

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

**Eine neue Klasse von präbiotischen
Aktivierungsmitteln**

-

**Imidazolidin-4-thione
als Phosphor-Aktivatoren**

Maximilian Bechtel

aus

Grünstadt, Deutschland

2023

Eidesstattliche Erklärung

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

Eidesstattliche Versicherung

Diese Dissertation wurde eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 05.09.2023

(Maximilian Bechtel)

Dissertation eingereicht am: 07.09.2023

1. Gutachterin/ 1. Gutachter: Prof. Dr. Oliver Trapp

2. Gutachterin/ 2. Gutachter: Prof. Dr. Paul Knochel

Mündliche Prüfung am: 20.10.2023

Kurzzusammenfassung

Für die Entstehung biologisch relevanter Verbindungen auf der frühen Erde gibt es trotz anhaltender interdisziplinärer Anstrengungen kein einheitliches Szenario wie oder unter welchen Bedingungen diese entstanden sein könnten. Stattdessen werden für unterschiedliche Reaktionen verschiedenartige Bedingungen angewendet. Dies hat den Nachteil, dass Reaktionspfade häufig wechselnde Konditionen aufweisen und keine konsekutive Reaktionsabfolgen stattfinden können. Phosphorhaltige Verbindungen sind universelle Bestandteile des Lebens, jedoch ist die Entstehung dieser Verbindungen in wässrigen Bedingungen thermodynamisch und kinetisch gehemmt, weshalb für Phosphorylierungen häufig auf hohe Temperaturen und nicht wässrige Reaktionsbedingungen zurückgegriffen werden muss. Diese Arbeit befasst sich mit der Herstellung wichtiger präbiotischer Phosphor enthaltender Moleküle unter wässrigen und milden Reaktionsbedingungen, durch die Aktivierung der Phosphorverbindungen mit Imidazolidin-4-thionen.

Aufgrund der thermodynamisch und kinetisch ungünstigen Phosphorylierung präbiotisch wichtiger Verbindungen unter wässrigen Bedingungen wurden neben der Anpassung der Reaktionsbedingungen verschiedene Phosphoramide entwickelt, welche die gehemmte Kondensationsreaktion umgehen. In diese Liste reiht sich Imidazolidin-4-thionphosphat ein. Zur Analyse der Effizienz dieses Phosphorylierungsmittels wurde Imidazolidin-4-thionphosphat mit Adenosin unter einer Reihe unterschiedlicher Reaktionsbedingungen umgesetzt. Hierbei wurden die Reaktionsmischungen mittels UHPLC-QTOF MS auf die Ausbeute untersucht und mit den bekannten Phosphorylierungsmitteln Diamidophosphat und Diamidophosphat in Kombination mit Imidazol untersucht. Hierbei wurde festgestellt, dass Imidazolidin-4-thionphosphat unter wässrigen Bedingungen das beste der drei getesteten Phosphorylierungsmitteln ist. In Selektivitätsuntersuchungen konnte gezeigt werden, dass es des Weiteren regioselektiv mit der primären Hydroxygruppe reagiert und 5'Adenosinmonophosphat selektiv entsteht. Im Folgenden wurden die besten Phosphorylierungsbedingungen für Adenosin auf die sieben weiteren kanonischen Nukleoside angewendet und die erfolgreiche Phosphorylierung dieser demonstriert.

Kurzzusammenfassung

In den bisher demonstrierten Reaktionspfaden zu präbiotischen Verbindungen werden häufig eine Reihe von unterschiedlichen Reaktionsbedingungen eingesetzt, die variierende äußere Faktoren benötigen. Zur Vermeidung verschiedener Reaktionsbedingungen wurde in dieser Arbeit das redoxaktive Koenzym NAD^+ , unter uniformen Reaktionsbedingungen ausgehend von Aldehyden, synthetisiert. Hierzu konnte eingangs ein bereits postulierter Reaktionspfad von Propionaldehyd, Cyanoacetaldehyd und Ribose zu Nikotinamidribosid nachgewiesen werden. Im weiteren Verlauf der Untersuchungen wurde ein zweiter Syntheseweg für Nikotinamidribosid entwickelt, der den Einsatz von Ribose umgeht und diese stattdessen intermolekular durch Glykolaldehyd und Glycerinaldehyd herstellt. Im darauffolgenden Schritt konnte das im vorherigen Teil entwickelte Phosphorylierungsmittel Imidazolidin-4-thionphosphat auf Nikotinamidribosid angewendet und Nikotinamidmononukleotid erfolgreich geformt werden. Die anschließende Ausbildung der Pyrophosphatbindung zwischen Nikotinamidmononukleotid und Adenosinmonophosphat erfolgte durch die Verwendung von Adenosin-5'-phosphorimidazolidin-4-thion. Während der Untersuchung der Reaktionsbedingungen wurde beobachtet, dass die Reaktionsgeschwindigkeit nicht nur eine Erhöhung der Temperatur, sondern auch die Bestrahlung mit UV-Licht einen Anstieg der NAD^+ Ausbeute nach sich zog. Die hohe Stabilität und Möglichkeit einer gezielten Aktivierung von Adenosin-5'-phosphorimidazolidin-4-thion durch Licht und/oder Wärme ermöglicht eine breite Anwendung sowohl unter präbiotischen Bedingungen, als auch in der modernen Chemie. Durch die einheitliche Anwendung der wässrigen Reaktionsbedingungen in allen Syntheseschritten konnte auf diese Weise ein plausibler Weg für die erste komplette präbiotische NAD^+ Synthese demonstriert werden.

Abstract

For the formation of biologically relevant compounds on the Early Earth, there is no unified scenario as to how or under what conditions they may have been formed, despite ongoing interdisciplinary efforts. Instead, different conditions are applied to different reactions. This has the disadvantage that reaction pathways often have changing conditions and thus no consecutive reaction sequences can take place. Phosphorus containing compounds are universal components of life, but the formation of these compounds is thermodynamically and kinetically unfavored under aqueous conditions, so that high temperatures and non-aqueous reaction conditions must often be used for phosphorylation reactions. This work addresses the preparation of important prebiotic phosphorus containing molecules under aqueous and mild reaction conditions by activation of the phosphorus compounds with imidazolidine-4-thione.

Due to the thermodynamically and kinetically inhibited phosphorylation of prebiotically important compounds under aqueous conditions, various phosphoramides have been developed to circumvent the unfavored condensation reaction, in addition to adjusting the reaction conditions. Imidazolidine-4-thionephosphate joins this list of phosphoramides. To analyze the efficiency of this phosphorylating agent, imidazolidine-4-thionephosphate was reacted with adenosine under a series of different reaction conditions. Here, the reaction mixtures were analyzed by UHPLC-QTOF MS regarding the yield and compared to the known phosphorylating agents diamidophosphate and a combination of diamidophosphate and imidazole. It was found that imidazolidine-4-thionephosphate was the best of the three tested phosphorylating agents under aqueous conditions. In selectivity studies, it was shown that it further reacts regioselectively with the primary hydroxyl group to selectively form 5'adenosinemonophosphate. In the following, the best phosphorylation conditions for adenosine were applied to the seven remaining canonical nucleosides and the successful phosphorylation of these was demonstrated.

In previously demonstrated reaction pathways towards prebiotic relevant compounds, several different reaction conditions are often employed, requiring different external circumstances. To avoid different reaction conditions, in this work the redox-active coenzyme NAD^+ was synthesized under uniform reaction conditions starting from aldehydes. For this purpose, an

Abstract

already postulated reaction pathway from propionaldehyde, cyanoacetaldehyde and ribose to nicotinamide riboside could be demonstrated. In the further course of the investigations, an additional synthetic pathway for nicotinamide riboside was developed, which bypasses the use of ribose and instead produces it intermolecularly from glycolaldehyde and glyceraldehyde. In the subsequent step, the phosphorylating agent imidazolidine-4-thionphosphate, which was presented in the previous part, was applied to nicotinamide riboside and nicotinamide mononucleotide was successfully formed. The subsequent formation of the pyrophosphate compound from nicotinamide mononucleotide and adenosine monophosphate could be achieved by using adenosine-5'phosphorimidazolidine-4-thione. During the study of the reaction conditions, it was observed that the reaction rate increased not only with an increase in temperature, but also that irradiation with UV light led to an increase of NAD^+ . The high stability and possibility of selective activation of adenosine-5'phosphorimidazolidine-4-thione by light and heat enables its wide applicability under prebiotic conditions and in modern chemistry. The uniform application of aqueous reaction conditions in all synthetic steps demonstrated a plausible route for the first complete prebiotic NAD^+ synthesis.

Wissenschaftliche Beiträge

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

Publikationen

A. C. Closs, M. Bechtel, O. Trapp, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2022**, *61*, e202112563; Dynamic Exchange of Substituents in a Prebiotic Organocatalyst: Initial Steps towards an Evolutionary System.

M. Bechtel, E. Hümmer, O. Trapp, *ChemSystemsChem* **2022**, e202200020. Selective Phosphorylation of RNA- and DNA-Nucleosides under Prebiotically Plausible Conditions.

M. Bechtel, M. Ebeling, L. Huber, O. Trapp, *Acc. Chem. Res.* **2023**, *56*, 2081-2813. (Photoredox) Organocatalysis in the Emergence of Life: Discovery, Application and Molecular Evolution

Posterpräsentationen

M. Bechtel, E. Hümmer, O. Trapp, Gordon Research Conference Systems Chemistry, Newry, (Maine, USA), June 2022; Regioselective phosphorylation of nucleosides under prebiotically plausible conditions.

M. Bechtel, A. C. Closs, O. Trapp, Molecular Origins of Life Conference, online, June 2023; Design & Application of an Evolutionary Organocatalyst.

Vorträge

M. Bechtel, O. Trapp, Towards Molecular Complexity: At the crossroads between astrophysics and biochemistry, Heidelberg (Germany), May 2022; Molecular evolution of a prebiotic organocatalyst and its application as an activation agent.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater *Prof. Dr. Oliver Trapp* für die Möglichkeit bedanken, unter seiner Anleitung meine Doktorarbeit anfertigen zu dürfen. Herzlichen Dank für die spannenden Fragestellungen, den wissenschaftlichen Austausch, die uns gelassenen kreativen Freiheiten und Möglichkeiten eigene Ideen umzusetzen und die vielen unterstützenden Ideen und Ratschläge.

Bei *Prof. Dr. Paul Knochel* möchte ich mich herzlichst für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken. *Prof. Dr. Anne Schütz*, *Prof. Dr. Silvija Markic*, *Prof. Dr. Konstantin Karaghiosoff* und *Prof. Dr. Franz Bracher* möchte ich ebenfalls für die Teilnahme an meiner Prüfungskommission danken.

Des Weiteren möchte ich mich bei den Mitarbeitern der Ludwig-Maximilians-Universität München bedanken, insbesondere bei den Angestellten des Chemie und Pharmazie Campus'. Allen voran den Angestellten des Arbeitskreises, der kompletten Analytikabteilung, der Feinmechanik und dem Be- und Entsorgungsteam, durch deren Arbeit die tägliche Forschung erst ermöglicht wird.

Für die sorgfältigen und schnellen Korrekturen möchte ich mich bei *Laura*, *Nathalie*, *Rebecca* und *Karo* bedanken.

Meinen ehemaligen Praktikanten, *Eva*, *Dina*, *Toffi* und *Hannah*, danke ich für ihr fleißiges Arbeiten und ihren Ideen während ihres Praktikums.

Danksagung

Ein riesiger Dank geht an die aktuellen und ehemaligen Mitglieder des Arbeitskreises für die anhaltende Unterstützung während der Promotion und den schönen Zeiten beim Grillen, den Neuen Wein Abenden oder anderen Unternehmungen. Ein großer Dank auch nochmal explizit an das komplette Labor F3.017 – *Jenny, Flo, Anna, Fabi, Nathalie, Toffi* und *Dino*. Durch eure Offenheit und die stets gute Laune bin ich auch nach den längsten Abenden am nächsten Morgen wieder gerne ins Labor gekommen. Danke an *Anna*, dass du mich als PM in die spannende Welt der präbiotischen Chemie gebracht hast und stets für den Austausch und viele Ideen für die Imidazolidin-4-thione offen warst. Vielen Dank an *Alex* für die vielen abendlichen Trainingssessions, für die jährlichen Leistungsnachweise und für deine immer geduldige Beantwortung all meiner Fragen und die vielen Stunden die du mir mit deinen Analytikkenntnissen zu Seite gestanden hast. Bei *Laura* möchte ich mich für sämtliche Korrekturen aller Paper und sonstigen Arbeiten und das produktive und schöne Zusammenarbeiten, sowie für die digitalen Kaffeepausen und die motivierenden Deadlines bedanken. Ein großer Dank geht an *Fabi* und *Sabrina*, für die vielen Ausflüge und Urlaube außerhalb des Labors und für die ständigen Herausforderungen, die für den nötigen Ausgleich zum Labor gesorgt haben – ich freu' mich schon auf die nächsten (Wein-) Wanderungen. Ein besonderer Dank geht an *Nathalie*, danke, dass du immer ein offenes Ohr hattest, auch mal mehr oder minder freiwillig einen Halbmarathon mitläufst und die beste Laborpartnerin warst, die ich mir vorstellen konnte, auch wenn ich alle drei Wochen die Glasgeräte an neuen Orten suchen musste.

Mein größter Dank gilt *Karo*, für die dauerhafte Unterstützung, die aufgebrachte Geduld, die unzähligen Ratschläge und für die vielen Ablenkungen im und vom Alltag, wenn es etwas stressiger wurde.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner kompletten Familie bedanken, die mich während des gesamten Studiums immer fleißig unterstützt und mir dieses überhaupt erst ermöglicht hat.

Vielen Dank euch allen!

Abkürzungsverzeichnis

AMP	Adenosinemonophosphat
AmTP	Amidotriphosphat
Äquiv.	Äquivalente
ATP	Adenosine-5'-triphosphat
CD	Zirkulardichroismus
CDCl ₃	Deuteriochloroform
CMP	Cytidinmonophosphat
cNMP	zyklische Nukleosidmonophosphat
CoA	Koenzym A
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
cTMP	cyclo Trimethaphosphat
d	Tag
dAMP	deoxyAdenosinmonophosphat
DAP	Diamidophosphat
DCM	Dichlormethan
dCMP	deoxyCytidinmonophosphat
dGMP	deoxyGuanosinmonophosphat
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid

Abkürzungsverzeichnis

DMSO-d ₆	deutერიertes DMSO
DNA	Deoxyribonukleinsäure
D ₂ O	Deuteriumoxid
dTMP	deoxyThymidinmonophosphat
EDCI	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
Et ₂ O	Diethylether
EtOAc	Ethylacetat
FAD	Flavinadenindinukleotid
FaPy	Formamidopyrimin
Ga	Jahrmilliarde, Giga-Jahr (Gigaannum)
GMP	Guanosinmonophosphat
GOE	Große Sauerstoffkatastrophe (great oxygenation event)
h	Stunden
ITO	Imidazolidin-4-thion
ITO-AMP	Adenosin 5'-phosphoro-2,5-dimethylimidazolidin-4-thion
ITO-P	Imidazolidin-4-thion-phosphat (2,5-Dimethyl-4-thioxoimidazolidin-1-yl) phosphonic acid
KSTA	kinetisch stabil und thermodynamisch aktivierte
LED	Leuchtdiode (light-emitting diode)
min	Minuten
mL	Milliliter
MS	Massenspektrometrie
NAD ⁺ /NADH	Nikotinadenindinukleotid

NADP	Nikotinadenindinukleotidphosphat
NDP	Nukleosiddiphosphat
NMN	Nikotinamidmononukleotid
NMP	Nukleosidmonophosphat
NMR	Kernspinresonanz (nuclear magnetic resonance)
NTP	Nukleosidtriphosphat
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
pK _a	negativer dekadischer Logarithmus der Säurekonstante
QTOF	Quadrupol-Flugzeitmassenspektrometer (Quadrupol Time of Flight)
RNA	Ribonukleinsäure
rt	Raumtemperatur
SAM	S-Adenosylmethionin
TMP	Thymidinmonophosphat
UHPLC	Ultra High Performance Liquid Chromatography
UMP	Uridinmonophosphat
UV	ultraviolett

Inhaltsverzeichnis

Kurzzusammenfassung	I
Abstract	III
Abkürzungsverzeichnis	IX
Inhaltsverzeichnis	XIII
1 Einleitung.....	1
2 Kenntnisstand.....	3
2.1 Bedingungen auf der frühen Erde.....	3
2.1.1 Extraterrestrische Ursprünge	5
2.1.2 Terrestrische Ursprünge	6
2.2 RNA-Welt	10
2.2.1 Nucleobasen.....	11
2.2.2 Zucker	12
2.2.3 Nucleoside.....	13
2.2.4 Phosphorylierungen/Nucleotide	18
2.2.5 Nucleotidaktivierung/Oligonucleotide	23
2.2.6 Coenzyme	25
3 Zielsetzung	29
4 Ergebnisse und Diskussion.....	31
4.1 Imidazolidin-4-thione als Phosphorylierungsmittel.....	32
4.1.1 Synthese von Imidazolidin-4-thionphosphat.....	32
4.1.2 Optimierung der Phosphorylierungsbedingungen	34
4.1.3 Regioselektivität der Phosphorylierungsreaktionen.....	40
4.1.4 Phosphorylierung der kanonischen Nucleoside	42

Inhaltsverzeichnis

4.2	Nikotinamidadenindinukleotid (NAD ⁺) Synthese.....	43
4.2.1	Nikotinamidribosid	44
4.2.2	Nikotinamidmononukleotid (NMN)	50
4.2.3	Nikotinamidadenindinukleotid (NAD ⁺)	52
5	Zusammenfassung und Ausblick	61
6	Experimenteller Teil	67
6.1	Allgemeine Informationen	67
6.1.1	Materialien	67
6.1.2	NMR-Spektroskopie.....	67
6.1.3	Massenspektrometrie.....	68
6.2	Synthesvorschriften und Charakterisierungsdaten von isolierten Verbindungen ..	71
6.2.1	Herstellung von α -Aminonitrilen	71
6.2.2	Herstellung von Imidazolidin-4-thionen	73
6.2.3	Herstellung von 2,5-Dimethyl-4-thioxoimidazolidin-1-yl) phosphonic acid	
	(ITO-P)	78
6.2.4	Herstellung von Natriumphosphorodiamidat (DAP).....	81
6.2.5	Herstellung von Propionaldehyd	82
6.2.6	Herstellung von Cyanoacetaldehyd ((1-Cyano-2-oxoethyl)natrium)	84
6.2.7	Herstellung von Nikotinamidribosid	86
6.2.8	Phosphorylierungsreaktionen.....	89
6.2.9	Herstellung von Adenosin 5'-phosphoro-2,5-dimethylimidazolidin-4-thion	
	(ITO-AMP)	125
6.2.10	Herstellung von Adenosin 5'-phosphoro-2,5-dimethylimidazolidin-4-thion	
	(ITO-AMP) (Präbiotische Bedingungen).....	129
6.2.11	Herstellung von Nikotinamidadenindinukleotid (NAD ⁺).....	133
6.3	Verdünnungsreihen	135
7	Literaturverzeichnis.....	141

1 Einleitung

„What I cannot create, I do not understand“

- Richard Feynman

Die fundamentale Frage, wie Leben auf der Erde entstanden ist, ist noch immer eines der größten Mysterien der Menschheit. Nicht nur aufgrund der Neugierde des Menschen, sondern auch durch das Interesse an der Erforschung fremder Planeten und der Frage, ob es im Universum weiteres Leben gab oder gibt, ist die Entstehung des Lebens auf der frühen Erde weiterhin ein spannendes Thema.^[1-2]

Trotz vieler Erkenntnisse und neuer Theorien in den letzten 50 bis 100 Jahren wurde ein möglicher Ursprung des Lebens nicht gefunden und unzählige Fragen bleiben weiterhin unbeantwortet. Ursache hierfür ist, dass viele grundlegende Dinge, wie etwa eine Definition des Lebens, nicht existieren.^[3] Als wesentliche Eigenschaften für Leben werden häufig Anpassungsfähigkeit (Evolution), Kompartimentbildung, Selbstreplikation und Stoffwechselaktivität angenommen,^[4] wobei es keine klare Definition gibt, ab wann ein Organismus als lebend bezeichnet wird.^[5] Um diese grundlegenden Fähigkeiten eines lebenden Organismus während der Entstehung des Lebens untersuchen zu können, müssen die Bedingungen zu dieser Zeit bekannt sein. Allerdings existieren aus dem Hadaikum und frühen Archaikum kaum Gesteinsproben, die darüber Aufschluss geben könnten.^[6]

Geologen, Physiker, Astrochemiker und viele weitere Wissenschaftler forschen auf diesem interdisziplinären Feld, um Bedingungen, wie die Zusammensetzung der Atmosphäre, den Druck oder die Temperatur, auf der frühen Erde zu ermitteln.^[6-8] Unter diesen postulierten Bedingungen versuchen präbiotische Chemiker Moleküle, welche heutzutage in Lebewesen gefunden werden können, aus einfachen anorganischen und organischen Molekülen herzustellen. Durch die Vielseitigkeit der Bedingungen, von hydrothermalen Quellen,^[9-11] über vulkanisch aktive Regionen, bis hin zu Reaktionen in wässrigen Medien^[12] sind verschiedene Theorien, wie die RNA-Welt-, Peptid-Welttheorie oder Metabolismus Theorie, entstanden.^{[13-}

16]

Einleitung

So groß wie die Diversität an Bedingungen zur Entwicklung von Molekülen, welche heute in Zellen auffindbar sind, ist, so spezifisch sind häufig auch die Reaktionspfade zu diesen Verbindungen.^[17] Gerade aufgrund der hohen Anzahl unterschiedlicher Reaktionsbedingungen ist es von großem Interesse, Bedingungen zu finden, unter denen ein breites Spektrum an präbiotisch wichtigen Molekülen synthetisiert werden kann.

Zahlreiche wichtige präbiotische Reaktionen, wie etwa die Peptidligation, die Phosphorylierung von Nukleosiden oder die Synthese von Dinukleotiden, sind Kondensationsreaktionen. Aufgrund der wässrigen Bedingungen auf der frühen Erde würden diese Reaktionen ohne Katalysator oder anderweitige Aktivierung der Substrate nur eingeschränkt ablaufen. In dieser Arbeit sollen präbiotisch plausible Aktivierungsmethoden für Phosphate, als auch Nukleotide und in diesem Zusammenhang die Bildung von wichtigen präbiotisch relevanten Molekülen untersucht werden.

2 Kenntnisstand

2.1 Bedingungen auf der frühen Erde

Obwohl nicht bekannt ist was vor dem Urknall vor ca. 13.8 Milliarden Jahren (Ga) und der ursprünglichen Singularität existiert hat, so sind sich Wissenschaftler nahezu sicher, wie sich das Universum ausdehnte, sich Moleküle, Planeten und unser Sonnensystem formten.^[18-22] Aus dem Staub und den Gasen, die unsere junge Sonne umgeben, entstand vor ca. 4.54 Ga die Erde. Allerdings war zumindest zu Beginn die Entstehung von Leben nach heutigem Wissensstand nicht möglich. Der anfangs noch aufgeschmolzene und aus Magma-Ozeanen bestehende Erdmantel machte die Entstehung von Leben nach dem heutigen Wissensstand unmöglich. Falls sich in der Anfangsphase der Erde nach dem Abkühlen der Magma-Ozeane und Bildung einer ersten Erdkruste vorläufiges Leben gebildet haben sollte, so wurde dieses durch Einschläge anderer Protoplaneten und dem erneuten teilweisen Aufschmelzen der Erdkruste höchstwahrscheinlich wieder zerstört. Erst nach dem letzten großen Einschlag eines Protoplaneten vor ca. 4.47 Ga,^[23] woraufhin sich der Mond formte, kühlte die Erde innerhalb weniger Millionen Jahre ab und Wasser kondensierte.^[24-25] Aus dieser ersten Entstehungsphase der Erde und der Bildung der Erdkruste gibt es nur wenige Gesteinsproben, die über die tatsächlichen Bedingungen aufschlussreiche Erkenntnisse liefern. Die meisten dieser alten Gesteinsproben stammen aus einem ungefähr 300 km großen Radius im Yilgarn Kraton in Westaustralien. Nur wenige ähnliche alte Gesteinsproben konnten bisher an anderen Orten auf der Erde gefunden werden.^[26] Allerdings zeigen Gesteinsproben aus Südchina, die auf eine ähnliche Zeit zurückzuführen sind, dass sich selbst in diesem frühen Stadium der Erde die lokalen Bedingungen drastisch unterschieden haben.^[26]

Obwohl es nach dem letzten großen Einschlag eines Protoplaneten zu vielen weiteren Einschlägen kam, vor allem in der Zeit des schweren Bombardements (*Late Heavy Bombardment*), so waren diese Einschläge nicht groß genug, um die Erdkruste erneut komplett aufzubrechen und in Magma-Ozeane zu verwandeln. Jedoch waren sie groß genug, um existierende Ozeane verdampfen und die Temperatur auf lebensfeindliche Höhen ansteigen zu lassen.^[27-29]

So wichtig wie die Zusammensetzung der Erdkruste und das Vorhandensein von flüssigem Wasser für die Entstehung des Lebens ist, so bedeutend ist das Vorhandensein und die Zusammensetzung einer Atmosphäre. Während man ursprünglich noch von einer reduzierenden Atmosphäre ausging, so wird mittlerweile von einer ursprünglich sehr leicht reduzierenden bis eher neutralen Atmosphäre ausgegangen, die hauptsächlich aus Kohlenstoffdioxid, Stickstoff und Wasser mit geringen Anteilen von Ammoniak, Methan, Schwefelwasserstoff und Kohlenmonoxid bestand.^[7, 30] Vor allem der heutzutage in großen Mengen auftretende und für die meisten heutigen Lebewesen wichtige Sauerstoff war ursprünglich kaum vorhanden. Erst durch die große Sauerstoffkatastrophe (great oxygenation event; GOE) vor ca. 2.4 Ga wurde vermehrt Sauerstoff freigesetzt und eine oxidierende Atmosphäre gebildet.^[31] Vermutlich schon lange vor dem GOE wurde Sauerstoff von anaeroben Lebewesen als Nebenprodukt der Photosynthese erzeugt. Zu Beginn reagierte der gebildete Sauerstoff jedoch mit leicht oxidierbaren Stoffen, wodurch die Sauerstoffkonzentration gering blieb. Erst mit dem Abflauen des Vulkanismus und den dadurch weniger vorhandenen leicht oxidierbaren Stoffen (z.B. Eisen, Kohlenstoff, Schwefelwasserstoff und Wasserstoff) reicherte sich Sauerstoff in der Atmosphäre an.^[7]

Der Zeitraum für die Entstehung des ersten Lebens lässt sich schließlich auf das späte Hadaikum und das frühe Archaikum zurückführen (vor 4.4 Ga-3.5 Ga). Dieser Zeitraum beruht auf der Verfügbarkeit von flüssigem Wasser, welches als grundlegende Voraussetzung für die Entstehung von Leben betrachtet wird und dem Fund der ältesten Hinweise auf Leben.^[24-25] Diese Anhaltspunkte auf Leben wurden in Sedimentablagerungen, sogenannten Stromatolithen, gefunden. Diese Sedimentablagerungen entstanden durch die Stoffwechselaktivitäten von Mikroorganismen in wässrigen Bedingungen.^[32-34]

Damit lässt sich der Zeitraum, in dem die präbiotische Chemie stattgefunden hat, auf eine Zeit von vor mehr als 3.5 Ga zurückführen. Wie und wo die für die präbiotische Chemie häufig wichtigen organischen Moleküle entstanden sind, ist weiterhin ungewiss. Allgemein lässt sich zusammenfassen, dass die für die Synthese von biologisch relevanten Molekülen wichtigen Ausgangsverbindungen einen terrestrischen oder extraterrestrischen Ursprung haben können.

