösliche Niederschläge formen kann. Auf diese Weise wäre das HCN (**3**) vor Hydrolyse geschützt und die gebildeten Mengen könnten sich über

längere Zeiträume akkumulieren. Wenn **3** dann durch pH-Wert-Veränderung, UV-Strahlung, hohe Temperaturen oder dem Ausfällen der Eisen-Ionen mit H₂S freigesetzt wird, könnten HCN-Konzentrationen erreicht werden, welche hoch genug sind, um präbiotische wertvolle Polymersierungsreaktionen gegenüber der Hydrolyse zu bevorzugen. Die Möglichkeit der Freisetzung durch Schwefelwasserstoff benötigt jedoch wieder große Mengen einer reduzierten Spezies.

Zusätzlich können sich bestimmte Ferrocyanide bei sehr hohen Temperaturen (700°C bis 1000 °C) zu Cyanamid oder gar Ethin umsetzen,^[97] und somit ließen sich der Ursprung der meisten bisher zur präbiotischen Synthese benötigten reduktiven Startmaterialien auf Ferrocyanid zurückführen.^[147, 148]

Allerdings hat dieses Modell auch Schwächen. So benötigt Ferrocyanid zur stabilen Lagerung den Schutz einer Wasserschicht von ungefähr zehn Metern, um vor Zerstörung durch UV-Strahlung geschützt zu sein^[146, 147]. Dies bedingt, dass sich Ferrocyanid nicht in sehr kleinen Tümpeln bilden kann, sondern dass diese ein größeres Wasservolumen benötigen. Da zusätzlich auch relativ hohe Konzentration an Cyanid zur Bildung des Komplex benötigt werden, wird hierfür insgesamt eine recht große Menge an HCN benötigt, bevor die Aufkonzentrierung durch stabile Lagerung überhaupt beginnen hätte können. Da die gebildeten Komplexe oder Sedimente zusätzlich nur bei niedrigen Temperaturen (0 °C oder weniger) und gleichzeitig hohen Konzentration an freien Cyanid-Ionen in der Umgebung stabil sind, ergeben sich weitere Probleme.^[146] So herrschen solch niedrige Temperaturen auf der frühen Erde theoretisch nur am Grund eines großen Ozeans permanent über die zur Anreicherung benötigten Zeiträume vor. Dies bedingt damit noch größere Mengen an **3** die Vorliegen müssen, bevor sich Ferrocyanid-Sedimente bilden können.^[146]

Daraus lässt sich schlussfolgern, dass Ferrocyanide nur bei HCN (**3**) Produktionsraten einer reduktiven Atmosphäre sich in großen Mengen auf der frühen Erde formen konnte.^[146]

Keines dieser erwähnten Modelle können die Entstehung der Biomoleküle auf der frühen Erde hinreichend erklären, deshalb haben wir uns entschlossen nach Alternativen zu suchen. Deshalb haben *Carell* und Mitarbeiter versucht, einen Reaktionsmechanismus zu finden, welcher die Biomoleküle direkt aus Startmaterialien aufbaut, welche aus der „unproduktiven“ redoxneutralen Atmosphäre zugänglich sind. Dass diese Atmosphäre ein

gewisses Potential birgt Biomoleküle zu bilden, wurde schon in ersten Experimenten von *Löb*^[37, 38] und *Cleaves*^[112] gezeigt.

Der hierbei entwickelte Ansatz beruht auf Formaldehyd, und den daraus zugänglichen Aldehyden, sowie Hydroxylamin (NH₂OH). Letzteres ist aus Nitrit und Hydrogensulfit zugänglich^[108], den Hydrolyseprodukten von NO und SO₂. Aldehyde formen gemeinsam mit Hydroxylamin Oxime, welche zu Nitrilen dehydrieren können. Ausführliches hierzu unter Punkt 5.2.

4. Zielsetzung

Zu Beginn dieser Arbeit gab es nur zueinander jeweils inkompatible Synthesewege für Purin- und Pyrimidin-Nukleoside^[1, 86, 89, 95], da die RNA-Welt Hypothese jedoch für die präzise RNA Replikation auf das Vorhandensein von Basenpaarungen angewiesen ist. Diese Basenpaarungen werden bei den heutzutage vorliegenden Watson-Crick Basenpaaren nur zwischen Pyrimidinen und Purinen ausgebildet. Da die Entstehung neuer Basenpaare im Laufe der Evolution unwahrscheinlich ist, da sämtliches Leben der Erde auf dieselben Watson-Crick Basenpaare C:G und A:U/T zurückgreift, müssen diese vier/fünf dafür notwendigen Basen am selben Ort entstehen können. Nur so gibt es eine hinreichend plausible Möglichkeit, dass sich diese Basenpaare zufällig ausbilden können.

Als Ziel dieser Arbeit wurde somit definiert, dieses Problem zu lösen und einen universellen Bedingungen zu finden unter denen alle vier kanonischen RNA Nukleoside entstehen können. Hierbei sollte eine Pyrimidinsynthese gefunden werden, welche kompatibel zu der von Carell 2016 veröffentlichten Purinsynthese^[1] über Formamidopyrimidine ist. Zusätzlich sollten Möglichkeiten evaluiert werden, diese Nukleoside in aktivierter Form zu erhalten, da die chemische Evolution nicht mit Synthese der Nukleoside beendet ist, da aus diesen im nächsten Schritt Oligonukleotide entstehen müssen.

Während dieser Arbeit wurde uns zunehmend bewusst, dass die bisher und auch im ersten Teil dieser Arbeit verwendeten reduzierten Kohlenstoff-Stickstoff Spezies Startmaterialien für präbiotische Synthesen keine hinreichend plausible Erklärung für ihr Vorhandensein auf der frühen Erde besitzen. Deshalb sollte eine neue Möglichkeit gefunden werden, wie die Startmaterialien oder frühe Intermediate der zuvor publizierten Nukleosid-Synthesen^[1, 108] aus einer redox-neutralen Atmosphäre gebildet werden können. Zusätzlich sollten auch Bildungswege unter ebendiesen Bedingungen für andere biologisch wichtige Moleküle gefunden werden, wie Aminosäuren.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit war es herauszufinden, was passiert, wenn präbiotische Reaktionen nicht mehr in inerten Glas- und Plastik-Apparaturen durchgeführt werden, sondern analog zu Bedingungen auf der frühen Erde. Hierfür sollten

4. Zielsetzung

verschiedene wasserunlösliche Gesteine als „*Reaktionskolben*“ verwendet werden, und ihr Einfluss auf die Reaktionen untersucht werden. Hierbei sollte hauptsächlich festgestellt werden, ob sogar Vorteilhafte Effekte durch Oberflächenkatalyse der Mineralien oder Gesteine beobachtet werden können. Hierbei sollte zuerst der im Kapitel 5.1 beschriebenen Bildungsweg für Cytidin ausgiebig untersucht werden.

5. Resultate

5.1 Unified prebiotically plausible synthesis of pyrimidine and purine RNA ribonucleotides

Sidney Becker#, Jonas Feldmann#, Stefan Wiedemann#, Hidenori Okamura, Christina Schneider, Katharina Iwan, Antony Crisp, Martin Rossa, Tynchtyk Amatov, Thomas Carell
geteilte Erstautorenschaft

Prolog

Für die RNA-Welt-Hypothese ist es unabdingbar, dass es robuste präbiotische Synthesen der RNA-Bausteine, den Nucleosiden gibt. Hierbei müssen alle kanonischen Nucleoside entstehen können, und nicht nur ein Teil davon, um Watson-Crick Basenpaare bilden zu können. Da bisher keine Möglichkeit gefunden wurden, die dafür notwendigen Pyrimidin- und Purin-Nucleoside unter denselben Bedingungen zu formen, wurde im Folgenden ein zur Carell's Purinsynthese^[1] kompatibler Reaktionspfad ausgearbeitet, welcher Pyrimidinucleoside und sogar 5'-Nucleotide in nur vier (Nucleoside) bzw. fünf (Nucleotide) Schritten in hohen Ausbeuten formen kann. Die anschließende Phosphorylierungsreaktion verläuft sehr selektiv für die Entstehung der 5'-Phosphate und es konnten neben den Mono-Phosphaten sogar Di-Phosphate identifiziert werden. Dass die gebildeten Pyrano-Nucleoside unter den getesteten Bedingungen nicht oder kaum phosphoryliert wurden könnte eine mögliche Erklärung für das Vorliegen von RNA in furanosischer Form sein.

Autorenbeitrag

Synthese der benötigten Standards aller möglichen Uridin- und Cytosin-Isomere. Durchführung und Optimierung der präbiotischen Reaktionen mit Schwerpunkt auf den Reaktionen zur Bildung der Riboside und der Nucleoside. Auswertung und Interpretation der Daten.

Lizenz

Aus Becker et al., *Science*, 2019, 366, 76-82. Nachdruck mit Genehmigung der AA.

PREBIOTIC CHEMISTRY

Unified prebiotically plausible synthesis of pyrimidine and purine RNA ribonucleotides

Sidney Becker^{1,2*}, Jonas Feldmann^{1*}, Stefan Wiedemann^{1*}, Hidenori Okamura^{1,3}, Christina Schneider¹, Katharina Iwan^{1,4}, Antony Crisp¹, Martin Rossa¹, Tynchtyk Amatov^{1,5}, Thomas Carell^{1†}

Theories about the origin of life require chemical pathways that allow formation of life's key building blocks under prebiotically plausible conditions. Complex molecules like RNA must have originated from small molecules whose reactivity was guided by physico-chemical processes. RNA is constructed from purine and pyrimidine nucleosides, both of which are required for accurate information transfer, and thus Darwinian evolution. Separate pathways to purines and pyrimidines have been reported, but their concurrent syntheses remain a challenge. We report the synthesis of the pyrimidine nucleosides from small molecules and ribose, driven solely by wet-dry cycles. In the presence of phosphate-containing minerals, 5'-mono- and diphosphates also form selectively in one-pot reactions. The pathway is compatible with purine synthesis, allowing the concurrent formation of all Watson-Crick bases.

The discovery of catalytic RNA (1) and the development of replicating RNA systems (2, 3) have lent strong support to the concept of an RNA world (4). The RNA world hypothesis predicts that life started with RNAs that were able to (self-)recognize and replicate. Through a process of chemical evolution, a complex RNA and later RNA-peptide and protein world supposedly evolved, from which life ultimately emerged (4). A prerequisite for the RNA world is the ability to create RNA under prebiotic conditions. This requires as the first elementary step the concurrent formation of pyrimidine and purine nucleosides in the same environment. They must have condensed to form information-carrying polymers able to undergo Darwinian evolution. The question of how the pyrimidine and purine nucleosides could have formed together is an unsolved chemical problem that is under intensive chemical investigation (5–9). Starting from an early atmosphere mainly composed of N₂ and CO₂ (10), the abiotic synthesis of life's building blocks must have occurred on the early Earth in aqueous environments, whose characteristics were determined by the minerals and chemical elements from which the early Earth's crust was made (11, 12). Atmospheric chemistry, impact events, and volcanic activities must have provided the first reactive small molecules. These reacted in surface or deep-sea hydrothermal vents (13–15), on mineral surfaces (16), or in shallow ponds (17).

Within these environments, volcanic activity, and seasonal or day-night cycles caused fluctuations of pH and temperature. Such fluctuations provided wet-dry conditions allowing precipitation or crystallization of chemicals (18). Mixing of microenvironments may have opened up new reaction pathways that led to increasing chemical complexity.

Along these geophysical boundaries, two main reaction pathways have been proposed for the formation of purine and pyrimidine nucleosides. The synthesis of the purines is possible along a continuous pathway based on the reaction of formamidopyrimidine (FaPy) precursors with ribose (6, 18). For the pyrimidines, a reaction sequence involving aminooxazoles has been discovered (5). These pathways provide the corresponding nucleosides under very different and partially incompatible conditions, leaving unanswered the question of how purines and pyrimidines could have formed in the same environment. Here, we report a prebiotically plausible pathway to pyrimidine nucleosides that selectively provides the 5'-mono- and 5'-diphosphorylated nucleosides needed for RNA strand formation. By connecting the pathway with the reported purine route (6, 18), we establish a unifying reaction network that allows for the simultaneous formation of both types of nucleosides in the same environment and that is driven by wet-dry cycles.

Results

Prebiotically plausible synthesis of pyrimidine nucleosides

The chemistry leading to pyrimidines starts from cyanoacetylene **1** as the key building block (Fig. 1A). Compound **1** is observed in interstellar clouds and in the atmosphere of Titan (19). It has been shown to form in large quantities by electric discharge through a CH₄-N₂ atmosphere (20) and is also a product

of the Cu(II)-mediated reaction of HCN and acetylene in water (Fig. 1B) (21). A recent report suggested that molecules such as **1** are plausible prebiotic starting materials which could have formed in surface hydrothermal vents in significant concentrations (13). We found that **1** reacts quickly and cleanly with hydroxylamine **2** or hydroxylurea **3** to give 3-aminoisoxazole **4**. The reaction of **1** with **3** proceeds under slightly basic conditions (pH ~10) with 80 to 90% yield within 2 hours. **3** is formed in almost quantitative yields from the reaction of **2** with cyanate (22). Compound **4** formed robustly even if we varied the temperature (10° to 95°C), the reactant concentrations (10 to 100 mM), or added additional compounds, such as urea **5** and/or different metal ions (see below). Reaction of cyanoacetylene **1** with hydroxylamine **2** produced **4** with 17% yield after 2 hours at pH 10.

While hydroxylamine **2** is an accepted building block for prebiotic amino acid syntheses (23), its potential formation on the early Earth is unclear. We therefore aimed to demonstrate its prebiotic availability. **2** is ultimately produced by reduction from NO, which is formed in large quantities when lightning passes through moist atmospheres containing N₂ and CO₂ (Fig. 1B) (10). NO forms as the main product under these conditions and spontaneously reacts in the presence of water to form nitrite (NO₂⁻) and nitrate (NO₃⁻), and this leads to the assumption that both anions were quite abundant on the early Earth (24–26). With Fe(II) as a plausible prebiotic reductant, NO₂⁻ is converted to NH₃ but not to NH₂OH **2** (26). Formation of the latter requires a partial reduction. We found that this can be achieved with HSO₃⁻, which forms from volcanic SO₂ and water (27). NO₂⁻ and HSO₃⁻ react to **2** with up to 85% yield (Fig. 1B and fig. S1) (28). We confirmed that this reaction gives first hydroxylamine disulfonate **6** (Fig. 1B), which hydrolyzes to hydroxylamine **2** and HSO₄⁻. We found that intermediate **6** reacts with cyanoacetylene **1** as well (88% yield) (Fig. 1B and fig. S2) to give the stable olefin **7**, which upon hydrolysis provides again the key intermediate **4**. The overall yield of **4** via compound **7** is 63% over these two steps. The suggested pyrimidine intermediate **4** is therefore readily available from cyanoacetylene **1** upon reaction with either **2**, **3**, or **6** under prebiotic conditions (Fig. 1B).

When we added urea **5** to a solution of **4**, warming (70° to 95°C) and dry-down resulted in formation of *N*-isoxazolyl-urea **8** (Figs. 1A and 2A) in a spot-to-spot reaction that is catalyzed by Zn²⁺ or Co²⁺. These metal ions were likely present on the early Earth (11, 12). In the presence of Zn²⁺, compound **8** is formed in 88% yield after 2 days at 95°C (at 70°C, the same yield is obtained after ~2 to 3 weeks). With Co²⁺, 68% yield is achieved after 2 days

¹Center for Integrated Protein Science, Department of Chemistry, LMU München, Butenandtstrasse 5-13, 81377 München, Germany.

²Department of Chemistry, University of Cambridge, Lensfield Road, Cambridge CB2 1EW, UK. ³Institute for Multidisciplinary Research for Advanced Materials, Tohoku University, 2-1-1 Katahira, Aoba-ku, Sendai, Miyagi 980-8577, Japan. ⁴Centre for Translational Omics, University College London, Great Ormond Street Institute of Child Health, 30 Guilford Street, London WC1N 1EH, UK. ⁵Max-Planck-Institut für Kohlenforschung, Kaiser-Wilhelm-Platz 1, 45470 Mülheim an der Ruhr, Germany.

*These authors contributed equally to this work.

†Corresponding author. Email: thomas.carell@lmu.de

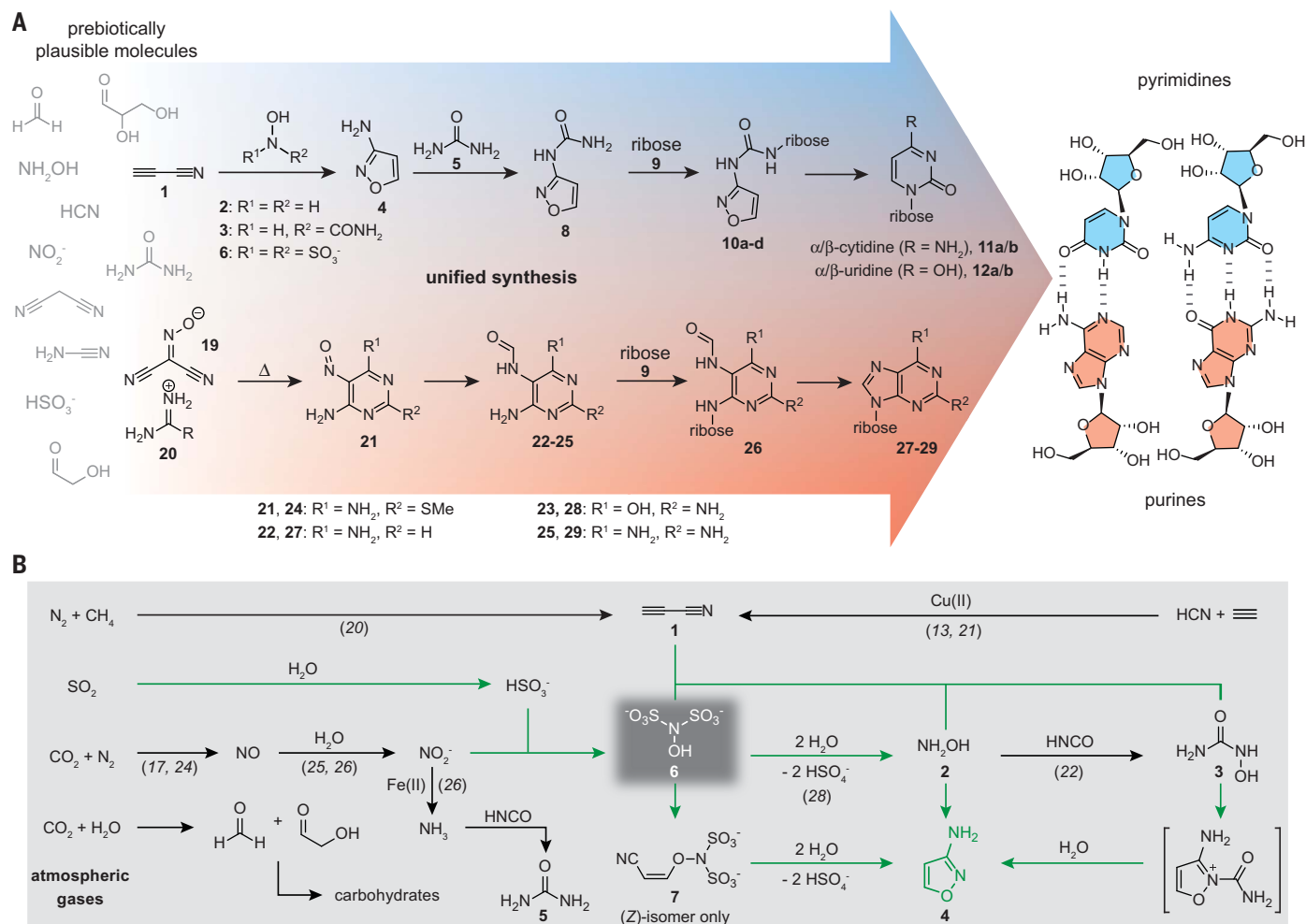


Fig. 1. Unified synthesis of pyrimidine and purine RNA building blocks.

(A) Starting from plausible prebiotic molecules, the reaction scheme depicts the route toward the pyrimidines via isoxazolylurea **8** (blue background) and the purines via formamidopyrimidines **22** to **25** (red background) (18). (B) Fundamental chemistry

that produces the molecules needed for the pyrimidine pathway. Reactions performed in this work are shown with green arrows, while black arrows represent well-known reactions. Formation of **4** requires reaction of **1** with hydroxylamine **2**, hydroxylurea **3**, or the disulfonate **6** (dark-gray box). **6** is formed from NO₂⁻ and SO₂/HSO₃⁻.

at 95°C. The reaction of **4** to **8** is in all cases a clean process, with the only impurity being unreacted **4** (Fig. 2A). The product **8** can be subsequently physically enriched. Addition of carbonated water to the dried reaction mixture solubilizes **4**, **5**, and **8**, leaving behind the metal ions as hydroxides or carbonates. Subsequent concentration of the supernatant leads to spontaneous crystallization of **8** (55%). This allowed us to obtain a crystal structure of **8** (fig. S3). In order to simulate early Earth chemistry, we performed a one-pot experiment. We mixed **1** with **3**, **5**, and Zn²⁺ or Co²⁺ in a carbonate solution (pH ~10) and obtained compound **4** at 95°C (80 to 90%). Neutralizing the solution to pH ~6 to 7, which may have occurred on the early Earth as a result of acidic rain, followed by dry-down at the same temperature, provided compound **8** with yields between 56% (Zn²⁺) and 40% (Co²⁺). The continuous synthesis of the key building block **8** was consequently achieved in a plau-

sible prebiotic setting that could have existed in hydrothermal vents or near volcanic activity, both of which would be able to provide elevated temperatures (fig. S3). The synthesis is also possible at lower temperatures, but with extended reaction times.

For the final step toward nucleosides, we need to assume that, due to flooding or a mixing of environments, **8** came into contact with ribose **9** (Figs. 1A and 2B) or any other sugar unit, such as threose (for TNA) or glyceraldehyde (for GNA), that was able to form a backbone for a pairing system (29, 30). When we mixed **8** with ribose **9** and warmed the mixture to 95°C in the presence of boric acid, we observed a fast and high-yielding reaction that provided the ribosylated products **10a** to **10d** with 95% yield (fig. S4a). Other borate minerals, such as synthetic lüneburgite {Mg₃[(PO₄)₂|B₂(OH)₆]·6H₂O} (31) or borax {Na₂[B₄O₅(OH)₄]·10H₂O} (32), were also able to catalyze this reaction with high yields (>70%)

(fig. S5). The major products were initially the α - and β -pyranosides (**10c** and **10d**), which dominate over the α - and β -furanosides (**10a** and **10b**) (fig. S4a). After heating the mixture under slightly basic conditions at 95°C in the presence of borates, the furanosides (54%; **10a** and **10b**) (Fig. 2B) gradually became the dominant products (fig. S4b). Under these conditions, we also observed hydrolysis of **10a** to **10d** to **8** and **9**. The accumulation of the furanosides **10a** and **10b** is best explained by complexation of their *cis*-diols with borate (32).

The final step toward pyrimidine nucleosides requires reductive opening of the isoxazole N-O bond, followed by tautomerization, intramolecular cyclization, and water elimination in a cascade-like fashion (Fig. 2, C and D). We found that this reaction occurred rapidly with Fe²⁺ in the presence of thiols (Fig. 2D) (33). Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) analysis indicated that cytidine nucleosides **11a** to **11d** formed efficiently under

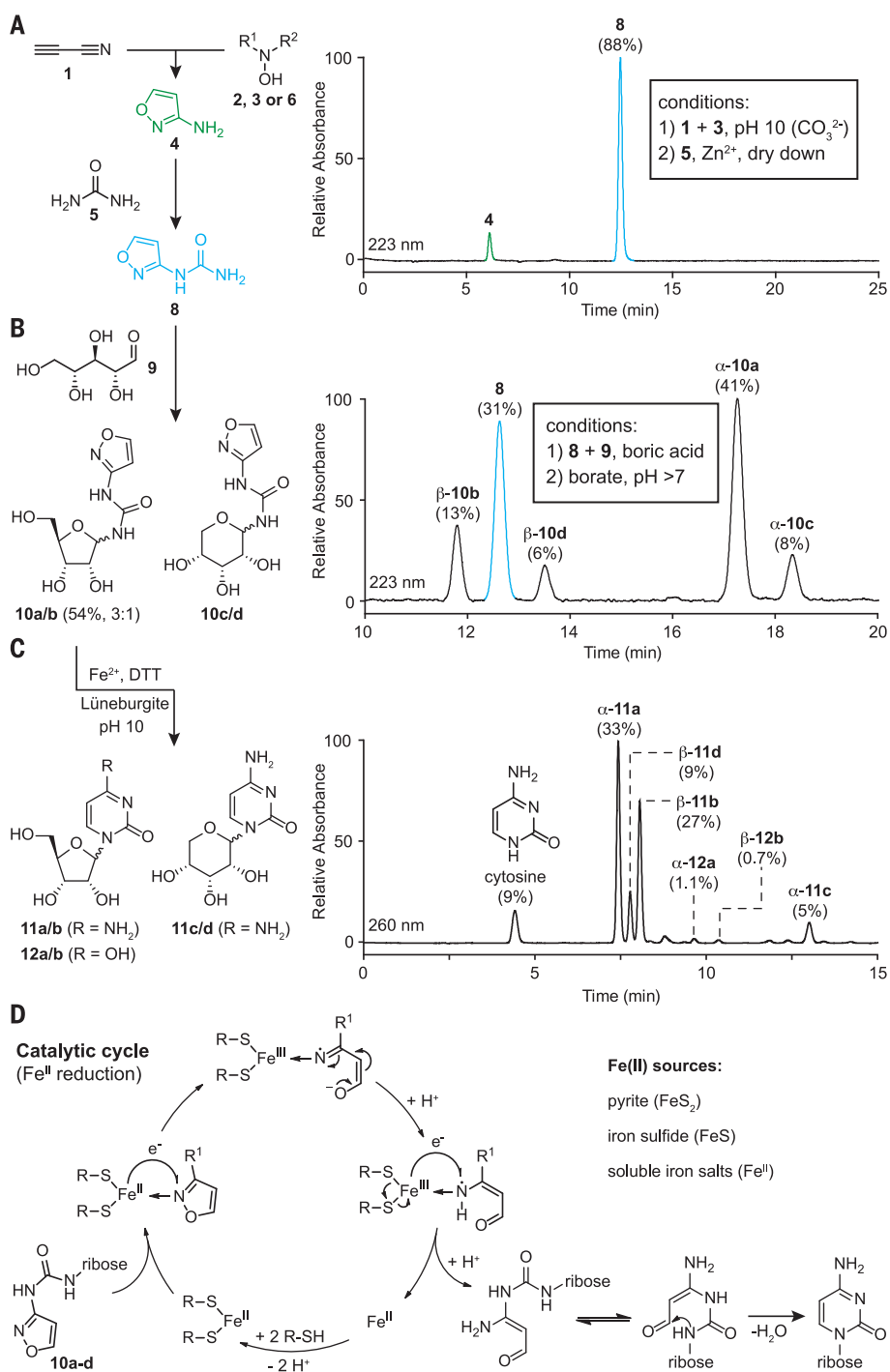


Fig. 2. Formation of pyrimidine nucleosides (11 and 12) from N-isoxazolylurea ribosides 10a and 10b. The different isomers are labeled as follows: **a** = α -furanosyl; **b** = β -furanosyl; **c** = α -pyranosyl; **d** = β -pyranosyl. **(A)** Formation of **4** and its conversion with urea **5** to N-isoxazolylurea **8**. **(B)** Ribosylation of **8** with ribose **9** and equilibration of the reaction mixture in the presence of borates gives the furanosidic isomers **10a** and **10b** (54%). **(C)** Pyrimidine nucleoside formation by reductive N-O cleavage from the compound mixture of **10a** and **10b** in the presence of ammonium iron(II) sulfate hexahydrate (0.0005 equiv.). The HPLC results with detection at 260 nm show formation of cytosine (C; **11a** to **11d**) and uridine (U; **12a** and **12b**). **(D)** Proposed catalytic cycle for the Fe²⁺ catalyzed reduction of the N-O bond of the isoxazole moiety.

these conditions, with the furanosidic uridine nucleosides **12a** and **12b** as the corresponding deamination products formed by hydrolysis (Fig. 2C). Reductive pyrimidine formation can be performed with FeS or the mineral pyrite (FeS₂), and both have been discussed in the context of early metabolic pathways (15, 34). Just 0.0001 equiv. of soluble Fe²⁺ in water is sufficient for the reaction. In the absence of Fe²⁺, pyrimidine formation was not observed. The reduction also appears to be independent of the thiol source, as the products **11a** to **11d** and **12a** and **12b** were obtained regardless of whether we used dithiothreitol (DTT), propanedithiol, mercaptoethanol, or cysteine (fig. S6).

Selective one-pot formation of 5'-nucleoside mono- and diphosphates

The addition of naturally occurring minerals such as hydroxyapatite, colemanite, or (synthetic) lüneburgite to the reductive pyrimidine-forming reaction mixture had a strong influence on the distribution of the four cytidine isomers. Synthetic lüneburgite gave a combined high yield of 85% (Fig. 2C). The natural furanosidic β -cytidine (**11b**) and its α -anomer (**11a**) are formed under these conditions with about the same yields, together with small amounts of α - and β -uridine (**12a** and **12b**). We found only small amounts of the α - and β -cytidine pyranosides (**11c** and **11d**), together with the cytosine base. Because synthetic lüneburgite is known to enable nucleotide formation in the presence of urea (Fig. 3A) (31), we simply added urea to the one-pot reaction mixture after pyrimidine formation and allowed the mixture to evaporate to dryness at 85°C over a period of about 20 hours. LC-MS analysis of the reaction mixture showed formation of phosphorylated nucleosides (Fig. 3A) in a substantial 19% yield relative to that for cytosine (Fig. 3B and fig. S7). We assumed that the reaction generated the α - and β -cytidine 5'-monophosphates **13a** and **13b** and the 5'-diphosphorylated cytidines **14a** and **14b**. Owing to hydrolysis, we also expected some α - and β -uridine 5'-monophosphates and 5'-diphosphates **15a** and **15b** and **16a** and **16b**. We isolated the corresponding high-performance LC (HPLC) peaks and removed the phosphate groups enzymatically (Fig. 3, B and C). LC-MS analysis showed the dephosphorylated furanosides **11a** and **11b** and **12a** and **12b** with over 94% in the nucleoside pool, which corresponds to a change of the furanoside/pyranoside ratio from an initial 4:1 to 17:1 (Fig. 3C). The formation of phosphorylated pyranosides **17** are only a minor side reaction. We found no discrimination between α - and β -anomers during the phosphorylation. The furanoside enrichment is best explained by the presence of a primary hydroxyl group in the furanosides which is absent in the pyranosides. The enrichment of 5'-nucleoside monophosphates and diphosphates under these one-pot conditions establishes a further

chemical selection step that favors the furanosides as the components of RNA. We further characterized the structures of the phosphorylated nucleosides and confirmed the formation of the 5'- α - and 5'- β -cytidine mono- and diphosphates (**13a**, **13b**, and **14a**, **14b**; α -/ β -CMP and α -/ β -CDP) (fig. S8). Additional analysis allowed identification of α , β -UDP **16a** and **16b** (fig. S9). 5'-Pyrophosphates are the dominating species within the diphosphorylated nucleoside mixture (fig. S8a).

Compatible formation of pyrimidine and purine RNA nucleosides

We next investigated if the prebiotically plausible pyrimidine and purine nucleoside pathways are compatible with each other so that they can be connected with the goal to form all Watson-Crick building blocks in the same environment, driven solely by wet-dry cycles. The purine synthesis (*18*) requires as the initial step a reaction of malonitrile **18** with sodium nitrite to give (hydroxyimino)malonitrile **19**. Because malonitrile **18** can be also generated from cyanoacetylene **1**, as shown by Eschenmoser (*35*), pyrimidines and purines can be traced back to the same chemical root (Fig. 4). Compound **19** forms an organic salt with amidines **20** to give nitroso-pyrimidines **21** and, upon reduction and formylation, FaPys (**22** to **25**). The latter can react with ribose **9** to give ribosylated FaPy **26** and then purine nucleosides **27** to **29** (Fig. 1A) (*18*). To investigate how the chemical conditions needed for

pyrimidine formation from the urea-isoxazole **8** would affect purine formation, we reacted **8** and the FaPy compounds **22** and **23** with ribose **9** under dry-down conditions. We performed the reaction under identical conditions but in separate reaction vials (Fig. 4). Under these conditions, formation of all four Watson-Crick nucleosides, cytidine **11**, uridine **12**, adenosine **27**, and guanosine **28**, were detected.

We next investigated if pyrimidines and purines can form simultaneously in the same environment (Fig. 5A). For this experiment, we mixed the starting materials cyanoacetylene **1**, hydroxylurea **3**, (hydroxyimino)malonitrile **19**, and amidine **20** under slightly basic conditions (pH ~10). Analysis of the mixture indeed showed formation of **4** with 86% yield, despite the presence of **19** and **20**. It is surprising that the N-OH functionality of compound **19** does not interfere with the formation of **4**. Compound **4** is a liquid that can enrich from a water solution by dry-down, owing to its high boiling point (228°C). Compound **4** can act as a solvent to facilitate the formation of **21** from the reaction of **19** with **20** under milder conditions (50°C to 100°C instead of 126°C), in contrast with results from a previous experiment (*18*). The next step requires reduction and formylation of **21** to the FaPy intermediate, but this step cannot be performed in the presence of the isoxazole. Addition of a water mixture eventually containing urea **5** leads to spontaneous precipitation of **21**. The supernatant containing **4** and **5** can flow away.

The water-insoluble **21**, if brought into contact with dilute formic acid and Zn (found in Earth's crust), reacts immediately to form the compounds **22** and **24** with Zn²⁺ as a side product (Fig. 5A and fig. S10a). These reaction products are water-soluble and can potentially recombine with **4** and **5**. The side product Zn²⁺ can then catalyze the reaction of **4** in the presence of **5** to give *N*-isoxazolyl urea **8** in the presence of **22** and **24** (Fig. 5A and fig. S10b). This leads to the formation of the pyrimidine and purine precursors **8**, **22**, and **24**, which can be transformed into the purine and pyrimidine nucleosides. In this scenario, intermediate **4** of the pyrimidine pathway helps formation of the purine precursor **21**, while Zn²⁺ as a side product of the purine pathway mediates formation of the pyrimidine precursor **8** in a mutually synergistic way, driven by wet-dry cycles.

We combined **8** with different FaPy intermediates and investigated if they reacted in a one-pot scenario with ribose **9** to finally give the purine and pyrimidine nucleosides. To examine this, we dissolved a mixture of **8**, **22**, **25**, ribose **9**, and boric acid and warmed the mixture to 95°C for 14 hours, allowing for slow evaporation of water. The solid material was then taken up with a slightly basic solution containing Fe²⁺ (0.0005 equiv.) and DTT (1.5 equiv.), and we allowed the mixture to warm to 95°C. HPLC-MS analysis proved that these conditions simultaneously provided the purine and pyrimidine nucleosides with cytidine (**11a** to **11d**) and adenosine (**27**) as the

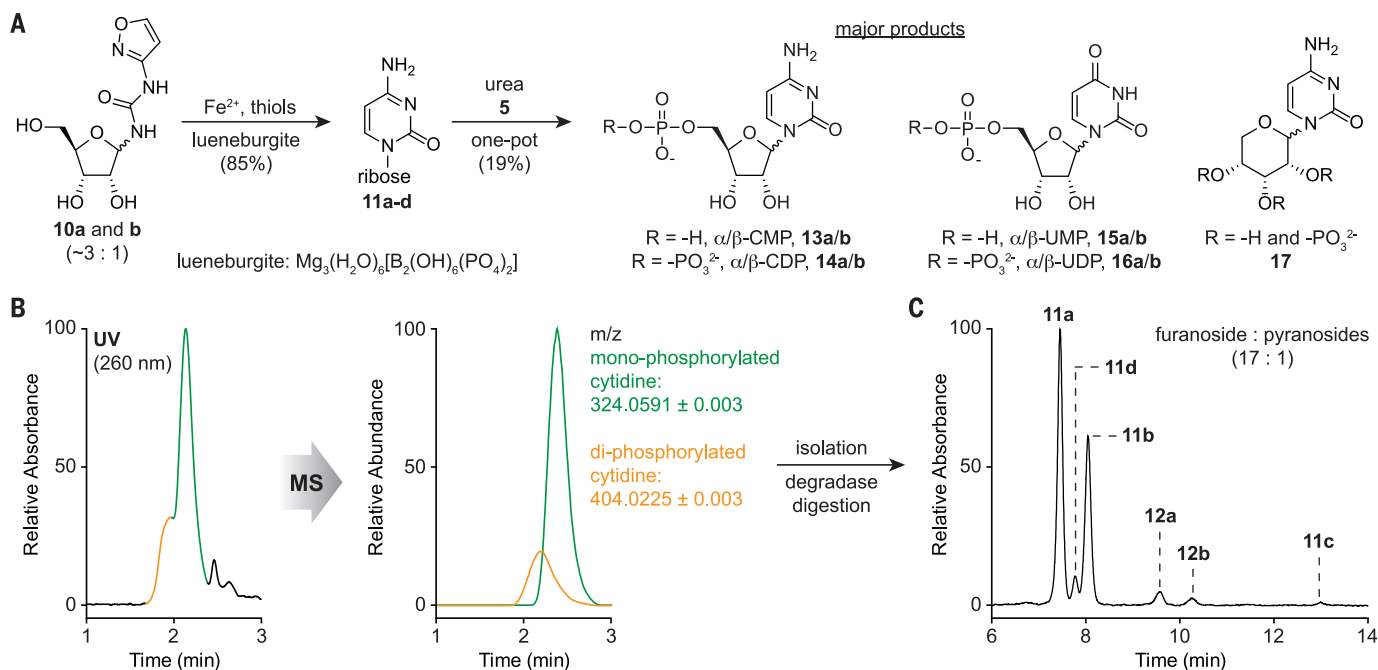


Fig. 3. One-pot nucleotide formation reaction. (A) One-pot synthesis of cytidine and uridine 5'-mono- and 5'-diphosphates (**13a** and **13b** to **16a** and **16b**) after urea addition to the reaction mixture and allowing the mixture to dry-down at 85°C for 20 hours. **a/b** represent the α - and β -anomers, respectively. (B) LC-MS

analysis of the corresponding nucleotide peaks with UV and MS detection and isolation of the formed nucleotides from the prebiotic reaction, followed by an enzymatic removal of the phosphate groups. (C) HPLC analysis of the dephosphorylated product mixture showing predominant formation of α - and β -cytidine **11a** and **11b**.

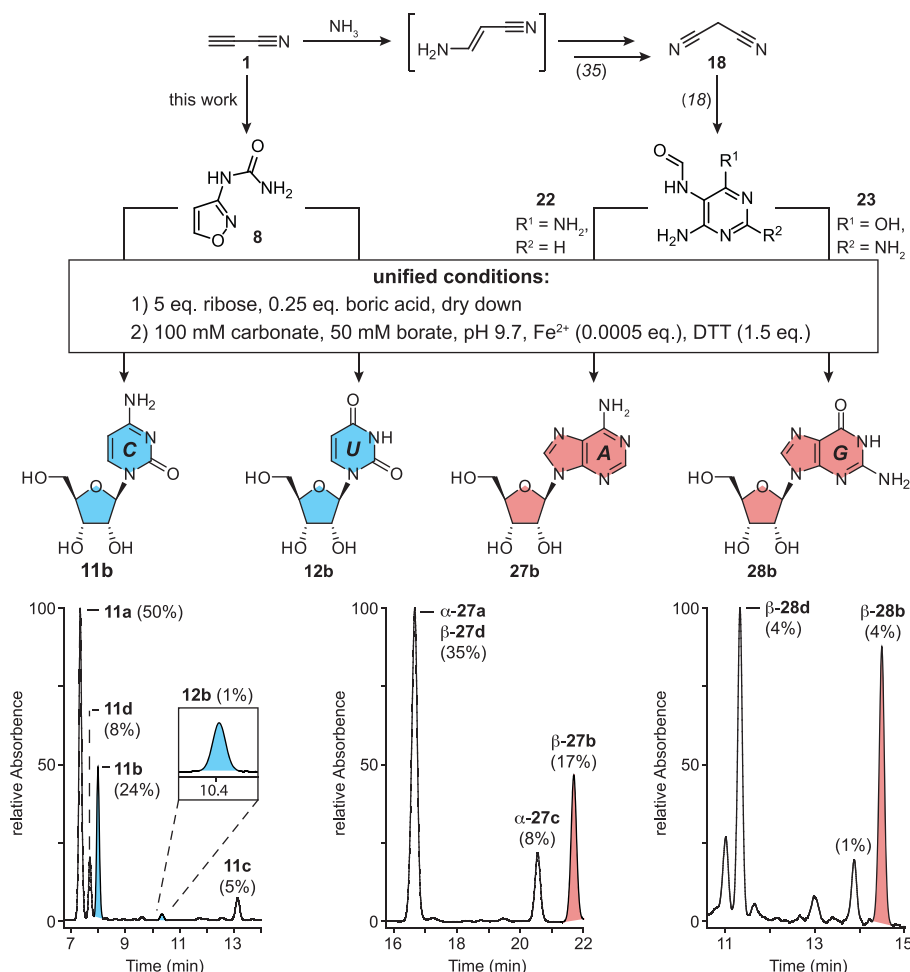


Fig. 4. Formation of all four Watson-Crick RNA building blocks in identical but parallel reactions.

C (**11b**), U (**12b**), A (**27b**), and G (**28b**) are formed under the same conditions separately from **8**, **22**, and **23**. HPLC results are shown with a detection at 260 nm. The nucleosides are labeled as follows: **a** = α -furanosyl; **b** = β -furanosyl; **c** = α -pyranosyl; **d** = β -pyranosyl. Canonical pyrimidine and purine RNA building blocks are labeled in blue and red, respectively.

main products. Diaminopurine nucleosides (DA; **29**), which hydrolyze to guanosine **28**, form in this one-pot reaction as well (Fig. 5A, chromatogram). We noted additional formation of double-ribosylated adenine (rib₂-A). Furthermore, the nucleoside **28** was created in this scenario when we used **23** (R¹ = OH, R² = NH₂) as the starting material, but the yields were lower.

Discussion

Ribose-based RNA and the four canonical nucleosides, A, G, C, and U, are central to modern life and to prebiotic hypotheses, such as the “RNA world,” in which RNA strands replicated and evolved to give increasingly complex chemical systems (4). Whether such RNAs were directly assembled from the canonical nucleotides (A, C, G, and U bases) or if they evolved from a simpler proto-RNA system is unclear (36).

Here we show that a reaction network toward the purine and pyrimidine RNA building blocks can be established, starting from simple atmospheric or volcanic molecules. Molecular complexity is generated by wet-dry cycles that can drive the chemical transformations. Therefore, any environment that was able to provide wet-dry phases might have been a suitable place for the origin of RNA building blocks. Our geochemical model assumes that chemistry took place in several basins that were needed to locally separate intermediates. We also needed one or two streams of water in our system to allow exchange of soluble molecules (Fig. 5B). Intermediates might precipitate upon fluctuations of physico-chemical parameters, allowing for the separation of soluble and insoluble materials (e.g., **4** and **21**). After further reactions, which reestablish solubility, the compounds can be recombined (Fig. 5B). For our scenario we need to assume that the early

Earth provided environmental conditions that fluctuated between slightly acidic (pH 3), potentially caused by acidic rain (SO₂, NO_x), or basic (pH 10) caused by carbonates. Even though most of the chemistry described here was performed at elevated temperatures, the reactions also occur at lower temperatures, but with substantially longer reaction times. We can assume that temperatures fluctuated on the early Earth just like today due to day-night or seasonal cycles. Such fluctuations would certainly have brought about wet-dry cycles, akin to modern droughts and rain. The geophysical requirements needed for the reported chemistry, including elevated temperatures, could have existed in geothermal fields or at surface hydrothermal vents, which are plausible geological environments on early Earth.

Our proposed chemical pathways toward pyrimidines and purines begin with cyanoacetylene **1**, which could have formed in surface hydrothermal vents (13). Reaction of **2**, **3**, or **6** with **1** is the starting point for the pyrimidines, but if **1** reacts instead with ammonia, a pathway to malononitrile **18** as the precursor for purine synthesis is possible (Fig. 4) (35). Another key molecule for the synthesis of purines and pyrimidines is NO₂⁻, which is needed to nitrosate malononitrile **18** to **19** (18). NO₂⁻ is also crucial for the formation of hydroxylamine in the presence of HSO₃⁻, which is formed from volcanic SO₂ (27). The concentration of NO₂⁻ that is reachable in a prebiotic setting is under debate, but it is speculated that the most likely place for its accumulation is in shallow ponds, as needed for our scenario (17). In general, the limited stability of NO₂⁻ would not be an issue, provided that it is rapidly captured by HSO₃⁻ upon its formation. Our model assumes a surface environment, where molecules such as NO₂⁻, HSO₃⁻, or urea **5** could have been delivered by rain after their formation in the atmosphere (Fig. 5B) (25, 37). Our chemistry shows that robust reaction networks can be established that allow all key intermediates to be generated efficiently from relatively complex mixtures, followed by their physical enrichment or separation on the basis of their solubility in water. Wet-dry cycles govern the formation of purine and pyrimidine RNA building blocks in a scenario depicted in Fig. 5B. Of course, we will be unable to definitively prove that the described scenario indeed took place on early Earth, but the reported chemistry shows that, under plausible prebiotic conditions, mutually synergistic reaction pathways can be established in which the intermediates along one pathway help the chemistry of the other. In such a scenario, we show that the key building blocks of life can be created without the need for sophisticated isolation and purification procedures of reaction intermediates that are common in traditional organic chemistry.

The concurrent formation of pyrimidine and purine nucleosides in the network can be traced to just a few key starting molecules, such as cyanoacetylene **1**, NH₃, NH₂OH **2** (or the disulfonate **6**), HCN, urea **5**, formic acid, and isocyanate, plus salts such as nitrites, carbonates, and borates. Metals such as Zn or Fe and their ions play an important role in our chemistry, consistent with their proposed involvement in early metabolic cycles (23, 38). In particular, iron-sulfur surfaces needed for pyrimidine formation have been discussed as platforms for early prebiotic chemistry (15, 34, 39). The 5'-(di)phosphorylation is integrated into our pathway if phosphate minerals such as lüneburgite or struvite (figs. S11 to S13) are present. It remains unclear, however, how ribose or any other carbohydrate, such as glycerol or threose, that is needed to form the backbone of RNA or pre-RNA could have formed selectively (29, 40). Sugars such as ribose can be produced nonselectively in a formose-like reaction, which is possible in a variety of different physico-chemical environments (32, 41–43).

REFERENCES AND NOTES

- J. A. Doudna, T. R. Cech, *Nature* **418**, 222–228 (2002).
- D. P. Horning, G. F. Joyce, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **113**, 9786–9791 (2016).
- J. Attwater, A. Raguram, A. S. Morgunov, E. Gianni, P. Holliger, *eLife* **7**, e35255 (2018).
- W. Gilbert, *Nature* **319**, 618 (1986).
- M. W. Powner, B. Gerland, J. D. Sutherland, *Nature* **459**, 239–242 (2009).
- S. Becker et al., *Science* **352**, 833–836 (2016).
- H.-J. Kim, S. A. Benner, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **114**, 11315–11320 (2017).
- S. Stairs et al., *Nat. Commun.* **8**, 15270 (2017).
- R. Saladino et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **112**, E2746–E2755 (2015).
- J. F. Kasting, *Science* **259**, 920–926 (1993).
- R. M. Hazen, *Am. J. Sci.* **313**, 807–843 (2013).
- E. D. Swanner et al., *Earth Planet. Sci. Lett.* **390**, 253–263 (2014).
- P. B. Rimmer, O. Shorttle, *Life* **9**, 12 (2019).
- W. Martin, J. Baross, D. Kelley, M. J. Russell, *Nat. Rev. Microbiol.* **6**, 805–814 (2008).
- E. Camprubi, S. F. Jordan, R. Vasiladou, N. Lane, *IUBMB Life* **69**, 373–381 (2017).
- S. A. Benner, H.-J. Kim, E. Biondi, in *Prebiotic Chemistry and Chemical Evolution of Nucleic Acids*, C. Menor-Salván, Ed. (Springer International Publishing, Cham, 2018), pp. 31–83.
- S. Ranjan, Z. R. Todd, P. B. Rimmer, D. D. Sasselov, A. R. Babbitt, *Geochem. Geophys. Geosyst.* **20**, 2021–2039 (2019).
- S. Becker et al., *Nat. Commun.* **9**, 163 (2018).
- P. Thaddeus, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **361**, 1681–1687 (2006).
- R. A. Sanchez, J. P. Ferris, L. E. Orgel, *Science* **154**, 784–785 (1966).
- B. H. Patel, C. Percivalle, D. J. Ritson, C. D. Duffy, J. D. Sutherland, *Nat. Chem.* **7**, 301–307 (2015).
- H. Kofod, B. Wickberg, A. Kjør, *Acta Chem. Scand.* **7**, 274–279 (1953).
- K. B. Muchowska, S. J. Varma, J. Moran, *Nature* **569**, 104–107 (2019).
- V. S. Airapetian, A. Glozer, G. Gronoff, E. Hébrard, W. Danchi, *Nat. Geosci.* **9**, 452–455 (2016).
- H. J. Cleaves, J. H. Chalmers, A. Lazcano, S. L. Miller, J. L. Bada, *Orig. Life Evol. Biosph.* **38**, 105–115 (2008).
- D. P. Summers, S. Chang, *Nature* **365**, 630–633 (1993).
- S. Ranjan, Z. R. Todd, J. D. Sutherland, D. D. Sasselov, *Astrobiology* **18**, 1023–1040 (2018).
- G. K. Rollefson, C. F. Oldershaw, *J. Am. Chem. Soc.* **54**, 977–979 (1932).
- G. F. Joyce, *Nature* **418**, 214–221 (2002).
- D. M. Fialho et al., *Org. Biomol. Chem.* **16**, 1263–1271 (2018).
- H.-J. Kim et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* **55**, 15816–15820 (2016).
- A. Ricardo, M. A. Carrigan, A. N. Olcott, S. A. Benner, *Science* **303**, 196–196 (2004).
- M. Kijima, Y. Nambu, T. Endo, *J. Org. Chem.* **50**, 1140–1142 (1985).
- G. Wächtershäuser, *Microbiol. Rev.* **52**, 452–484 (1988).
- U. Trinks, A. Eschenmoser, ETH Zurich (1987); doi: 10.3929/ethz-a-000413538.
- R. Krishnamurthy, *Isr. J. Chem.* **55**, 837–850 (2015).
- J. Liebig, F. Wöhler, *Ann. Phys.* **96**, 369–400 (1830).
- M. Preiner et al., *bioRxiv* 682955 (2019).
- C. Bonfio et al., *Nat. Catal.* **1**, 616–623 (2018).
- J. S. Teichert, F. M. Kruse, O. Trapp, *Angew. Chem. Int. Ed.* **58**, 9944–9947 (2019).
- J. Kofoed, J.-L. Reymond, T. Darbre, *Org. Biomol. Chem.* **3**, 1850–1855 (2005).
- C. Meinert et al., *Science* **352**, 208–212 (2016).
- K. Usami, A. Okamoto, *Org. Biomol. Chem.* **15**, 8888–8893 (2017).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank J. Kampmann for x-ray diffraction measurements and S. Balasubramanian for supporting S.B. during the revision of the manuscript. **Funding:** Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) provided financial support via the programs SFB1309 (TP-A4), SFB749 (TP-A4), SPP-1784, GRK2062/1, and CA275/11-1, the Excellence Cluster EXC114, the European Research Council (ERC) under the European Union's Horizon 2020 research and innovation program (grant agreement EPIR 741912), and the Volkswagen Foundation (Initiative "Life": EcoRib). H.O. thanks the European Commission for a Marie Skłodowska-Curie postdoctoral fellowship (PRENUCRNA). **Author contributions:** T.C. designed and supervised research; S.B. helped to design the study, S.B., J.F., S.W., and H.O. performed the experiments. C.S., M.R., and A.C. supported the synthesis and MS quantification, K.I. performed biochemical studies, and T.A. helped to design the synthesis. T.C., S.B., J.F., and S.W. analyzed data. T.C. and S.B. wrote the manuscript and designed the figures. **Competing interests:** The authors declare no competing interests. **Data and materials availability:** The x-ray crystallographic data for isoxazoleurea **8** are deposited in the CCDC under accession number 1889652. All other data needed to support the conclusions of this manuscript are included in the main text and supporting material.

SUPPLEMENTARY MATERIALS

science.sciencemag.org/content/366/6461/76/suppl/DC1
Materials and Methods
Figs. S1 to S13
References (44–51)

8 March 2019; resubmitted 21 June 2019
Accepted 21 August 2019
10.1126/science.aax2747

Unified prebiotically plausible synthesis of pyrimidine and purine RNA ribonucleotides

Sidney BeckerJonas FeldmannStefan WiedemannHidenori OkamuraChristina SchneiderKatharina IwanAntony CrispMartin RossaTynchtyk AmatovThomas Carell

Science, 366 (6461), • DOI: 10.1126/science.aax2747

Conditions right for making nucleosides

In the absence of biological catalysts and metabolism, can atmospheric and geochemical processes provide the substrates and conditions required for production of biological molecules? Becker *et al.* devised an abiotic synthetic scheme that allows for accumulation of both purine and pyrimidine nucleoside mono- and diphosphates (see the Perspective by Hud and Fialho). A key starting material for this chemistry, hydroxylamine and/or hydroxylamine disulfonate, can form under plausible early atmospheric conditions. Cycles between wet and dry conditions provide the environments necessary to complete formation of purine and pyrimidine bases essentially in one pot.

Science, this issue p. 76; see also p. 32

View the article online

<https://www.science.org/doi/10.1126/science.aax2747>

Permissions

<https://www.science.org/help/reprints-and-permissions>

Use of this article is subject to the [Terms of service](#)

5.2 The Origin of Biomolecules Under Early Earth Conditions (unveröffentlicht)

Jonas Feldmann[#], Stefan Wiedemann[#], Sidney Becker and Thomas Carell

[#] geteilte Erstautorenschaft

Prolog

Für alle präbiotische Reaktionen ist die Entstehung der Ausgangsmoleküle in ausreichenden Mengen unter plausiblen Bedingungen unabdingbar. Da bisherige präbiotische Reaktionen von Startmaterialien wie HCN oder anderen reduzierten Kohlenstoff-Stickstoffverbindungen wie Nitrilen ausgehen, wird eine reduktive, H₂ reiche Atmosphäre benötigt, um diese in der Atmosphäre zu produzieren. Da mittlerweile allerdings von einer redox-neutralen Atmosphäre auf der frühen Erde ausgegangen wird, kann die Entstehung dieser Startmaterialien nicht plausibel begründet verwendet werden. In dieser Arbeit wurde versucht, ausgehend von Produkten einer redox-neutralen Atmosphäre Bildungswege für Biomoleküle zu finden. Ausgehend von Aldehyden und Hydroxylamin konnten Bildungswege für Nucleoside und Aminosäuren gefunden werden. Die Möglichkeit Biomoleküle in großen Mengen aus Produkten einer redox-neutralen Atmosphäre zu formen, ermöglicht es die Entstehung des Lebens erklären zu können, ohne auf spezifische Szenarien zurückgreifen zu müssen, welche kurzzeitig eine „produktive“ reduzierende Atmosphäre entstehen lassen können.

Autorenbeitrag

Entwicklung und Optimierung von präbiotischen Synthesen. Entwicklung von Analytikmethoden zur Auswertung präbiotischer Reaktionen. Synthese von Standards für die Aminosäuresynthese.

The Origin of Biomolecules Under Early Earth Conditions

Jonas Feldmann^{1#}, Stefan Wiedemann^{1#}, Sidney Becker^{1,2} and Thomas Carell^{1*}

Affiliations:

¹ Department of Chemistry, Ludwig-Maximilians-Universität München, Butenandtstrasse 5–13, 81377 München, Germany

² Current address: Max Planck Institute of Molecular Physiology, Department of Chemical Biology, Otto-Hahn-Strasse 11, 44227 Dortmund, Germany

These authors contributed equally.

* Corresponding author
Tel.: 0049 (0)89 218077755
Fax.: 0049 (0)89 218077756
E-Mail: Thomas.carell@lmu.de
www.carellgroup.de

Abstract:

Life on Earth has started with the formation of biomolecules such as amino acids and nucleosides, which subsequently condensed to give proteins and oligonucleotides. The formation of the building blocks of life required the presence of reactive starting materials on the early Earth, which are currently thought to have been HCN, together with a set of small nitriles such as cyanoacetylene, cyanamide and malononitrile. The formation of these starting materials in significant amounts under plausible early Earth conditions is a major unsolved problem. Here, we analyzed the formation of starting materials for life from simple nitrogen-containing inorganics and formaldehyde that can form on an early Earth surrounded by a redox-neutral atmosphere, composed of CO₂, N₂, H₂O, and SO₂. In contrast to the generally accepted models, which involve highly reducing atmospheric conditions, we detected the formation of aldoximes and of complex nitriles, which can start diverse reaction networks that lead to amino acids as well as pyrimidine and purine nucleosides. The uncovered chemistry provides a comprehensive roadmap from inorganic matter to molecules of life and shows that hydroxylamine and aldoximes can be considered signature molecules for life in the universe.

One Sentence Summary:

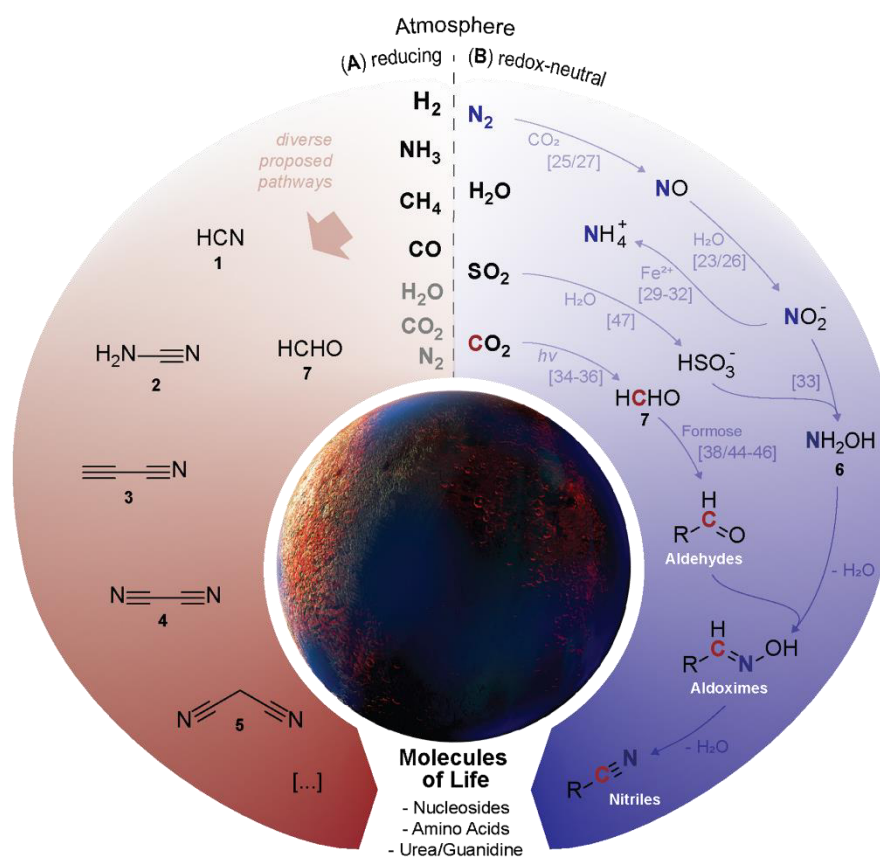
Formation of feedstock compounds for biomolecules occurs under plausible, redox-neutral prebiotic Earth conditions.

Main Text:

The origin of life on Earth required as the initial step the formation of nucleosides and amino acids as the essential building blocks for nucleic acids and proteins.¹⁻⁴ Chemical reactions towards nucleosides and amino acids, however, need reactive starting materials, which must have been present on the early Earth in significant amounts. The current chemical models suggest that nitriles such as hydrogen cyanide (**1**, HCN), cyanamide (**2**), cyanoacetylene (**3**), dicyan (**4**), and malononitrile (**5**) could have served as these reactive precursors on the early Earth (Fig. 1A).¹⁻⁴ Despite the central importance of these molecules for the current concepts of how life could have emerged, their efficient formation under early Earth conditions is an unsolved problem. While molecules such as **1–5** are known to form predominantly in a hydrogen, methane and ammonia containing atmosphere,^{1,5-10} it is currently assumed that such a highly reducing atmosphere may have never existed on the early Earth. All data that are currently available suggest a Hadean atmosphere that was redox-neutral and composed of CO₂, N₂, H₂O, and SO₂.¹¹⁻¹⁴ Under these conditions, the resilient formation of feedstock molecules such as **1–5** is unlikely or even impossible.^{15,16}

The enigma around the fundamental reactions that once allowed life to form is currently tackled with concepts that suggest a temporary, potentially only local, shift of the atmosphere into a H₂-rich state, induced, e.g., by iron core impactors.¹⁶⁻¹⁸ Alternatively, it is discussed that HCN (**1**) may have formed by aerodynamic ablation of carbonaceous chondrites.¹⁹ An attractive model suggests that such sporadically formed HCN (**1**) could have been captured and enriched by soluble Fe²⁺ in the form of ferrocyanides, from where it could have been liberated to fuel prebiotic reactions.²⁰⁻²² While these concepts offer potential solutions for the HCN (**1**) supply problem, the durable formation of the other essential nitriles **2–5** in larger quantities remains difficult.^{15,16}

Here, we describe chemical pathways that can take place under plausible early Earth conditions, using reactions under a plausible redox neutral atmosphere (Fig. 1B). The discovered pathways involve first the formation of nitrogen-containing inorganics by lightning and UV-irradiation, to furnish a set of complex aldoximes, which can further react to complex nitrile organics. From these feedstock molecules amino acids and pyrimidine or purine nucleosides are readily available (Fig. 1C).