2.1.1 Extraterrestrische Ursprünge

Unter einem extraterrestrischen Ursprung versteht man die Entstehung von Molekülen in interstellaren Wolken, auf anderen Planeten oder an sonstigen Stellen des Universums, welche anschließend über Staubpartikel, Asteroiden oder Meteoriten auf die Erde gelangten. Untersuchungen von Meteoriten, wie etwa dem Murchison Meteoriten oder NWA 801, zeigen, dass eine Vielzahl an organischen Molekülen über diesen Weg auf die Erde gelangt sein könnten.^[35]

Die Entdeckung von nicht racemischen Mengen von Aminosäuren auf Meteoriten lässt vermuten, dass unsere homochirale Welt ihren Ursprung im Weltall hat. Eine der Möglichkeiten, wie dieser Enantiomerenüberschuss entstanden sein könnte, beruht auf dem Zirkulardichroismus (CD). Der CD beschreibt die unterschiedlich starke Absorption beider Enantiomere einer chiralen Verbindung bei der Bestrahlung mit zirkular polarisiertem Licht. Auf diese Weise konnte durch Bestrahlung mittels zirkular polarisierter Synchrotronstrahlung einer racemischen Festphasenprobe ein Enantiomerenüberschuss von bis zu 2.6 % D-Leucine und bis zu 4.2 % L-Alanin erzeugt werden.^[36-37] Die Entdeckung von zirkular polarisiertem Licht in Sternentstehungsgebieten in Verbindung mit dem gefundenen Enantiomerenüberschuss auf dem Murchison Meteoriten, sprechen für eine Entstehung der Homochiralität im Weltall.^[38-39] Auch wenn der auf Meteoriten gefundene Enantiomerenüberschuss nicht groß genug ist um die hohe homochirale Reinheit der Biomoleküle zu erklären, so könnte sie in Verbindung mit einer autokatalytischen Vervielfältigung, wie sie z.B. aus der SOAI Reaktion bekannt ist,^[40] für die Homochiralität verantwortlich sein. Weitere Theorien für die Entstehung von Homochiralität beinhalten Paritätsverletzungen oder die spontane Kristallisation von Konglomeraten aus racemischen Mischungen.^[41-46]

Die Entdeckung von Aminosäuren, Zuckern, Nukleobasen und weiteren Verbindungen, auf denen unser heutiges Leben basiert, bekräftigen die Theorie der Panspermie: Die Theorie, dass Leben anderswo entstanden und erst anschließend durch Meteorite auf die Erde gelangt ist.^[47-48] Die Hypothese der Panspermie gibt zwar Aufschluss darüber, wie das Leben auf der Erde entstanden ist, allerdings nimmt die Theorie an, dass das Leben die harschen Bedingungen des Weltalls und auch den Eintritt in die irdische Atmosphäre und den Einschlag auf die Erde überlebt haben muss. Des Weiteren löst diese Theorie nicht die Frage nach der Entstehung des Lebens, sondern verschiebt sie lediglich auf einen anderen, nicht irdischen Ursprungsort.

2.1.2 Terrestrische Ursprünge

Im Gegensatz zum extraterrestrischen steht der terrestrische Ursprung, die Entstehung von biologisch relevanten Molekülen und Leben auf der Erde. Bei einem terrestrischen Ursprung müssen diese organischen Moleküle aus zuvor auf der frühen Erde schon vorhandenen anorganischen Molekülen, wie Schwefelwasserstoff, Phosphaten, Kohlenstoffdioxid, Stickstoff oder aus Kohlenwasserstoffen entstanden sein. Aufgrund der häufig wechselnden und in vielen Regionen unterschiedlichen Bedingungen auf der frühen Erde, wurden verschiedene Theorien für die Entstehung grundlegender Moleküle aufgestellt. Hierbei dient nicht nur Wasser, sondern auch flüssiges Schwefeldioxid oder zum Beispiel Reaktionen ohne Lösungsmittel als Reaktionsmedium.^[49-50] Neben der Anwesenheit der passenden Reaktionspartner und des geeigneten Reaktionsmediums, muss für die meisten Reaktionen auch die ausreichende Energie aufgebracht werden. Diese wird in den Modellen meist durch Meteoriteneinschläge, UV-Strahlung, Wärme oder elektrische Entladungen in Form von Blitzen aufgebracht.^[51-56]

2.1.2.1 Oparin-Haldane Hypothese (Präbiotische Ursuppe)

Eine der ältesten Annahmen ist CHARLES DARWIN'S Theorie des kleinen Teichs. Hierbei postulierte DARWIN, dass wichtige Biomoleküle (Proteine) in kleinen Teichen, die warmes Wasser und anorganische Chemikalien wie Phosphat- und Ammoniumsalze enthalten, in der Anwesenheit von Licht, Wärme oder Elektrizität entstehen könnten.^[57]

Die von CHARLES DARWIN postulierte Idee eines kleinen Teichs steht im Einklang mit der Theorie einer präbiotischen Ursuppe. 1924 berichtete ALEXANDER OPARIN über eine mögliche frühe Erde mit einer vor allem aus Wasserdampf, Kohlenwasserstoffen (größtenteils Methan), Wasserstoff und Ammoniak bestehenden Atmosphäre und flüssigen Ozeanen. Er behauptete, dass die Kohlenwasserstoffe unter Energieeinfluss mit Ammoniak reagieren und daraufhin über eine lange Zeitspanne komplexe organische Moleküle entstanden, wodurch sich in den Ozeanen eine präbiotische Ursuppe bildete.^[58] 1929 veröffentlichte JOHN HALDANE eine Annahme für ein ähnliches präbiotisches Szenario. Auch er vermutete, dass unter dem Einfluss einer reduzierenden Atmosphäre und UV-Strahlung eine Fülle von unterschiedlichen Reaktionen ablaufen konnten, die letztlich zu Biomolekülen und Leben führte.^[59] STANLEY MILLER baute 1953 eine Apparatur (**Abbildung 1**) um die Hypothese von OPARIN und HALDANE zu überprüfen.^[53]

In seiner Apparatur erhitze MILLER Wasser in einem Kolben und ließ den Wasserdampf in eine von OPARINS vorgeschlagene Gasatmosphäre aufsteigen. Das Wasserdampf-Gas-Gemisch zirkuliert entlang von Elektroden, die eine elektrische Entladung durch Blitze simulieren, kondensiert und fließt schließlich zurück in das kochende Wasser. Nach einer Woche konnte MILLER die Entstehung von Glycin, Asparaginsäure, α -Alanin als auch β -Alanin, Harnstoff und weitere Verbindungen nachweisen.^[53-54]

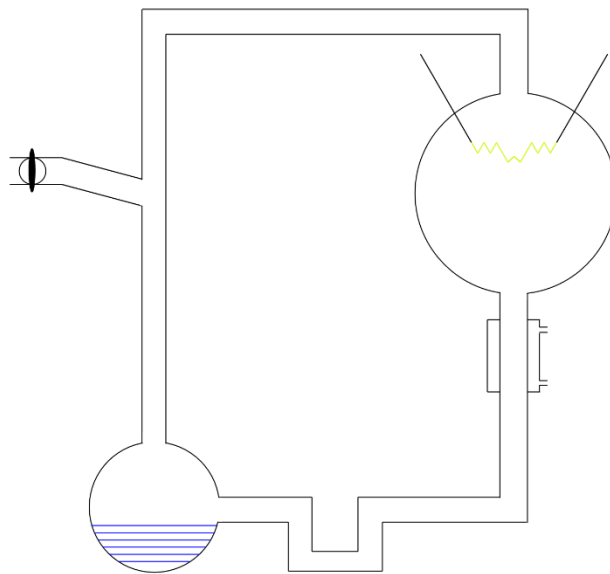


Abbildung 1: Millers Apparatur zur Überprüfung Oparins Hypothese einer präbiotischen Ursuppe.^[53]

2.1.2.2 Hydrothermale Quellen

Es wird vermutet, dass nicht nur an der Meeresoberfläche durch UV-Strahlung oder elektrische Entladungen wichtige präbiotische Moleküle entstanden sein können, sondern auch tief im Ozean. Eine zweite neben der präbiotischen Ursuppen Hypothese weitverbreitete Theorie beruht auf der Einbeziehung von hydrothermalen Quellen in die Entstehung von Leben.

Hydrothermale Quellen bilden sich in Unterwasserregionen mit vulkanischen Aktivitäten, an denen sich zwei tektonische Platten auseinander bewegen. Obwohl die zwei unterschiedlich bekannten Arten hydrothermaler Quellen, Schwarze und Weiße Raucher, beide in der Nähe vulkanischer Aktivität entstehen, so ist ihre Entstehung und chemische Umgebung doch unterschiedlich. Bei Schwarzen Rauchern dringt kaltes Meerwasser in der Nähe einer Magmakammer durch Schlitze und Risse in der Meereskruste in tiefere Erdschichten und wird

anschließend durch das Magma erhitzt. Dadurch kommt es zu einer hydrothermalen Zirkulation. Das heiße Wasser kann in diesem Vorgang chemische Verbindungen besser lösen. Beim anschließenden Kontakt des erhitzten Wassers mit dem kalten Meerwasser kommt es zu einem Niederschlag der zuvor gelösten Verbindungen. Auf diese Art werden im Laufe der Zeit mehrere Meter hohe mineralische röhren- oder kegelförmige Ablagerungen gebildet, die an Schornsteine erinnern.^[60-61] Das bei Schwarzen Rauchern austretende Wasser ist stark sauer (pH 2-3) und enthält Kohlenstoffdioxid, Wasserstoff, Methan und Schwefelwasserstoff. Aufgrund der unmittelbaren Nähe zu Magmablasken und des hohen Tiefseedrucks kann das Wasser Temperaturen von bis zu 464 °C erreichen.^[62] Der den Schwarzen Rauchern ihren Namen gebende schwarze Rauch entsteht durch Mangan- und Eisensulfidpartikel, die bei Kontakt mit kaltem Meerwasser (ca. 2 °C) aus dem Hydrothermal-Quellen-Wasserstrom ausgefällt werden.^[11, 61]

Erst 2000 wurden mit der Entdeckung der „Lost City“ die Weißen Raucher entdeckt.^[63] Wie der Name es vermuten lässt, stoßen Weiße Raucher keine dunklen, sondern helle Partikel aus, welche auf die Entstehungsart zurückzuführen sind. Obwohl Weiße Raucher auch in der Nähe vulkanisch aktiver Regionen zu finden sind, so beruht ihre Entstehung jedoch nicht auf dem direkten Kontakt mit der Magmakammer, wodurch Temperaturen von lediglich 200 °C erreicht werden können.^[61] Meerwasser dringt in Spalten der Ozeankruste ein und reagiert dort in einer exothermen chemischen Reaktion mit Peridotit, welches in diesem Prozess (Serpentinisierung) zu Serpentin umgewandelt wird.^[64] Da kein direkter Kontakt mit einer Magmakammer besteht, ist die Temperatur der emittierten hydrothermalen Flüssigkeit mit 40 bis 90 °C deutlich niedriger als bei Schwarzen Rauchern. Neben der unterschiedlichen Temperatur unterscheiden sich die Raucher vor allem im pH-Wert und den in der hydrothermalen Flüssigkeit enthaltenen Stoffe. Das austretende Wasser ist bei Weißen Rauchern basisch (pH 9-11) und enthält neben Carbonat und Sulfaten vor allem deutlich höhere Konzentrationen an Wasserstoff und Methan.^[60-61, 63, 65]

Aufgrund der reduzierenden Atmosphäre, konstanten Energieflusses, der Nähe zu katalytisch aktiven Mineralien und sowohl pH- als auch Temperaturgradienten bilden hydrothermale Quellen ein mögliches Szenario für die Entstehung des Lebens.^[10, 61, 66]

2.1.2.3 Nass-Trocken Zyklen

Als einer der großen Nachteile der bis hierhin diskutierten Bedingungen für die Darstellung von wichtigen Biomolekülen in Wasser ist ihre häufige Hydrolyse- und Temperaturanfälligkeit. Auch die Syntheseschritte, die häufig Kondensationsschritte beinhalten, sind in wässrigen Lösungen thermodynamisch ungünstig.^[17, 67-69] Aus diesem Grund wurden Nass-Trocken Zyklen vorgeschlagen.^[68] Diese können unter dem Einfluss von Gezeiten, Tag-Nacht Zyklen, regelmäßig überschwemmt und anschließend austrocknenden Gebieten (z.B. Geysire) oder Jahreszeiten auftreten.^[70] Durch die Austrocknung eines Gebiets wird die Konzentration der Moleküle sukzessive erhöht und die thermodynamisch benachteiligten Kondensationsreaktionen können leichter ablaufen. Der große Nachteil von Nass-Trocken Zyklen ist, dass aufgrund eines mangelnden Lösungsmittels keine Diffusion stattfinden und nur die in direktem Kontakt stehenden Moleküle miteinander reagieren können. Erst durch anschließende Hydratation durch Regen, Überschwemmungen oder auf einem anderen z.B. mechanischem Weg kann es zu einer erneuten Durchmischung der Verbindungen und eventuell auch zur Anwesenheit neuer, durch das Wasser transportierter Moleküle kommen. Auf diese Weise konnte erfolgreich die Synthese von Nukleosiden, Peptiden und Phosphorylierungen demonstriert werden.^[50, 71-74]

2.2 RNA-Welt

Die RNA-Welt Hypothese ist die wahrscheinlich am weitesten verbreitete und akzeptierte Theorie über die Entstehung des heutigen komplexen Lebens.^[13] Grundlage dieser Theorie bilden die RNA Eigenschaften Informationen zu speichern und Reaktionen katalysieren zu können.^[75-76] Vor allem die Fähigkeit zur Selbstreplikation ist essenziell für die Entwicklung eines sich anpassenden und weiterentwickelnden Systems. Die Entdeckung des Ribozyms und der damit erstmals bewiesenen Fähigkeit der RNA, sowohl als Informationsspeicher als auch als Enzym zu funktionieren, bekräftigte die Theorie der RNA-Welt.^[75]

Aufgrund dieser Merkmale wird angenommen, dass es vor dem heutigen aus DNA und Proteinen bestehenden Metabolismus einen Stoffwechsel auf Grundlage von RNA gegeben hat. Es wird vermutet, dass sich die erste RNA aus vorhandenen organischen Molekülen direkt aus der präbiotischen Ursuppe geformt haben könnte.^[71, 77-78] Damit bildet die RNA ein Verbindungsstück zwischen der chemischen Evolution von wichtigen organischen Verbindungen und der Entstehung des ersten Lebens.

Infolge von Replikationsfehlern konnte die RNA sich weiter entwickeln und sich durch Mutationen den äußeren gegebenen Umständen anpassen und neue katalytische Fähigkeiten erlangen.^[79] Es wird angenommen, dass die katalytischen Reaktionen zu Beginn nicht sehr effektiv, allerdings noch immer deutlich effektiver als Reaktionen ohne Katalysator waren. Die in vielen Koenzymen vorhandenen Nukleotideinheiten lassen darauf schließen, dass Koenzyme während der RNA-Welt vorhanden waren und die katalytische Effektivität der RNA weiter gesteigert haben.^[80] Im Laufe der Zeit muss RNA die Fähigkeit erlangt haben über RNA-Adaptermoleküle Peptidformationsreaktionen zu katalysieren und Proteine aufzubauen.^[13, 80] Aufgrund der höheren Katalysegeschwindigkeit und überlegenen katalytischen Fähigkeiten wurden die RNAs allmählich von Proteinen als Katalysatoren im Metabolismus abgelöst.

Nicht nur in den meisten katalytischen Reaktionen wurde RNA im evolutionären Prozess ersetzt, sondern auch bei der Informationsspeicherung. Obwohl RNA und DNA sich zu einer Doppelhelix zusammenlagern können, ist die DNA deutlich stabiler, weshalb sie im Laufe der Zeit die RNA ersetzte. Die höhere Stabilität im Vergleich zu RNA ergibt sich aus dem Fehlen der 2'-Hydroxygruppe der Ribose und einer damit einhergehenden verminderten Hydrolyseanfälligkeit der 2'-Deoxyribose.^[81]

Der wahrscheinlich größte Kritikpunkt an der RNA-Welt Hypothese ist die Herstellung der Oligonukleotide und die Verknüpfung dieser aus abiotischen Verbindungen. So gibt es etwa keine schlüssige Theorie für die Triebkraft der Polymerisation. Auch die Frage, wie unsere homochirale Welt entstanden ist, bleibt unbeantwortet und wird meist auf eine frühere Vorstufe zurückgeführt.

2.2.1 Nukleobasen

Eine Variante, um Nucleoside aufzubauen, besteht darin, zuerst Nucleobasen zu synthetisieren und diese anschließend mit Ribose zu koppeln. Als Erstes gelang es ORÓ Adenin, das ein Pentamer der Blausäure ist, durch Blausäure-Polymerisation aus Ammoniumcyanid herzustellen.^[82] Durch Hydrolyse des als Zwischenprodukt gebildeten Diaminopurins konnte auch Guanin nachgewiesen werden. Interessanterweise konnte die Synthese der Pyrimidine aus der gleichen Lösung nicht nachgewiesen werden.^[83] Allerdings konnte Cytosin aus Cyanoacetylen und Cyanat oder Guanidin hergestellt werden (**Abbildung 2**).^[84-86]

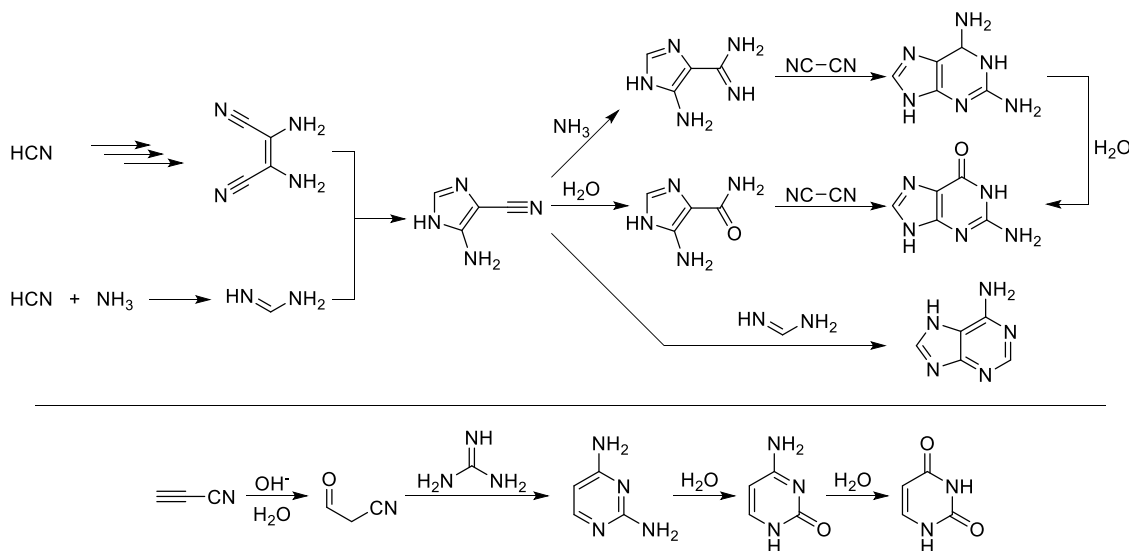


Abbildung 2: Synthesewege für Nucleobasen. Oben: Synthese von der Purin-Nucleobasen aus einer Ammoniumcyanid-Lösung. Unten: Synthese von Cytidin und Uracil ausgehend von Cyanoacetylen.^[82-83, 86-87]

Die Synthese von Nucleobasen aus Blausäure ist insgesamt allerdings sehr ineffizient. Das liegt zum einen an der hohen Reaktivität von Blausäure zu Polymeren in konzentrierten

Lösungen und an der Hydrolyseanfälligkeit von Blausäure in verdünnten Lösungen. Des Weiteren ist es fraglich, ob die hohen Konzentrationen der Blausäure, die für die Nucleobasensynthese benötigt werden, präbiotisch überhaupt plausibel sind.^[82] Cyanoacetylen und Blausäure sind unter Normalbedingungen sehr volatile Verbindungen, wodurch konzentrierte Lösungen unwahrscheinlich erscheinen.

2.2.2 Zucker

Neben Nucleobasen bestehen die RNA-Nucleoside aus der Pentose Ribose bzw. die DNA-Nucleoside aus Desoxyribose. Der älteste und von einem allgemein akzeptierte Weg für die präbiotische Zuckerherstellung ist die von BUTLEROW entdeckte Formose Reaktion.^[88-89] Durch elektrische Entladungen in CO₂ reichen Atmosphären können Formaldehyd und Glykolaldehyd entstehen, die in Anwesenheit von Calciumhydroxid durch eine Aldolreaktion zu Glycerinaldehyd und dessen Isomer Dihydroxyaceton reagieren können.^[90] Durch weitere Aldol- und parallel ablaufenden Cannizaroreaktionen kann so eine komplexe Mischung aus Kohlenhydraten hergestellt werden (**Abbildung 3**).

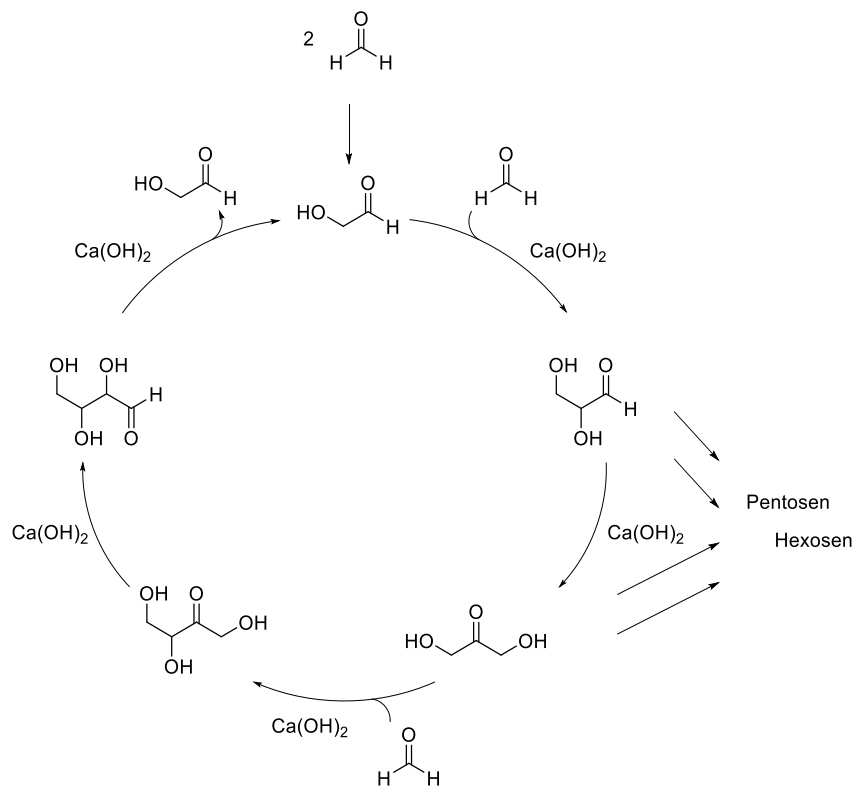


Abbildung 3: Katalytischer Reaktionsmechanismus der Formose Reaktion nach BRESLOW.^[89]

Trotz vieler Optimierungsversuche ist es bislang nicht gelungen durch die Formose Reaktion Ribose selektiv und in großen Ausbeuten herzustellen. Ein vielversprechender Ansatz entstand durch die Verwendung von Hydroxylapatit ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$) als Katalysator. Hierbei konnte gezeigt werden, dass in einem ersten Schritt aus Dihydroxyaceton und Glykolaldehyd die Ketosen Ribulose und Xylulose entstanden und anschließend selektiv Ribulose zu Ribose isomerisiert wurde.^[91] Neben dem Mineral Hydroxylapatit konnten auch Borate eine selektivere Reaktion zu Pentosen katalysieren. Die höhere Pentosenausbeute beruht auf einer Stabilisierung der Zucker durch Boratkomplexierung.^[92-93]

2.2.3 Nukleoside

Nachdem sowohl Nukleobasen als auch Ribose unabhängig voneinander hergestellt werden können, müssen sie in einem weiteren Schritt miteinander verknüpft werden. Die erste präbiotische Synthese eines Nukleosids gelang ORGEL im Jahr 1972.^[77, 94] Durch das Erhitzen der Purin-Nukleobasen im trockenen Zustand in der Anwesenheit von Ribose und synthetischem Meerwasser konnten Adenosin und Guanosin hergestellt werden. Aufgrund der geringen Regioselektivität wurden allerdings nicht nur Adenosin und Guanosin, sondern auch weitere Isomere gebildet.^[77, 94] Eine höhere Regioselektivität und Ausbeute konnte BENNER in einer Adenosin-Synthese demonstrieren. Durch die Verwendung von Ribose-1,2-cyclophosphat wurde selektiv und mit bis zu 15 % Ausbeute Adenosin hergestellt. Aufgrund des Cyclophosphats ist ein nukleophiler Angriff des Adenins am anomeren Zentrum in der α -Position blockiert, wodurch selektiv das kanonische β -Adenosin hergestellt werden kann (**Abbildung 4**).^[95] Interessanterweise konnten weder ORGEL, noch BENNER Pyrimidin-Nukleobasen mit Ribose verknüpfen.^[77, 94-95]

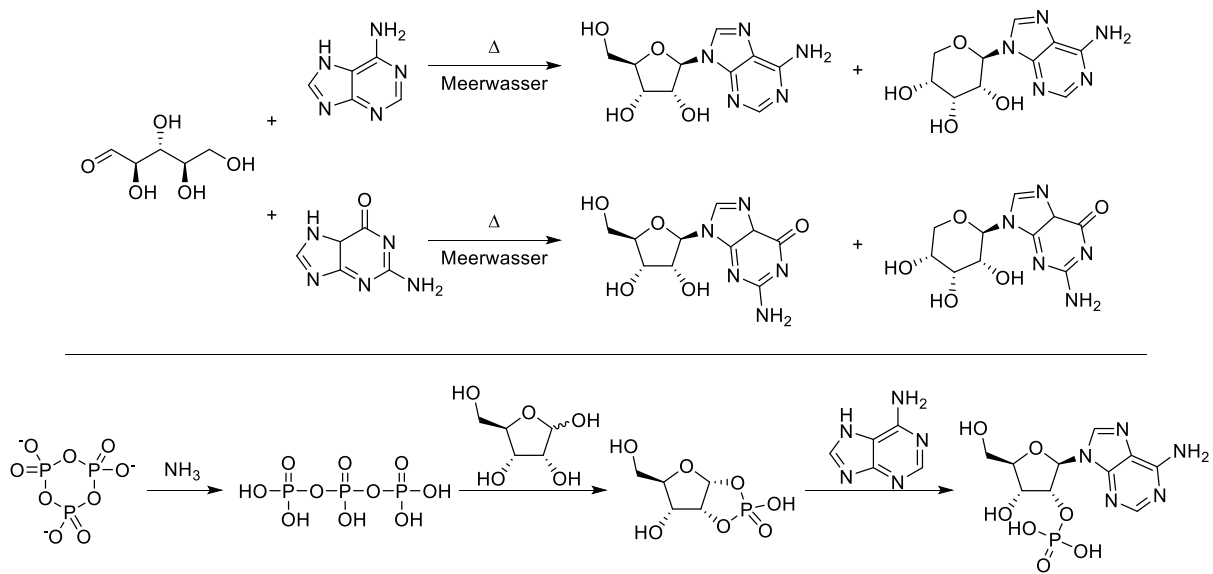


Abbildung 4: Synthesewege für Purin-Nukleoside ausgehend von Nucleobasen und Ribose. Oben: Synthese der Purin-Nucleobasen ausgehend von Ribose und Adenin bzw. Guanin. Unten: Stereoselektive Synthese von Adenosin ausgehend von Adenin und Ribose-1,2-cyclophosphat.^[77, 95]

Einen möglichen präbiotischen Syntheseweg für Pyrimidin-Nucleoside unter der Verwendung von Ribose konnte von CARELL demonstriert werden.^[72] Durch die Reaktion von Harnstoff, Cyanoacetylen und Hydroxylamin gelang die Synthese eines Harnstoff-Isloxazolyl Derivats, das in einem folgenden Schritt mit Ribose kondensieren und einen Nucleosid-Vorläufer bilden konnte. Durch die Verwendung von Nass-Trocken Zyklen konnten zunächst α - und β -Pyranoside als Hauptprodukte und anschließend durch weitere Zyklen und dem Einsatz von Boraten α - und β -Furanoside als Hauptprodukte erhalten werden. Eine anschließende reduktive Öffnung des Isloxazolrings, Tautomerisierung und Zyklisierung ergibt Cytidin. Durch eine Deaminierungsreaktion kann auf die gleiche Reaktionsroute auch Uridin hergestellt werden (**Abbildung 5**).^[72]

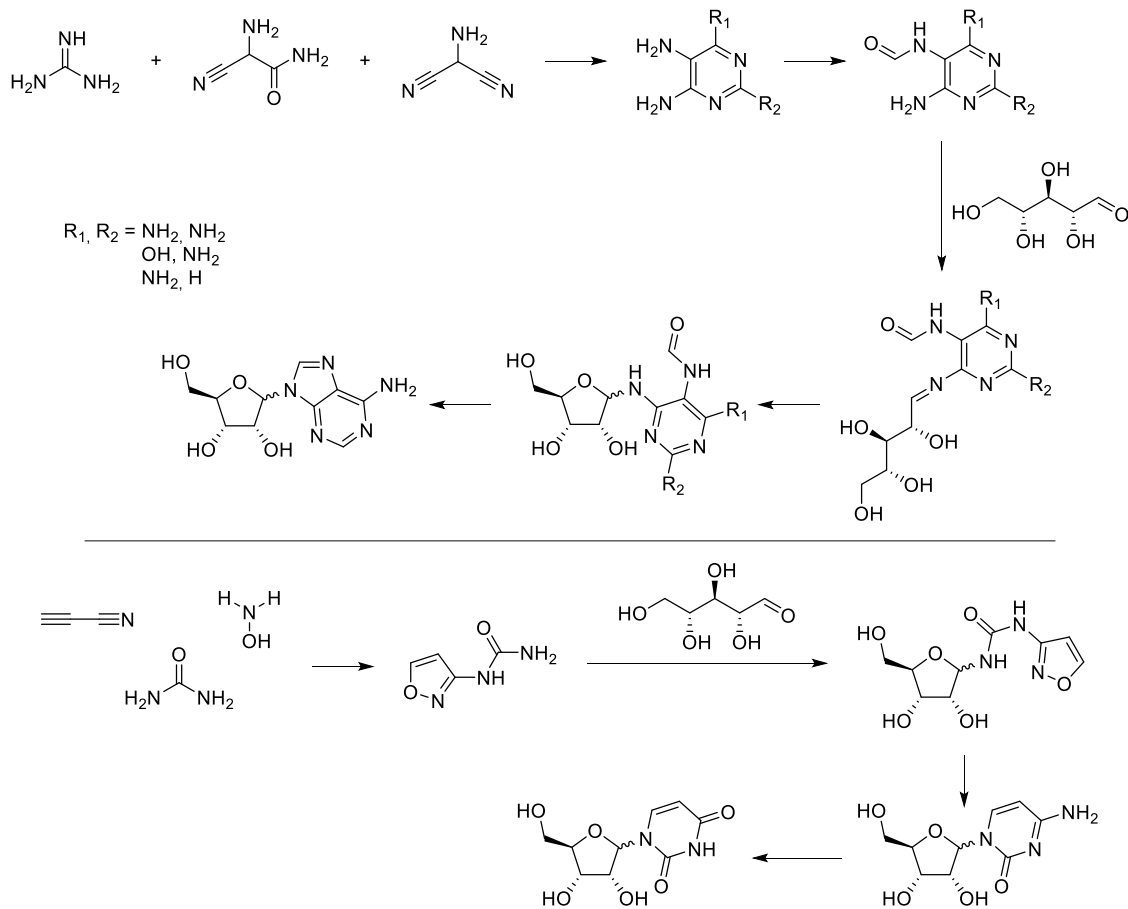


Abbildung 5: Syntheseweg für Purin-Nucleobasen und Pyrimidin-Nucleobasen. Der Syntheseweg für Adenosin verläuft über Formamidopyrimidin und der Reaktionsweg für Cytidin über ein Harnstoff-Isoxazolyl Derivat.^[71-72]

Unter den gleichen Bedingungen konnten neben den Pyrimidin-Nucleobasen auch eine erfolgreiche Purin-Nucleobasen Synthese demonstriert werden.

Um die niedrigen Ausbeuten der meisten Purin-Nucleobasen Synthesen zu umgehen, entwickelte CARELL eine präbiotische Synthese ausgehend von Formamidopyrimin (FaPy), welche ähnlich zur TRAUBE Synthese unter basischen Bedingungen zu Purinen zyklisieren können.^[96] Die für die FaPys wichtige Zwischenstufe der Aminopyrimidine können aus Aminomalonodinitril und Aminocyanoacetamid unter der Verwendung von Guanidin hergestellt werden. Bei der Reaktion mit Ameisensäure oder Formamid entsteht letztlich das FaPy. In einer Kondensationsreaktion mit der offenkettigen Ribose wird im folgenden Schritt erst ein Imin gebildet, bevor durch einen intramolekularen Angriff das Ribofuranosid entsteht. Mittels eines finalen Kondensationsschritts lässt sich so Adenosin unter präbiotischen Bedingungen bilden (**Abbildung 5**).^[71-72]

Alle bisher präsentierten Synthesewege für Nucleoside basieren auf der präbiotischen Verfügbarkeit von Ribose. Wie im Abschnitt **2.2.2 Zucker** beschrieben, verläuft die Ribose Synthese über die Formose Reaktion allerdings keineswegs selektiv und in geringen Ausbeuten. Aus diesem Grund entwickelte SUTHERLAND einen Pyrimidin-Syntheseweg, der nicht von Ribose abhängig ist. Stattdessen wird durch Cyanamid und Glykolaldehyd ein Aminooxazol gebildet, das mit Glycerinaldehyd zu Pentose-Aminooxazolen reagiert. Für die Bildung der Pentosen ist es wichtig, dass die Aldehyde in der richtigen Reihenfolge zugegeben werden, da sonst keine Pentosen geformt werden können. Jedoch entsteht das Arabinosederivat nur zu 15 % und das Ribosederivat zu 25 %. Durch die anschließende Reaktion mit Cyanoacetylen in der Anwesenheit von Phosphat entsteht Cytidin, wobei das Ribosederivat α -Cytidin und das Arabinosederivat β -Cytidin ergibt (**Abbildung 6**).^[78, 97]

Nachdem in der ursprünglichen SUTHERLAND Pyrimidin-Synthese Cytidin nur aus dem Arabinose-Aminooxazolinderivat hergestellt werden konnte, gelang es durch einen zusätzlichen Photoanomerisierungsschritt auch aus dem Ribose-Derivat Cytidin zu synthetisieren. Durch die Reaktion von Cyanoacetylen mit Ribose-Aminooxazolin kann das 2'-Anhydronucleosid Intermediat gebildet werden, welches mit Hydrogensulfid erst zu α -Thioribocytidin und daraufhin durch Bestrahlung durch eine Photoanomerisierung zu β -Thioribocytidin reagieren kann. Mittels eines anschließenden Hydrolyseschrittes können Cytidin und Uridin erhalten werden (**Abbildung 6**).^[98-99]

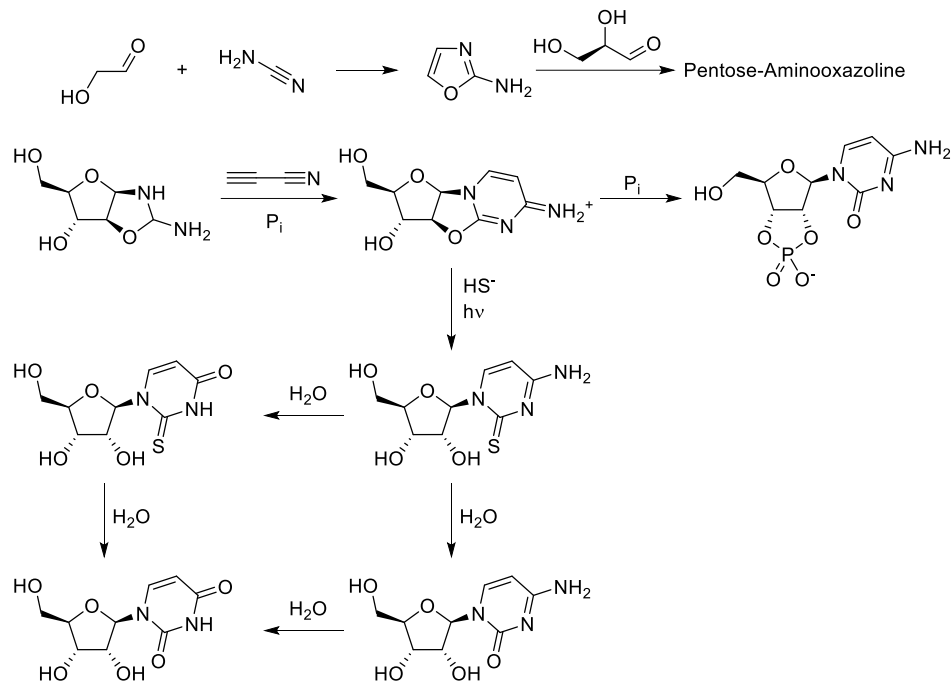


Abbildung 6: Syntheseweg für Pyrimidin-Nucleoside ausgehend von Aminoimidazolen und Glycerinaldehyd.^[78, 98-99]

Neben der Synthese von RNA-Nucleosiden konnten auch präbiotische Reaktionswege zu DNA-Nucleosiden aufgezeigt werden. So konnte durch die Umsetzung von β -Thiouridin mit Phosphat in halb geschmolzenem Harnstoff 2'-Thioanhydronucleoside erhalten werden. Allerdings entstanden hierbei erst mehrere phosphorylierte Derivate, die durch eine Phosphatase in das gewünschte Produkt umgewandelt werden müssen. Infolge der Bestrahlung des 2'-Thioanhydronucleosids in Anwesenheit von Natriumhydrogensulfid konnte durch eine photoinduzierte Reduktion 2'-Deoxy-2-thiouridin synthetisiert werden. Auf diese Weise konnte neben dem Pyrimidin-Nucleosid auch durch eine weitere Reaktion mit Adenin α - und β - 2'-Deoxyadenosin hergestellt werden (**Abbildung 7**).^[100]

Aufgrund der benötigten Phosphatase ist der Mechanismus erst in einem fortgeschrittenen Zeitalter der RNA-Welt möglich, bei dem komplexe Ribozyme mit Phosphatase Eigenschaften existiert haben müssen. Um die Synthese der DNA-Nucleoside nicht von einem Enzym abhängig zu machen, wurde eine ähnliche Syntheseroute entwickelt. Ausgehend von dem aus Cyanoacetylen und Ribose-Aminoimidazol hergestellten 2'-Anhydronucleosid (siehe **Abbildung 6**), konnte durch die Umsetzung mit 8-Mercptoadenin 2'-Thioanhydroadenosin hergestellt werden. Mittels der zuvor bei der 2'-Deoxy-2-thiouridin Synthese demonstrierten photoinduzierten Reduktion konnte so die Synthese von 2'-Deoxyadenosin demonstriert werden (**Abbildung 7**).^[101]

Einen Syntheseweg für alle DNA-Nukleoside, ohne die Verwendung von Enzymen, konnte TRAPP aufzeigen. Die Nucleobasen konnten zusammen mit Acetaldehyd zu einer Vinyl-Nucleobase kondensiert werden, die durch eine stereoselektive Reaktion mit D-Glycerinaldehyd die entsprechenden DNA-Nucleoside bildet.^[102]

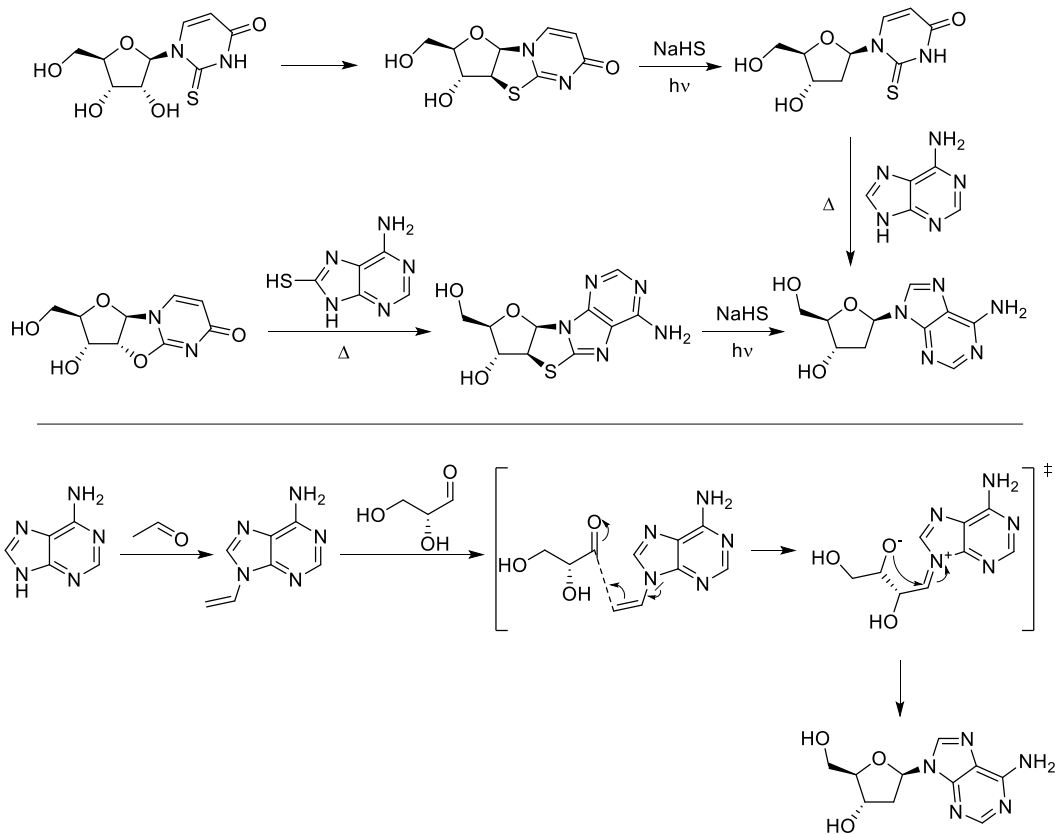


Abbildung 7: Präbiotisch plausible Synthesewege für die Herstellung von DNA-Nucleosiden. Oben: Synthese von 2'-Deoxyadenosin ausgehend von Thiouridin oder eines Thioanhydronucleosids über eine photoinduzierte Reduktion. Unten: Synthese aller DNA-Nucleoside über den anhand von Adenosin demonstrierten Reaktionsverlauf ausgehend von einer Nucleobase, Acetaldehyd und Glycerinaldehyd.^[100-102]

2.2.4 Phosphorylierungen/Nucleotide

Phosphorylierte Verbindungen sind allgegenwärtig im modernen Metabolismus. Egal ob sie als DNA/RNA Rückgrat,^[103] polarer Rest in Phosphorlipiden^[104] oder in Form von Triphosphate als Energiequelle im Körper dienen,^[105] ohne sie würde aus heutiger Sicht kein Leben existieren. Aufgrund dessen wurden Phosphorylierungsreaktionen unter präbiotischen Bedingungen intensiv untersucht.^[106-110]

Vor allem die Entstehung von Nukleotiden stellt für das RNA-Welt Szenario einen zentralen Schritt dar. Ausgehend von Nukleosiden können durch einen Phosphorylierungsschritt die entsprechenden Nukleotide erhalten werden. Angesichts mehrerer potenzieller Phosphorylierungsstellen, häufig unlöslichen vorhandenen Phosphorquellen und der thermodynamischen Benachteiligung von Kondensationsreaktionen in wässrigen Lösungsmitteln, müssen bei einer Phosphorylierung unter präbiotischen Bedingungen mehrere Hindernisse überwunden werden, um zu dem gewünschten Produkt zu gelangen.^[111-114] Neben den thermodynamisch gehemmten Kondensationsreaktionen unter wässrigen Bedingungen, ist auch ein kinetischer Angriff auf Phosphate aufgrund der negativen Ladungen in direkter Nachbarschaft zum elektrophilen Zentrum kinetisch gehemmt. Hinsichtlich dessen werden in der synthetischen Chemie häufig aktive P(III)-Spezies eingesetzt, welche mit Nukleosiden reagieren und in einem anschließenden Schritt zu Phosphaten oxidiert werden.^[115-117]

Für die Synthese von präbiotischen Phosphatverbindungen und zur Überwindung der thermodynamischen Barriere wurden verschiedene Methoden entwickelt. Die vermutlich einfachste Methode ist die thermische Phosphatbildung. Hierbei werden hohe Temperaturen verwendet, um die thermodynamische Barriere zu überwinden. Allerdings enthalten die Reaktionen meist nur zu Beginn Wasser, welches im Verlauf der Experimente allmählich verdampft.^[50] Durch diese Nass-Trocken-Zyklen repräsentierenden Reaktionen konnte erfolgreich die Synthese von mono- und diphosphorylierten Nukleosiden, sowie verbrückte Dinukleosidphosphate gezeigt werden.^[50] Durch die Verwendung von Chelatbildnern und der damit einhergehenden Erhöhung der Phosphormenge, können die Phosphorylierungsausbeuten weiter erhöht werden.^[118-119]

Die Erhöhung der Reaktionstemperaturen für Phosphorylierungsreaktionen ist ein bewährtes Mittel und wird häufig in Kombination mit verschiedenen anderen Phosphorylierungsmethoden verwendet.

Neben der Verwendung von Wasser als Lösungsmittel wurden auch andere Reaktionsmedien für Phosphorylierungsreaktionen eingesetzt. In eutektischen Lösungen aus Harnstoff, Ammoniumformiat und Wasser (UAFW) konnte in Gegenwart von Hydroxylapatit, Dinatriumhydrogenphosphat oder anderen Phosphor-Quellen die Synthese von Mono-, Di- und Trinukleotiden nachgewiesen werden. Durch Eintrocknen der eutektischen Lösungen und weiterem Erhitzen konnte auch eine Umwandlung von nicht-zyklischen zu zyklischen Phosphaten beobachtet werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass durch die

Verwendung von eutektischen Lösungsmitteln die Verfügbarkeit von Phosphaten aus Phosphatmineralien erhöht werden konnte.^[120] Durch die Verwendung von wasserfreiem Formamid konnten ebenfalls phosphorylierte Nucleoside hergestellt werden. SCHOFFSTALL wies durch diese Variante die Synthese aller möglichen Monophosphate und auch der 2'5'- und 3'5'-Diphosphate ausgehend von Adenosin nach. Allerdings ist die Verwendung von Formamid als präbiotisches Phosphorylierungsmedium wenig geeignet, da die geringe Anwesenheit von Wasser die Ausbeuten deutlich senkt.^[106-107]

Kondensationsreagenzien könnten zu der Entstehung phosphorylierter organischer Verbindungen beigetragen haben. Durch die Reaktion der Kondensationsreagenzien mit Phosphaten entstehen aktivierte Phosphate, die in einem zweiten Reaktionsschritt mit Nucleosiden zu Nucleotiden reagieren können. ORGEL wies die Funktionalität von verschiedenen Kondensationsreagenzien nach (**Abbildung 8**). Auch wenn die Bildung der aktivierten Phosphatspezies meist annähernd quantitativ abläuft, so ist die Ausbeute der Nucleotide, aufgrund der stark konkurrierenden Hydrolyse Reaktion, meist sehr gering.^[121]

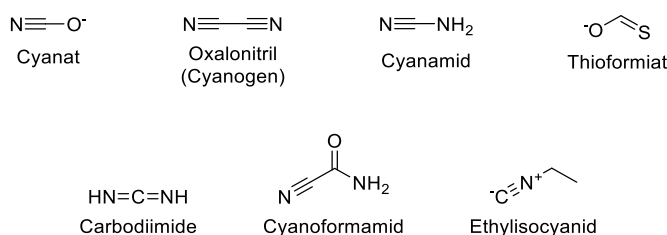


Abbildung 8: Übersicht über die von Orgel erfolgreich getesteten Kondensationsreagenzien in Phosphorylierungsreaktionen.^[121]

Neben der Veränderung der Temperatur, des Lösungsmittels und der Verwendung von zusätzlichen Kondensationsreagenzien kann die Phosphatspezies variiert werden, um die thermodynamisch gehemmte Kondensationsreaktion zu überbrücken. Durch die Verwendung von Phosphaten, die kein Wasser, sondern eine andere Abgangsgruppe besitzen, ist die Reaktion thermodynamisch nicht mehr gehemmt. Aus diesem Grund werden häufig Amidophosphate für präbiotische Phosphorylierungsreaktionen verwendet. Die Aminogruppe dient in diesen Verbindungen nicht nur als bessere Abgangsgruppe, sondern erleichtert angesichts der geringeren negativen Ladung und ihrer elektronenziehenden Eigenschaften den nukleophilen Angriff am Phosphorzentrum.

Selbst wenn keine Mineralien bekannt sind, in denen Amidophosphate vorkommen, so konnte ihre präbiotische Plausibilität durch Kondensationsreaktionen von Aminen mit Schreibersit, Polyphosphaten oder reduzierten Phosphaten gezeigt werden.^[122] Ein weiterer Vorteil von

Amidophosphaten ist ihre erhöhte Löslichkeit. Während in Titrationsexperimenten Phosphate durch die Zugabe von bivalenten Salzen komplett ausgefällt wurden, blieben Amidophosphate bei den gleichen Salzkonzentrationen noch in Lösung.^[122]

Die Anwendbarkeit von Amidophosphaten als Phosphorylierungsmittel demonstrierte ESCHENMOSER durch eine regioselektive α -Phosphorylierung von Aldosen in wässrigen Bedingungen. Durch die Ammonolyse von cycloTrimetaphosphat (cTMP) bildet sich Amidotriphosphat (AmTP), welches durch einen nukleophilen Angriff das Carbonylkohlenstoffatom angreift. Durch einen nukleophilen Angriff der α -Hydroxy-Gruppe und Abspaltung von Pyrophosphat entsteht ein zyklisches Intermediat, das in einem zweiten Reaktionsschritt durch Ringöffnung zur regioselektiv phosphorylierten Aldose reagiert (**Abbildung 9**).^[123]

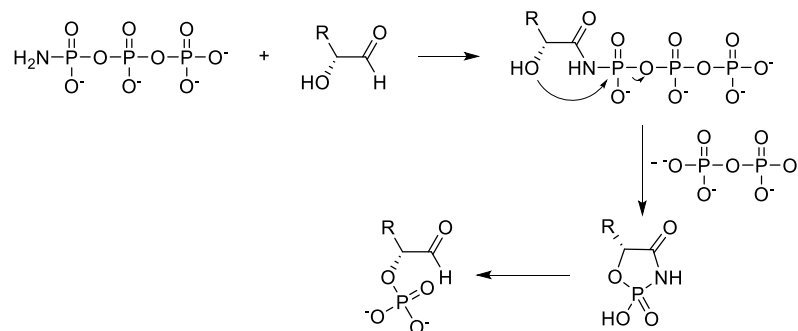


Abbildung 9: Regioselektive α -Phosphorylierung von Aldosen.^[123]

Mittels eines zweiten Ammonolyseschritts kann aus AmTP unter Abspaltung von Pyrophosphat Diamidophosphat (DAP) entstehen. Durch die Verwendung von DAP konnte KRISHNAMURTHY die Phosphorylierungen der RNA-Nukleosiden präsentieren. Die Reaktion von DAP mit Nukleosiden unter reduzierten Mengen an Wasser, so genannte Pastenbedingungen, ergaben 2'3' zyklische Nukleosidmonophosphate (2'3' cNMPs) als Hauptprodukt, wobei sogar Uridin-Tetramere als Nebenprodukt gefunden werden konnten. Die Phosphorylierung verläuft hierbei über einen nukleophilen Angriff der 2',3'-*cis*-Hydroxy-Gruppen an dem protonierten DAP, wodurch ein Monophosphoramidat entsteht, welches durch einen zweiten nukleophilen Angriff der verbleibenden Hydroxy-Gruppe zu dem entsprechenden 2',3' cNMP reagiert (**Abbildung 10**). Durch die Zugabe von Imidazol als Kondensationsreagenz konnten die Ausbeuten weiter erhöht werden, da in einem ersten Schritt das reaktive Amidoimidazolphosphat gebildet wird, das anschließend mit den Nukleosiden reagiert. Auch die Synthese der 5' Nukleosidamidodi- und -triphosphate konnte aus den entsprechenden 5' Nukleosidmonophosphaten (5' NMPs) und

Kenntnisstand

5' Nucleosiddiphosphaten (5' NDPs) gezeigt werden.^[74] Des Weiteren fördert DAP die Synthese von Oligopeptiden aus Aminosäuren. Zusätzlich konnte es in weiteren Experimenten erfolgreich als DNA-Nucleosid Phosphorylierungsreagenz eingesetzt werden.^[74, 124]

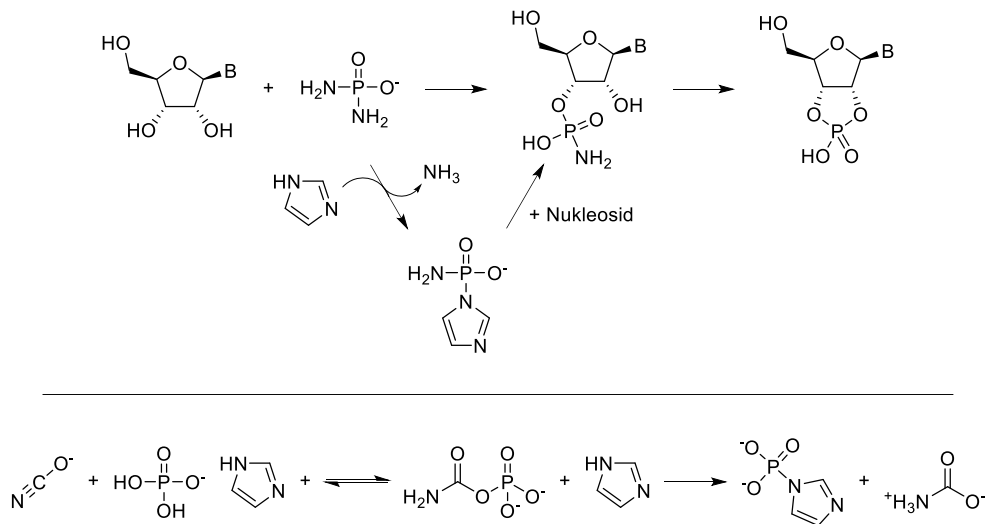


Abbildung 10: Präbiotisch plausible Amidophosphate als Phosphorylierungsmittel. Oben: Phosphorylierungen mit DAP nach Krishnamurthy.^[74] Unten: Herstellung von Imidazolphosphat aus Cyanat, Phosphat und Imidazol.^[125]

Imidazol kann nicht nur als Kondensationsreagenz, sondern auch als Imidazolphosphat angewendet werden. HUCK gelang es durch die Verwendung von Cyanat Phosphat in ein aktiviertes Carbamoylphosphat zu überführen, das anschließend mit Imidazol zu Imidazolphosphat reagieren kann (**Abbildung 10**). Das kinetisch stabile und thermodynamisch aktivierte (KSTA) Imidazolphosphat kann in Pastenreaktionen alle für das Leben wichtige Verbindungsklassen phosphorylieren. Durch die hohe kinetische Stabilität kann Imidazolphosphat in Nass-Trocken Zyklen angereichert werden und während des Trockenzyklus mit den Nucleophilen reagieren. Durch die erneute Zugabe von Cyanat können hydrolysierte Phosphatverbindungen erneut aktiviert werden und neues Imidazolphosphat bilden, wodurch ein effektives Phosphatrecycling ermöglicht wird.^[125]

Neben Imidazolphosphat wird auch mit anderen KSTA Phosphaten gearbeitet. Ähnlich wie bei ATP in der Biochemie werden unter präbiotischen Bedingungen häufig Polyphosphate eingesetzt. Durch die hohen negativen Ladungen in unmittelbarer Umgebung zu den Phosphorzentren ist ein nukleophiler Angriff kinetisch gehemmt, wodurch diese Verbindungen eine hohe Stabilität aufweisen. Durch die Verwendung von Pyrophosphaten, cTMP oder linearen Triphosphaten konnten sowohl zyklische und nicht zyklische NMPs, als auch NTPs erfolgreich synthetisiert werden.^[126] Obwohl wenige Mineralien auf eine präbiotische Verfügbarkeit von Polyphosphaten hindeuten, so konnte PASEK eine mögliche Entstehung von

Polyphosphaten aus Phosphit (P^{III}) und NAMBA die Entstehung von Polyphosphaten in vulkanischen Gebieten zeigen.^[12, 69, 127-130]

2.2.5 Nukleotidaktivierung/Oligonukleotide

Obwohl, wie bereits erwähnt, bei Phosphorylierungsreaktionen teilweise verknüpfte Nukleotide entstehen, so entstehen diese meist nur als Nebenprodukte und in geringen Ausbeuten. Für eine erfolgreiche und effektive Oligonukleotidsynthese benötigt es eine Aktivierung der einzelnen Nukleotide. Auch wenn gezeigt werden konnte, dass Ribozyme eine Polymerisierung ausgehend von zyklischen Nukleosidmonophosphaten katalysieren können, so sind Ribozyme auch selbst RNA-Stränge, weshalb die Entstehung der ersten RNA-Stränge ohne Ribozyme erfolgt sein muss.^[131-132]