(C) Fundamental reaction pathway under redox neutral conditions

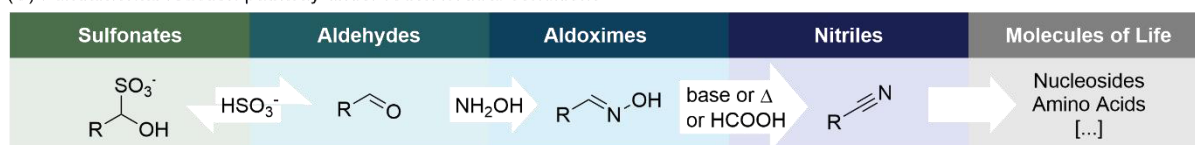


Fig. 1. Depiction of the two alternative feedstock-providing early Earth models. (A) The reductive scenario shows the currently accepted model of how HCN (1) and the feedstock molecules 2–5 needed for the synthesis of amino acids and nucleosides could have formed. (B) The neutral scenario is based on the idea that the early Earth atmosphere had a redox neutral atmosphere, which was capable of producing nitrogen oxides and aldehydes. These molecules react to give aldoximes and, upon water elimination, nitriles with a balanced reactivity from which amino acids and nucleosides are available. (C) Fundamental chemistry concept for the origin of biomolecules in a redox neutral, early Earth atmosphere.

Redox-neutral formation of nitriles

The inorganic chemical network that allows the fixation of nitrogen atoms in a redox neutral atmosphere is shown in Fig. 1B. It is well established that lightning and UV-irradiation through a CO_2 , N_2 , H_2O , and SO_2 atmosphere generates extensive amounts of nitrogen oxide (NO), which further reacts to give the inorganic nitrate (NO_3^-), and nitrite (NO_2^-).^{5,23-28} In the presence of (aqueous) Fe^{2+} , which was abundant on the early Earth, it is likely these molecules were partially reduced to NH_3 .²⁹⁻³² The atmospheric component SO_2 , which originated in large quantities from volcanic activity, is known to react with water to give bisulfite (HSO_3^-), which reacts with NO_2^- as a reductant to give hydroxylamine disulfonate³³. This molecule slowly hydrolyzes to hydroxylamine (6) and sulfate.³³ Another major component of the hadean atmosphere, CO_2 , provides formaldehyde (7, H_2CO),³⁴⁻³⁷ upon lightning and

UV irradiation and continues to react to yield more complex aldehydes³⁴⁻⁴² including glycolaldehyde (**8a**),³⁴⁻³⁹ and malondialdehyde (**9**)^{40,43}. Glycolaldehyde (**8a**), which is a central element of the formose cycle, is the basis for the formation of more complex α -hydroxyaldehydes **8b–e**.^{38,44-46} All of these different aldehydes are rather reactive molecules with consequently limited lifetimes. In the presence of HSO_3^- , however, the aldehydes can form stable sulfonate deposits. According to Benner, these bisulfite adducts are conceivable storage forms of aldehydes, from which they can be liberated to fuel prebiotic reactions.⁴⁷ Our model suggests that these bisulfite adducts and hydroxylamine (**6**) are the major ingredients for prebiotically plausible recipes that enable the formation of biomolecules (Fig. 1C).

Formation of urea, guanidine and amino acids

In order to examine how this chemistry could have enabled the formation of amino acids, we systematically reacted various prebiotically reasonable aldehydes (or their bisulfite adducts) with hydroxylamine. We first focused on formaldehyde (**7**), which can be prebiotically stabilized and accumulated upon formation of its bisulfite adduct **10**.⁴⁷ While formaldehyde (**7**) is known to form urea (**11**) in the presence of hydroxylamine,⁴⁸ we found that the addition of ammonia also provides guanidine (**12**) (Fig. 2A). Urea (**11**) and guanidine (**12**) are both key molecules needed for the formation of pyrimidine or purine nucleosides (*vide infra*). We found that the formation of guanidine (**12**) is even possible under prebiotically plausible one-pot conditions.

We next reacted hydroxylamine (**6**) with various α -hydroxyaldehydes that are produced for example by the formose cycle. We tested glycolaldehyde (**8a**),^{38,39} glyceraldehyde (**8b**),³⁸ lactaldehyde (**8c**),^{41,42} and the aldehydes **8d** and **8e** (Fig. 2B). Under slightly basic conditions we found that they all form the corresponding aldoximes **13a–e** in excellent yields (75%-100%). Again, we observed that the reactions are also possible with the aldehyde bisulfite adducts **14a–e**.^{41,42} We next subjected the α -hydroxyaldoximes **13a–e** to prebiotically plausible wet-dry cycles and noted that all the aldoximes investigated eliminate water quickly to give the corresponding α -hydroxynitriles (**15a–c**), again in excellent yields (75%-100%). This reaction sequence can also be performed under one-pot conditions (Fig. 2B,C), which furnished the α -hydroxynitriles **15a–e** in yields between 20% and 84%. When the hydroxynitriles are brought in contact with ammonia, α -aminonitriles **16a–e** form, which are well established precursor molecules for α -amino acids.^{49,50} These results show that the aldoximes **13a–e**, which form under redox neutral conditions are efficient precursors for the prebiotic formation of amino acids such as **Gly**, **Ser**, **Ala**, **Val**, and **Phe**. This new route does not exclude amino acid formation by the classical Strecker synthesis,^{48,51,52} but it provides an alternative pathway that does not require HCN and in which the C-atom of the aldehyde is directly converted to the carboxylic acid (without homologization).

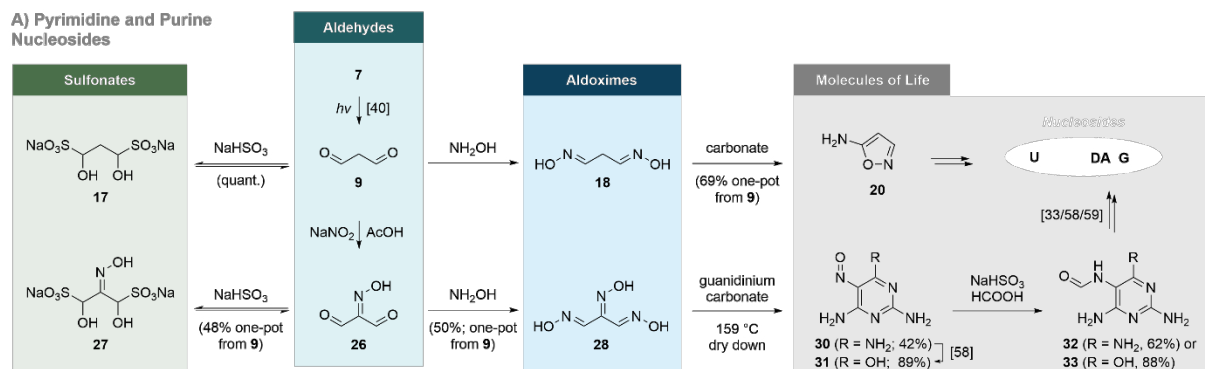
Formation of purine nucleosides

We further investigated how the aldoximes could serve as precursor molecules for purine nucleosides. Towards this goal we reacted NO_2^- with malondialdehyde (**9**) to form (hydroxyimino)-malondialdehyde (**26**), which can be stabilized as its bisulfite adduct (**27**) (Fig. 3A). We found that **26** reacts with hydroxylamine (**6**) to give (hydroxyimino)malondialdoxime (**28**) in 50% overall yield. A subsequent dry-down step in the presence of guanidinium (**12**) carbonate leads to the crystallization of a salt composed out of nitrile **29** and **12** (SI). When we performed this dry-down process at elevated temperature,³³ formation of nitrosopyrimidine **30** takes place (40% yield). A subsequent hydrolytic reaction furnishes in addition nitrosopyrimidine **31** (90% yield). Both nitroso derivatives are already known precursors for purine nucleosides.^{33,58,59} The nitrosopyrimidine **30** reacts with bisulfite and formic acid to generate the formamidopyrimidine compound FaPy-DA (**32**) in 62% yield. The hydrolysed nitrosopyrimidine **31** forms in the presence of bisulfite and formic acid, FaPy-G (**33**, 88% yield). The FaPy-compounds **32** and **33** then react under dry-down conditions with ribose (**23**) to the corresponding ribosides **34** and **35**, which are the direct precursors for the purine nucleosides 2-amino adenosine **36** and guanosine **37** along the recently reported FaPy-pathway.³³

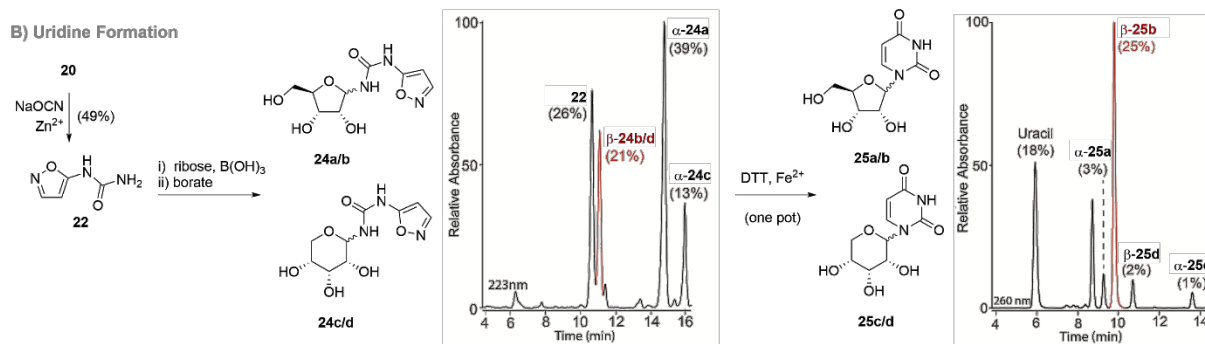
The aldoxime chemistry is compatible with prebiotically plausible, sequential one-pot reactions (Fig. 3C). Malondialdehyde (**9**) plus NO_2^- and hydroxylamine (**6**) give (hydroxyimino)malondialdoxime (**28**), which can be enriched in a dry-down step. Addition of guanidinium (**12**), which could plausibly occur by aqueous inundation or flooding and subsequent gentle warming, generates nitrosopyrimidine **30**, which hydrolyzes to **31**⁵⁸. This compound precipitates. Further addition of bisulfite and formic acid, perhaps by similar natural flowing events, allows formation of **32** and **33**, which again precipitate from solution. After influx of ribose (**23**) dissolved in water, followed by a dry-down step and subsequent flooding, the purine nucleosides **36** and **37** can be obtained.³³

The pyrimidine and purine pathways can also be chemically linked. If malondialdehyde is not completely nitrosated, a mixture of malondialdehyde (**9**) and (hydroxyimino)malondialdehyde (**26**) is formed. Flow-in of a dilute solution of hydroxylamine (**6**) then generates a mixture of the bisaldoxime **18** and the trisaldoxime **28**, which gives 5-aminoisoxazole (**20**) together with **29**. The more NO_2^- is present, the more **26** forms, which allows subsequent formation of the nitrosopyrimidines **30** and **31**, together with the purine nucleosides **36** and **37**. The less NO_2^- is present, the more 5-aminoisoxazole (**20**) forms for the production of uridine (**25**).

A) Pyrimidine and Purine Nucleosides



B) Uridine Formation



C) Connected Pond Model

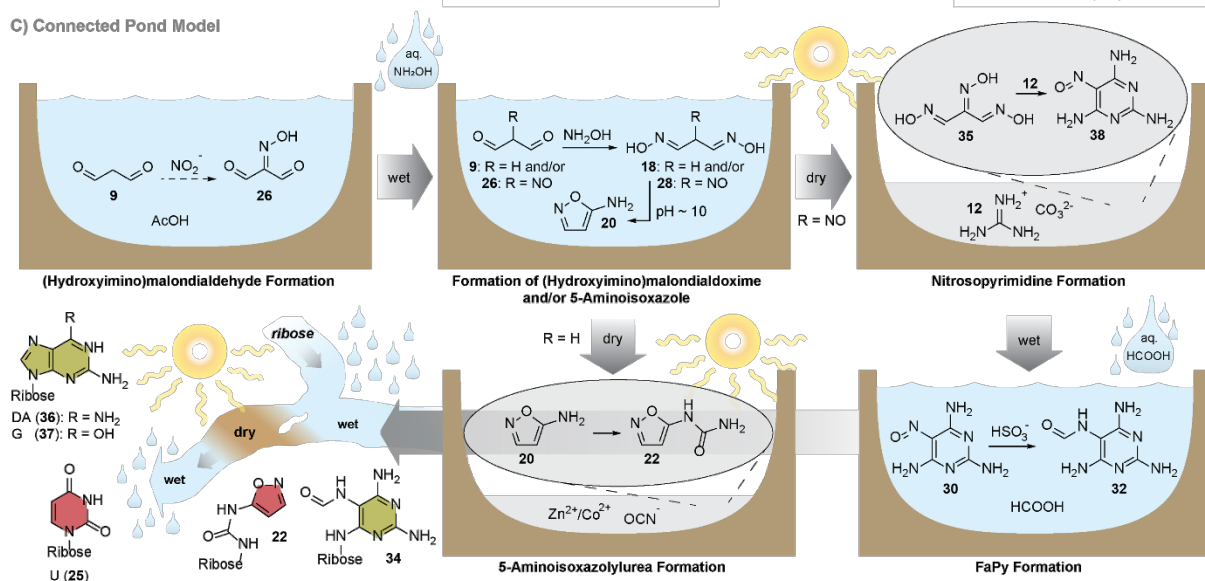


Fig. 3. Prebiotic formation of nucleosides. (A) Formation of uridine via 5-aminoisoxazoles (**20**), respectively, both of which originate from malondialdehyde (**9**) and hydroxylamine (**6**). The purine nucleosides **36** and **37** are formed from nitrosated malondialdehyde (**26**), hydroxylamine (**6**), and guanidine (**12**). (B) Formation of uridine (**25**) from 5-aminoisoxazoles (**20**). HPL chromatography reveals the predominant formation of β -furan nucleosides. (C) Connected pond model that postulates the concomitant formation of pyrimidines and purines.

Discussion

The currently dominating models of how life may have started on the early Earth assumes that abiotic reactions initially produced amino acids and nucleosides, which then condensed to give functional proteins and information-encoding oligonucleotides.¹⁻⁴ For the abiotic formation of these biomolecules reactive starting molecules must have been available on the early Earth.¹⁻⁴ In the absence of efficient metabolic pathways, these reactive molecules must have formed in large quantities by sustainable and resilient processes on the Hadean Earth.¹⁻⁴ The current models propose HCN (**1**) and small reactive nitriles (**2–5**) as the central starting molecules from which life was finally able to emerge.¹⁻⁴ Although prebiotically models of how these molecules (**1–5**) could have formed exist, they are in disagreement with the current knowledge about the geochemical situation of the early Earth. A particular conflict exists with the fact that the early Earth was surrounded by a redox neutral (CO₂, H₂O, N₂, and SO₂ containing) atmosphere.¹¹⁻¹⁴ Current chemical knowledge suggests that under these conditions the formation of the compounds (**1–5**) is only possible in very small quantities.^{15,16} In addition, the central building blocks for nucleosides, **2–5**, are highly reactive with consequently short lifetime, inappropriate for a robust origin of life. We cannot exclude that life indeed formed based on **1–5**, potentially under unknown, peculiar conditions in special geological niches. But, a more resilient chemical pathway to create molecules from which the key building block of life could have formed would certainly provide a better basis for our understanding of how higher molecular complexity was initially generated.

The idea to search for more robust pathways to complex organic matter under plausible redox neutral early Earth conditions allowed the recent discovery that Urey-Miller experiments with neutral gas mixtures yield amino acids by unresolved mechanisms.²³ It seems that a redox neutral atmosphere that some called chemically unproductive¹⁶ is more versatile than originally thought. Here, we followed the idea that life may have formed under rather redox-neutral atmospheric conditions. We investigated the question of what kind of alternative feedstock molecules could have formed in an “inert” CO₂, H₂O, N₂, and SO₂ atmospheric that has dominated the Hadean eon (Fig. 4). We started with considering lightning and UV irradiation through such an atmosphere, which is known to produce NO_x^{-23,26,28} as well as CH₂O³⁴⁻³⁷ in large quantities. Calculations predict that the NO_x⁻ concentration could have reached up to 20 mM levels²⁷ and also for HSO₃⁻ it was estimated that concentrations in the millimolar range are plausible.⁶⁰ Despite the large uncertainties behind such estimates, the data underpin that NO_x⁻ and HSO₃⁻ were robustly formed under early Earth conditions in substantial quantities.^{27,60} If we assume that the formed formaldehyde continued to react (potentially in geochemical niches) to give more complex aldehydes such as malondialdehyde and different α -hydroxyaldehydes, chemical logic predicts a fast and irreversible reaction of all of them with HSO₃⁻, which leads to capturing (and storing) these reactive aldehydes as bisulfite adducts. These adducts can then react with hydroxylamine, which is formed from NO₂⁻ in the presence of HSO₃⁻,³³ to generate the corresponding aldoximes in a reaction that is fast and irreversible under ambient pH-conditions. Nitrosation reactions, particularly of malondialdehyde, produces even trialdoximes, such as compound **28**. We observed that these aldoximes rapidly eliminate water under simple early Earth compatible conditions to give a series of complex nitriles. The resulting reaction products are altogether excellent starting materials for nucleosides and amino acids.

The data presented show that this aldoxime/nitrile chemistry – that can take place under the umbrella of a neutral redox atmosphere – generates the basic ingredients needed for the formation of the most essential biomolecules. Hydroxylamine (**6**), formaldehyde (**7**), SO₂, and water are consequently the

central “pillar molecules” that can start chemical reaction networks towards life. It appears that hydroxylamine and aldoximes are molecular markers for places in the universe where life may have originated.⁶¹

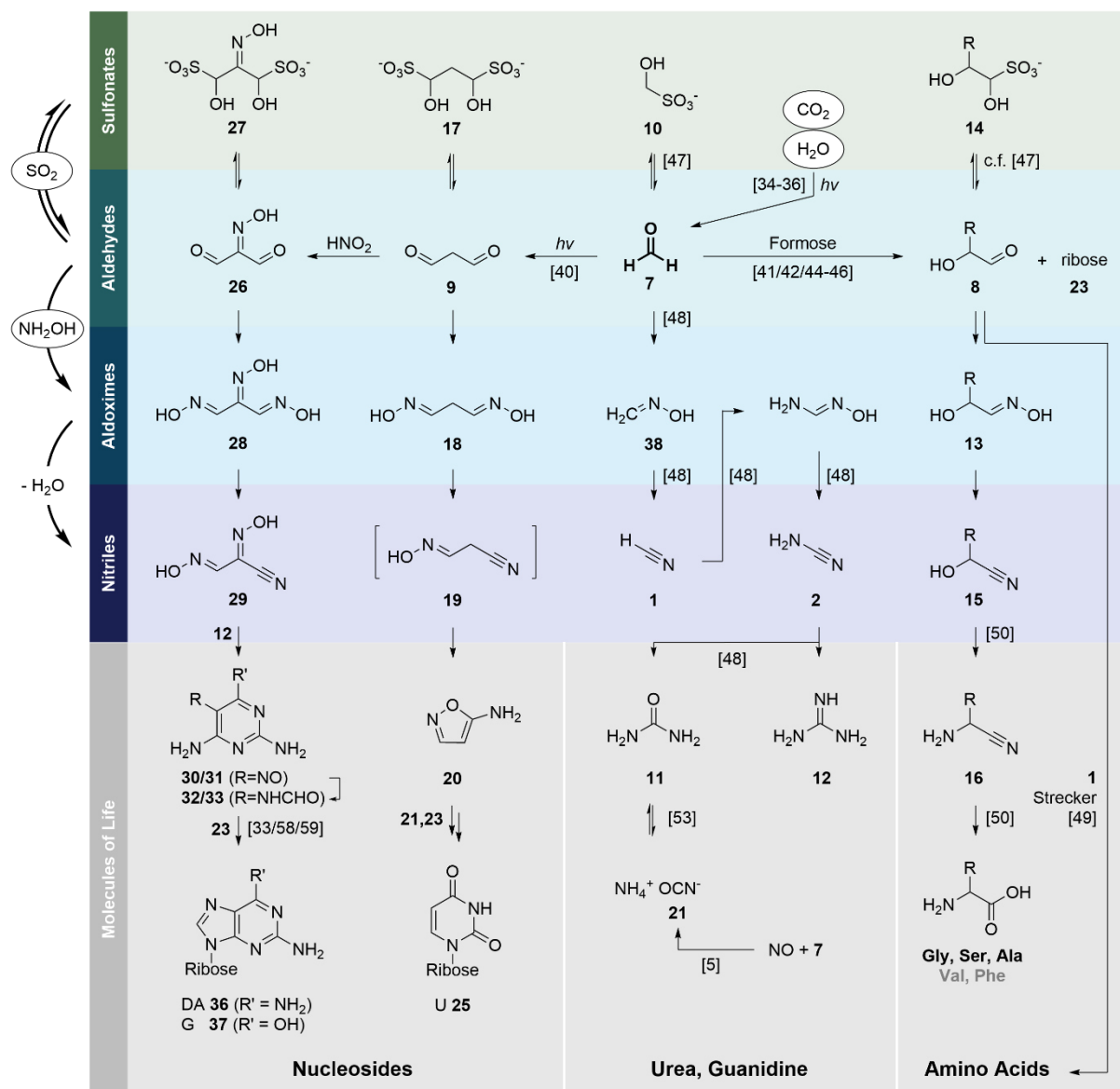


Fig. 4. Overview of the prebiotic reaction network. The network operates with formaldehyde-derived aldehydes (stabilized with aqueous SO_2 (HSO_3^-) as their corresponding sulfonates) as the carbon sources. Hydroxylamine (6) (from NO_2^- and SO_3^{2-} in H_2O) allows introduction of N-atoms into organic matter. Aldehydes 26, 9, 7, and 8 can be stabilized as their corresponding α -hydroxysulfonates (27, 17, 10, and 14) and react with hydroxylamine (6) to aldoximes 28, 18, 38, and 13. Subsequent dehydration allows the formation of nitriles 29, 19, 1, and 15, which finally give access to biomolecules like purines, pyrimidines, guanidine (12), urea (11), and amino acids. The scheme establishes the four molecules SO_2 , NH_2OH , CH_2O and H_2O as the key starting molecules to generate the precursors for amino acids, sugars, and nucleosides.

References

- 1 Orgel, L. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. *Mol. Biol* **39**, 99-123 (2004).
- 2 Yadav, M., Kumar, R. & Krishnamurthy, R. Chemistry of Abiotic Nucleotide Synthesis. *Chem. Rev.* (2020).
- 3 Frenkel-Pinter, M., Samanta, M., Ashkenasy, G. & Leman, L. J. Prebiotic Peptides: Molecular Hubs in the Origin of Life. *Chem. Rev.* (2020).
- 4 Fialho, D. M., Roche, T. P. & Hud, N. V. Prebiotic syntheses of noncanonical nucleosides and nucleotides. *Chem. Rev.* **120**, 4806-4830 (2020).
- 5 Rimmer, P. B. & Rugheimer, S. Hydrogen cyanide in nitrogen-rich atmospheres of rocky exoplanets. *Icarus* **329**, 124-131 (2019).
- 6 Schimpl, A., Lemmon, R. M. & Calvin, M. Cyanamide formation under primitive Earth conditions. *Science* **147**, 149-150 (1965).
- 7 Yung, Y. L. An update of nitrile photochemistry on Titan. *Icarus* **72**, 468-472 (1987).
- 8 Patel, B. H., Percivalle, C., Ritson, D. J., Duffy, C. D. & Sutherland, J. D. Common origins of RNA, protein and lipid precursors in a cyanosulfidic protometabolism. *Nat. Chem.* **7**, 301-307 (2015).
- 9 Sanchez, R., Ferris, J. & Orgel, L. Cyanoacetylene in prebiotic synthesis. *Science* **154**, 784-785 (1966).
- 10 Trinks, U. & Eschenmoser, A., ETH Zurich, (1987).
- 11 Sossi, P. A. *et al.* Redox state of Earth's magma ocean and its Venus-like early atmosphere. *Sci. Adv.* **6**, eabd1387 (2020).
- 12 Trail, D., Watson, E. B. & Tailby, N. D. The oxidation state of Hadean magmas and implications for early Earth's atmosphere. *Nature* **480**, 79-82 (2011).
- 13 Hirschmann, M. M. Magma ocean influence on early atmosphere mass and composition. *Earth Planet. Sci. Lett.* **341-344**, 48-57 (2012).
- 14 Lupu, R. *et al.* The atmospheres of earthlike planets after giant impact events. *Astrophys. J.* **784**, 27 (2014).
- 15 Schlesinger, G. & Miller, S. L. Prebiotic synthesis in atmospheres containing CH₄, CO, and CO₂. *J. Mol. Evol.* **19**, 383-390 (1983).
- 16 Benner, S. A. *et al.* When Did Life Likely Emerge on Earth in an RNA-First Process? *ChemSystemsChem* (2019).
- 17 Genda, H., Brassler, R. & Mojzsis, S. The terrestrial late veneer from core disruption of a lunar-sized impactor. *Earth Planet. Sci. Lett.* **480**, 25-32 (2017).
- 18 Zahnle, K. J., Lupu, R., Catling, D. C. & Wogan, N. Creation and evolution of impact-generated reduced atmospheres of early Earth. *Planet. Sci. J.* **1**, 11 (2020).
- 19 Kurosawa, K. *et al.* Hydrogen cyanide production due to mid-size impacts in a redox-neutral N₂-rich atmosphere. *Orig. Life Evol. Biosph.* **43**, 221-245 (2013).
- 20 Keefe, A. D. & Miller, S. L. Was ferrocyanide a prebiotic reagent? *Orig. Life Evol. Biosph.* **26**, 111-129 (1996).
- 21 Toner, J. D. & Catling, D. C. Alkaline lake settings for concentrated prebiotic cyanide and the origin of life. *Geochim. Cosmochim. Acta.* **260**, 124-132 (2019).
- 22 Sasselov, D. D., Grotzinger, J. P. & Sutherland, J. D. The origin of life as a planetary phenomenon. *Sci. Adv.* **6**, eaax3419 (2020).
- 23 Cleaves, H. J., Chalmers, J. H., Lazcano, A., Miller, S. L. & Bada, J. L. A reassessment of prebiotic organic synthesis in neutral planetary atmospheres. *Orig. Life Evol. Biosph.* **38**, 105-115 (2008).
- 24 Chameides, W. & Walker, J. C. Rates of fixation by lightning of carbon and nitrogen in possible primitive atmospheres. *Orig. Life* **11**, 291-302 (1981).
- 25 Mvondo, D. N., Navarro-González, R., McKay, C. P., Coll, P. & Raulin, F. Production of nitrogen oxides by lightning and coroneae discharges in simulated early Earth, Venus and Mars environments. *Adv. Space Res.* **27**, 217-223 (2001).
- 26 Summers, D. P. & Khare, B. Nitrogen fixation on early Mars and other terrestrial planets: experimental demonstration of abiotic fixation reactions to nitrite and nitrate. *Astrobiology* **7**, 333-341 (2007).

- 27 Ranjan, S., Todd, Z. R., Rimmer, P. B., Sasselov, D. D. & Babbin, A. R. Nitrogen oxide concentrations in natural waters on early Earth. *Geochem. Geophys. Geosyst.* **20**, 2021-2039 (2019).
- 28 Wong, M. L., Charnay, B. D., Gao, P., Yung, Y. L. & Russell, M. J. Nitrogen oxides in early Earth's atmosphere as electron acceptors for life's emergence. *Astrobiology* **17**, 975-983 (2017).
- 29 Summers, D. P. & Chang, S. Prebiotic ammonia from reduction of nitrite by iron (II) on the early Earth. *Nature* **365**, 630-633 (1993).
- 30 Summers, D. P. & Lerner, N. Ammonia from Iron (II) reduction of nitrite and the Strecker synthesis: do iron (II) and cyanide interfere with each other? *Orig. Life Evol. Biosph.* **28**, 1-11 (1998).
- 31 Summers, D. P. Ammonia formation by the reduction of nitrite/nitrate by FeS: ammonia formation under acidic conditions. *Orig. Life Evol. Biosph.* **35**, 299-312 (2005).
- 32 Summers, D. P., Basa, R. C., Khare, B. & Rodoni, D. Abiotic nitrogen fixation on terrestrial planets: reduction of NO to ammonia by FeS. *Astrobiology* **12**, 107-114 (2012).
- 33 Becker, S. *et al.* Unified prebiotically plausible synthesis of pyrimidine and purine RNA ribonucleotides. *Science* **366**, 76-82 (2019).
- 34 Löb, W. Studien über die chemische Wirkung der stillen elektrischen Entladung. *Z. Elektrochem. angew. phys. Chem.* **12**, 282-312 (1906).
- 35 Löb, W. Über das Verhalten des Formamids unter der Wirkung der stillen Entladung Ein Beitrag zur Frage der Stickstoff-Assimilation. *Chem. Ber.* **46**, 684-697 (1913).
- 36 Pinto, J. P., Gladstone, G. R. & Yung, Y. L. Photochemical Production of Formaldehyde in Earth's Primitive Atmosphere. *Science* **210**, 183-185 (1980).
- 37 Cleaves, H. J. The prebiotic geochemistry of formaldehyde. *Precambrian Res.* **164**, 111-118 (2008).
- 38 Kim, H.-J. *et al.* Synthesis of carbohydrates in mineral-guided prebiotic cycles. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 9457-9468 (2011).
- 39 Harman, C. E., Kasting, J. F. & Wolf, E. T. Atmospheric Production of Glycolaldehyde Under Hazy Prebiotic Conditions. *Orig. Life Evol. Biosph.* **43**, 77-98 (2013).
- 40 Halmann, M. & Bloch, S. Glyoxal and malonaldehyde formation by ultraviolet irradiation of aqueous formaldehyde. *BioSystems* **11**, 227-232 (1979).
- 41 Stovbun, S. *et al.* Formation of Chiral Structures in Photoinitiated Formose Reaction. *High Energy Chem.* **52**, 108-116 (2018).
- 42 Stovbun, S. *et al.* in *Dokl. Phys. Chem.* 57-60 (Springer).
- 43 Beeby, A., Mohammed, D. b. H. & Sodeau, J. R. Photochemistry and photophysics of glycolaldehyde in solution. *J. Am. Chem. Soc.* **109**, 857-861 (1987).
- 44 Butlerov, A. C. R. *Hebd. Seances Acad. Sci.* **53**, 145-147 (1861).
- 45 Breslow, R. On the mechanism of the formose reaction. *Tetrahedron Lett.* **1**, 22-26 (1959).
- 46 Eckhardt, A. K., Linden, M. M., Wende, R. C., Bernhardt, B. & Schreiner, P. R. Gas-phase sugar formation using hydroxymethylene as the reactive formaldehyde isomer. *Nat. Chem.* **10**, 1141-1147 (2018).
- 47 Kawai, J., McLendon, D. C., Kim, H.-J. & Benner, S. Hydroxymethanesulfonate from Volcanic Sulfur Dioxide: A "Mineral" Reservoir for Formaldehyde and Other Simple Carbohydrates in Prebiotic Chemistry. *Astrobiology* **19**, 506-516 (2019).
- 48 Yanagawa, H. & Egami, F. Formation of molecules of biological interest from formaldehyde and hydroxylamine in a modified sea medium. *J. Biochem.* **85**, 1503-1507 (1979).
- 49 Strecker, A. Ueber einen neuen aus Aldehyd-Ammoniak und Blausäure entstehenden Körper. *Liebigs Ann.* **91**, 349-351 (1854).
- 50 Islam, S., Bučar, D.-K. & Powner, M. W. Prebiotic selection and assembly of proteinogenic amino acids and natural nucleotides from complex mixtures. *Nat. Chem.* **9**, 584-589 (2017).
- 51 Hatanaka, H. & Egami, F. The formation of amino acids and related oligomers from formaldehyde and hydroxylamine in modified sea mediums related to prebiotic conditions. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **50**, 1147-1156 (1977).

- 52 Oró, J., Kimball, A., Fritz, R. & Master, F. Amino acid synthesis from formaldehyde and hydroxylamine. *Arch. Biochem. Biophys.* **85**, 115-130 (1959).
- 53 Malkina, N. & Kazarnovskii, S. Synthesis of cyanuric acid from urea. *Zh. Priklad. Khim.* **34**, 1583-1587 (1960).
- 54 Ricardo, A., Carrigan, M., Olcott, A. & Benner, S. Borate minerals stabilize ribose. *Science* **303**, 196-196 (2004).
- 55 Barnes, H. L. *Geochemistry of hydrothermal ore deposits*. (John Wiley & Sons, 1997).
- 56 JW, S. Isotopic fractionations accompanying sulfur hydrolysis. *Gechem. J.* **34**, 95-99 (2000).
- 57 Kusakabe, M., Komoda, Y., Takano, B. & Abiko, T. Sulfur isotopic effects in the disproportionation reaction of sulfur dioxide in hydrothermal fluids: implications for the $\delta^{34}\text{S}$ variations of dissolved bisulfate and elemental sulfur from active crater lakes. *J. Volcanol. Geotherm. Res.* **97**, 287-307 (2000).
- 58 Becker, S. *et al.* Wet-dry cycles enable the parallel origin of canonical and non-canonical nucleosides by continuous synthesis. *Nat. Commun.* **9**, 1-9 (2018).
- 59 Becker, S. *et al.* A high-yielding, strictly regioselective prebiotic purine nucleoside formation pathway. *Science* **352**, 833-836 (2016).
- 60 Ranjan, S., Todd, Z. R., Sutherland, J. D. & Sasselov, D. D. Sulfidic anion concentrations on early earth for surficial origins-of-life chemistry. *Astrobiology* **18**, 1023-1040 (2018).
- 61 Rivilla, V. M. *et al.* Prebiotic precursors of the primordial RNA world in space: Detection of NH_2OH . *Astrophys. J. Lett.* **899**, L28 (2020).

Acknowledgements: We thank the Volkswagen Foundation for funding this research (grant EvoRib). This project has received funding from the European Research Council (ERC) under the European Union's Horizon 2020 research and innovation program under grant agreement No 741912 (EPiR). Further support was obtained by the DFG program CRC1309 (325871075), the DFG Normalverfahren "prebiotic chemistry of modified nucleosides" grant number 326039064 and the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under the Marie Skłodowska-Curie grant agreement No 861381.

Author contributions: J.F., S.W. conducted all experiments and designed parts of this study. S.B. contributed with early discussions and ideas. T.C. conceived the project and directed the research. All authors contributed to the analysis of the results and writing of the manuscript.

Competing interests: Authors declare no competing financial interests.

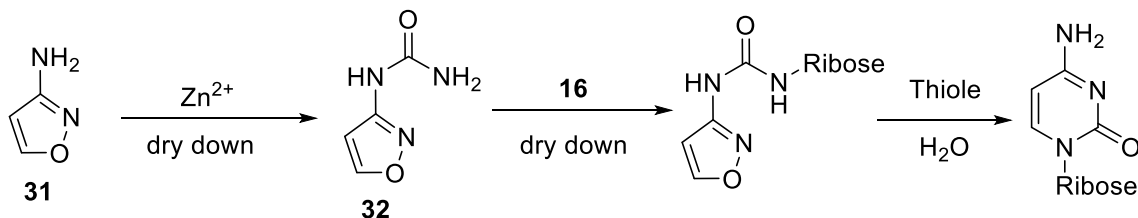
Supplementary Information: Supplementary Information is available for this paper.

5.3 Nicht publizierte Arbeiten

5.3.1 Reaktionen in Gesteinsreaktionsgefäßen

5.3.1.1 Prolog

Zunächst wurde versucht die Durchführung der in Abschnitt 5.1 beschriebenen Cytidin-Synthese in einer miteinander verbundenen Glasapparatur durchzuführen, um die Einfachheit des publizierten Bildungsweges zu demonstrieren. Dieser Aufbau konnte schnell realisiert werden, wurde aber durch einen Aufbau aus Reaktionsgefäßen bestehend aus Gestein ersetzt. Dies wurde durchgeführt, da in der organischen Chemie Glas- oder Plastikapparaturen als Reaktionsgefäße gewählt werden, gerade weil sie inerte Oberflächen besitzen. Für eine chemische Synthese ist es gewünscht, dass nur die Reaktionspartner miteinander interagieren. Das Reaktionsgefäß sollte inert sein. Gänzlich anders verhielt es sich jedoch mit den präbiotischen Reaktionen auf der frühen Erde. Diese fanden entweder in den Ozeanen in großer Verdünnung statt oder in kleinen Tümpeln an Land oder gar im trockenen Zustand. Da in den zuvor berichteten Arbeiten viele Reaktionen sogenannte „dry down“ Reaktion sind, bei denen das Lösemittel (Wasser) während der Reaktion allmählich verdunstet, entstehen zwangsläufig Interaktionen mit Mineralien- oder sonstigen Oberflächenstrukturen der frühen Erde. Um diese Interaktionen zu simulieren wurden Reaktionsgefäße aus Gesteinen, die Geologen auf der frühen Erde vermuten, angefertigt. Anschließend sollte in diesen Reaktionsgefäßen, die bereits in Kapitel 5.1 beschriebene Cytidin-Synthese durchgeführt werden (Schema 5).



Schema 5: Reaktionskaskade die in den Reaktionsgefäßen aus Gesteinen durchgeführt wurde.

5.3.1 Reaktionen in Gesteinsreaktionsgefäßen

Der erste Syntheseschritt, die Herstellung von 3-Aminoisoxazol (**31**) wurde ausgelassen, da diese Synthese aus Cyanoacetylen (**8**) und Hydroxyharnstoff^[108] aufgrund der Gefährlichkeit und Toxizität von **8** nicht im benötigten großen Maßstab durchgeführt werden sollte. Zusätzlich läuft diese Reaktion selbst bei sehr geringen Konzentrationen an Startmaterialien in sehr hohen Ausbeuten ab. Es wurde angenommen, dass diese Reaktion sich auch in Gesteinsreaktoren problemlos durchführen lassen sollte, da aufgrund der Durchführung in Lösung und der geringen Konzentration an Startmaterialien nur geringe Interaktionen mit der Gesteinsoberfläche vermutet wurden.

Da die verwendeten Reaktionsgefäße nun deutlich größer waren, wurde beschlossen statt mit 0.1 mmol mit 5-10 mmol Ansätzen zu arbeiten um bei den „dry down“ Reaktionen eine komplette Bedeckung der Bodenfläche mit einer ausreichenden Menge an Substanz in den Reaktionsmulden (Abbildung 15) zu gewährleisten.



Abbildung 15: Reaktionsmulde eines Reaktors aus Basalt.

5.3.1.2 Ergebnisse

Bei der Adaption dieser Reaktion im Glasapparat konnten alle Reaktionen unter sehr ähnlichen Bedingungen wie bei den kleinen Ansätzen im Eppendorftube oder Falcon mit ähnlichen Ausbeuten durchgeführt werden. Auch das Überführen durch Stickstoffüberdruck aus einem Reaktionskolben in den nächsten funktionierte problemlos.

5.3.1 Reaktionen in Gesteinsreaktionsgefäßen

Einzigste Änderung war, dass 3-Ureaisoxazol (**32**) nur sehr langsam und in sehr geringen Ausbeuten durch selektives Ausfällen aufgereinigt werden konnte. Deshalb wurde dieser Schritt durch eine Ausfällung des als Katalysator zugegebenen Zn^{2+} (Schema 5) mit CO_3^{2-} ersetzt, wobei unlösliches ZnCO_3 als Niederschlag entstand. Der hierbei entstandene Überstand konnte dann im nächsten Schritt in dem nächsten Kolben mit Ribose unter Borsäure Katalyse zu Ribosiden reagieren. Nachdem dieser Aufbau sehr schnell realisiert werden konnte, wurde aus den unter 5.3.1.1 erwähnten Gründen beschlossen, statt auf miteinander verbundenen Glaskolben auf Gesteinsgefäße aus Gneiss ($\text{SiO}_2 = 70\%$, $\text{Al}_2\text{O}_3 = 15\%$, $\text{K}_2\text{O} = 3,5\%$, $\text{Fe}_2\text{O}_3 = 2,5\%$, $\text{Na}_2\text{O} = 1,7\%$) oder Basalt ($\text{SiO}_2 = 50\%$, $\text{Al}_2\text{O}_3 = 20\%$, $\text{FeO} = 10\%$, $\text{Na}_2\text{O} = 5\%$, $\text{K}_2\text{O} = 0,3\%$) zurückzugreifen. Zuerst wurde hierbei versucht, die Reaktionen einzeln in diesen Durchzuführen, sobald dies gelang, sollten die Reaktionen miteinander kombiniert werden. Hauptunterschied zwischen der Glasapparatur und der Durchführung in Gesteinsmulden war, neben dem anderen Reaktionsgefäß, dass in den Gesteinsreaktoren nicht Sauerstofffrei gearbeitet werden konnte und dass das Erhitzen der Reaktionsgefäße geschah, indem sie direkt auf Heizplatten platziert wurden (Abbildung 16).

5.3.1 Reaktionen in Gesteinsreaktionsgefäßen



Abbildung 16: Bild des Aufbaus der drei notwendigen Gesteinsreaktoren und wie sie nacheinander platziert wurden. Der Travertinreaktor mit den zwei nach unten führenden Schläuchen dient der Zugabe von Flüssigkeiten in die ersten beiden Reaktoren.

Zuerst wurde die Reaktion von **31** zu **32** in einem Gneissreaktor untersucht. Diese Reaktion konnte ohne Adaptionen auf die neue Reaktionsumgebung durchgeführt werden, allerdings musste die Reaktionszeit in größeren Ansätzen deutlich verlängert werden. Dies liegt vermutlich daran, dass diese Reaktionen nach dem Eintrocknen als hochgradig viskose und inhomogene Masse vorliegen, bei der es in größeren Mengen durch verlangsamte Diffusion länger dauert bis die Reaktionspartner aufeinandertreffen können. Bei der Reaktion konnten somit nur noch maximal 53 % Ausbeute erreicht werden.

Die Reaktion erfolgte mit vier Äquivalenten Harnstoff (**10**) und einem Äquivalenten ZnCl_2 in 100 mL Wasser bei 93°C für 8 Tage. Hierbei wurde die Reaktionsmischung einmal nach vier Tagen nochmal in Wasser gelöst und ein weiterer *dry down* durchgeführt. Das zwischenzeitliche Anlösen wurde durchgeführt, damit die Reaktionsmischung noch einmal durchgemischt werden kann. Durch Verlängerung der Reaktionszeit auf 28 Tage

5.3.1 Reaktionen in Gesteinsreaktionsgefäßen

wurde die Ausbeute mit 48% nur minimal erniedrigt. Die Reaktion im Basaltreaktor wurde nicht weiter optimiert, weil im Gneissreaktor bessere Ausbeuten erzielt wurden.

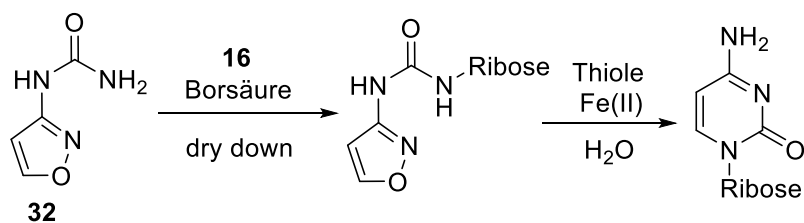
Während der Optimierung zeigte sich, dass die Ausbeute durch Neigung des Reaktionsgefäßes deutlich erhöht werden konnte (Abbildung 17) und die viskose Reaktionsmaße sich so an einer Seite sammeln konnte. Die Notwendigkeit des Schrägstellens könnte vermutlich durch Verwendung deutlich größerer Mengen an Edukt umgangen werden, da sich somit eine homogenere Menge in der Reaktionsmulde bilden könnte. Um nicht unnötig viele Ressourcen hierfür zu verschwenden, wurden die Gesteinsreaktionsgefäße aber weiterhin schräg gestellt.



Abbildung 17: Ein schräg gestellter Gneiss-Reaktor.

Da sich der zweite und der dritte Schritt (Schema 6) jeweils problemlos einzeln durchführen ließen, wurde beschlossen diese Schritte direkt als *one-Pot* Reaktion zu optimieren. Zusätzlich konnte die verwendete Stoffmenge an **32** auf 5 mmol reduziert werden..

5.3.1 Reaktionen in Gesteinsreaktionsgefäßen



Schema 6: One-pot optimierte Schritte zwei und drei der Cytidin-Synthese im Gesteinsreaktor.

Für die Glykosidierung wurde **32** mit 5 Äquivalenten (Äq.) Ribose (**16**) und 0,5 Äq. Borsäure in 50 mL Wasser gelöst. Die Reaktionsmischung wurde für 16 Stunden auf 64 °C (Temperatur der Lösung) erhitzt. Der Rückstand wurde in 100 mL Wasser gelöst, mit 0,375 Äq., Na₂CO₃ und Dithiothreitol (DTT) (1,5 Äq.) versetzt. Die Mischung wurde für 3 Stunden bei 85 °C erhitzt. Hierbei konnte eine Gesamtausbeute an 65 % Cytidin-Nukleosiden erreicht werden und weitere 4 % gebildetes Cytosin (**6**) konnten beobachtet werden (Abbildung 18).

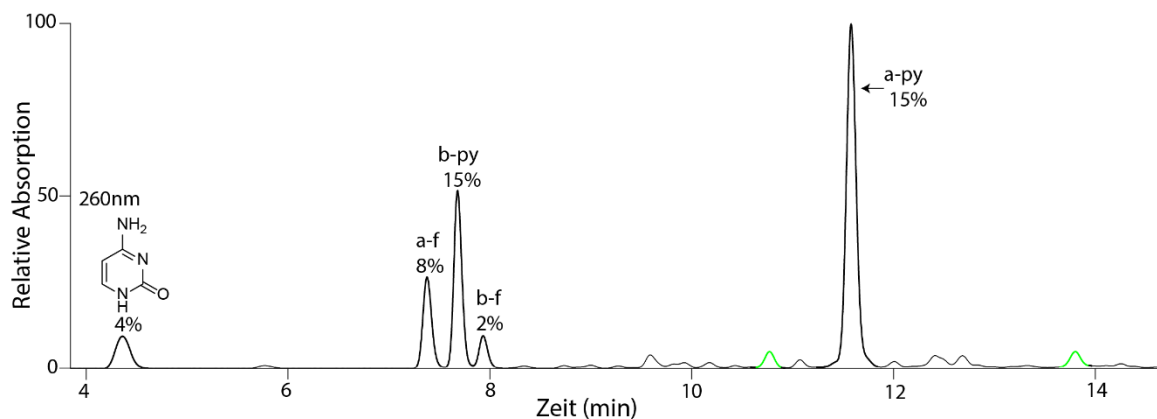


Abbildung 18: LCMS Chromatogram der One-Pot Reaktion in Basalt für Schritt zwei und drei ausgehend von **32**. Die grünen Peaks sind Uridine, welche durch Hydrolyse gebildet wurden. a-py, α-pyranose; b-py, β-pyranose; a-f, α-furano; b-f, β-furano.

Es zeigt sich eine Selektivität sowohl für die Pyrano- als auch die α-Produkte. Dies ist beides nicht gewünscht, aber diese Trends konnten sich auch beim Verändern einzelner Parameter nicht grundlegend umkehren lassen.

Durch die Verwendung von Pyrit als zusätzliche Fe²⁺ Quelle konnten die Ausbeuten sogar noch gesteigert werden. So konnten in Basalt 74 % und in Gneiss sogar 78 % an Gesamtausbeute erzielt werden. Die Verteilung der Verhältnisse der einzelnen Isomeren zueinander konnte aber auch hierbei nicht maßgeblich geändert werden (Tabelle 1).

Daher wurde beschlossen, diese Reaktion erst auf Selektivität zu optimieren, sobald diese beiden Schritte mit dem ersten Schritt gekoppelt worden sind.

Während die Kopplung mit **16** noch unter gleichen Bedingungen durchgeführt werden konnte, zeigte sich, dass für die Umwandlung in Cytidin-Nukleoside die Ausbeute durch Zugabe von Boraten zusätzlich zu den bereits verwendeten Carbonaten und DTT erhöht werden konnte.

Tabelle 1: Ausbeuten für die Reaktion aus zu Cytidinnukleosiden für alle möglichen Isomere. Es ist jeweils der beste Ansatz in einem Basalt- und einem Gneiss-Reaktor aufgeführt

	α -furano	β -pyrano	β -furano	α -pyrano	Gesamt	Cytosin 6
Basalt	11 %	20 %	3 %	40 %	74 %	5 %
Gneiss	13 %	19 %	3 %	44 %	78 %	6 %

Für den letzten Reaktionsschritt hin zu Cytidin-Nukleosiden konnte die Reaktionszeit im zweiten Schritt von vier Stunden aus Kapitel 5.1 auf drei Stunden und mit Pyrit sogar auf 1,5 Stunden reduziert werden. Dies liegt höchstwahrscheinlich daran, dass zuvor in einem in sich geschlossen System gearbeitet wurde und somit auch bei hohen Temperaturen die Menge an Flüssigkeit annähernd konstant blieb, im Basaltreaktor wurde diese doch durchgehend geringer, sodass alle 30 min Wasser nachgefüllt wurde um ein Eintrocknen zu verhindern. Durch die zwischenzeitliche Reduktion an Lösemittel wurde gleichzeitig die Konzentration an Base erhöht, was zu einer effektiveren Deprotonierung der Thiole führen sollte. Da dies notwendig für die Bindung der Thiole an Fe^{2+} ist (Mechanismus siehe Kapitel 5.1), sollte die Reaktion unter sonst sehr ähnlichen Bedingungen durch den zeitweise erhöhten pH-Wert beschleunigt werden.

Da Basalt Fe^{2+} -Ionen enthält^[149] ist die Zugabe zusätzlicher Eisen(II)verbindungen wie Pyrit nicht zwingend notwendig. Die Anwesenheit von Sauerstoff, welcher bei der Entwicklung der Reaktion unter Kapitel 5.1 nicht vorhanden war, hat auf diese Reaktion keinen Einfluss. So zeigten Reaktionen in Falcons, dass eine Sauerstoffatmosphäre ohne Fe(II) keine Cytidin-Nukleoside ausbilden kann. Eine Reaktion mit Basaltpulver als Fe(II) Quelle unter einer Argonatmosphäre hingegen bildet Cytidin-Nukleoside aus. Nach der Optimierung der Einzelschritte, sollte nun versucht werden alle drei Schritte miteinander zu koppeln.

5.3.1 Reaktionen in Gesteinsreaktionsgefäßen

Hierbei sollte der erste Schritt zur Synthese von 3-Ureaisoxazole (**32**) wie bisher durchgeführt werden, die Reaktionsmischung dann in Wasser gelöst werden und das Zn^{2+} mit Carbonat gefällt werden. Der Überstand sollte dann in das nächste Gesteinsreaktionsgefäß überführt werden um dort mit Ribose (**16**) zu reagieren. Der gebildete Rückstand sollte wiederrum gelöst werden um dann im letzten Reaktor zu Cytidin-Nukleosiden zu reagieren.

Hierfür sollte der Aufbau aus Abbildung 16 verwendet werden, nur dass der erste Basaltreaktor (der oberste Reaktor) für die Durchführung des ersten Schrittes durch einen Gneissreaktor ersetzt wurde, da dieser dort besser funktionierte. Für den zweiten und dritten Reaktor wurde Basalt gewählt, da die Reaktionen in beiden Gesteinen ähnlich verliefen und Basalt zusätzlich die Möglichkeit bietet den letzten Schritt ohne zusätzliche Fe^{2+} Quelle durchzuführen. Über den Travertinreaktor sollten Flüssigkeiten zu gegeben werden, etwa um die Rückstände einer „dry down“ Reaktion wieder anzulösen. Folgende Schritte (Abbildung 19) sollten nun in den drei Gesteinsreaktoren durchgeführt werden um aus 3-Aminoisoxazol (**31**) Cytidin-Nukleoside herzustellen.

5.3.1 Reaktionen in Gesteinsreaktionsgefäßen

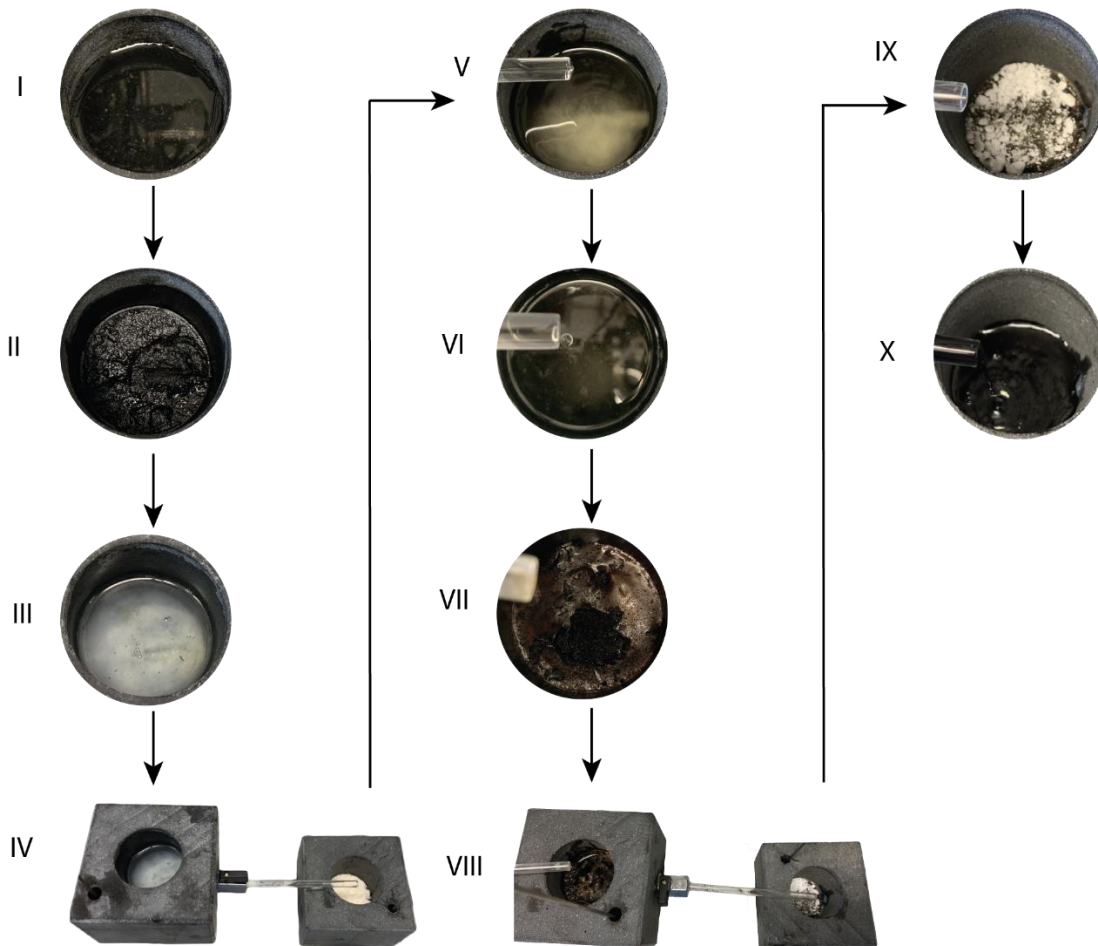


Abbildung 19: Sequenzieller Reaktionsverlauf von **31** zu Cytidin-Nukleoside im Basaltreaktor.

Bild I zeigt die Reaktionslösung für den ersten Syntheseschritt bestehend aus 3-Aminoisoxazol (**31**), Harnstoff (**10**) und ZnCl_2 in Wasser zur Herstellung von 3-Ureaisoxazol (**32**). Diese Mischung wird nun erhitzt, sodass das H_2O verdampfen kann. Das Endprodukt dieser Reaktion (Bild II) wird dann in wässriger Na_2CO_3 gelöst, wobei Zn^{2+} als ZnCO_3 ausgefällt wird (Bild III). Nachdem sich der gebildete Niederschlag absetzen konnte, wird der Überstand in einen zweiten Gesteinsreaktor überführt, in welchem bereits Ribose (**16**) und Borsäure vorliegen (Bild IV und V). Nachdem eine homogene Lösung entstanden ist (Bild VI), wird erneut erhitzt bis das Wasser verdampft und der in Bild VII zu sehende Rückstand gebildet wird. Dieser Rückstand wird in wässriger Na_2CO_3 gelöst (Bild VIII) und in den dritten Reaktor überführt, in dem wie auf Bild IX zu sehen bereits DTT und Pyrit vorgelegt wurden. Nachdem sich das DTT gelöst hat, wird wiederum erhitzt, allerdings wird alle dreißig Minuten Wasser zugegeben um ein

5.3.1 Reaktionen in Gesteinsreaktionsgefäßen

Eintrocknen zu verhindern. Die komplette Reaktionsabfolge über alle Schritten wurde bisher noch nicht ohne Pyrit als zusätzliche Fe^{2+} Quelle durchgeführt. Der Grund hierfür waren schlechtere Ausbeuten und längere Reaktionszeiten, sodass zuerst die besten Bedingungen optimiert wurden.

Nach Optimierung der Reaktionsbedingungen wurde Cytosin (**6**) mit 26,9 % als Hauptprodukt sowie Cytidin-Nukleoside (6,3 %) erhalten.

Der niedrige Anteil an Nukleosiden kann vermutlich damit erklärt werden, dass im ersten Schritt vier Äquivalente Harnstoff (**10**) verwendet werden, dessen Überschuss nicht aus der Reaktion entfernt wird. Damit konkurriert er bei der Glykosiderungsreaktion als Nukleophil mit 3-Ureaisoxazol (**32**). Um die Ausbeuten an Cytidin-Nukleosiden gegenüber **6** zu erhöhen, wurde versucht die vorhandene Menge an Harnstoff (**10**) zu reduzieren. Dafür wurden zwei verschiedene Ansätze gewählt.

In einem ersten Ansatz sollte die Reaktionszeit im ersten Schritt, der Synthese von 3-Ureaisoxazol (**32**), verlängert werden. Hierbei war das Ziel, dass die Ausbeute an **32** konstant bleibt, überschüssiges **10** jedoch mit sich selbst zu Biuret, Triuret oder anderen Harnstoffpolymeren reagiert. Hierdurch würde sich die Anzahl an Nukleophilen, welche in Konkurrenz mit **32** für die Reaktion mit Ribose stehen, deutlich erniedrigen.

Durch Verlängerung der Reaktionszeit im ersten Schritt um 20 Tage konnte beobachtet werden, dass die Ausbeute für **32** von 53 % auf nur 48 % sank. Nach Durchführung der weiteren Schritte zu Cytidin-Nukleosiden, konnte tatsächlich eine leicht erhöhte Ausbeute an Nukleosiden beobachtet werden (Tabelle 2).

Tabelle 2: Optimierung der Reaktionszeit für den ersten Schritt. Die Ausbeuten für die einzelnen Isomere, dann die Gesamtausbeute für Cytidin-Nukleoside. Die Ausbeute an Cytosin **6**, dann die Gesamtausbeute an gebildeten Cytidinen und Cytosin(Cytosine).

α - furano	β - pyrano	β - furano	α - pyrano	Gesamtausbeute Nukleoside	6 [%]	Cytosine	Reaktionszeit Schritt 1:	Ausbeute Schritt 1
2,7 %	0,4 %	1,7 %	1,5 %	6,3 %	26,9	33,2 %	8d	53 %
3,0 %	0,9 %	2,1 %	2,6 %	8,6 %	17,7	26,3 %	28d	48 %

Während die Ausbeute an Nukleosiden und des natürlich vorkommende β -furano-Isomers steigen, sinkt die Menge an gebildetem **6** deutlich. Somit hat die verlängerte Reaktionszeit im ersten Schritt die erhofften Änderungen erzielen können, allerdings ist der Einfluss auf

5.3.1 Reaktionen in Gesteinsreaktionsgefäßen

die Nukleoside-Ausbeute nur sehr gering, da weiterhin nur insgesamt 8,6 % an Cytosin-Nukleosiden über alle Schritte erzielt wurden.

Ein interessanter Nebenaspekt ist jedoch, dass diese kontinuierliche Reaktionsabfolge mehr Furanoside als Pyranoside bildet, eine separate Durchführung beider Schritte eine hohe Pyranose-Selektivität erzielte (Tabelle 1). Dieser Unterschied ist vermutlich auf den überschüssigen Harnstoff (**10**) zurückzuführen, da die Reaktionen unter ansonsten identischen Bedingungen durchgeführt wurden.

Da die Menge an zusätzlich gebildeten Nukleosiden durch den ersten Verbesserungsansatz nur marginal war, sollte ein weiterer Ansatz entwickelt werden. Hierzu wurde die Menge an verwendetem **10** im ersten Reaktionsschritt auf 1,0 Äq. reduziert, und eine geringere Ausbeute in diesem Schritt in Kauf genommen. Die negative Beeinflussung des zweiten Schrittes durch überschüssigen Harnstoff sollte somit vermieden werden. Zusätzlich wurde die Menge an verwendetem Zn^{2+} auch angepasst und von 1,0 Äq. auf 0,25 Äq. abgesenkt.

Wie erwartet sank im ersten Schritt die Ausbeute von **32** auf 21 %, während eine Gesamtmenge von 13,2 % an Cytidin-Nukleosiden und 1,6 % an Cytosin (**6**) über alle drei Schritte beobachtet werden konnte (Tabelle 3). Dies entspricht einer Umsetzung an 63 % **32** zu Cytidin-Nukleosiden.

Tabelle 3: Ergebnisse für die Verwendung von einem Äquivalent Harnstoff (**10**)

α - furano	β - pyrano	β - furano	α - pyrano	Gesamtausbeute Nukleoside	6	Cytosine
2,1 %	3,3 %	0,8 %	7,0 %	13,2 %	1,6 %	14,8 %

Die zuvor aufgestellte These, dass der überschüssige Harnstoff (**10**) sich negativ auf die Glykosidierung auswirkt, konnte durch dieses Experiment bestätigt werden, da sich durch die Reduzierung der Menge an **10** die Ausbeute an Cytidin-Nukleosiden deutlich erhöhen ließ. Allerdings zeigen die Ergebnisse in Tabelle 3 aber auch, dass der zuvor beobachtete Effekt auf das Isomerenverhältnis zwischen Furanose- und Pyranose-Isomeren nach der Reduzierung der Harnstoffmenge nicht mehr zu beobachten war. Daraus kann geschlossen werden, dass auch dieser Effekt, wie zuvor schon vermutet, auf den Einfluss des Harnstoffes zurückzuführen ist. Als Ergebnis kann festgehalten werden, dass durch die Reduzierung der Harnstoffmenge zwar mehr Nukleoside gebildet werden, die Menge an natürlich vorliegenden β -furan-Isomer sich allerdings insgesamt reduziert (2,1 % auf 0,8 %). Somit stellt sich die Frage, ob es eine optimale Harnstoffmenge gibt, und bei welcher Harnstoffmenge dieses Optimum vorliegt. Allerdings konnte diese Frage im Rahmen dieser Arbeit noch nicht beantwortet werden.