Aufgrund der freiwerdenden Ringspannung und der Vermeidung einer Wasserabgangsgruppe eignen sich zyklische Nukleosidmonophosphate als aktivierte Nukleotide. So gelang es ORGEL unter Verwendung von katalytisch wirkenden Aminen bis zu 14-mere in nicht Templat-dirigierenden Reaktionen aus 2',3' cAMP herzustellen. Allerdings glückte die Oligomerisierung nur für Homooligomere und musste unter hohen Temperaturen im Trockenen durchgeführt werden.^[133-134]

Durch die Verwendung von mikrofluiden Wärmekammern, die mit Wasser und Luftblasen gefüllte vulkanische Gesteinsporen repräsentieren, gelang BRAUN in basischen wässrigen Lösungen ausgehend von 2'3' cNMPs die Synthese von nicht nur Homo- sondern auch von Heterooligomerensträngen. Die an der Luft-Wasser Grenze gebildeten Oligomere besitzen zwar einen hohen Anteil an Guanosineinheiten, jedoch konnten auch Cytidin, Adenosin und Uridin in geringen Konzentrationen in die Nukleotidketten eingebaut werden.^[135] Neben der Verwendung von 2',3' cNMPs wurden auch 3',5' cNMPs unter verschiedenen Bedingungen für die Synthese von Oligonukleotiden eingesetzt. Durch das Stapeln und die Ausrichtung der einzelnen zyklischen Monomere im trockenen Zustand wird eine Polymerisation durch Transphosphorylierung vereinfacht, wodurch höhere Ausbeuten erzielt werden können.^[136-141]

Abgesehen von der intrinsischen Aktivierung von Nukleotiden durch zyklische Phosphate, haben sich auch andere Verbindungen als Nukleotidaktivatoren etabliert. Durch die präbiotische Verfügbarkeit von Cyanamiden sind dessen Isomere, die Carbodiimide, eine wichtige Klasse von Aktivierungsverbindungen.^[142-145] Da Carbodiimid häufig als das Tautomer

Cyanamid vorliegt, wird stattdessen meist 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDCI) bzw. dessen Hydrochloridsalz eingesetzt. In Reaktionen mit Nukleotiden reagiert EDCI in einem ersten Schritt mit der Phosphateinheit, wodurch eine bessere Abgangsgruppe gebildet wird, was wiederum zu einer Erleichterung der Transphosphorylierung im zweiten Reaktionsschritt führt. In vielen Fällen erfolgt nicht direkt eine Reaktion mit einem weiteren Nukleotid/Nukleosid, sondern das Phosphat wird durch die Reaktion mit einem Organokatalysator weiter aktiviert.^[146-148] Die für Nukleotidaktivierungen am meisten verwendeten Organokatalysatoren basieren hierbei auf Imidazol. ORGEL und FERRIS konnten als Pioniere auf diesem Feld die Fähigkeiten von Nukleosid 5'-phosphorimidazol in nicht enzymatischen Phosphorylierungen zeigen.^[149-151]

Die größten Nachteile von Nukleosid 5'-phosphorimidazol sind allerdings niedrige Ausbeuten und eine langsame Reaktionsrate. Daher wurden 2-Methylimidazole eingesetzt, die im Vergleich zu Imidazol als bessere Abgangsgruppe fungieren und aufgrund der Interaktion mit dem benachbarten Monomer die Reaktion um das 10- bis 100-Fache beschleunigen.^[152-155] Untersuchungen von Imidazolderivaten zeigten, dass ein größerer Substituent in der 2-Position die Reaktion verlangsamt und die Reaktionsrate abnimmt, wenn der pK_a der Abgangsgruppe sinkt. Hinsichtlich dieser beiden Eigenschaften konnte durch 2-Aminoimidazol (kleinerer Substituent in der 2-Position und höherer pK_a als 2-Methylimidazol) die Reaktionsrate und auch Ausbeute in nichtenzymatischen Reaktionen nochmals deutlich verbessert werden.^[156] Obwohl die mit Imidazol aktivierten Nukleotide seit langem erfolgreich unter präbiotisch plausiblen Bedingungen eingesetzt wurden, blieb ihre präbiotische Plausibilität lange fragwürdig.^[157-158] Erst kürzlich konnte eine weitere erfolgreiche Syntheseroute ausgehend von 5' NMP, Acetaldehyd und Methylocyanid demonstriert werden. Während der Reaktion reagiert AMP mit einem Nitriliumion zu einem reaktiven Imidoylphosphat, das anschließend mit Imidazol zu Adenosin 5'-phosphorimidazol reagieren kann (**Abbildung 11**).^[159]

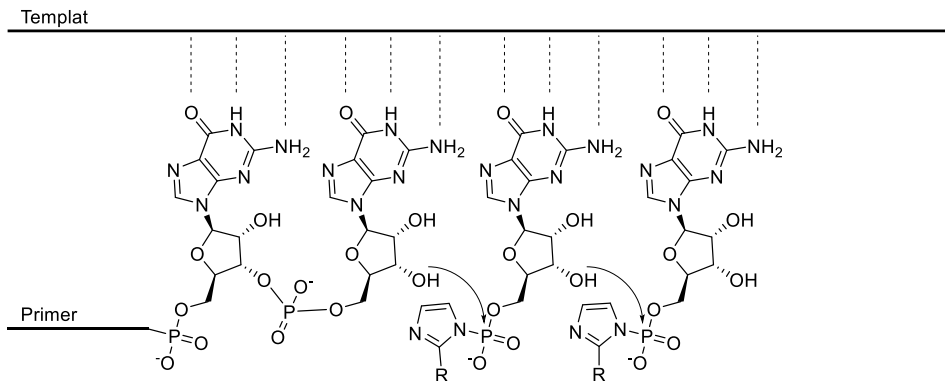
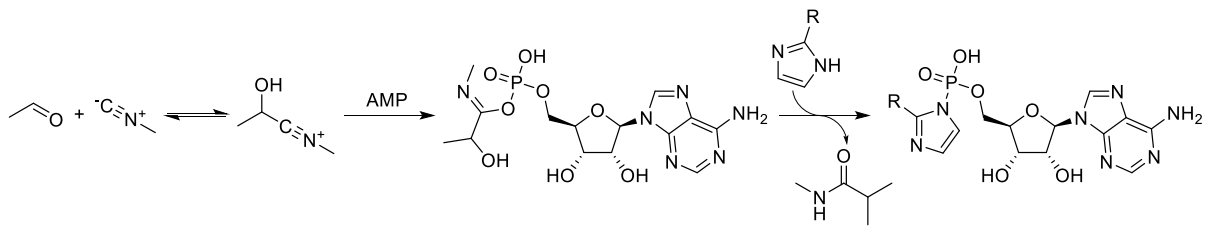


Abbildung 11: Nukleotidaktivierung und Oligonukleotidsynthese. Oben: Nukleotidaktivierung ausgehend von Acetaldehyd und Methylisocyanid über Imidoylphosphat zum Adenosin-5'-phosphorimidazol nach SUTHERLAND.^[159] Unten: Darstellung einer nicht-enzymatischen Templat-dirigierenden Oligonukleosidsynthese.^[160]

Obwohl Nucleosid-5'-phosphorimidazole aktivierte Nucleoside darstellen, bleiben die Ausbeuten gering, wenn die Reaktionen ohne weitere Additive durchgeführt werden. Die größten Verbesserungen erfolgten durch die Verwendung von Mineralien oder Templaten.^[150-151, 156] Ähnlich zu dem zuvor bei 3',5' cNMP beschriebenen Stapeln der Monomere werden auch in Templat-dirigierenden Reaktionen die Monomere ausgerichtet, wodurch eine anschließende Oligomerisierung durch Transphosphorylierung der aktivierten Monomere vereinfacht wird (**Abbildung 11**).^[153, 156, 160]

2.2.6 Koenzyme

Als Relikte der RNA-Welt werden heute verschiedene Koenzyme angesehen, die noch eine Nucleotideinheit, meist Adenosine-5'-monophosphat (AMP), besitzen. Hinsichtlich der Nucleotideinheit wird vermutet, dass diese Koenzyme Überreste von RNA-Enzymen sind. Aufgrund der geringen Aktivität von Koenzymen im Vergleich zu Protein-Koenzym Komplexen wird angenommen, dass auch schon während der RNA-Welt Koenzyme Komplexverbindungen für eine effektivere Katalyse eingegangen sind. Die Abwesenheit von Proteinen lässt die Schlussfolgerung zu, dass die wichtigen Komplexverbindungen von

Kenntnisstand

Koenzymen und RNA-Enzymen ausgebildet wurden. Um eine effektive und gute Interaktion zwischen Koenzym und RNA-Enzym zu erhalten, besitzen viele der Koenzyme eine Nukleotid-/Nucleosideinheit, um mit dem RNA-Enzym die benötigte Bindung einzugehen (**Abbildung 12**).^[161]

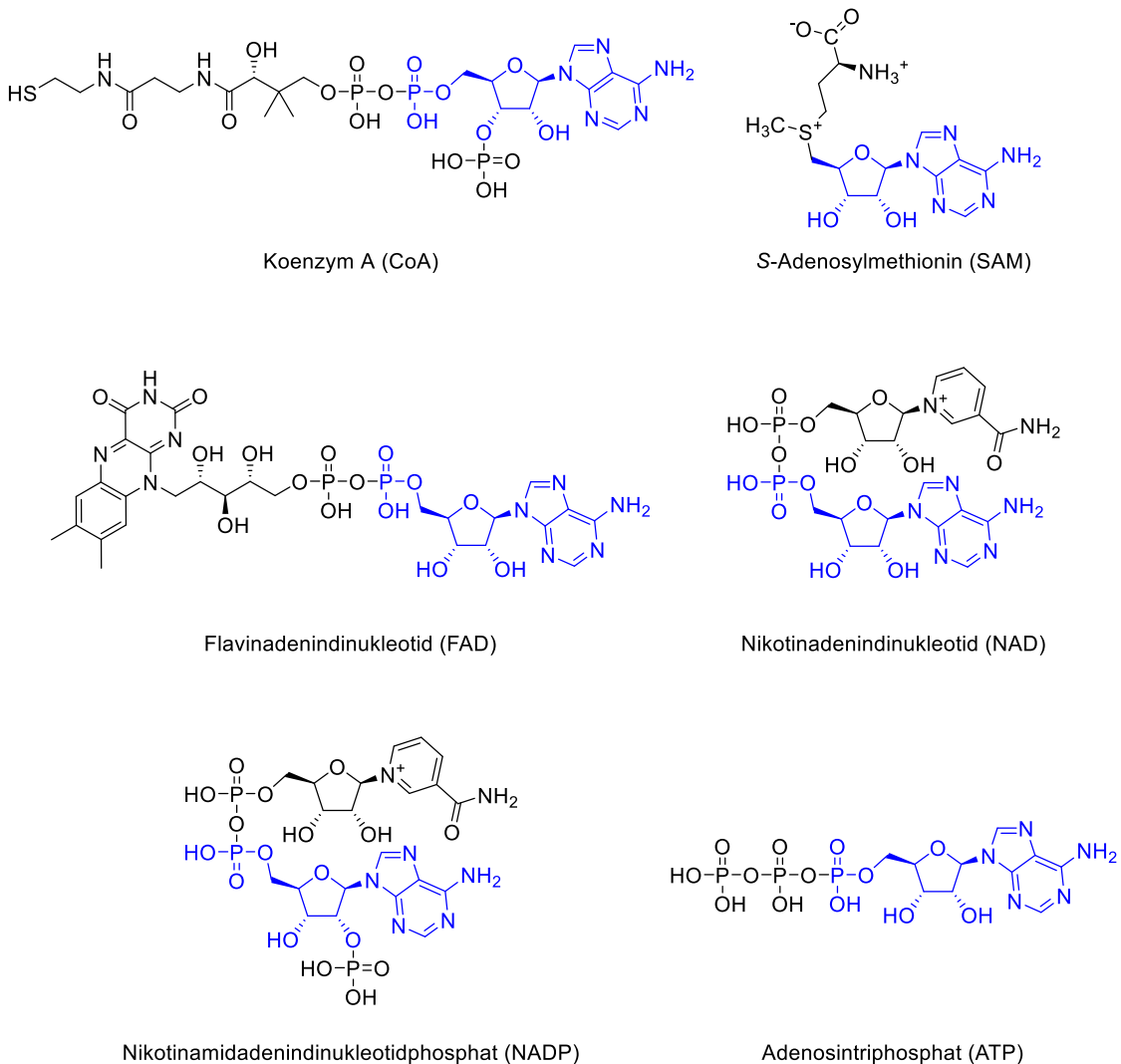


Abbildung 12: Strukturen einiger Koenzyme, die als Relikte aus der RNA-Welt angesehen werden. RNA-Teil der Moleküle (Adenosine/AMP) ist blau gefärbt, die funktionelle Einheit des Moleküls ist in schwarz dargestellt.

Es wird angenommen, dass sich über die Zeit immer längere und komplexere RNA-Moleküle gebildet haben, die schließlich irgendwann eine Proteinsynthese katalysieren konnten. Daraufhin übernahmen Proteine langsam die Funktion der RNA-Enzyme. Als Überreste der RNA-Welt blieben nur die Koenzyme. Aufgrund ihrer weitverbreiteten Verwendung bis zur Zeit der RNA-Protein Translation im Metabolismus, konnten sie nicht mehr ohne weiteres verändert werden, ohne gleichzeitig auch eine Vielzahl von Enzymen ändern zu müssen.^[80]

Aufgrund ihrer metabolischen Relevanz wurde die Funktionsweise von Koenzymen und ihre metabolischen, als auch präbiotischen Synthesewege intensiv erforscht. Während inzwischen präbiotische Synthesewege für Adenosin/AMP^[71, 77, 94] und verschiedene funktionelle Koenzym-Gruppen, wie Methionin (S-Adenosylmethionin)^[162], ATP^[125] oder Pantethein (Koenzym A)^[163] gezeigt werden konnten, so erweist sich die präbiotische Herstellung anderer funktioneller Gruppen bzw. der Verknüpfungen mit Adenosin/AMP als schwierig.

3 Zielsetzung

Die Synthese von biomolekularen Verbindungen unter präbiotischen Bedingungen stellt eine große Herausforderung dar. Trotz vieler demonstrierter Syntheserouten, existieren nur wenige, die unter denselben oder ähnlichen Bedingungen funktionieren. Viele der Reaktionspfade enthalten Kondensationsreaktionen, welche unter wässrigen Bedingungen thermodynamisch unvorteilhaft sind. Aufgrund dessen muss häufig mit Nass-Trocken Zyklen, hohen Temperaturen oder in nicht wässrigen Reaktionsmedien gearbeitet werden. Eine Möglichkeit, um dieses Problem zu bewältigen, ist die Herstellung von aktivierten Intermediaten, die in wässrigen Lösungen (temporär) stabil sind und anschließend mit dem gewünschten Nukleophil weiterreagieren.

Phosphorylierte Verbindungen spielen eine essenzielle Rolle im Metabolismus, weshalb präbiotische Phosphorylierungsreaktionen intensiv untersucht wurden. Allerdings sind Phosphorylierungsreaktionen ausgehend von Phosphaten Kondensationsreaktionen und damit thermodynamisch unvorteilhaft. Außerdem sind Phosphate aufgrund einer hohen negativen Ladung in der Nähe des Phosphors auch kinetisch für nukleophile Angriff gehemmt. Aufgrund dessen wurden präbiotisch plausible Amidophosphate für Phosphorylierungen entwickelt, die durch eine geringere negative Ladung in der Nähe des Phosphors kinetisch und aufgrund einer modifizierten Abgangsgruppe thermodynamisch weniger gehemmt sind. Allerdings sind auch die entwickelten Phosphorylierungsmethoden mit Amidophosphaten nur in Pastenreaktionen und damit nicht in wässrigen Medien möglich. Des Weiteren liefern viele der Phosphorylierungsmethoden nicht selektiv das in der Natur am häufigsten vorkommende Phosphorylierungsprodukt, sondern ein breites Spektrum an Regioisomeren.

Daher soll im ersten Teil dieser Arbeit eine Phosphorylierungsmethode unter präbiotischen wässrigen Bedingungen entwickelt werden. Neben dem wässrigen Lösungsmittel soll ein möglichst breites Spektrum an Reaktionsbedingungen toleriert werden können, um die Robustheit zu demonstrieren und einen möglichst großen Anwendungsbereich der Phosphorylierungen zu ermöglichen. Zur Vermeidung von anschließenden Transphosphorylierungsreaktionen soll deshalb auch eine regioselektive Phosphorylierungsmethode entwickelt werden.

Zielsetzung

Während die Synthese vieler relevanter biomolekularer Verbindungsklassen erforscht wurde, sind Reaktionswege für einige sehr wichtige Koenzyme weiterhin aufgrund ihrer Unlöslichkeit oder Instabilität unerforscht. Bisher gibt es potentielle präbiotische Reaktionsrouten für spezifische funktionelle Gruppen innerhalb der Koenzyme, aber es fehlt zumeist an Syntheserouten unter einheitlichen Bedingungen, um das gesamte Molekül zu synthetisieren.

Im zweiten Teil dieser Arbeit soll ein Reaktionsweg für das Redox-Koenzym Nikotinamidadenindinukleotid (NAD^+/NADH) entwickelt werden. Dabei soll darauf zu achten sein, dass die Synthese von leicht zugänglichen präbiotischen Molekülen und unter möglichst uniformen Reaktionsbedingungen stattfinden kann. Hierbei sollen bereits existente Synthesewege für ähnliche Molekülklassen adaptiert und ihre Anwendbarkeit erweitert, sowie eine neue Aktivierungsmethode entwickelt werden.

4 Ergebnisse und Diskussion

Die Verwendung von Katalysatoren und Aktivierungsmitteln stellt eine elegante Variante für die Synthese von präbiotisch wichtigen Verbindungen dar, die andernfalls nicht oder nur in geringen Ausbeuten synthetisiert werden könnten. Aufgrund dessen wurde eine Vielzahl von präbiotisch plausiblen Aktivierungsreagenzien entwickelt und erfolgreich eingesetzt.^[121]

Neben den schon häufig eingesetzten und getesteten anorganischen Katalysatoren, wie Mineralien oder verschiedenen Metallen,^[109, 164-170] sind vor allem Organokatalysatoren von großem Interesse. Durch die Verwendung von chiralen Organokatalysatoren ist es plausibel, dass aus einem zunächst geringen Enantiomerenüberschuss mittels Katalyse eine homochirale Welt entstanden sein könnte.^[171-175]

Imidazolidin-4-thione wurden erstmals von PAVENTI und EDWARD als eine potentiell wichtige präbiotische Verbindung für die Synthese von aktivierten Peptidvorläufern, den α -Aminothioamiden erachtet.^[176] Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der Imidazolidin-4-thione zu dem MacMillan Imidazolidinon Katalysator^[177] (**Abbildung 13**) wurde die präbiotische Synthese verschiedener Imidazolidin-4-thione und ihrer Anwendungsmöglichkeiten als präbiotische Organokatalysatoren erforscht.^[178]



Abbildung 13: Strukturelle Ähnlichkeit des MacMillan Imidazolidinons und der Imidazolidin-4-thione.

Angesichts der großen Anzahl von präbiotisch zugänglichen Imidazolidin-4-thionen und ihrer Fähigkeit zur Selbstmodifikation unter wechselnden Bedingungen des Umfelds, stellen Imidazolidin-4-thione eine wichtige Klasse an präbiotischer Katalysatoren und Aktivatoren dar.^[179]

Neben der Verwendung von Imidazolidin-4-thionen als Katalysatoren ergibt sich auch die Möglichkeit Imidazolidin-4-thione als mögliches Phosphoramid, ähnlich zu bekannten Phosphorimidazolen,^[74, 125] in präbiotischen Reaktionen als Phosphorylierungsmittel

einzusetzen. Im Verlauf dieser Arbeit sollen Imidazolidin-4-thionphosphatderivate vor allem im Bezug als Phosphorylierungsmittel für Nucleoside untersucht werden.

4.1 Imidazolidin-4-thione als Phosphorylierungsmittel

4.1.1 Synthese von Imidazolidin-4-thionphosphat

Aufgrund der verschiedenen nukleophilen Hydroxygruppen (**Abbildung 14**) und damit unterschiedlichen Phosphorylierungstellen entstehen bei der Phosphorylierung von RNA- und DNA-Nucleosiden in den meisten Fällen eine Vielzahl von unterschiedlichen Regioisomeren.



Abbildung 14: Potenzielle Phosphorylierungstellen (blau markiert) von RNA- (links) und DNA-Nucleosiden (rechts).

Aufgrund der höheren Nucleophilie der primären Hydroxy-Gruppe im Vergleich zu den sekundären Hydroxygruppen sollten theoretisch bevorzugt an der primären Hydroxygruppe phosphorylierte Nucleoside entstehen. Allerdings müssen für Phosphorylierungsreaktionen unter wässrigen Bedingungen meist erhöhte Temperaturen verwendet werden, um die thermodynamisch benachteiligten Kondensationsreaktionen zu ermöglichen. Die erhöhten Temperaturen haben jedoch den Nachteil, dass hierdurch keine regioselektive Phosphorylierung der primären Hydroxygruppe mehr möglich ist, sondern eine Vielzahl von unterschiedlichen Regioisomeren gebildet werden.

Um eine gezielte regioselektive Phosphorylierung von Nucleosiden zu ermöglichen, soll deshalb ein sterisch anspruchsvolles Phosphoramid verwendet werden, sodass nur die sterisch flexiblere primäre Hydroxygruppe phosphoryliert werden kann. Aufgrund der präbiotischen Verfügbarkeit von kurzkettigen Aldehyden und Ketonen kamen unter anderem die Imidazolidin-4-thione 2,2,5-Trimethylimidazolidin-4-thion (**1a**), 2,5,5-Trimethylimidazolidin-4-thion (**1b**) und 2,2,5,5-Tetramethylimidazolidin-4-thion (**1c**) in Betracht. Neben diesen vier auf Aceton basierten Imidazolidin-4-thionen kamen des Weiteren auch noch das sterisch anspruchsvollere und damit potenziell regioselektivere 5-Isopropyl-2-methylimidazolidin-4-

thion (**1d**) und das als Konglomerat kristallisierende (2*R*, 5*S*)-5-Ethyl-2-methylimidazolidin-4-thion (**1e**) in Frage (**Abbildung 15**). Durch die spontane Auflösung von einzelnen enantiomerenreinen Kristallen und einer damit einhergehenden möglichen Entstehung einer chiralen Welt, ist vor allem die letztgenannte Verbindung hoch interessant.^[180]

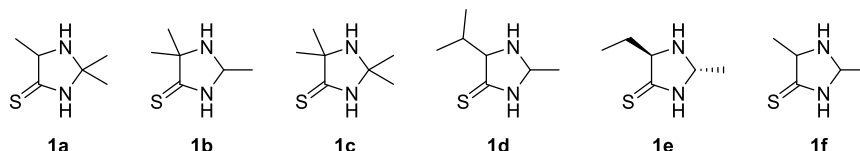


Abbildung 15: Unterschiedliche Imidazolidin-4-tione, die als Phosphoramide in Betracht gezogen wurden: 2,2,5-Trimethylimidazolidin-4-thion (**1a**), 2,5,5-Trimethylimidazolidin-4-thion (**1b**), 2,2,5,5-Tetramethylimidazolidin-4-thion (**1c**), 5-Isopropyl-2-methylimidazolidin-4-thion (**1d**), 5-Isopropyl-2-methylimidazolidin-4-thion, (2*R*, 5*S*)-5-Ethyl-2-methylimidazolidin-4-thion (**1e**), 2,5-Dimethylimidazolidin-4-thion (**1f**).

Zur Herstellung der unterschiedlichen Imidazolidin-4-thionphosphaten, sollten die entsprechenden Imidazolidin-4-thione mit Phosphoroxychlorid und Triethylamin in DCM umgesetzt werden (**Abbildung 16**). Allerdings konnte nach über sieben Tagen Reaktionszeit und auch unter erhöhten Temperaturen kein Imidazolidin-4-thionphosphat isoliert werden. Die aufgrund ihrer großen Sterik verwendeten Imidazolidin-4-thione **1a-1e** sind wahrscheinlich sterisch zu anspruchsvoll, weshalb kein phosphoryliertes Imidazolidin-4-thion erhalten werden konnte. Aus diesem Grund wurde das sterisch kleinere 2,5-Dimethylimidazolidin-4-thion (**1f**) als weiteres potenzielles Phosphorylierungsmittel in Erwägung gezogen. Die Hypothese, dass aufgrund des sterisch anspruchsvollen Phosphoroxychlorids und den sperrigen Seitenketten die Imidazolidin-4-thionphosphate der Imidazolidin-4-thione **1a-1e** nicht erhalten werden konnten, wurde bestätigt, als das kleinere **1f** erfolgreich zu 2,5-Dimethylimidazolidin-4-thionphosphat (**2f**) phosphoryliert werden konnte.

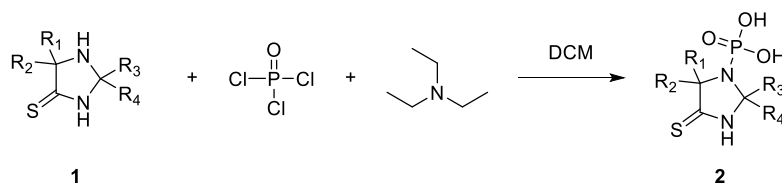


Abbildung 16: Herstellung von Imidazolidin-4-thionphosphaten (**2**) ausgehend von Phosphoroxychlorid, Triethylamin und Imidazolidin-4-thion (**1**) in DCM.

4.1.2 Optimierung der Phosphorylierungsbedingungen

Um die Ergebnisse der Phosphorylierungsreaktionen mit anderen, in der Literatur bekannten präbiotischen Phosphorylierungsreaktionen vergleichen zu können, wurden zu Beginn leicht modifizierte Reaktionsbedingungen korrespondierend zu KRISHNAMURTHYS Reaktionen mit dem Phosphorylierungsmittel Diamidophosphat (DAP) verwendet. KRISHNAMURTHY, bei dessen Phosphorylierungen 2'3'cyclisches Nucleosidmonophosphat (2'3'cNMP) als Hauptprodukt entstand, verwendete verschiedene Phosphorylierungsbedingungen bei unterschiedlichen pH-Werten, Konzentrationen und in Mikrowellenversuchen oder Pasten-Reaktionen.^[74]

Anders als bei KRISHNAMURTHY war das Ziel dieser Arbeit nicht die Synthese der 2'3'cNMPs, sondern eine regioselektive Synthese der 5'NMPs. Aufgrund der zusätzlichen Hydroxygruppe der RNA-Nucleoside im Vergleich zu den DNA-Nucleosiden wurde die Optimierung der Reaktionsbedingungen für Phosphorylierungen mit **2f** an Adenosin durchgeführt. Neben dem gewünschten 5'AMP können aufgrund der zwei weiteren Hydroxygruppen ebenfalls die Adenosinmonophosphate 3'AMP und 2'AMP, wie auch die zyklischen Adenosinmonophosphate 2'3'cAMP und 3'5'cAMP entstehen (**Abbildung 17**).

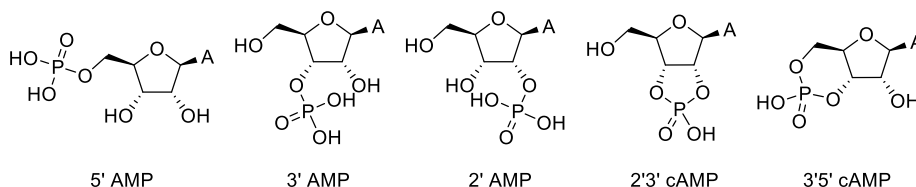


Abbildung 17: Mögliche Phosphorylierungsprodukte von Adenosin.

Da die Phosphorylierung von Nucleosiden mittels **2f** unter wässrigen Bedingungen durchgeführt werden sollte, wurden die Versuche zwar analog zu denen von KRISHNAMURTHY durchgeführt, allerdings nicht exakt reproduziert. In Anlehnung an die Phosphorylierungsergebnisse von KRISHNAMURTHY mit DAP,^[74] wurden die ersten Phosphorylierungen in einer gesättigten Lösung von Adenosin (0.1 M) und **2f** (5.0 Äquiv.) in hochreinem Wasser (1.0 mL) durchgeführt. Das Gemisch wurde, nachdem das Phosphorylierungsmittel zugegeben wurde, auf pH 6 eingestellt und für 7 Tage bei 50 °C gerührt. Qualitative Analyse durch hochauflösende Orbitrap MS und UHPLC-QTOF MS zeigten die erfolgreiche Phosphorylierung von Adenosin. Allerdings zeigte die qualitative

Analyse, dass nicht nur 5'AMP, sondern noch weitere Regioisomere entstanden sind (**Abbildung 18**).