5.3.1.3 Zusammenfassung und Ausblick

In einer Apparatur aus Gestein, welche an Reaktionsmulden auf der frühen Erde angelehnt sein sollten, konnte die Synthese der Cytidin-Nukleoside über den in Kapitel 5.1 vorgestellten Syntheseweg, erfolgreich umgesetzt werden. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass unser Bildungsweg zur Cytidin-Synthese robust und auch ohne die klassischen inerten Laborreaktionsgefäße durchgeführt werden kann. Allerdings konnten die Ausbeuten und Selektivitäten noch nicht an die zuvor publizierten Resultate heranreichen, was an einer Vielzahl nicht optimierter Faktoren liegen kann.

Da die Gesteinsreaktionsgefäße nur von unten beheizt werden, liegt keine einheitliche Temperatur vor, sondern ein Temperaturgradient, welcher mit zunehmendem Abstand zur Heizplatte kälter wird. Zusätzlich macht es dieser Aufbau schwer eine Reaktion bei exakt derselben Temperatur zu wiederholen, was zu einer erschwerten Reproduzierbarkeit führt. Diese Einschränkung könnte allerdings leicht behoben werden, indem die Gesteinsreaktoren anstatt auf einer Heizplatte in einem Ofen platziert werden. Hierdurch sollte sich eine einheitliche Temperatur im gesamten Reaktionsgefäß einstellen.

Die Reaktionsmulden in den Gesteinen sind auf ihrer Grundfläche nicht eben, sondern von Vertiefungen und Erhöhungen beeinflusst. Dies führt dazu, dass sich die Produkte

der *dry down* Reaktionen nicht gleichmäßig auf der der Grundfläche anlagern, sondern hauptsächlich in den Mulden vorliegen und somit die Ausbildung einer homogenen Reaktionsmischung nicht gelingt. Dieses Problem könnte vermutlich durch Verwendung an größeren Mengen Startmaterial gelöst werden. Dies könnte aber zu längeren Reaktionszeiten führen, sodass für diese Reaktion das Schrägstellen der Reaktoren, so dass sich die Reaktionsmischung in einem Teil der Grundfläche sammeln kann, eine sinnvollere Lösung ist. Zusätzlich sollte das Schräg stellen in einem Ofen deutlich einfacher zu bewerkstelligen sein, als wenn der Gesteinsreaktor noch auf einer Heizplatte stehen muss.

Eine begrenzte Anzahl an Gesteinsreaktoren und die lange Reaktionsdauer des ersten Reaktionsschrittes reduzieren die Anzahl an Screening Möglichkeiten, wodurch Optimierungen sehr lange dauerten. Dieses Problem kann nur unter großem Material- und Ressourcenverbrauch gelöst werden, wodurch es sinnvoller scheint nicht allzu viele Faktoren zu optimieren, und sich auf die Publikation der generellen Durchführbarkeit und nicht auf die bestmögliche Optimierung zu konzentrieren.

Zusätzlich könnten mögliche Oxidationsschäden durch den vorliegenden Sauerstoff auftreten. Um diesen Faktor zu unterbinden, müsste der ganze Aufbau in eine Schutzgasbox überführt werden. Dieser Aufwand scheint unvernünftig in Anbetracht der Tatsache, dass bisher keine negativen Einflüsse durch Sauerstoff beobachtet worden sind.

Überdies könnten weitere Gesteine und Mineralien, entweder als Reaktionsgefäße oder als Pulverzusatz auf ihren Einfluss auf die Reaktion getestet werden. Zusätzlich könnten auch anderer Faktoren wie unter Kaptiel 5.1 nachzulesen auf diesen Ansatz optimiert werden.

Zusätzlich sollte auch untersucht werden, ob Harnstoff selektiv entfernen werden kann, z.B. durch selektives Ausfällen von 3-Ureaisoxazol (**32**), wie in Kapitel 5.1 beschrieben. Ein sinnvoller Unterschied wäre, dass Zn^{2+} durch Carbonatfällung schon aus der Lösung zu entfernen, und dann erst mit der Ausfällung **32** zu beginnen. Hierbei sollte **32** anhand seiner Löslichkeit und ohne die Möglichkeit, dass sich Zn-Komplexe ausbilden können, als erstes Produkt ausfallen.

Auch könnten noch andere Nukleosidbildungswege in den Gesteinsreaktoren durchgeführt werden, so dass diese nicht nur auf ein Nukleosid, nämlich Cytidin,

5.3.1 Reaktionen in Gesteinsreaktionsgefäßen

beschränkt sind. Hierbei wäre es natürlich besonders interessant die Purin-Bildung^[107, 108] zu implementieren, da somit sowohl Pyrimidine als auch Purine zugänglich wären, wodurch sich Watson-Crick Basenpaare ausbilden könnten.

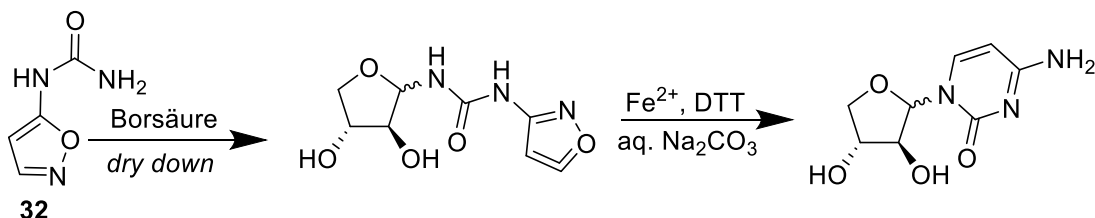
5.3.2 Synthese von Threose-Nukleosiden

5.3.2.1 Prolog

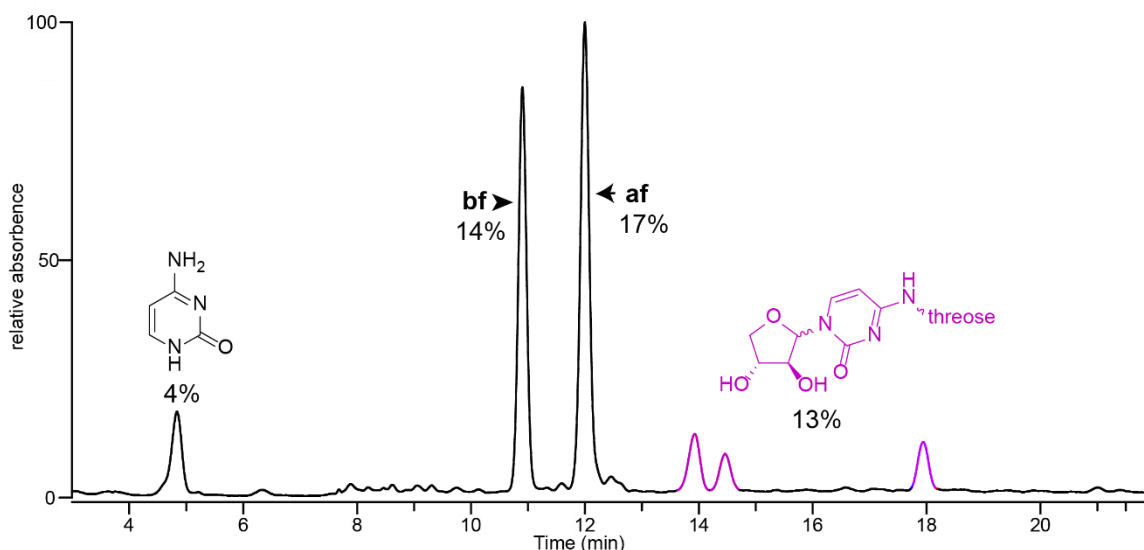
Wie in der Einleitung zur präbiotischen Synthese von Zuckern erwähnt, gibt es viele präbiotische Synthesen, welche zwar reine Ribose als Zucker verwenden, aber nicht auf diese beschränkt sind. So sollte, gezeigt werden, dass die im Punkt 5.1 gezeigten Pyrimidin Synthese auch mit anderen Zuckern durchgeführt werden kann. Hierfür wurde L-Threose (**22**) gewählt, weil auch **22** das Zuckergerüst einer Nukleinsäure aufbauen kann, welche die Fähigkeit zur Basenpaarung besitzt, die TNA.^[150, 151] Die TNA besitzt zudem auch katalytische Fähigkeiten^[152, 153], wobei noch unklar ist ob die Katalysefähigkeit mit der von RNA vergleichbar ist.^[154] Zusätzlich ist **22** als C4 Zucker einfacher aufgebaut als Ribose (**16**), dem C5 Zucker, und kann im Gegensatz zu **16** nur ein mögliches ringförmiges Halbacetal formen. Dies reduziert die Anzahl möglicher Stereoisomere von vier auf zwei.

5.3.2.2 Ergebnisse

In ersten Experimenten konnte gezeigt werden, dass die L-Threose (**22**) mit 3-Ureaisoxazol (**32**) zwei verschiedene Threose-Cytidine formen kann, nämlich das α - und das β -Isomer (Schema 7, Abbildung 20).



Schema 7: Reaktionsschema zur Bildung der Threose-Nukleoside



*Abbildung 20: LCMS Diagramm der Reaktion der Cytidin-Vorstufe mit L-Threose (**22**).*

Die Zuordnung der beiden Isomere erfolgte über die literaturbekannte^[155] Synthese eines Standards.

Die Analyse zeigte, dass 31% Nukleoside gebildet wurden, was eine deutlich geringere Ausbeute verglichen mit Ribose darstellt. Allerdings wurde diese Reaktion nicht weiter optimiert, sondern aufgrund der eingeschränkten kommerziellen Verfügbarkeit von **22** nur in geringer Anzahl durchgeführt. Besonderes Interesse erwecken die drei lila markierten Peaks (Abbildung 20), welche eine Masse besitzen, die einem Addukt von Cytosin mit

zwei Molekülen L-Threose (**22**) entsprechen. Allerdings wurde die Position des zweiten Moleküls Threose nicht aufgeklärt. Es wurde aber angenommen, dass dieses zweite Molekül **22** am wahrscheinlichsten am exocyclischen Amin des Threose-Nukleosides sitzt. Dieses Phänomen ließ sich für Ribose (**16**) in dieser Reaktion nicht beobachten, jedoch für die Reaktion von **16** mit den FaPys^[1, 156]. Hier zeigte sich, dass eine Verlängerung der Reaktionszeit zur Hydrolyse dieser Produkte zum zugehörigen Nukleosid führt und somit hier die Ausbeute an Threose-Nukleosiden durch Verlängerung der Reaktionszeit gesteigert werden könnte. Die geringe Menge an gebildetem Cytosin (**6**) zeigt, dass die Basenvorstufe sehr gut mit **22** reagiert und auch die glykosidische Bindung stabil ist, da ansonsten deutlich größere Mengen der freien Base gebildet worden wären.

Bei Reaktion des 3-Urea-isoxazols (**32**) mit anderen Zuckern (Xylose, Arabionse und Lyxose), zeigte sich zudem, dass diese Basenvorstufe mit allen Aldosen Nukleoside bildet. Hierbei konnte die richtige Anzahl an Isomeren mit der richtigen Masse bei LCMS Messungen beobachtet werden. Allerdings wurden hierfür keine Standards synthetisiert, sodass auch keine Ausbeute bestimmt werden konnten. Bei Reaktionen mit Ketosen (Ribulose (**20**), Sorbose und Fructose) konnte keine Nukelosidbildung detektiert werden. Dies ist besonders beachtlich, da der Hydroxyapatit katalysierte Bildungsweg für die Zuckersynthese^[70], welcher in der Einleitung in der präbiotischen Zuckersynthese erwähnt wird, neben Ribose nur Pento-ketosen ausbildet.

5.3.2.2 Zusammenfassung und Ausblick

Es konnte gezeigt werden, dass auch andere Zucker, welche basenpaarungsfähige Nukleinsäuren ausbilden können, über den Isoxazol-Syntheseweg auch Cytidin-Nukleoside bilden können. Auch konnte durch die Beschränkung auf Aldosen ein Selektionsvorteil für Ribose durch diesen Syntheseweg ausgemacht werden.

Aber für deutlichere Aussagen oder um die allgemeine Gültigkeit zu bestätigen, müssten noch viele weitere Untersuchungen durchgeführt werden. So müssten noch weitere Zucker untersucht werden, um die beobachteten Trends zu bestätigen. Auch müssten die Reaktionen optimiert werden und zusätzlich Standards synthetisiert werden, um die Peaks den Isomeren zuordnen zu können.

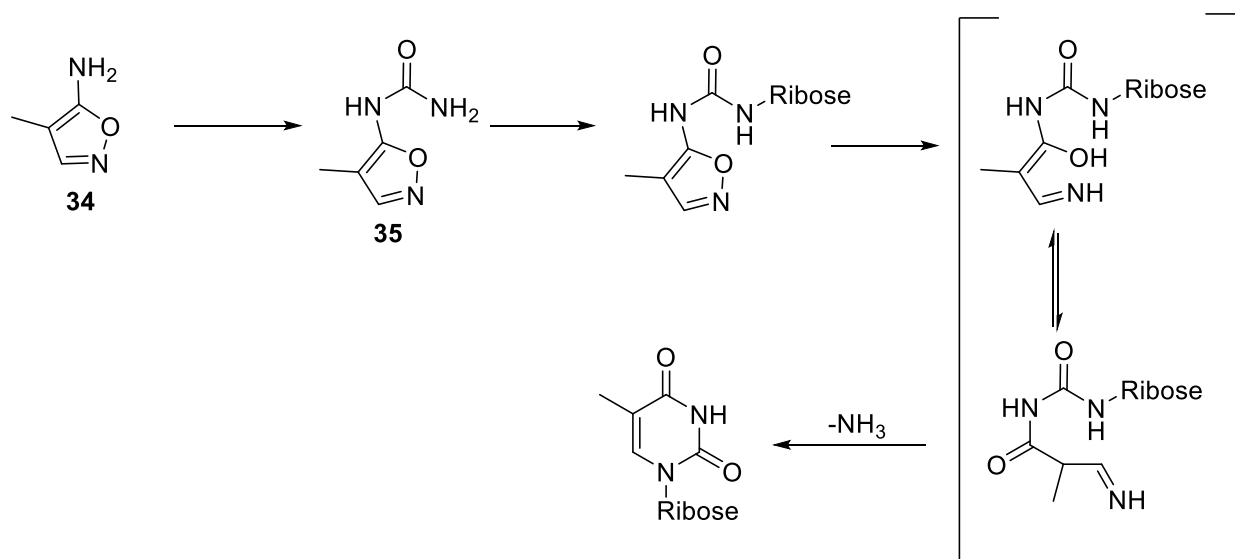
Auch sollten diese Reaktionen dann mit dem unter 5.2 erwähnten direkten Bildungsweg für Uridine durchgeführt werden. Zusätzlich sollten sie auf ihre Kompatibilität zur Purinbildung über die FaPy-Synthesewege untersucht werden, ob hierbei ähnliche oder doch konträre Ergebnisse beobachtet werden können.

Aber dieser Trend für die Cytidin-Synthese zeigt, dass der verwendete Zucker einen gewissen Einfluss auf die Ergebnisse hat. Dieser Einfluss wird allerdings bisher in den Erklärungsversuchen, warum Ribose als Zucker der Nukleinsäuren ausgewählt wurde, größtenteils vernachlässigt. Diese Untersuchungen könnten für die Zukunft noch einige Erkenntnisse liefern, warum gerade Ribose (**16**) als Zucker der Nukleinsäuren auserwählt wurde.

5.3.3 Entwicklung eines Reaktionspfads zur Synthese von Thymidin-Nukleosiden

5.3.3.1 Prolog

Da Thymin (**24**) als Base zwar nicht in RNA jedoch in DNA enthalten ist, stellt sich die Frage, ob **24** schon präbiotisch auf der frühen Erde gebildet oder erst später von Lebewesen erzeugt wurde. Obwohl es bereits eine präbiotische Synthese aus Uracil (**7**) gibt, welche über das 5-Hydroxymehtyluridine^[157] abläuft, wollten wir testen, ob die in Kapitel 5.1 und 5.2 erwähnten Pyrimidin-Bildungswege auch in leicht abgewandelter Form zur Synthese anderer Pyrimidine geeignet ist. Hierfür wurde zuerst einmal folgender Bildungsweg postuliert (Schema 8).



Schema 8: Postulierter Bildungsweg zur Thymidinsynthese.

Dieser Bildungsweg ist im Prinzip ähnlich aufgebaut wie der unter Kapitel 5.2 vorgestellte Weg für Uridin, nur dass anstatt 5-Aminoisoxazol (**33**) 4-Methyl-5-aminoisoxazol (**34**) als Startmaterial verwendet wurde. Der Bildungsweg schien realisierbar, da Literatur^[158] für nukleophile Reaktionen in Position 4 für 5-substituierte Isoxazole existiert.

Zur Durchführung dieses Syntheseweges mussten zunächst alle nicht umklammerten Strukturen (Schema 8) dieses Bildungswegs synthetisiert werden. Es wurde angenommen, dass dieser Reaktionspfad ausgehend von **34** analog zu den anderen Pyrimidinbildungswegen über Aminoisoxazole (Kapitel 5.1 und 5.2) durchführbar ist. Trotzdem sollten die dafür notwendigen Reaktionsschritte auf ihre präbiotische Plausibilität hin demonstriert werden, wie im Folgenden dargelegt wird.

5.3.3.2 Ergebnisse

In einem ersten Schritt galt es aus 4-Methyl-5-aminoisoxazol (**34**) das 4-Methyl-5-ureaisoxazol (**35**) herzustellen. Dies gelang auch unter Zn^{2+} Katalyse mit NaOCN in 13 % Ausbeute (Abbildung 21).

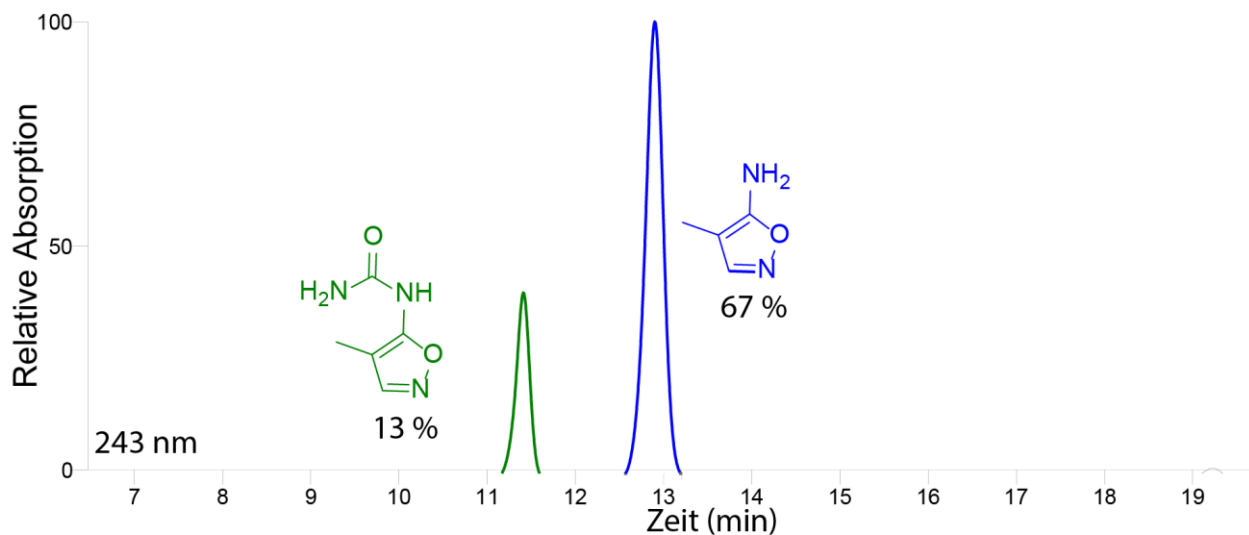


Abbildung 21: LCMS Diagramm der Reaktion von 4-Methyl-5-aminoisoxazol (**34**) (blau) zu 4-Methyl-5-ureaisoxazol (**35**) (grün).

Auch die Reaktion des Urea-Derivates mit Ribose (**16**) in einer *dry down* Reaktion mit Borsäure zeigte bei LCMS-Analysen die Bildung der vier möglichen Isomere mit der richtigen Masse, allerdings wurden bisher noch keine Kalibrierungsgeraden erstellt um die Ausbeuten zu bestimmen. Auch die reduktive Ringöffnung des im vorherigen Schritt erhaltenen Ribosids zum Thymin-Ribose-Nukleosid mit DTT unter Eisen(II)-Katalyse in einem Borat-Carbonatpuffer, konnte beobachtet werden. Wiederum konnten alle vier möglichen Isomere bei Analyse des LCMS-Diagramms identifiziert werden, wobei eine starke Selektivität für ein Isomer zu beobachten ist (Abbildung 22). Auch hier wurde bisher noch keine Kalibrierungsgerade zur Bestimmung der Ausbeute erstellt, da es bisher nicht gelungen ist **34** präbiotisch herzustellen. Alle Reaktionen wurden unter gleichen oder

ähnlichen Bedingungen wie im analogen Uridin-Bildungsweg unter Kapitel 5.2 durchgeführt.

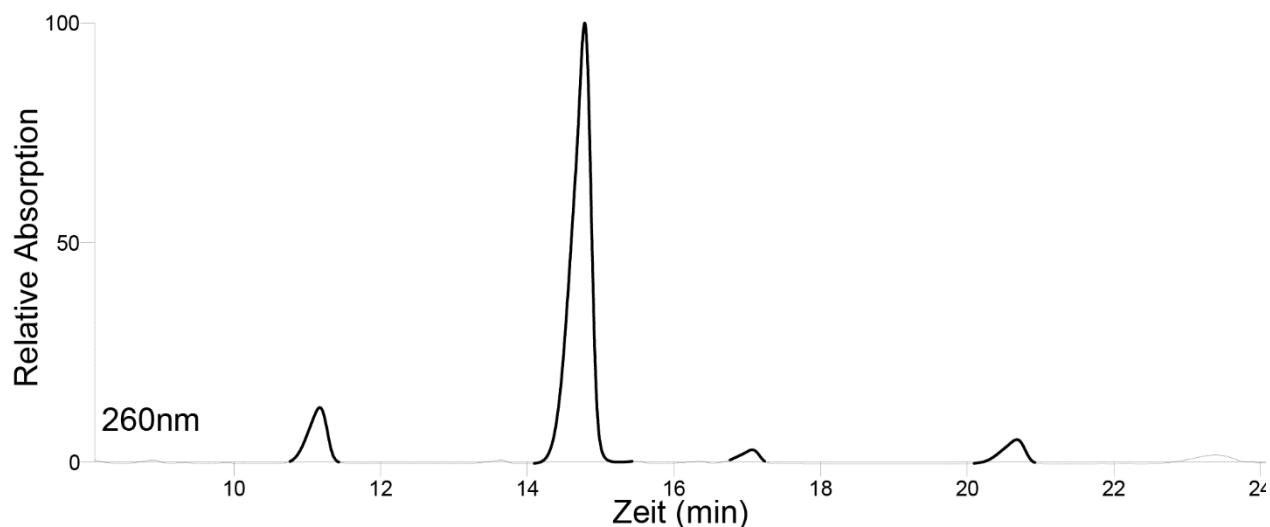


Abbildung 22: LCMS-Diagramms der Umwandlung zu Thymidin unter präbiotischen Bedingungen und Bildung der vier möglichen Isomere (hervorgehobene Peaks).

5.3.2.3 Zusammenfassung und Ausblick

Da es uns noch nicht gelungen ist, **34** präbiotisch herzustellen, wurde dieser Bildungsweg nicht weiter untersucht. Dennoch konnte gezeigt werden, dass jede im Anschluss notwendige Reaktion durchführbar ist. Somit würde ein präbiotischer Bildungsweg zur Synthese von Thymidin-Ribose Nukleosiden bereitstehen, sobald eine Synthese des Edukts vorliegt.

Allerdings sollte der Thymin-Weg sogar besser durchführbar sein als der analoge Bildungsweg für Uridine, da anzunehmen ist, dass das 4-Methyl-5-aminoisoxazol (**34**) potentiell nukleophiler ist als 5-Aminoisoxazol (**33**). Dies könnte ebenfalls erklären, weswegen das 4-Methyl-5-urea-Ribosid analog zum 3-Urea-Ribosid synthetisch hergestellt werden kann, was für das 5-Urea-Ribosid nicht gelungen ist. Bei dieser Synthese reagiert das verwendete Aminoisoxazol mit einem Zuckerisocyanat.

Aufgrund der hieraus abgeleiteten höheren Nukleophilie sollte der präbiotische Reaktionsschritt zur Bildung des Urea-Isoxazols besser funktionieren als im analogen Schritt des Uridin-Bildungsweges (Kapitel 5.2). Zusätzlich gilt es, die hohe Selektivität für

5.3.3 Entwicklung eines Reaktionspfads zur Synthese von Thymidin-Nukleosiden

eines der vier Thymidin-Isomer näher zu untersuchen und festzustellen, welches Isomer bevorzugt gebildet wird.

Aufgrund dieser Faktoren sollte die Suche nach einer präbiotischen Synthese für **34** intensiviert werden und sich hierbei nicht nur auf die Methylierung von **33** konzentriert werden. Die Synthese sollte auch analog der klassischen Synthese unter Anhang C des 4-Methyl-5-aminoisoxazols (**34**) ausgehend von 2-Methyl-cyanoacetaldehyd präbiotisch möglich sein. Somit wäre nur noch eine präbiotische Synthese für 2-Methyl-cyanoacetaldehyd notwendig.

6. Abkürzungsverzeichnis

a-f	=	α -furano
a-py	=	α -pyrano
A	=	Adenosin
Äq	=	Äquivalente
b-f	=	β -furano
b-py	=	β -pyrano
C	=	Cytosin
DCM	=	Dichlormethan
DNA	=	Desoxyribonukleinsäure
DTT	=	Dithioeritol
EtOH	=	Ethanol
FaPy	=	Formamidopyrimidin
G	=	Guanin
g	=	Gramm
HCN	=	Hydrogencyanid, Blausäure
HPLC	=	High Performance Liquid Chromathography
LCMS	=	Liquid Chromathography Mass Spectrometry
LUCA	=	Last universal common ancestor
MeCN	=	Acetonitril
MeOH	=	Methanol
mL	=	Milliliter
mmol	=	Millimol
RNA	=	Ribonukleinsäure
T	=	Thymin
THF	=	Tetrahydrofuran
TNA	=	Threosenukleinsäure
U	=	Uracil

UV = Ultraviolett

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Glasapparatur bestehend aus drei verschiedenen Reaktionsgefäßen, welche über Sandbäder erwärmt werden können. Durch Umlenken des Stickstoffflusses können Reaktionslösungen von einem Reaktionskolben in den nächsten befördert werden. Die Tropftrichter können zwischenzeitlichen Regen oder das geflutet werden eines Reaktionsortes simulieren.....	4
Abbildung 2: Bild der Gesteinsreaktoren aus Basalt (links) und aus Gneiss (rechts) mit Reaktionsmulden.	4
Abbildung 3: The glass apparatus for the synthesis consisting of three different reaction vessels which can be heated via sand baths. By changing the nitrogen flow, reaction solutions can be transported from one reaction vessel to the next. The dropping funnels can simulate intermediate rain or the flooding of a reaction pot.....	8
Abbildung 4: Picture of the reaction vessels made out of basalt (left) and gneiss (right).	8
Abbildung 5: Synthese der Purinbasen ausgehend von HCN oder einer NH ₄ CN Lösung.....	14
Abbildung 6: Reaktionsfolge zur Herstellung kanonischer und modifizierter Pyrimidin-Basen nach Carell. ^[47]	15
Abbildung 7: Struktur von Hydroxymethylen (rechts) und Formaldehyde (links).	16
Abbildung 8: Ursprünglicher postulierter Mechanismus der Glycolaldehyd katalysierten Formose Reaktion nach Breslow ^[49]	17
Abbildung 9: Hydroxylapatit katalysierte Reaktion von Formaldehyd (14 und (15 zu (19. Reaktion mit einem weiteren Äquivalent (15 ergibt die beiden Ketopentosen (20 und 21. Von diesen beiden Substanzen kann nur Ribulose zu einer Aldopentose isomerisieren, und auch nur selektiv zu Ribose (20%). Weitere Reaktionsprodukte sind Xylulose (11 %), Dihydroxyaceton (20 %), Glykolsäure (40 %) und Ribulose (8 %). ^[70]	19
Abbildung 10: Mechanismus der Zuckerverlängerung nach Sutherland. ^[74] Die Photoredoxschritte werden durch einen Cu(I)-Cu(II)-Mechanismus angetrieben. Als Reduktionsmittel dient ebenfalls 3, welches zu Dicyan oxidiert wird. Auch das einfachste mögliche Startmaterial Formaldehyd (14) kann durch Reduktion aus 3 gewonnen werden.....	20
Abbildung 11: Syntheseroute der Pyrimidinnukleoside nach Sutherland. Hierbei reagiert von den vier gebildeten Aminooxazolin-Isomer nur das Arabio-Isomer zu den Ribose-Nukleosiden. ^[95]	23
Abbildung 12: Synthese von Cytidin über 2-Thiocytidin nach Sutherland. ^[101]	25
Abbildung 13: Präbiotischer Bildungsweg der Purine nach Becker ^[1,107] über die Formamidopyrimidine 28.	26
Abbildung 14: Mechanismus zur Kohlenstoffkettenverlängerung von Hydroxynitrilen nach Sutherland. ^[114]	28
Abbildung 15: Reaktionsmulde eines Reaktors aus Basalt.....	61
Abbildung 16: Bild des Aufbaus der drei notwendigen Gesteinsreaktoren und wie sie nacheinander platziert wurden. Der Travertinreaktor mit den zwei nach unten führenden Schläuchen dient der Zugabe von Flüssigkeiten in die ersten beiden Reaktoren.	61
Abbildung 17: Ein schräg gestellter Gneiss-Reaktor.	62

Abbildung 18: LCMS Chromotogram der One-Pot Reaktion in Basalt für Schritt zwei und drei ausgehend von 32. Die grünen Peaks sind Uridine, welche durch Hydrolyse gebildet wurden. a-py, α -pyrano; b-py, β -pyrano; a-f, α -furano; b-f, β -furano..... **63**

Abbildung 19: Sequenzieller Reaktionsverlauf von 31 zu Cytidin-Nukleoside im Basaltreaktor..... **66**

Abbildung 20: LCMS Diagramm der Reaktion der Cytidin-Vorstufe mit L-Threose (22). **73**

Abbildung 21: LCMS Diagramm der Reaktion von 4-Methyl-5-aminoisoxazol (34) (blau) zu 4-Methyl-5-ureaisoxazol (35) (grün)..... **77**

Abbildung 22: LCMS-Diagramms der Umwandlung zu Thymidin unter präbiotischen Bedingungen und Bildung der vier möglichen Isomere (hervorgehobene Peaks). **78**

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ausbeuten für die Reaktion aus zu Cytidinnukleosiden für alle möglichen Isomere. Es ist jeweils der beste Ansatz in einem Basalt- und einem Gneiss-Reaktor aufgeführt.....	64
Tabelle 2: <i>Optimierung der Reaktionszeit für den ersten Schritt. Die Ausbeuten für die einzelnen Isomere, dann die Gesamtausbeute für Cytidin-Nukleoside. Die Ausbeute an Cytosin 6, dann die Gesamtausbeute an gebildeten Cytidinen und Cytosin(Cytosine).</i>	67
Tabelle 3: Ergebnisse für die Verwendung von einem Äquivalent Harnstoff (10).....	68

9. Schemataverzeichnis

Schema 1: Neuer Bildungsweg der Pyrimidine (unten) und der dazu kompatible Bildungsweg der Purine (oben).....	2
Schema 2: Bildungswege verschiedener Biomoleküle aus Aldehyden und Formaldehyd. Umklammerte Strukturen zeigen Zwischenprodukte, die direkt zum nächsten Produkt weiterreagieren konnten.	3
Schema 3: The new prebiotic synthesis pathway for pyrimidine nucleosides (bottom) and the compatible purin synthesis pathway (top).....	6
Schema 4: Formation pathways of various biomolecules from aldehydes and formaldehyde. Clapsed structures show intermediates in a One-Pot reaction to the next structure.....	7
Schema 5: Reaktionskaskade die in den Reaktionsgefäßen aus Gesteinen durchgeführt wurde.	60
Schema 6: One-pot optimierte Schritte zwei und drei der Cytidin-Synthese im Gesteinsreaktor.....	63
Schema 7: Reaktionsschema zur Bildung der Throse-Nukleoside	73
Schema 8: Postulierter Bildungsweg zur Thymidinsynthese.	76

10. Literaturverzeichnis

1. Becker, S.; Thoma, I.; Deutsch, A.; Gehrke, T.; Mayer, P.; Zipse, H.; Carell, T., A high-yielding, strictly regioselective prebiotic purine nucleoside formation pathway. *Science* **2016**, *352* (6287), 833-836.
2. Oparin, A. I., *The origin of life*. Courier Corporation: 2003.
3. Pagel, M., *Nature* **1999**, *401*, 877-884
4. Darwin, C., *On the Origin of Species (1988 Nachdruck)*. Harvard University Press: Cambridge, 1859.
5. Weiss, M. C.; Sousa, F. L.; Mrnjavac, N.; Neukirchen, S.; Roettger, M.; Nelson-Sathi, S.; Martin, W. F., The physiology and habitat of the last universal common ancestor. *Nat. Micobiol.* **2016**, *1*, 1-8.
6. Wade, N., Meet Luca, the ancestor of all living things. *The New York Times* **2016**, *25*.
7. Sutherland, J. D., Opinion: Studies on the origin of life—the end of the beginning. *Nat. Rev. Chem.* **2017**, *1*, 1-7.
8. Stark, B.; Kole, R.; Bowman, E.; Altman, S., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1978**, *75* (3717-3721).
9. Cech, T., *Biochem. Soc. Trans.* **2002**, *30*, 1162-1166.
10. Gilbert, W., *Nature* **1986**, *319*, 618.
11. Robertsen, M.; Joyce, G., *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **2012**, *4*, a003608.
12. Orgel, L. E., Evolution of the genetic apparatus. *Journal of molecular biology* **1968**, *38* (3), 381-393
13. Crick, F. H. C., The origin of the genetic code. *Journal of molecular biology* **1968**, *38* (3), 367-379.
14. Rich, A.; Kasha, M.; Pullman, B., *Biosci. Horiz. Eds. M. Kasha and B. Pullman, Academic Press, New York* **1962**, *103*.
15. Orgel, L., *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2004**, *39*, 99-123.
16. Gilbert, W., Origin of life: The RNA world. *nature* **1986**, *319*, 618-618.
17. Yoluç, Y.; Ammann, G.; Barraud, P.; Jora, M.; Limbach, P. A.; Motorin, Y.; Marchand, V.; Tisné, C.; Borland, K.; Kellner, S., Instrumental analysis of RNA modifications. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2021**, *56* (2), 178-204.
18. Wong, J., Origin of genetically encoded protein synthesis: a model based on selection for RNA peptidation. *Orig. Life Evol. Biosph.* **1991**, *21* (3), 165-176.
19. Di Giulio, M., Reflections on the origin of the genetic code: a hypothesis. *J. Theor. Biol.* **1998**, *191* (2), 191-196.
20. Grosjean, H.; Westhof, E., An integrated, structure-and energy-based view of the genetic code. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44* (17), 8020-8040.
21. Beenstock, J.; Sicheri, F., The structural and functional workings of KEOPS. *Nucleic Acids Res.* **2021**, *49* (19), 10818-10834
22. Shapiro, R., Prebiotic syntheses of the RNA bases: a critical analysis. *Orig Life Evol Biosph .* **1996**, *26* (3), 238-239.
23. Shapiro, R., *Planetary dreams: The quest to discover life beyond Earth*. 1999.
24. Shapiro, R., The homopolymer problem in the origin of life. *Orig Life Evol Biosph .* **2000**, *30*, 243-244.
25. Larralde, R.; Robertson, M. P.; Miller, S. L., Rates of decomposition of ribose and other sugars: implications for chemical evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92* (18), 8158-8160.
26. Eschenmoser, A., Etiology of potentially primordial biomolecular structures: from vitamin B12 to the nucleic acids and an inquiry into the chemistry of life's origin: a retrospective. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 12412-12472.

27. Eschenmoser, A., Chemistry of potentially prebiological natural products. *Orig. Life Evol. Biosph.* **1994**, *24*, 389-423.
28. Eschenmoser, A., Chemical etiology of nucleic acid structure. *Science* **1999**, *284* (5423), 2118-2124.
29. Joyce, G. F., The antiquity of RNA-based evolution. *Nature* **2002**, *418* (6894), 214-221.
30. Engelhart, A. E.; Hud, N. V., Primitive genetic polymers. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2010**, *2*, 1943-0264.
31. Dass, A. V.; Hickman-Lewis, K.; Brack, A.; Kee, T. P.; Westall, F., Stochastic prebiotic chemistry within realistic geological systems. *ChemistrySelect* **2016**, *1*, 4906-4926.
32. Trinks, U. P. Zur Chemie der Aminopyrimidine. ETH Zurich, 1987.
33. Oró, J., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1960**, *2*, 407-412.
34. Lohrmann, R., Formation of urea and guanidine by irradiation of ammonium cyanide. *J. Mol. Evol.* **1972**, *1*, 263-269.
35. Miller, S. L., A production of amino acids under possible primitive earth conditions. *Science* **1953**, *117*, 528-529.
36. Butlerow, A., Bildung einer zuckerartigen Substanz durch Synthese. *Justus Liebigs Annalen der Chemie* **1861**, *120*, 295-298.
37. Löb, W., Über das Verhalten des Formamids unter der Wirkung der stillen Entladung Ein Beitrag zur Frage der Stickstoff-Assimilation. *Chem. Ber.* **1913**, *46*, 684-697.
38. Löb, W., Studien über die chemische Wirkung der stillen elektrischen Entladung. *Z. Elektrochem. angew. phys. Chem.* **1906**, *12*, 282-312.
39. Oró, J., Comets and the formation of biochemical compounds on the primitive Earth. *Nature* **1961**, *190*, 389-390.
40. Oró, J.; Kimball, A. P., Synthesis of purines under possible primitive earth conditions: II. Purine intermediates from hydrogen cyanide. *Arch. Biochem. Biophys.* **1962**, *96* (2), 293-313.
41. Levy, M.; Miller, S. L.; Oró, J., Production of guanine from NH₄CN polymerizations. *J. Mol. Evol.* **1999**, *49*, 165-168.
42. Lowe, C. U.; Rees, M. W.; Markham, R., Synthesis of complex organic compounds from simple precursors: formation of amino-acids, amino-acid polymers, fatty acids and purines from ammonium cyanide. *Nature* **1963**, *199*, 219-222
43. Miyakawa, S.; Cleaves, H. J.; Miller, S. L., The cold origin of life: B. Implications based on pyrimidines and purines produced from frozen ammonium cyanide solutions. *Orig. Life Evol. Biosph.* **2002**, *32*, 209-218.
44. Sanchez, R.; Ferris, J.; Orgel, L., Cyanoacetylene in prebiotic synthesis. *Science* **1966**, *154*, 784-785.
45. Ferris, J. P.; Sanchez, R. A.; Orgel, L. E., Studies in prebiotic synthesis: III. Synthesis of pyrimidines from cyanoacetylene and cyanate. *J. Mol. Biol.* **1968**, *33*, 693-704
46. Robertson, M. P.; Miller, S. L., An efficient prebiotic synthesis of cytosine and uracil. *Nature* **1995**, *375*, 772-774.
47. Okamura, H.; Becker, S.; Tiede, N.; Wiedemann, S.; Feldmann, J.; Carell, T., A one-pot, water compatible synthesis of pyrimidine nucleobases under plausible prebiotic conditions. *Chem. Commun.* **2019**, *55*, 1939-1942.
48. Forsythe, J. G.; Yu, S. S.; Mamajanov, I.; Grover, M. A.; Krishnamurthy, R.; Fernández, F. M.; Hud, N. V., Ester-mediated amide bond formation driven by wet-dry cycles: A possible path to polypeptides on the prebiotic Earth. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 9871-9875.
49. Breslow, R., On the mechanism of the formose reaction. *Tetrahedron Lett.* **1959**, *1*, 22-26.
50. Eckhardt, A. K.; Linden, M. M.; Wende, R. C.; Bernhardt, B.; Schreiner, P. R., Gas-phase sugar formation using hydroxymethylene as the reactive formaldehyde isomer. *Nat. Chem.* **2018**, *10*, 1141-1147.
51. Feil, S., Hydroxymethylen. *Chem. Unserer Zeit.* **2008**, *42* (4), 252.

52. Schreiner, P. R.; Reisenauer, H. P.; Pickard Iv, F. C.; Simmonett, A. C.; Allen, W. D.; Mátyus, E.; Császár, A. G., Capture of hydroxymethylene and its fast disappearance through tunnelling. *Nature* **2008**, *453*, 906-909.
53. Harman, C. E.; Kasting, J. F.; Wolf, E. T., Atmospheric Production of Glycolaldehyde Under Hazy Prebiotic Conditions. *Orig. Life Evol. Biosph.* **2013**, *43*, 77-98.
54. Kim, H.-J.; Ricardo, A.; Illangkoon, H. I.; Kim, M. J.; Carrigan, M. A.; Frye, F.; Benner, S. A., Synthesis of carbohydrates in mineral-guided prebiotic cycles. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 9457-9468.
55. Ricardo, A.; Frye, F.; Carrigan, M. A.; Tipton, J. D.; Powell, D. H.; Benner, S. A., 2-Hydroxymethylboronate as a reagent to detect carbohydrates: Application to the analysis of the formose reaction. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 9503-9505.
56. Appayee, C.; Breslow, R., Deuterium studies reveal a new mechanism for the formose reaction involving hydride shifts. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 3720-3723.
57. Socha, R. F.; Weiss, A. H.; Sakharov, M. M., Autocatalysis in the formose reaction. *React. Kinet. Mech. Catal.* **1980**, *14*, 119-128.
58. Miller, S. L., The origins of life on the earth. *Concept of Modern biology series* **1974**.
59. Shapiro, R., Prebiotic ribose synthesis: a critical analysis. *Orig Life Evol Biosph* **1988**, *18*, 71-85.
60. Lambert, J. B.; Gurusamy-Thangavelu, S. A.; Ma, K., The silicate-mediated formose reaction: bottom-up synthesis of sugar silicates. *Science* **2010**, *327*, 984-986.
61. Pallmann, S.; Šteflová, J.; Haas, M.; Lamour, S.; Henß, A.; Trapp, O., Schreibersite: An effective catalyst in the formose reaction network. *New J. Phys.* **2018**, *20*, 055003.
62. Reid, C.; Orgel, L.; Ponnampereuma, C., *Nature* **1967**, *216*, 936.
63. Ricardo, A.; Carrigan, M.; Olcott, A.; Benner, S., Borate minerals stabilize ribose. *Science* **2004**, *303*, 196-196.
64. Furukawa, Y.; Kakegawa, T., Borate and the origin of RNA: a model for the precursors to life. *Elements* **2017**, *13*, 261-265.
65. Scorei, R., Is boron a prebiotic element? A mini-review of the essentiality of boron for the appearance of life on earth. *Orig Life Evol Biosph.* **2012**, *42*, 3-17.
66. Gardner, P. M.; Winzer, K.; Davis, B. G., Sugar synthesis in a protocellular model leads to a cell signalling response in bacteria. *Nat. Chem.* **2009**, *1*, 377-383.
67. Krishnamurthy, R.; Arrhenius, G.; Eschenmoser, A., Formation of glycolaldehyde phosphate from glycolaldehyde in aqueous solution. *Orig Life Evol Biosph* **1999**, *29*, 333-354.
68. Krishnamurthy, R.; Guntha, S.; Eschenmoser, A., Regioselective α -phosphorylation of aldoses in aqueous solution. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 2281-2285.
69. Mueller, D.; Pitsch, S.; Kittaka, A.; Wagner, E.; Wintner, C.; Eschenmoser, A., *Helv. Chim. Acta* **1990**, *73*, 1410-1468.
70. Usami, K.; Okamoto, A., Hydroxyapatite: Catalyst for a one-pot pentose formation. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 8888-8893.
71. Harsch, G.; Bauer, H.; Voelter, W., *Liebigs Ann. Chem.* **1984**, 623-635.
72. Kofoed, J.; Reymond, J.-L.; Darbre, T., Prebiotic carbohydrate synthesis: zinc-proline catalyzes direct aqueous aldol reactions of α -hydroxy aldehydes and ketones. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 1850-1855.
73. Benner, S. A.; Bell, E. A.; Biondi, E.; Brassler, R.; Carell, T.; Kim, H. J.; Mojzsis, S. J.; Omran, A.; Pasek, M. A.; Trail, D., When did life likely emerge on Earth in an RNA-first process? *ChemSystemsChem* **2020**, *2*, e1900035.
74. Ritson, D. J.; Sutherland, J. D., Synthesis of aldehydic ribonucleotide and amino acid precursors by photoredox chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 5845-5847.
75. Ritson, D.; Sutherland, J. D., Prebiotic synthesis of simple sugars by photoredox systems chemistry. *Nat. Chem.* **2012**, *4*, 895-899.

76. Islam, S.; Bučar, D.-K.; Powner, M. W., Prebiotic selection and assembly of proteinogenic amino acids and natural nucleotides from complex mixtures. *Nat. Chem.* **2017**, *9*, 584-589.
77. Meinert, C.; Myrgorodska, I.; De Marcellus, P.; Buhse, T.; Nahon, L.; Hoffmann, S. V.; d'Hendecourt, L. L. S.; Meierhenrich, U. J., Ribose and related sugars from ultraviolet irradiation of interstellar ice analogs. *Science* **2016**, *352*, 208-212.
78. Munoz Caro, G. M.; Meierhenrich, U. J.; Schutte, W. A.; Barbier, B.; Arcones Segovia, A.; Rosenbauer, H.; Thiemann, W.-P.; Brack, A.; Greenberg, J. M., Amino acids from ultraviolet irradiation of interstellar ice analogues. *Nature* **2002**, *416*, 403-406.
79. Sallembien, Q.; Bouteiller, L.; Crassous, J.; Raynal, M., Possible chemical and physical scenarios towards biological homochirality. *Chem. Soc. Rev.* **2022**.
80. Hazen, R. M.; Sverjensky, D. A., Cold Spring Harb. Perspect. Biol. *Biol* **2010**, *2*, a002162.
81. Lee, C.; Weber, J. M.; Rodriguez, L. E.; Sheppard, R. Y.; Barge, L. M.; Berger, E. L.; Burton, A. S., Chirality in Organic and Mineral Systems: A Review of Reactivity and Alteration Processes Relevant to Prebiotic Chemistry and Life Detection Missions. *Symmetry* **2022**, *14*, 460.
82. Yin, P.; Zhang, Z.-M.; Lv, H.; Li, T.; Haso, F.; Hu, L.; Zhang, B.; Bacsá, J.; Wei, Y.; Gao, Y., Chiral recognition and selection during the self-assembly process of protein-mimic macroanions. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 1-8
83. Blackmond, D. G., The origin of biological homochirality. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2010**, *2*, a002147.
84. Fuller, W.; Sanchez, R.; Orgel, L., *J. Mol. Biol.* **1972**, *67*, 25-33.
85. Fuller, W.; Sanchez, R.; Orgel, L., *J. Mol. Biol.* **1972**, *1*, 249-257.
86. Nam, I.; Lee, J. K.; Nam, H. G.; Zare, R. N., Abiotic production of sugar phosphates and uridine ribonucleoside in aqueous microdroplets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, 12396-12400.
87. Camici, M.; Sgarrella, F.; Ipata, P. L.; Mura, U., The standard gibbs free energy change of hydrolysis of α -d-ribose 1-phosphate. *Arch. Biochem. Biophys.* **1980**, *205*, 191-197.
88. Nam, I.; Nam, H. G.; Zare, R. N., Abiotic synthesis of purine and pyrimidine ribonucleosides in aqueous microdroplets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, 36-40.
89. Kim, H.-J.; Benner, S. A., Prebiotic stereoselective synthesis of purine and noncanonical pyrimidine nucleotide from nucleobases and phosphorylated carbohydrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, 11315-11320.
90. Bean, H. D.; Sheng, Y.; Collins, J. P.; Anet, F. A. L.; Leszczynski, J.; Hud, N. V., Formation of a β -pyrimidine nucleoside by a free pyrimidine base and ribose in a plausible prebiotic reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 9556-9557.
91. Kim, H.-J.; Kim, J., A prebiotic synthesis of canonical pyrimidine and purine ribonucleotides. *Astrobiology* **2019**, *19*, 669-674.
92. Saladino, R.; Bizzarri, B. M.; Botta, L.; Šponer, J.; Šponer, J. E.; Georgelin, T.; Jaber, M.; Rigaud, B.; Kapralov, M.; Timoshenko, G. N., Proton irradiation: a key to the challenge of N-glycosidic bond formation in a prebiotic context. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1-8.
93. Saladino, R.; Carota, E.; Botta, G.; Kapralov, M.; Timoshenko, G. N.; Rozanov, A. Y.; Krasavin, E.; Di Mauro, E., Meteorite-catalyzed syntheses of nucleosides and of other prebiotic compounds from formamide under proton irradiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2015**, *112*, E2746-E2755.
94. Sanchez, R. A.; Orgel, L. E., Studies in prebiotic synthesis: V. Synthesis and photoanomerization of pyrimidine nucleosides. *J. Mol. Biol.* **1970**, *47*, 531-543.
95. Powner, M.; Gerland, B.; Sutherland, J., *Nature* **2009**, *459*, 239-242.
96. Ingar, A. A.; Luke, R. W. A.; Hayter, B. R.; Sutherland, J. D., Synthesis of cytidine ribonucleotides by stepwise assembly of the heterocycle on a sugar phosphate. *ChemBioChem.* **2003**, *4*, 504-507.
97. Sutherland, J. D., The origin of life—out of the blue. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55* (1), 104-121.

98. Benner, S. A.; Kim, H.-J.; Yang, Z., Setting the stage: the history, chemistry, and geobiology behind RNA. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **2012**, *4*, a003541.
99. Keefe, A. D.; Miller, S. L., Are polyphosphates or phosphate esters prebiotic reagents? *J. Mol. Evol.* **1995**, *41*, 693-702.
100. Ritson, D. J.; Mojzsis, S. J.; Sutherland, J., Supply of phosphate to early Earth by photogeochemistry after meteoritic weathering. *Nat. Geosci.* **2020**, *13*, 344-348.
101. Xu, J.; Tsanakopoulou, M.; Magnani, C. J.; Szabla, R.; Šponer, J. E.; Šponer, J.; Góra, R. W.; Sutherland, J. D., A prebiotically plausible synthesis of pyrimidine β -ribonucleosides and their phosphate derivatives involving photoanomerization. *Nat. Chem.* **2017**, *9*, 303-309.
102. Fernández-García, C.; Grefenstette, N. M.; Powner, M. W., Selective aqueous acetylation controls the photoanomerization of α -cytidine-5'-phosphate. *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 4850-4853.
103. Powner, M. W.; Sutherland, J. D.; Szostak, J. W., Chemoselective multicomponent one-pot assembly of purine precursors in water. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 16677-16688.
104. Stairs, S.; Nikmal, A.; Bučar, D.-K.; Zheng, S.-L.; Szostak, J. W.; Powner, M. W., Divergent prebiotic synthesis of pyrimidine and 8-oxo-purine ribonucleotides. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 1-12.
105. Xu, J.; Chmela, V.; Green, N. J.; Russell, D. A.; Janicki, M. J.; Góra, R. W.; Szabla, R.; Bond, A. D.; Sutherland, J. D., Selective prebiotic formation of RNA pyrimidine and DNA purine nucleosides. *Nature* **2020**, *582*, 60-66.
106. Traube, W., Ueber eine neue Synthese des Guanins und Xanthins. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1900**, *33*, 1371-1383.
107. Becker, S.; Schneider, C.; Okamura, H.; Crisp, A.; Amatov, T.; Dejmek, M.; Carell, T., *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 163-172.
108. Becker, S.; Feldmann, J.; Wiedemann, S.; Okamura, H.; Schneider, C.; Iwan, K.; Crisp, A.; Rossa, M.; Amatov, T.; Carell, T., Unified prebiotically plausible synthesis of pyrimidine and purine RNA ribonucleotides. *Science* **2019**, *366*, 76-82.
109. Miller, S. L., Production of some organic compounds under possible primitive earth conditions1. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 2351-2361.
110. Miller, S. L.; Urey, H. C., Organic compound synthesis on the primitive Earth: Several questions about the origin of life have been answered, but much remains to be studied. *Science* **1959**, *130*, 245-251.
111. Strecker, A., Ueber einen neuen aus Aldehyd-Ammoniak und Blausäure entstehenden Körper. *Liebigs Ann.* **1854**, *91*, 349-351.
112. Cleaves, H. J.; Chalmers, J. H.; Lazcano, A.; Miller, S. L.; Bada, J. L., A reassessment of prebiotic organic synthesis in neutral planetary atmospheres. *Orig. Life Evol. Biosph.* **2008**, *38*, 105-115.
113. Foden, C. S.; Islam, S.; Fernández-García, C.; Maugeri, L.; Sheppard, T. D.; Powner, M. W., Prebiotic synthesis of cysteine peptides that catalyze peptide ligation in neutral water. *Science* **2020**, *370*, 865-869.
114. Patel, B. H.; Percivalle, C.; Ritson, D. J.; Duffy, C. D.; Sutherland, J. D., Common origins of RNA, protein and lipid precursors in a cyanosulfidic protometabolism. *Nat. Chem.* **2015**, *7*, 301-307.
115. Kasting, J. F., Earth's early atmosphere. *Science* **1993**, *259*, 920-926.
116. Trail, D.; Watson, E. B.; Tailby, N. D., The oxidation state of Hadean magmas and implications for early Earth's atmosphere. *Nature* **2011**, *480*, 79-82.
117. Wade, J.; Wood, B., Core formation and the oxidation state of the Earth. *Earth Planet. Sci. Lett.* **2005**, *236*, 78-95.
118. Canup, R. M.; Asphaug, E., Origin of the Moon in a giant impact near the end of the Earth's formation. *Nature* **2001**, *412*, 708-712.
119. Kitadai, N.; Maruyama, S., Origins of building blocks of life: A review. *Geosci. Front.* **2018**, *9*, 1117-1153.

120. Leslie E, O., Prebiotic chemistry and the origin of the RNA world. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2004**, *39*, 99-123.
121. Oro, J., *Nature* **1961**, *191*, 1193-1194.
122. Chyba, C.; Sagan, C., Endogenous production, exogenous delivery and impact-shock synthesis of organic molecules: an inventory for the origins of life. *Nature* **1992**, *355*, 125-132.
123. Cooper, G.; Kimmich, N.; Belisle, W.; Sarinana, J.; Brabham, K.; Garrel, L., Carbonaceous meteorites as a source of sugar-related organic compounds for the early Earth. *Nature* **2001**, *414*, 879-883.
124. Rivilla, V. M.; Martín-Pintado, J.; Jiménez-Serra, I.; Martín, S.; Rodríguez-Almeida, L. F.; Requena-Torres, M. A.; Rico-Villas, F.; Zeng, S.; Briones, C., Prebiotic precursors of the primordial RNA world in space: Detection of NH₂OH. *Astrophys. J. Lett.* **2020**, *899*, L28.
125. Marchi, S.; Bottke, W. F.; Elkins-Tanton, L. T.; Bierhaus, M.; Wuennemann, K.; Morbidelli, A.; Kring, D. A., Widespread mixing and burial of Earth's Hadean crust by asteroid impacts. *Nature* **2014**, *511*, 578-582.
126. Mukhin, L. M.; Gerasimov, M. V.; Safonova, E. N., Origin of precursors of organic molecules during evaporation of meteorites and mafic terrestrial rocks. *Nature* **1989**, *340*, 46-48.
127. Bottke, W. F.; Norman, M. D., The late heavy bombardment. *Annu. Rev. Earth Planet. Sci.* **2017**, *45*, 619-647.
128. Genda, H.; Iizuka, T.; Sasaki, T.; Ueno, Y.; Ikoma, M., Ejection of iron-bearing giant-impact fragments and the dynamical and geochemical influence of the fragment re-accretion. *Earth Planet. Sci. Lett.* **2017**, *470*, 87-95.
129. Parkos, D.; Pikus, A.; Alexeenko, A.; Melosh, H. J., HCN production via impact ejecta reentry during the late heavy bombardment. *J. Geophys. Res. Planets* **2018**, *123*, 892-909.
130. Day, J. M. D.; Brandon, A. D.; Walker, R. J., Highly siderophile elements in Earth, Mars, the Moon, and asteroids. *Rev. Mineral Geochem.* **2016**, *81*, 161-238.
131. Rubie, D. C.; Laurenz, V.; Jacobson, S. A.; Morbidelli, A.; Palme, H.; Vogel, A. K.; Frost, D. J., Highly siderophile elements were stripped from Earth's mantle by iron sulfide segregation. *Science* **2016**, *353*, 1141-1144.
132. Bottke, W. F.; Vokrouhlický, D.; Marchi, S.; Swindle, T.; Scott, E. R. D.; Weirich, J. R.; Levison, H., Dating the Moon-forming impact event with asteroidal meteorites. *Science* **2015**, *348*, 321-323.
133. Bottke, W. F.; Walker, R. J.; Day, J. M. D.; Nesvorný, D.; Elkins-Tanton, L., Stochastic late accretion to Earth, the Moon, and Mars. *science* **2010**, *330*, 1527-1530.
134. Genda, H.; Brasser, R.; Mojzsis, S., The terrestrial late veneer from core disruption of a lunar-sized impactor. *Earth Planet. Sci. Lett.* **2017**, *480*, 25-32.
135. Wood, B. J.; Halliday, A. N., The lead isotopic age of the Earth can be explained by core formation alone. *Nature* **2010**, *465*, 767-770.
136. Kleine, T.; Rudge, J. F., Chronometry of meteorites and the formation of the Earth and Moon. *Elements* **2011**, *7*, 41-46.
137. Schlichting, H. E.; Ofek, E. O.; Nelan, E. P.; Gal-Yam, A.; Wenz, M.; Muirhead, P.; Javanfar, N.; Livio, M., Measuring the abundance of sub-kilometer-sized Kuiper belt objects using stellar occultations. *Astrophys. J.* **2012**, *761*, 150.
138. Kraus, R. G.; Root, S.; Lemke, R. W.; Stewart, S. T.; Jacobsen, S. B.; Mattsson, T. R., Impact vaporization of planetesimal cores in the late stages of planet formation. *Nat. Geosci.* **2015**, *8*, 269-272.
139. Day, J. M. D.; Walker, R. J., Highly siderophile element depletion in the Moon. *Earth Planet. Sci. Lett.* **2015**, *423*, 114-124.
140. Hamano, K.; Abe, Y.; Genda, H., Emergence of two types of terrestrial planet on solidification of magma ocean. *Nature* **2013**, *497*, 607-610.

141. Kawai, J.; McLendon, D. C.; Kim, H.-J.; Benner, S., Hydroxymethanesulfonate from Volcanic Sulfur Dioxide: A "Mineral" Reservoir for Formaldehyde and Other Simple Carbohydrates in Prebiotic Chemistry. *Astrobiology* **2019**, *19*, 506-516.
142. Zahnle, K. J., Earth's earliest atmosphere. *Elements* **2006**, *2*, 217-222.
143. Lyons, J. R.; Manning, C.; Nimmo, F., Formation of methane on Mars by fluid-rock interaction in the crust. *Geophys. Res. Lett.* **2005**, *32*.
144. Tian, F.; Kasting, J.; Zahnle, K., Revisiting HCN formation in Earth's early atmosphere. *Earth Planet. Sci. Lett.* **2011**, *308*, 417-423.
145. Zahnle, K. J., Photochemistry of methane and the formation of hydrocyanic acid (HCN) in the Earth's early atmosphere. *J. Geophys. Res. Atmos.* **1986**, *91*, 2819-2834.
146. Keefe, A. D.; Miller, S. L., Was ferrocyanide a prebiotic reagent? *Orig. Life Evol. Biosph.* **1996**, *26*, 111-129.
147. Sasselov, D. D.; Grotzinger, J. P.; Sutherland, J. D., The origin of life as a planetary phenomenon. *Sci. Adv.* **2020**, *6*, eaax3419.
148. Xu, J.; Ritson, D. J.; Ranjan, S.; Todd, Z. R.; Sasselov, D. D.; Sutherland, J. D., Photochemical reductive homologation of hydrogen cyanide using sulfite and ferrocyanide. *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 5566-5569.
149. Tatsumi, Y., Migration of fluid phases and genesis of basalt magmas in subduction zones. *J. Geophys. Res. Solid Earth.* **1989**, *94*, 4697-4707.
150. Eschenmoser, A., The TNA-family of nucleic acid systems: properties and prospects. *Orig. Life Evol. Biosph.* **2004**, *34*, 277-306.
151. Schöning, K. U.; Scholz, P.; Wu, X.; Guntha, S.; Delgado, G.; Krishnamurthy, R.; Eschenmoser, A., The α -L-Threofuranosyl-(3'→2')-oligonucleotide System ('TNA'): Synthesis and Pairing Properties. *Helv. Chim. Acta* **2002**, *85*, 4111-4153.
152. Wang, Y.; Wang, Y.; Song, D.; Sun, X.; Li, Z.; Chen, J.-Y.; Yu, H., An RNA-cleaving threose nucleic acid enzyme capable of single point mutation discrimination. *Nat. Chem.* **2021**, 1-10.
153. Wang, Y.; Wang, Y.; Song, D.; Sun, X.; Zhang, Z.; Li, X.; Li, Z.; Yu, H., A threose nucleic acid enzyme with RNA ligase activity. *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143*, 8154-8163.
154. Chen, X.; Li, N.; Ellington, A. D., Ribozyme catalysis of metabolism in the RNA world. *Chem. Biodivers.* **2007**, *4*, 633-655.
155. Sau, S. P.; Fahmi, N. E.; Liao, J.-Y.; Bala, S.; Chaput, J. C., A scalable synthesis of α -L-threose nucleic acid monomers. *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 2302-2307.
156. Becker, S.; Schneider, C.; Okamura, H.; Crisp, A.; Amatov, T.; Dejmek, M.; Carell, T., Wet-dry cycles enable the parallel origin of canonical and non-canonical nucleosides by continuous synthesis. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 1-9.
157. Robertson, M. P.; Miller, S. L., Prebiotic synthesis of 5-substituted uracils: a bridge between the RNA world and the DNA-protein world. *Science* **1995**, *268*, 702-705.
158. Hamama, W. S.; Ibrahim, M. E.; Zoorob, H. H., Synthesis and biological evaluation of some novel isoxazole derivatives. *J. Heterocycl. Chem.* **2017**, *54*, 341-346.

11. Anhänge

Anhang A: Supporting Information zu Kapitel 5.1

Anhang B: Supporting Information zu Kapitel 5.2

Anhang C: Experimental Teil zu Kapitel 5.3 (Unveröffentlichte Ergebnisse)

Anhang A



Supplementary Materials for
**Unified prebiotically plausible synthesis of pyrimidine and purine RNA
ribonucleotides**

Sidney Becker*, Jonas Feldmann*, Stefan Wiedemann*, Hidenori Okamura,
Christina Schneider, Katharina Iwan, Antony Crisp, Martin Rossa, Tynchtyk Amatov,
Thomas Carell†

*These authors contributed equally to this work.

†Corresponding author. Email: thomas.carell@lmu.de

Published 4 October 2019, *Science* **366**, 76 (2019)
DOI: 10.1126/science.aax2747

This PDF file includes:

Materials and Methods
Figs. S1 to S13
References

Materials and Methods

General Information

Chemicals were purchased from Sigma-Aldrich, Fluka, ABCR, Carbosynth, TCI or Acros organics and used without further purification. The solvents were of reagent grade or purified by distillation. Chromatographic purification of products was accomplished using flash column chromatography on Merck Geduran Si 60 (40-63 μm) silica gel (normal phase). ^1H - and ^{13}C -NMR spectra were recorded on Varian Oxford 200, Bruker ARX 300, Varian VXR400S, Varian Inova 400, Bruker AMX 600 and Bruker AVIIIHD 400 spectrometers and calibrated to the residual solvent peak. Multiplicities are abbreviated as follows: s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, m = multiplet, br = broad. High-resolution ESI spectra were obtained on the mass spectrometer Thermo Finnigan LTQ FT-ICR. IR measurements were performed on Perkin Elmer Spectrum BX FT-IR spectrometer with a diamond-ATR (Attenuated Total Reflection) setup. Melting points were measured on a Büchi B-540 device. For preparative HPLC purification a Waters 1525 binary HPLC Pump in combination with a Waters 2487 Dual Absorbance Detector was used, with a Nucleosil 100-7 C18 reversed phase column. The prebiotic reactions were analyzed by LC-ESI-MS on a Thermo Finnigan LTQ Orbitrap XL and were chromatographed by a Dionex Ultimate 3000 HPLC system. All chromatographic separations except for nucleotides were performed on an Interchim Uptisphere120 3HDO C18 column with a flow of 0.15 ml/min and a constant column temperature of 30 °C. Eluting buffers were buffer A (2 mM HCOONH_4 in H_2O (pH 5.5)) and buffer B (2 mM HCOONH_4 in $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ 20/80 (pH 5.5)). The gradient for isoxazole containing compounds and pyrimidine nucleosides was 0 \rightarrow 20 min, 0% \rightarrow 4% buffer B. The gradient for purine nucleosides was 0 \rightarrow 45 min, 0% \rightarrow 15% buffer B. Chromatographic separation for nucleotides were performed on a YMC-Triart C18 column with a flow of 0.20 ml/min and a constant column temperature of 40 °C. Eluting buffers were buffer A (10 mM NH_4HCO_3 and 5 mM dibutylamine in H_2O (pH 9.1)) and buffer B (MeCN). The gradient was 0 \rightarrow 10 min, 0% \rightarrow 20%; 10 \rightarrow 20 min, 20% \rightarrow 20% buffer B. The elution was monitored at 223 nm and 260 nm (Dionex Ultimate 3000 Diode Array Detector). The chromatographic eluent was directly injected into the ion source without prior splitting. Ions were scanned by use of a positive polarity mode over a full-scan range of m/z 80-500 with a resolution of 30000. Nucleotides were scanned by use of a negative polarity mode over a full-scan range of m/z 120-1000 with a resolution of 30000. The synthetic standards for the co-injection experiments were synthesized in our lab (see synthetic procedures or according to reported literature (6)) or purchased. XRD measurements were performed on a STOE powder diffractometer in transmission geometry ($\text{Cu-K}\alpha 1$, $\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$) with a step size of $2^\circ 2\theta$ (30 seconds per step) and equipped with a position-sensitive Mythen-1K detector. The X-ray intensity data was measured at a temperature of 100 K on a Bruker D8 Venture TXS system equipped with a multilayer mirror optics monochromator and a Mo $\text{K}\alpha$ rotating-anode X-ray tube ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$). The frames were integrated with the Bruker SAINT software package using a narrow-frame algorithm. Data were corrected for absorption effects using the Multi-Scan method (SADABS). The structures were solved and refined using the Bruker SHELXTL software package.

Degradase digestion

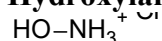
Isolated nucleotides in 42 μL H_2O were digested as follows: 10X DNA Degradase™ Reaction Buffer (5 μL), together with 8 U DNA Degradase Plus™ (2 μL , Zymo Research) and 3.5 U of Benzonase® Nuclease (1 μL , Merck, purity >90%) was added and the mixture was incubated at 37 °C for 2 h. The sample was directly analysed by LC-MS according to the general information.

Apyrase digestion

Isolated nucleotides in 17.6 μL H_2O were digested as follows: 10X Apyrase reaction buffer (2 μL , NEB) was added together with 0.2 U of apyrase (0.4 μL , NEB). The mixture was incubated at 30 °C for 2 h. The sample was directly analysed by LC-MS according to the general information.

Synthetic Procedures

Hydroxylammonium chloride (2)

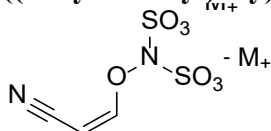


A solution of potassium hydroxylamine disulfonate **6** (269 mg, 1.00 mmol, 1.0 eq) (**28**) in 100 mM aq. HCl (10 mL) was shaken at 850 rpm and 90 °C for 2 h in an Eppendorf ThermoMixer®. The reaction mixture was treated with BaCl_2 (489 mg, 2.00 mmol, 2.0 eq) and left for 5 min at 90 °C to precipitate the formed sulfates. The resulting suspension was filtered, and the filtrate was lyophilized to afford a white residue, which was extracted with EtOH (3 x 5 mL). After removing the solvent *in vacuo*, hydroxylammonium chloride **2** was identified *via* ^1H -NMR (Fig. S1).

Note: Under neutral conditions, hydrolysis of hydroxylamine disulfonate proceeds over a much longer period of time (**28**, **44**).

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 10.32 (s, 3H), 10.11 (s, 1H).

((2-Cyanovinyl)oxy)(sulfonato)sulfamate (7) *via* hydroxylamine disulfonate (6)



Prebiotically from SO_2 and NO_2 :

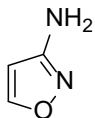
NaNO_2 (2.76 g, 40.0 mmol, 1.0 eq) and $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (4.18 g, 22.0 mmol, 0.55 eq) were dissolved in H_2O (150 mL). SO_2 was passed through the solution under stirring, while the temperature increased from 25 °C to about 35 °C. When a pH of 3 was reached, the gas injection was stopped and 700 μL of the reaction mixture were transferred into a microcentrifuge tube. After the successive addition of aq. Na_2CO_3 (300 μL , 1 M) and cyanoacetylene (6.26 μL , 100 μmol), the mixture was shaken at 25 °C and 850 rpm for 60 min in an Eppendorf ThermoMixer®. For quantification, a sample of 100 μL was treated with aq. 14.3 mM NaOAc (350 μL , as internal standard) and D_2O (50 μL). NMR spectroscopy (Fig. S2a) revealed the formation of (Z)-((2-cyanovinyl)oxy)(sulfonato)-sulfamate (**7**, 88%).

From hydroxylamine disulfonate:

To a solution of Na₂CO₃ (106 mg, 1.00 mmol, 2.2 eq.) and **6** (121 mg, 450 μmol, 1.0 eq) in H₂O (5 mL) was added cyanoacetylene (31.3 μL, 500 μmol, 1.1 eq.). The mixture was shaken at 25 °C and 850 rpm for 40 min in an Eppendorf ThermoMixer®. The mixture was neutralized with aq. 2 M HCl (500 μL) and lyophilized to obtain crude (*Z*)-((2-cyanovinyl)oxy)(sulfonato)sulfamate (**7**) as identified *via* NMR (Fig. S2b). Note: Compound **6** was synthesized according to literature (28).

¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 7.38 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 4.91 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H). ¹³C NMR (101 MHz, D₂O) δ 160.35, 115.47, 74.52. HRMS (ESI-): calc.: [C₃H₃N₂O₇S₂]⁻ 242.9387, found: 242.9386 [M-H]⁻.

General procedure for the formation of 3-aminoisoxazole (**4**) under prebiotic conditions



From hydroxyurea:

To a mixture of a divalent metal salt (13.6 mg ZnCl₂ or 23.8 mg CoCl₂ · 6 H₂O, 100 μmol, 1.0 eq.), Na₂CO₃ (42.4 mg, 400 μmol, 4.0 eq.), urea (24.0 mg, 400 μmol, 4.0 eq.), hydroxyurea (8.0 mg, 105 μmol, 1.1 eq.) in H₂O (1 mL) was added cyanoacetylene (6.26 μL, 100 μmol, 1.0 eq.). The mixture was shaken at 25 °C and 850 rpm for 2 h in an Eppendorf ThermoMixer®. A sample (10 μL) was taken and diluted with H₂O (990 μL) to 1 mL for LC-MS analysis (5 μL injection volume). Compound **4** was formed in 88% (Zn²⁺) and 83% (Co²⁺) yield, respectively. The yield was determined by LC-MS measurement with the calibration curve prepared using commercially available 3-aminoisoxazole. For the confirmation of the structural integrity, the reaction mixture was extracted with diethylether, dried over MgSO₄, concentrated and the crude residue purified by flash column chromatography (CH₂Cl₂:MeOH = 20:1). The NMR spectrum of the isolated compound was identical to that of a commercial sample.

From SO₂ and NO₂⁻:

NaNO₂ (2.76 g, 40.0 mmol, 1.0 eq) and Na₂S₂O₅ (4.18 g, 22.0 mmol, 0.55 eq) were dissolved in H₂O (150 mL). SO₂ was passed through the solution under stirring, while the temperature increased from 25 °C to about 35 °C. When a pH of 3 was reached, the gas injection was stopped and 700 μL of the reaction mixture were transferred into a microcentrifuge tube. After the successive addition of aq. Na₂CO₃ (300 μL, 1 M) and cyanoacetylene (6.26 μL, 100 μmol), the mixture was shaken at 25 °C and 850 rpm for 60 min in an Eppendorf ThermoMixer®. To accelerate hydrolysis (**44**), 900 μL of the reaction mixture were acidified with aq. conc. HCl (100 μL) and shaken at 50 °C and 850 rpm for 60 min in an Eppendorf ThermoMixer®. Compound **4** was formed in 63% yield. The yield was determined by LC-MS measurement with the calibration curve prepared using commercially available 3-aminoisoxazole.

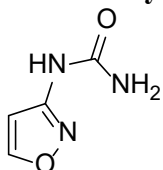
From hydroxylamine:

To a mixture of ZnCl₂ (6.8 mg, 50 μmol, 0.5 eq), Na₂CO₃ (26.5 mg, 250 μmol, 2.5 eq), urea (12.0 mg, 200 μmol, 2.0 eq), 40% wt hydroxylamine (6.32 μL, 0.105 mmol, 1.1 eq) in H₂O (1 mL) was added cyanoacetylene (6.26 μL, 100 μmol, 1.0 eq). The mixture

was shaken at 25 °C and 850 rpm for 3.5 h in an Eppendorf ThermoMixer®. A sample (10 µL) was taken and diluted with H₂O (990 µL) to 1 mL for LC-MS analysis (5 µL injection volume). Compound **4** was formed in 17% yield. The yield was determined by LC-MS measurement with the calibration curve prepared using commercially available 3-aminoisoxazole.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.32 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H, HC5), 5.88 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H, HC4), 5.57 (s, 2H, NH₂). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 163.76 (C5), 158.73 (C3), 97.71 (C4).

***N*-isoxazolyl-urea (**8**)**



Prebiotic Synthesis from **4**:

To a solution of urea (120 mg, 2.00 mmol, 4.0 eq.) and a divalent metal salt (68 mg ZnCl₂ or 119 mg CoCl₂ · 6 H₂O; 0.5 mmol, 1.0 eq.) in H₂O (500 µL) was added 3-aminoisoxazole (36.9 µL, 500 µmol, 1.0 eq.). The mixture was shaken at 850 rpm and 95 °C for 2 d in an Eppendorf ThermoMixer® open to the air to allow water to evaporate. The resulting residue was dissolved in H₂O to a final volume of 1 mL. A sample (10 µL) was taken and diluted with H₂O (2000 x) for LC-MS analysis (5 µL injection volume). Compound **8** was formed in 88% (Zn²⁺), 68% (Co²⁺) and 25% (no metal) yield, respectively. The yield was determined by LC-MS measurement with the calibration curve prepared using synthetic *N*-isoxazolyl-urea.

For prebiotic enrichment, five replicates of the aforementioned reaction were prepared using ZnCl₂. The crude products were combined and resuspended in H₂O (50 mL). After treatment with K₂CO₃ (2.76 g, 20 mmol, 4.0 eq.) in H₂O (10 mL), the resulting suspension was mixed and centrifuged at 5000 rpm for 5 min. The supernatant was transferred into a 100 mL beaker and left at RT for 5 d to allow for crystallization by concentration. Crystallized *N*-Isoxazolyl-urea (348 mg, 2.74 mmol, 55%) was collected and analyzed by X-ray spectroscopy.

One-pot prebiotic synthesis from **1**:

To a mixture of a divalent metal salt (13.6 mg ZnCl₂ or 23.8 mg CoCl₂ · 6 H₂O; 100 µmol, 1.0 eq.), Na₂CO₃ (42.4 mg, 400 µmol, 4.0 eq.), urea (24.0 mg, 400 µmol, 4.0 eq.), hydroxylurea (8.0 mg, 105 µmol, 1.1 eq.) in H₂O (1 mL) was added cyanoacetylene (6.26 µL, 100 µmol, 1.0 eq.). The suspension was shaken at 25 °C and 850 rpm for 2 h in an Eppendorf ThermoMixer®. The mixture was neutralized with conc. aq. HCl (70.4 µL) and left to equilibrate for several minutes at 95 °C to adjust the pH to ~6-7. The resulting solution was shaken at 95 °C and 850 rpm for 2 d in an Eppendorf ThermoMixer® open to the air to allow water to evaporate. The resulting residue was dissolved in H₂O to a final volume of 1 mL. A sample (10 µL) was taken and diluted with H₂O (990 µL) to 1 mL for LC-MS analysis (5 µL injection volume). Compound **8** was formed in 56% (Zn²⁺)

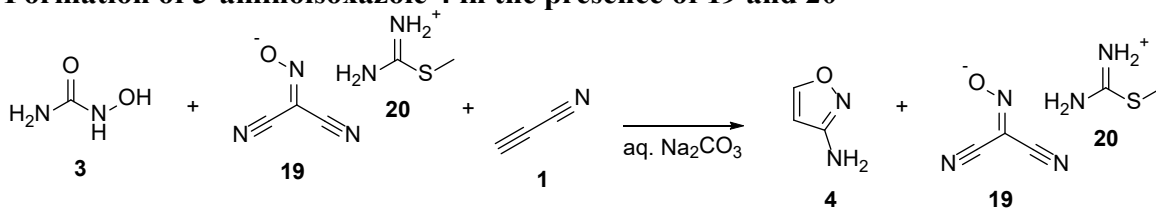
and 40% (Co²⁺) yield, respectively. The yield was determined by LC-MS measurement with the calibration curve prepared using synthetic *N*-isoxazolyli-urea.

Synthetic reference:

3-aminoisoxazole (1.14 g, 1.00 ml, 13.5 mmol) was dissolved in dry THF (20 ml) under inert atmosphere at 0°C. 2,2,2-trichloroacetylisocyanate (2.45 g, 1.61 ml, 13.5 mmol) was slowly added to the solution and the reaction was stirred at rt for 2 h. The reaction was quenched with MeOH (10 ml) and the solvent removed *in vacuo*. After co-evaporation with EtOH (2 x 20 ml) the product was obtained as a colorless solid (3.44 g, 12.6 mmol, 93 %). The crude product (3.12 g, 11.4 mmol) was dissolved in methanolic ammonia (10 mL, 7 M) and stirred for 1.5 h at rt. MeOH (20 mL) and EtOH (20 mL) were added to the reaction to obtain a clear solution. Et₂O (40ml) was added to the clear solution to precipitate the product. The crude product was filtered off and was subsequently dissolved in H₂O (20 ml). After filtering through celite, the solvent was removed by freeze-drying to obtain the product as a colorless solid (1.16 g, 9.15 mmol, 80%).

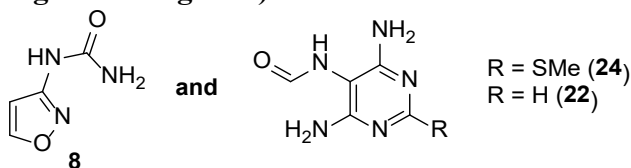
mp: 175 °C. **¹H NMR** (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 9.41 (s, 1H, HN4), 8.65 (d, ³*J* = 1.7 Hz, 1H, HC5), 6.70 (d, ³*J* = 1.7 Hz, 1H, HC4), 6.28 (s, 2H, NH₂). **¹³C NMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 159.4 (C5), 158.6 (C3), 154.6 (CO), 98.2 (C4). **HRMS** (ESI+): calc.: [C₄H₆N₃O₂]⁺ 128.0455, found: 128.0455 [M+H]⁺. **IR** (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3486 (vw), 3389 (w), 3259 (vw), 3179 (w), 3194 (w), 3033 (w), 2958 (w), 1752 (m), 1730 (m), 1686 (w), 1631 (w), 1592 (vs), 1537 (w), 1486 (m), 1416 (s), 1378 (s), 1343 (w), 1298 (vw), 1284 (w), 1123 (m), 1070 (w), 1039 (vw), 981 (vw), 928 (w), 891 (w), 797 (s), 756 (vs), 654 (w).

Formation of 3-aminoisoxazole 4 in the presence of 19 and 20

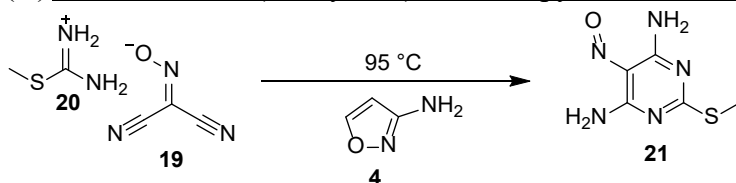


To a solution of the methylthioamidinium 20 salt of (hydroxyimino)malononitrile 19 (9.3 mg, 50 μ mol, 0.5 eq), Na₂CO₃ (26.5 mg, 250 μ mol, 2.5 eq.), and hydroxylurea 3 (8.0 mg, 0.11 μ mol, 1.1 eq.) in H₂O (1 mL) was added cyanoacetylene (6.26 μ L, 100 μ mol, 1.0 eq). The mixture was left at rt for 10 min. A sample (10 μ L) was taken and diluted with H₂O (990 μ L) to 1 mL for LC-MS analysis (5 μ L injection volume). Compound 4 was formed in 86% yield. The yield was determined by LC-MS measurement with the calibration curve prepared using commercially available 3-aminoisoxazole.

Prebiotically linked syntheses of pyrimidine (8) and purine (22,24) precursors (see Fig. 5 and Fig. S10)

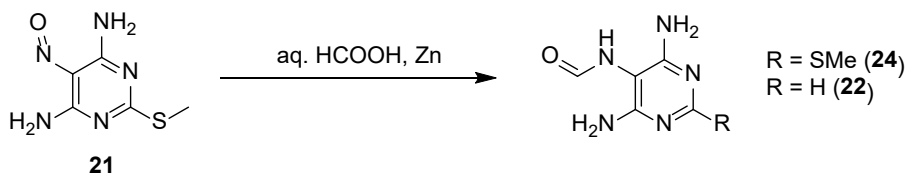


(A) Formation of 2-(methylthio)-5-nitrosopyrimidine-4,6-diamine **21**



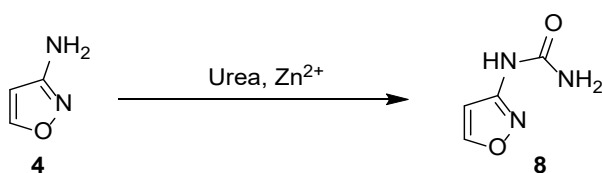
The methylthioamidine salt of (hydroxyimino)malononitrile (130 mg, 0.7 mmol, 0.5 eq.) was suspended in 3-amino-isoxazole (103 μ L, 1.39 mmol, 1 eq.) and shaken at 95 °C and 850 rpm for 3 h in an Eppendorf ThermoMixer®. To the reaction mixture was added an aq. solution of urea (4 eq. in 1 mL H₂O). The reaction mixture was filtered, the residue was washed with H₂O (1 mL) and dried to afford crude 2-(methylthio)-5-nitrosopyrimidine-4,6-diamine **21** (57 mg, 0.31 mmol, 45%). The filtrate was kept for the formation of **8**.

(B) Formation of formamidopyrimidine **22** and **24**



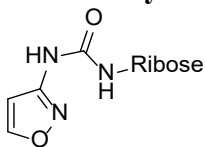
The intermediate **21** (46 mg, 0.25 mmol, 1.0 eq) was suspended in aq. HCOOH (4.5%, 2.5 mL) in the presence of elementary Zn powder (65 mg, 1.0 mmol, 4.0 eq). The reaction mixture was stirred at 70 °C in a sealed 15 mL Ace pressure tube for 4 h. After cooling to rt, the mixture was diluted with H₂O (2.5 mL) and filtered. The filtrate was analysed by LC-MS (see Fig. 5b) and was used for the formation of **8** in the next step.

(C) Formation of isoxazolyl-urea **8**



The filtrate from (B) was transferred into a conical glass tube containing the filtrate of (A). The solution was left at 95 °C for 2d in the oven open to the air to allow water to evaporate. After cooling to rt, the resulting solid was suspended in H₂O (10 mL). A sample (100 μ L) was taken and diluted with H₂O (10 x) for LC-MS analysis (5 μ L injection volume). FaPyA (**22**), FaPym²A (**24**) and *N*-isoxazolyl-urea (**8**), were observed as main products (see Fig. 5c).

***N*-isoxazolyl-*N'*-riboseyl-urea (10a-d)**



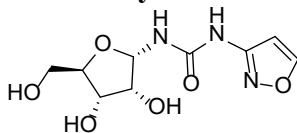
Prebiotic synthesis:

N-isoxazolylurea (6.4 mg, 0.05 mmol) was thoroughly ground up with ribose (37.5 mg, 0.25 mmol, 5 eq.) and boric acid (0.8 mg, 0.013 mmol, 0.25 eq.). The mixture was heated overnight in an oven at 95 °C. Alternatively the reaction can also be performed by a dry-down method, where a solution of *N*-isoxazolylurea (500 μ l, 0.05 mmol, 100 mM) is mixed with a ribose (83 μ l, 0.25 mmol, 3 M) and boric acid (25 μ l, 0.013 mmol, 500 mM) solution. The mixture was kept in an oven for 20 h at 95 °C. The sample was dissolved in H₂O (2 ml) and analyzed by LC-MS. To confirm the structural integrity, the different isomers were isolated by reversed phase HPLC in pure form.

Synthetic reference:

1-*O*-acetyl-2,3,5-tri-*O*-benzoyl- β -D-ribofuranose (17.0 g, 33.8 mmol) was dissolved in dry DCM (300 ml) under inert atmosphere. TiCl₄ (4.46 mL, 40.7 mmol) was added and stirred for 2 h at rt. H₂O (250 ml) was added and filtered through celite. The organic layer was separated and the aqueous phase was extracted with DCM (3 x 100 ml). The combined organic layers were washed with sat. NaCl (300 ml), dried over MgSO₄, filtered and the solvent was removed *in vacuo*. The crude product was dissolved in dry toluene (300 ml) and AgNCO (6.25 g, 41.6 mmol) was added. After refluxing for 2.5 h, the reaction mixture was filtered through celite and washed with dry toluene. To the clear solution was added 3-aminoisoxazole (3 ml, 40.6 mmol) and stirred for 16 h at rt. The solvent was removed *in vacuo* and the product purified by flash column chromatography (DCM:MeOH 50:1). The product was dissolved in methanolic ammonia (330 ml, 7 M) and stirred for 18 h at rt. The solvent was removed *in vacuo* and the product purified by flash column chromatography (DCM:MeOH 17:3 \rightarrow 4:1). The product was obtained as a colorless foam and contained a 3:1 mixture of the α - and β -furanoside (4.87 g, 18.8 mmol, 56%). The α - and β -furanosides were isolated in pure form by reversed phase HPLC to confirm the structural integrity.

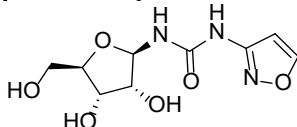
α -furanosyl-isomer 10a



mp: (131 °C). **¹H NMR** (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 9.85 (s, 1H, NH), 8.66 (d, ³*J* = 1.7 Hz, 1H, HC5), 7.24 (d, ³*J* = 9.5 Hz, 1H, C1'NH), 6.73 (d, ³*J* = 1.8 Hz, 1H, HC4), 5.50 (dd, ³*J* = 9.5, 4.4 Hz, 1H, HC1'), 5.41 (br, 1H, C3'OH), 5.03 (br, 1H, C2'OH), 4.66 (br, 1H, C5'OH), 3.92 (t, ³*J* = 4.4 Hz, 1H, HC2'), 3.87 (dd, ³*J* = 6.6, 4.5 Hz, 1H, HC3'), 3.71 (ddd, *J* = 6.5, 4.9, 3.1 Hz, 1H, HC4'), 3.49 (dd, ²*J* = 11.7 Hz, ³*J* = 3.1 Hz, 1H, H_aC5'), 3.39-3.35 (m, 1H, H_bC5'). **¹³C NMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 159.5 (C5), 158.4 (C3), 153.3 (CO), 98.3 (C4), 81.9 (C4'), 80.6 (C1'), 71.1 (C3'), 70.1 (C2'), 61.6 (C5'). **HRMS** (ESI⁺): calc.: [C₉H₁₄N₃O₆]⁺ 260.0877, found: 260.0877 [M+H]⁺. **IR**

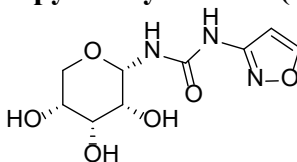
(cm^{-1}): $\tilde{\nu} = 3852$ (w), 3820 (w), 3648 (w), 3283 (w), 1843 (vw), 1771 (w), 1717 (m), 1699 (s), 1652 (vs), 1634 (s), 1575 (m), 1558 (vs), 1539 (vs), 1506 (vs), 1456 (s), 1436 (m), 1418 (m), 1032 (m), 971 (m).

β -furanosyl-isomer 10b



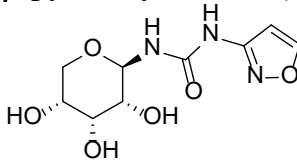
mp: 120 °C (decomp.). **$^1\text{H NMR}$** (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm) = 9.63 (s, 1H, NH), 8.67 (d, $^3J = 1.7$ Hz, 1H, HC5), 7.13 (d, $^3J = 9.5$ Hz, 1H, C1'NH), 6.74 (d, $^3J = 1.7$ Hz, 1H, HC4), 5.20 (dd, $^3J = 9.5, 5.4$ Hz, 1H, HC1'), 5.12 – 4.68 (m, 3H, C2'OH, C3'OH and C5'OH), 3.85 (t, $^3J = 4.6$ Hz, 1H, HC3'), 3.71 (t, $^3J = 5.4$ Hz, 1H, HC2'), 3.67 (q, $^3J = 4.2$ Hz, 1H, HC4'), 3.45 (dd, $^2J = 11.7$ Hz, $^3J = 4.0$ Hz, 1H, H_aC5'), 3.42 – 3.39 (m, 1H, H_bC5'). **$^{13}\text{C NMR}$** (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm) = 159.6 (C5), 158.3 (C3), 153.4 (CO), 98.3 (C4), 84.4 (C1'), 83.5 (C4'), 74.3 (C2'), 70.3 (C3'), 61.8 (C5'). **HRMS** (ESI+): calc.: $[\text{C}_9\text{H}_{13}\text{NaN}_3\text{O}_6]^+$ 282.0697, found: 282.0696 $[\text{M}+\text{Na}]^+$. **IR** (cm^{-1}): $\tilde{\nu} = 3268$ (m), 1677 (m), 1599 (s), 1537 (vs), 1478 (s), 1403 (m), 1228 (m), 999 (vs), 893 (s), 777 (vs).

α -pyranosyl-isomer (10c)



mp: 190 °C. **$^1\text{H NMR}$** (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm) = 9.97 (s, 1H, NH), 8.67 (d, $^3J = 1.8$ Hz, 1H, HC5), 7.47 (d, $^3J = 9.1$ Hz, 1H, C1'NH), 6.74 (d, $^3J = 1.8$ Hz, 1H, HC4), 5.25 – 4.87 (m, 4H, HC1', C2'OH, C3'OH, C5'OH), 3.70 (t, $^3J = 2.8$ Hz, 1H, HC3'), 3.64 – 3.44 (m, 4H, HC2', HC4', H_aC5', H_bC5'). **$^{13}\text{C NMR}$** (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm) = 159.5 (C5), 158.4 (C3), 153.4 (CO), 98.4 (C4), 77.9 (C1'), 69.4 (C3'), 69.3 (C4'), 68.4 (C5'), 67.6 (C2'). **HRMS** (ESI+): calc.: $[\text{C}_9\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_6]^+$ 260.0877, found: 260.0877 $[\text{M}+\text{H}]^+$. **IR** (cm^{-1}): $\tilde{\nu} = 3090$ (vw), 2363 (m), 2271 (w), 1956 (w), 1700 (vs), 1683 (s), 1652 (s), 1823 (w), 1732 (w), 1700 (vs), 1683 (s), 1652 (s), 1609 (w), 1559 (m), 1509 (m), 1456 (s), 707 (w), 680 (m), 656 (s).

β -pyranosyl-isomer (10d)



mp: 175 °C (decomp.). **$^1\text{H NMR}$** (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm) = 9.46 (s, 1H, NH), 8.68 (d, $^3J = 1.8$ Hz, 1H, HC5), 6.89 (d, $^3J = 9.1$ Hz, 1H, C1'NH), 6.74 (d, $^3J = 1.8$ Hz, 1H, HC4), 4.90 (t, $^3J = 9.1$ Hz, 1H, HC1'), 4.84 (d, $^3J = 3.6$ Hz, 1H, C3'OH), 4.82 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H, C2'OH), 4.69 (d, $^3J = 6.5$ Hz, 1H, C4'OH), 3.88 (q, $J = 2.8$ Hz, 1H, HC3'), 3.55 – 3.47 (m, 1H, HC4'), 3.47 – 3.37 (m, 2H, H_aC5', H_bC5'), 3.18 (ddd, $J =$

9.1, 7.4, 2.8 Hz, 1H, HC2'). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 159.7 (C5), 158.3 (C3), 153.6 (CO), 98.3 (C4), 77.5 (C1') 70.9 (C3'), 69.9 (C2'), 67.0 (C4'), 64.1 (C5'). **HRMS** (ESI+): calc.: $[\text{C}_9\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_6]^+$ 260.0877, found: 260.0877 $[\text{M}+\text{H}]^+$. **IR** (cm^{-1}): $\tilde{\nu}$ = 3314 (m), 2871 (vw), 1941 (vw), 1705 (vs), 1598 (w), 1540 (vs), 1476 (w), 1432 (vw), 1336 (vw), 1282 (m), 1266 (w), 1208 (w), 1168 (m), 1139 (m), 1088 (w), 1065(m), 1035 (vs), 1004 (m), 950 (s), 916 (w), 886 (m), 804 (m), 789 (vs), 744 (w), 706 (m).

Prebiotic formation of pyrimidine nucleosides and nucleotides

General procedure nucleoside formation

The reactions were handled under inert atmosphere. All solutions were degassed for 1 h with argon before use. A solution of ribose isoxazole **10a/b** as a 3:1 mixture (25.9 mg, 0.1 mmol, 1 eq.) in 75 mM Na_2CO_3 (0.5 ml) was added to a mixture of mineral (1 eq.), dithiol (1.5 eq.) and Fe^{2+} source (0.5 eq.) in a 15 ml falcon tube. The tube was sealed with a PTFE sealing tape and shaken for 4 h at 100°C in an Eppendorf ThermoMixer®. After cooling to rt, it was centrifuged and a sample (10 μL) was removed and diluted with H_2O to 1 ml. This diluted sample was used for LC-MS analysis according to the general information.

The different minerals, thiols and iron sources used are stated in the main text. Monothiois were used with 3 eq. As water soluble Fe^{2+} salt we used ammonium iron(II) sulfate hexahydrate in a range of 0.001-0.0001 eq. Reactions without minerals were performed in a different buffer (100 mM Na_2CO_3 , 50 mM boric acid, pH 9.7).

General procedure for one-pot nucleotide formation

The above described procedure was used for nucleoside formation. Lüneburgite or struvite (0.1 mmol, 1 eq.) were used as minerals, DTT (23.1 mg, 0.15 mmol, 1.5 eq.) and FeS_2 (6.0 mg, 0.05 mmol, 0.5 eq.) were used as thiol and Fe^{2+} source. After nucleoside formation we added solid urea (240 mg, 4 mmol, 40 eq.) and in case of struvite additionally oxalic acid (0.30 mmol, 3.0 eq.). The mixture was heated to 65 °C until the urea was fully dissolved. The sample was well suspended by vortexing and a sample (25 μL) was transferred into a 2 ml Eppendorf tube. The sample was kept at 85 °C for 20 h in an Eppendorf ThermoMixer® open to the air to allow water to evaporate. The dried sample was taken up in H_2O (1 ml) and analyzed for nucleotides by LC-MS analysis according to the general information.

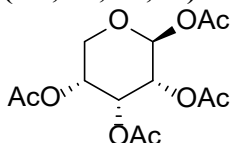
Formation of purine nucleosides compatible to pyrimidine nucleoside formation

For purine nucleoside synthesis, FaPyA **22** or FaPyG **23** (0.05 mmol, 1eq.) was thoroughly ground up with ribose (37.5 mg, 0.25 mmol, 5 eq.) and boric acid (0.80 mg, 0.013 mmol, 0.25 eq.), identical to the N-isoxazolyl-urea ribosylation. The mixture was heated overnight in an oven at 95 °C. The resulting ribosides were heated at 100 °C in sealed 2 ml Eppendorf tubes under the following conditions: 100 mM Na_2CO_3 , 50 mM boric acid, pH 9.7, 1.5 eq. DTT and 0.0005 eq. ammonium iron(II) sulfate hexahydrate. The following reaction times and concentrations were used: FaPyA (3d, 25 mM), FaPyG (2d, 6.25 mM).

Formation of purine and pyrimidine nucleoside in an one-pot reaction

For one-pot nucleoside synthesis of purines and pyrimidines, solutions of **8** (400 μ l, 100 mM, 40 μ mol, 1.0 eq), FaPyA (400 μ l, 50 mM, 20 μ mol, 0.5 eq.), FaPyDA (400 μ L, 50 mM, 20 μ mol, 0.5 eq.), ribose (267 μ L, 3 M, 800 μ mol, 20 eq.) and boric acid (48.0 μ L, 500 mM, 24 μ mol, 0.6 eq.) were heated at 95 °C for 14 h in a dry down reaction. The formed residue containing **10** and **26** was dissolved in a basic buffer (1.6 mL, 100 mM Na₂CO₃ and 50 mM Borate) and degased in a 15 mL Falcon tube with argon. To the degassed reaction mixture (500 μ l) was added soluble Fe²⁺ (0.0005 eq.) and DTT (2.8 mg, 18.2 μ mol, 1.5 eq.). The tube was sealed with a PTFE sealing tape and shaken for 4 h at 100 °C in an Eppendorf ThermoMixer[®]. After 4 h a carbonate solution (0.5 mL, 500 mM) was added and the reaction continued for another 20 h. After cooling to rt, it was centrifuged and a sample (20 μ L) was removed and diluted with H₂O to 0.5 ml. This diluted sample was used for LC-MS analysis according to the general information.

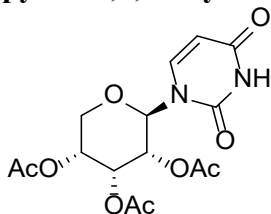
(1R,2R,3R,4S)-tetrahydro-2H-pyran-2,3,4,5-tetrayl tetraacetate (**30**)



D-ribose (5.00 g, 33.3 mmol) was dissolved in pyridine (20 mL) and cooled to 0°C in an ice water bath. Acetic anhydride (20 ml, 212 mmol) was added and stirred at 0°C overnight. The mixture was poured into ice cold water (200 ml). The solid was filtered off and the crude product was crystallized from a mixture of MeOH and H₂O to obtain the pure product as colorless crystals (5.22 g, 16.4 mmol, 49%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 6.02 (d, ³J = 4.8 Hz, 1H, HC1), 5.47 (t, ³J = 3.4 Hz, 1H, HC3), 5.19 – 5.11 (m, 1H, HC4), 5.05 – 5.00 (m, 1H, HC2), 4.01 (dd, ²J = 12.4 Hz, ³J = 3.4 Hz, 1H, H_aC5), 3.90 (dd, ²J = 12.4 Hz, ³J = 5.7 Hz, 1H, H_bC5), 2.12 (s, 3H, CH₃), 2.09 (s, 3H, CH₃), 2.09 (s, 3H, CH₃), 2.08 (s, 3H, CH₃). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 170.0 (CO), 169.9 (CO), 169.6 (CO), 168.9 (CO), 91.0 (C1), 67.40 (C2), 66.3 (C3), 66.2 (C4), 62.8 (C5), 21.0 (CH₃), 20.9 (CH₃), 20.8 (CH₃), 20.8 (CH₃).

(1'R,2'R,3'R,4'S)-2-(2,4-Dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)tetrahydro-2H-pyran-3,4,5-triyl triacetate (**31**)

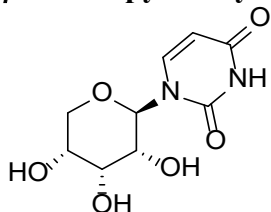


Uracil (269 mg, 2.40 mmol) was suspended in dry MeCN (14 ml) under inert atmosphere. The mixture was refluxed and bis(trimethylsilyl)acetamid (1.26 mL, 1.05 mg, 5.15 mmol) was added. After the mixture became clear, a solution containing tetraacetyl- β -D-ribose **30** (636 mg, 2.00 mmol, 0.8 eq.) and TMSOTf (0.54 mL, 667 mg, 3.00 mmol) in dry MeCN was added. The reaction was further refluxed for 8 h. After cooling to rt, the reaction was quenched with sat. NaHCO₃ (20 ml) and the aqueous phase

extracted with EtOAc (5 x 25 ml). The combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and the solvent removed *in vacuo*. The crude product was purified by flash column chromatography (DCM/MeOH 97:3) to obtain the pure compound as a yellowish solid (655 mg, 1.77 mmol, 89%).

mp: 164 °C. **¹H NMR** (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 11.47 (s, 1H, HN3), 7.90 (d, ³*J* = 8.2 Hz, 1H, HC6), 5.85 (d, ³*J* = 9.7 Hz, 1H, HC1'), 5.70 (dd, ³*J* = 8.1 Hz, ⁴*J* = 1.5 Hz, 1H, HC5), 5.66 – 5.63 (m, 1H, HC3'), 5.49 (dd, ³*J* = 9.8, 3.1 Hz, 1H, HC2'), 5.23 – 5.15 (m, 1H, HC4'), 3.99 – 3.92 (m, 1H, H_aC5'), 3.85 (dd, ²*J* = 11.0 Hz, ³*J* = 5.5 Hz, 1H, H_bC5'), 2.19 (s, 3H, CH₃), 1.98 (s, 3H, CH₃), 1.92 (s, 3H, CH₃). **¹³C NMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 170.0 (CO), 169.3 (CO), 169.0 (CO), 162.8 (C4), 150.6 (C2), 140.7 (C6), 102.7 (C5), 77.7 (C1'), 67.7 (C3'), 66.5 (C2'), 65.5 (C4'), 62.7 (C5'), 20.5 (CH₃), 20.5 (CH₃), 20.3 (CH₃). **HRMS** (ESI+): calc.: [C₁₅H₁₉N₂O₉]⁺ 371.1090, found: 371.1085 [M+H]⁺. **IR** (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3066 (vw), 2822 (vw), 2360 (vw), 1747 (s), 1692 (s), 1453 (w), 1371 (s), 1305 (w), 1212 (vs), 1163 (m), 1121 (w), 1079 (s), 1041 (s), 986 (m), 952 (m), 882 (w), 813 (m), 771 (w), 718 (w).

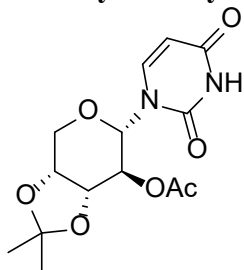
β -D-Ribopyranosyl-uradine (12d)



Nucleoside **31** (56 mg, 0.151 mmol) was dissolved in methanolic ammonia (4 ml, 1 M) and stirred for 19 h at rt. The solvent was removed *in vacuo* and the crude product was purified by flash column chromatography (DCM/MeOH 4:1) to obtain the pure product as a colorless solid (28.0 mg, 0.115 mmol, 76%). For LC-MS measurements, a fraction of the product was further purified by reversed phase HPLC.

mp: 220 °C (decomp.). **¹H NMR** (599 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 11.25 (s, 1H, HN3), 7.66 (d, ³*J* = 8.1 Hz, 1H, HC6), 5.60 (d, ³*J* = 8.1 Hz, 1H, HC5), 5.58 (d, ³*J* = 9.4 Hz, 1H, HC1'), 5.11 (br, 1H, OH), 5.09 (br, 1H, OH), 4.84 (br, 1H, OH), 3.97 (d, ³*J* = 3.2 Hz, 1H, HC3'), 3.68 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H, HC2'), 3.63 (ddd, ³*J* = 7.4, 6.0, 2.3 Hz, 1H, HC4'), 3.58 – 3.53 (m, 2H, H_aC5', H_bC5'). **¹³C NMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 163.0 (C4), 151.1 (C2), 141.4 (C6), 101.67 (C5), 79.6 (C1'), 71.2 (C3'), 67.6 (C2'), 66.4 (C4'), 65.2 (C5'). **HRMS** (ESI+): calc.: [C₉H₁₃N₂O₆]⁺ 245.0768, found: 245.0768 [M+H]⁺. **IR** (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3347 (w), 2357 (vw), 2336 (vw), 1675 (vs), 1363 (w), 1391 (w), 1272 (m), 1250 (m), 1197 (m), 1084 (vs), 1042 (vs), 975 (m), 918 (w), 859 (w), 813 (m), 779 (w), 689 (m), 667 (m).

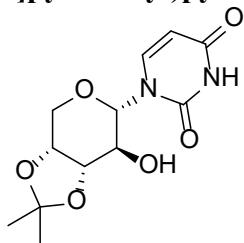
(1'R,2'S,3'S,4'R)-6-(2,4-Dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)-2,2-dimethyltetrahydro-4H-[1,3]dioxolo[4,5-c]pyran-7-yl acetate (32)



Uracil (224 mg, 2.00 mmol, 1.00 eq.) was suspended in dry MeCN (16 ml) under inert atmosphere. Bis(trimethylsilyl)acetamid (1.26 ml, 1.05 g, 5.00 mmol, 2.50 eq.) was added and stirred at 40 °C until the mixture became clear. TMSOTf (0.50 ml, 0.62 mg, 2.80 mmol, 1.40 eq.) was added. 1,2-O-acetate-3,4-O-isopropylidene-D-arabinose (**6**) (716 mg, 2.60 mmol, 1.30 eq.) was separately dissolved in dry MeCN (5 ml) and slowly added to the reaction mixture within 30 min. After stirring 2 h at 40 °C, the reaction was quenched with sat. NaHCO₃ (20 ml) and extracted with DCM (3 x 25 ml). The combined organic layers were washed with sat. NaCl (30 ml), dried over Na₂SO₄, filtered and the solvent removed *in vacuo*. The product was purified by flash column chromatography (iHex/acetone, 7:3 → 1:1) to yield the product as a colorless solid (565 mg, 1.73 mmol, 87%).

mp: 225 °C; **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 8.54 (s, 1H, HN3), 7.43 (d, ³J = 8.2 Hz, 1H, HC6), 5.78 (dd, ³J = 8.2 Hz, ⁴J 2.3 Hz, 1H, HC5), 5.56 (d, ³J = 9.4 Hz, 1H, HC1'), 5.10 (dd, ³J = 9.4, 7.0 Hz, 1H, HC3'), 4.40 (d, ²J = 13.9 Hz, 1H, H_aC5'), 4.34 (dd, J = 7.1, 5.4 Hz, 1H, HC2'), 4.31 – 4.26 (m, 1H, HC4'), 3.98 (dd, ²J = 13.9, 2.4 Hz, 1H, H_b5'), 2.06 (s, 3H, CH₃), 1.59 (s, 3H, CH₃), 1.39 (s, 3H, CH₃). **¹³C NMR** (101 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 170.0 (CO), 162.5 (C4), 150.4 (C2), 139.9 (C6), 110.8 (C_q), 103.3 (C5), 80.4 (C1'), 76.5 (C2'), 73.3 (C4'), 71.1 (C3'), 66.3 (C5'), 27.9 (CH₃), 26.2 (CH₃), 20.8 (CH₃). **HRMS** (ESI⁺): calc.: [C₁₄H₁₉N₂O₇]⁺ 327.1187, found: 327.1188 [M+H]⁺. **IR** (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 2985 (vw), 2882 (vw), 2359 (vw), 2053 (vw), 1741 (m), 1711 (s), 1675 (vs), 1470 (w), 1426 (w), 1375 (m), 1296 (m), 1249 (m), 1218 (vs), 1170 (w), 1130 (s), 1051 (vs), 967 (w), 889 (w), 847 (m), 797 (m), 761 (w), 686 (w).

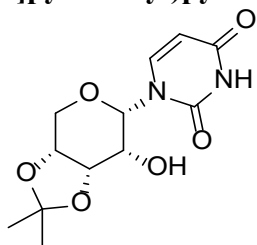
1-((1'R,2'S,3'S,4'R)-7-Hydroxy-2,2-dimethyltetrahydro-4H-[1,3]dioxolo[4,5-c]pyran-6-yl)pyrimidine-2,4(1H,3H)-dion (33)



Nucleoside **32** (355 mg, 1.09 mmol) was dissolved in methanolic ammonia (14 ml, 1 M) and kept at rt for 20 h. The solvent was removed *in vacuo* and the crude product was purified by flash column chromatography (DCM/MeOH, 92:8) to obtain the product as colorless solid (284 mg, 1.00 mmol, 92%).

mp: 220 °C (decomp.). **¹H NMR** (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 11.36 (s, 1H, HN3), 7.65 (d, ³*J* = 8.1 Hz, 1H, HC6), 5.64-5.59 (m, 2H, HC5, HO), 5.26 (d, ³*J* = 9.7 Hz, 1H, HC1'), 4.23 – 4.18 (m, 1H, HC4'), 4.15 (d, ²*J* = 13.5 Hz, 1H, H_aC5'), 4.11 (dd, ³*J* = 7.0, 5.5 Hz, 1H, HC3'), 3.92 (dd, ²*J* = 13.5 Hz, ³*J* = 2.6 Hz, 1H, H_bC5'), 3.71 – 3.63 (m, 1H, HC2'), 1.49 (s, 4H, CH₃), 1.29 (s, 4H, CH₃). **¹³C NMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 163.0 (C4), 151.0 (C2), 141.3 (C6), 108.7 (C_q), 102.0 (C5), 81.9 (C1'), 79.1 (C3'), 73.3 (C4'), 69.7 (C2'), 65.3 (C5'), 28.0 (CH₃), 26.2 (CH₃). **HRMS** (ESI+): calc.: [C₁₂H₁₇N₂O₆]⁺ 285.1081, found: 285.1082 [M+H]⁺. **IR** (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3378 (w), 2989 (w), 2888 (vw), 2827 (vw), 2360 (vw), 1678 (vs), 1623 (m), 1469 (w), 1416 (w), 1392 (m), 1372 (m), 1336 (w), 1288 (m), 1275 (w), 1249 (s), 1216 (s), 1202 (s), 1167 (w), 1138 (s), 1108 (m), 1086 (vs), 1046 (s), 1022 (m), 975 (m), 958 (m), 936 (w), 874 (s), 846 (s), 826 (m), 796 (m), 780 (w), 761 (s), 732 (m), 684 (m).

1-((1'*R*,2'*R*,3'*S*,4'*R*)-7-Hydroxy-2,2-dimethyltetrahydro-4H-[1,3]dioxolo[4,5-*c*]pyran-6-yl)pyrimidine-2,4(1H,3H)-dion (34)

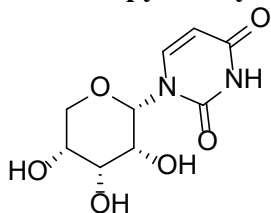


Nucleoside **33** (150 mg, 0.53 mmol) was dissolved in DCM (8 ml) together with Dess-Martin Periodinan (336 mg, 0.79 mmol) and NaHCO₃ (89 mg, 1.06 mmol). The reaction mixture was reacted for 2 h at 45 °C and quenched with solid Na₂S₂O₃ (0.55 g) together with sat. NaHCO₃ (5 ml). It was rigorously stirred until the organic phase became clear. The organic layer was separated and the aqueous layer was extracted with DCM (5 x 15 ml) and EtOAc (5 x 20 ml). The combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and the solvent removed *in vacuo*. The crude product was dissolved in a mixture of DCM/EtOAc/MeOH (2:1:1, 10 mL) and NaBH₄ (35 mg, 0.93 mmol) was added. The mixture was stirred for 1 h at 0 °C. The solvent was removed *in vacuo*. The residue was dissolved in EtOAc (20 ml) and washed with sat. NaCl (30 ml). The aqueous phase was extracted with EtOAc (8 x 25 ml). The combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and the solvent removed *in vacuo*. The crude product was purified by flash column chromatography (DCM/MeOH, 96:4) to obtain the product as a colorless solid (60 mg, 0.21 mmol, 40%).

mp: 205 °C (decomp.). **¹H NMR** (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 11.32 (s, 1H, HN3), 7.79 (d, ³*J* = 8.1 Hz, 1H, HC6), 5.64 (d, ³*J* = 3.0 Hz, 1H, HC1'), 5.56 (d, ³*J* = 8.1 Hz, 1H, HC5), 5.40 (d, ³*J* = 5.9 Hz, 1H, OH), 4.34 (dd, ³*J* = 6.7, 4.5 Hz, 1H, HC3'), 4.24 – 4.19 (m, 1H, HC4'), 4.06 (dd, ²*J* = 12.6 Hz, ³*J* = 3.1 Hz, 1H, H_aC5'), 3.95 (dd, ²*J* = 12.7 Hz, ³*J* = 3.9 Hz, 1H, H_bC5'), 3.91 – 3.87 (m, 1H, HC2'), 1.46 (s, 3H, CH₃), 1.30 (s, 3H, CH₃). **¹³C NMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 163.2 (C4), 150.3 (C2), 143.2 (C6), 109.1 (C_q), 100.0 (C5), 80.2 (C1'), 72.8 (C3'), 70.8 (C4'), 65.4 (C5'), 64.60 (C2'), 26.0 (CH₃), 25.5. (CH₃). **HRMS** (ESI+): calc.: [C₁₂H₁₇N₂O₆]⁺ 285.1081, found: 285.1081 [M+H]⁺. **IR** (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 2989 (vw), 2890 (vw), 2359 (vw), 2215 (vw), 1708 (s), 1674

(vs), 1454 (w), 1425 (w), 1381 (m), 1211 (s), 1155 (m), 1126 (s), 1084 (s), 1064 (vs), 1042 (vs), 991 (w), 882 (w), 846 (m), 814 (m), 763 (m), 737 (m), 678 (w).

α -D-Ribopyranosyl-Uracil (α -p-U, **12c**)

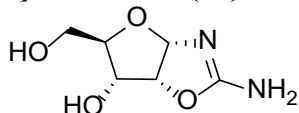


Nucleoside **34** was dissolved in 70% acetic acid (5 ml) and stirred for 5 h at 60 °C. The solvent was removed *in vacuo* and remaining AcOH was co-evaporated with EtOH (2 x 30 ml) and MeCN (3 x 30 ml). The crude product was purified by flash column chromatography (DCM/MeOH 88:12) to obtain the product as white solid (32.0 mg, 0.151 mmol, 83%). For LC-MS measurements, a fraction of the product was further purified by reversed phase HPLC.

mp: 243 °C (decomp.) **¹H NMR** (599 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 11.34 (s, 1H, HN3), 7.70 (d, ³*J* = 8.2 Hz, 1H, HC6), 5.57 (d, ³*J* = 8.1 Hz, 1H, HC5), 5.47 (d, ³*J* = 1.2 Hz, 1H, HC1'), 5.27 (br, 1H, C2'OH), 5.17 – 5.12 (br, 1H, C3'OH), 5.10 (br, 1H, C4'OH), 3.96 (dd, ²*J* = 12.4 Hz, ³*J* = 1.6 Hz, 1H, H_aC5'), 3.75 (d, ²*J* = 12.2 Hz, 1H, H_bC5'), 3.72 (d, ³*J* = 7.4 Hz, 1H, HC2'), 3.70 – 3.66 (m, 2H, HC3', HC4'). **¹³C NMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 163.1 (C4), 150.0 (C2), 142.5 (C6), 100.1 (C5), 81.6 (C1'), 70.9 (C2'), 70.3 (C5'), 68.6 (C4'), 67.2 (C3'). **HRMS** (ESI+): calc.: [C₉H₁₃N₂O₆]⁺ 245.0768, found: 245.0768 [M+H]⁺. **IR** (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3359 (w), 3295 (w), 2934 (vw), 1769 (vw), 1716 (w), 1692 (m), 1665 (s), 1461 (m), 1432 (w), 1398 (w), 1385 (w), 1373 (w), 1322 (vw), 1295 (m), 1251 (m), 1195 (w), 1159 (w), 1110 (m), 1084 (vs), 996 (w), 968 (w), 911 (w), 889 (w), 834 (w), 818 (s), 769 (vs), 714 (s), 670 (s).

Synthesis pathway for α -furanosyl-uridine

(1'S,2'R,3'S,4'R)-2-amino-5-(hydroxymethyl)-3a,5,6,6a-tetrahydrofuro[2,3-d]oxazol-6-ol (**35**)



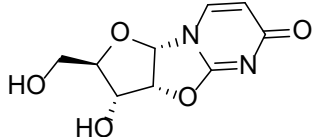
D-Ribose (14.4 g, 96 mmol) and cyanamide (8.06 g, 192 mmol) were dissolved in aqueous ammonia (16 ml, 1M) in a pressure tube. The mixture was heated at 30 °C until the solution became clear. The reaction was further stirred at rt until a precipitate started to form. The reaction was heated for 30 min at 60 °C and the solvent removed *in vacuo*. The residue was taken up in hot MeOH (32 ml) and filtrated immediately. The warm filtrate was kept at -20 °C overnight. The yellowish solid was filtered off and washed with MeOH and Et₂O to obtain the pure product as a colorless solid (12.6 g, 72.3 mmol, 75%) (**45**).

The analytical data is in agreement with reported literature (**46**).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 6.14 (d, ³*J* = 1.8 Hz, 2H), 5.57 – 5.12 (m, 1H), 4.29 (dd, ³*J* = 18.4, 1.9 Hz, 2H), 2.00 – 1.78 (m, 2H), 1.74 – 1.66 (m, 1H), 1.51

- 1.29 (m, 2H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 164.0, 98.1, 80.9, 77.8, 71.1, 60.4.

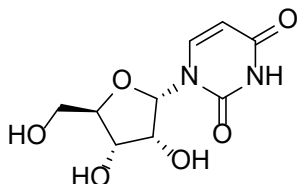
(1'S,2'R,3'S,4'R)-3-Hydroxy-2-(hydroxymethyl)-2,3,3a,9a-tetrahydro-6H-furo[2',3':4,5]oxazolo[3,2-a]pyrimidin-6-on (36)



Compound **35** (10.0 g, 75.4 mmol) and methyl propiolate (9.60 g, 9.65 mL, 114 mmol) were dissolved in H₂O (130 mL) and stirred at 100 °C for 30 min. The solvent was removed *in vacuo* and the residue taken up in hot MeOH (65 ml). The solution was filtered hot and the filtrate kept at -20 °C for 48 h. The formed yellow crystals were filtered off to obtain the pure product (6.21 g, 27.5 mmol, 48%).⁽⁴⁷⁾ The analytical data is in agreement with reported literature (47).

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 7.85 (d, 3J = 7.4 Hz, 1H), 6.20 (d, 3J = 5.3 Hz, 1H), 5.88 (d, 3J = 7.4 Hz, 1H), 5.77 (d, 3J = 6.8 Hz, 1H), 5.23 (t, 3J = 5.4 Hz, 1H), 4.91 – 4.86 (m, 1H), 4.05 (ddd, 3J = 9.1, 6.8, 5.4 Hz, 1H), 3.69 (ddd, 2J = 12.3 Hz, 3J = 4.9, 2.0 Hz, 1H), 3.56 (ddd, 3J = 9.2, 5.0, 1.9 Hz, 1H), 3.50 – 3.42 (m, 1H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 171.2, 160.8, 137.0, 108.9, 88.7, 81.5, 80.8, 69.7, 59.5.

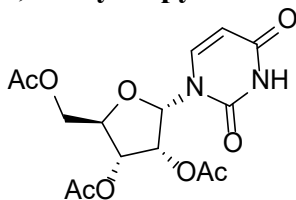
α -furanosyl-uradine (12a)



Compound **36** (1.0 g, 4.40 mmol) dissolved in aqueous HCl (2.2 ml, 0.2 M) was refluxed for 2 h. The solvent was removed *in vacuo* and the residue was taken up in H₂O. The solution was neutralized until pH ~6 with Dowex 1X8. It was filtered and the resin was washed with H₂O. The filtrate was freeze dried to obtain the product as a colorless powder (1.02 g, 4.18 mmol, 95%). For LC-MS analysis, a small fraction of the product was further purified by reversed phase HPLC.

mp: 202 °C (decomp.). ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 11.18 (s, 1H, HN3) 7.61 (d, 3J = 8.1 Hz, 1H, HC6), 6.01 (d, 3J = 4.6 Hz, 1H, HC1'), 5.56 (d, 3J = 8.1 Hz, 1H, HC5), 5.49 (br, 1H, OH), 5.12 (br, 1H, OH), 4.80 (d, 3J = 9.0 Hz, 1H, OH), 4.16 (t, 3J = 4.5 Hz, 1H, HC2'), 4.06 – 3.98 (m, 2H, HC3', HC4'), 3.58 (dd, 2J = 12.0 Hz, 3J = 2.7 Hz, 1H, H_aC5), 3.42 (dd, 2J = 12.2 Hz, 3J = 4.1 Hz, 1H, H_bC5). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 163.3 (C4), 150.6 (C2), 142.8 (C6), 99.8 (C5), 85.1 (C1'), 84.0 (C4'), 70.4 (C3'), 70.3 (C2'), 61.2 (C7). **HRMS** (ESI+): calc.: [C₉H₁₃N₂O₆]⁺ 245.0768, found: 245.0768 [M+H]⁺. **IR** (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3301 (w), 3058 (w), 2930 (w), 2805 (vw), 2342 (vw), 1659 (vs), 1463 (m), 1394 (m), 1269 (s), 1197 (m), 1096 (s), 1037 (vs), 1021 (vs), 990 (s), 927 (m), 857 (m), 806 (s), 763 (s), 718 (m).

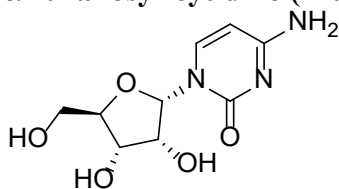
Synthesis of α -furanosyl-cytidine(1'S,2'R,3'S,4'R)-2-(acetoxymethyl)-5-(2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)tetrahydrofuran-3,4-diyl diacetate (37)



Compound **12a** (500 mg, 2.05 mmol) was dissolved in pyridine (5 ml) and acetic anhydride (5 ml) at 0 °C. The mixture was reacted for 18 h and the solvent removed *in vacuo*. It was co-evaporated with MeCN (20 ml). The residue was purified by flash column chromatography (DCM/MeOH 97:3) to afford the product as a colorless solid (611 mg, 1.65 mmol, 80%).

mp: 70 °C. **¹H NMR** (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 11.38 (s, 1H, HN3), 7.65 (d, ³*J* = 8.2 Hz, 1H, HC6), 6.34 (d, ³*J* = 4.7 Hz, 1H, HC1'), 5.64 (d, ³*J* = 8.2 Hz, HC5), 5.54 (t, ³*J* = 4.7 Hz, 1H, HC2'), 5.35 (dd, ³*J* = 6.2, 5.1 Hz, 1H, HC3'), 4.66 – 4.60 (m, 1H, HC4'), 4.26 (dd, ²*J* = 12.2 Hz, ³*J* = 3.4 Hz, 1H, H_aC5'), 4.16 (dd, ²*J* = 12.2 Hz, ³*J* = 5.7 Hz, 1H, H_bC5'), 2.06 (s, 3H, CH₃), 2.03 (s, 3H, CH₃), 1.97 (s, 3H, CH₃). **¹³C NMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 170.1 (CO), 169.4 (CO), 168.8 (CO), 163.1 (C4), 150.2 (C2), 141.0 (C6), 100.9 (C5), 83.5 (C1'), 78.8 (C4'), 70.6 (C3'), 69.8 (C2'), 63.1 (C5'), 20.6 (CH₃), 20.4 (CH₃), 20.1 (CH₃). **HRMS** (ESI+): calc.: [C₁₅H₁₈N₂NaO₉]⁺ 393.0905, found: 393.0904 [M+Na]⁺. **IR** (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3059 (vw), 2159 (vw), 1743 (s), (1682 (vs), 1455 (w), 1371 (m), 1211 (vs), 1109 (s), 1075 (m), 1030 (s), 944 (w), 902 (w), 813 (m), 766 (w), 714 (w), 674 (vw).