Neben der Phosphorylierung mit **2f** wurden auch die etablierten Phosphorylierungsmittel DAP und die Kombination aus DAP und Imidazol eingesetzt und bezüglich Ausbeute und Selektivität untersucht, um diese als Referenz für das neu entwickelte Phosphorylierungsmittel zu verwenden.

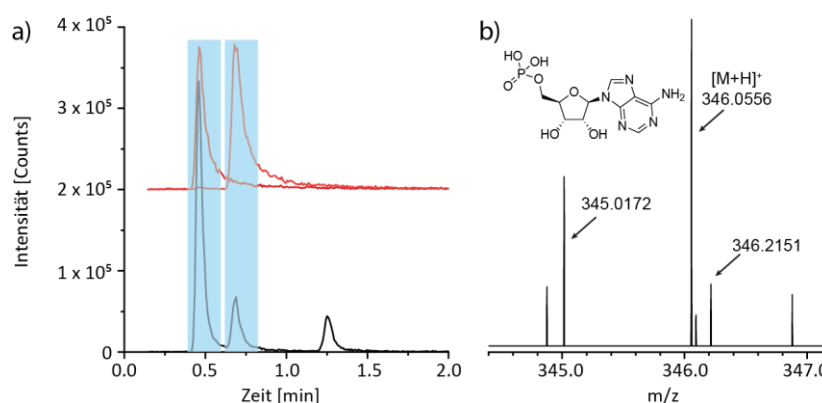


Abbildung 18: Qualitative Analyse bezüglich der Adenosinmonophosphatbildung in der Reaktion von Adenosin mit **2f** unter wässrigen Bedingungen. a) Mittels UHPLC-QTOF MS (Massenfilter m/z 346.0541 – 346.0575) analysierte Reaktion von **2f** mit Adenosin (schwarze Kurve). Die rote Kurve zeigt die gemessenen Referenzverbindungen 5'AMP und 3'AMP. Aufgrund des Massenfilters und der ähnlichen Retentionszeit wird der dritte Peak 2'AMP zugeordnet. b) Hochauflösendes Orbitrap MS Spektrum von der Reaktion von Adenosin mit **2f**.

Damit quantitative Analysen bezüglich der Regioselektivität getroffen werden konnten, wurden Verdünnungsreihen mittels UHPLC-QTOF MS für die Adenosinmonophosphate 5'AMP, 3'AMP, 2'3'cAMP und 3'5'cAMP aufgenommen (siehe 6.3 Verdünnungsreihen).

Die quantitative Auswertung zeigte, dass mehr 5'AMP als irgendeine andere Adenosinmonophosphatverbindung hergestellt wurde und damit eine selektive Phosphorylierung mit **2f** erzielt werden konnte. Des Weiteren erzielten die Reaktionen mit dem Phosphorylierungsmittel **2f** meist die größeren Ausbeuten bezüglich der 5'AMP Bildung im Vergleich zu DAP und DAP in Kombination mit Imidazol. Durch die Testung von Additiven ($MgCl_2$ oder $ZnCl_2$) in Kombination mit unterschiedlichen Äquivalenten der Phosphorylierungsmittel und bei weiteren pH-Werten (pH 6 und pH 8) bei 50 °C wurden die Reaktionsbedingungen optimiert (**Tabelle 1**).

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 1: Getestete Bedingungen für die Phosphorylierungsreaktionen von Adenosin mit den Phosphorylierungsmitteln **2f**, DAP und DAP mit Imidazol bei 50 °C.

Bedingung	Additiv (0.5 Äquiv.)	Temperatur
pH 6		
1	-	50 °C
2	MgCl ₂	50 °C
3	ZnCl ₂	50 °C
4*	-	50 °C
5#	-	50 °C
pH 8		
6	-	50 °C
7	MgCl ₂	50 °C
8	ZnCl ₂	50 °C
9*	-	50 °C
10#	-	50 °C

*: pH-Wert wurde täglich eingestellt; #: 1.0 Äquiv. des Phosphorylierungsmittels wurden eingesetzt

Während **2f** immer mehr 5'AMP als DAP oder DAP mit Imidazol lieferte, war DAP und auch DAP mit Imidazol das deutlich überlegene Phosphorylierungsmittel bezüglich der Synthese von 2'3'cAMP (**Abbildung 19**). Aufgrund des größeren sterischen Anspruchs von **2f** und der Anwesenheit von zwei Aminogruppen als potenziellen Abgangsgruppen in DAP waren diese Ergebnisse wenig überraschend. Des Weiteren sind die 2'3'cAMP Ausbeuten unter leicht sauren Bedingungen für Phosphorylierungen mit DAP höher als in leicht basischen Bedingungen, was darauf schließen lässt, dass aufgrund einer positiven Ladung an den Stickstoffatomen, ein nukleophiler Angriff durch die Hydroxygruppen am Phosphoratom erleichtert wird.

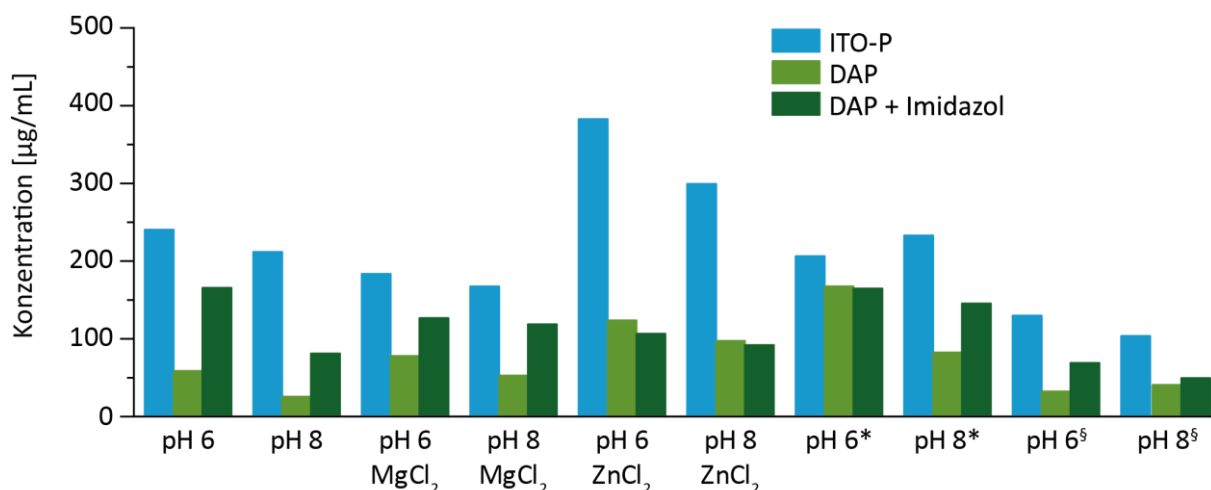


Abbildung 19: Vergleich der in den Phosphorylierungen mit DAP, DAP mit Imidazol und Imidazolidin-4-thionphosphat erzielten 5'AMP Ausbeuten. Die Reaktionen wurden in 1.0 mL hochreinem Wasser bei 50 °C für 7 Tage und dem entsprechenden pH-Wert durchgeführt. Dabei wurden 0.1 mmol Adenosin, 5.0 Äquiv. Phosphorylierungsmittel und falls verwendet 1.0 Äquiv. Imidazol und 0.5 Äquiv. Additiv eingesetzt. [*] pH-Wert wurde täglich auf den korrespondierenden pH-Wert eingestellt; [§] Reaktionen wurden mit 1.0 Äquiv. statt der ansonsten verwendeten 5.0 Äquiv. Phosphorylierungsmittel durchgeführt.

3'5'cAMP Produkte konnten bei den verwendeten Phosphorylierungsbedingungen nicht beobachtet werden. Untersuchungen von SMITH ergaben, dass Temperaturen von über 60 °C benötigt werden, um den in 3'5'cAMP enthaltenden thermodynamisch ungünstigeren 5-gliedrigen Ring in trans-Position zu einem 6-gliedrigen Ring auszubilden.^[181]

Aufgrund der in Wasser thermodynamisch unvorteilhaften Kondensationsreaktionen werden bei präbiotischen Phosphorylierungsreaktionen in Wasser meist erhöhte Temperaturen eingesetzt. Allerdings erfolgt bei erhöhten Temperaturen eine beschleunigte Zersetzung von sowohl Imidazolidin-4-thion als auch Imidazolidin-4-thionphosphat (**2f**). Deshalb wurden die Phosphorylierungsreaktionen im Folgenden auch bei Raumtemperatur untersucht. Neben den milderen Reaktionsbedingungen bei einer erniedrigten Temperatur sollte die Funktionalität von Imidazolidin-4-thionphosphat in unterschiedlichen präbiotisch plausiblen Reaktionsräumen untersucht werden, weshalb die Phosphorylierungsreaktionen abgesehen von Versuchen in hochreinem Wasser auch in Phosphatpuffer, das eine phosphatreiche Umgebung darstellt,^[182] durchgeführt (**Tabelle 2**) wurden. Um auszuschließen, dass die Phosphatübertragung auf die Nucleoside vom Phosphatpuffer anstelle des Phosphorylierungsmittels stattgefunden hat, wurden die Versuche in Phosphatpuffer ohne Phosphorylierungsmittel wiederholt. Hierbei konnten mittels Orbitrap MS keine phosphorylierten Nucleoside detektiert werden, was darauf schließen lässt, dass die Phosphatgruppen von dem Phosphorylierungsmittel übertragen wurden und nicht vom Phosphatpuffer stammen.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 2: Erweiterte Untersuchung der Reaktionsbedingungen bei Raumtemperatur und in Phosphatpuffer.

Bedingung	Additiv (0.5 Äquiv.)	Temperatur
pH 6		
11	-	rt
12	MgCl ₂	rt
13	ZnCl ₂	rt
14*	-	rt
15#	-	rt
pH 8		
16	-	rt
17	MgCl ₂	rt
18	ZnCl ₂	rt
19*	-	rt
20#	-	rt
Phosphatpuffer pH 7		
21	-	rt
Phosphatpuffer pH 8		
22	-	rt

*: pH-Wert wurde täglich eingestellt; #: 1.0 Äquiv. des Phosphorylierungsmittels wurden eingesetzt

Durch die Erniedrigung der Reaktionstemperatur konnten die Ausbeuten für alle Reaktionsbedingungen erhöht werden. Die Produktsteigerung ist allerdings nicht unter allen Bedingungen gleich groß. So konnte z.B. die Ausbeute unter den Reaktionsbedingungen **13** und **16** im Vergleich zu ihren korrespondierenden Reaktionen bei 50 °C ungefähr verdoppelt, während die Ausbeuten bei Versuchen, die mit 1.0 Äquivalenten statt der ansonsten verwendeten 5.0 Äquivalenten Phosphorylierungsmittel nur minimal gesteigert werden konnten (**Abbildung 20**). Interessanterweise konnte für Reaktionen bei 50 °C festgestellt werden, dass die Reaktionen bei einem leicht sauren pH-Wert (pH 6), mit Ausnahme der Reaktionen, bei denen der pH-Wert täglich eingestellt wurde, immer eine höhere Ausbeute erzielten als die gleichen Reaktionen bei pH 8. Diese pH-Abhängigkeit konnte allerdings bei Reaktionen bei Raumtemperatur nicht mehr beobachtet werden. Hier hingegen war der Einfluss des pH-Werts deutlich geringer ausgeprägt und unterschied sich bei den verschiedenen verwendeten Reaktionsbedingungen (**Abbildung 20**).

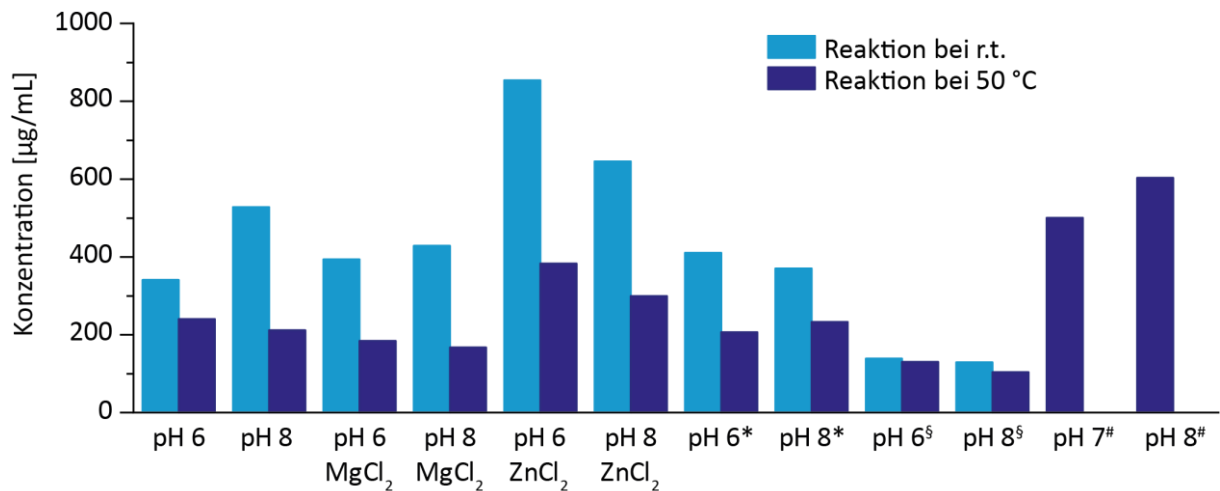


Abbildung 20: Untersuchung der Phosphorylierung von Adenosin zu 5'AMP mittels Imidazolidin-4-thionphosphat. Die Reaktionen wurden in 1.0 mL hochreinem Wasser oder Phosphatpuffer, dem entsprechenden pH-Wert und der dazugehörigen Temperatur durchgeführt. Dabei wurden 0.1 mmol Adenosin, 5.0 Äquiv. Phosphorylierungsmittel und falls verwendet 1.0 Äquiv. Imidazol und 0.5 Äquiv. Additiv eingesetzt. [*] pH-Wert wurde täglich auf den korrespondierenden pH-Wert eingestellt; [§] Reaktionen wurden mit 1.0 Äquiv. statt der ansonsten verwendeten 5.0 Äquiv. Phosphorylierungsmittel durchgeführt; [#] Reaktionen wurden in einem Phosphatpuffer mit dem korrespondierendem pH-Wert statt Wasser durchgeführt.

Durch die erfolgreiche Verwendung von Imidazolidin-4-thionphosphat unter einer Fülle von unterschiedlichen Reaktionsbedingungen konnte gezeigt werden, dass Imidazolidin-4-thionphosphat ein für präbiotische Bedingungen relevantes Phosphorylierungsmittel ist. Ähnlich wie bei den Reaktionen bei 50 °C waren DAP und DAP mit Imidazol abermals die besseren Phosphorylierungsmittel für die Synthese von 2'3'cAMP, wobei auch hier die Ausbeute mit der Verringerung der Temperatur anstieg (**Abbildung 21**).

Ergebnisse und Diskussion

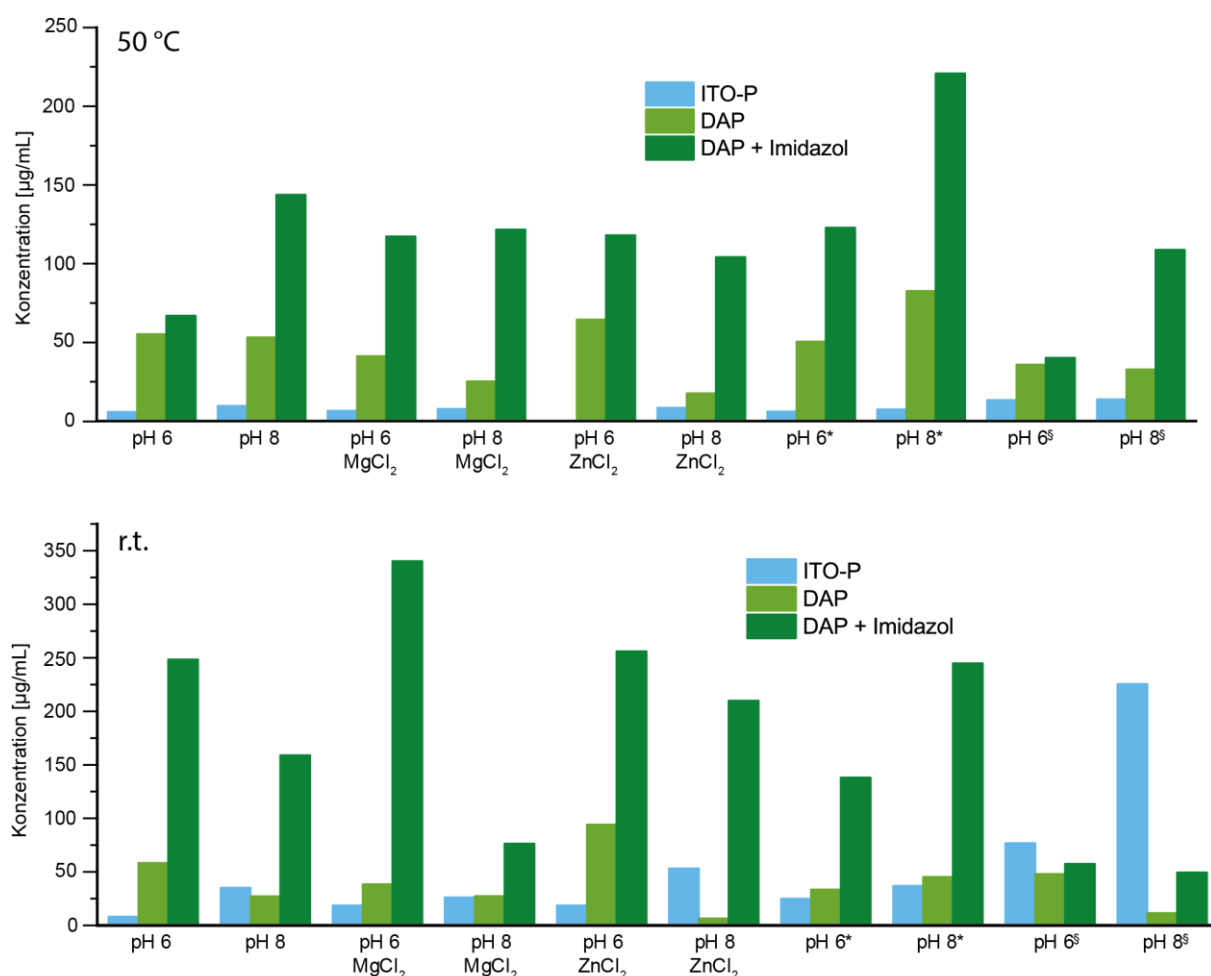


Abbildung 21: Untersuchung der Phosphorylierung von Adenosin zu 2'3'-cAMP mittels Imidazolidin-4-thionphosphat, DAP und DAP mit Imidazol. Die Reaktionen wurden in 1.0 mL hochreinem Wasser mit dem entsprechenden pH-Wert und der dazugehörigen Temperatur durchgeführt. Dabei wurden 0.1 mmol Adenosin, 5.0 Äquiv. Phosphorylierungsmittel und falls verwendet 1.0 Äquiv. Imidazol und 0.5 Äquiv. Additiv eingesetzt. [*] pH-Wert wurde täglich auf den korrespondierenden pH-Wert eingestellt; [§] Reaktionen wurden mit 1.0 Äquiv. statt der ansonsten verwendeten 5.0 Äquiv. Phosphorylierungsmittel durchgeführt.

4.1.3 Regioselektivität der Phosphorylierungsreaktionen

Die Analyse der unterschiedlichen Reaktionsbedingungen zeigte, dass auch bei Raumtemperatur kein 3'5'-cAMP entstand und dass bei allen Reaktionen, mit Ausnahme der Reaktion bei pH 8 und nur 1.0 Äquivalenten Phosphorylierungsmittel, deutlich mehr 5'AMP als das zyklische 2'3'-cAMP entstand (**Abbildung 22**). Es konnte nicht nur eine hohe Selektivität zwischen 5'AMP und den zyklischen AMPs demonstriert werden, sondern es konnten keine cAMPs mittels Orbital MS oder UHPLC-QTOF MS nachgewiesen werden, wenn die Reaktionen in Phosphatpuffer statt hochreinem Wasser durchgeführt wurden. Unter diesen

Bedingungen konnte dementsprechend eine 100 %ige Regioselektivität zwischen zyklischen und azyklischen Adenosinmonophosphaten erzielt werden.

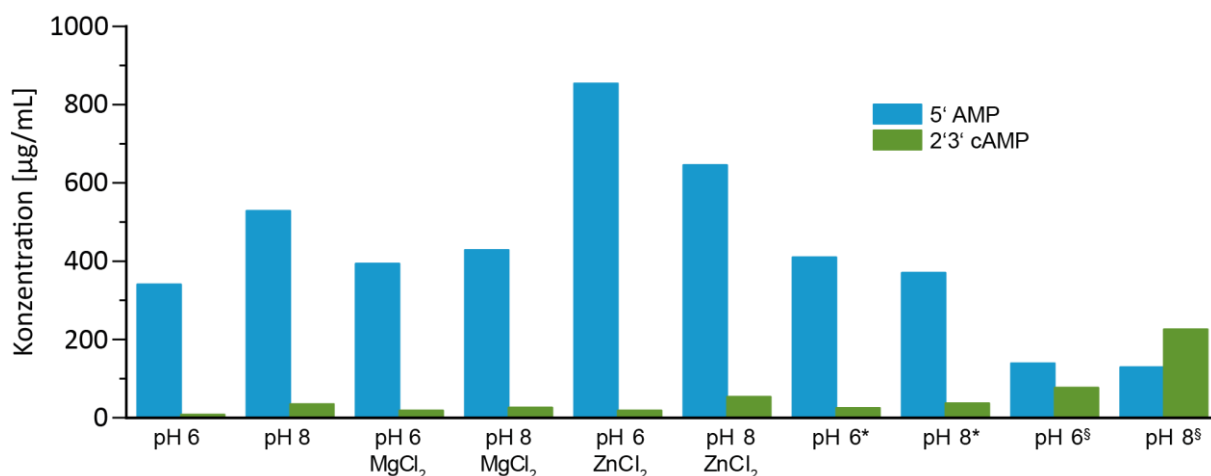


Abbildung 22: Ausbeutenverteilung von 2'3'cAMP und 5'AMP bei der Phosphorylierung von Adenosin unter den getesteten Reaktionsbedingungen mit Imidazolidin-4-thionphosphat bei Raumtemperatur. Die Reaktionen wurden in 1.0 mL hochreinem Wasser mit dem entsprechenden pH-Wert und der dazugehörigen Temperatur durchgeführt. Dabei wurden 0.1 mmol Adenosin, 5.0 Äquiv. Imidazolidin-4-thionphosphat und 0.5 Äquiv. Additiv eingesetzt. [§] Reaktionen wurden mit 1.0 Äquiv. statt der ansonsten verwendeten 5.0 Äquiv. Phosphorylierungsmittel durchgeführt.

Um nicht nur die Selektivität zwischen dem azyklischen 5'AMP und dem zyklischen 2'3'cAMP zu vergleichen, wurden auch die Regioselektivitäten der vier besten Phosphorylierungsbedingungen bezüglich der 5'AMP Ausbeute verglichen. Der Vergleich zeigt, dass nicht nur eine sehr hohe Regioselektivität zwischen den zyklischen und azyklischen Adenosinmonophosphaten existiert, sondern eine allgemein hohe Regioselektivität für 5'AMP erzielt werden konnte (**Abbildung 23**).

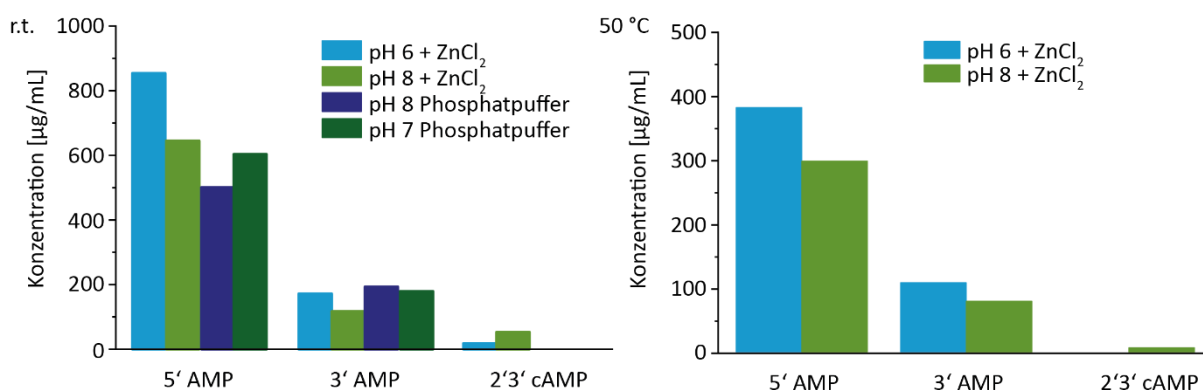


Abbildung 23: Ausbeutenverteilung zwischen 5'AMP, 3'AMP und 2'3'cAMP für ausgewählte Phosphorylierungsbedingungen. Eine Selektivität bezüglich 5'AMP konnte für alle Bedingungen mittel UHPLC-QTOF MS beobachtet werden. Es konnte kein cAMP detektiert werden, wenn Phosphatpuffer statt hochreinem Wasser verwendet wurde.

4.1.4 Phosphorylierung der kanonischen Nucleoside

Die vier besten Phosphorylierungsbedingungen bezüglich der 5'AMP Ausbeute und der Selektivität zwischen zyklischen und azyklischen Adenosinmonophosphaten wurden anschließend auf die verbleibenden sieben kanonischen RNA- und DNA-Nucleoside angewendet. Auch hier konnte Imidazolidin-4-thionphosphat, wie erhofft, als erfolgreiches Phosphorylierungsmittel eingesetzt werden. Während auch hier in Phosphatpuffer keine cNMPs detektiert werden konnten, wurden für die weiteren Nucleoside ähnliche Ausbeuten wie für Adenosin (2.46 $\mu\text{mol/mL}$) erzielt. Die einzigen Ausnahmen sind Uridin in Phosphatpuffer bei pH 8 mit einer mehr als doppelt so hohen Ausbeute mit 7.04 $\mu\text{mol/mL}$ und deoxyAdenosin und deoxyGuanosin, bei denen nur eine Ausbeute von deutlich unter 1 % erzielt werden konnte. Unerwarteterweise konnten für die deoxyNucleotide mit Ausnahme von deoxyThymidin auch keine 3'dNMPs gefunden werden, das noch einmal die hohe Regioselektivität bezüglich der 5'-Hydroxygruppe in Nucleosiden unterstreicht.

Tabelle 3: Phosphorylierung der RNA- und DNA-Nucleosiden in hochreinem Wasser und Phosphatpuffer mit Imidazolidin-4-thionphosphat.

Nucleosid	Methode	5'NMP Ausbeute [$\mu\text{mol/mL}$]	cNMP gefunden
Adenosin	A	2.46	Ja
Adenosin	C	1.74	Nein
Guanosin	B	1.61	Ja
Guanosin	C	2.93	Nein
Cytidin	B	2.79	Ja
Cytidin	C	2.17	Nein
Uridin	A	3.10	Ja
Uridin	D	7.04	Nein
deoxyAdenosin	B	0.10	Ja ^[a]
deoxyAdenosin	D	0.05	Ja ^[a]
deoxyGuanosin	B	0.51	Nein
deoxyGuanosin	C	0.37	Nein

deoxyCytidin	A	4.19	Nein
deoxyCytidin	C	4.78	Nein
deoxyThymidin	B	2.79	Nein
deoxyThymidin	D	2.95	Nein

Methode A: 1 mL hochreines Wasser, 0.05 mmol ZnCl_2 , 0.1 mmol Nukleosid und 0.5 mmol Imidazolidin-4-thionphosphat wurden bei pH 6 für 7 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Methode B: 1 mL hochreines Wasser, 0.05 mmol ZnCl_2 , 0.1 mmol Nukleosid und 0.5 mmol Imidazolidin-4-thionphosphat wurden bei pH 8 für 7 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Methode C: 1 mL Phosphatpuffer pH 7, 0.1 mmol Nukleosid und 0.5 mmol Imidazolidin-4-thionphosphat wurden für 7 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Methode D: 1 mL Phosphatpuffer pH 8, 0.1 mmol Nukleosid und 0.5 mmol Imidazolidin-4-thionphosphat wurden für 7 Tage bei Raumtemperatur gerührt.