α -furanosyl-cytidine (11a)

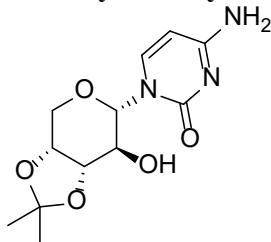


Compound **37** (100 mg, 0.27 mmol) was dissolved in dry DCM. It was added Et₃N (105 μ L, 78.1 mg, 0.77 mmol), DMAP (6.00 mg, 0.05 mmol) and 2,4,6-TIPBS (164 mg, 0.54 mmol) and stirred for 20 h at rt. The reaction was quenched with sat. aqueous ammonia (6 ml) and further stirred for 3 h at rt. The solvent was removed *in vacuo* and residual water co-evaporated with MeCN (2 x 25 ml). The residue was purified by flash column chromatography (DCM/MeOH 88:12) and reversed phase HPLC to afford the product as a colorless solid (15 mg, 0.06 mmol, 23%)

mp: 190 °C. **¹H NMR** (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 7.52 (d, ³*J* = 7.4 Hz, 1H, HC6), 7.05 (br, 1H, H_aN), 6.96 (br, 1H, H_bN), 6.01 (d, ³*J* = 3.7 Hz, 1H, HC1'), 5.66 (d, ³*J* = 7.4 Hz, 1H, HC5), 5.27 (s, 1H, OH), 4.97 (s, 1H, OH), 4.77 (s, 1H, OH), 4.07 – 4.01 (m, 2H, HC2', HC3'), 3.98 – 3.92 (m, 1H, HC4'), 3.61 (dd, ²*J* = 12.1 Hz, ³*J* = 2.6 Hz, 1H, H_aC5'), 3.42 (dd, ²*J* = 12.2 Hz, ³*J* = 4.6 Hz, 1H, H_bC5'). **¹³C NMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 165.6 (C4), 155.2 (C2), 143.1 (C6), 92.3 (C5), 85.6 (C1'), 83.1 (C4'), 70.6 (C2'), 70.1 (C3'), 61.1 (C5'). **HRMS** (ESI+): calc.: [C₉H₁₄N₃O₅]⁺ 244.0928,

found: 244.0927 $[M+H]^+$. IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3267 (w), 2360 (vs), 2222 (s), 1842 (m), 1589 (m), 1311 (w), 1210 (w), 1033 (m), 793 (m), 668 (vs).

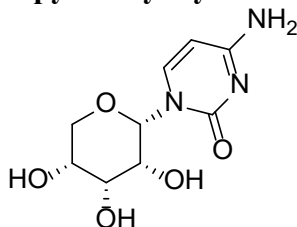
Synthesis of α -pyranosyl-cytidine 4-amino-1-((1'R,2'S,3'S,4'R)-7-hydroxy-2,2-dimethyltetrahydro-4H-[1,3]dioxolo[4,5-c]pyran-6-yl)pyrimidin-2(1H)-on (38)



Compound **32** (143 mg, 0.44 mmol) was dissolved in dry DCM (9 ml). It was added triethylamine (118 mg, 162 ml, 1.60 mmol), DMAP (8 mg, 0.07 mmol, 0.15 eq.) and 2,4,6-TIPBS (265 mg, 0.88 mmol). The mixture was reacted for 72 h at rt and quenched with sat. ammonia in H₂O (3 ml). The reaction was further stirred for 5 h at rt. The solvent was removed *in vacuo* and residual H₂O was co-evaporated with MeCN (2 x 25 ml). The crude mixture was purified by flash column chromatography (DCM/MeOH 12:1 → 4:1, containing 0.1% Et₃N) to obtain the product as a white solid (67 mg, 0.21 mmol, 48%).

mp: 210 °C (decomp.). **¹H NMR** (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 7.54 (d, ³*J* = 7.5 Hz, 1H, HC6), 7.23 (br, 1H, H_aN), 7.11 (br, 1H, H_bN), 5.71 (d, ²*J* = 7.4 Hz, 1H, HC5), 5.41 (d, ³*J* = 6.4 Hz, 1H, OH), 5.36 (d, ³*J* = 9.8 Hz, 1H, HC1'), 4.22 – 4.18 (m, 1H, HC4'), 4.14 – 4.07 (m, 2H, H_aC5', HC3'), 3.85 (dd, ²*J* = 13.6 Hz, ³*J* = 2.5 Hz, 1H, H_bC5'), 3.67 – 3.57 (m, 1H, HC3'), 1.48 (s, 3H, CH₃), 1.29 (s, 3H, CH₃). **¹³C NMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 165.4 (C4), 155.5 (C2), 141.7 (C6), 108.5 (C_q), 94.2 (C5), 82.3 (C1'), 79.4 (C3'), 73.3 (C4'), 69.9 (C2'), 65.2 (C5'), 28.0 (CH₃), 26.2 (CH₃). **HRMS** (ESI⁺): calc.: [C₁₂H₁₈N₃O₅]⁺ 284.1240, found: 284.1241 $[M+H]^+$. IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3326 (w), 2932 (w), 2819 (vw), 2360 (vw), 1660 (vs), 1525 (vw), 1465 (m), 1395 (m), 1270 (s), 1203 (m), 1096 (s), 1039 (vs), 1022 (s), 928 (w), 869 (m), 808 (s), 763 (m), 719 (m).

α -pyranosyl-cytidine (11c)

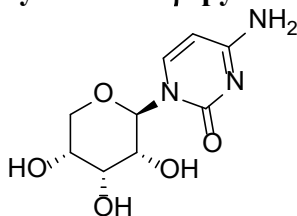


Compound **38** (35 mg, 0.12 mmol) was dissolved in MeCN (5.5 ml). Dess-Martin-Periodinan (104 mg, 0.25 mmol) was added and the reaction mixture was stirred for 3.5 h at rt. The reaction was quenched with Na₂S₂O₃ (500 mg) and NaHCO₃ (100 mg) and further stirred for 10 min. The mixture was filtered and the solvent removed *in vacuo*. The crude keto product was dissolved in DCM (3 mL), EtOAc (1.5 mL) and MeOH (1.5 mL). NaBH₄ (20 mg, 0.529 mmol) was added and stirred for 2.5 h at rt. The solvent

was removed *in vacuo*. The crude product was dissolved in 70% acetic acid (5 ml) and stirred for 5 h at 60 °C. The solvent was removed *in vacuo* and co-evaporated with EtOH (2 x 30 ml) and MeCN (3 x 30 ml). The crude mixture was purified by reversed phase HPLC to obtain the product as colorless solid (7.0 mg, 0.029 mmol, 24 %).

mp: 194 °C (decomp.). **¹H NMR** (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 7.61 (d, ³*J* = 7.4 Hz, 1H, HC6), 7.18 (br, 1H, H_aN), 7.02 (br, 1H, H_bN), 5.67 (d, ³*J* = 7.4 Hz, 1H, HC5), 5.47 (s, 1H, HC1'), 5.13 (d, ³*J* = 6.0 Hz, 1H, OH), 5.10 (d, ³*J* = 5.8 Hz, 1H, OH), 5.07 (d, ³*J* = 7.7 Hz, 1H, OH), 3.95 (dd, ²*J* = 12.2 Hz, ³*J* = 1.8 Hz, 1H, H_aC5'), 3.75 – 3.63 (m, 4H, HC2, HC3, HC4, H_bC5'). **¹³C NMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 165.5 (C4), 154.4 (C2), 143.1 (C6), 92.5 (C5), 82.3 (C1'), 70.6 (C2'), 70.3 (C5'), 68.7 (C4'), 67.4 (C3'). **HRMS** (ESI+): calc.: [C₉H₁₄N₃O₅]⁺ 244.0928, found: 244.0927 [M+H]⁺. **IR** (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3217 (w), 2360 (vw), 1891 (vw), 1645 (s), 1598 (m), 1525 (w), 1481 (m), 1405 (m), 1299 (m), 1203 (m), 1158 (m), 1084 (vs), 1015 (s), 987 (s), 902 (m), 833 (m), 780 (vs), 752 (s), 668 (vs).

Synthesis of β -pyranosyl-cytidine (11d)



Nucleoside **31** (50.0 mg, 0.135 mmol) was dissolved in dry DCM. It was added NEt₃ (27.3 mg, 37.4 μ L, 0.270 mmol), DMAP (1.7 mg, 0.014 mmol, 0.1 eq.) and 2,4,6-TIPBS (61.5 mg, 0.203 mmol) and stirred for 17 h at rt. The reaction was quenched with sat. ammonia in H₂O. The solvent was removed *in vacuo* and residual water was co-evaporated with MeCN (4 x 20 ml). The crude product was purified by reversed phase HPLC to obtain the pure product as a colorless solid (15 mg, 0.062 mmol, 46%).

mp: 180 °C. **¹H NMR** (599 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 7.54 (d, ³*J* = 7.4 Hz, 1H, HC6), 7.16 (br, 1H, H_aN), 7.05 (br, 1H, H_bN), 5.70 (d, ³*J* = 9.6 Hz, 1H, HC1'), 5.68 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, HC5), 5.01 (d, ³*J* = 3.5 Hz, 1H, OH), 4.83 (d, ³*J* = 7.2 Hz, 1H, OH), 4.78 (br, 1H, OH), 3.96 (s, 1H, HC3'), 3.64 – 3.57 (m, 2H, HC4', HC2'), 3.54 (d, ²*J* = 10.2 Hz, 1H, H_aC5'), 3.50 (dd, ²*J* = 10.3 Hz, ³*J* = 5.0 Hz, 1H, H_bC5'). **¹³C NMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 165.3 (C4), 155.7 (C2), 141.8 (C6), 93.9 (C5), 79.8 (C1'), 71.2 (C3'), 68.0 (C2'), 66.7 (C4'), 65.2 (C5'). **HRMS** (ESI+): calc.: [C₉H₁₄N₃O₅]⁺ 244.0928, found: 244.0927 [M+H]⁺. **IR** (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3426 (w), 3210 (m), 2922 (w), 1640 (vs), 1596 (vs), 1526 (m), 1489 (vs), 1400 (m), 1387 (m), 1368 (m), 1322 (w), 1300 (m), 1281 (m), 1269 (m), 1242 (m), 1224 (m), 1204 (s), 1132 (s), 1115 (m), 1094 (s), 1076 (s), 1039 (vs), 1018 (s), 991 (s), 970 (m), 800 (m), 781 (s), 660 (vs).

Synthesis of lüneburgite: $\text{Mg}_3(\text{H}_2\text{O})_6[\text{B}_2(\text{OH})_6(\text{PO}_4)_2]$

The synthesis was performed according to literature (48). Magnesium oxide (1 g, 25 mmol), dimagnesiumphosphate trihydrate (8.1 g, 46.5 mmol) and boric acid (9.2 g, 149 mmol) were refluxed in H_2O (200 ml) for 4 days. After cooling to rt, the colorless solid was filtered off to afford the product (9.5 g, 19.2 mmol, 83%). The mineral was analysed by XRD measurement to confirm the correct product (see Fig. S10).

Synthesis of struvite: $\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \times 6\text{H}_2\text{O}$

The synthesis was performed according to literature (49). A solution of $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ (50 mL, 1 M, 50 mmol) was added to a solution of MgCl_2 (50 mL, 1M, 50 mmol). The mixture was stirred for 15 min at room temperature. The solid was filtered off and washed with water to afford the product as a white solid (8.1 g). The mineral was analysed by XRD measurement to confirm the correct product (see Fig. S11).

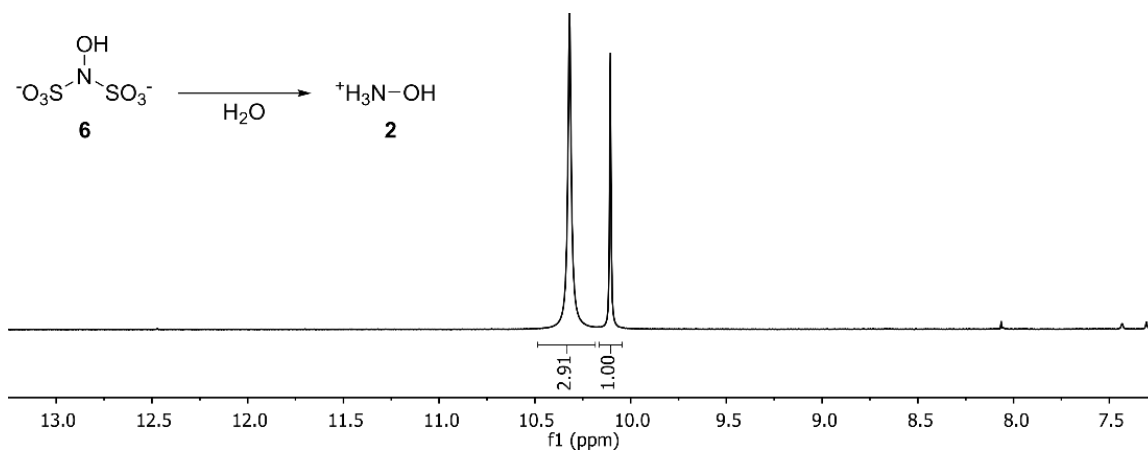


Fig. S1.

Hydrolysis of hydroxylamine disulfonate (**6**) affords hydroxylamine (**2**) as revealed by ¹H-NMR. Detailed information can be found in the aforementioned synthetic procedure.

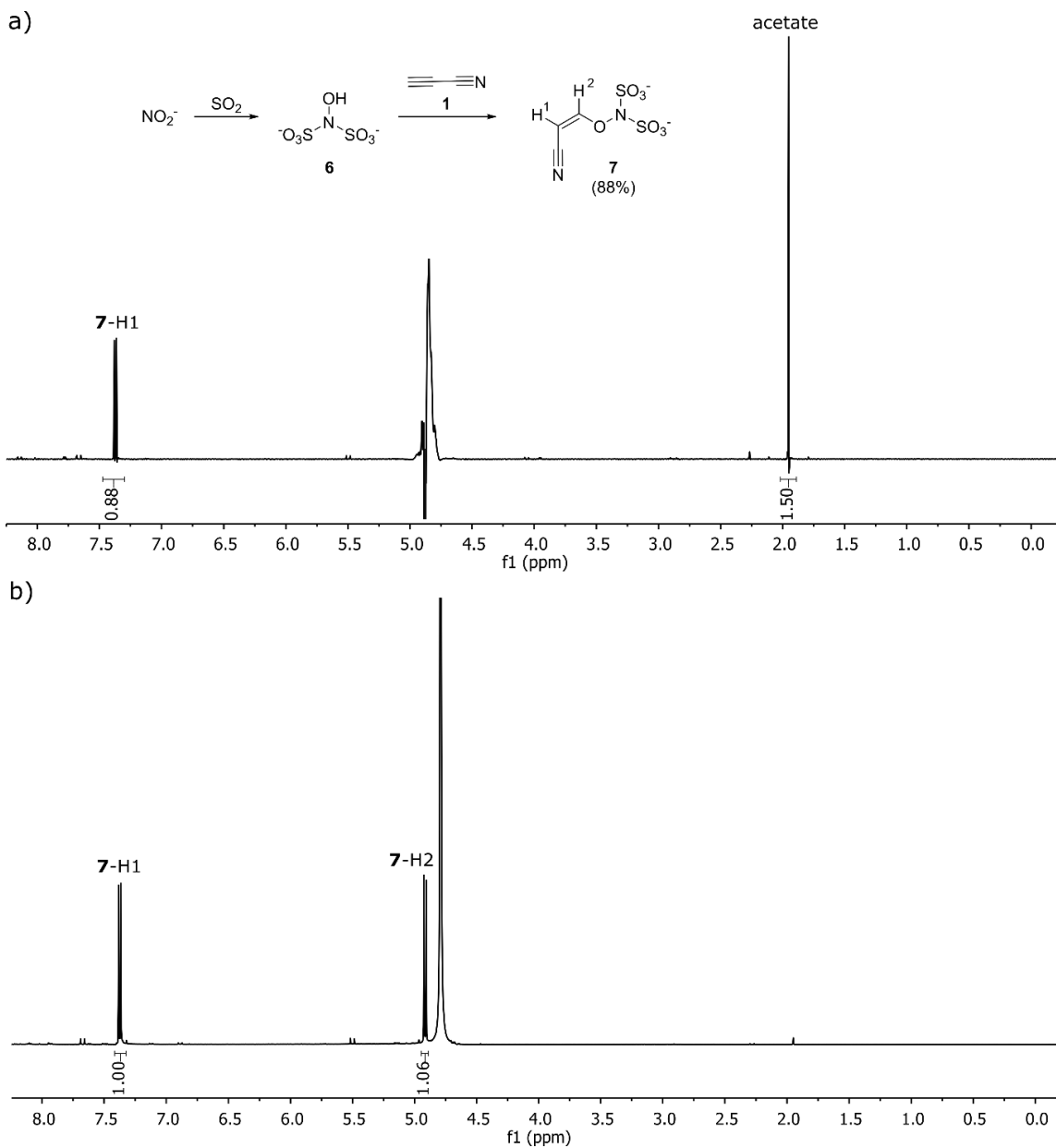


Fig. S2.

^1H NMR analysis for the formation of *cis*-7. a) Treatment of an aqueous nitrite solution with SO_2 afforded **6**, which further reacted with **1** to give adduct **7**. Detailed information can be found in the aforementioned procedure. ^1H -NMR spectroscopy in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1) reveals formation *cis*-7 (88%). Quantification was achieved using sodium acetate (0.5 eq) as reference standard. b) Since water suppression interferes with the H-2 signal of the *cis*-7 isomer, we isolated and spectroscopically characterized the compound in D_2O .

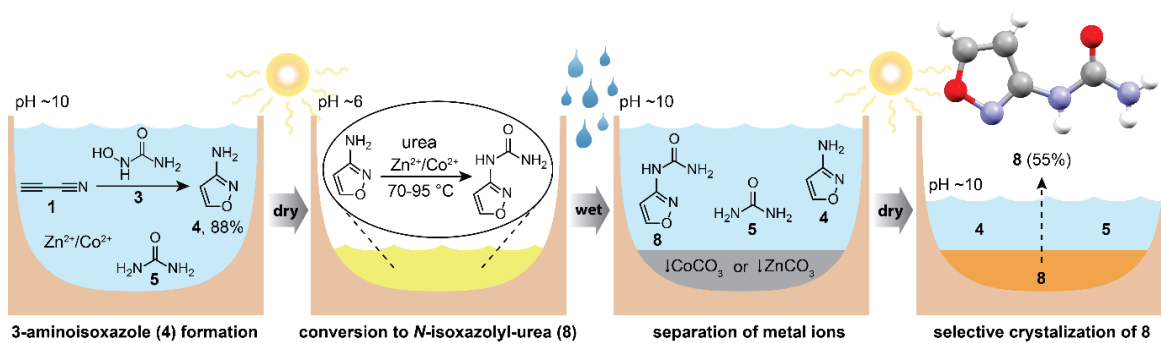


Fig. S3.

Plausible prebiotic scenario for the one-pot formation and enrichment of isoxazolyurea **8**.

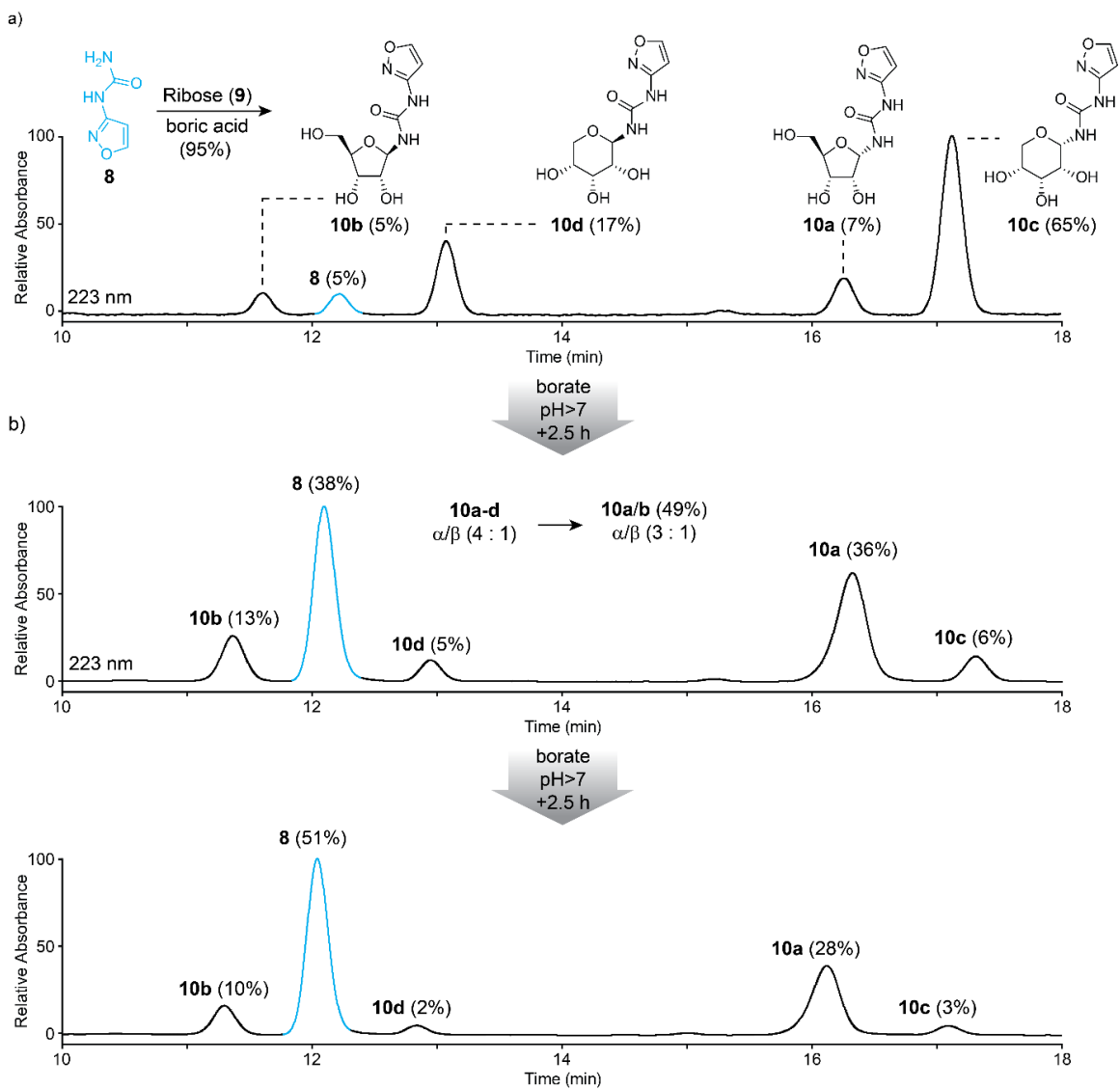


Fig. S4.

LC-MS analysis for the formation of **10a-d**. The UV-chromatograms at 223 nm are shown. a) Boric acid catalysed ribosylation of **8** affords the four expected α and β -anomers of isoxazolyl-urea as furanoside **10 a,b** or pyranoside **10c,d**. b) The mixture obtained in a) was heated in 125 mM borax at 95 °C for 2.5 h. Isomerization is also possible at lower temperature but with longer reaction time. The pyranoside products (**10c** and **d**) are converted into the furanoside products (**10a** and **b**). Further reaction gives **10a** and **b** as the only ribosides with only trace amounts of the pyranosides **10c** and **d** after 5 h.

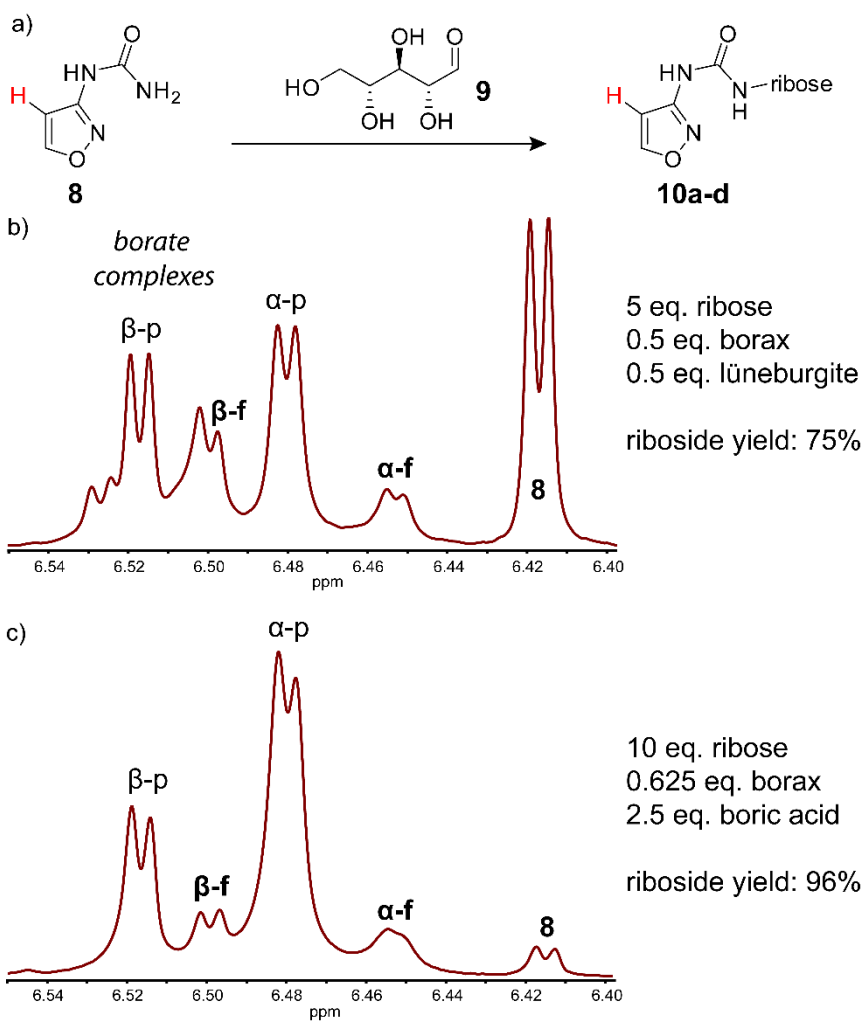
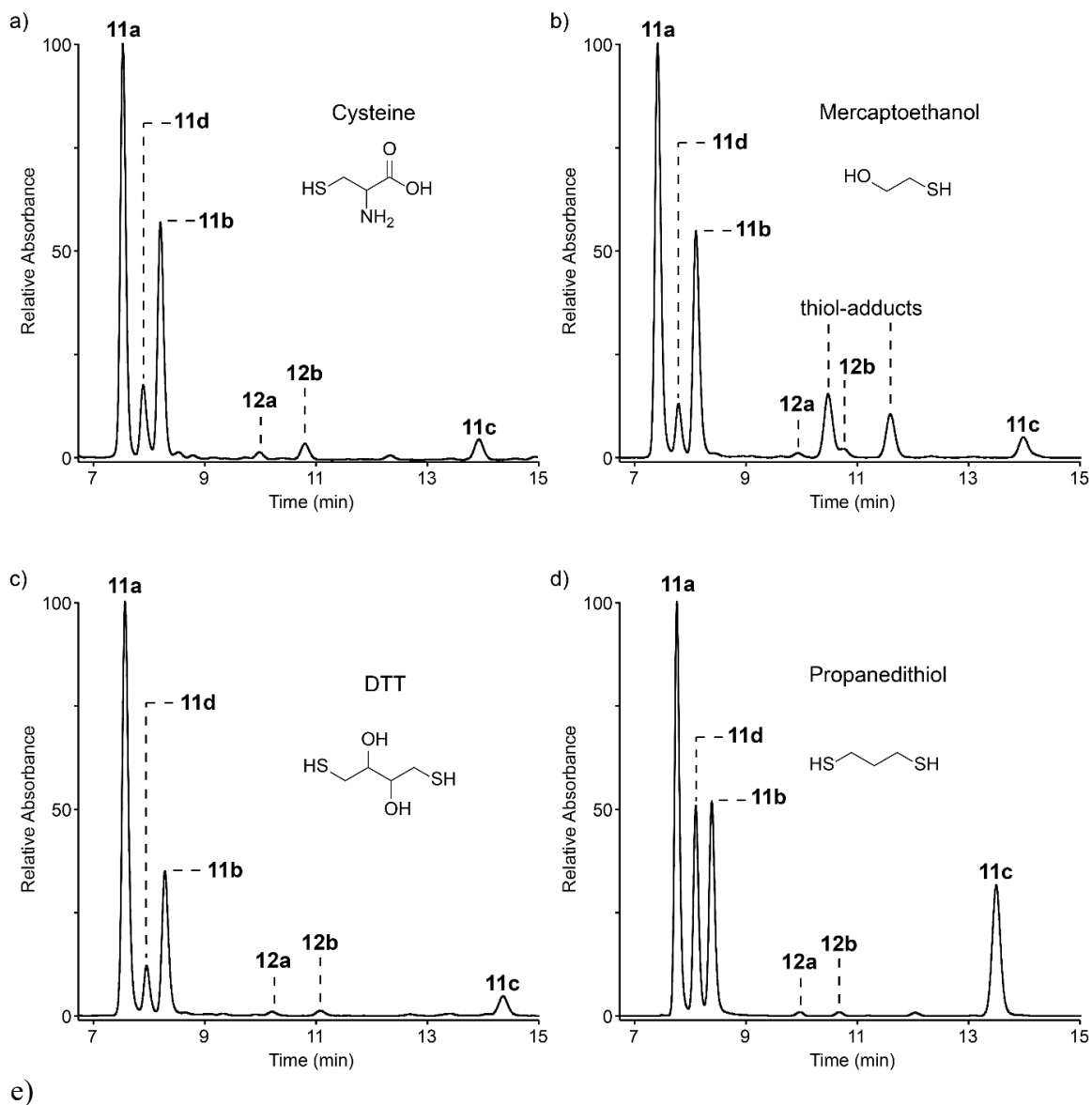


Fig. S5.

$^1\text{H-NMR}$ in D_2O after **8** was reacted with ribose under different conditions. The ribosylated product **10a-d** is obtained as a mixture of α - and β -anomers as either furanoside (f) or pyranoside (p). The $^1\text{H-NMR}$ signals observed correspond to the proton labelled in red. The yields are relative to the starting material **8**. a) reaction scheme. b) the slightly basic conditions are expected to give borate complexes that are overlapping with the free nucleosides. c) more acidic conditions lead to higher degree of glycosylation and no borate complexes.



e)

thiol	11a	11b	11c	11d	12a	12b
cysteine	37.2%	22.9%	3.2%	6.1%	0.5%	1.4%
mercaptoethanol	30.8%	18.2%	1.7%	2.6%	0.3%	0.4%
DTT	54.7%	19.8%	2.8%	5.4%	0.7%	1.0%
propanedithiol	26.0%	12.2%	11.0%	10.9%	0.2%	0.1%

Fig. S6.

Cytidine **11a-d** and uridine **12a/b** formation in the presence of different thiols. All reductions were performed with 0.001 eq. of soluble Fe^{2+} in 100 mM sodium carbonate, 50 mM borate buffer (pH 9.7). Reduction in the presence of different thiols: a) cysteine, b) mercaptoethanol, c) dithiothreitol (DTT) and d) propanedithiol. e) table with calculated yields for **11a-d** and **12a/b**. For mercaptoethanol the overall yield is significantly lower, probably due to formation of thiol-adducts as labeled in b).

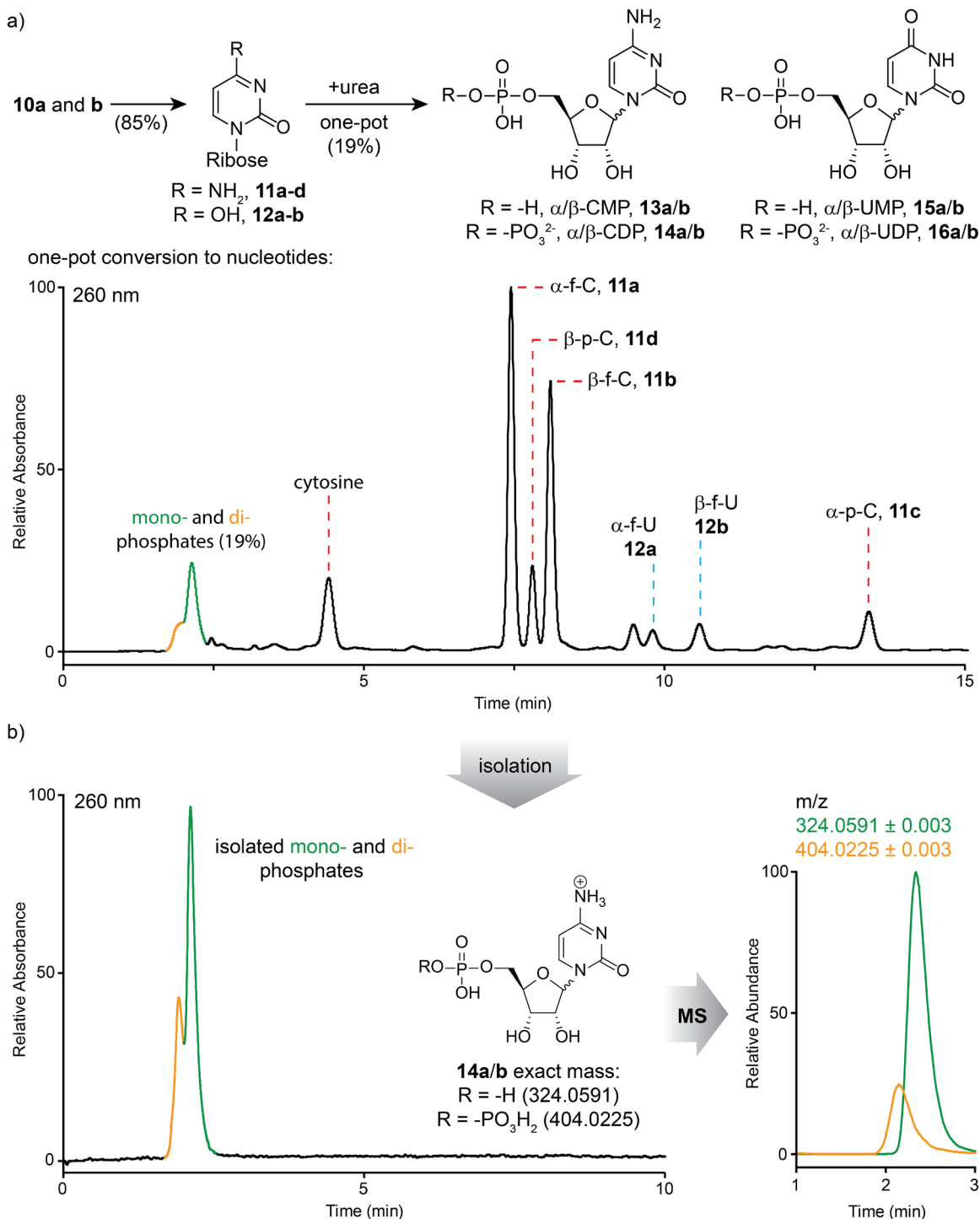


Fig. S7.

Prebiotic nucleotide synthesis in the presence of lueneburgite. a) Reaction scheme and full UV-chromatogram after nucleotide formation. An extract was shown in Fig. 5b in the main text. The yield was calculated relative to all cytidine isomers. The mono- (green) and di-phosphate (orange) peaks are highlighted. b) UV-chromatogram and corresponding mass (ESI+) for the isolated nucleotides.

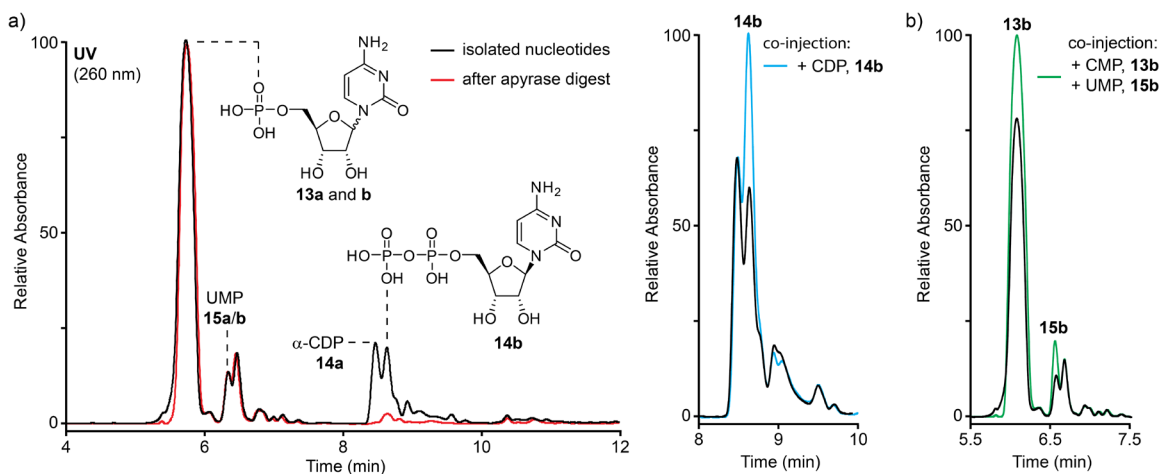


Fig. S8.

Confirmation of nucleotide structures from a prebiotic sample. a) LC-MS separation of phosphorylated nucleosides, isolated from a prebiotic reaction. The products were compared with a sample treated with apyrase. The di-phosphorylated peaks are clearly depleted in the treated sample (red line), proving the formation of pyrophosphates (left panel). Co-injection with 5'-cytidine-di-phosphate (**14b**, β -CDP) clearly confirmed formation of α - and β -CDP (right panel). b) Co-injection of 5'-cytidine and 5'-uridine-mono-phosphate (**13b** and **15b**, β -CMP and β -UMP) confirmed the formation of **13b** and **15b**. The peaks represent mixtures of the inseparable α - and β -anomers.

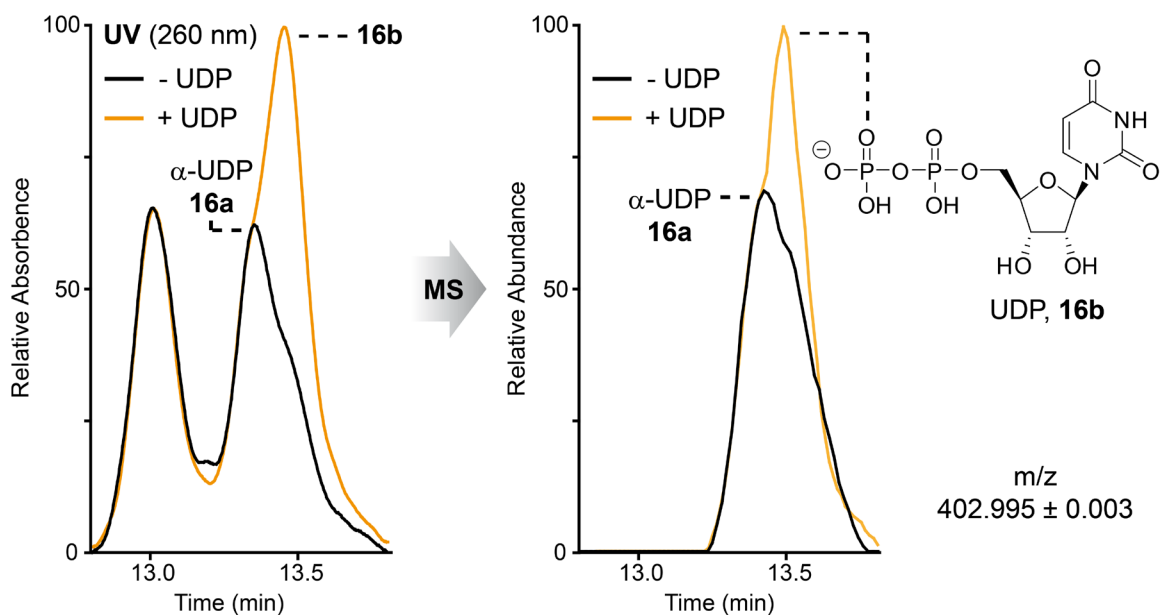


Fig. S9.

Co-injection study for β -5'-uridine-di-phosphate **16b**. For this experiment we used the same buffers as stated in the general information, but a different gradient: 0 \rightarrow 15 min, Buffer B 0% \rightarrow 10%. Co-injection was followed by UV and MS detection with commercially available material.

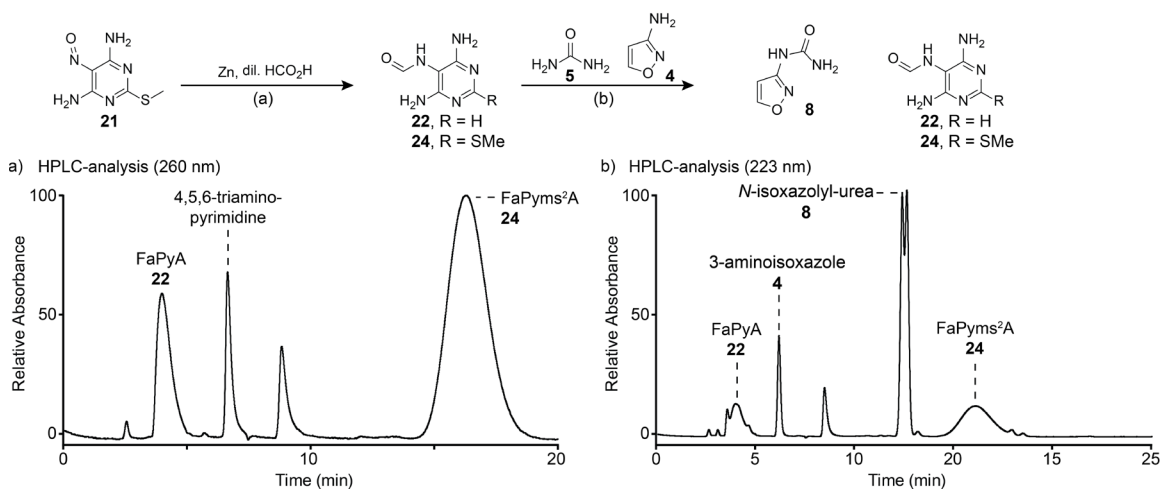


Fig. S10

Prebiotically linked syntheses of pyrimidine (**8**) and purine (**22**, **24**) precursors (detailed information can be found in the aforementioned procedure). a) prebiotically formed nitrosopyrimidine **21** was converted to **22** and **24** in the presence of Zn and dil. formic acid. The HPL-chromatogram of the reaction products is shown. b) The reaction from a) was directly used and a solution containing **4** and **5** was added. Upon dry-down the formation of **8** was observed in the presence of **22** and **24**. The HPL-chromatogram of the resulting products is shown.

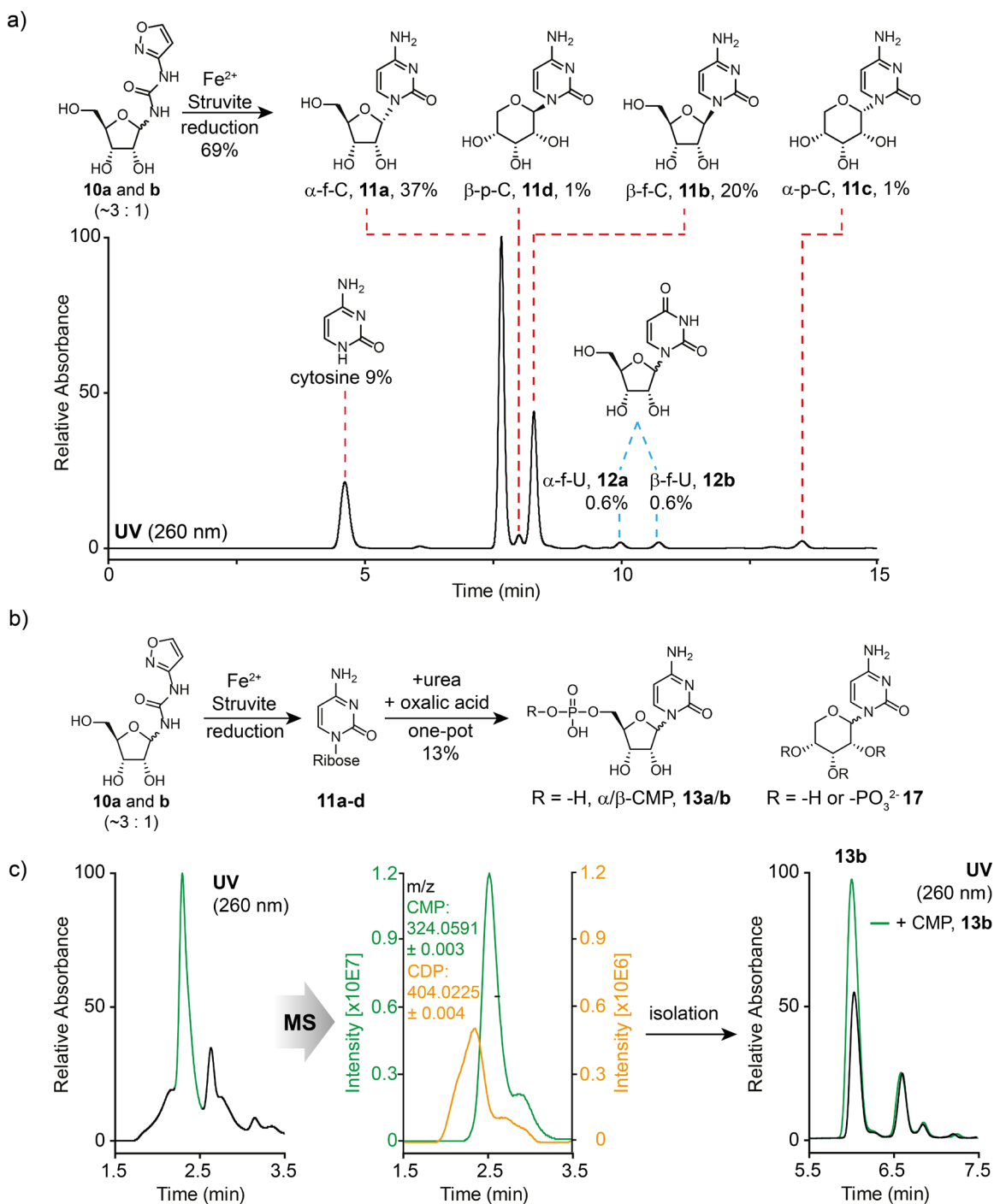


Fig. S11.

Formation of pyrimidine nucleotides from isoxazolyurea-ribosides with struvite. a) LC-MS analysis of pyrimidine nucleoside formation from compound **10a/b** in the presence of struvite. The UV-chromatogram at 260 nm is shown. The reduction of the isoxazole moiety in **10a/b** furnished the α and β -anomers as pyranoside (p) and furanside (f) isomers of cytidine (C, **11a-d**) or uridine (U, **12a/b**). b) One-pot Synthesis of cytidine mono- and di-phosphates (**13a/b-14a/b**) with struvite after urea and oxalic acid was

added to the reaction mixture shown in (a) and letting the mixture dry-down at 85°C for 20 h. c) LC-MS analysis of the corresponding nucleotide peaks and isolation from the prebiotic reaction. Co-injection studies confirmed formation of CMP (**13a/b**). The α - and β -anomers of CMP were not separable and therefore the UV peaks represent a mixture of both anomers.

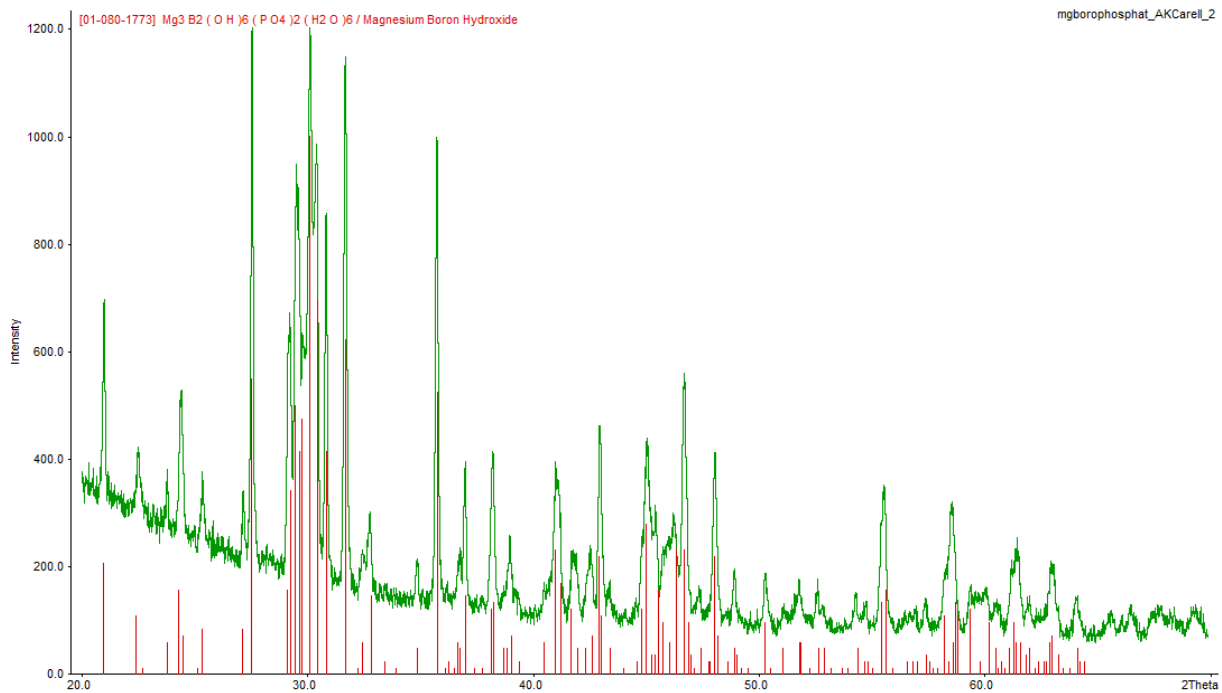


Fig. S12.

XRD measurement of synthetic lueneburgite (green) and comparison with database values (red).

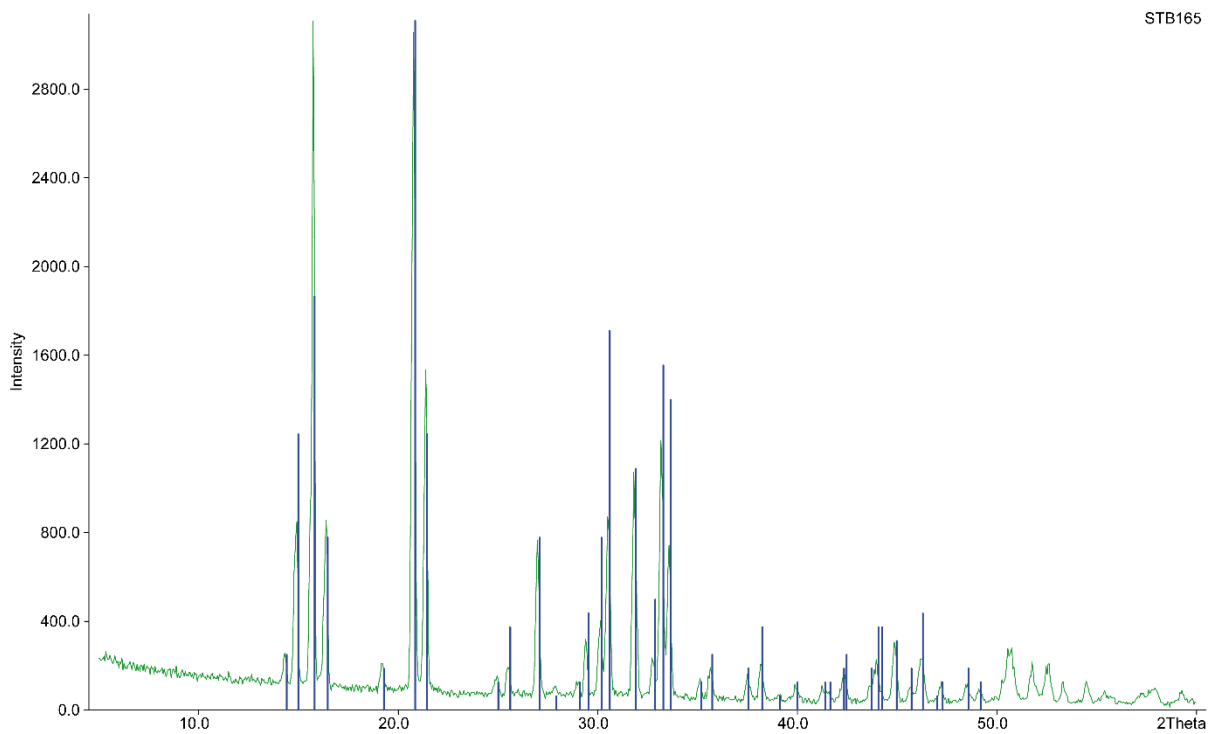


Fig. S13.

XRD measurement of synthetic struvite (green) and comparison with database values (blue).

References and Notes

1. J. A. Doudna, T. R. Cech, The chemical repertoire of natural ribozymes. *Nature* **418**, 222–228 (2002). [doi:10.1038/418222a](https://doi.org/10.1038/418222a) [Medline](#)
2. D. P. Horning, G. F. Joyce, Amplification of RNA by an RNA polymerase ribozyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **113**, 9786–9791 (2016). [doi:10.1073/pnas.1610103113](https://doi.org/10.1073/pnas.1610103113) [Medline](#)
3. J. Attwater, A. Raguram, A. S. Morgunov, E. Gianni, P. Holliger, Ribozyme-catalysed RNA synthesis using triplet building blocks. *eLife* **7**, e35255 (2018). [doi:10.7554/eLife.35255](https://doi.org/10.7554/eLife.35255) [Medline](#)
4. W. Gilbert, Origin of life: The RNA world. *Nature* **319**, 618 (1986). [doi:10.1038/319618a0](https://doi.org/10.1038/319618a0)
5. M. W. Powner, B. Gerland, J. D. Sutherland, Synthesis of activated pyrimidine ribonucleotides in prebiotically plausible conditions. *Nature* **459**, 239–242 (2009). [doi:10.1038/nature08013](https://doi.org/10.1038/nature08013) [Medline](#)
6. S. Becker, I. Thoma, A. Deutsch, T. Gehrke, P. Mayer, H. Zipse, T. Carell, A high-yielding, strictly regioselective prebiotic purine nucleoside formation pathway. *Science* **352**, 833–836 (2016). [doi:10.1126/science.aad2808](https://doi.org/10.1126/science.aad2808) [Medline](#)
7. H.-J. Kim, S. A. Benner, Prebiotic stereoselective synthesis of purine and noncanonical pyrimidine nucleotide from nucleobases and phosphorylated carbohydrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **114**, 11315–11320 (2017). [doi:10.1073/pnas.1710778114](https://doi.org/10.1073/pnas.1710778114) [Medline](#)
8. S. Stairs, A. Nikmal, D.-K. Bučar, S.-L. Zheng, J. W. Szostak, M. W. Powner, Divergent prebiotic synthesis of pyrimidine and 8-oxo-purine ribonucleotides. *Nat. Commun.* **8**, 15270 (2017). [doi:10.1038/ncomms15270](https://doi.org/10.1038/ncomms15270) [Medline](#)
9. R. Saladino, E. Carota, G. Botta, M. Kapralov, G. N. Timoshenko, A. Y. Rozanov, E. Krasavin, E. Di Mauro, Meteorite-catalyzed syntheses of nucleosides and of other prebiotic compounds from formamide under proton irradiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **112**, E2746–E2755 (2015). [doi:10.1073/pnas.1422225112](https://doi.org/10.1073/pnas.1422225112) [Medline](#)
10. J. F. Kasting, Earth's early atmosphere. *Science* **259**, 920–926 (1993). [doi:10.1126/science.11536547](https://doi.org/10.1126/science.11536547) [Medline](#)
11. R. M. Hazen, Paleomineralogy of the Hadean Eon: A preliminary species list. *Am. J. Sci.* **313**, 807–843 (2013). [doi:10.2475/09.2013.01](https://doi.org/10.2475/09.2013.01)
12. E. D. Swanner, N. J. Planavsky, S. V. Lalonde, L. J. Robbins, A. Bekker, O. J. Rouxel, M. A. Saito, A. Kappler, S. J. Mojzsis, K. O. Konhauser, Cobalt and marine redox evolution. *Earth Planet. Sci. Lett.* **390**, 253–263 (2014). [doi:10.1016/j.epsl.2014.01.001](https://doi.org/10.1016/j.epsl.2014.01.001)
13. P. B. Rimmer, O. Shorttle, Origin of Life's Building Blocks in Carbon- and Nitrogen-Rich Surface Hydrothermal Vents. *Life* **9**, 12 (2019). [doi:10.3390/life9010012](https://doi.org/10.3390/life9010012) [Medline](#)
14. W. Martin, J. Baross, D. Kelley, M. J. Russell, Hydrothermal vents and the origin of life. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**, 805–814 (2008). [doi:10.1038/nrmicro1991](https://doi.org/10.1038/nrmicro1991) [Medline](#)
15. E. Camprubi, S. F. Jordan, R. Vasiliadou, N. Lane, Iron catalysis at the origin of life. *IUBMB Life* **69**, 373–381 (2017). [doi:10.1002/iub.1632](https://doi.org/10.1002/iub.1632) [Medline](#)

16. S. A. Benner, H.-J. Kim, E. Biondi, in *Prebiotic Chemistry and Chemical Evolution of Nucleic Acids*, C. Menor-Salván, Ed. (Springer International Publishing, Cham, 2018), pp. 31–83.
17. S. Ranjan, Z. R. Todd, P. B. Rimmer, D. D. Sasselov, A. R. Babbín, Nitrogen Oxide Concentrations in Natural Waters on Early Earth. *Geochem. Geophys. Geosyst.* **20**, 2021–2039 (2019). [doi:10.1029/2018GC008082](https://doi.org/10.1029/2018GC008082)
18. S. Becker, C. Schneider, H. Okamura, A. Crisp, T. Amatov, M. Dejmek, T. Carell, Wet-dry cycles enable the parallel origin of canonical and non-canonical nucleosides by continuous synthesis. *Nat. Commun.* **9**, 163 (2018). [doi:10.1038/s41467-017-02639-1](https://doi.org/10.1038/s41467-017-02639-1) [Medline](#)
19. P. Thaddeus, The prebiotic molecules observed in the interstellar gas. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **361**, 1681–1687 (2006). [doi:10.1098/rstb.2006.1897](https://doi.org/10.1098/rstb.2006.1897) [Medline](#)
20. R. A. Sanchez, J. P. Ferris, L. E. Orgel, Cyanoacetylene in prebiotic synthesis. *Science* **154**, 784–785 (1966). [doi:10.1126/science.154.3750.784](https://doi.org/10.1126/science.154.3750.784) [Medline](#)
21. B. H. Patel, C. Percivalle, D. J. Ritson, C. D. Duffy, J. D. Sutherland, Common origins of RNA, protein and lipid precursors in a cyanosulfidic protometabolism. *Nat. Chem.* **7**, 301–307 (2015). [doi:10.1038/nchem.2202](https://doi.org/10.1038/nchem.2202) [Medline](#)
22. H. Kofod, B. Wickberg, A. Kjær, On the Isomerism of Hydroxyurea. I. Kinetics of the Reaction between Hydroxylammonium Ion and Cyanate Ion. *Acta Chem. Scand.* **7**, 274–279 (1953). [doi:10.3891/acta.chem.scand.07-0274](https://doi.org/10.3891/acta.chem.scand.07-0274)
23. K. B. Muchowska, S. J. Varma, J. Moran, Synthesis and breakdown of universal metabolic precursors promoted by iron. *Nature* **569**, 104–107 (2019). [doi:10.1038/s41586-019-1151-1](https://doi.org/10.1038/s41586-019-1151-1) [Medline](#)
24. V. S. Airapetian, A. Gloer, G. Gronoff, E. Hébrard, W. Danchi, Prebiotic chemistry and atmospheric warming of early Earth by an active young Sun. *Nat. Geosci.* **9**, 452–455 (2016). [doi:10.1038/ngeo2719](https://doi.org/10.1038/ngeo2719)
25. H. J. Cleaves, J. H. Chalmers, A. Lazcano, S. L. Miller, J. L. Bada, A reassessment of prebiotic organic synthesis in neutral planetary atmospheres. *Orig. Life Evol. Biosph.* **38**, 105–115 (2008). [doi:10.1007/s11084-007-9120-3](https://doi.org/10.1007/s11084-007-9120-3) [Medline](#)
26. D. P. Summers, S. Chang, Prebiotic ammonia from reduction of nitrite by iron (II) on the early Earth. *Nature* **365**, 630–633 (1993). [doi:10.1038/365630a0](https://doi.org/10.1038/365630a0) [Medline](#)
27. S. Ranjan, Z. R. Todd, J. D. Sutherland, D. D. Sasselov, Sulfidic Anion Concentrations on Early Earth for Surficial Origins-of-Life Chemistry. *Astrobiology* **18**, 1023–1040 (2018). [doi:10.1089/ast.2017.1770](https://doi.org/10.1089/ast.2017.1770) [Medline](#)
28. G. K. Rollefson, C. F. Oldershaw, The reduction of nitrites to hydroxylamine by sulfites. *J. Am. Chem. Soc.* **54**, 977–979 (1932). [doi:10.1021/ja01342a019](https://doi.org/10.1021/ja01342a019)
29. G. F. Joyce, The antiquity of RNA-based evolution. *Nature* **418**, 214–221 (2002). [doi:10.1038/418214a](https://doi.org/10.1038/418214a) [Medline](#)
30. D. M. Fialho, K. C. Clarke, M. K. Moore, G. B. Schuster, R. Krishnamurthy, N. V. Hud, Glycosylation of a model proto-RNA nucleobase with non-ribose sugars: Implications for

- the prebiotic synthesis of nucleosides. *Org. Biomol. Chem.* **16**, 1263–1271 (2018). [doi:10.1039/C7OB03017G](https://doi.org/10.1039/C7OB03017G) [Medline](#)
31. H.-J. Kim, Y. Furukawa, T. Kakegawa, A. Bitá, R. Scorei, S. A. Benner, Evaporite Borate-Containing Mineral Ensembles Make Phosphate Available and Regiospecifically Phosphorylate Ribonucleosides: Borate as a Multifaceted Problem Solver in Prebiotic Chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed.* **55**, 15816–15820 (2016). [doi:10.1002/anie.201608001](https://doi.org/10.1002/anie.201608001) [Medline](#)
 32. A. Ricardo, M. A. Carrigan, A. N. Olcott, S. A. Benner, Borate minerals stabilize ribose. *Science* **303**, 196–196 (2004). [doi:10.1126/science.1092464](https://doi.org/10.1126/science.1092464) [Medline](#)
 33. M. Kijima, Y. Nambu, T. Endo, Reduction of cyclic compounds having nitrogen-oxygen linkage by dihydrolipoamide-iron(II). *J. Org. Chem.* **50**, 1140–1142 (1985). [doi:10.1021/jo00207a052](https://doi.org/10.1021/jo00207a052)
 34. G. Wächtershäuser, Before enzymes and templates: Theory of surface metabolism. *Microbiol. Rev.* **52**, 452–484 (1988). [Medline](#)
 35. U. Trinks, A. Eschenmoser, ETH Zurich (1987; [doi:10.3929/ethz-a-000413538](https://doi.org/10.3929/ethz-a-000413538)).
 36. R. Krishnamurthy, On the Emergence of RNA. *Isr. J. Chem.* **55**, 837–850 (2015). [doi:10.1002/ijch.201400180](https://doi.org/10.1002/ijch.201400180)
 37. J. Liebig, F. Wöhler, Untersuchungen über die Cyansäure. *Ann. Phys.* **96**, 369–400 (1830). [doi:10.1002/andp.18300961102](https://doi.org/10.1002/andp.18300961102)
 38. M. Preiner *et al.*, A hydrogen dependent geochemical analogue of primordial carbon and energy metabolism. *bioRxiv* 682955 (2019).
 39. C. Bonfio, E. Godino, M. Corsini, F. Fabrizi de Biani, G. Guella, S. S. Mansy, Prebiotic iron–sulfur peptide catalysts generate a pH gradient across model membranes of late protocells. *Nat. Catal.* **1**, 616–623 (2018). [doi:10.1038/s41929-018-0116-3](https://doi.org/10.1038/s41929-018-0116-3)
 40. J. S. Teichert, F. M. Kruse, O. Trapp, Direct Prebiotic Pathway to DNA Nucleosides. *Angew. Chem. Int. Ed.* **58**, 9944–9947 (2019). [doi:10.1002/anie.201903400](https://doi.org/10.1002/anie.201903400) [Medline](#)
 41. J. Kofoed, J.-L. Reymond, T. Darbre, Prebiotic carbohydrate synthesis: Zinc-proline catalyzes direct aqueous aldol reactions of α -hydroxy aldehydes and ketones. *Org. Biomol. Chem.* **3**, 1850–1855 (2005). [doi:10.1039/b501512j](https://doi.org/10.1039/b501512j) [Medline](#)
 42. C. Meinert, I. Myrgorodska, P. de Marcellus, T. Buhse, L. Nahon, S. V. Hoffmann, L. S. d’Hendecourt, U. J. Meierhenrich, Ribose and related sugars from ultraviolet irradiation of interstellar ice analogs. *Science* **352**, 208–212 (2016). [doi:10.1126/science.aad8137](https://doi.org/10.1126/science.aad8137) [Medline](#)
 43. K. Usami, A. Okamoto, Hydroxyapatite: Catalyst for a one-pot pentose formation. *Org. Biomol. Chem.* **15**, 8888–8893 (2017). [doi:10.1039/C7OB02051A](https://doi.org/10.1039/C7OB02051A) [Medline](#)
 44. S. Naiditch, D. M. Yost, The Rate and Mechanism of the Hydrolysis of Hydroxylamine Disulfonate Ion. *J. Am. Chem. Soc.* **63**, 2123–2127 (1941). [doi:10.1021/ja01853a028](https://doi.org/10.1021/ja01853a028)
 45. D. H. Shannahoff, R. A. Sanchez, 2,2-Anhydropyrimidine nucleosides. Novel syntheses and reactions. *J. Org. Chem.* **38**, 593–598 (1973). [doi:10.1021/jo00943a040](https://doi.org/10.1021/jo00943a040) [Medline](#)

46. R. M. Davidson, E. White, S. A. Margolis, B. Coxon, Synthesis of nitrogen-15-labeled 2-amino(glycofurano)oxazolines via glycosylamine intermediates. *Carbohydr. Res.* **116**, 239–254 (1983). [doi:10.1016/0008-6215\(83\)88113-0](https://doi.org/10.1016/0008-6215(83)88113-0)
47. R. U. Lemieux, T. L. Nagabhushan, B. Paul, Relationship of ^{13}C to Vicinal ^1H Coupling to the Torsion Angle in Uridine and Related Structures. *Can. J. Chem.* **50**, 773–776 (1972). [doi:10.1139/v72-120](https://doi.org/10.1139/v72-120)
48. W. Berdesinski, Synthetische Darstellung von Lüneburgit. *Naturwissenschaften* **38**, 476–477 (1951). [doi:10.1007/BF00622085](https://doi.org/10.1007/BF00622085)
49. V. V. Vol'khin, D. A. Kazakov, G. V. Leont'eva, Y. V. Andreeva, E. A. Nosenko, M. Y. Siluyanova, Synthesis of struvite ($\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) and its use for sorption of nickel ions. *Russ. J. Appl. Chem.* **88**, 1986–1996 (2015). [doi:10.1134/S10704272150120149](https://doi.org/10.1134/S10704272150120149)

Anhang B

Supplementary Information

The Origin of Biomolecules Under Early Earth Conditions

Jonas Feldmann^{1#}, Stefan Wiedemann^{1#}, Sidney Becker^{1,2} and Thomas Carell^{1*}

Affiliations:

¹ Department of Chemistry, Ludwig-Maximilians-Universität München, Butenandtstrasse 5-13, 81377 München, Germany

² Current address: Max Planck Institute of Molecular Physiology, Department of Chemical Biology, Otto-Hahn-Strasse 11, 44227 Dortmund, Germany

These authors contributed equally.