4.2 Nikotinamidadenindinukleotid (NAD^+) Synthese

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde ein kompletter und direkter präbiotisch plausibler Reaktionsweg zu dem Koenzym NAD^+/NADH unter einheitlichen Reaktionsbedingungen erforscht. Obwohl das redoxaktive Koenzym NAD^+ eine essenzielle Rolle im heutigen Metabolismus spielt und angesichts seiner Nukleotideinheit beinhaltenden Struktur als ein Relikt der RNA-Welt angesehen wird, wurde noch kein kompletter Reaktionspfad unter einheitlichen Bedingungen für NAD^+/NADH demonstriert.^[183-184]

Aus retrosynthetischer Sicht (**Abbildung 24**) kann NAD^+ (**3**) in eine Adenosinmonophosphat- und eine Nikotinamidmononukleotid (NMN) (**4**) - Einheit geteilt werden. Da die Synthese von Adenosin schon auf unterschiedlichen Wegen demonstriert und eine milde Phosphorylierungsmethode im vorherigen Abschnitt dargestellt wurde (siehe **2.2.3 Nukleoside**), wird auf die Synthese von Adenosinmonophosphat nicht weiter eingegangen.

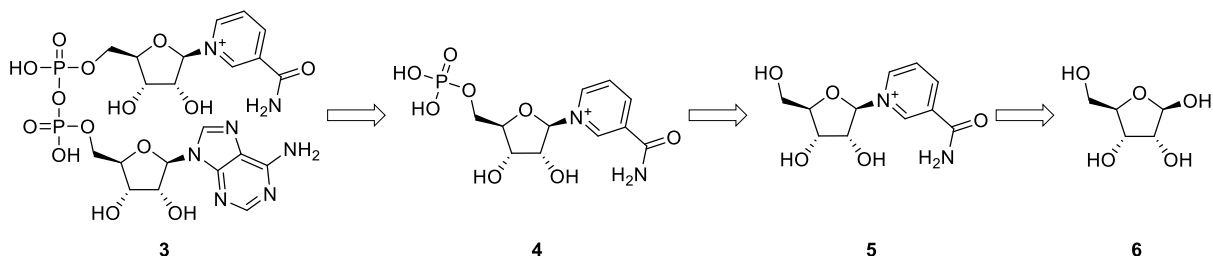


Abbildung 24: Retrosynthetische Analyse von Nikotinamidadenindinukleotid (**3**).

In einem vorherigen Schritt kann NMN (**4**) aus Nikotinamidribosid (**5**) und Phosphat hergestellt werden. Hier ist vor allem darauf zu achten, dass möglichst milde Reaktionsbedingungen eingesetzt werden, damit die instabile glykosidische Bindung zwischen Nikotinamid und Ribose (**6**) nicht zerstört wird. In einem letzten Schritt muss das Ausgangsmaterial, Nikotinamidribosid (**5**) synthetisiert werden. Aufgrund der positiven Ladung am Stickstoffatom des Pyridinrings ist vor allem die Ausbildung der glykosidischen Bindung als Schwierigkeit anzusehen.

4.2.1 Nikotinamidribosid

Einen präbiotisch plausiblen Reaktionspfad für die Synthese von Nikotinamid zeigten ORGEL und SANCHEZ, als sie das durch elektrische Entladungen in Anwesenheit von Methan, Wasser und Stickstoff entstehende Propionaldehyd mit Cyanoacetaldehyd umsetzten. In einem ersten Zwischenschritt entsteht dabei 2-Cyanoglutaconicdialdehyd, das durch einen Ringschluss zu Nikotinonitril reagiert und anschließend durch Hydrolyse in Nikotinamid umgewandelt werden kann.^[185] ORGEL und SANCHEZ beobachteten außerdem durch die Zugabe von Ribose zu ammoniakalischen Lösungen von Cyanoacetaldehyd (**7**) und Propionaldehyd (**8**) die Entstehung eines positiv geladenen Addukts, von dem ausgegangen wurde, dass es sich um Nikotinonitrilribosid handelt, es allerdings nicht nachgewiesen werden konnte (**Abbildung 25**). Durch einen anschließenden Hydrolyseschritt kann das Nikotinonitrilribosid (**5**) in Nikotinamidribosid umgewandelt werden.

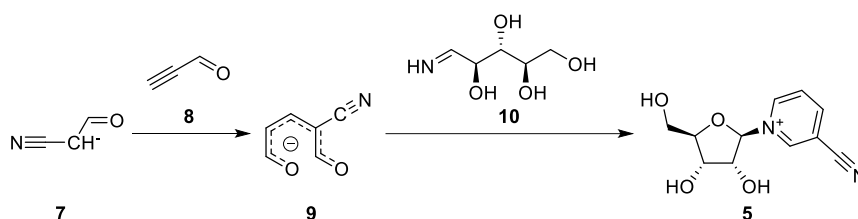


Abbildung 25: Postulierte Synthese von Nikotinonitrilribosid ausgehend von Propionaldehyd und Cyanoacetaldehyd nach ORGEL und SANCHEZ.^[185]

Eine Synthese von nicht nur Nikotinamidribosid sondern eines Nikotinamidmononukleotids gelang BENNER durch die Umsetzung von Ribose-1,2-cyclophosphat mit Nikotinamid ähnlich zu seiner Syntheseroute der Purin-Nukleoside (siehe **2.2.3 Nukleoside**).^[95, 183] Durch die

Blockierung der Ribose α -Position konnten so das Nikotinamidmononukleotid stereoselektiv hergestellt werden. Allerdings wurde auf diesem Weg nicht das für die weitere Synthese benötigte 5'-phosphorylierte, sondern das 2'-phosphorylierte Nikotinamidribosid synthetisiert (**Abbildung 26**).

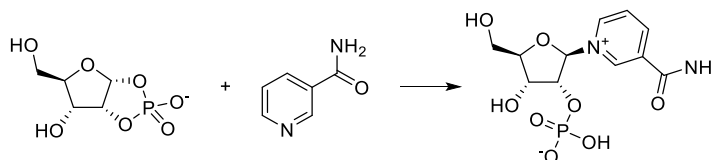


Abbildung 26: Synthese des Nikotinamidmononukleotids nach BENNER.^[183]

Um die von ORGEL und SANCHEZ vorgeschlagene Syntheseroute zu Nikotinonitrilribosid zu überprüfen, wurde in einem Reaktionskolben Ribose vorgelegt und anschließend 0.5 mL einer 0.1 M Cyanoacetaldehyd-Lösung, 0.5 mL einer 0.1 M Propionaldehyd-Lösung und 0.5 mL einer 1.0 M wässrigen ammoniakalischen Lösung zugegeben, der pH auf 8.5 eingestellt und die Reaktion für 21 d bei 60 °C gerührt. Qualitative Analyse der Reaktionsmischung mittels UHPLC-QTOF MS ergab, dass kein Nikotinonitrilribosid und auch kein Nikotinamidribosid hergestellt werden konnte.

In einem zweiten Experiment wurden zuerst in einem Reaktionskolben Ribose vorgelegt und anschließend 0.5 mL einer 1.0 M wässrigen ammoniakalischen Lösung zugegeben und für 3 h bei 60 °C gerührt. In einem weiteren Reaktionsgefäß wurden 0.5 mL einer 0.1 M Cyanoacetaldehyd-Lösung und 0.5 mL einer 0.1 M Propionaldehyd-Lösung vermengt und für 3 h bei 60 °C gerührt. Nach den jeweiligen 3 h Reaktionszeit wurden die Reaktionsgemische vermengt und für insgesamt 21 d bei 60 °C gerührt. Analyse der Reaktionslösung mittels UHPLC-QTOF MS zeigte zwei Signale für die Masse von Nikotinamidribosid (Massenfilter von m/z 255.0924 – 255.1026). Durch Koinjektion der Reaktionslösung mit einer authentischen Nikotinamidribosid Probe konnte kein weiterer Peak, sondern eine Intensitätssteigerung des ersten Peaks beobachtet werden, wodurch die erfolgreiche Synthese des β -Nikotinamids nach ORGEL und SANCHEZ bewiesen werden konnte (**Abbildung 27**).

Wie aus den zwei unterschiedlichen Experimenten ersichtlich wurde, ist die richtige Reihenfolge der Zugabe der einzelnen Edukte essenziell. In einem ersten Schritt muss das Ribosylamin (**10**) gebildet werden, das in einem zweiten Schritt mit dem zuvor gebildeten 2-Cyanoglutaconicdialdehyd (**9**) reagieren und in einem anschließenden Hydrolyseschritt zu Nikotinamidribosid umgewandelt werden kann. Falls die ammoniakalische Lösung zuvor schon mit den unterschiedlichen Aldehyd-Lösungen vermengt wird, kann hier zuvor schon der

Ergebnisse und Diskussion

Ammoniak mit den Aldehyden zu Iminen abreagieren, wodurch anschließend kein Ribosylamin mehr gebildet werden kann.

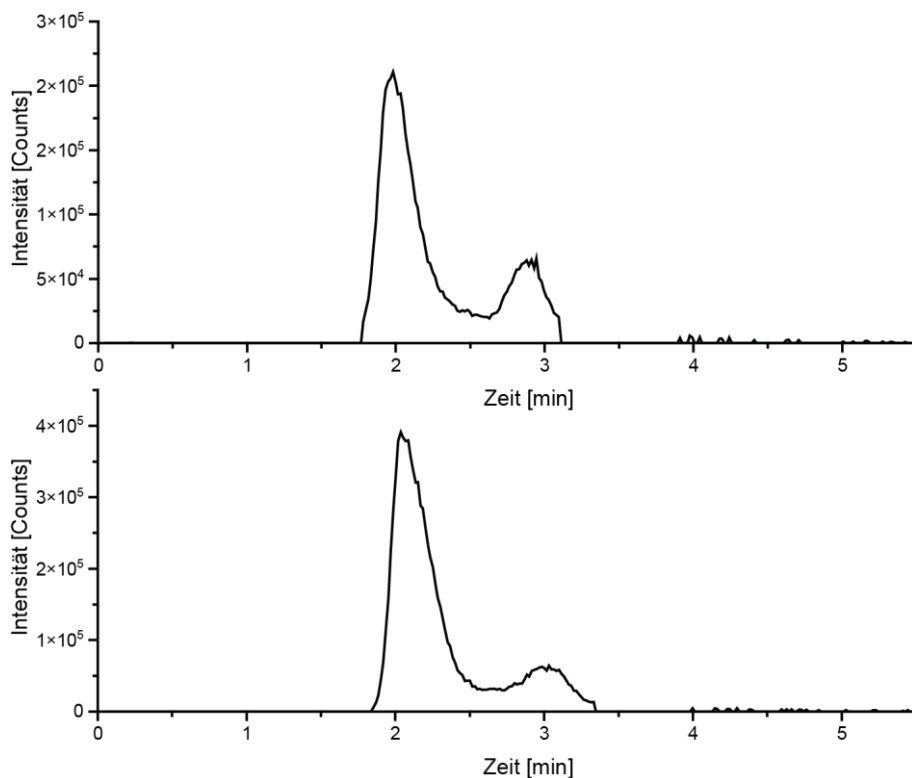


Abbildung 27: Herstellung von Nikotinamidribosid ausgehend von Ribose. Extrahiertes Ionen Chromatogramm (EIC) der Herstellung von Nikotinamidribosid aus Ribose, Propionaldehyd, Ammoniak und Cyanoacetaldehyd, mittels UHPLC-QTOF MS (Massenfilter m/z 255.0924 – 255.1026) analysiert. Oberes Chromatogramm zeigt das Reaktionsgemisch nach 21 h bei 60 °C. Unteres Chromatogramm zeigt das Reaktionsgemisch nach 21 d bei 60 °C konjiziert mit einer authentischen Nikotinamidribosidprobe.

Ribose ist dank der Formose-Reaktion (siehe **2.2.2 Zucker**) eine präbiotisch plausible Verbindung, allerdings entstehen bei der Formose Reaktion eine Vielzahl unterschiedlicher Produkte. Aus diesem Grund wurde eine weitere Nikotinamidribosid-Synthese angestrebt. Eine vielversprechende Syntheseroute basiert auf der DNA-Nukleosid Synthese nach TRAPP.

TRAPP konnte eine Synthese der DNA-Nukleoside ausgehend der Nucleobasen, Acetaldehyd und Glycerinaldehyd präsentieren (**Abbildung 28**).^[102]

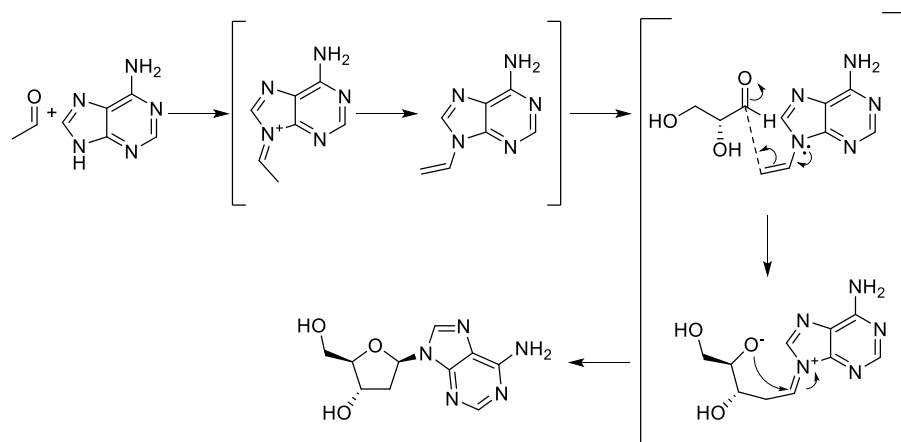


Abbildung 28: Synthese von DNA-Nucleosiden nach TRAPP.^[102]

Zur Einführung der zusätzlichen Hydroxygruppe in den RNA-Nucleosiden im Vergleich zu den DNA-Nucleosiden, muss Glykolaldehyd statt Acetaldehyd verwendet werden (**Abbildung 29**). Daraufhin wurde Nikotinamid (**12**) unter den publizierten Bedingungen von TRAPP mit Glykolaldehyd (**13**) und Glycerinaldehyd (**14**) in 1.0 mL Methanol und 50 °C für 4 d gerührt. Obwohl die molekulare Masse von Nikotinamidribosid (**5**) mittels Orbitrap MS detektiert werden konnte, zeigte die Koinjektion mit einer authentischen Nikotinamidribosidprobe, dass kein Nikotinamidribosid (**5**) gebildet wurde. Dies ist bei der näheren Betrachtung des Mechanismus wenig überraschend, da in einem ersten Reaktionsschritt das Glykolaldehyd in einer Kondensationsreaktion mit Nikotinamid erst zu einem Imin und anschließend durch Tautomerie zu der korrespondierenden Vinylspezies reagieren müsste. Allerdings müsste hierfür das aromatische System des Nikotinamids aufgehoben werden, da ansonsten ein 5-bindiger Stickstoff entstehen würde. Dieser thermodynamisch sehr unvorteilhafte Schritt zur Aufhebung des aromatischen Systems ist der wahrscheinlichste Grund, weshalb ausgehend von Nikotinamid, Glykolaldehyd und Glycerinaldehyd kein Nikotinamidribosid gebildet werden kann. Des Weiteren wäre die potenzielle Weiterreaktion der aus Glykolaldehyd gebildeten Vinylspezies deutlich gehemmter als die aus Acetaldehyd gebildeten Vinylspezies, da aufgrund der Keto-Enol Tautomerie die zusätzliche Hydroxygruppe in ein Aldehyd umgeformt werden kann.

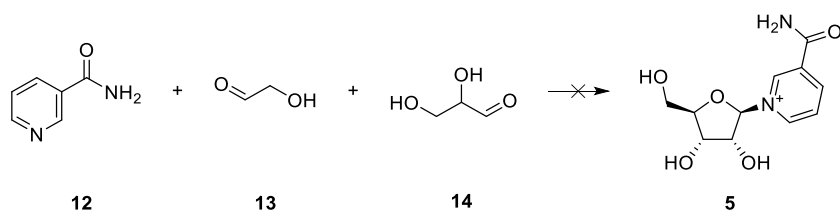


Abbildung 29: Vorgeschlagener Syntheseweg für Nikotinamidribosid ausgehend von Nikotinamid, Glykolaldehyd und Glycerinaldehyd.

Um die notwendige Auflösung des aromatischen Systems des Nikotinamids zu umgehen wurde die Synthese des Nikotinamidribosids nicht bei Nikotinamid begonnen, sondern wie bei ORGELS und SANCHEZ' Synthese für Nikotinonitril bei Cyanoacetaldehyd (**7**) und Propionaldehyd (**8**) in einer ammoniakalischen Lösung.^[185] Durch diesen zusätzlichen Schritt ist das aromatische System ursprünglich noch nicht vorhanden, sondern wird erst bei der Synthese des Nikotinamids gebildet.

Auch bei der Synthese des Nikotinamidribosids, ausgehend von Glykolaldehyd (**13**) und Glycerinaldehyd (**14**), ist es wichtig, die Reaktanden in der richtigen Reihenfolge zusammenzugeben. Wenn alle Reaktanden direkt zusammengegeben wurden, konnte kein Nikotinamidribosid beobachtet werden. Dies liegt höchst wahrscheinlich an den miteinander konkurrierenden Reaktionen zwischen der Ausbildung des Nikotinonitrils aus Ammoniak und 2-Cyanooglutaconicdialdehyd (**9**) und der für die Synthese von Ribosylamin notwendigen Iminbildung aus Glykolaldehyd und Ammoniak (**Abbildung 30**).

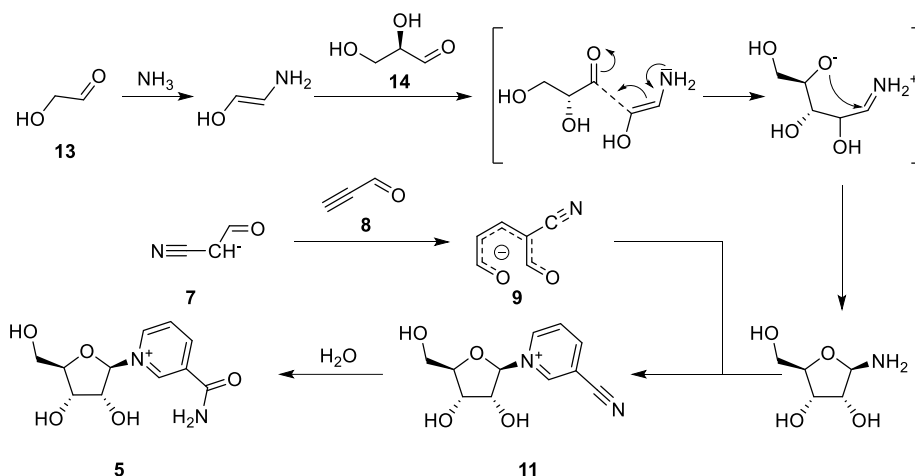


Abbildung 30: Postulierter Mechanismus für die Entstehung von Nikotinamidribosid ausgehend von Propionaldehyd, Cyanoacetaldehyd, Glykolaldehyd, Ammoniak und Glycerinaldehyd.

Werden stattdessen die Lösungen der Reaktanden vorher gemischt, für 3 h bei 60 °C gerührt, anschließend vereint und zusammen für 21 d bei 60 °C gerührt, so konnte durch HR Orbitrap

MS die gewünschte Produktmasse gefunden und anschließend durch Koinjektion mit einer authentischen Nikotinamidribosidprobe die Entstehung von Nikotinamidribosid (**5**) bewiesen werden (**Abbildung 31**). Hierbei macht es keinen Unterschied, ob zuerst die Glykol- und Glycerinaldehyd-Lösungen mit der ammoniakalischen Lösung vermischt und für 3 h bei 60 °C gerührt werden, oder ob die Glykolaldehyd-Lösung allein mit einer ammoniakalischen Lösung für 3 h bei 60 °C gerührt wurde und die Glycerinaldehyd-Lösung erst bei der Vermischung mit der zuvor für 3 h bei 60 °C gerührten Cyanoacetaldehyd- und Propionaldehyd-Lösung zugegeben wird.

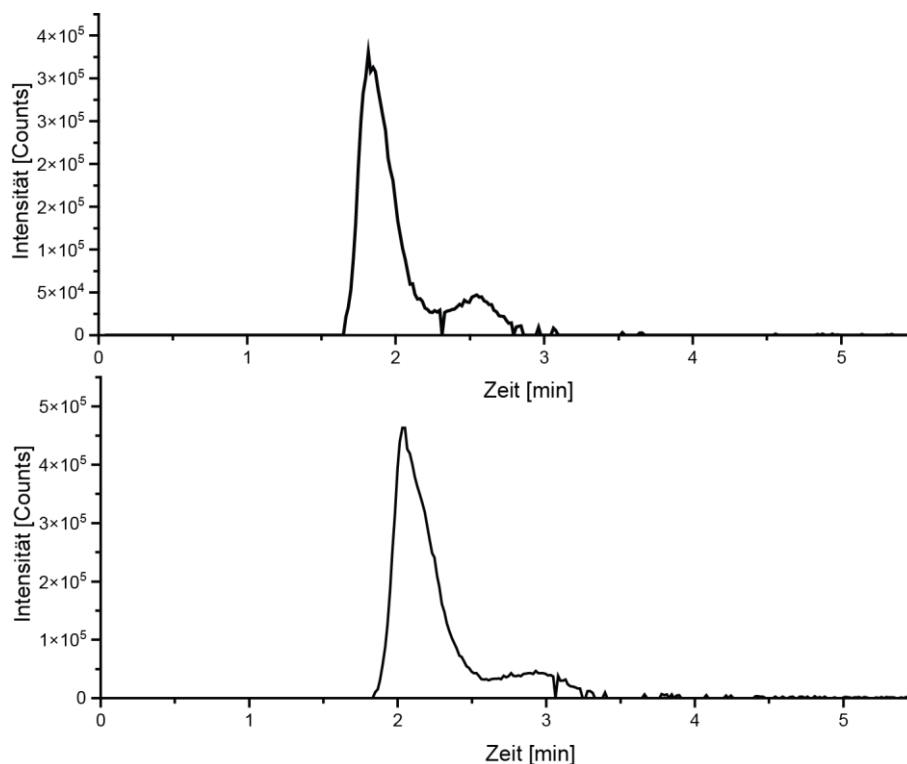


Abbildung 31: Herstellung von Nikotinamidribosid ausgehend von Glykolaldehyd und Glycerinaldehyd. Extrahiertes Ionen Chromatogramm (EIC) der Herstellung von Nikotinamidribosid aus Glykolaldehyd, Glycerinaldehyd, Propionaldehyd, Ammoniak und Cyanoacetaldehyd, mittels UHPLC-QTOF MS (Massenfilter m/z 255.0924 – 255.1026) analysiert. Oberes Chromatogramm zeigt das Reaktionsgemisch nach 21 h bei 60 °C. Unteres Chromatogramm zeigt das Reaktionsgemisch nach 21 d bei 60 °C konjiziert mit einer authentischen Nikotinamidribosidprobe.

4.2.2 Nikotinamidmononukleotid (NMN)

Im zweiten Schritt der NAD^+ Synthese muss Nikotinamidribosid zu Nikotinamidmononukleotid (**4**) phosphoryliert werden. Wie im Abschnitt 2.2.4 Phosphorylierungen/Nukleotide bereits beschrieben, wurden über die Jahre einige präbiotische Phosphorylierungsmethoden erforscht. Aufgrund der hierfür häufig benötigten harschen Reaktionsbedingungen sind diese nicht mit der Nikotinamidribosidsynthese in Einklang zu bringen. Des Weiteren wird in den meisten Phosphorylierungsreaktionen die 5' Hydroxygruppe nicht regioselektiv phosphoryliert und es entstehen eine Reihe von unterschiedlichen Nikotinamidribosidmonophosphaten. Um eine regioselektive Phosphorylierung der 5' Hydroxygruppe unter milden einheitlichen Reaktionsbedingungen zu ermöglichen, wurde das in Abschnitt 4.1 Imidazolidin-4-thione als Phosphorylierungsmittel untersuchte Phosphorylierungsmittel Imidazolidin-4-thionphosphat (**2f**) verwendet. Die Verwendung von **2f** erlaubt neben einer Phosphorylierung im wässrigen Medium und milden Bedingungen, wodurch die instabile glykosidische Bindung nicht Gefahr läuft gebrochen zu werden, eine regioselektive Phosphorylierung, womit anschließende Transphosphorylierungsschritte nicht benötigt werden.

Zur Phosphorylierung von Nikotinamidribosid (**Abbildung 32**) wurden die fünf Phosphorylierungsmethoden angewendet, die für die Phosphorylierung von Adenosin zu 5'AMP bezüglich Selektivität und Ausbeute die besten Ergebnisse erzielen konnten (siehe **Tabelle 4**).

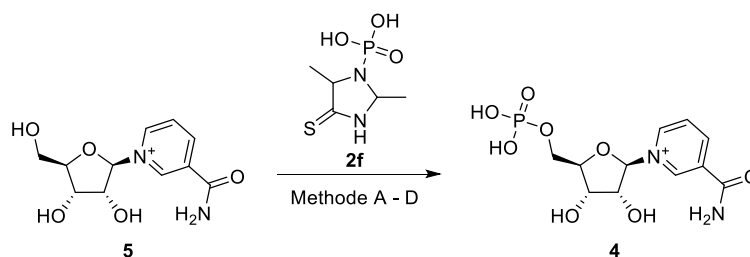


Abbildung 32: Phosphorylierung von Nikotinamidribosid (**5**) mit Imidazolidin-4-thionphosphat (**2f**) zu Nikotinamidmononukleotid (**4**).

Mittels qualitativer UHPLC-QTOF MS Analyse und Koinjektion mit einer authentischen Nikotinamidmononukleotid-Probe konnte die erfolgreiche Synthese von **4** gezeigt werden. Quantitative Analysen zeigten, dass die Ausbeuten mit bis zu 2 % für NMN unter neutralen bzw. leicht sauren Reaktionsbedingungen höher als unter leicht basischen Bedingungen waren (**Tabelle 4**).

Tabelle 4: Für die Phosphorylierung von Nikotinamidribosid verwendeten Phosphorylierungsbedingungen.

Methode	Lösungsmittel	Additiv	pH	Temperatur	Ausbeute [μmol/mL]
A	Hochreines Wasser	0.05 mmol ZnCl ₂	6	rt	1.4
B	Hochreines Wasser	0.05 mmol ZnCl ₂	8	rt	0.8
C	Phosphatpuffer	-	7	rt	1.6
D	Phosphatpuffer	-	8	rt	0.4

0.1 mmol Nikotinamidribosid, 0.5 mmol **2f**, 1.0 mL Lösungsmittel und eine Reaktionszeit von 7 d wurde für alle Methoden verwendet.

Nicht nur die Synthese von NMN konnte demonstriert werden (**Abbildung 33**), sondern erneut eine sehr hohe Regioselektivität bezüglich der 5'-Hydroxygruppe gezeigt werden, da auch keine zyklischen Nikotinamidribosidmonophosphate detektiert werden konnte.

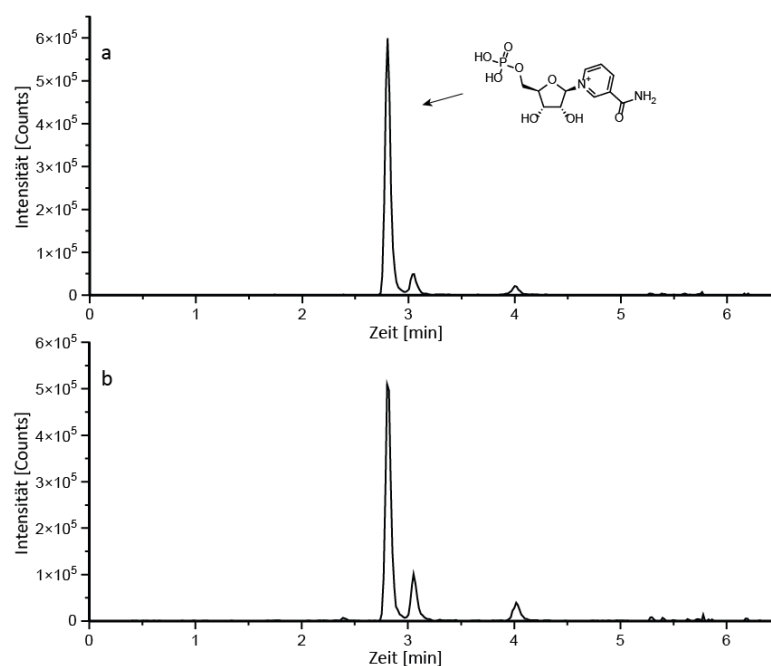


Abbildung 33: Qualitative Analyse der Entstehung von Nikotinamidmononucleotid. Herstellung von NMN ausgehend von Nikotinamidribosid mit Imidazolidin-4-thionphosphat in Phosphatpuffer pH 7, analysiert mittels UHPLC-QTOF MS (Massenfilter m/z 335.06.5 – 335.0673). a) Koinjektion der Probe mit einer authentischen NMN Probe. b) Reaktionsprobe nach einer Reaktionszeit von 7 Tagen bei Raumtemperatur.