* Corresponding author

Tel.: 0049 (0)89 218077755

Fax.: 0049 (0)89 218077756

E-Mail: Thomas.carell@lmu.de

www.carellgroup.de

Materials and Methods

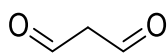
General Information

Chemicals were purchased from Sigma-Aldrich, Fluka, ABCR, Carbosynth, TCI or Acros organics and used without further purification. The solvents were of reagent grade or purified by distillation. Chromatographic purification of products was accomplished using flash column chromatography on Merck Geduran Si 60 (40-63 μm) silica gel (normal phase). ^1H - and ^{13}C -NMR spectra were recorded on Bruker ARX 300, Varian VXR400S, Varian Inova 400, Bruker AMX 600 and Bruker AVIIIHD 400 spectrometers and calibrated to the residual solvent peak. Multiplicities are abbreviated as follows: s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, m = multiplet, br = broad. High-resolution ESI spectra were obtained on the mass spectrometer Thermo Finnigan LTQ FT-ICR. IR measurements were performed on Perkin Elmer Spectrum BX FT-IR spectrometer with a diamond-ATR (Attenuated Total Reflection) setup. Melting points were measured on a Büchi B-540 device. For preparative HPLC purification a Waters 1525 binary HPLC Pump in combination with a Waters 2487 Dual Absorbance Detector was used, with a Nucleosil 100-7 C18 reversed phase column. The prebiotic reactions were analyzed by LC-ESI-MS on a Thermo Finnigan LTQ Orbitrap XL and were chromatographed by a Dionex Ultimate 3000 HPLC system. All chromatographic separations were performed on an Interchim Uptisphere120 3HDO C18 column with a flow of 0.15 ml/min and a constant column temperature of 30 °C. Eluting buffers were buffer A (2 mM HCOONH_4 in H_2O (pH 5.5)) and buffer B (2 mM HCOONH_4 in $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ 20/80 (pH 5.5)). The gradient for isoxazole or pyrimidine nucleosides containing compounds and nucleosides was 0 \rightarrow 25 min, 0% \rightarrow 10% buffer B. The gradient for samples containing pyrimidine- and purine nucleosides was 0 \rightarrow 10 min, 0% \rightarrow 2%, 10 \rightarrow 40 min, 2% \rightarrow 10% buffer B. The elution was monitored at 223 nm, 243 nm and 260 nm (Dionex Ultimate 3000 Diode Array Detector). The gradient for one-pot guanidine formation was 0 \rightarrow 30 min, 40% \rightarrow 80%, buffer B. The elution was monitored at 260nm, 223nm, 230nm and 225nm. The chromatographic eluent was directly injected into the ion source without prior splitting. Ions were scanned by use of a positive polarity mode over a full-scan range of m/z 80-500 with a resolution of 30000. The synthetic standards for the co-injection experiments were synthesized in our lab according to reported literature¹⁻⁸ or purchased. The X-ray intensity data were measured on a Bruker D8 Venture TXS system equipped with a multilayer mirror monochromator and a Mo $K\alpha$ rotating anode X-ray tube ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$). The frames were integrated with the Bruker SAINT software package.⁹ Data

were corrected for absorption effects using the Multi-Scan method (SADABS).¹⁰ The structure was solved and refined using the Bruker SHELXTL Software Package.¹¹ All C-bound hydrogen atoms have been calculated in ideal geometry riding on their parent atoms while the N-bound hydrogen atoms have been refined freely. The figures have been drawn at the 50% ellipsoid probability level.¹²

Purine Nucleosides

Malondialdehyde (9)

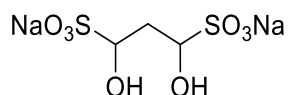


Synthetic reference:

Monohydrate sodium salt of 9: In a modified procedure of Grabowski and Autrey,³ an emulsion of 1,1,3,3-tetraethoxypropane (95% purity; 115 mL, 450 mmol, 1.0 eq) in 1 M aq. HCl (40 mL) was stirred vigorously at r.t. for 90 min. The pH was adjusted to 12 with 5 M aq. NaOH (~ 50 mL) and acetone (750 mL) was added under stirring to allow precipitation. The mixture was stirred at 0 °C for 1.5 h and filtered. The residue was washed with acetone (100 mL) and dried under hv for 1 h to obtain a yellowish solid (25.2 g). The crude product was suspended in H₂O (30 mL) and vigorously stirred at r.t. for 20 min. After filtration, the residue was washed with acetone (100 mL) and dried under hv for 1 h to obtain an off-white powder (9.95 g). The crude product was again suspended in H₂O (9 mL) and vigorously stirred at r.t. for 20 min. After filtration, the residue was washed with acetone (100 mL) and dried under hv for 5 d to obtain the pure monohydrate sodium salt of malondialdehyde (3.36 g, 30.0 mmol, 7%) as a white powder. A 1 M aq. stock solution was prepared and stored aliquoted at -20 °C.

mp: 245 °C. **¹H-NMR** (400 MHz, D₂O) δ 8.62 (d, *J* = 10.1 Hz, 2H, CHO), 5.28 (t, *J* = 10.1 Hz, 1H, CH⁻). **¹³C-NMR** (101 MHz, D₂O) δ 192.9 (CHO), 109.5 (CH⁻). **IR** (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3334 (w), 2774 (w), 1718 (w), 1581 (s), 1365 (s), 1268 (s), 1164 (s), 1020 (m), 852 (w), 838 (m), 813 (s), 799 (w). **HRMS** (ESI): calc.: [C₃H₃O₂]⁻ 71.0139, found: 71.0137. **Elemental analysis**: Calc. (found) for C₃H₅NaO₃: C, 32.16 (31.65); H, 4.50 (4.46); Na, 20.52 (20.49).

Sodium 1,3-dihydroxypropane-1,3-disulfonate (**17**)



Synthetic reference:

An emulsion of 1,1,3,3-tetraethoxypropane (2.5 mL g, 10.0 mmol, 1.0 eq) in H₂O (2.0 mL) and aq. 2 M HCl (1.0 mL) was stirred vigorously at r.t. for 90 min. A solution of NaHSO₃ (2.08 g, 20.0 mmol, 2.0 eq) in H₂O (5 mL) was added dropwise and the resulting suspension was stirred at r.t. for 20 min. After filtration, the residue was washed with EtOH and Et₂O, and dried under high vacuum. Sodium 1,3-dihydroxypropane-1,3-disulfonate (**17**; 2.77 g, 9.89 mmol, quant.) was obtained as a white solid.

NMR analysis revealed a diastereomeric ratio of *dr* = 60 (*R,R* and *S,S*) : 40 (*meso*).

¹H-NMR (400 MHz, D₂O) δ 4.66 (dd, *meso*, *J* = 8.0, 5.1 Hz, 2H, CH), 4.58 (dd, *R,R* and *S,S*, *J* = 8.1, 5.4 Hz, 2H, CH), 2.57 (dt, *meso*, *J* = 14.7, 5.1 Hz, 1H, CH₂), 2.26 (dd, *R,R* and *S,S*, *J* = 8.1, 5.4 Hz, 2H, CH₂), 2.07 (dt, *meso*, *J* = 14.7, 8.0 Hz, 1H, CH₂). **¹³C-NMR** (101 MHz, D₂O) δ 81.17 (*meso*, CH), 79.99 (*R,R* and *S,S*, CH), 34.39 (*meso*, CH₂), 33.30 (*R,R* and *S,S*, CH₂). **IR** (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3541 (w), 3432 (w), 3325 (w), 1645 (mw), 1276 (w), 1181 (s), 1099 (m), 1049 (m), 1026 (s), 990 (w), 949 (w), 884 (w), 750 (w), 660 (m). **HRMS** (ESI): calc.: [C₃H₆NaO₈S₂]⁻ 256.9407, found: 256.9406.

Prebiotic formation from malondialdehyde (**9**):

A solution of malondialdehyde (**9**) sodium salt monohydrate (40.0 mM) and NaHSO₃ (100 mM, 2.5 eq.) in H₂O (1.0 mL) was acidified with 2 M aq. HCl to pH 5.5. The solution was incubated at 25 °C and 500 rpm under a nitrogen flow to allow water to evaporate. After evaporation to dryness, the remaining solid was taken up in D₂O (1 mL) and analyzed by NMR spectroscopy using sodium acetate as an internal standard. The yield of sodium 1,3-dihydroxypropane-1,3-disulfonate (**17**) was found to be quantitative (Figure S1).

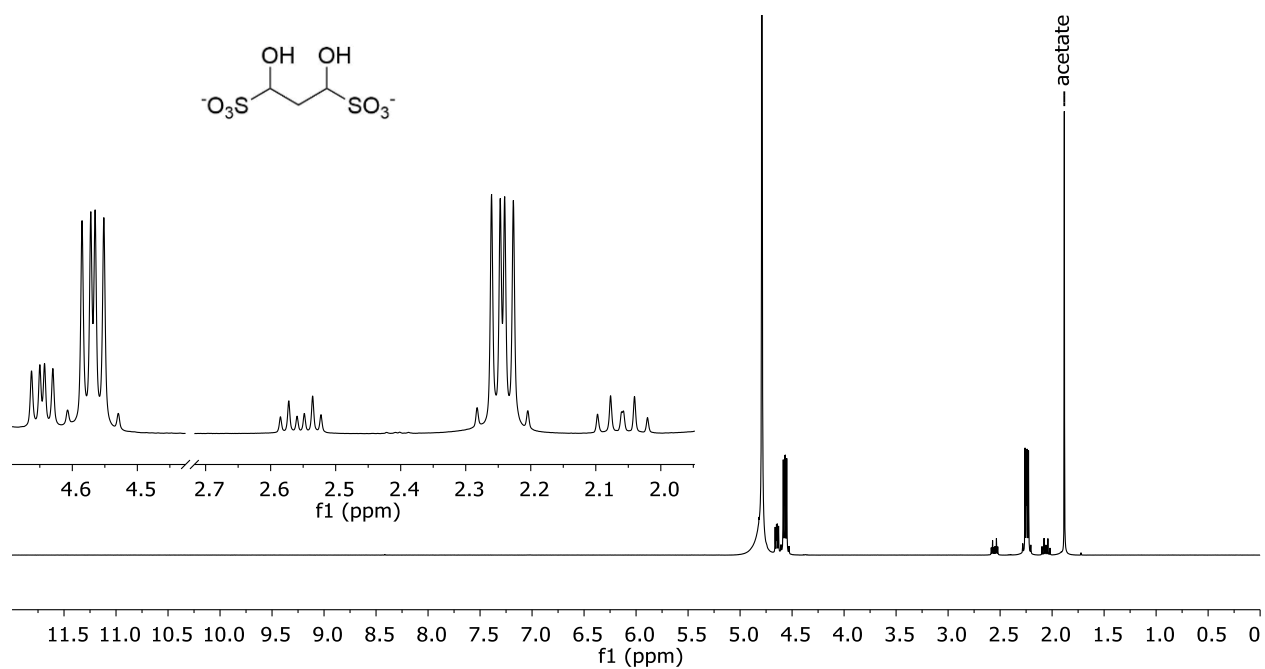
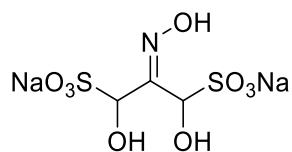


Figure S1: $^1\text{H-NMR}$ spectrum (400 MHz, D_2O , 0.0–12.0 ppm) of prebiotically enriched 1,3-dihydroxypropane-1,3-disulfonate (**17**).

Sodium 1,3-dihydroxy-2-(hydroxyimino)propane-1,3-disulfonate (27)



Synthetic reference:

An emulsion of 1,1,3,3-tetraethoxypropane (12.0 mL, 50.0 mmol, 1.0 eq) in 1 M aq. HCl (60 mL, 60 mmol, 1.2 eq) was stirred vigorously at r.t. for 2 h. The reaction mixture was treated with a solution of NaOAc · 3 H₂O (8.16 g, 60.0 mmol, 1.2 eq) in H₂O (20 mL) at 0 °C to adjust the pH to 2.5. A solution of NaNO₂ (4.14 mg, 60.0 mmol, 1.2 eq) in H₂O (10 mL) was added dropwise at 0 °C and the mixture was stirred at r.t. for 60 min. The reaction mixture was extracted with EtOAc (2 x 70 mL). The combined org. phases were treated with a solution of NaHSO₃ (10.4 g, 100 mmol, 2.2 eq) in H₂O (100 mL) and the emulsion was stirred vigorously at r.t. for 30 min. The aqueous phase was lyophilized to afford the crude product (6.40 g) in the presence of inorganic salts as an off-white powder.

NMR analysis revealed a diastereomeric ratio of $dr = 67$ (*R,R* and *S,S*) : 33 (*R,E,S* and *R,Z,S*).

¹H-NMR (400 MHz, D₂O) δ 5.93 (s, *R,R* and *S,S*, 1H, CH), 5.59 (s, *R,E,S* and *R,Z,S*, 1H, CH), 5.47 (s, *R,R* and *S,S*, 1H, CH), 5.33 (s, *R,E,S* and *R,Z,S*, 1H, CH). **¹³C-NMR** (101 MHz, D₂O) δ 150.85 (*R,R* and *S,S*, CNOH), 149.34 (*R,E,S* and *R,Z,S*, CNOH), 82.80 (*R,E,S* and *R,Z,S*, CH), 82.25 (*R,E,S* and *R,Z,S*, CH), 79.44 (*R,R* and *S,S*, CH), 76.58 (*R,R* and *S,S*, CH). **IR** (cm⁻¹): $\tilde{\nu} = 3252$ (w), 1634 (w), 1184 (s), 1036 (s), 863 (m).

Prebiotic formation:

A solution of malondialdehyde (**9**) sodium salt monohydrate (40.0 mM) and NaNO₂ (50.0 mM) in dil. AcOH (1% in H₂O; 1 mL) was incubated at r.t. and 500 rpm for 30 min. The mixture was then treated with NaHSO₃ (100 mM) and incubated at r.t. and 500 rpm for 30 min. For prebiotic enrichment, the reaction mixture was left at 25 °C and 500 rpm under a nitrogen flow to allow water to evaporate. After evaporation to dryness, the remaining solid was taken up in D₂O and quantified by NMR spectroscopy using malonic acid (MA) as internal standard (Figure S2). The yield was found to be 48%.

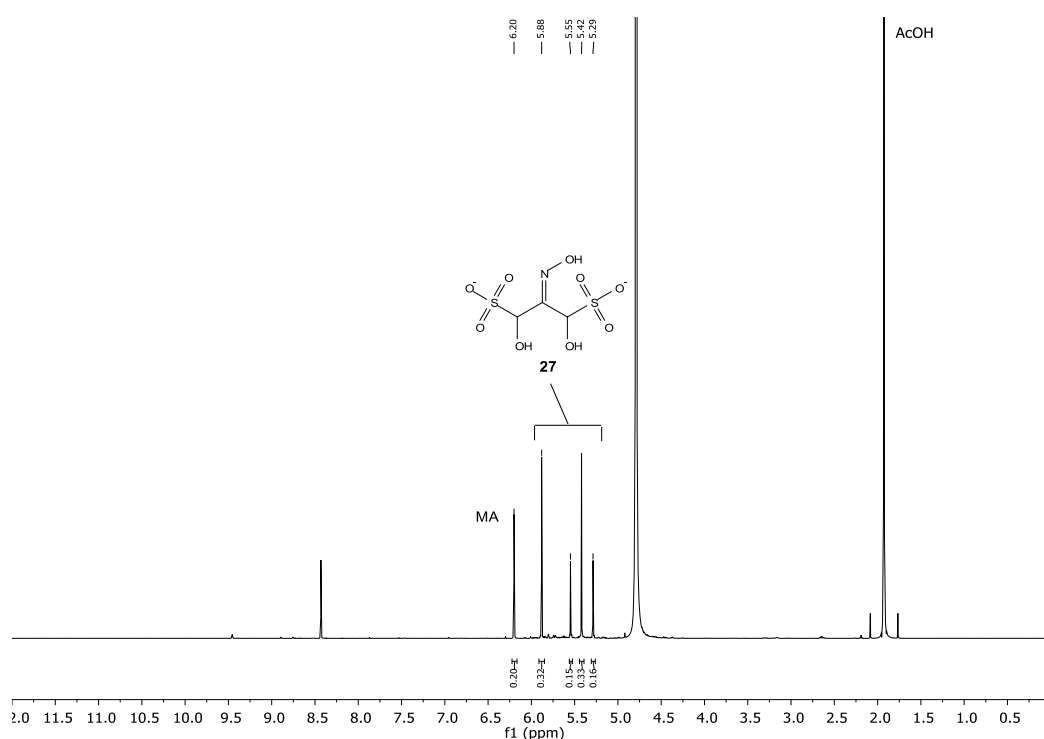
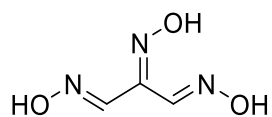


Figure S2: ¹H-NMR spectrum (400 MHz, D₂O, 0.0–12.0 ppm) of prebiotically enriched 1,3-dihydroxy-2-(hydroxyimino)propane-1,3-disulfonate (**27**).

(Hydroxyimino)malondialdoxime (**28**)



Synthetic reference:

An emulsion of 1,1,3,3-tetraethoxypropane (47.9 mL, 200 mmol, 1.0 eq) in 1 M aq. HCl (220 mL, 220 mmol, 1.1 eq) was stirred vigorously at r.t. for 30 min. The yellowish mixture was cooled to 0 °C and treated with a solution NaOAc · 3 H₂O (29.9 g, 220 mmol, 1.1 eq.) in H₂O (80 mL). A solution of NaNO₂ (15.2 g, 220 mmol, 1.1 eq.) in H₂O (40 mL) was added dropwise at 0 °C and the mixture was stirred at r.t. for 45 min. After the addition of NH₂OH (50% in H₂O; 27.0 mL, 440 mmol, 2.2 eq), the orange solution was stirred at r.t. for 60 min and 0 °C for another 60 min, during which a precipitate formed. The reaction mixture was filtered, and the residue was washed with H₂O. After drying under vacuum, (hydroxyimino)malondialdoxime (**28**; 12.6 g, 96.1 mmol, 48%) was obtained as a beige solid.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.21 (s, 1H, OH), 11.92 (s, 1H, OH), 11.54 (s, 1H, OH), 8.14 (s, 1H, CH), 7.79 (s, 1H, CH). **¹³C-NMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 146.02 (C2), 144.07 (CH), 139.00 (CH). **IR** (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3197 (m), 1474 (w), 1438 (w), 1392 (w), 1322 (w), 1279 (m), 1046 (m), 970 (s), 932 (s), 762 (m), 728 (s). **HRMS** (ESI⁺): calc.: [C₃H₆N₃O₃]⁺ 132.0404, found: 132.0406.

Prebiotic formation:

A solution of malondialdehyde (**9**) sodium salt monohydrate (40.0 mM) and NaNO₂ (50.0 mM) in dil. AcOH (1% in H₂O; 1 mL) was incubated at r.t. and 500 rpm for 30 min. The mixture was then treated with NH₂OH **7** (100 mM) and incubated at r.t. and 500 rpm for 30 min. The reaction was monitored via ¹H-NMR (Figure S3). For prebiotic enrichment, the reaction mixture was left at 25 °C and 500 rpm under a nitrogen flow to allow water to evaporate. After evaporation to dryness, the remaining solid was taken up in D₂O and quantified by NMR spectroscopy using malonic acid (MA) as internal standard (Figure S4). The yield was found to be 50%.

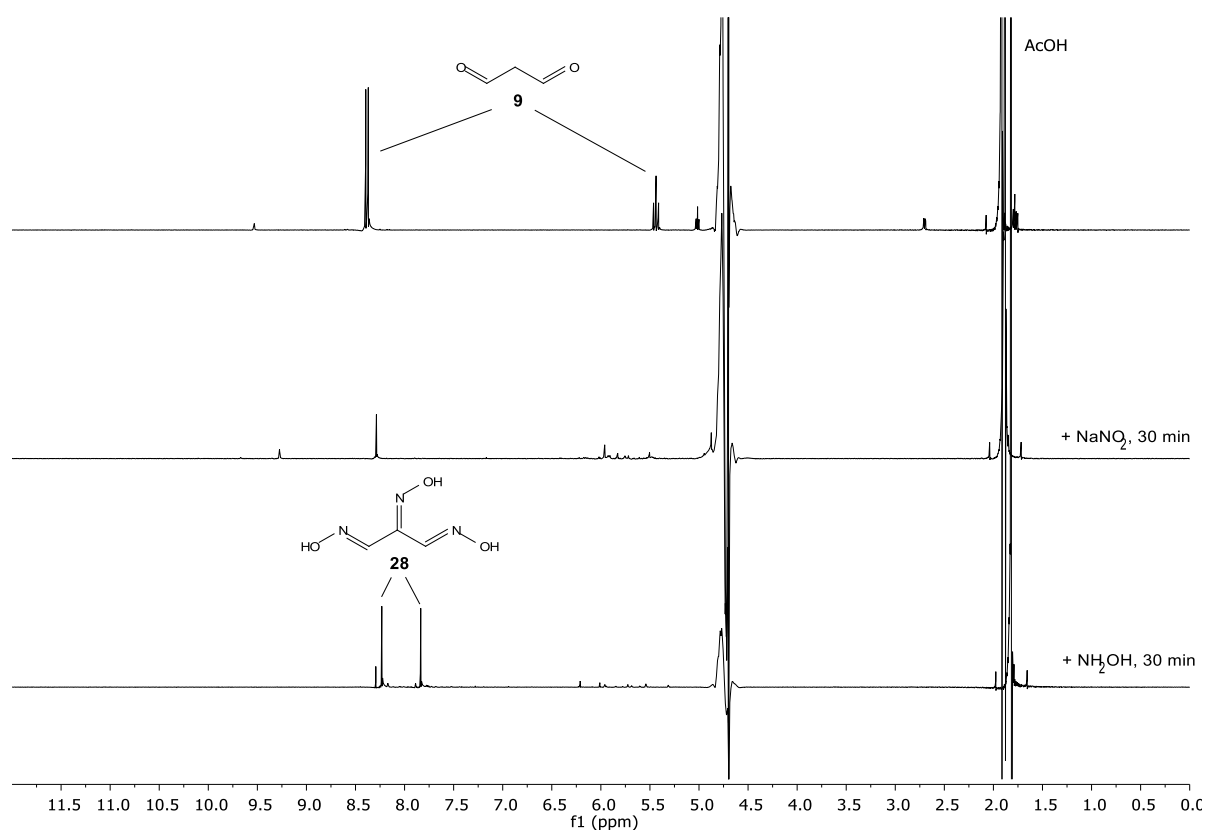


Figure S3: Conversion of malondialdehyde (**9**) to (hydroxyimino)malondialdoxime (**28**). ¹H-NMR spectra (400 MHz, D₂O, 0.0–12.0 ppm) before the addition of sodium nitrite (top); 30 min after the addition of sodium nitrite (middle); and 30 min after the addition of hydroxylamine (bottom).

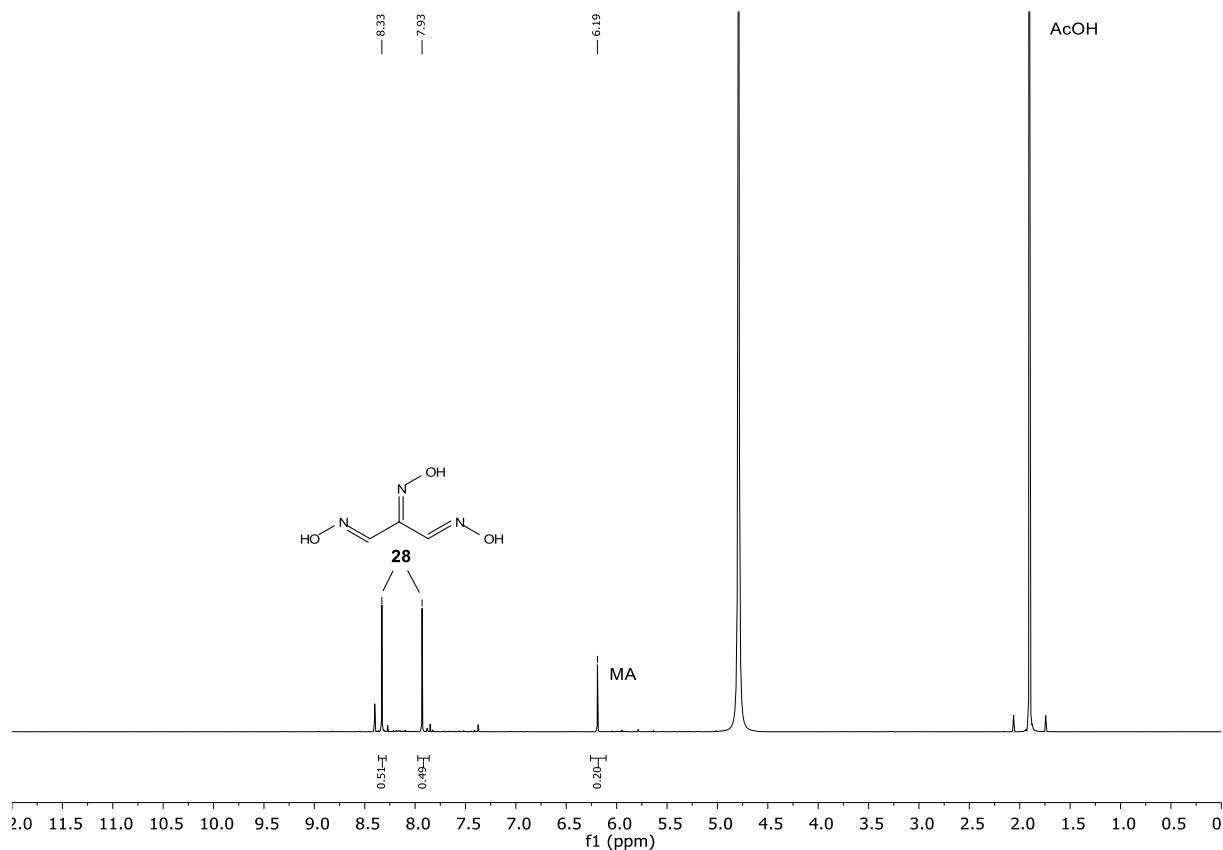
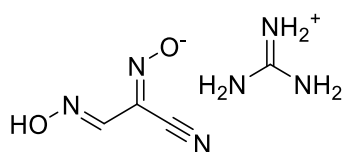


Figure S4: $^1\text{H-NMR}$ spectrum (400 MHz, D_2O , 0.0–12.0 ppm) of prebiotically enriched (hydroxyimino)malondialdoxime (**28**).

Guanidinium (**12**) salt of *N*-hydroxy-2-(hydroxyimino)acetimidoyl cyanide (**29**)

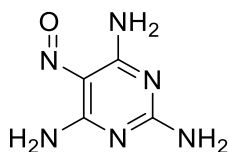


Prebiotic formation:

(Hydroxyimino)malondialdoxime (**28**; 3.93 g, 30.0 mmol, 1.0 eq) and guanidinium (**12**) carbonate (2.70 g, 30.0 mmol, 1.0 eq) were dissolved in H_2O (150 mL) in a 200 mL beaker at 60 °C. The solution was kept at 60 °C under an N_2 flow until the mixture was concentrated to 30 mL. The reaction mixture was placed in a fridge for 1 week open to the air. The orange crystals formed were filtered off to give the monohydrate of the desired salt (2.91 g, 15.3 mmol, 51%).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.15 (s, 1H, CH), 7.12 (s, 6H, guanidinium). **¹³C-NMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 157.94 (guanidinium), 148.53 (CH), 126.15 (C2), 114.14 (CN). **IR** (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3417 (m), 3350 (m), 3127 (m), 2210 (m), 1661 (s), 1575 (m), 1429 (s), 1256 (m), 1132 (s), 970 (s), 924 (s), 802 (s), 676 (s). **Crystallographic data:** Figure S29.

5-Nitrosopyrimidine-2,4,6-triamine (30)



Prebiotic formation:

A suspension of (hydroxyimino)malondialdoxime (**28**; 65.5 mg, 500 μmol, 1.0 eq) and guanidinium (**12**) carbonate (90.1 mg, 500 μmol, 1.0 eq) in H₂O (500 μL) was left at 159 °C* for 20 min open to the air to allow water to evaporate. The residue was taken up in H₂O (3 mL) and the red solids were collected and dried to give 5-nitrosopyrimidine-2,4,6-triamine (32 mg, 208 μmol, 42%). The ¹H-NMR spectrum is shown in Figure S5.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.25 (s, 1H, NH), 8.15 (s, 1H, NH), 7.81 – 7.67 (m, 1H, NH), 7.35 (s, 1H, NH), 7.20 (s, 2H, NH₂). **¹³C-NMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 166.11, 164.91, 151.02, 137.62. **IR** (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 1624 (s), 1520 (s), 1370 (s), 1253 (m), 1160 (s), 994 (m), 785 (s), 752 (m). **HRMS** (EI): calc.: [C₄H₆N₆O] 154.0603, found: 154.0599.

*) Melting point of the guanidine salt of (hydroxyimino)malononitrile.²

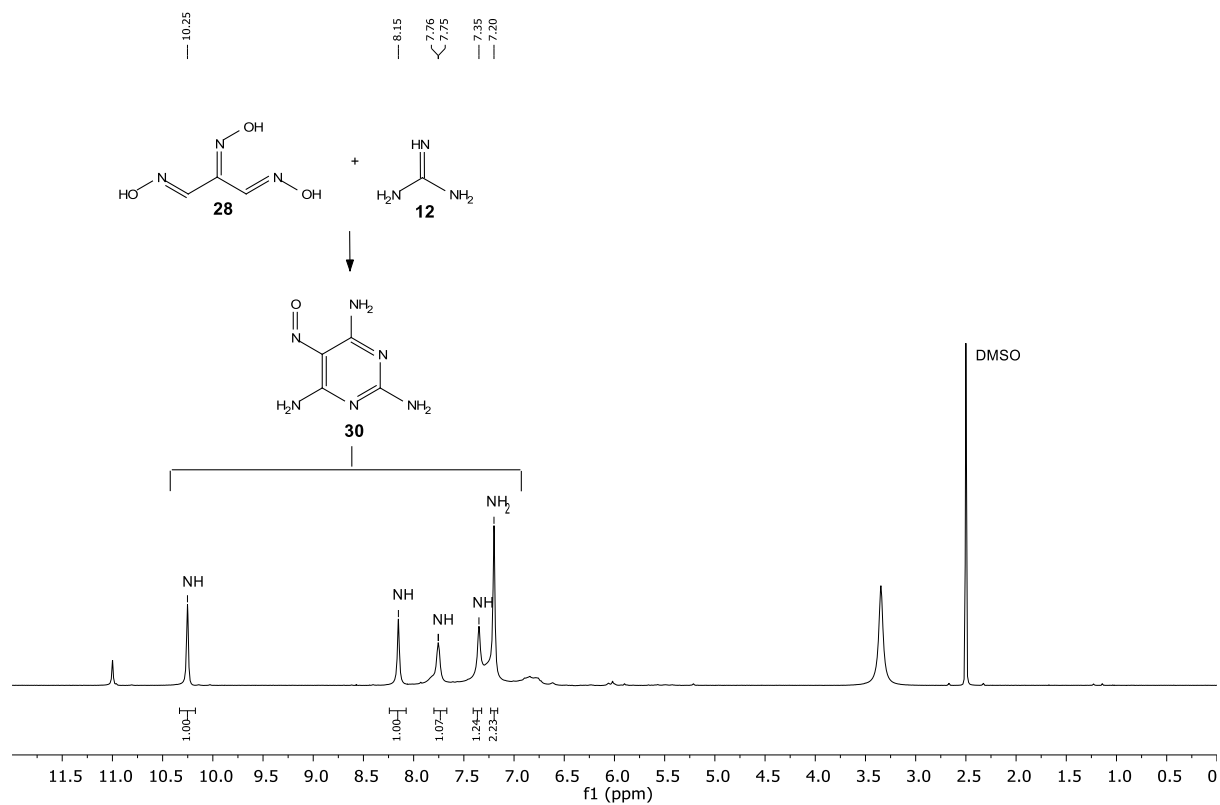
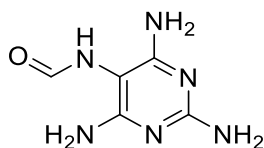


Figure S5: ¹H-NMR spectrum (400 MHz, DMSO-*d*₆, 0.0–12.0 ppm) of prebiotically enriched 5-nitrosopyrimidine-2,4,6-triamine (**30**).

***N*-(2,4,6-Triaminopyrimidin-5-yl)formamide (FaPyDA; 32)**

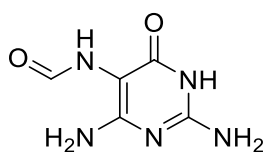


Prebiotic formation:

A suspension of 5-nitrosopyrimidine-2,4,6-triamine² (**30**; 231 mg, 1.50 mmol, 1.0 eq) and NaHSO₃ (312 mg, 3.00 mmol, 2.0 eq) in dil. HCOOH (5% in H₂O; 30 mL) was stirred at 90 °C for 10 h. The reaction mixture was evaporated to dryness and the residue taken up in H₂O (50 mL). The pH was adjusted to 8 by adding K₂CO₃. The mixture was concentrated (to about 1/10 of the volume) and left at r.t. for 5 days. The orange crystals formed were filtered off to give the *N*-(2,4,6-triaminopyrimidin-5-yl)formamide (**32**; 157 mg, 934 μmol, 62%).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.60 (s, *cis*, 1H; NH), 8.08 (d, *trans*, *J* = 11.9 Hz, 1H; NH), 8.04 (s, *cis*, 1H; CHO), 7.69 (d, *trans*, *J* = 11.5 Hz, 1H; CHO), 5.74 (s, *trans*, 2H; C2NH₂), 5.56 (s, *trans*, 4H; C4NH₂ and C6NH₂), 5.55 (s, *cis*, 4H; C4NH₂ and C6NH₂), 5.46 (s, *cis*, 2H; C2NH₂). **¹³C-NMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 166.56 (*trans*, CHO), 166.33 (*trans*, C4 and C6), 161.67 (*cis*, CHO), 161.18 (*trans*, C2), 161.13 (*cis*, C2), 161.07 (*cis*, C4 and -C6), 160.11 (*cis*, C4 and C6), 86.75 (*trans*, C5), 86.57 (*cis*, C5). **HRMS** (ESI⁺): calc.: [C₅H₉N₆O]⁺ 169.0832, found: 169.0833.

***N*-(2,4-Diamino-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-5-yl)formamide (FaPyG; 33)**



Prebiotic formation:

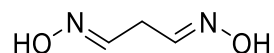
A suspension of 2,6-diamino-5-nitrosopyrimidin-4-ol² (**31**; 233 mg, 1.50 mmol, 1.0 eq) and NaHSO₃ (312 mg, 3.00 mmol, 2.0 eq) in dil. HCOOH (5% in H₂O; 30 mL) was stirred at 90 °C for 10 h. The reaction mixture was evaporated to dryness and the residue taken up in H₂O (50 mL). The pH was adjusted to 8 by adding K₂CO₃. The mixture was concentrated to about 1/10

of the volume. The orange solids were filtered off to give the *N*-(2,4-diamino-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-5-yl)formamide (**33**; 224 mg, 1.32 mmol, 88%).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.32 (s, *cis/trans*, 2H; N_{arom}), 8.49 (d, *cis*, *J* = 1.6 Hz, 1H; NH), 7.99 (d, *cis*, *J* = 1.6 Hz, 1H; CHO), 7.85 (d, *trans*, *J* = 11.7 Hz, 1H; NH), 7.72 (d, *trans*, *J* = 11.7 Hz, 1H; CHO), 6.40 (s, *trans*, 2H; C2NH₂), 6.31 (s, *cis*, 2H; C2NH₂), 6.00 (s, *trans*, 2H; C4NH₂), 5.77 (s, *cis*, 2H; C4NH₂). **¹³C-NMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 166.90, 161.52, 160.70, 160.66, 160.01, 159.53, 153.56, 153.39, 88.66, 88.54. **HRMS** (ESI⁺): calc.: [C₅H₆N₅O₂]⁺ 168.0527, found: 168.0527.

Pyrimidine Nucleosides

Malondialdoxime (**15**)



Synthetic reference:

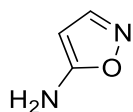
In a modified procedure of Betke and Gröger,⁴ a solution of hydroxylammonium chloride (12.2 g, 176 mmol, 4.0 eq.) in H₂O (40 mL) was degassed with argon. 1,1,3,3-Tetraethoxypropane (11.0 mL g, 44.0 mmol, 1.0 eq) was added and the resulting emulsion was stirred vigorously at 40 °C for 30 min. After cooling to r.t., Na₂CO₃ (9.33 g, 88.0 mmol, 2.0 eq) was added portion-wise under stirring. The suspension was stirred for 30 min at r.t., left at 0 °C for 1 h and filtered. The residue was washed with H₂O and dried under high vacuum to afford malondialdoxime (**15**; 1.94 g, 19.0 mmol, 43%) as a white solid.

mp: 137 °C. **¹H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.05 (s, 2H, OH), 6.78 (t, *J* = 5.3 Hz, 2H, CH), 3.19 (t, *J* = 5.3 Hz, 2H, CH₂). **¹³C-NMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 145.03 (CH), 22.69 (CH₂). **IR** (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3082 (m), 3040 (m), 2850 (m), 1661 (m), 1489 (w), 1435 (s), 1400 (m), 1343 (w), 1321 (s), 1253 (m), 1048 (w), 971 (w), 946 (s), 928 (s), 860 (m), 784 (s), 748 (s), 677 (s). **HRMS** (ESI⁺): calc.: [C₃H₇N₂O₂]⁺ 103.0502, found: 103.0503.

Prebiotic formation:

For the prebiotic formation of malondialdoxime see page 18 (one-pot formation of 5-aminoisoxazole (**20**) from malondialdehyde (**9**)).

5-Aminoisoxazole (20)



Prebiotic formation from malondialdoxime (15):

A solution of malondialdoxime (**15**; 40.0 mM) and Na₂CO₃ (5 eq.) in H₂O (2 mL) was incubated at 50 °C and 500 rpm for 4 h. The reaction was monitored via NMR (Figure S6). After 4 h, a sample (10 μL) was taken and diluted with H₂O (990 μL) for LC-MS analysis (injection volume: 10 μL). 5-Aminoisoxazole (**20**) was formed in 63% yield. The yield was determined by LC-MS measurements with the calibration curve prepared using synthetically produced 5-aminoisoxazole.

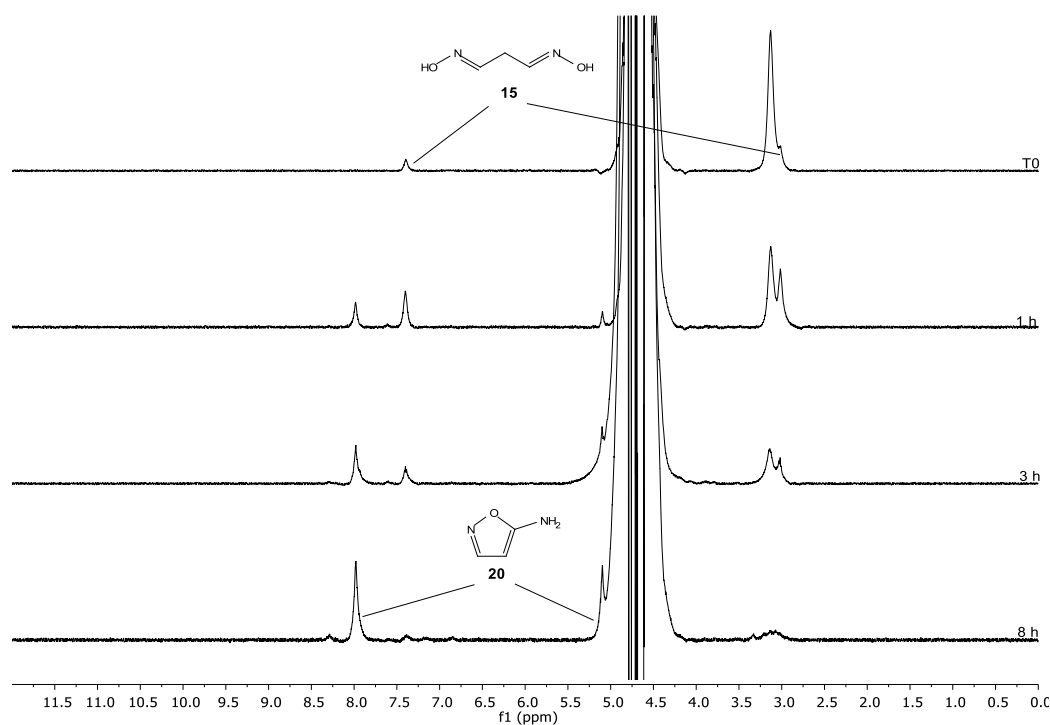


Figure S6: Conversion of malondialdoxime (**15**) to 5-aminoisoxazole (**20**). ¹H-NMR spectra (400 MHz, D₂O, 0.0–12.0 ppm) before the addition of hydroxylamine (top); as well as 1 after the addition of hydroxylamine.

Prebiotic one-pot formation from malondialdehyde (9):

A solution of malondialdehyde (9) sodium salt monohydrate (40.0 mM), Na₂CO₃ (5 eq.) and NH₂OH (2.5 eq.) in H₂O (2 mL) was incubated at 50 °C and 500 rpm for 8 h. The reaction was monitored via NMR (Figure S7). After 8 h, a sample (10 μL) was taken and diluted with H₂O (990 μL) for LC-MS analysis (injection volume: 10 μL). 5-Aminoisoxazole (20) was formed in 69% yield. The yield was determined by LC-MS measurements with the calibration curve prepared using synthetically produced 5-aminoisoxazole.

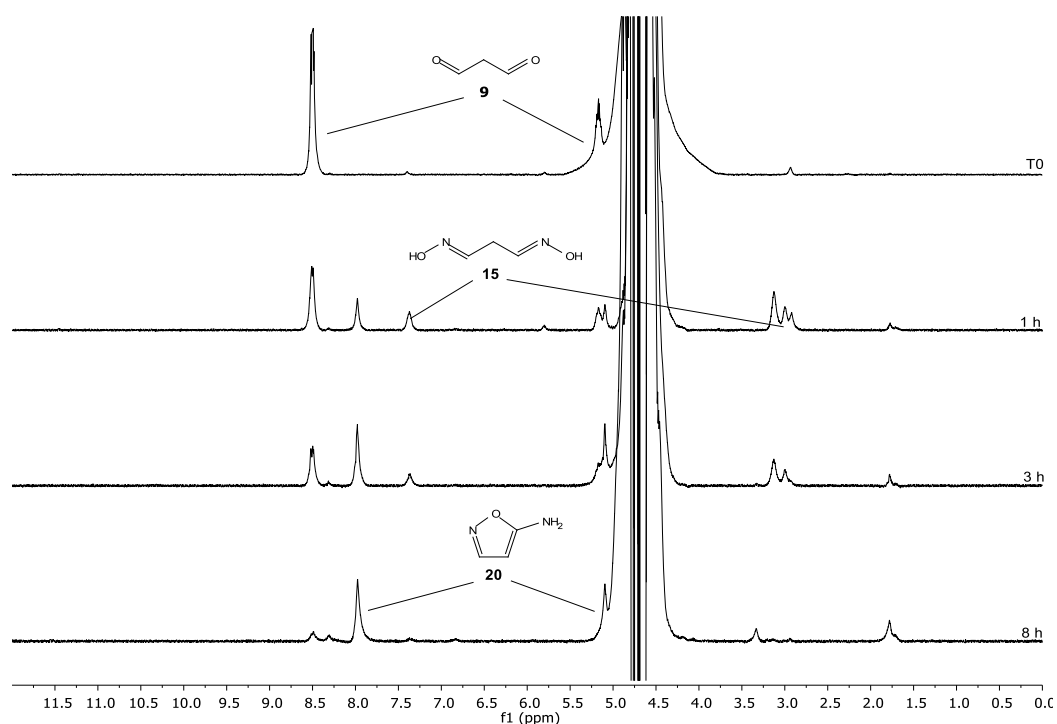


Figure S7: Conversion of malondialdehyde (9) to 5-aminoisoxazole (20). ¹H-NMR spectra (400 MHz, D₂O, 0.0–12.0 ppm) before the addition of hydroxylamine (top); as well as 1 after the addition of hydroxylamine.

Prebiotic one-pot formation from bisulfite-stabilized malondialdehyde (**17**) and enrichment:

A solution of malondialdehyde (**9**) sodium salt monohydrate (40.0 mM) and NaHSO₃ (2.5 eq.) in H₂O (1.0 mL) and the pH was adjusted to 5.5 with 2 M aq. HCl. The solution was incubated at 25 °C and 500 rpm under a nitrogen flow to allow water to evaporate. After evaporation to dryness, the remaining solid together with Na₂CO₃ (200 mM, 5 eq.) and NH₂OH (100 mM, 2.5 eq.) was dissolved in H₂O (1 mL). The suspension was incubated at 50 °C and 500 rpm for 4 h. A sample (10 μL) was taken and diluted with H₂O (990 μL) for LC-MS analysis (injection volume: 10 μL). 5-Aminoisoxazole (**20**) was formed in 65% yield. The yield was determined by LC-MS measurements with the calibration curve prepared using synthetically produced 5-aminoisoxazole (**20**). For prebiotic enrichment, the above-mentioned reaction mixture was left at 25 °C and 500 rpm under a nitrogen flow to allow water to evaporate. After evaporation to dryness, the remaining solid was taken up in D₂O (1 mL) and analyzed by NMR spectroscopy (Figure S8).

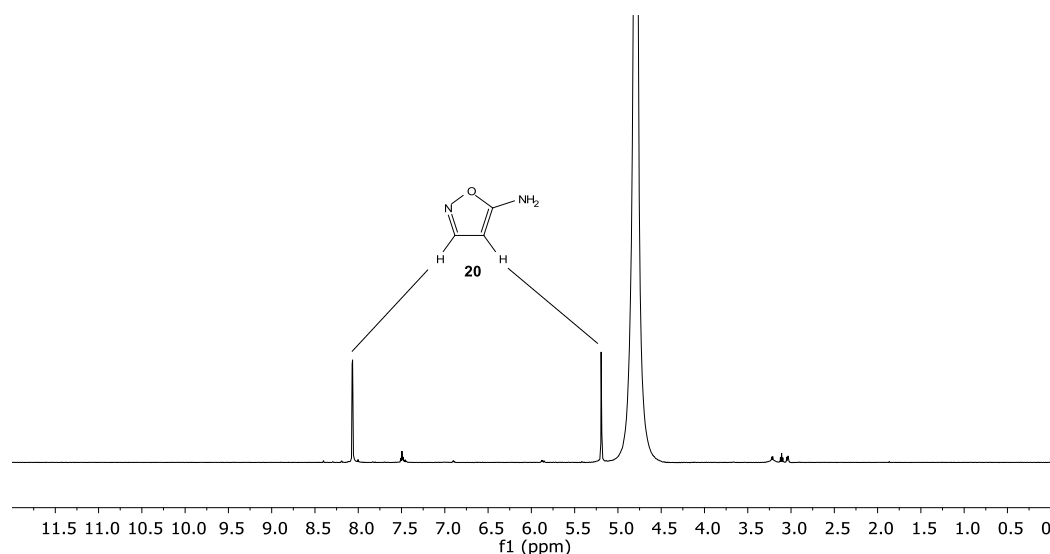


Figure S8: ¹H-NMR spectrum (400 MHz, D₂O, 0.0–12.0 ppm) of prebiotically enriched 5-aminoisoxazole (**20**).

Prebiotic one-pot formation of **28**, **29**, and **20** from malondialdehyde (**9**):

A solution of malondialdehyde (**9**) sodium salt monohydrate (40.0 mM) and NaNO₂ (50.0 mM) in dil. AcOH (1% in H₂O; 1 mL) was incubated at 25 °C and 500 rpm for 30 min. The mixture was treated with NH₂OH (**6**; 5 eq), basified with Na₂CO₃ to pH 10.5 and incubated at 500 rpm and 25 °C for 1 h or at 50 °C for 4 h. The reactions were monitored via ¹H-NMR (Figure S9) revealing the formation of (hydroxyimino)malondialdoxime (**28**), *N*-hydroxy-2-(hydroxyimino)acetimidoyl cyanide (**29**), and 5-aminoisoxazole (**20**).

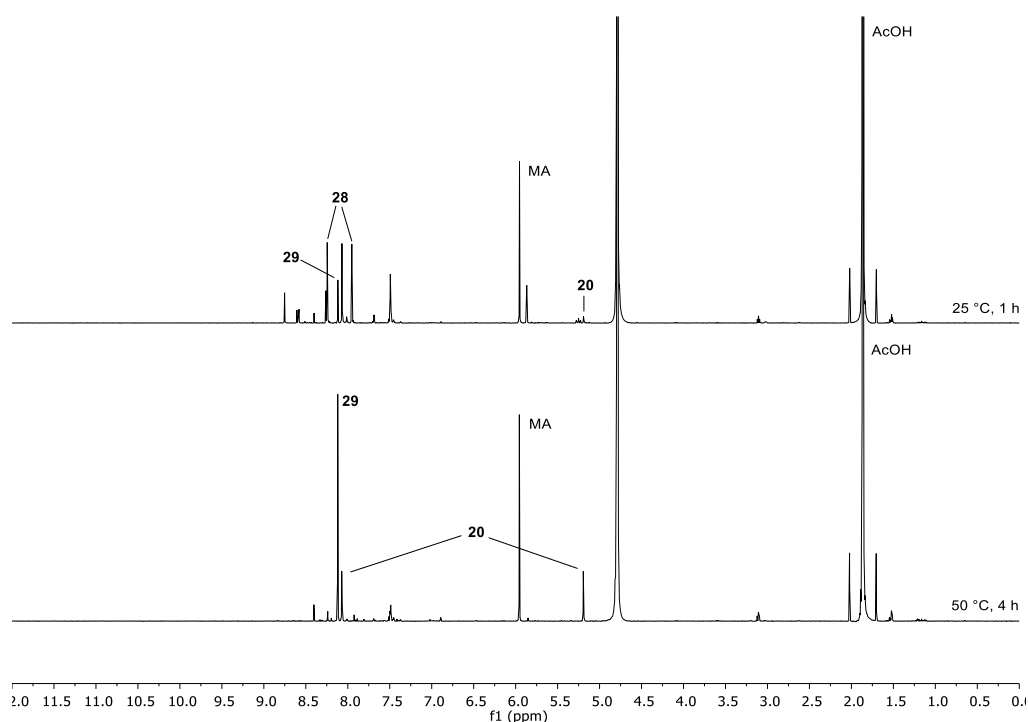


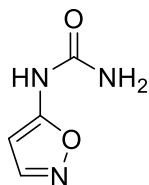
Figure S9: Conversion of malondialdehyde (**9**) to (hydroxyimino)malondialdoxime (**28**), *N*-hydroxy-2-(hydroxyimino)acetimidoyl cyanide (**29**), and 5-aminoisoxazole (**20**). ¹H-NMR spectra (400 MHz, D₂O, 0.0-12.0 ppm) monitoring the second reaction step after 1 h at 25 °C (top) and after 4 h at 50 °C (bottom). Maleic acid (MA) was used as an internal standard.

Synthetic reference:

Hydroxylamine (**6**; 50 wt% in H₂O; 10.2 g, 9.40 mL, 153 mmol, 1.1 eq) was added to 3-ethoxyacrylonitrile, mixture of *cis* and *trans*, (13.2 g, 14.0 mL, 136 mmol 1.00 eq) and stirred for 2 h at 65 °C. The crude product was purified by flash column chromatography (isohexan/EtOAc 3:2) to obtain the product (**20**; 5.92 g, 70.3 mmol, 52%) as slightly yellowish needles. For LC-MS measurements, a fraction of the product was further purified by reversed phase HPLC. The NMR spectrum of the isolated compound was identical to that of a commercial sample.

Crystallographic data: Figure S30.

1-(Isoxazol-5-yl)urea (**22**)



Prebiotic formation:

A solution of 5-aminoisoxazole (**20**; 10 μ L, 10 μ mol, 1 M, 1.0 eq) was added to a mixture of NaOCN (**21**; 2.60 mg, 40 μ mol, 4.0 eq) and ZnSO₄ · 7 H₂O (11.5 mg, 40 μ mol, 4.0 eq.). The mixture was shaken at 65 °C and 450 rpm for 14 h in an Eppendorf ThermoMixer[®] open to the air to allow water to evaporate. The resulting residue was dissolved in water to a final volume of 2 mL. A sample (100 μ L) was taken and diluted with water (900 μ L) to 1 mL for LCMS analysis (4 μ L injection volume). Compound **22** was formed in 49% yield. The yield was determined by LC-MS measurement with the calibration curve prepared using synthetically produced 1-(isoxazol-5-yl)urea (**22**; Figure S10).

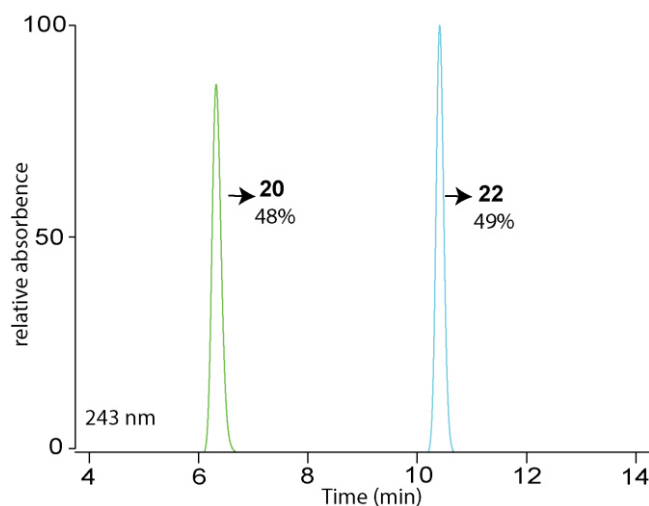


Figure S10: LCMS diagram for the formation of **22** from **20**.

Prebiotic formation with Co²⁺:

A solution of 5-aminoisoxazole (**20**; 10 μ L, 10 μ mol, 1 M, 1.0 eq) was added to a mixture of NaOCN (**21**; 2.60 mg, 40 μ mol, 4.0 eq) and CoSO₄ · 7 H₂O (11.2 mg, 40 μ mol, 4.0 eq.). The mixture was shaken at 65 °C and 450 rpm for 25 h in an Eppendorf ThermoMixer[®] open to the air to allow water to evaporate. The resulting residue was dissolved in water to a final volume of 2 mL. A sample (100 μ L) was taken and diluted with water (900 μ L) to 1 mL for LCMS analysis (4 μ L injection volume). Compound **22** was formed in 18% yield.

Prebiotic purification:

A solution of 5-aminoisoxazole (**20**; 100 μ L, 100 μ mol, 1 M, 1.0 eq) was added to a mixture of NaOCN (**27**; 26.0 mg, 400 μ mol, 4.0 eq) and ZnSO₄ · 7 H₂O (115 mg, 400 μ mol, 4.0 eq.). The mixture was shaken at 65 °C and 450 rpm for 14 h in an Eppendorf ThermoMixer[®] open to the air to allow water to evaporate. The residue was dissolved in water (10 mL) and Na₂CO₃ (42.4 mg, 400 μ mol, 4.0 eq.). The precipitate was filtered off and the filtrate was transferred into a 250 mL baker and left at RT for 7 days to allow for crystallization by concentration. The supernatant was removed and the formed solid residue was dissolved in D₂O.

22 (0.8 mg, 6.3 μ mol, 6.5%) has been identified by comparison of the ¹H-NMR spectra with synthetic material and the yield determined by 1,4-dioxane as internal standard (Figure S11).

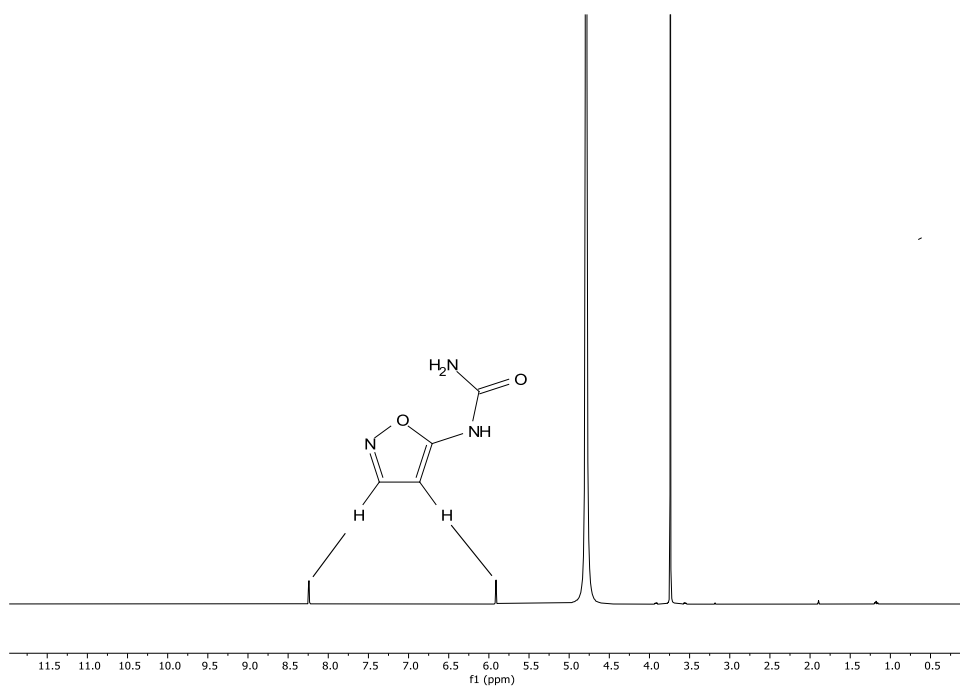


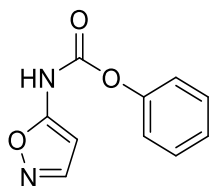
Figure S11: ¹H-NMR spectrum (400 MHz, D₂O, 0.0–12.0 ppm) of prebiotically enriched 5-isoxazolylurea (**22**). The peak at 3.74 ppm refers to 1,4-dioxane, which has been used as an internal standard.

Synthetic reference:

5-Aminoisoxazole (**20**; 2.00 g, 23.8 mmol, 1.1 eq) was dissolved in MeCN (28 mL) under inert atmosphere. The reaction mixture was cooled down to 0 °C and trichloro acetylisocyanate (3.98 g, 2.50 mL, 21.1 mmol, 1.0 eq) was slowly added. The ice bath was removed and the reaction mixture stirred for 1.5 h at rt. The reaction was quenched with methanol (15 mL) and the solvents removed *in vacuo*. After co-evaporation with EtOH (2 x 25 ml) the residue was dissolved in methanolic ammonia (28 mL, 2 M) and stirred for 1.5 h at rt. The solvent was removed *in vacuo* and the crude product purified by flash column chromatography (DCM/MeOH 24:1). Product **22** (2.36 g, 18.6 mmol, 88%) was obtained as a white solid.

mp: 165 °C. **¹H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 10.05 (s, 1H, HN), 8.26 (d, ³*J* = 1.9 Hz, 1H, HC3), 6.25 (s, 2H, H₂N), 5.88 (d, ³*J* = 1.9 Hz, 1H, HC4). **¹³C-NMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 162.7 (C5), 152.9 (CO), 152.0 (C3), 84.1 (C4). **HRMS** (ESI⁻): calc.: [C₄H₄N₃O₂]⁻ 126.0309, found: 126.0309 [M-H]⁻. **IR** (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3464 (w), 3261 (w), 3195 (m), 3021 (w), 1734 (vs), 1699 (m), 1568 (vs), 1560 (vs), 1373 (s), 1326 (s), 1240 (m), 1189 (s), 1122 (m), 1045 (s), 980 (w), 911 (s), 864 (m), 853 (m), 805 (m), 770 (s). **Crystallographic data:** Figure S31.

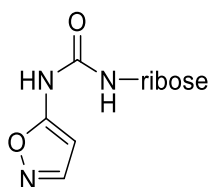
Phenyl isoxazol-5-ylcarbamate (39)



5-Aminoisoxazol (**20**; 6.00 g, 71.4 mmol, 1.00 eq.) was dissolved in dry MeCN (120 mL) and dry pyridine (5.48 g, 5.60 mL, 69.4 mmol, 0.97 eq.) under inert atmosphere. The reaction mixture was cooled down to 0 °C and phenyl chloroformate (13.6 g, 9.00 mL, 86.8 mmol, 1.22 eq.) was added dropwise. The ice bath was removed and the reaction mixture stirred for 15 h at rt. Water (120 mL) was added and the reaction mixture put in a refrigerator overnight. The formed precipitate was filtered off and washed with cold water to give the product (**39**; 9.63 g, 47.1 mmol, 66 %) as a yellow solid.

mp 195 °C. **¹H-NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 8.18 (dd, ³J = 1.9, 0.8 Hz, 1H, HC3), 7.82 (s, 1H, NH), 7.46 – 7.39 (m, 2H, HCph3), 7.33 – 7.26 (m, 1H, HCph4), 7.22 – 7.18 (m, 2H, HCph2), 6.19 (s, 1H, HC4). **¹³C-NMR** (101 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 160.2 (C5), 152.2 (C3), 150.2 (CO), 149.5 (Cph1), 129.8 (Cph3), 126.6 (Cph4), 121.4 (Cph2), 87.2 (C4). **HRMS** (ESI): calc.: [C₁₀H₇N₂O₃]⁻ 203.0462, found: 203.0460 [M-H]⁻. **IR** (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3203 (vw), 3003 (vw), 1760 (s), 1612 (m), 1560 (s), 1494 (m), 1476 (m), 1340 (w), 1246 (s), 1221 (m), 1190 (vs), 1030 (m), 995 (w), 916 (s), 781 (s), 715 (s), 686 (vs).

1-(Isoxazol-5-yl)-N'-ribose-urea (**24a-d**)



Prebiotic formation:

A solution of **22** (500 μ l, 0.05 mmol, 100 mM) was mixed with ribose (**23**; 125 μ l, 0.25 mmol, 2 M) and boric acid (50 μ l, 0.025 mmol, 500 mM). The mixture was kept in an oven for 14 h at 80 °C. The sample was dissolved in H₂O (1 ml) and a sample (10 μ L) was taken and diluted with water (990 μ L) to 1 mL for LCMS analysis (4 μ L injection volume). To confirm the structural integrity, the different pyrano-isomers **24c+d** were isolated by reversed phase HPLC in pure form.

Prebiotic formation and rearrangement:

A solution of **22** (500 μ l, 0.05 mmol, 100 mM) is mixed with ribose (**23**; 83.3 μ l, 0.25 mmol, 3 M) and boric acid (50 μ l, 0.035 mmol, 500 mM). The mixture was kept in an oven for 14 h at 95 °C. The residue was dissolved in an aqueous borax solution (1.00 mL, 500 mM) and shaken for 3 h at 750 rpm at 75°C in an Eppendorf ThermoMixer®. A sample (10 μ L) was taken and diluted with water (990 μ L) to 1 mL for LCMS analysis (4 μ L injection volume; Figure S12). The second reaction can be performed at different conditions to result different ratios for α/β and furano/pyrano isomers. When the glycosylation reaction is dissolved in an aqueous borax buffer (4.00 mL, 500 mM). A sample of 1 mL was taken from this solution and shaken for 1 h

at 750 rpm at 75°C in an Eppendorf ThermoMixer®. A sample (40 μL) was taken and diluted with water (960 μL) to 1 mL for LCMS analysis (4 μL injection volume; Figure S13).

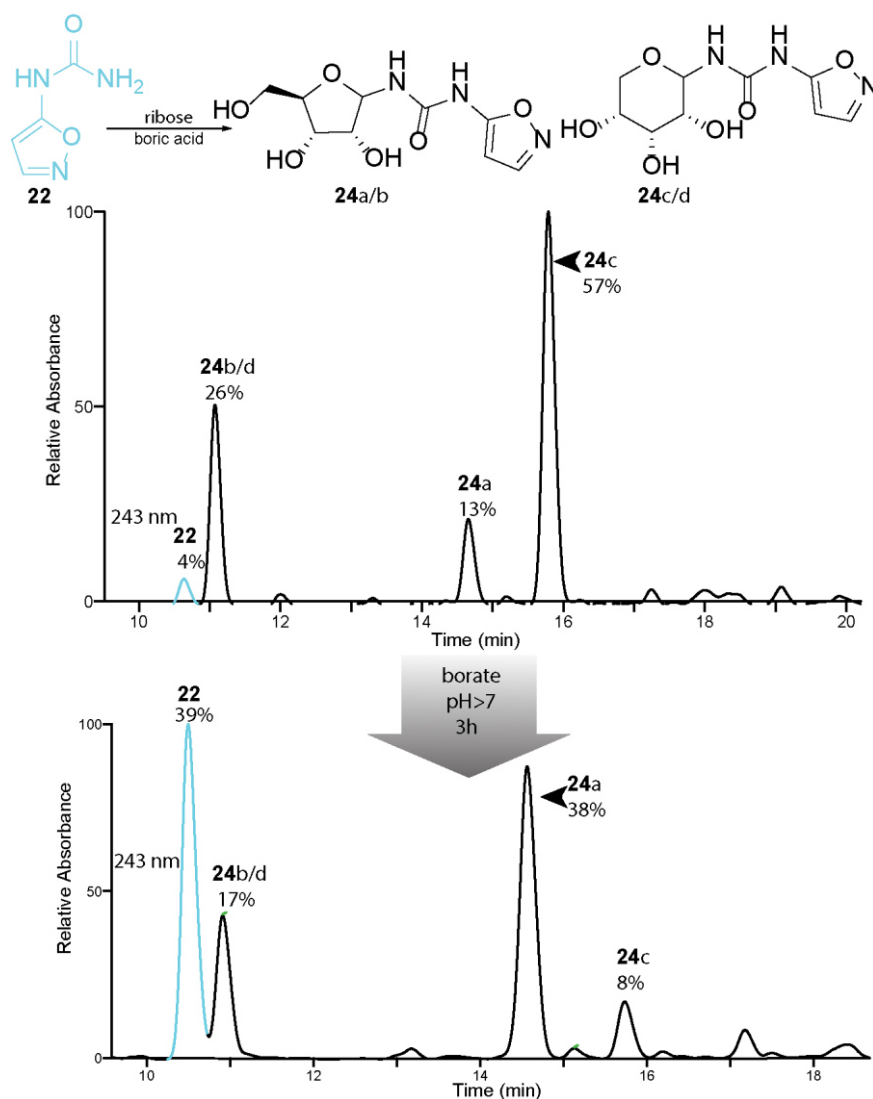


Figure S12: LC-MS analysis for the formation of **24a-d**. The UV-chromatograms at 243 nm are shown. The β-anomers **24b/d** could not be separated. a) Boric acid catalyzed ribosylation of **22** affords the four expected α and β anomers of isoxazolylyl-urea ribosides **24a-d**. b) The mixture obtained in a) was heated in 500 mM borax at 75 °C for 3 h. The pyranoside products (**24c/d**) are converted into the furanoside products (**24a/b**), which was observed for the α-anomers and expected to happen for the β-anomers.

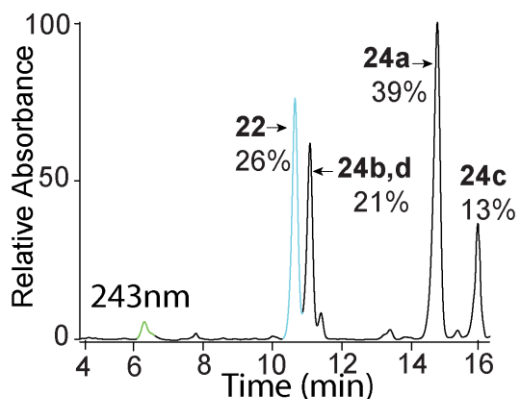


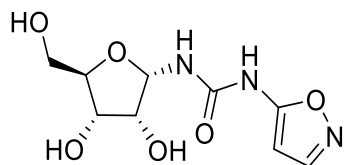
Figure S13: LC-MS analysis for the formation of **24a-d** under different conditions in the stereo-inversion step.

Synthetic reference:

β -D-Ribofuranosyl azide, 2,3,5-tribenzoate⁶ (7.07 g, 14.5 mmol, 1.0 eq) was dissolved in THF (40 mL) and Pd/C (25 mg) was added. The mixture stirred for 19 h at rt under a H₂ atmosphere. It was filtered over celite 454 and the solvent removed *in vacuo*. The residue was dissolved in dry MeCN (120 mL) together with **39** (3.26 g, 16.0 mmol, 1.1 eq) under inert atmosphere. It was stirred for 72 h at rt and for additional 48 h at 45 °C. The solvent was removed *in vacuo* and the residue purified by flash column chromatography (DCM/MeOH 99/1 →49/1). The product was dissolved in methanolic ammonia (84 mL, 2 M) and stirred for 14 h at rt. The solvent was removed *in vacuo* and the residue purified by flash column chromatography (DCM/MeOH 9/1). Not completely deprotected fractions were collected and stirred in methanolic ammonia (42 mL, 2 M) for 16 h, The solvent was removed *in vacuo* and the residue purified by flash column chromatography (DCM/MeOH 9/1).

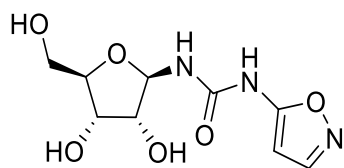
The products were combined to give the product (645 mg, 2.49 mmol, 17%) as a yellowish foam in a 2.25:1 mixture of α - and β -furanosides. The isomers were separated by reversed phase HPLC to confirm the structural integrity for the different furano-compounds **24a/b**.

α -Furanosyl-isomer 24a



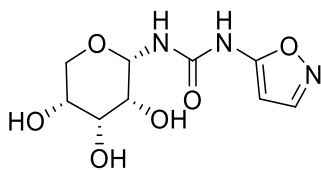
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm) = 10.54 (s, 1H, NH), 8.33 (d, $^3J = 2.0$ Hz, 1H, HC3), 7.07 (d, $^3J = 9.5$ Hz, 1H, C1'NH), 5.95 (d, $^3J = 1.9$ Hz, 1H, HC4), 5.50 – 5.44 (m, 2H, HC1', C2'OH), 5.10 (d, $^3J = 5.8$ Hz, 1H, C3'OH), 4.70 (t, $^3J = 5.7$ Hz, 1H, C5'OH), 3.94 (q, $^3J = 4.7$ Hz, 1H, HC2'), 3.88 (td, $^3J = 6.0, 4.6$ Hz, 1H, HC3'), 3.72 (ddd, $^3J = 6.2, 4.8, 3.2$ Hz, 1H, HC4'), 3.48 (ddd, $^3J = 11.8, 5.5, 3.3$ Hz, 1H, H_aC5'), 3.40 – 3.29 (m, 1H, H_bC5'). **$^{13}\text{C-NMR}$** (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm) = 162.3 (C5), 152.1 (C3), 151.5 (CO), 84.4 (C4), 823 (C4'), 80.5 (C1'), 71.1 (C3'), 70.1 (C2'), 61.6 (C5')

β -furanosyl-isomer 24b



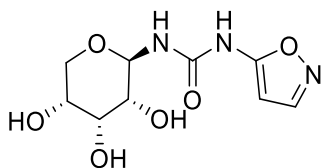
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm) = 8.42 (s, 1H, NH), 8.31 (d, $^3J = 1.9$ Hz, 1H, HC3), 8.16 (d, $^3J = 9.3$ Hz, 1H, C1'NH), 5.95 (d, $^3J = 1.9$ Hz, 1H, HC4), 5.20 (dd, $^3J = 9.3, 5.1$ Hz, 1H, HC1'), 3.87 (t, $^3J = 4.7$ Hz, 1H HC3'), 3.77 (t, $^3J = 5.1$ Hz, 1H. HC2'), 3.66 (q, $^3J = 4.3$ Hz, 1H, HC4'), 3.46 (dd, $^3J = 11.7, 4.0$ Hz, 1H, H_aC5'), 3.38 (dd, $J = 11.7, 4.7$ Hz, 1H. H_bC5'). **$^{13}\text{C-NMR}$** (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm) = 162.8 (C5), 152.3 (CO), 151.9 (C3), 84.8 (C1'), 84.4 (C4), 83.5 (C4'), 74.1 (C2'), 70.5 (C3'), 62.1 (C5')

α -pyranosyl-isomer 24c



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm) = 8.40 (s, 1H, NH), 8.33 (d, $^3J = 1.9$ Hz, 1H, HC3), 7.48 (d, $^3J = 9.0$ Hz, 1H, C1'NH), 5.95 (d, $^3J = 1.9$ Hz, 1H, HC4), 5.02 (dd, $^3J = 8.9, 3.3$ Hz, 1H, HC1'), 3.74 (t, $J = 2.7$ Hz, 1H, HC3'), 3.60 – 3.52 (m, 3H, HC2', HC4', H_aC5'), 3.35 – 3.31 (m, 1H, H_bC5'). **$^{13}\text{C-NMR}$** (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm) = 162.5 (C5), 152.0 (C3), 151.8 (CO), 84.4 (C4), 77.7 (C1'), 69.8 (C3'), 68.8 (C4'), 67.4 (C2'), 61.6 (C5').

β -pyranosyl-isomer 24d



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm) = 8.41 (s, 1H, NH), 8.32 (d, $^3J = 1.9$ Hz, 1H, HC3), 7.67 (d, $^3J = 8.9$ Hz, 1H, HC1'NH), 5.95 (d, $^3J = 1.8$ Hz, 1H, HC4), 4.89 (t, $^3J = 8.9$ Hz, 1H, HC1'), 3.88 (q, $^3J = 2.7$ Hz, 1H, HC3'), 3.49 (ddt, $^3J = 11.8, 6.5, 2.3$ Hz, 1H, HC4'), 3.46 – 3.34 (m, 2H, H_aC5', H_bC5'), 3.23 (dd, $^3J = 8.9, 2.7$ Hz, 1H, HC2'). **$^{13}\text{C-NMR}$** (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm) = 163.1 (C5), 152.8 (CO), 152.4 (C3), 84.8 (C4), 78.2 (C1'), 71.2 (C3'), 70.1 (C2'), 67.5 (C4'), 64.6 (C5').

Prebiotic formation from 1-(isoxazol-5-yl)-N'-riboseyl-urea **24a/b**:

The reaction was handled under inert atmosphere. All solutions were degassed for 1 h with argon before usage. A solution of ribose isoxazole **24a/b** as a 2.25:1 mixture (25.9 mg, 0.1 mmol, 1.0 eq.) in water (0.5 ml) was added to a mixture of sodium carbonate (5.3 mg, 0.05 mmol, 0.5 eq.), DTT (23.1 mg, 1.5 mmol, 1.5 eq.) and FeS₂ (6.0 mg, 0.5 mmol, 0.5eq.) in a 15 ml falcon tube. The tube was sealed with a PTFE sealing tape and shaken for 4 h at 750 rpm at 100 °C in an Eppendorf ThermoMixer®. After cooling to rt, it was centrifuged and a sample (10 μL) was removed and diluted with H₂O (990 μL) to 1 ml. This diluted sample was used for LC-MS (4 μL) analysis according to the general information (Figure S14). The mechanism of the ring opening and the following rearrangement to uridine is shown in (Figure S15).

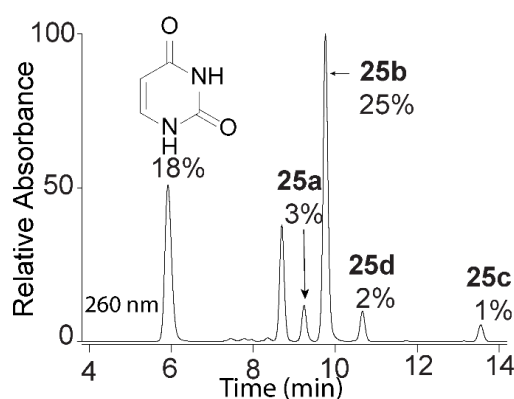


Figure S14: LC-MS analysis for the formation of **25a-d** starting from **24a/b**.

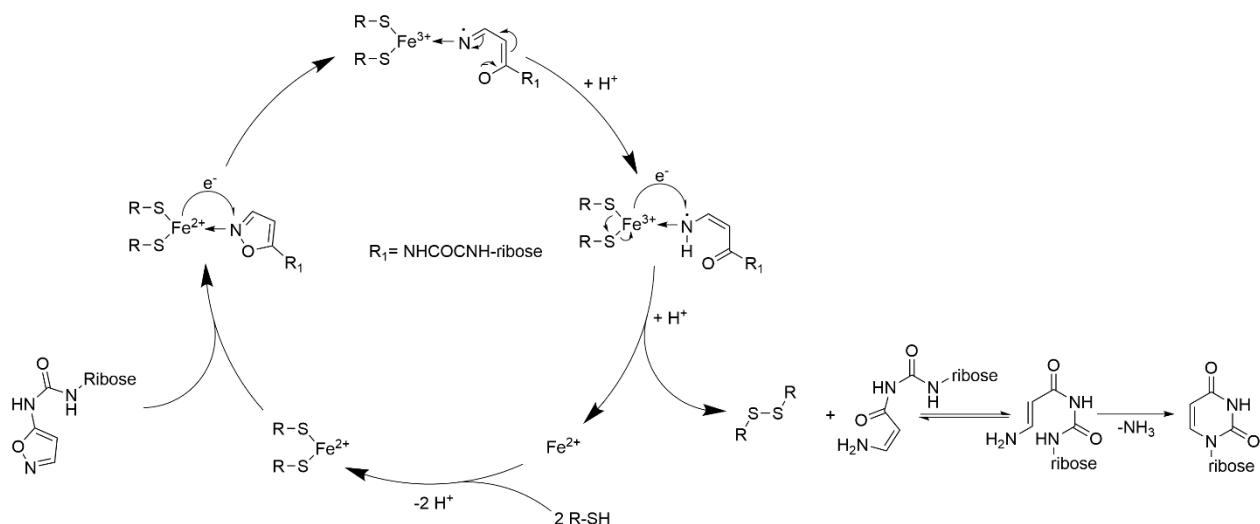


Figure S15: Mechanism for the Fe²⁺ catalyzed ring opening of **24** and the following rearrangement to form uridine nucleosides **25**.

Prebiotic one-pot formation from **22**:

The second step was handled under inert atmosphere. For this step solutions were degassed for 1 h with argon before usage. A solution of **22** (500 μ L, 0.05 mmol, 100 mM) is mixed with ribose (**23**; 83 μ L, 0.25 mmol, 3 M) and boric acid (25 μ L, 0.013 mmol, 500 mM). The mixture was kept in an oven for 14 h at 95 $^{\circ}$ C. The residue was dissolved in 75 mM Na₂CO₃ (0.5 mL, pH 10) and added to DTT (11.6 mg, 0.075 mmol, 1.5 eq). An (NH₄)₂Fe(SO₄)₂ solution (10 μ L, 0.075 μ mol, 0.001 eq, 7.5 mM) was added and the mixture sealed with a PTFE sealing tape and shaken for 4 h at 750 rpm at 100 $^{\circ}$ C in an Eppendorf ThermoMixer[®]. After cooling to rt, it was centrifuged and a sample (10 μ L) was removed and diluted with H₂O (990 μ L) to 1 mL. This diluted sample was used for LC-MS analysis according to the general information (4 μ L injection volume; Figure S16).

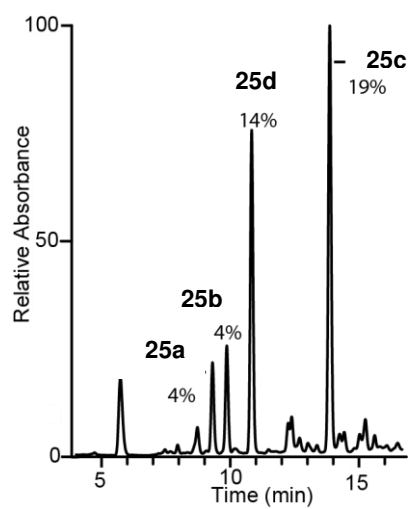
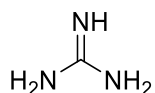


Figure S16: LC-MS analysis for the formation of **25a-d** and uracil in a one-pot reaction from **22**.

Guanidine (**12**)



Prebiotic one-pot formation:

In a further developed procedure of Egami,¹³ hydroxylamine (**6**; 50 wt% in H₂O, 306 μ L, 5.00 mmol, 2.0 eq), formaldehyde (**7**; 37 wt%, 249 μ L, 2.50 mMol, 1.0 eq.) and KCl (105 mg) were dissolved in H₂O (4 mL) and the resulting solution heated for 4d at 95 °C in a sealed pressure tube. After cooling to room temperature sat. aqueous ammonia (3 ml) was added and stirred for additional 60 h. The reaction mixture was freeze dried and the residue benzyloxycarbonyl-(Cbz)-protected with benzyl chloroformate⁷ for analytical reasons. The crude reaction mixture was freeze dried again and dissolved in H₂O (6 mL) and MeCN (4 mL). A sample (200 μ L) has been taken and diluted with H₂O (480 μ L) and MeCN (320 μ L) for LCMS analysis (16 μ L injection volume; Figure S17). Di-Cbz-protected guanidine was formed and identified by comparison with authentic di-Cbz-protected guanidine⁷. In the LCMS data also a quite big peak for mono-Cbz-protected guanidine (Figure S18) appeared and therefore no yields for total guanidine synthesis were determined. The Cbz protection was performed, since guanidine could not be detected by MS or UV during LCMS spectroscopy. However, the presence of residual unprotected guanidine **12** cannot be excluded. The amount of the protecting reagent (benzyl chloroformate) was calculated assuming a quantitative conversion of formaldehyde (**7**) to **12**.

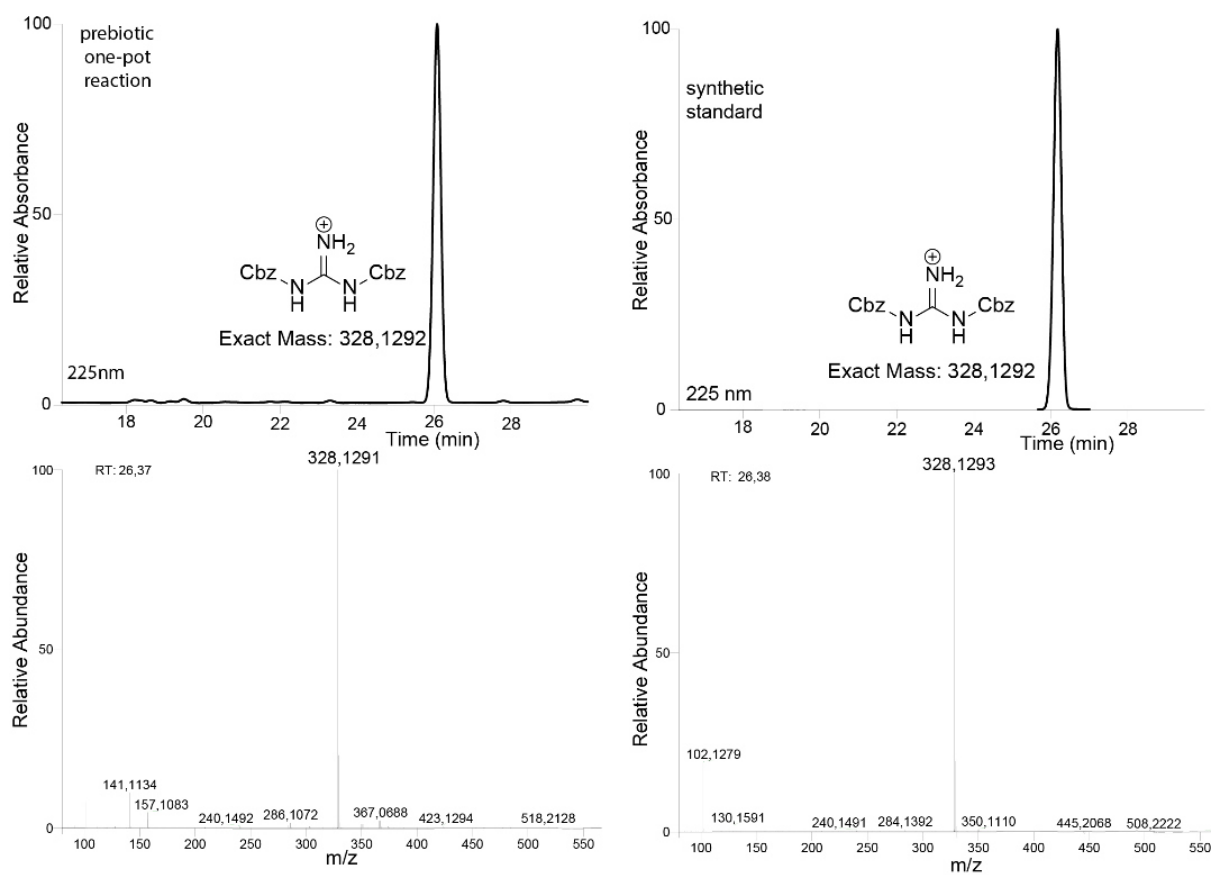


Figure S17: Comparison of the LCMS spectra of the one-pot formation and subsequent Cbz-protection of guanidine (left top) in comparison with an authentic synthesized standard⁷ (right top). On the bottom the measured mass spectra at the time the di-Cbz-protected guanidinium 23 elutes (RT) for the corresponding UV-measurement.

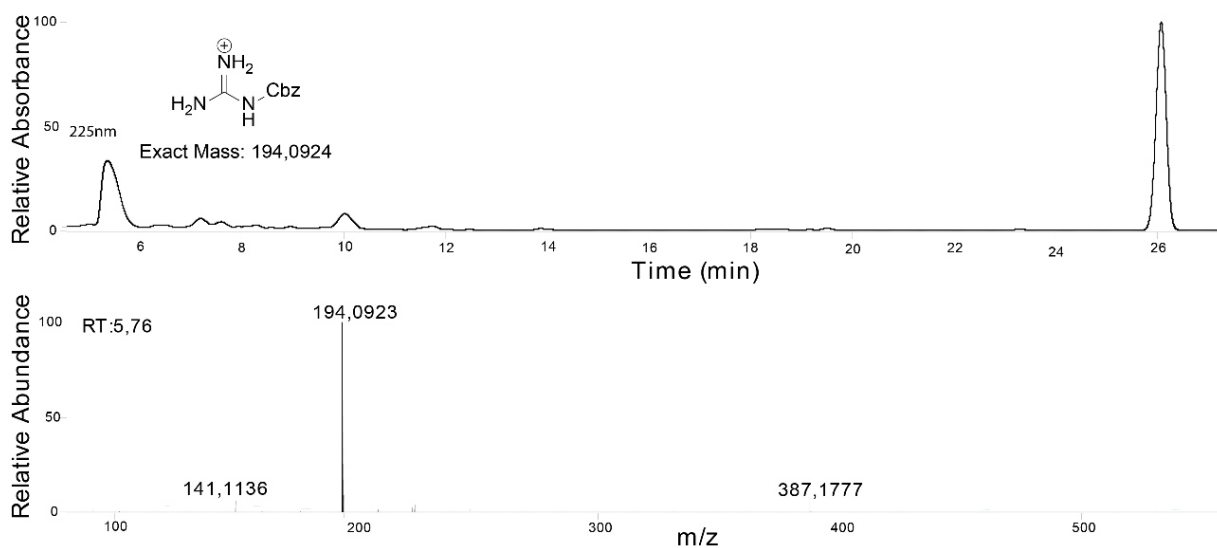
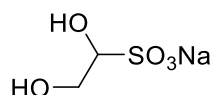


Figure S18: (Top) LCMS spectra of the one-pot synthesis of guanidine and subsequent Cbz-protection. The the (di-Cbz)-protected guanidinie 23 can be seen at 26 min retention time again. Additionally, the peak for the mono (Cbz)-protected product can be seen at 5 to 6 min and on the bottom the corresponding mass spectra for this peak. The mass corresponds to the expected product placed in the top part.

Amino Acids

Synthesis of Sulfonates

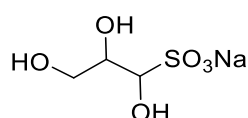
Sodium 1,2-dihydroxyethane-1-sulfonate (14a)



1,4-Dioxan-2,5-diol (300 mg, 2.50 mmol, 0.5 eq.) was dissolved in H₂O (1.0 mL) and 2M HCl (100 μ L). A solution of NaHSO₃ (520 mg, 5.00 mmol, 1.0 eq.) in H₂O (2.5 mL) was added dropwise and the reaction mixture was stirred for 1h at room temperature. MeCN (10 mL) was added and formed precipitates were filtered off. The solvents were removed *in vacuo*. The residue was taken up in MeOH, filtered and the solvent removed *in vacuo* and the residue dried under high vacuum. The product was obtained as a white solid (720 mg, 4.39 mmol, 88%).

¹H-NMR (400 MHz, D₂O) δ 4.49 (dd, $J = 8.2, 3.2$ Hz, 1H, CH), 4.00 (dd, $J = 12.1, 3.2$ Hz, 1H, CH_{2a}), 3.71 (dd, $J = 12.1, 8.2$ Hz, 1H, CH_{2b}). ¹³C-NMR (101 MHz, D₂O) δ 83.72, 61.28. IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu} = 3331$ (w), 2359 (vw), 1343 (w), 1263 (m), 1178 (s), 1132 (m), 1079 (s), 1045 (vs), 989 (m), 894 (m), 703 (s). HRMS (ESI): calc.: [C₂H₅O₅S]⁻ 140.9863, found: 140.9862.

Sodium 1,2,3-trihydroxypropane-1-sulfonate (14b)

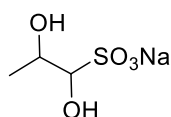


3,6-Dihydroxy-1,4-dioxan-2,5-dimethanol (450 mg, 2.5 mmol, 0.5 eq.) was dissolved in H₂O (1.0 mL) and 2M HCl (100 μ L). A solution of NaHSO₃ (520 mg, 5.00 mmol, 1.0 eq.) in H₂O (2.5 mL) was added dropwise and the reaction mixture was stirred for 20 min at room temperature. MeCN (10 mL) was added and formed precipitates were filtered off. The solvents were removed *in vacuo*. The residue was taken up in MeOH, filtered and the precipitate dried under high vacuum. The product was obtained as a colorless oil (quantitative yield).

NMR analysis revealed an isomeric ratio of = 59 (*R,R* and *S,S*) : 41 (*R,S* and *S,R*).

¹H-NMR (400 MHz, D₂O) δ 4.44 (d, *R,S* and *S,R*, *J* = 6.1 Hz, 1H, SO₃CH), 4.41 (d, *R,R* and *S,S*, *J* = 3.1 Hz, 1H, SO₃CH), 4.11 (ddd, *R,R* and *S,S*, *J* = 6.8, 5.3, 3.1 Hz, 1H, CH), 3.99 (m, *R,S* and *S,R*, 1H), 3.88 (dd, *R,S* and *S,R*, *J* = 12.1, 2.8 Hz, 1H, CH_{2a}), 3.75 – 3.70 (m, *R,S* and *S,R*, 1H, CH_{2b}), 3.68 (dd, *R,R* and *S,S*, *J* = 9.4, 6.1 Hz, 2H, CH₂). **¹³C-NMR** (101 MHz, D₂O) δ 83.99 (*R,S* and *S,R*, SO₃CH), 82.12 (*R,R* and *S,S*, SO₃CH), 71.13 (*R,S* and *S,R*, CH) 70.20 (*R,R* and *S,S*, CH), 62.28 (*R,R* and *S,S*, CH₂)_s, 61.87 (*R,S* and *S,R*, CH₂). **IR** (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3375 (m), 2961 (vw), 1643 (vw), 1409 (w), 1174 (vs), 1068 (m), 1029 (vs), 703 (m). **HRMS** (ESI): calc.: [C₃H₇O₆S]⁻ 170.9969, found: 170.9968.

Sodium 1,2-dihydroxypropane-1-sulfonate (14c)

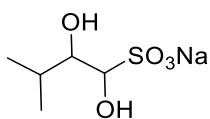


1,1-Dimethoxy-2-propanol (601 mg, 5.00 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in H₂O (1.0 mL) and 2M HCl (500 μL) and stirred for 90 min at room temperature. A solution of NaHSO₃ (520 mg, 5.00 mmol, 1.0 eq.) in H₂O (2.5 mL) was added dropwise and the reaction mixture was stirred for 20 min. Isopropanol (15 mL) was added and formed precipitates were filtered off. The solvents were removed *in vacuo*. The residue was taken up in isopropanol, filtered and the precipitate dried under high vacuum. The product was obtained as a white solid (338 mg, 1.90 mmol, 38%).

NMR analysis revealed a mixture of isomers, but the signals are overlapping except for the signal at the carbon linked to the sulfonate, therefore the structures could not be assigned.

¹H-NMR (400 MHz, D₂O) δ 4.37 (m, 1H, SO₃CH), 4.22 – 4.20 (m, 1H, SO₃CH), 4.20 – 4.13 (m, 1H, CH), 1.27 (m, 3H, CH₃). **¹³C-NMR** (101 MHz, D₂O) δ 86.37 (SO₃CH), 85.87 (SO₃CH), 66.81 (CH), 66.40 (CH), 18.73 (CH₃), 16.27 (CH₃). **IR** (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3406 (m), 2974 (w), 1631 (w), 1379 (w), 1261 (m), 1191 (vs), 1136 (vs), 1112 (s), 1044 (vs), 1014 (s), 937 (m), 856 (m), 791 (w), 703 (m). **HRMS** (ESI): calc.: [C₃H₇O₅S]⁻ 155.0020, found: 155.0019.

Sodium 1,2-dihydroxy-3-methylbutane-1-sulfonate (14d)

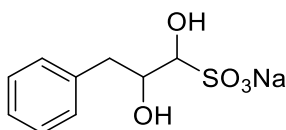


1,1-dimethoxy-3-methylbutan-2-ol⁸ (741 mg, 5.00 mmol, 1.0 eq) was dissolved in H₂O (1.0 mL) and 2M HCl (500 μL) and stirred for 90 min at room temperature. A solution of NaHSO₃ (520 mg, 5.00 mmol, 1.0 eq.) in H₂O (2.5 mL) was added dropwise and the reaction mixture was stirred for 20 min. The formed precipitated was filtered off and dried under high vacuum. The product (183 mg, 1.23 mmol, 25%) was obtained as a white solid.

NMR analysis revealed an isomeric ratio of = 76 (*R,R* and *S,S*) : 24 (*R,S* and *S,R*).

¹H-NMR (400 MHz, D₂O) δ 4.91 (d, *R,R* and *S,S*, *J* = 5.5 Hz, 1H, SO₃CH), 4.17 (d, *R,S* and *S,R*, *J* = 4.3 Hz, 1H, SO₃CH), 3.73 (m, *R,S* and *S,R*, 1H, CH), 3.21 (t, *R,R* and *S,S*, *J* = 5.2 Hz, 1H, CH), 2.20 (pd, *R,S* and *S,R*, *J* = 6.9, 4.3 Hz, 1H, (CH₃)₂CH), 1.90-1.75 (m, *R,R* and *S,S*, 1H, (CH₃)₂CH), 1.00 (d, *J* = 6.9 Hz, 6H, CH₃), 0.92 – 0.83 (m, 6H, CH₃). **¹³C-NMR** (101 MHz, D₂O) δ 93.29 (*R,S* and *S,R*, SO₃CH), 90.09 (*R,R* and *S,S*, SO₃CH), 81.02 (*R,S* and *S,R*, CH), 78.23 (*R,R* and *S,S*, CH), 29.29 (*R,S* and *S,R*, (CH₃)₂CH), 28.89 (*R,R* and *S,S*, (CH₃)₂CH), 18.62 (*R,R* and *S,S*, CH_{3a}) 18.01 (*R,S* and *S,R*, CH_{3a}) 15.83 (*R,S* and *S,R*, CH_{3b}), 15.67 (*R,R* and *S,S*, CH_{3b}). **IR** (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3381 (w), 3321 (vw), 2961 (vw), 1641 (vw), 1257 (w), 1189 (vs), 1135 (m), 1067 (s), 1040 (vs), 969 (m), 838 (w), 752 (m), 701 (m). **HRMS** (ESI): calc.: [C₅H₁₁O₅S]⁻ 183.0333, found: 183.0332.

Sodium 1,2-dihydroxy-3-phenylpropane-1-sulfonate (14e)



1,1-dimethoxy-3-phenylpropan-2-ol⁸ (981 mg, 5.00 mmol, 1.0 eq) was dissolved in H₂O (1.0 mL) and 2M HCl (500 μL) and stirred for 2h at room temperature. A solution of NaHSO₃ (520 mg, 5.00 mmol, 1.0 eq.) in H₂O (2.5 mL) was added dropwise and the reaction mixture was stirred for 40 min at room temperature. MeCN (20 mL) was added and formed precipitates were filtered off. The solvents were removed *in vacuo*. The residue was taken up in isopropanol,

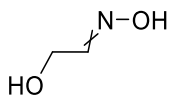
filtered and the solvent removed *in vacuo*. The residue was dried under high vacuum. The product was obtained as a colorless oil (982 mg, 3.86 mmol, 77%).

No mixture of isomers could be distinguished.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.32 – 7.14 (m, 5H, CH_{phenyl}), 4.77 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H, CHOH), 4.09 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H, SO₃CH), 3.63 (dtd, *J* = 9.0, 5.8, 2.8 Hz, 1H, CH), 3.41 (s, 1H, SO₃CHOH), 2.80 (dd, *J* = 13.9, 2.8 Hz, 1H, CH_{2a}), 2.58 – 2.48 (m, 1H, CH_{2b}). **¹³C-NMR (100 MHz DMSO-*d*₆):** δ 140.08 (C_{phenyl}), 129.92 (CH_{phenyl}), 128.34 (CH_{phenyl}), 126.12 (CH_{phenyl}), 107.14 (SO₃CH), 71.75 (CH), 38.36 (CH₂). **IR (cm⁻¹):** $\tilde{\nu}$ = 3449 (vw), 2993 (vw), 2832 (vw), 1453 (w), 1168 (s), 1128 (vs), 1056 (vs), 967 (vs), 750 (m), 699 (vs), 695 (s). **HRMS (ESI):** calc.: [C₉H₁₁O₅S]⁻ 231.0333, found: 231.0333.

Synthesis of Oximes

2-Hydroxyacetaldehyde oxime (**13a**)



Prebiotic formation:

A 1 M solution of the sulfonate **14a** (100 μ L, 0.10 mmol, 1.0 eq) in D₂O was mixed with hydroxylamine (**7**; 50 wt% in H₂O; 7.66 μ L, 8.26 mg, 0.125 mmol, 1.25 eq), Na₂CO₃(53 mg, 0.50 mmol, 5.0 eq.) and D₂O (892 μ L). The reaction mixture was shaken at 50 °C at 450 rpm for 4 h in an Eppendorf ThermoMixer[®]. The reaction mixture was analyzed by NMR spectroscopy using maleic acid as an internal standard. The yield of sodium 2-hydroxyacetaldehyde oxime (**13a**) was found to be quantitative (Figure S19).

NMR analysis revealed an isomeric ratio of 70 (*Z*) : 30 (*E*).

Synthetic reference:

In a 50 mL Falcon-tube added with a stirring bar, 1,4-dioxane-2,5-diol (1.20 g, 10.0 mmol, 0.5 eq.) was dissolved in water (7.55 mL). After adding hydroxylamine (**7**; 50 wt% in H₂O; 2.64 g, 2.45 mL, 40.0 mmol, 2.0 eq.), the white suspension was stirred for 1 hour at room temperature. After the clear solution was lyophilized, 2-hydroxyacetaldehyde oxime (**13a**) was obtained as a colorless oil (0.99 g, 13.2 mmol, 66%).

NMR analysis revealed an isomeric ratio of 7 (*Z*) : 93 (*E*).

¹H-NMR (400 MHz, D₂O) δ = 7.44 (t, *Z*, *J* = 5.1 Hz, 1H, CH), 6.84 (t, *E*, *J* = 3.8 Hz, 1H, CH), 4.31 (d, *E*, *J* = 3.9 Hz, 2H, CH₂), 4.08 (d, *Z*, *J* = 5.2 Hz, 2H, CH₂). **¹³C-NMR** (101 MHz, D₂O) δ = 151.6 (*Z*, CH), 151.2 (*E*, CH), 58.4 (*E*, CH₂), 55.6 (*Z*, CH₂). **IR** (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3243 (s), 2882 (w), 1635 (w), 1447 (m), 1282 (m), 1224 (w), 1104 (w), 1046 (s), 989 (vs), 931 (vs), 690 (vs). **HRMS** (ESI⁺) calc.: [C₂H₅NO₂]⁺ 76.0354, found: 76.0391.

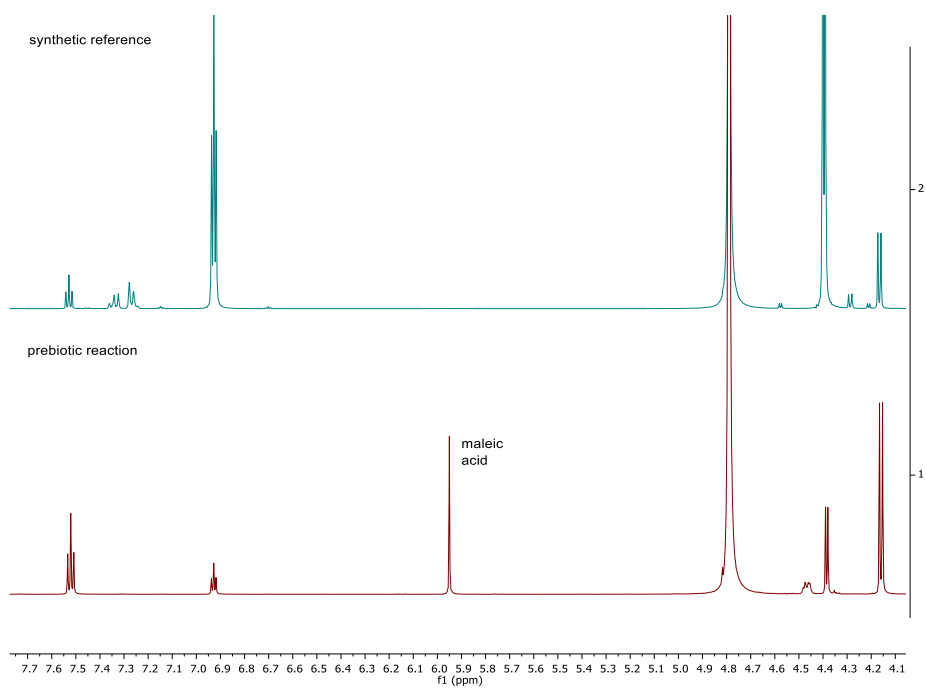
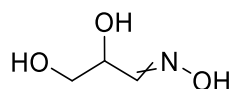


Figure S19: ¹H-NMR spectrum (400 MHz, D₂O, 4.1–7.7 ppm) of prebiotically and synthetically produced 2-hydroxyacetaldehyde oxime (**13a**). The *E/Z* ratio strongly varies depending on the synthetic conditions.

2,3-Dihydroxypropanal oxime (**13b**)



Prebiotic formation:

A 1M solution of sulfonate **14b** (100 μ L, 0.10 mmol, 1.0 eq) in D₂O was mixed with hydroxylamine (**7**; 50 wt% in H₂O; 7.66 μ L, 8.26 mg, 0.125 mmol, 1.25 eq), Na₂CO₃ (53 mg, 0.50 mmol, 5.0 eq.) and D₂O (892 μ L). The reaction mixture was shaken at 50 °C at 450 rpm for 4 h in an Eppendorf ThermoMixer[®]. The reaction mixture was analyzed by NMR spectroscopy using maleic acid as an internal standard. The yield of sodium 2-hydroxyacetaldehyde oxime (**13b**) was found to be quantitative (Figure S20).

NMR analysis revealed an isomeric ratio of 84 (*Z*) : 16 (*E*).

Synthetic reference:

In a 2 ml Eppendorf tube 3,6-bis(hydroxymethyl)-1,4-dioxane-2,5-diol (180 mg, 1 mmol, 0.5 eq.) was dissolved in water (755 μ L). After adding hydroxylamine (**7**; 50 wt% in H₂O; 264 mg, 245 μ L, 4.00 mmol, 2.0 eq.), the resulting white suspension was shaken at 1000 rpm in an Eppendorf shaker for 1 hour. After lyophilization 2,3-dihydroxypropanal oxime (**13b**; 65.0 mg, 0.619 mmol, 31%) was obtained as colorless oil.

NMR analysis revealed an isomeric ratio of 76 (*Z*) : 24 (*E*).

¹H-NMR (400 MHz, D₂O) δ = 7.44 (d, *Z*, *J* = 5.9 Hz, 1H, HONCH), 6.79 (t, *E*, *J* = 5.7 Hz, 1H, HONCH), 4.87 (td, *E*, *J* = 5.8, 3.9 Hz, 1H, CH), 4.29 (td, *Z*, *J* = 6.0, 4.9 Hz, 1H, CH), 3.67 (d, *E*, *J* = 4.8 Hz, 2H, CH₂), 3.65 (d, *Z*, *J* = 6.0 Hz, 2H, CH₂). **¹³C-NMR** (101 MHz, D₂O) δ = 152.2 (*E*, HONCH), 151.6 (*Z*, HONCH), 69.2 (*Z*, CH), 65.7 (*E*, CH), 63.1 (*Z*, CH₂), 62.3 (*E*, CH₂). **IR** (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3248 (s), 2883 (m), 1607 (vw), 1416 (m), 1284 (m), 1210 (w), 1077 (s), 1031 (vs), 924 (vs), 873 (vs). **HRMS** (ESI⁺) [C₃H₇NO₃]⁺ calc.: 106.0459, found: 106.0498.

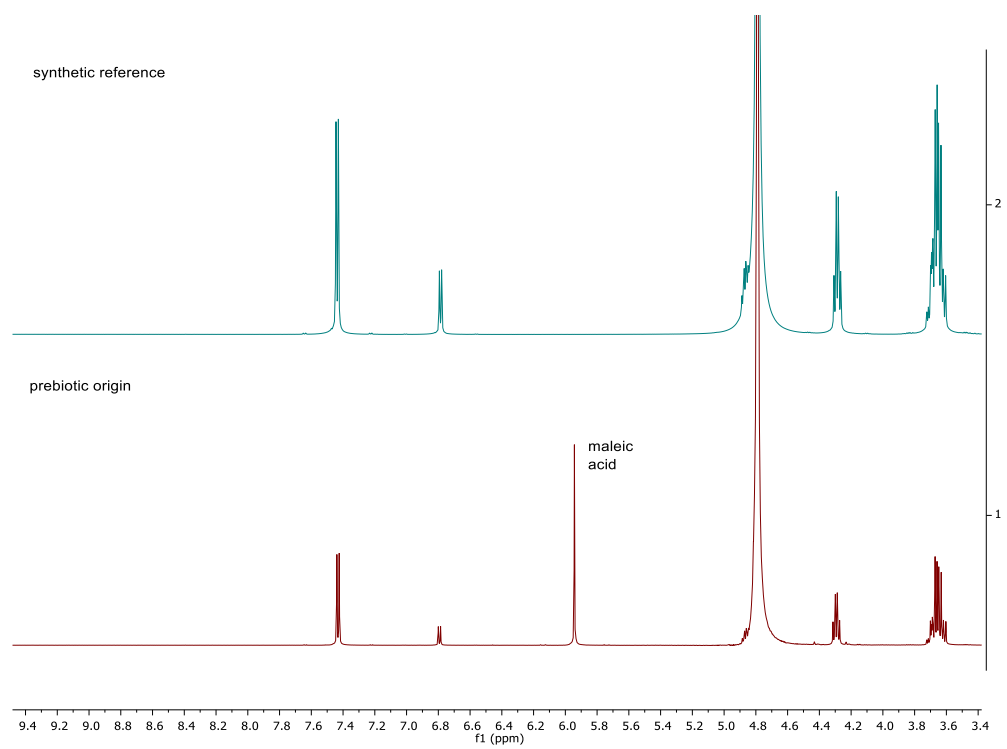
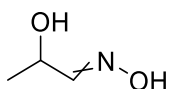


Figure S20: ¹H-NMR spectrum (400 MHz, D₂O, 3.4–9.4 ppm) of prebiotically and synthetically produced 2,3-dihydroxypropanal oxime (**13b**).

2-Hydroxypropanal oxime (**13c**)



Prebiotic formation:

A 1M solution of the sulfonate **14c** (100 μ L, 0.10 mmol, 1.0 eq) in D₂O was mixed with hydroxylamine (**7**; 50 wt% in H₂O; 7.66 uL, 8.26 mg, 0.125 mmol, 1.25 eq), Na₂CO₃ (53 mg, 0.50 mmol, 5.0 eq.) and D₂O (892 uL). The reaction mixture was shaken at 50 °C at 450 rpm for 4 h in an Eppendorf ThermoMixer[®]. The reaction mixture was analyzed by NMR spectroscopy using maleic acid as an internal standard. The yield of sodium 2-hydroxyacetaldehyde oxime (**13c**) was found to be 85% (Figure S21).

NMR analysis revealed an isomeric ratio of 85 (*Z*) : 15 (*E*).

Synthetic reference:

1,1-dimethoxypropan-2-ol (1.11 g, 10.0 mmol, 1.0eq.) was dissolved in water (10 mL). After the addition of DOWEX 50WX 8 (2.50 g), it was stirred at 50 °C for 3 h. DOWEX was filtered off, hydroxylamine solution 50 wt% in H₂O (755 mg, 700 μ L, 11.4 mmol, 1.14 eq.) was added to the filtrate and the solution was stirred for 1.5 hours at room temperature. After lyophilization the crude product was purified by column chromatography (DCM/MeOH: 9:1) to obtain the product (303 mg, 3.39 mmol, 34%) as a colorless oil.

NMR analysis revealed an isomeric ratio of 76 (*Z*) : 24 (*E*).

¹H-NMR (400 MHz, D₂O) δ = 7.43 (d, *Z*, *J* = 6.0 Hz, 1H, HONCH), 6.81 (d, *E*, *J* = 5.8 Hz, 1H, HONCH), 4.98-4.88 (m, 1H, CH), 4.41-4.36 (m, 1H, CH), 1.28 (dd, *J* = 6.7, 3.1 Hz, 3H, CH₃). **¹³C-NMR** (101 MHz, D₂O) δ = 155.8 (*E*, HONCH), 154.7 (*Z*, HONCH), 64.8 (*Z*, CH), 60.9 (*E*, CH), 21.9 (*Z*, CH₃), 18.6 (*E*, CH₃). **IR** (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3270 (w), 2975 (w), 2933 (w), 1643 (w), 1605 (vw), 1447 (m), 1370 (m), 1291 (w), 1218 (s), 1161 (m), 1070 (s), 1027 (vs), 962 (m), 917 (s), 865 (s), 836 (s), 717 (s). **HRMS** (ESI⁺) calc.: [C₃H₇NO₂]⁺ 90.0510, found: 90.0549.

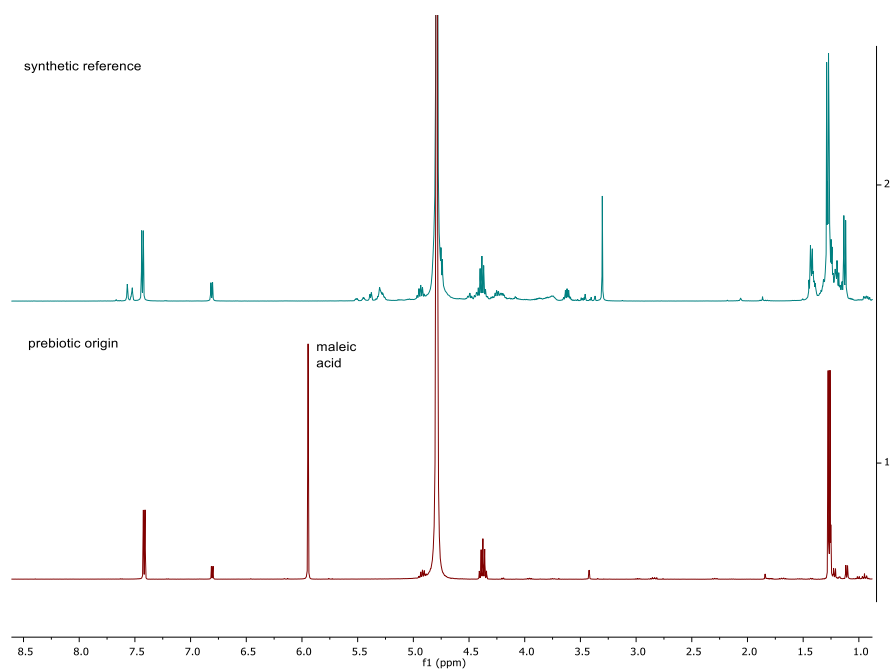
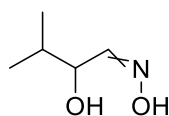


Figure S21: ¹H-NMR spectrum (400 MHz, D₂O, 1.0–8.5 ppm) of prebiotically and synthetically produced 2-hydroxypropanal oxime (**13c**).

2-Hydroxy-3-methylbutanal oxime (13d)



Prebiotic formation:

14d (22.0 mg, 0.10 mmol, 1.0 eq) was dissolved in D₂O (992 uL) together with hydroxylamine (**7**; 50 wt% in H₂O; 7.66 uL, 8.26 mg, 0.125 mmol, 1.25 eq) and Na₂CO₃ (53 mg, 0.50 mmol, 5.0 eq.). The reaction mixture was shaken at 50 °C at 450 rpm for 8 h in an Eppendorf ThermoMixer[®]. The reaction mixture was analyzed by NMR spectroscopy using maleic acid as an internal standard. The yield of sodium 2-hydroxyacetaldehyde oxime (**14d**) was found to be quantitative (Figure S22).

NMR analysis revealed just one variant of 85 (*Z*) : 15 (*E*).

Synthetic reference:

1,1-Dimethoxy-3-methylbutan-2-ol⁸ (1.48 g, 10.0 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in H₂O (10 mL). After the addition of DOWEX 50WX 8 (2.50 g), the reaction mixture was stirred at 50 °C for 4 h. DOWEX was filtered off, hydroxylamine solution 50 wt% in H₂O (755 mg, 700 μL, 11.4 mmol, 1.14 eq.) was added to the filtrate and the solution was stirred for 1h at room temperature. The crude product was purified by column chromatography (DCM/MeOH = 9/1) to obtain the product (468 mg, 3.99 mmol, 40%) as a yellowish solid.

NMR analysis revealed just one isomer.

¹H-NMR (400 MHz, D₂O) δ = 7.43 (d, *Z*, *J* = 7.1 Hz, 1H, HONCH), 6.70 (d, *E*, *J* = 6.8 Hz, 1H, HONCH), 4.48 (t, *E*, *J* = 6.8 Hz, 1H, CH), 3.91 (t, *Z*, *J* = 7.0 Hz, 1H, CH), 2.65 – 2.51 (m, *E*, 1H, CH), 1.84 (dp, *Z*, *J* = 13.7, 6.9 Hz, 1H, (CH₃)₂CH), 0.94 (d, *E*, *s* *J* = 8.4 Hz, 6H, CH₃), 0.91 (d, *Z*, *J* = 6.7 Hz, 3H, CH₃), 0.85 (d, *Z*, *J* = 6.9 Hz, 3H, CH₃). ¹³C-NMR (101 MHz, D₂O) δ = 151.4 (HONCH), 73.2 (CH), 32.4 ((CH₃)₂CH), 18.2 (CH₃). IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3260 (m), 2963 (w), 2920 (m), 2871 (w), 1656 (vw), 1464 (m), 1381 (w), 1369 (w), 1346 (m), 1324 (w), 1304 (w), 1272 (w), 1145 (w), 1125 (w), 1025 (vs), 962 (vs), 945 (vs), 927 (vs), 917 (s), 842 (m), 801 (w), 738 (s). HRMS (ESI⁺) calc.: [C₅H₁₁NO₂]⁺ 118.0823, found: 118.0497.

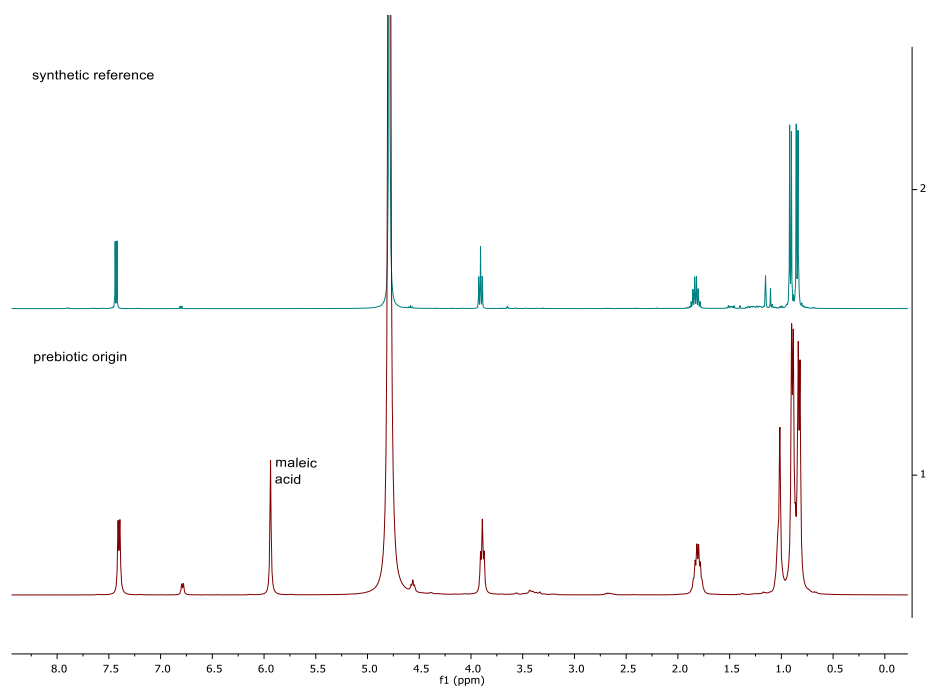
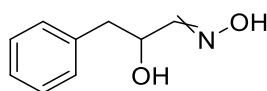


Figure S22: ¹H-NMR spectrum (400 MHz, D₂O, 1.0–8.5 ppm) of prebiotically and synthetically produced 2-hydroxy-3-methylbutanal oxime (**13d**).

2-Hydroxy-3-phenylpropanal oxime (13e)



Prebiotic formation:

14e (25.4 mg, 0.10 mmol, 1.0 eq) was dissolved in D₂O (992 uL) together with hydroxylamine (**7**; 50 wt% in H₂O; 7.66 uL, 8.26 mg, 0.125 mmol, 1.25 eq) and Na₂CO₃ (53 mg, 0.50 mmol, 5.0 eq.). The reaction mixture was shaken at 50 °C at 450 rpm for 8 h in an Eppendorf ThermoMixer[®]. The reaction mixture was analyzed by NMR spectroscopy using maleic acid as an internal standard. The yield of sodium 2-hydroxyacetaldehyde oxime (**13e**) was found to be 75% (Figure S23).

NMR analysis revealed an isomeric ratio of 81 (*Z*) : 19 (*E*).