4.2.3 Nikotinamidadenindinukleotid (NAD⁺)

Im letzten Schritt zur kompletten NAD⁺-Synthese unter einheitlichen Reaktionsbedingungen muss die Pyrophosphatbindung zwischen NMN und 5'AMP geknüpft werden. Obwohl mittlerweile einige Aktivierungsmittel für Nukleotide in nicht-enzymatischen Templat-basierten RNA-Ligationen existieren,^[149-150, 152, 156, 159] sollte ein neues Aktivierungsmittel etabliert werden. Viele der bisherigen Imidazol-Aktivatoren zeigen eine hohe Reaktivität und damit gute Ausbildungsraten von Pyrophosphaten, allerdings zersetzen diese sich durch ihre hohe Reaktivität auch schnell unter wässrigen Bedingungen.^[159] Aufgrund der raschen Zersetzung sind mit Imidazol aktivierte Nukleotide in einem präbiotischen Kontext nur in ihrer unmittelbaren Entstehungsnähe auch als Aktivierungsmittel einsetzbar. Aus diesem Grund sollte ein sich unter wässrigen Bedingungen langsamer zersetzendes Aktivierungsmittel erforscht werden. Da die Phosphorylierung von Nukleosiden unter wässrigen Bedingungen mit Imidazolidin-4-thionphosphat möglich war, waren Imidazolidin-4-thione hierfür eine aussichtsreiche Verbindungsklasse.

In einem ersten Schritt musste hierfür eine Syntheseroute zu Nukleosid-5'-phosphorimidazolidin-4-thionen (**19**) gefunden werden. Da es unter präbiotischen Bedingungen häufig schwierig ist, die synthetisierten Produkte in hohen Ausbeuten herzustellen und diese zu isolieren, sollte neben der präbiotischen Herstellungsrouten auch eine Synthese unter Laborbedingungen erforscht werden. Die Synthese von Adenosin-5'-phosphorimidazolidin-4-thion unter Laborbedingungen konnte analog zu einer Adenosin-5'-phosphorimidazol Synthese ausgehend von 5'AMP (**15**), 2,5-Dimethylimidazolidin-4-thion (**1f**), Triphenylphosphin (**16**), 2,2'-Dipyridyldisulfid (**17**) und Triethylamin (**18**) in DMSO und DMF realisiert werden (**Abbildung 34**).^[186] Durch das anschließende Ausfällen des Produkts mit Natriumperchlorat in einer Aceton/Diethylether-Lösung konnte Adenosin-5'-phosphorimidazolidin-4-thion (**19**) in 79 % Ausbeute mit bis zu 98 %iger Reinheit erhalten werden.

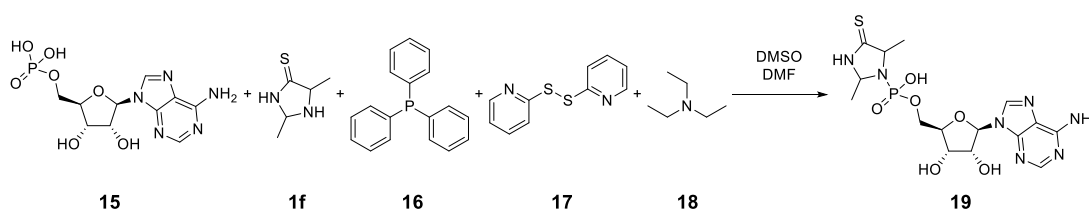


Abbildung 34: Synthese von Adenosin-5'-phosphorimidazolidin-4-thion unter Laborbedingungen.

UHPLC-Analyse des Produkts zeigte die hierbei entstehenden vier Diastereomere, die in verschiedenen Ausbeuten erzeugt werden (**Abbildung 35**). Das unterschiedliche Diastereomerenverhältnis entsteht hierbei nicht in der Synthese des aktivierten Nukleotids, sondern ist ein Resultat aus dem eingesetzten Imidazolidin-4-thion, das mit einem *cis*-Diastereomerenüberschuss hergestellt wurde. Durch anschließende Umkehrphasen Säulenchromatographie konnten die einzelnen Diastereomere, falls benötigt, voneinander getrennt und das noch vorhandene Edukt entfernt werden.

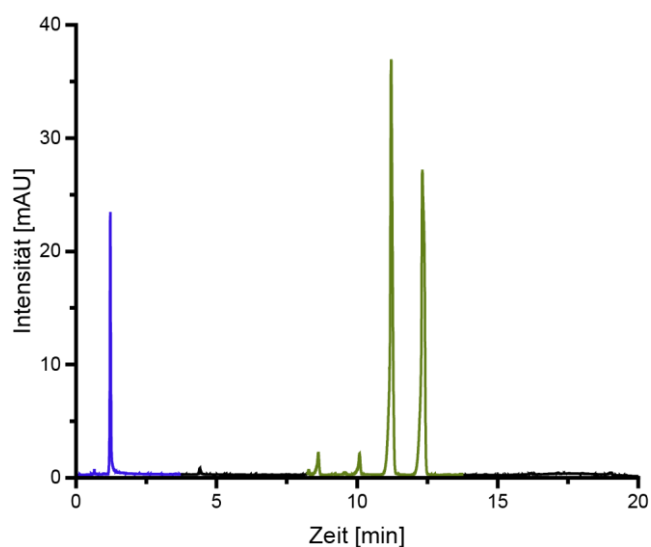


Abbildung 35: UHPLC UV-Spektrum (254 nm) des ausgefällten Adenosin-5'-phosphorimidazolidin-4-thions. Grün: Vier Diastereomere des Adenosin-5'-phosphorimidazolidin-4-thions; Blau: noch im Produkt enthaltenes Adenosin.

Die präbiotische Synthese von Adenosin-5'-phosphorimidazolidin-4-thion konnte ebenfalls analog zu einer präbiotischen Adenosin-5'-phosphorimidazol Synthese demonstriert werden. Hierbei reagieren Acetaldehyd (**20**) und Methylisocyanid (**21**) in Wasser in einem ersten Reaktionsschritt zu einem Nitriliumion, das wahrscheinlich mit 5'AMP (**15**) zu einem Imidoylphosphat reagiert, bevor durch einen nukleophilen Angriff des Imidazolidin-4-thions (**1f**) am Phosphoratom Adenosin-5'-phosphorimidazolidin-4-thion (**19**) entsteht (**Abbildung 36**).^[159]

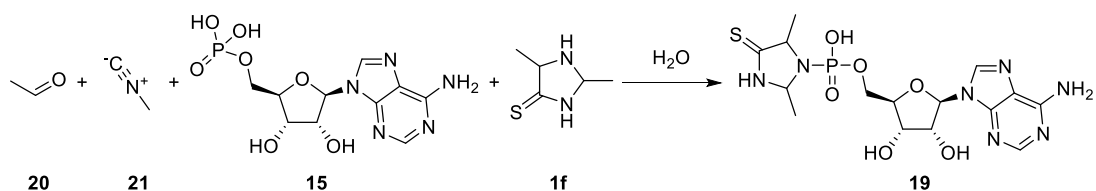


Abbildung 36: Synthese von Adenosin-5'-phosphorimidazolidin-4-thion unter präbiotischen Bedingungen.

Ergebnisse und Diskussion

Bei pH 6 konnte unter den präbiotischen Bedingungen mittels Koinjektion eine Adenosin-5'phosphorimidazolidin-4-thion Ausbeute von 16 % nach 20 Minuten mittels NMR Spektroskopie nachgewiesen werden (**Abbildung 37**).

Des Weiteren wurde die Stabilität des Adenosin-5'phosphorimidazolidin-4-thions mittels NMR Spektroskopie untersucht. Auflösung einer authentischen Adenosin-5'phosphorimidazolidin-4-thion Probe in D₂O zeigte über einen Zeitraum von über 14 Tagen wenig bis keine Zersetzung (**Abbildung 37**). Die dadurch demonstrierte hohe Stabilität und präbiotische Zugänglichkeit ermöglicht eine plausible Anwendbarkeit von Adenosin-5'imidazolidin-4-thion in einem präbiotischen Kontext unter wässrigen Bedingungen.

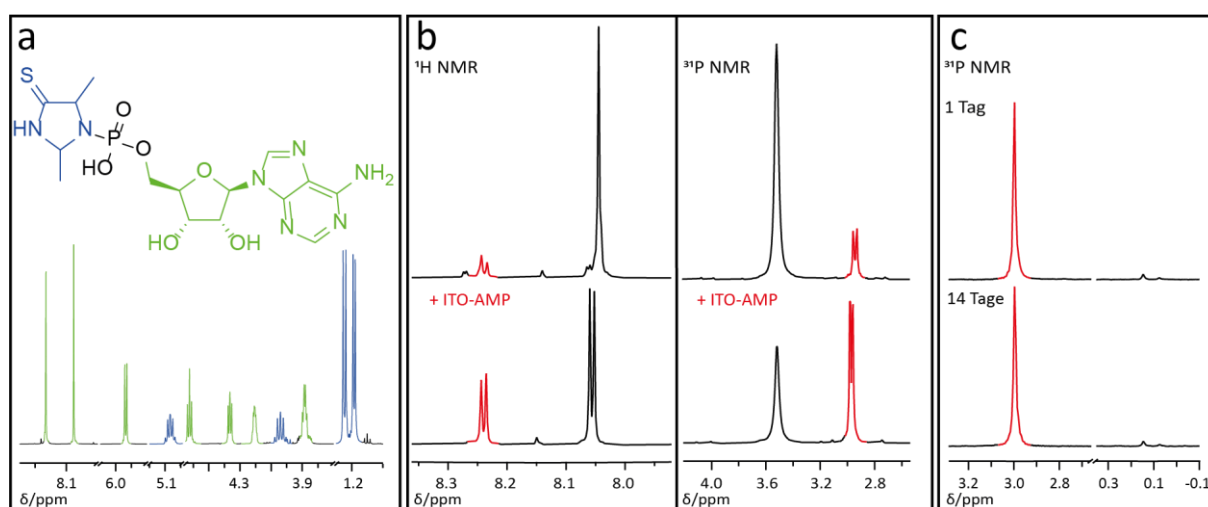


Abbildung 37: Synthese von Adenosin-5'phosphorimidazolidin-4-thion. a) NMR Spektrum von Adenosin-5'phosphorimidazolidin-4-thion, Imidazolidin-4-thion und 5'AMP Signale wurden farblich gekennzeichnet. b) Präbiotische Adenosin-5'phosphorimidazolidin-4-thion Synthese ausgehend von 5'AMP (0.05 mmol), ITO (2.0 Äquiv.), Acetaldehyde (8.0 Äquiv.) und Methylisocyanid (8.0 Äquiv.) bei pH 6 und Raumtemperatur in hochreinem Wasser (1 mL). Die oberen Spektren zeigen die Entstehung von Adenosin-5'phosphorimidazolidin-4-thion, die unteren Spektren bestätigen die Entstehung von Adenosin-5'phosphorimidazolidin-4-thion durch Koinjektion mit einer authentischen Probe. c) Das ³¹P-Spektrum zeigt die Stabilität von Adenosin-5'phosphorimidazolidin-4-thion in Wasser.

Im darauffolgenden Schritt wurde Adenosin-5'phosphorimidazolidin-4-thion als mögliches 5'NMP-Aktivierungsmittel in der Synthese zu NAD⁺ eingesetzt. Hierbei wurde Adenosin-5'phosphorimidazolidin-4-thion und Nikotinamidmononukleotid (NMN) in hochreinem Wasser gelöst, bei unterschiedlichen Bedingungen mit NMN umgesetzt und die Reaktion mittels UHPLC-QTOF MS verfolgt. Die Reaktionslösungen sollten neben dem gewünschten Pyrophosphat-Produkt des Weiteren auch auf die, durch die nukleophilen Eigenschaften der Hydroxygruppen potenziell entstehenden, 5'-3'- und 5'-2'-verbrückten Dinukleotid Nebenprodukte untersucht werden (**Abbildung 38**).

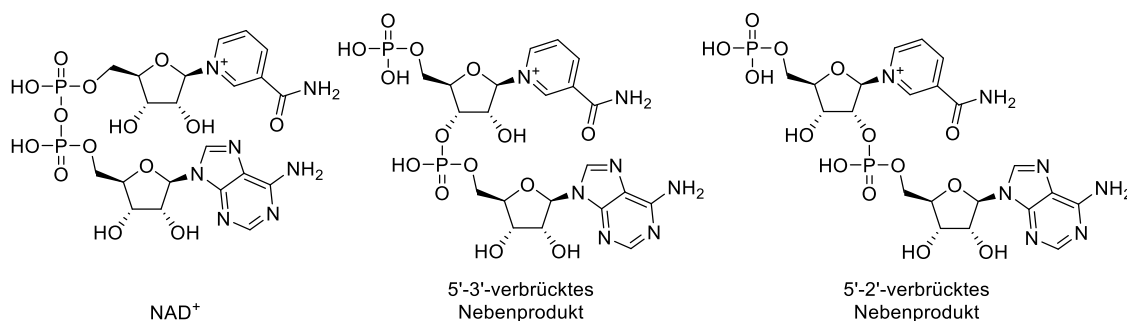


Abbildung 38: Mögliches Produkt und Nebenprodukte bei der Synthese von NAD⁺ ausgehend von aktiviertem 5'AMP und NMN.

Zu Beginn wurde Adenosin-5'-phosphorimidazolidin-4-thion (0.10 M) und Nikotinamidmononucleotid (NMN) (0.11 M) in hochreinem Wasser (1.0 mL) unter einer Argon-Atmosphäre gelöst und bei Raumtemperatur gerührt. Die Entstehung von NAD⁺ konnte mittels UHPLC-QTOF MS und einer authentischen Referenzprobe nachgewiesen werden. Die im Vergleich zu Adenosin-5'-phosphorimidazol hohe Stabilität unter wässrigen Bedingungen ist hierbei wahrscheinlich der Grund, warum die NAD⁺ Ausbeute bei Raumtemperatur nur langsam zunimmt. Um diese höhere Stabilität zu überwinden und die Ausbeute zu erhöhen, wurde die Temperatur in dem darauffolgenden Experiment erhöht. Bei einer Temperatur von 80 °C konnte bei der ersten Messung nach ca. 3 h eine deutlich höhere Ausbeute von NAD⁺ als noch bei Raumtemperatur detektiert werden. Durch die Erhöhung der Temperatur wurde allerdings nicht nur die NAD⁺ Ausbeute gesteigert, sondern auch die Zersetzung der Edukte und Produkte beschleunigt. Aus diesem Grund war die NAD⁺ Ausbeute nach ca. 7 h schon wieder deutlich verringert und nach weiteren 13 h konnte kein NAD⁺ mehr detektiert werden. Zwei der wahrscheinlichsten Gründe für die Zersetzung sind die Spaltung der Pyrophosphatbindung und die Zersetzung der glykosidischen Bindung des Nikotinamidribosids (**Abbildung 39**).

Aufgrund der raschen Zersetzung wurde die nächste Reaktion bei 50 °C durchgeführt, mit dem Ziel, sowohl eine schnellere Reaktion im Vergleich zu der Reaktion bei Raumtemperatur stattfinden zu lassen, als auch eine verlangsamte Produkt- und die Eduktzersetzung zu erzielen und nicht wie bei 80 °C nach kurzer Zeit eine komplette Zersetzung der Produkte herbeizuführen. Durch die Verringerung der Temperatur im Vergleich zu der Reaktion bei 80 °C ist die NAD⁺ Bildungsgeschwindigkeit deutlich geringer, allerdings deutlich schneller als bei Raumtemperatur. Im Gegensatz zu der Reaktion bei 80 °C stieg hier hingegen die NAD⁺ Ausbeute kontinuierlich an und nahm erst nach ca. 65 h wieder ab, wodurch ein guter Mittelweg zwischen einer erhöhten Reaktionsgeschwindigkeit und der Stabilität der Edukte und Produkte gefunden werden konnte.

Neben einer erhöhten Temperatur dienen vor allem die elektromagnetischen Strahlungen der Sonne als wichtige Energiequellen für Reaktionen auf der präbiotischen Erde, weshalb die Reaktionslösungen der darauffolgenden Reaktionen mit UV-Licht bestrahlt wurden. Die erste verwendete Lichtquelle war eine energiereiche Quecksilberlampe (Hg-Lampe) mit mehreren Emissionsbanden, sowohl im UV- als auch im Bereich sichtbaren Lichts. Durch die Bestrahlung der Probe konnte eine schnellere Bildung des gewünschten NAD⁺ Produkts erreicht werden, die zwischen der Produktbildungsgeschwindigkeit von 50 °C und 80 °C liegt. Während die NAD⁺ Ausbeute der Reaktion bei Raumtemperatur und 50 °C noch stetig anstiegen, ist bei der Reaktion mit Hg-Lampen Bestrahlung nach ca. 22 h allerdings erneut sichtbar, dass sich die Produkte und auch die Edukte durch eine erhöhte Energiezufuhr zersetzen und die Ausbeuten sinken.

HPLC-Analysen von Imidazolidin-4-thionen zeigten, dass diese Verbindungsklasse ein charakteristisches Absorptionsmaximum bei 270 nm besitzt, das auf die Kohlenstoff-Schwefel Doppelbindung zurückzuführen ist.^[187] Aufgrund dieses Maximums wurde die Reaktionslösung in einer zweiten Reaktion mit einer 278 nm LED-Lampe statt der Hg-Lampe bestrahlt. Ähnlich wie zu der Hg-Lampe konnte auch mit der 278 nm LED eine beschleunigte NAD⁺ Bildung beobachtet werden, wobei diese bei der LED-Lampe geringer ausfiel. Aufgrund der geringeren Strahlungsleistung der LED im Vergleich zu der Hg-Lampe ist zwar die Bildungsrate geringer, dafür zersetzten sich die Produkte und Edukte allerdings nicht so schnell (**Abbildung 39**).

Bei den Reaktionen, die mit UV-Licht bestrahlt wurden, konnte eine bräunliche Ablagerung an der Glaswand der Küvette zwischen Lichtquelle und Lösung beobachtet werden. Besonders bei der Probe, die mit der punktförmigen 278 nm LED bestrahlt wurde, war dieser Effekt besonders ausgeprägt. Diese Ablagerung absorbierte vermutlich Teile des Lichts, weshalb ohne diese Ablagerungen wahrscheinlich noch höhere Ausbeuten möglich gewesen wären.

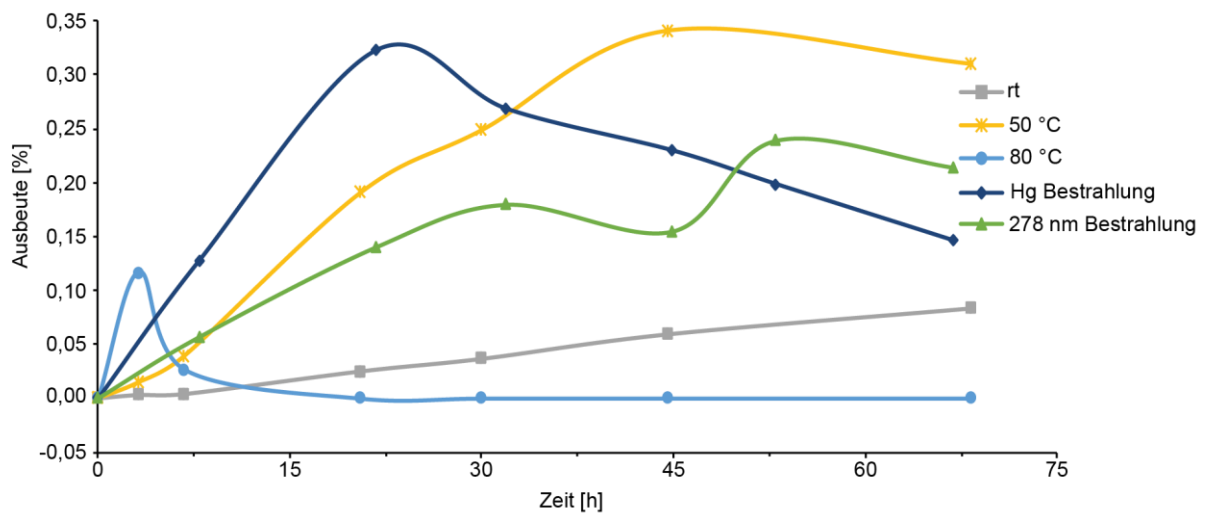


Abbildung 39: Anwendung von Adenosin-5'-phosphorimidazolidin-4-thion als 5'AMP-Aktivator. NAD⁺ Ausbeute über einen zeitlichen Verlauf von ca. 70 h. Die Reaktion wurde durchgeführt mit 0.10 m Adenosin-5'-phosphorimidazolidin-4-thion und 0.11 m NMN in hochreinem entgastem Wasser bei unterschiedlichen Temperaturen und mit unterschiedlichen Bestrahlungsmethoden.

Neben NAD⁺ konnte bei allen Versuchen auch die Entstehung von Diadenosindiphosphaten beobachtet werden. Obwohl kein Adenosin bei den Reaktionen eingesetzt wurde, so kann es jedoch vereinzelt noch als Nebenprodukt aus der Adenosin-5'-phosphorimidazolidin-4-thion Synthese vorhanden sein. Allerdings erklärt dies nicht die stetig ansteigenden Konzentrationen des Dinukleotids. Wahrscheinlicher ist, dass Adenosin durch die Zersetzung von Adenosin-5'-phosphorimidazolidin-4-thion entsteht und dieses anschließend mit dem aktivierten Nukleotid reagiert. Diese Theorie wird durch die Beobachtung unterstützt, dass die Dinukleotidbildung zwar bei allen Reaktionen detektiert werden kann, allerdings ist ihre Konzentration bei den Reaktionen am höchsten, bei denen die meiste Energie in Form von Licht oder Wärme zugeführt wird. Bei der Kombination des Adenosin-5'-phosphorimidazolidin-4-thions mit 5'AMP entsteht nicht nur das am häufigsten detektierte Pyrophosphat (AppA), sondern es entstehen zwei weitere Produkte mit identischer Masse, welche wahrscheinlich zu dem 5'-2'- und dem 5'-3'-verbrückten Diadenosindiphosphat gehören.

Durch die erfolgreiche Aktivierung von Adenosinmonophosphat mit Imidazolidin-4-thion konnte eine komplette NAD⁺ Synthese demonstriert werden. Hierbei konnte eine Syntheseroute zu Nikotinamidribosid ausgehend von Ammoniak und kurzkettigen Aldehyden präsentiert werden. Durch eine anschließende regioselektive Phosphorylierung konnte gezielt Nikotinamidmononukleotid synthetisiert werden, das daraufhin erfolgreich mit Adenosin-5'-phosphorimidazolidin-4-thion zu NAD⁺ reagierte. Das Ziel, die komplette NAD⁺ Synthese unter uniformen Reaktionsbedingungen durchzuführen, wurde erreicht. Alle Reaktionsschritte

Ergebnisse und Diskussion

sind in wässrigen Lösungen ohne zusätzliche Trocknungsschritte, mit milden pH-Werten und Temperaturen von unter 50 °C durchführbar (**Abbildung 40**).

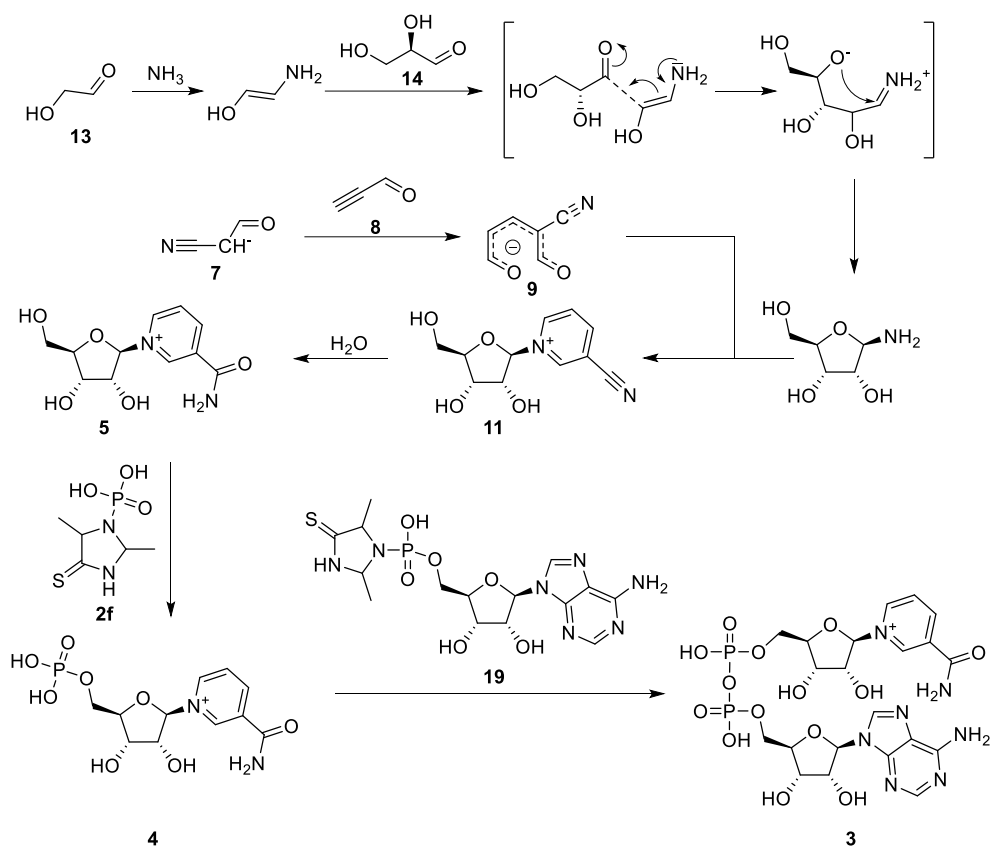


Abbildung 40: Reaktionsweg der erfolgreichen NAD⁺ Synthese, ausgehend von Ammoniak und Aldehyden unter milden wässrigen Bedingungen.

Um die Reaktionseffizienz von Adenosin-5'-phosphorimidazolidin-4-thion und Nikotinamidmononukleotid zu NAD⁺ einzuschätzen, wurde Nikotinamidmononukleotid außerdem jeweils mit Adenosin-5'-phosphorimidazol und Adenosin-5'-phosphor-2-methylimidazol bei 50 °C in Wasser ohne Bestrahlung, und somit gleichen Reaktionsbedingungen, umgesetzt. Hierbei ließ sich feststellen, dass die Imidazol und 2-Methylimidazol derivatisierten 5'AMPs die höheren NAD⁺ Ausbeuten lieferten. Zusätzlich zur Steigerung der Ausbeute konnten mit den beiden Imidazol-basierten 5'AMP-Aktivatoren auch eine deutlich erhöhte NAD⁺ Bildungsrate festgestellt werden (**Abbildung 41**).

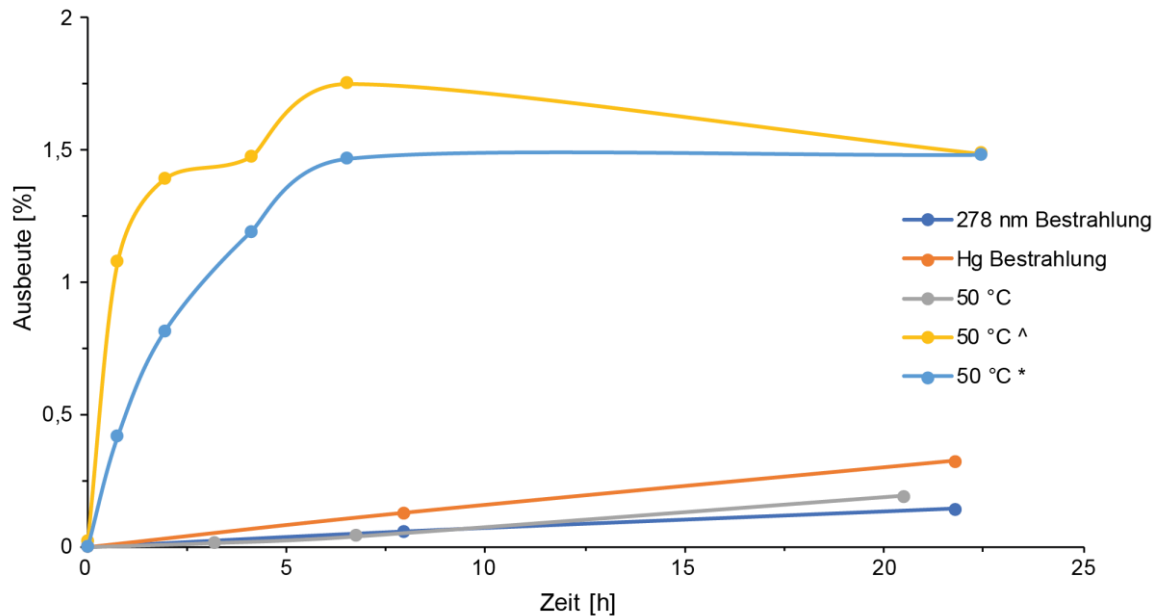


Abbildung 41: Vergleich der NAD⁺ Ausbeute von unterschiedlichen Nukleotidaktivatoren über einen Zeitraum von ca. 22 h. Die Reaktion wurde durchgeführt mit 0.10 M aktiviertem 5'AMP und 0.11 M NMN in hochreinem entgastem Wasser bei unterschiedlichen Temperaturen und mit unterschiedlichen Bestrahlungsmethoden. Falls nicht anders beschrieben, wurde Adenosin-5'phosphorimidazolidin-4-thion als aktiviertes 5'AMP verwendet; [^] Adenosin-5'phosphorimidazol wurde als aktiviertes 5'AMP verwendet; [*] Adenosin-5'phosphor-2-methylimidazol wurde als aktiviertes 5'AMP verwendet.