Synthetic reference:

1,1-dimethoxy-3-phenylpropan-2-ol⁸ (1.96 g, 10.0 mmol, 1.0 eq) and DOWEX 50WX 8 (5.0 g) were dissolved in H₂O (10 mL) and stirred at room temperature for 3 h. Dowex was filtered off and hydroxylamine 50 wt% in H₂O (1.35 g, 1.25 mL, 20.4 mmol, 2.04 eq) was added and the reaction mixture stirred at room temperature for 90 min. The solvent was removed by freeze drying and the crude product purified through column chromatography (EtOAc/Isohex = 2/3) to yield the product as a yellowish oil (631 mg, 3.82 mmol, 38%).

NMR analysis revealed an isomeric ratio of 76 (*Z*) : 24 (*E*).

¹H-NMR (400 MHz, D₂O) δ = 7.45 (d, *Z*, *J* = 6.4 Hz, 1H, HONCH), 7.38 – 7.18 (m, *E*+*Z*, 5H, CH_{phenyl}), 6.79 (d, *E*, *J* = 6.0 Hz, 1H, HONCH), 5.06 (ddd, *E*, *J* = 7.9, 6.0, 5.0 Hz, 1H, CH), 4.45 (dt, *Z*, *J* = 7.4, 6.6 Hz, 1H, CH), 3.03 – 2.82 (m, *E*+*Z*, 2H, CH₂). **¹³C-NMR** (101 MHz, D₂O) δ = 154.32 (*E*, HONCH), 153.54 (*Z*, HONCH), 137.02 (*E*, C_{phenyl}), 136.68 (*Z*, C_{phenyl}), 129.55 (*Z*, CH_{phenyl}), 129.48 (*E*, CH_{phenyl}), 128.58 (*Z*, CH_{phenyl}), 128.53 (*E*, CH_{phenyl}), 126.77 (*Z*, CH_{phenyl}), 126.75 (*E*, CH_{phenyl}), 69.71 (*Z*, CH), 65.33 (*E*, CH), 40.43 (*Z*, CH₃), 39.03 (*E*, CH₃). **IR** (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3379 (vw), 2930 (w), 2832 (vw), 10603 (vw), 1495 (w), 1453, (m), 1276 (w), 1189 (m), 1128 (s), 1055 (vs), 974 (s), 749 (s), 699 (vs). **HRMS** (ESI) calc.: [C₉H₁₀NO₂]⁻ 164.0717, found: 164.0717

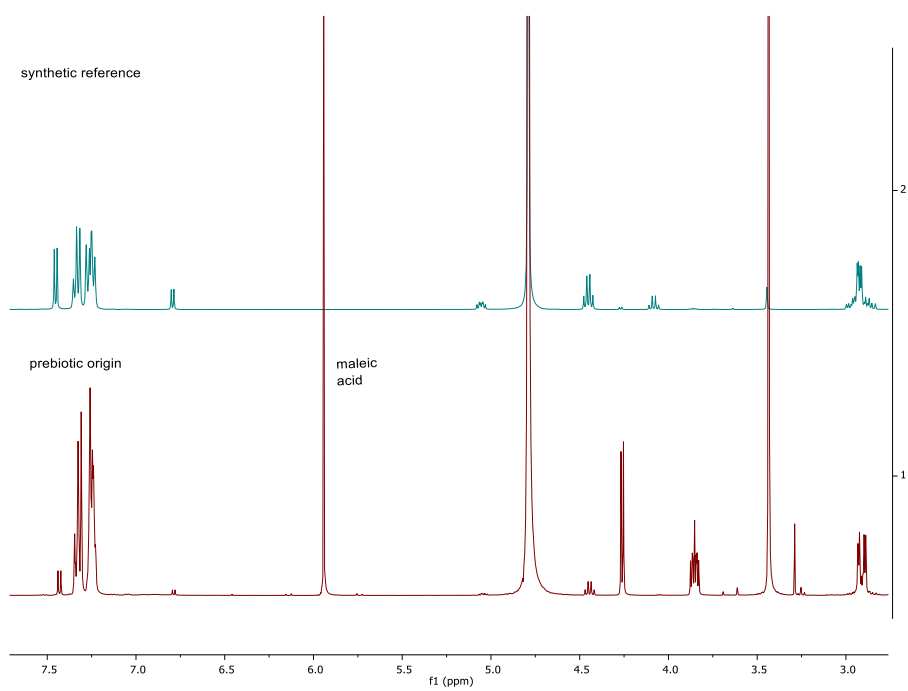
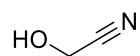


Figure S23: ¹H-NMR spectrum (400 MHz, D₂O, 3.0–7.5 ppm) of prebiotically and synthetically produced 2-hydroxy-3-phenylpropanal oxime (**13e**).

Synthesis of α -Hydroxynitriles

2-Hydroxyacetonitrile (**15a**)



Prebiotic formation from oximes:

A 1 M solution of 2-hydroxyacetaldehyde oxime (**13a**; 50 μ L, 0.05 mmol, 1.0 eq.) was mixed with a buffer containing formic acid and NaHCOO (5 M/5 M, 200 μ l). The mixture was shaken at 70 °C and 450 rpm for 6 h in an Eppendorf ThermoMixer[®] open to the air to allow water to evaporate. The residue was dissolved in D₂O and the solution was analyzed by NMR spectroscopy using maleic acid as an internal standard (0.5 eq.). The product was identified by comparison of the NMR with a commercial sample and the yield was determined to be 91% (Figure S24).

Prebiotic one-pot formation from sulfonates:

A 1 M solution of sodium 1,2-dihydroxyethane-1-sulfonate (**14a**; 100 μ L, 0.1 mmol, 1.0 eq.) was mixed with Na₂CO₃ (26.5 mg, 0.25 mmol, 2.5 eq) and water (392 μ L). To the resulting solution hydroxylamine (**7**; 50 wt% in H₂O; 7.66 μ L, 8.26 mg, 0.125 mmol, 1.25 eq.) was added and it was shaken at 50 °C and 450 rpm for 4 h in an Eppendorf ThermoMixer[®]. A formic acid and NaHCOO containing buffer (10 M/10 M, 300 μ l) was added to the reaction mixture and it was shaken at 70 °C and 450 rpm for 24 h in an Eppendorf ThermoMixer[®] open to the air to allow water to evaporate. The residue was dissolved in D₂O and the solution was analyzed by NMR spectroscopy using maleic acid as an internal standard (0.5 eq.). The product was identified by comparison of the NMR with a commercial sample and the yield determined to be 63% (Figure S24).

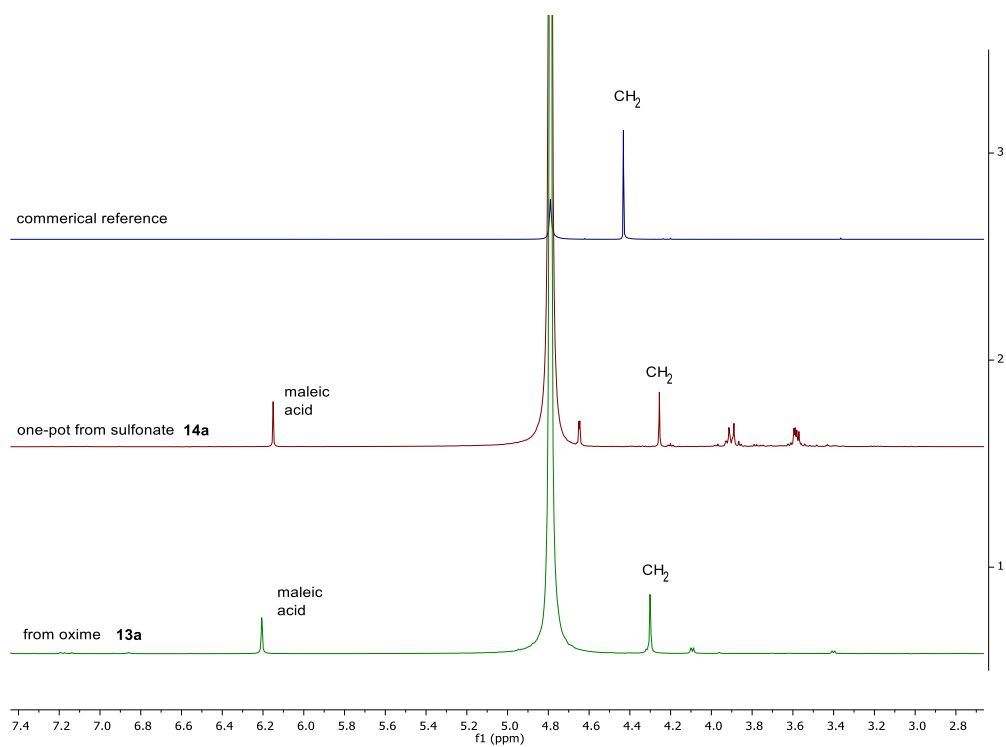
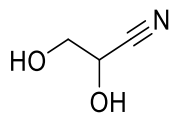


Figure S24: ¹H-NMR spectrum (400 MHz, D₂O, 2.8–7.4 ppm) for the prebiotic synthesis of 2-hydroxyacetonitrile (**15a**) from sulfonate **14a** (middle) and oxime **13a** (bottom) and the commercial reference (top).

2,3-Dihydroxypropanenitrile (**15b**)



Prebiotic formation from oximes:

A 500 mM solution of 2,3-dihydroxypropanal oxime (**13b**; 100 μ L, 0.05 mmol, 1.0 eq.) was mixed with a buffer containing formic acid and NaHCOO (5 M/5 M, 200 μ l). The mixture was shaken at 70 $^{\circ}$ C and 450 rpm for 6 h in an Eppendorf ThermoMixer[®] open to the air to allow water to evaporate. The residue was dissolved in D₂O and the solution was analyzed by NMR spectroscopy using maleic acid as an internal standard (0.5 eq.). The product was identified by comparison of the NMR with a synthetic reference and the yield was determined to be 75% (Figure S25).

Prebiotic one-pot formation from sulfonate:

A 1M solution of sodium 1,2,3-trihydroxypropane-1-sulfonate (**14b**; 50 μ L, 0.05 mmol, 1.0 eq.) was mixed with 2 M Na₂CO₃ in H₂O (50 μ L, 0.10 mmol, 2.0 eq) and water (46 μ L). To the resulting solution hydroxylamine (**7**; 50 wt% in H₂O; 3.83 μ L, 4.13 mg, 0.063 mmol, 1.25 eq.) was added and it was shaken at 50 $^{\circ}$ C and 450 rpm for 4 h in an Eppendorf ThermoMixer[®]. A formic acid and NaHCOO containing buffer (6 M/4 M, 275 μ l) was added to the reaction mixture and it was shaken at 50 $^{\circ}$ C and 450 rpm for 28 h in an Eppendorf ThermoMixer[®] open to the air to allow water to evaporate. The residue was dissolved in D₂O and the solution was analyzed by NMR spectroscopy using maleic acid as an internal standard (0.5 eq.). The product was identified by comparison of the NMR with the synthetic standard and the yield determined to be 28% (Figure S25).

Synthetic reference:

1,4-Dioxane-2,5-diol (1.88 g, 15.7 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in water (100 mL). After the addition of potassium cyanide (2.45 g, 37.6 mmol, 2.4 eq.), the reaction batch was adjusted with 2 M hydrochloric acid to pH 3-4. The reaction mixture was stirred for 4 h at room temperature. The solution was degassed with N₂ for 2 h to remove remaining hydrocyanic acid. The water was removed by rotary evaporation and the residue was dissolved in isopropanol (100 mL). The resulting white suspension was filtered, and the solvent was removed from the filtrate by rotary evaporation. 2,3-dihydroxypropanenitrile (**15b**; 2.28 g, 26.2 mmol, 84 %) was obtained as brown oil.

¹H-NMR (400 MHz, D₂O) δ = 4.67 (t, J = 4.8 Hz, 1H, CH), 3.79 (d, J = 4.8 Hz, 2H, CH₂). ¹³C-NMR (101 MHz, D₂O) δ = 117.6 (CN), 62.6 (CH), 61.7 (CH₂). IR (cm⁻¹): $\tilde{\nu}$ = 3290 (m), 2943 (w), 2653 (w), 2247 (w), 1770 (vw), 1667 (vw), 1516 (vw), 1417 (w), 1323 (w), 1230 (w), 1204 (w), 1148 (w), 1094 (vs), 1056 (vs), 1007 (s), 935 (w), 900 (m), 873 (w), 819 (m), 701 (s).

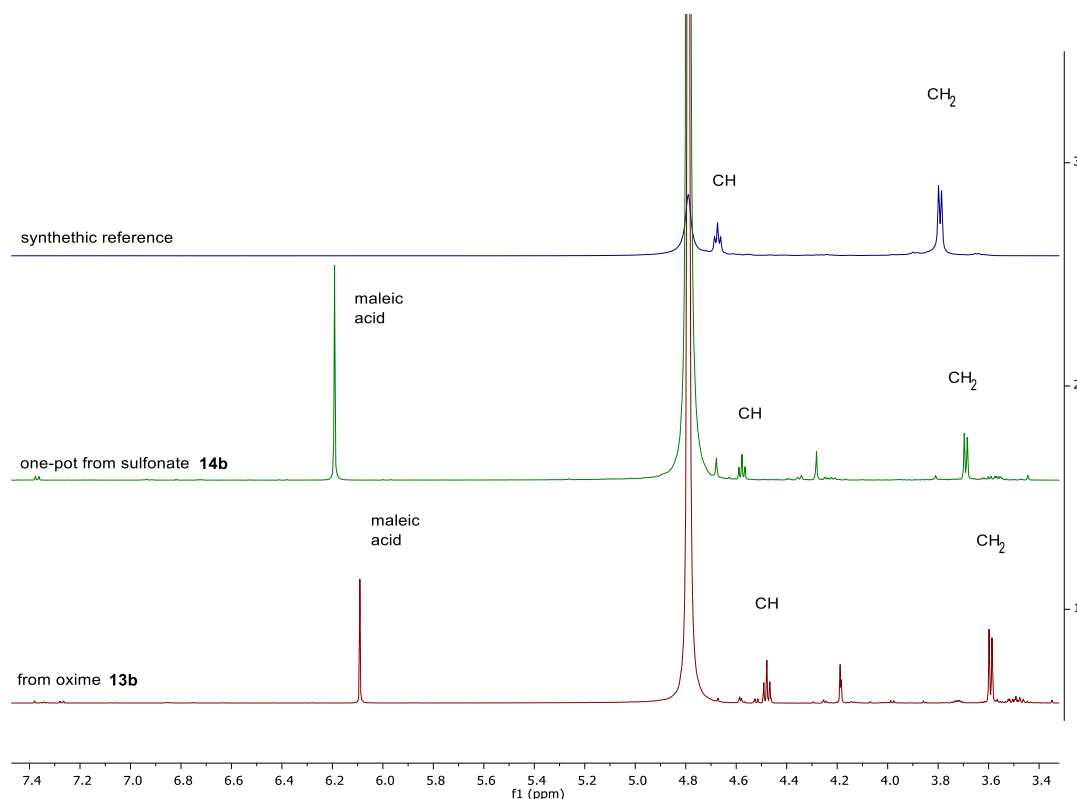
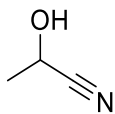


Figure S25: ¹H-NMR spectrum (400 MHz, D₂O, 3.4–7.4 ppm) for the synthesis of 2-hydroxyacetonitrile (**15b**) from sulfonate **14b** (middle) and oxime **13b** (bottom) and the synthetic standard (top).

2-Hydroxypropanenitrile (**15c**)



Prebiotic origin from oximes:

A 500 mM solution of 2-hydroxypropanal oxime (**15c**; 100 μ L, 0.10 mmol, 1.0 eq.) was mixed with a buffer containing formic acid and NaHCOO (5 M/5 M, 250 μ l). The mixture was shaken at 50 °C and 450 rpm for 48 h in an Eppendorf ThermoMixer[®] open to the air to allow water to evaporate. The residue was dissolved in D₂O and the solution was analyzed by NMR spectroscopy using maleic acid as an internal standard (0.5 eq.). The product was identified by comparison of the NMR with a commercial sample and the yield was determined to be 78% (Figure S26).

Prebiotic one-pot formation from sulfonates:

A 1M solution of sodium 1,2-dihydroxypropane-1-sulfonate (**14c**; 50 μ L, 0.05 mmol, 1.0 eq.) was mixed with an aqueous 2 M Na₂CO₃ solution (50 μ L, 0.10 mmol, 2.0 eq) and water (46 μ L). To the resulting solution hydroxylamine (**7**; 50 wt% in H₂O; 3.83 μ L, 4.13 mg, 0.063 mmol, 1.25 eq.) was added and it was shaken at 50 °C and 450 rpm for 4 h in an Eppendorf ThermoMixer[®]. A formic acid and NaHCOO containing buffer (6 M/4 M, 330 μ l) was added to the reaction mixture and it was shaken at 50 °C and 450 rpm for 48 h in an Eppendorf ThermoMixer[®] open to the air to allow water to evaporate. The residue was dissolved in D₂O and the solution was analyzed by NMR spectroscopy using maleic acid as an internal standard (0.5 eq.). The product was identified by comparison of the NMR with a commercial sample and the yield determined to be 36% (Figure S26).

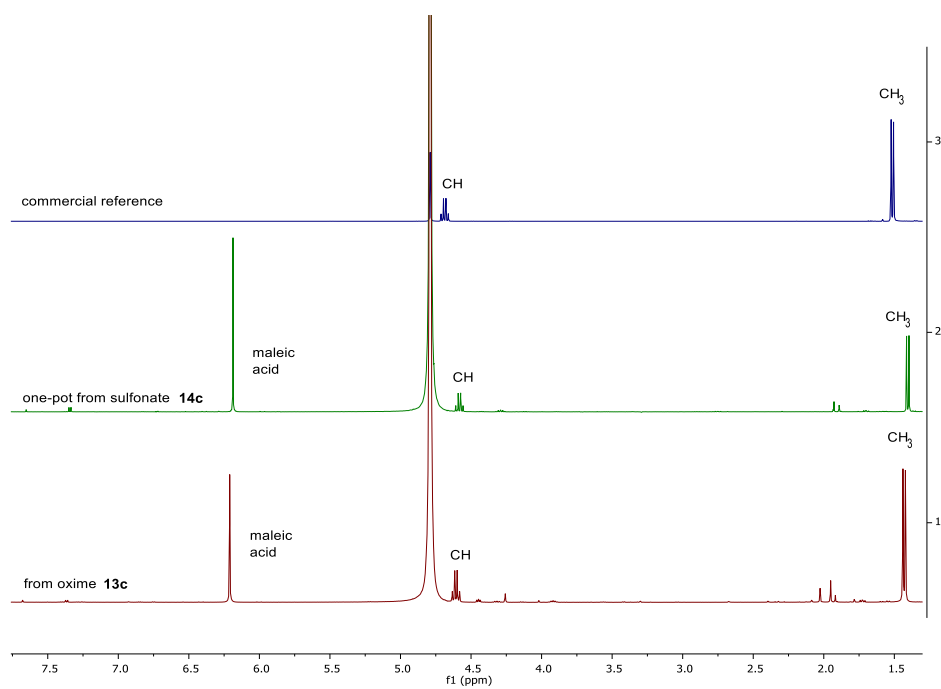
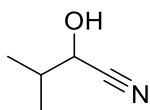


Figure S26: ¹H-NMR spectrum (400 MHz, D₂O, 1.5–7.5 ppm) for the synthesis of 2-hydroxypropanenitrile (**15c**) from sulfonate **14c** (middle), oxime **13c** (bottom) and the synthetic standard (top).

2-Hydroxy-3-methylbutanenitrile (**15d**)



Prebiotic formation from oximes:

2-Hydroxy-3-methylbutanal oxime (**13d**; 5.9 mg, 0.05 mmol, 1.0 eq.) was mixed with a buffer containing formic acid and NaHCOO (10 M/10 M, 200 μ l). The mixture was shaken at 50 °C and 450 rpm for 72 h in an Eppendorf ThermoMixer[®] open to air to allow water to evaporate. The residue was dissolved in D₂O and the solution was analyzed by NMR spectroscopy using maleic acid as an internal standard (0.5 eq.). The product was identified by comparison of the NMR with a synthetic reference and the yield was determined to be quantitative (Figure S27).

Prebiotic one-pot formation from sulfonates:

Sodium 1,2-dihydroxy-3-methylbutane-1-sulfonate (**14d**; 20.6 mg, 0.10 mmol, 1.0 eq.) was mixed with 2 M Na₂CO₃ in H₂O (100 μ L, 0.20 mmol, 2.0 eq.) and water (92 μ L). To the resulting solution hydroxylamine (**7**; 50 wt% in H₂O; 7.88 μ L, 8.26 mg, 0.125 mmol, 1.25 eq.) was added and it was shaken at 50 °C and 450 rpm for 4 h in an Eppendorf ThermoMixer[®]. A formic acid and NaHCOO containing buffer (6 M/4 M, 500 μ l) was added to the reaction mixture and it was shaken at 70 °C and 450 rpm for 18 h in an Eppendorf ThermoMixer[®] open to the air to allow water to evaporate. The residue was dissolved in D₂O and the solution was analyzed by NMR spectroscopy using maleic acid as an internal standard (0.5 eq.). The product was identified by comparison of the NMR with the synthetic standard and the yield determined to be 84% (Figure S27).

Synthetic reference:

Isobutyraldehyde (1.00 g, 1.27 mL, 13.9 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in H₂O (10 mL) and Et₂O (17 mL), KCN (2.53 g, 38.8 mmol, 2.8 eq.) was added and the reaction mixture vigorously stirred overnight. The phases were separated and the aqueous phase extracted with Et₂O (3 x 20 mL). The combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and the solvent removed *in vacuo*. The crude product was purified by column chromatography (DCM /MeOH = 39 /1) to yield 2-hydroxy-3-methylbutanenitrile **15d** (650 mg, 6.56 mmol, 47%) as a colorless liquid.

The NMR data correspond to the literature.¹⁴

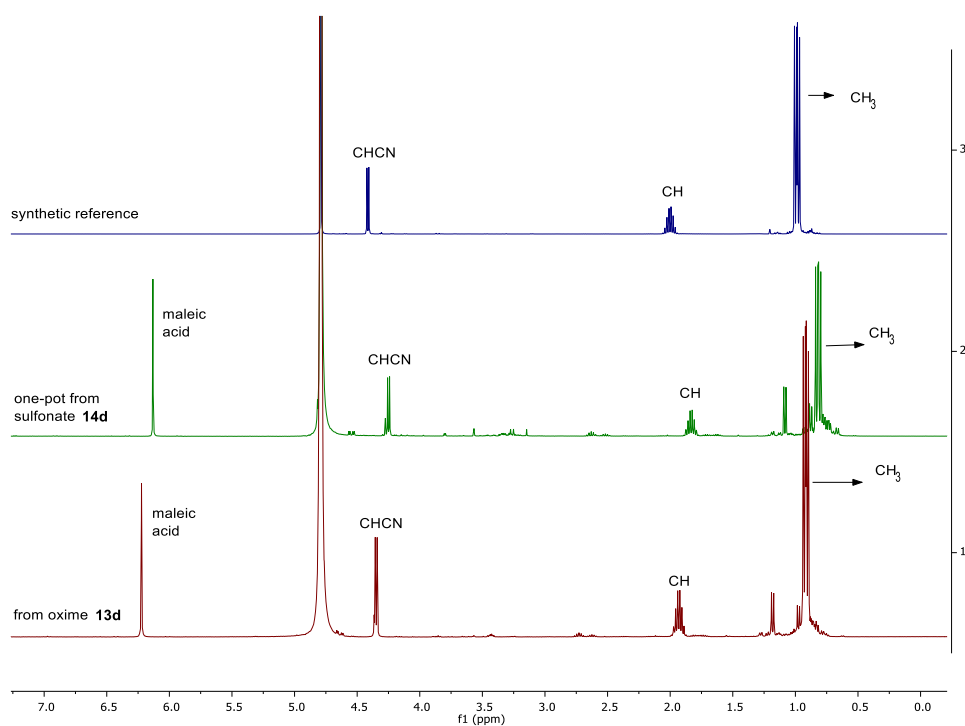
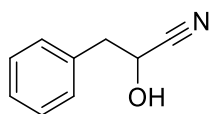


Figure S27: ¹H-NMR spectrum (400 MHz, D₂O, 0.4–6.4 ppm) for the synthesis of 2-hydroxy-3-methylbutanenitrile (**15d**) from sulfonate **14d** (middle), oxime **13d** (bottom) and the synthetic standard (top).

2-Hydroxy-3-phenylpropanenitrile (15e)



Prebiotic formation from oximes:

2-Hydroxy-3-phenylpropanal oxime (**13e**; 16.5 mg, 0.05 mmol, 1.0 eq.) was mixed with a buffer containing formic acid and NaHCOO (5 M/5 M, 300 μ l). The mixture was shaken at 50 °C and 450 rpm for 72 h in an Eppendorf ThermoMixer[®] open to the air to allow water to evaporate. The residue was dissolved in D₂O and the solution was analyzed by NMR spectroscopy using maleic acid as an internal standard (0.5 eq.). The product was identified by comparison of the NMR with a synthetic reference and the yield was determined to be 82% (Figure S28).

Prebiotic one-pot formation from sulfonates:

Sodium 1,2-dihydroxy-3-phenylpropane-1-sulfonate (**14e**; 12.7 mg, 0.05 mmol, 1.0 eq.) was mixed with 2 M Na₂CO₃ in H₂O (50 μ L, 0.10 mmol, 2.0 eq.) and water (46 μ L). To the resulting solution hydroxylamine (**7**; 50 wt% in H₂O, 3.84 μ L, 4.13 mg, 0.063 mmol, 1.25 eq) was added and it was shaken at 50 °C and 450 rpm for 4 h in an Eppendorf ThermoMixer[®]. A formic acid and NaHCOO containing buffer (6 M/4 M, 600 μ l) was added to the reaction mixture and it was shaken at 70 °C and 450 rpm for 24 h in an Eppendorf ThermoMixer[®] open to the air to allow water to evaporate. The residue was dissolved in D₂O and the solution was analyzed by NMR spectroscopy using maleic acid as an internal standard (0.5 eq.). The product was identified by comparison of the NMR with the synthetic standard and the yield determined to be 20% (Figure S28).

Synthetic reference:

KCN (650 mg, 10.0 mmol, 1.67 eq.) was dissolved in water (2 mL) and Et₂O (4 mL) and the resulting solution cooled to 0 °C. 2-phenylacetaldehyde (721 mg, 700 μ L, 6.00 mmol, 1.0 eq.) and acetic acid (572 μ L) were added dropwise to the solution and the reaction mixture stirred for 2h at room temperature. The phases were separated and the aqueous phase extracted with Et₂O (3 x 10 mL), the combined organic layers dried over MgSO₄, filtered and the solvent

removed *in vacuo*. The crude product was purified by column chromatography (Isohex/EtOAC = 3/1) to yield the product (733 mg, 4.98 mmol, 83%) as a yellow oily liquid.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O) δ = 7.34 – 7.22 (m, 5H, $\text{CH}_{\text{phenyl}}$), 6.53 (d, J = 6.3 Hz, 1H, HONCH), 4.73 (q, J = 7.0 Hz, 1H, CH), 2.99 (dd, J = 7.1, 2.7 Hz, 2H CH_2). **$^{13}\text{C-NMR}$** (101 MHz, D_2O) δ = 135.74 (C_{phenyl}), 129.67 ($\text{CH}_{\text{phenyl}}$), 128.29 ($\text{CH}_{\text{phenyl}}$), 126.94 ($\text{CH}_{\text{phenyl}}$), 121.01 (HONCH), 61.28 (CH), 40.83 (CH). **IR** (cm^{-1}): $\tilde{\nu}$ = 3372 (m), 3030 (vw), 2266 (vw), 1495 (w), 1456 (w), 1419 (w), 1279 (m), 1127 (w), 1080 (m), 1063 (s), 1026 (m), 970 (m), 829 (w), 801 (m), 748 (vs), 700 (vs).

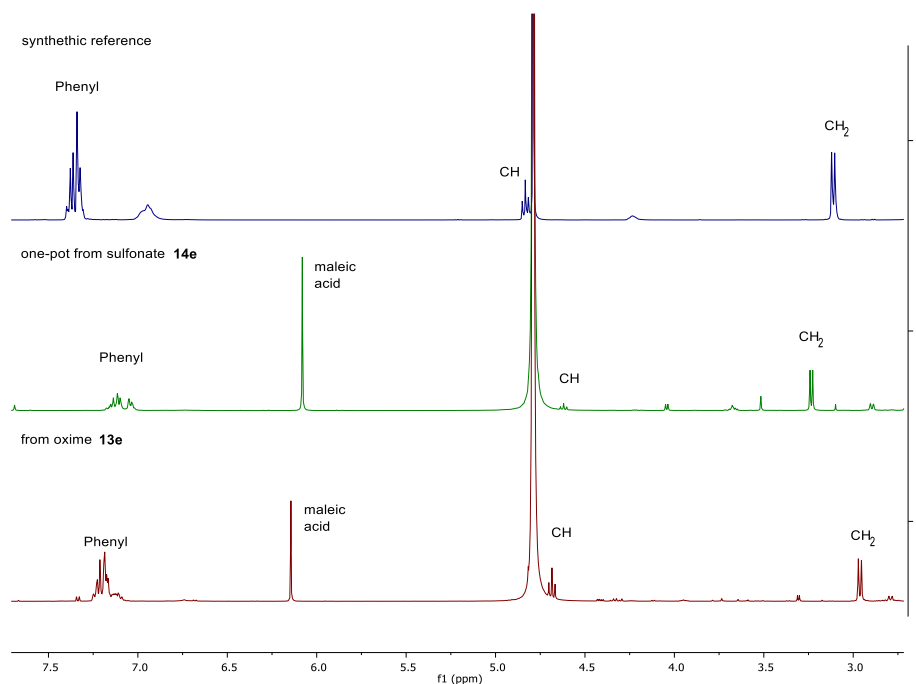
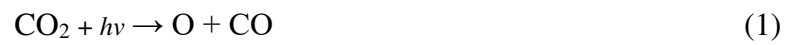


Figure S28: $^1\text{H-NMR}$ spectrum (400 MHz, D_2O , 3.0–7.5 ppm) for the synthesis of 2-hydroxy-3-phenylpropanenitrile (**15e**) from sulfonate **14e** (middle), oxime **13e** (bottom) and the synthetic standard (top).

Fundamental Reaction Pathways

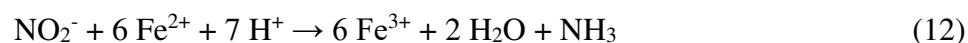
Formation of NO:¹⁵



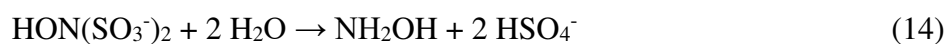
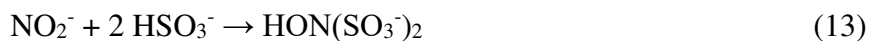
Formation of NO_x⁻:¹⁶



Formation of NH₃:¹⁷



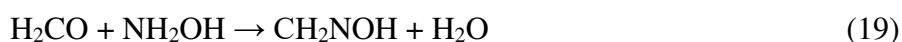
Formation of NH₂OH (6):¹



Formation of H₂CO (7):¹⁸



Formation of urea (11):¹³



Crystallographic Data

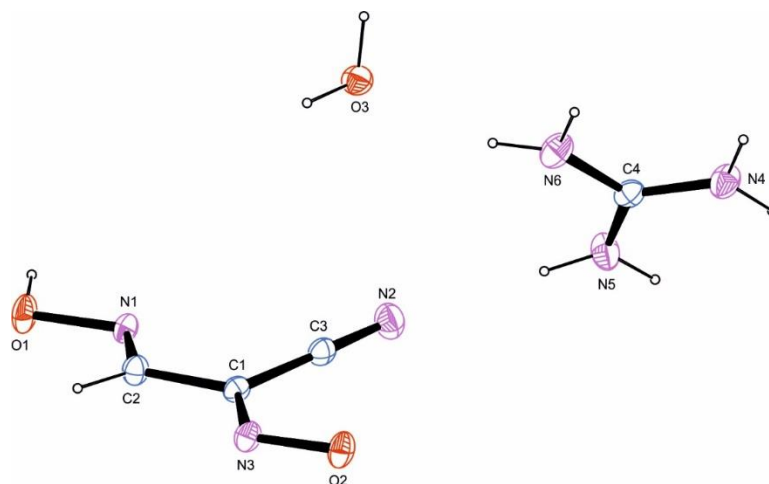


Figure S29: Crystal structure of the monohydrate guanidinium (**12**) salt of *N*-hydroxy-2-(hydroxyimino)acetimidoyl cyanide (**29**). Nitrogen atoms (pink), oxygen atoms (red) and carbon atoms (blue) are represented by large spherical structures. Hydrogen atoms (white) are represented by small spherical structures. CCDC 2189560 contains the supplementary crystallographic data for this paper. These data can be obtained free of charge from The Cambridge Crystallographic Data Centre via www.ccdc.cam.ac.uk/structures.

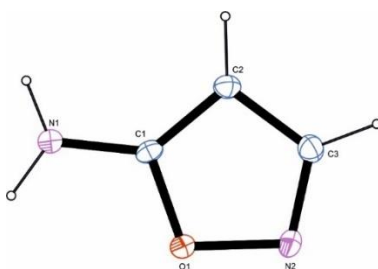


Figure S30: Crystal structure of 5-aminoisoxazole (**20**). Nitrogen atoms (pink), oxygen atoms (red) and carbon atoms (blue) are represented by large spherical structures. Hydrogen atoms (white) are represented by small spherical structures. CCDC 2051594 contains the supplementary crystallographic data for this paper. These data can be obtained free of charge from The Cambridge Crystallographic Data Centre via www.ccdc.cam.ac.uk/structures.

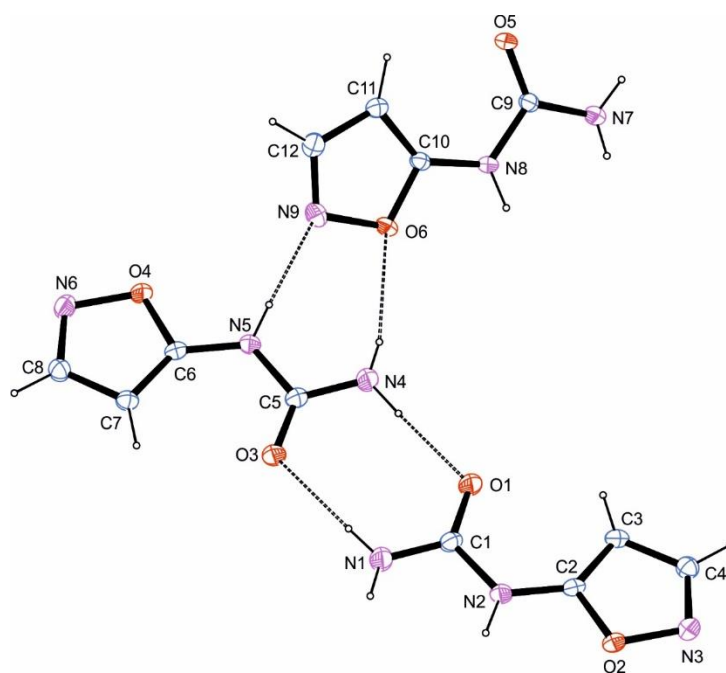


Figure S31: Crystal structure of 5-aminoisoxazolyl-urea **22**. Nitrogen atoms (pink), oxygen atoms (red) and carbon atoms (blue) are represented by large spherical structures. Hydrogen atoms (white) are represented by small spherical structures. CCDC 2189559 contains the supplementary crystallographic data for this paper. These data can be obtained free of charge from The Cambridge Crystallographic Data Centre via www.ccdc.cam.ac.uk/structures.

Uncategorized References

- 1 Becker, S. *et al.* Unified prebiotically plausible synthesis of pyrimidine and purine RNA ribonucleotides. *Science* **366**, 76-82 (2019).
- 2 Becker, S. *et al.* Wet-dry cycles enable the parallel origin of canonical and non-canonical nucleosides by continuous synthesis. *Nat. Commun.* **9**, 1-9 (2018).
- 3 Grabowski, E. & Autrey, R. Oxygenated dienes and the synthesis of methylenedioxybiphenyl derivatives. *Tetrahedron* **25**, 4315-4330 (1969).
- 4 Betke, T. & Gröger, H. (2018).
- 5 Malcor, J.-D. *et al.* Synthesis and reactivity of pyrrolo [3, 2-d][1, 3] oxazine-2, 4-dione. Access to new pyrrolo [3, 2-e][1, 4] diazepine-2, 5-diones. *Tetrahedron* **70**, 4631-4639 (2014).
- 6 Štimac, A. & Kobe, J. An improved preparation of 2, 3, 5-tri-O-acyl- β -D-ribofuranosyl azides by the Lewis acid-catalysed reaction of β -D-ribofuranosyl acetates and trimethylsilyl azide: an example of concomitant formation of the α anomer by trimethylsilyl triflate catalysis. *Carbohydr. Res.* **232**, 359-365 (1992).
- 7 Davis, M. C. & Groshens, T. J. Orthoamides by selective borohydride reduction of N, N', N''-triacyl- and N, N', N''-tri(alkoxycarbonyl)-guanidines. *Tetrahedron Lett.* **60**, 427-431 (2019).
- 8 Zacuto, M. J. & Cai, D. α -Hydroxylation of carbonyls using iodine. *Tetrahedron Lett.* **46**, 447-450 (2005).
- 9 Bruker, A. Inc: Madison, Wisconsin, 2012.
- 10 Sheldrick, G. (University of Göttingen, 1996).
- 11 Sheldrick, G. M. Crystal structure refinement with SHELXL. *Acta Crystallographica Section C: Structural Chemistry* **71**, 3-8 (2015).
- 12 Farrugia, L. J. WinGX and ORTEP for Windows: an update. *J. Appl. Crystallogr.* **45**, 849-854 (2012).
- 13 Yanagawa, H. & Egami, F. Formation of molecules of biological interest from formaldehyde and hydroxylamine in a modified sea medium. *J. Biochem.* **85**, 1503-1507 (1979).
- 14 Patel, B. H., Percivalle, C., Ritson, D. J., Duffy, C. D. & Sutherland, J. D. Common origins of RNA, protein and lipid precursors in a cyanosulfidic protometabolism. *Nat. Chem.* **7**, 301-307 (2015).
- 15 Mvondo, D. N., Navarro-González, R., McKay, C. P., Coll, P. & Raulin, F. Production of nitrogen oxides by lightning and coronae discharges in simulated early Earth, Venus and Mars environments. *Adv. Space Res.* **27**, 217-223 (2001).
- 16 Summers, D. P. & Khare, B. Nitrogen fixation on early Mars and other terrestrial planets: experimental demonstration of abiotic fixation reactions to nitrite and nitrate. *Astrobiology* **7**, 333-341 (2007).
- 17 Summers, D. P. & Chang, S. Prebiotic ammonia from reduction of nitrite by iron (II) on the early Earth. *Nature* **365**, 630-633 (1993).
- 18 Pinto, J. P., Gladstone, G. R. & Yung, Y. L. Photochemical Production of Formaldehyde in Earth's Primitive Atmosphere. *Science* **210**, 183-185 (1980).

Anhang C

Synthese **32** im Gesteinsreaktor (4 Äquivalente Harnstoff):

31 (840 mg, 768 μ L, 10,0 mmol, 1,0 Äq.) wurde gemeinsam mit Harnstoff (2,40 g, 40 mmol, 4,0 Äq.) und ZnCl_2 (1,36 g, 10,0 mmol, 1,0 Äq.) in Wasser (100 mL) gelöst und in einen schräg gestellten Gneiss-Reaktor überführt. Dieser Reaktor wurde für 8 (28) Tage auf 93 °C erhitzt und jeweils nach ungefähr 4 (8) Tagen weiteres Wasser (50 mL) zugegeben um die Reaktionsmischung wieder anzulösen. Nachdem der Reaktor auf Raumtemperatur abgekühlt war, wurde der Rückstand in Wasser (200 mL) gelöst und eine Probe (10 μ L), welche mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 1 mL verdünnt wurde, für LCMS-Analysen (5 μ L Injektionsvolumen), genommen. Die Ausbeute wurde anhand einer Kalibrierungsgeraden, welche mit kommerziell erhältlichen **31** aufgenommen wurde, auf 53 % (48 %) bestimmt.

Synthese **32** im Gesteinsreaktor (1 Äquivalente Harnstoff):

31 (840 mg, 768 μ L, 10,0 mmol, 1,0 Äq.) wurde gemeinsam mit Harnstoff (600 mg, 10 mmol, 1,0 Äq.) und ZnCl_2 (340 mg, 2,50 mmol, 0,25 Äq.) in Wasser (100 mL) gelöst und in einen schräg gestellten Gneiss-Reaktor überführt. Dieser Reaktor wurde für 8 Tage auf 93 °C erhitzt und jeweils nach ungefähr 4 Tagen weiteres Wasser (50 mL) zugegeben um die Reaktionsmischung wieder anzulösen. Nachdem der Reaktor auf Raumtemperatur abgekühlt war, wurde der Rückstand in Wasser (200 mL) gelöst und eine Probe (10 μ L) genommen, welche mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 1 mL verdünnt wurde, für LCMS-Analysen (5 μ L Injektionsvolumen). Die Ausbeute wurde anhand einer Kalibrierungsgeraden, welche mit kommerziell erhältlichen **31** aufgenommen wurde, auf 21 % bestimmt.

Synthese der Cytosine-Nukleoside ausgehend von **32**:

Basaltreaktor ohne Pyrit (FeS_2):

3-Ureaisoxzaol (**32**) (635 mg, 5,00 mmol, 1,0 Äq.) wurde gemeinsam mit Borsäure (155 mg, 2,51 mmol, 0,5 Äq.) und Ribose (3,75 g, 25,0 mmol, 5,0 Äq.) in H_2O (50 mL) in

einem Basaltreaktor gelöst und für 16 h auf 62 °C erhitzt. Der Rückstand wurde in Wasser (100 mL) gelöst und in einen weiteren Basaltreaktor, indem DTT (1,16 g, 7,50 mmol, 1,5 Äq.) und Na₂CO₃ (398 mg, 3,75 mmol, 0,75 Äq.) vorlagen, überführt. Es wurde für 3 h bei 82 °C geheizt, wobei alle 0,5 h Wasser dazugegeben wurde um ein Eintrocknen zu verhindern. Nachdem die Reaktionsmischung auf Raumtemperatur abgekühlt war, wurde auf 100 mL aufgefüllt. Anschließend wurde eine Probe (40 µL), welche mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 1 mL verdünnt wurde, für LCMS-Analysen (5 µL Injektionsvolumen), genommen. Die Ausbeute wurde anhand einer Kalibrierungsgeraden, welche mit kommerziell erhältlichen Cytidin aufgenommen wurde, auf 60 % Cytidin-Nukleoside und 5 % Cytosin (**6**) bestimmt. Die Nukleoside teilten sich Folgendermaßen auf die Isomere auf: α-furano (8 %), β-furano (3 %), α-pyrano (33 %) und β-pyrano (17 %).

Basaltreaktor mit Pyrit (FeS₂):

Ureaisoxzaol (**32**) (635 mg, 5,00 mmol, 1,0 Äq.) wurde gemeinsam mit Borsäure (155 mg, 2,51 mmol, 0,5 Äq.) und Ribose (3,75 g, 25,0 mmol, 5,0 Äq.) in H₂O (50 mL) in einem Basaltreaktor gelöst und für 17 h auf 60 °C erhitzt. Der Rückstand wurde in Wasser (100 mL) gelöst und in einen weiteren Basaltreaktor, indem DTT (1,16 g, 7,50 mmol, 1,5 Äq.), FeS₂ (300 mg), Natriumtetraborat decahydrat (762 mg, 2 mmol, 0,4 Äq.) und Na₂CO₃ (398 mg, 3,75 mmol, 0,75 Äq.) vorlagen, überführt. Es wurde für 1,5 h bei 79 °C geheizt, wobei alle 0,5 h Wasser dazugegeben wurde um ein Eintrocknen zu verhindern. Nachdem die Reaktionsmischung auf Raumtemperatur abgekühlt war, wurde auf 100 mL aufgefüllt. Anschließend wurde eine Probe (40 µL), welche mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 1 mL verdünnt wurde, für LCMS-Analysen (5 µL Injektionsvolumen), genommen. Die Ausbeute wurde anhand einer Kalibrierungsgeraden, welche mit kommerziell erhältlichen Cytidin aufgenommen wurde, auf 74 % Cytidin-Nukleoside und 5 % Cytosin (**6**) bestimmt. Die Nukleoside teilten sich Folgendermaßen auf die Isomere auf: α-furano (11 %), β-furano (3 %), α-pyrano (40 %) und β-pyrano (20 %).

Gneissreaktor mit Pyrit (FeS_2):

Ureaisoxzaol (**32**) (635 mg, 5,00 mmol, 1,0 Äq.) wurde gemeinsam mit Borsäure (155 mg, 2,51 mmol, 0,5 Äq.) und Ribose (3,75 g, 25,0 mmol, 5,0 Äq.) in H_2O (50 mL) in einem Gneissreaktor gelöst und für 18 h auf 60 °C erhitzt. Der Rückstand wurde in Wasser (100 mL) gelöst und in einen weiteren Gneissreaktor, indem DTT (1,16 g, 7,50 mmol, 1,5 Äq.), FeS_2 (300 mg), Natriumtetraborat decahydrat (762 mg, 2 mmol, 0,4 Äq.) und Na_2CO_3 (398 mg, 3,75 mmol, 0,75 Äq.) vorlagen, überführt. Es wurde für 1,5 h bei 80 °C geheizt, wobei alle 0,5 h Wasser dazugegeben wurde um ein Eintrocknen zu verhindern. Nachdem die Reaktionsmischung auf Raumtemperatur abgekühlt war, wurde auf 100 mL aufgefüllt. Anschließend wurde eine Probe (40 μL), welche mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 1 mL verdünnt wurde, für LCMS-Analysen (5 μL Injektionsvolumen), genommen. Die Ausbeute wurde anhand einer Kalibrierungsgeraden, welche mit kommerziell erhältlichen Cytidin aufgenommen wurde, auf 78 % Cytidin-Nukleoside und 6 % Cytosin (**6**) bestimmt. Die Nukleoside teilten sich Folgendermaße auf die Isomere auf: α -furano (13 %), β -furano (3 %), α -pyrano (44 %) und β -pyrano (19 %).

Synthese der Cytosine-Nukleoside ausgehend von **31**:

4 Äq. Harnstoff, 8d Reaktionszeit für Schritt eins:

31 (840 mg, 768 μL , 10,0 mmol, 1,0 Äq.) wurde gemeinsam mit Harnstoff (2,40 g, 40 mmol, 4,0 Äq.) und ZnCl_2 (1,36 g, 10,0 mmol, 1,0 Äq.) in Wasser (100 mL) gelöst und in einen schräg gestellten Gneiss-Reaktor überführt. Dieser Reaktor wurde für 8 Tage auf 93 °C erhitzt und nach ungefähr 4 Tagen weiteres Wasser (50 mL) zugegeben um die Reaktionsmischung wieder anzulösen. Nachdem der Reaktor auf Raumtemperatur abgekühlt war, wurde der Rückstand in Wasser (200 mL) gelöst und eine Probe (10 μL), welche mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 1 mL verdünnt wurde, für LCMS-Analysen (5 μL Injektionsvolumen), genommen.

Zur Reaktionslösung wurde Na_2CO_3 (1080 mg, 10.2 mmol, 1.02 Äq.) versetzt und der entstandene Niederschlag bei der Überführung in einen Basaltreaktor abfiltriert. In diesem Basaltreaktor lagen bereits Ribose (7.5 g, 50 mmol, 5.0 Äq.) und Borsäure (309 mg,

5.00 mMol, 0,5 Äq.) vor. Die Reaktionsmischung wurde für 17 h auf 57 °C erhitzt. Der Rückstand wurde in Wasser (100 mL) gelöst und die Lösung in einen weiteren Basaltreaktor, indem bereits DTT (2,36 g, 15 mmol, 1,5 Äq.), Na₂CO₃ (796 mg) und FeS₂ (600 mg) vorlagen. Es wurde für 90 Minuten bei 78 °C erhitzt, wobei wieder alle 30 Minuten Wasser zugegeben wurde um ein Eintrocknen zu verhindern. Nachdem die Reaktionsmischung auf Raumtemperatur abgekühlt war, wurde die Reaktionsmischung auf 100 mL mit H₂O verdünnt. Im Anschluss wurde eine Probe (40 µL), welche mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 1 mL verdünnt wurde, für LCMS-Analysen (5 µL Injektionsvolumen), genommen. Die Ausbeute wurde anhand einer Kalibrierungsgeraden, welche mit kommerziell erhältlichen Cytidin aufgenommen wurde, auf 6,3% Cytidin-Nukleoside und 26,9 % Cytosin (**6**) bestimmt. Die Nukleoside teilten sich Folgendermaßen auf die Isomere auf: α-furano (2,7 %), β-furano (1,7 %), α-pyrano (1,5 %) und β-pyrano (0,4 %).

4 Äq. Harnstoff, 28d Reaktionszeit für Schritt eins:

31 (840 mg, 768 µL, 10,0 mmol, 1,0 Äq.) wurde gemeinsam mit Harnstoff (2,40 g, 40 mmol, 4,0 Äq.) und ZnCl₂ (1,36 g, 10,0 mmol, 1,0 Äq.) in Wasser (100 mL) gelöst und in einen schräg gestellten Gneiss-Reaktor überführt. Dieser Reaktor wurde für 28 Tage auf 93 °C erhitzt und jeweils nach ungefähr 8 Tagen weiteres Wasser (50 mL) zugegeben um die Reaktionsmischung wieder anzulösen. Nachdem der Reaktor auf Raumtemperatur abgekühlt war, wurde der Rückstand in Wasser (200 mL) gelöst und eine Probe (10 µL), welche mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 1 mL verdünnt wurde, für LCMS-Analysen (5 µL Injektionsvolumen), genommen.

Zur Reaktionslösung wurde Na₂CO₃ (1080 mg, 10.2 mmol, 1.02 Äq.) versetzt und der entstandene Niederschlag bei der Überführung in einen Basaltreaktor abfiltriert. In diesem Basaltreaktor lagen bereits Ribose (7.5 g, 50 mmol, 5.0 Äq.) und Borsäure (309 mg, 5.00 mMol, 0,5 Äq.) vor. Die Reaktionsmischung wurde für 15 h auf 57 °C erhitzt. Der Rückstand wurde in Wasser (100 mL) gelöst und die Lösung in einen weiteren Basaltreaktor, indem bereits DTT (2,36 g, 15 mmol, 1,5 Äq.), Na₂CO₃ (796 mg) und FeS₂ (600 mg) vorlagen. Es wurde für 90 Minuten bei 75 °C erhitzt, wobei wieder alle 30 Minuten Wasser zugegeben wurde um ein Eintrocknen zu verhindern. Nachdem die

Reaktionsmischung auf Raumtemperatur abgekühlt war, wurde die Reaktionsmischung auf 100 mL mit H₂O verdünnt. Im Anschluss wurde eine Probe (40 µL), welche mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 1 mL verdünnt wurde, für LCMS-Analysen (5 µL Injektionsvolumen), genommen. Die Ausbeute wurde anhand einer Kalibrierungsgeraden, welche mit kommerziell erhältlichen Cytidin aufgenommen wurde, auf 8,6% Cytidin-Nukleoside und 17,7 % Cytosin (**6**) bestimmt. Die Nukleoside teilten sich Folgendermaßen auf die Isomere auf: α-furano (3,0 %), β-furano (2,1 %), α-pyrano (2,6 %) und β-pyrano (0,9 %).

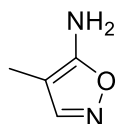
1 Äq. Harnstoff, 8d Reaktionszeit für Schritt eins:

31 (840 mg, 768 µL, 10,0 mmol, 1,0 Äq.) wurde gemeinsam mit Harnstoff (600 mg, 10 mmol, 1,0 Äq.) und ZnCl₂ (340 mg, 2,50 mmol, 0,25 Äq.) in Wasser (100 mL) gelöst und in einen schräg gestellten Gneiss-Reaktor überführt. Dieser Reaktor wurde für 8 Tage auf 93 °C erhitzt und nach ungefähr 4 Tagen weiteres Wasser (50 mL) zugegeben um die Reaktionsmischung wieder anzulösen. Nachdem der Reaktor auf Raumtemperatur abgekühlt war, wurde der Rückstand in Wasser (200 mL) gelöst und eine Probe (10 µL), welche mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 1 mL verdünnt wurde, für LCMS-Analysen (5 µL Injektionsvolumen), genommen.

Zur Reaktionslösung wurde Na₂CO₃ (270 mg, 2.55 mmol, 0,26 Äq.) versetzt und der entstandene Niederschlag bei der Überführung in einen Basaltreaktor abfiltriert. In diesem Basaltreaktor lagen bereits Ribose (7.5 g, 50 mmol, 5.0 Äq.) und Borsäure (309 mg, 5.00 mMol, 0,5 Äq.) vor. Die Reaktionsmischung wurde für 15 h auf 61 °C erhitzt. Der Rückstand wurde in Wasser (100 mL) gelöst und die Lösung in einen weiteren Basaltreaktor, indem bereits DTT (2,36 g, 15 mmol, 1,5 Äq.), Na₂CO₃ (796 mg), Natriumtetraborat Decahydrat (1524 mg, 4,00 mmol, 0,8 Äq.) und FeS₂ (600 mg) vorlagen. Es wurde für 90 Minuten bei 81 °C erhitzt, wobei wieder alle 30 Minuten Wasser zugegeben wurde um ein Eintrocknen zu verhindern. Nachdem die Reaktionsmischung auf Raumtemperatur abgekühlt war, wurde die Reaktionsmischung auf 100 mL mit H₂O verdünnt. Im Anschluss wurde eine Probe (40 µL), welche mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 1 mL verdünnt wurde, für LCMS-Analysen (5 µL Injektionsvolumen), genommen. Die Ausbeute wurde anhand einer Kalibrierungsgeraden, welche mit

kommerziell erhältlichen Cytidin aufgenommen wurde, auf 13,2% Cytidin-Nukleoside und 1,6% Cytosin (**6**) bestimmt. Die Nukleoside teilten sich Folgendermaße auf die Isomere auf: α -furano (2,1 %), β -furano (0,8 %), α -pyrano (7,0 %) und β -pyrano (3,3 %).

4-Methyl-5-Aminoioxazol (**34**):

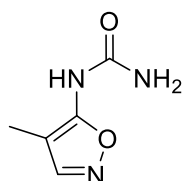


Kalium-*tert*-butanolat (6.99 g, 62.3 mmol, 2.2 Äq) wurden in trockenem Tetrahydrofuran (THF, 45 mL) bei 0 °C gelöst. Hierzu wurde eine Lösung aus Propiononitril (1.56 g, 2 mL, 28.3 mmol, 1.0 Äq.) und Ameisensäureethylester (2.20 g, 2.39 mL, 29.7 mMol, 1.05 Äq.) in THF (5 mL) zugegeben und bei Raumtemperatur über Nacht gerührt.

Die Reaktionsmischung wurde mit DCM und Wasser verdünnt und der pH-Wert mittels konzentrierter Salzsäure auf pH = 4 eingestellt. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase mit DCM (4 x 30 mL) extrahiert, mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Hierbei durfte die Temperatur 30°C nicht überschreiten. Der Rückstand wurde in Wasser (30 mL) aufgenommen und eine wässrige Hydroxylaminlösung (50wt %, 1.90 mL, 31.1 mmol, 1.1 Äq.) wurden hinzugegeben. Es wurde für 2h bei 50 °C gerührt und das Rohprodukt durch Säulenchromatographie (Isohex/EtOAc : 3/2) aufgereinigt um das Produkt (503 mg, 5.13 mmol, 18 %) im Form eines weißen Feststoffes zu erhalten.

Das ¹H-NMR entsprach dem eines kommerziellen Probe.

1-(4-methylisoxazol-5-yl)urea (**35**):

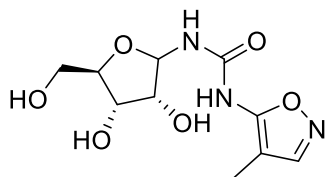


34 (586 mg, 5.98 mMol, 1.0 Äq.) wurde bei 0 °C in trockenem MeCN (10 mL) gelöst. Zur Lösung wurde tröpfchenweise Trichloracetylisocyanat (709 μ L, 5.98 mmol, 1.0 Äq.) zugegeben und für 2h bei Raumtemperatur gerührt und das Lösemittel *in vacuo* entfernt.

Zusätzlich wurde mit EtOH co-evaporiert (2 x 50 mL). Der Rückstand wurde in methanolischen Ammoniak (2M, 11 mL) gelöst und für 90 min. bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösemittel wurde *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt durch Säulenchromatographie (DCM/MeOH : 94/6) aufgereinigt um das Produkt (764 mg, 5.41 mmol, 91 %) in Form eines weißen Feststoffes erhalten.

¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ (ppm) = 9.02 (s, 1H, NH), 8.35 (s, 1H, CH), 6.25 (s, 2H, NH₂), 1.90 (s, 2H, CH₃). **¹³C NMR** (101 MHz, DMSO) δ (ppm) = 158.9 (C(NH(CONH₂)), 154.1 (CO(NH)(NH₂)), 153.9 (CH), 100.2 (C(CH₃)), 7.15 (CH₃). **HRMS** (ESI+): calc.: [C₅H₈N₃O₂]⁺ 142.0611, found: 142.0612 [M+H]⁺.

1-((3R,4S,5R)-3,4-dihydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl)-3-(4-methylisoxazol-5-yl)urea:



1-O-Acetyl-2,3,5-tri-O-benzoyl- β -D-ribofuranose (7.09 g, 14.0 mmol, 1.0 Äq.) wurde in trockenem DCM (120 mL) unter Schutzgas gelöst. Danach wurde TiCl₄ (1.85 mL, 17.0 mmol, 1.2 Äq.) hinzugegeben und für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Wasser (50 mL) wurde hinzugegeben und über Kieselgur filtriert. Die organische Phase des Filtrats wurde abgetrennt und die wässrige Phase mit DCM (3 x 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaCl Lösung (100 mL) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösemittel *in vacuo* entfernt.

Der Rückstand wurde in wasserfreiem Toluol (120 mL) gelöst und Silbercyanat (2.61 g, 17.4 mmol, 1.24 Äq.) wurde hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 2.5 h refluxiert. Es wurde über Kieselgur filtriert und mit trockenem Toluol gewaschen.

Zum Filtrat wurde **34** (1.66 g, 15.5 mmol, 1.1 Äq.) hinzugegeben und für 18 h bei Raumtemperatur gerührt.

Da Lösemittel wurde *in vacuo* entfernt und das noch benzylgeschützte Rohprodukt durch Säulenchromatographie (Isohex/EtOAc = 1/1) aufgereinigt. Das benzylgeschützte Rohprodukt wurde in 3.5M methanolischem Ammoniak (100 mL) gelöst und für 14 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösemittel wurde *in vacuo* entfernt.

Das entschützte Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie (DCM/MeOH = 9/1) aufgereinigt um das Produkt in Form eines weißen Schaumes als Mischung von α - und β -Anomeren zu erhalten (1.21 g, 4.43 mmol, 32%) zu erhalten.

Das Produkt wurde über LCMS und die Erfolgreiche Weiterreaktion zu Thymidin identifiziert, zur genaueren Analytik müssten die Isomere mittels HPLC getrennt werden.

Danksagung

Zuerst möchte ich mich ganz herzlich bei *Prof. Dr. Thomas Carell* bedanken, der mir mit der Aufnahme in seine Arbeitsgruppe ermöglicht hat, die Forschung im Rahmen meiner Promotion in einem sehr spannenden Themengebiet in einem wissenschaftlich wie menschlich ausgezeichneten Umfeld durchführen zu können. Zusätzlich hat mich dein Enthusiasmus für die Wissenschaft immer Beeindruckt und auch meine Motivation gesteigert. Zusätzlich möchte ich mich für die netten Diskussionen und vielen guten Ideen bedanken.

Bei Dr. Pavel Kielkowski möchte ich mich für die Übernahme der Zeitkorrektur so wie die vielen interessanten Gesprächen bei unseren Treffen im Masseraum bedanken.

Bei den Mitgliedern der Prüfungskommission, Prof. Dr. Oliver Trapp, Prof. Dr. Anja Hoffmann-Röder, Prof. Konstantin Karaghiosoff und Prof. Dr. Ane Schütz, bedanke ich mich für die Mitwirkung an der mündlichen Prüfung.

Frau Slava Gärtner möchte ich für die gewissenhafte Abwicklung aller bürokratischen Aufgaben danken.

Jonas Feldmann und Felix Xu möchte ich für das gewissenhafte Korrekturlesen dieser Arbeit danken.

Für die immer sehr angenehme Laboratmosphäre und dem „*temporären*“ dulden meines Musikgeschmackes möchte ich mich bei meinen ehemaligen und aktuellen Laborkammeraden *Dr Michael Stadelmeier, Dr. Bastian Viverge, Dr. Hidenori Okamura, Dr. Clemens Dialer, Dr. Simon Veith, Felix Müller, Jonas Feldmann, Dr. Florian Schelter, Johann de Graaff, Ewa Węgrzyn* sowie *Julie Brossier* bedanken. Besonderer Dank geht hier zusätzlich an *Florian Schelter*, mit dem ich unzählige Stunden vor den LCMS und HPLC Geräten verbringen durfte, damit diese wieder das machten, was wir wollten. Auch möchte ich *Jonas Feldmann* und *Sidney Becker* noch einmal explizit erwähnen, ohne deren Mitarbeit und der produktiven Zusammenarbeit diese Arbeit so nicht entstanden wäre.

Weiterer Dank geht an alle weiteren Mitglieder des AK Carell, die ich während der Promotion kennen lernen durfte, ihr habt diese Zeit zu einem Wunderschönen und unvergesslichen Erlebnis gemacht.

Zum Schluss möchte ich noch meinen Eltern, sowie *Martin Weigele*, danken ohne die dieses Studium niemals möglich gewesen wäre, bei meiner Großtante für die ungewöhnlich aber doch wunderbare Wohngemeinschaft bei meinen beiden Schwestern für den Familienzusammenhalt und zuallerletzt bei all meinen Freunden, aber besonders bei Tobias Simon und den anderen Mitgliedern unserer Berggruppe für unzählige unvergessliche Bergerlebnisse und weitere Gemeinsame Erlebnisse.

Vielen Dank euch allen