Angesichts der erhöhten Reaktivität sind die Imidazol Aktivatoren, wie eingangs beschrieben, zwar die reaktiveren Verbindungen und liefern unmittelbar nach dem Start der Reaktion mehr Produkt, allerdings sind sie aus diesem Grund in einer präbiotischen Betrachtung nur in unmittelbarer Nähe zu ihrem Entstehungsort als Nukleotidaktivatoren einsetzbar.

Am Beispiel von 5'AMP konnte demonstriert werden, dass Imidazolidin-4-thion ebenfalls als Nukleotidaktivator eingesetzt werden kann. Auch wenn dessen Reaktivität und die Bildungsrate des gewünschten Nikotinamidadenindinukleotids geringer ist als mit Imidazol basierten Aktivatoren, so ist ihre Verwendung unter präbiotischen Bedingungen plausibel. Aufgrund der erhöhten Langlebigkeit unter wässrigen Bedingungen und die beschleunigte Produktbildung durch eine Erhöhung der Temperatur oder durch Bestrahlung von Licht macht Imidazolidin-4-thion zu einem präbiotisch höchst interessanten Aktivator. Durch die hohe Stabilität könnten Adenosin-5'phosphorimidazolidin-4-thion oder andere aktivierte Nukleotide potenziell in einem abgegrenzten Bereich entstehen und erst durch Licht bzw. Wärme in einem entfernten Ort aktiviert werden und mit den dort vorhandenen Molekülen reagieren. Durch

Ergebnisse und Diskussion

diese Langlebigkeit wird das Problem umgangen, dass alle Moleküle von vornherein an einem Ort vorgelegen haben müssen.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Hinsichtlich der Entstehung der komplexen Verbindungen aus unbelebter Materie, welche aus aktueller Sicht essenziell für Lebewesen sind, widmen sich zahlreiche Forschungsgruppen aus unterschiedlichen Fachrichtungen der Erforschung möglicher Reaktionswege und Reaktionsbedingungen auf der frühen Erde. In diesem Zusammenhang wurde in dieser Arbeit die regioselektive Phosphorylierung und Synthese von wichtigen phosphorhaltigen Bausteinen des Lebens untersucht.

Präbiotisch plausible Phosphorylierungsbedingungen benötigen meist harsche Reaktionsbedingungen mit hohen Temperaturen und hohen Konzentrationen, die im Hadaikum zwar vorgekommen sind, allerdings die Möglichkeiten für Phosphorylierungen auf einzelne Orte beschränken. Neben der Einschränkung der Lokalität geht aufgrund der harschen Bedingungen auch meist die Selektivität verloren. Aufgrund dessen wird ein Phosphorylierungsmittel benötigt, das in einem wässrigen Medium eingesetzt werden kann und des Weiteren eine hohe Selektivität zwischen den unterschiedlichen nukleophilen Zentren in einem Molekül besitzt. Um die thermodynamische Barriere einer Kondensationsreaktion unter wässrigen Bedingungen zu überwinden, wurde hierfür ein Phosphoramid hergestellt. Zu diesem Zweck wurde das aus Carbonylverbindungen, Cyanid und Schwefelwasserstoff herstellbare Imidazolidin-4-thion verwendet und in das entsprechende Phosphoramid überführt. Die einfache Zugänglichkeit, Stabilität unter wässrigen Bedingungen und die Möglichkeit sperrige Seitenketten, die potenziell eine bessere Selektivität ermöglichen, einzubauen, machen Imidazolidin-4-thionphosphat zu einem idealen Kandidaten für Phosphorylierungsreaktionen. Mit diesem neuen Phosphorylierungsmittel wurden zunächst Reaktionsbedingungen untersucht, die an literaturbekannte Phosphorylierungsreaktionen angelehnt sind, allerdings im Unterschied zu diesen unter wässrigen Bedingungen durchgeführt wurden. Hierbei wurde zu Beginn die Synthese von Adenosinmonophosphat ausgehend von Adenosin und den Phosphorylierungsmitteln Imidazolidin-4-thionphosphat, DAP und DAP mit Imidazol untersucht und miteinander verglichen. Nach einer initialen Demonstration der Funktionalität von Imidazolidin-4-thionphosphat als Phosphorylierungsmittel wurden die drei eingesetzten Phosphorylierungsmittel in einer Reihe unterschiedlicher Reaktionsbedingungen bei 50 °C bezüglich der

5'Adenosinmonophosphatausbeute untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass jeweils Imidazolidin-4-thionphosphat bei den getesteten Bedingungen die höchsten Ausbeuten erzielen konnte.

Während der Testung der Reaktionsbedingungen wurde beobachtet, dass es im Laufe der Reaktionszeit zu einer kontinuierlichen Zersetzung des Imidazolidin-4-thionphosphats kam, weshalb die Reaktionstemperatur weiter herabgesetzt wurde. Neben der Durchführung der Reaktionen bei Raumtemperatur wurde die Reaktion darüber hinaus auch in Phosphatpuffer durchgeführt, um die Anwendbarkeit von Imidazolidin-4-thionphosphat unter einer Reihe unterschiedlicher präbiotischer Bedingungen zu demonstrieren.

Durch die Herabsetzung der Temperatur konnte die 5'Adenosinmonophosphatausbeute für alle getesteten Reaktionen gesteigert werden. Obwohl für fast alle Reaktionen bei 50 °C eine erhöhte Ausbeute bei einem leicht sauren im Vergleich zu einem leicht basischen pH-Wert festgestellt wurde, konnte die Bevorzugung eines bestimmten pH-Wertes bei Raumtemperatur nicht beobachtet werden. Wogegen Imidazolidin-4-thionphosphat das überlegene Phosphorylierungsmittel für 5'Adenosinmonophosphat war, waren DAP und auch DAP mit Imidazol fast immer die besseren Reagenzien für die Synthese von 2'3'cAMP, wobei auch hier die besten Ausbeuten bei Raumtemperatur erreicht werden konnten. Dabei konnte gezeigt werden, dass Imidazolidin-4-thionphosphat Adenosin regioselektiv phosphoryliert. Während neben dem Hauptprodukt 5'AMP auch noch eine geringe Menge an anderen nicht zyklischen Adenosinmonophosphaten entstand, so entstanden bei Reaktionen in Phosphatpuffer keine zyklischen Adenosinmonophosphate. Hinsichtlich der auch bei erhöhten Temperaturen beobachteten Regioselektivität beruht diese nicht nur auf der erhöhten Nukleophilie der primären Hydroxygruppe, sondern auch auf dem sterischen Anspruch des Imidazolidin-4-thionphosphats.

In einem zweiten Schritt wurden die für die Synthese von Adenosinmonophosphat vier besten Reaktionsbedingungen bezüglich 5'AMP Ausbeute und Regioselektivität für die Phosphorylierung der verbliebenen kanonischen Nukleoside erfolgreich eingesetzt. Aufgrund der Einsetzbarkeit in wässrigen Bedingungen unter einer Vielzahl von unterschiedlichen Reaktionsbedingungen stellt Imidazolidin-4-thionphosphat ein vielversprechendes Phosphorylierungsmittel zur Synthese von wichtigen Organophosphatverbindungen unter wässrigen Bedingungen dar.

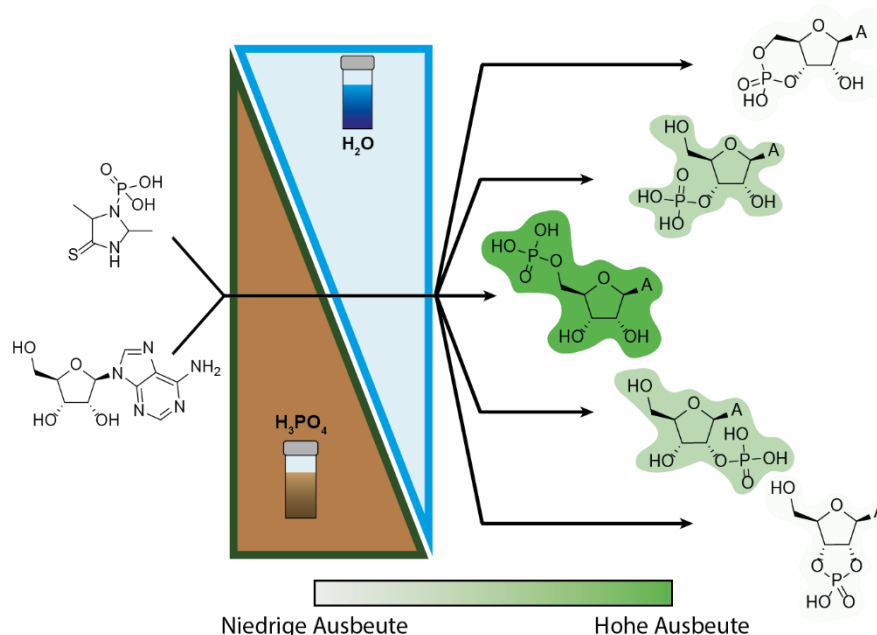


Abbildung 42: Grafische Zusammenfassung der Untersuchung von Imidazolidin-4-thionphosphat als präbiotisches regioselektives Phosphorylierungsmittel unter wässrigen Bedingungen.

Motiviert von der erfolgreichen Phosphorylierung der kanonischen Nucleoside unter milden Reaktionsbedingungen im wässrigen Milieu, befasst sich der zweite Teil dieser Arbeit mit der vollständigen Synthese eines Koenzyms unter wässrigen uniformen Reaktionsbedingungen. Hierfür sollte das im Metabolismus essenzielle redoxaktive Koenzym NAD^+ synthetisiert werden. Aufgrund der fragilen glykosidischen Bindung zwischen Ribose und dem positiv geladenen Pyridiniumderivat müssen harsche Reaktionsbedingungen bei der Herstellung von NAD^+ vermieden werden. In einem ersten Schritt wurde Nikotinamidribosid in Analogie zu einer von SANCHEZ und ORGEL postulierten Syntheseroute ausgehend von Propionaldehyd, Cyanoacetaldehyd und Ribose in einer wässrigen ammoniakalischen Lösung hergestellt und erstmalig nachgewiesen.^[185] Zur Erhöhung der Plausibilität der Edukte und Verminderung der Abhängigkeit von der Formosereaktion wurde eine weitere Nikotinamidribosid Synthese entwickelt. Im Einklang mit der von TRAPP demonstrierten DNA-Nucleosid Syntheseroute wurde statt dem für die DNA-Nucleoside verwendeten Acetaldehyd Glykolaldehyd zur Erzeugung der zusätzlichen Hydroxygruppe verwendet. Anders als in der literaturbekannten DNA-Nucleosid Synthese konnte allerdings nicht Nikotinamid direkt als Nucleobase eingesetzt werden. Stattdessen wurde in einem ersten Schritt Ribosylamin synthetisiert, das in einem zweiten Reaktionsschritt erfolgreich mit Propionaldehyd und Cyanoacetaldehyd zu Nikotinamidribosid reagierte.

Im darauffolgenden Schritt konnte durch die Anwendung von Imidazolidin-4-thionphosphat Nikotinamidribosid zu Nikotinamidmononukleotid (NMN) phosphoryliert werden. Mit allen vier Reaktionsbedingungen, die schon im ersten Teil dieser Arbeit für die kanonischen Nucleoside entwickelt wurden, wurde Nikotinamidmononukleotid (NMN) erfolgreich synthetisiert. Die milden Reaktionsbedingungen und die Regioselektivität des Imidazolidin-4-thionphosphats ermöglichten die gezielte Phosphorylierung der 5'-Hydroxygruppe, wodurch die fragile glykosidische Bindung nicht gebrochen und keine zyklischen Nikotinamidribosidmonophosphate detektiert wurden.

In einem letzten Reaktionsschritt wurde die Pyrophosphatbindung zwischen Nikotinamidmononukleotid und 5'-Adenosinmonophosphat zur vollständigen Synthese des NAD^+ geknüpft. Hierfür wurde sowohl eine präbiotische als auch eine Laborsynthese für Adenosin-5'-phosphorimidazolidin-4-thion realisiert. In der Laborsynthese konnte Imidazolidin-4-thion mittels einer oxidativen Addition durch die Verwendung von Triphenylphosphin und 2,2'-Dipyridyldisulfid an 5'-AMP addiert werden. Die präbiotische Syntheseroute hingegen wurde durch die Synthese eines aktivierten Imidoylphosphats ausgehend von Acetaldehyd, Methylisocyanid und der Reaktion dessen mit Imidazolidin-4-thion unter wässrigen Bedingungen verwirklicht. Stabilitätsuntersuchungen in wässrigen Lösungen zeigten, dass Adenosin-5'-phosphorimidazolidin-4-thion im Gegensatz zu bereits etablierten aktivierten Nucleosidmonophosphaten eine hohe Stabilität besitzt und sich unter wässrigen Bedingungen nicht zersetzt. Durch die anschließende Umsetzung von Adenosin-5'-phosphorimidazolidin-4-thion mit Nikotinamidmononukleotid konnte NAD^+ präbiotisch synthetisiert und mittels UHPLC-QTOF MS nachgewiesen werden. Die bei Raumtemperatur langsam ablaufende Reaktion konnte hierbei durch die Erhöhung der Temperatur beschleunigt werden. Des Weiteren konnte die Reaktionsgeschwindigkeit abgesehen von einer Erhöhung der Temperatur auch durch die Bestrahlung mit Licht gesteigert werden. In Anbetracht der Aktivierung des Moleküls bzw. der Beschleunigung der Reaktionsgeschwindigkeit durch Temperatur und Licht ist Adenosin-5'-phosphorimidazolidin-4-thion ein präbiotisch höchst relevantes Molekül, da es aufgrund seiner Stabilität unter wässrigen Bedingungen vorliegen und erst in Anwesenheit der entsprechenden Reaktanden aktiviert werden kann. Angesichts der erfolgreichen Pyrophosphatbildung unter wässrigen milden Reaktionsbedingungen konnte das Koenzym NAD^+ erfolgreich unter uniformen Bedingungen ausgehend von kurzkettigen Aldehyden gebildet werden.

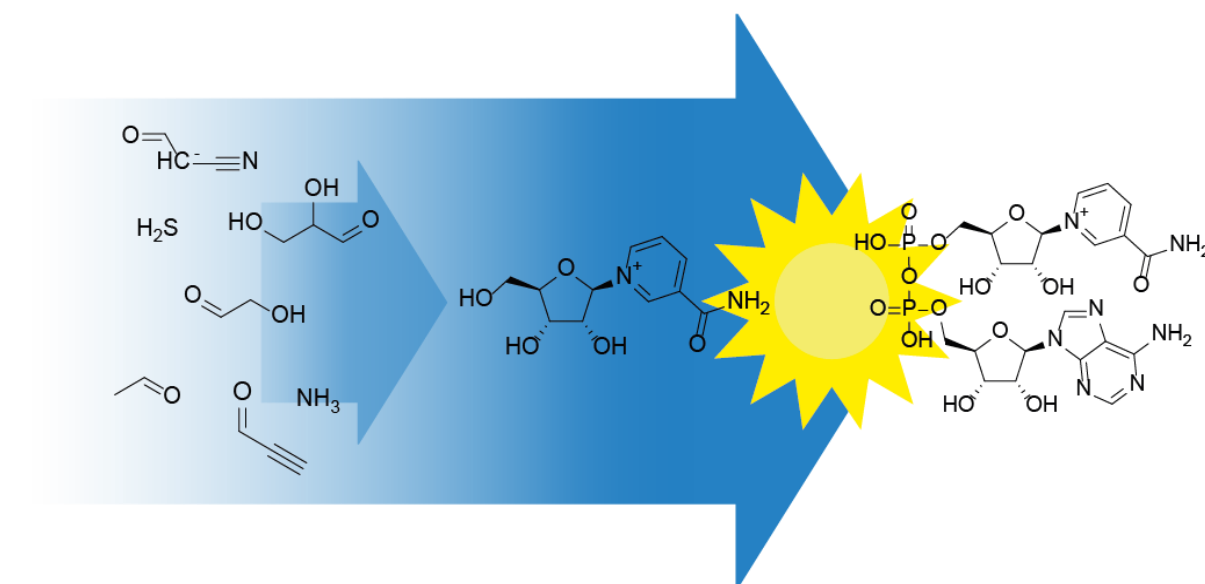


Abbildung 43: Grafische Zusammenfassung der Synthese des wichtigen Biomoleküls NAD⁺ unter uniformen präbiotischen Bedingungen ausgehend von kleinen Aldehyden.

Neben der Möglichkeit zur regioselektiven Phosphorylierung unter wässrigen Bedingungen ist vor allem die photoinduzierte Aktivierung von Imidazolidin-4-thion-Verbindungen von großem Interesse. Die bereits demonstrierte Möglichkeit, Imidazolidin-4-thion ohne zusätzlichen Photosensibilisator als Katalysator einzusetzen und die hier gezeigte gezielte Aktivierung mittels Bestrahlung könnte zu interessanten Einsätzen in der modernen Chemie führen und verdeutlicht das Potential von Imidazolidin-4-thion-Verbindungen.

6 Experimenteller Teil

6.1 Allgemeine Informationen

6.1.1 Materialien

Alle Lösungsmittel und Chemikalien wurden von kommerziellen Händlern (abcr GmbH, Acros Organics b.v.b.a., Sigma-Aldrich Co. LLC, Strem Chemicals Inc. and TCI Europe N.V.) gekauft, entsprechend ihren speziellen Anweisungen gelagert und wenn nicht anders vermerkt ohne weitere Aufreinigung eingesetzt. Für Analysen wurden HPLC grade bzw. HPLC-MS grade Lösungsmittel verwendet. Bidestilliertes Wasser wurde von einer VWR Purity PU 15 Anlage bezogen.

Argon Gas (Ar 5.0) und Schwefelwasserstoff (H₂S 5.0) wurden von Air Liquide Deutschland GmbH bezogen.

6.1.2 NMR-Spektroskopie

NMR-Aufnahmen wurden an einem 400 MHz Bruker Avance III HD Spektrometer, an einem 600 MHz Varian NMR System mit CryoProbe Prodigy oder einem 800 MHz Bruker Avance III HD Spektrometer mit einem CryoProbe aufgenommen. Alle Spektren wurden mittels des Lösungsmittelpeaks kalibriert. Die chemischen Verschiebungen δ werden in ppm und die Kopplungskonstanten J in Hz angegeben. Die verschiedenen Multiplizitäten sind durch s (Singulett), d (Dublett), t (Triplett), q (Quartett), sext (Sextett), m (Multipllett), bs (breites Singulett) oder durch Kombinationen der Multiplizitäten definiert. Die Zuordnung aller Signale wurde durch zweidimensionale NMR-Spektroskopie (COSY, HSQC, HMBC) vorgenommen. Die Nummerierung der Atome für die NMR-Zuordnungen basiert nicht auf der IUPAC Nomenklatur. Durch ", " getrennte Zahlen beziehen sich auf die Zuordnung beider Atome, durch "/" getrennte Zahlen beziehen sich auf die Zuordnung eines der Atome. Magnetisch nicht

äquivalente Wasserstoffatome desselben Kohlenstoffatoms werden durch a und b unterschieden.

6.1.3 Massenspektrometrie

Die massenspektrometrischen Analysen wurden mit einem Thermo Scientific Q Exactive Plus Massenspektrometer durchgeführt, das mit Elektrospray-Ionisierung (ESI) durch direkte Injektion gekoppelt war. Als Injektionslösungsmittel wurde 80:20 Isopropanol:Wasser mit 0.05 % Ameisensäure verwendet. Die Probe wurde in Acetonitril oder destilliertem Wasser gelöst und das Massenspektrometer wurde, falls nicht anders beschrieben, im Full-Scan-Modus betrieben, wobei im positiven und negativen Modus gemessen wurde. 10 µl der Reaktionsmischung wurden mit 990 µl hochreinem Wasser verdünnt, bevor die Mischung spritzenfiltriert und für die UHPLC-QTOF MS-Analyse verwendet wurde. Die Flüssigkeitschromatographie wurde auf einem Agilent Technologies 1260 Infinity LC System durchgeführt.

Methode A: Zur Trennung wurde eine Dr. Maisch ReproSil-Pur 120 C18-AQ (2 mm x 100 mm, 2.4 µm Partikelgröße) Säule verwendet. Während der Analyse wurde die Säule konstant auf 40 °C gehalten. Die Injektionsvolumina betragen 1.0 µL, sofern nicht anders angegeben. Die mobile Phase war ein Gradient aus hochreinem Wasser mit 0.05 % (v/v) Ameisensäure (Eluent A) und Methanol (Eluent B). Für die LC-MS wurde folgender Gradient verwendet: 0 % B wurde über 20 min auf 1 % B erhöht. B wurde innerhalb von 0.01 min auf 100 % erhöht und für 5 min konstant gehalten, um die Säule zu spülen. Die anschließende Rekonstitution der Ausgangsbedingungen mit 0.01 min und die erneute Äquilibration mit 0 % B für 5 min ergaben eine Gesamtanalysezeit von 30 min. Der Flüssigkeitsdurchfluss wurde auf 0.15 mL/min eingestellt. Das hochreine Wasser wurde aus einer VWR Purity PU 15 UV-Anlage erhalten, das Methanol in HPLC-MS-Qualität von Aldrich bezogen. Die nachgeschaltete Massenanalyse wurde mit einem Agilent Technologies 6550 iFunnel Q-TOF/MS durchgeführt, die Ionen in einem Scanbereich von 50-1100 m/z analysiert. Es fand kein vorheriges Splitting statt. Sofern nicht anders angegeben, wurden bei der Analyse die folgenden Parameter verwendet: Gastemperatur: 200 °C, Trocknungsgasfluss: 14 l/min, Zerstäubedruck: 35 psi, Mantelgastemperatur: 275 °C, Mantelgasdurchfluss: 11 L/min, Kapillarspannung: 4 kV, Kapillarstrom: 0.0 µA, Düsenspannung: 1 kV, Fragmentorspannung 180 V; für die interne Kalibrierung wurde die ESI-TOF-Referenzmassenlösung von Agilent

Technologies verwendet, verdünnt in Acetonitril:Wasser (95:5). Die internen Referenzmassen wurden auf 121.0509 und 922.0098 eingestellt.

Methode B: Zur Trennung wurde eine Agilent Extend C18-Säule (2.1 x50 mm, 1.80 µm Partikelgröße) verwendet. Während der Analyse wurde die Säule konstant auf 40 °C gehalten. Das Injektionsvolumen betrug 1.0 µL, sofern nicht anders angegeben. Die mobile Phase war ein Gradient, der aus hochreinem Wasser mit 0.05 % (v/v) Ameisensäure (Elutionsmittel A) und Methanol (Elutionsmittel B) hergestellt wurde.^[188] Der für die LC-MS verwendete Gradient war: 0 % B wurde für 0.54 min konstant gehalten, danach innerhalb von 2.38 min auf 40 % B erhöht und für 0.59 min gehalten. Anschließend wurde der Gradient innerhalb von 0.03 min auf 100 % des Elutionsmittels B erhöht und für 4.57 min gehalten. Die anschließende Rekonstitution der Ausgangsbedingungen nach 0,03 min und die erneute Äquilibrierung mit 0 % B für 3.86 min ergaben eine Gesamtanalysezeit von 12 min. Der Flüssigkeitsdurchfluss wurde auf 0.50 mL/min eingestellt. Das hochreine Wasser wurde aus einer VWR Purity PU 15 UV-Anlage gewonnen. Das Methanol wurde in HPLC-MS-Qualität von Aldrich bezogen. Die nachgeschaltete Massenanalyse wurde mit einem Agilent Technologies 6550 iFunnel Q-TOF/MS durchgeführt. Die Ionen wurden in einem Scanbereich von 100-1700 m/z analysiert. Es wurde kein vorheriges Splitting durchgeführt. Sofern nicht anders angegeben, wurden bei der Analyse die folgenden Parameter verwendet: Gastemperatur: 200 °C, Trocknungsgasfluss: 14 l/min, Zerstäubendruck: 35 psi, Mantelgastemperatur: 275 °C, Mantelgasdurchfluss: 11 L/min, Kapillarspannung: 4 kV, Kapillarstrom: 0.0 µA, Düsenanspannung: 1 kV, Fragmentorspannung 180 V; für die interne Kalibrierung wurde die ESI-TOF-Referenzmassenlösung von Agilent Technologies verwendet, verdünnt in Acetonitril:Wasser (95:5).

Methode C: Zur Trennung wurde eine Dr. Maisch ReproSil-Pur 120 C18-AQ (2 mm x 100 mm, 2.4 µm Partikelgröße) Säule verwendet. Während der Analyse wurde die Säule konstant auf 40 °C gehalten. Die Injektionsvolumina betragen 1,0 µL, sofern nicht anders angegeben. Die mobile Phase war ein Gradient aus hochreinem Wasser mit 0.05 % (v/v) Ameisensäure (Eluent A) und Methanol (Eluent B). Für die LC-MS wurde folgender Gradient verwendet: 0 % B wurde über 13 min auf 20 % B erhöht. B wurde innerhalb von 6 min auf 50 % erhöht und für 6 min konstant gehalten. B wurde innerhalb von 0.01 min auf 100 % erhöht und für 2.99 min konstant gehalten. Die anschließende Rekonstitution der Ausgangsbedingungen mit 0.01 min und die Rekonstitution mit 0 % B für 7.99 min ergaben eine Gesamtanalysezeit von 36 min. Der Flüssigkeitsdurchfluss wurde auf 0.50 mL/min eingestellt. Das hochreine Wasser wurde aus einer VWR Purity PU 15 UV-Anlage gewonnen. Das Methanol wurde in HPLC-MS-

Qualität von Aldrich bezogen. Die nachgeschaltete Massenanalyse wurde mit einem Agilent Technologies 6550 iFunnel Q-TOF/MS durchgeführt. Die Ionen wurden in einem Scanbereich von 50-1700 m/z analysiert. Es wurde kein vorheriges Splitting durchgeführt. Sofern nicht anders angegeben, wurden bei der Analyse die folgenden Parameter verwendet: Gastemperatur: 200 °C, Trocknungsgasfluss: 14 l/min, Zerstäuberdruck: 35 psi, Mantelgastemperatur: 275 °C, Mantelgasdurchfluss: 11 L/min, Kapillarspannung: 4 kV, Kapillarstrom: 0.0 µA, Düsenanspannung: 1 kV, Fragmentorspannung 180 V; für die interne Kalibrierung wurde die ESI-TOF-Referenzmassenlösung von Agilent Technologies verwendet, verdünnt in Acetonitril:Wasser (95:5). Die internen Referenzmassen wurden auf 121.0509 und 922.0098 eingestellt.

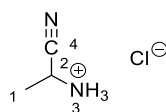
Methode D: Zur Trennung wurde eine Agilent Extend C18-Säule (2.1 x50 mm, 1.80 µm Partikelgröße) verwendet. Während der Analyse wurde die Säule konstant auf 40 °C gehalten. Das Injektionsvolumen betrug 0.3 µL, sofern nicht anders angegeben. Die mobile Phase war ein Gradient, der aus hochreinem Wasser mit 0.05 % (v/v) Ameisensäure (Elutionsmittel A) und Methanol (Elutionsmittel B) hergestellt wurde.^[188] Der für die LC-MS verwendete Gradient war: 0 % B wurde für 0,59 min konstant gehalten, dann innerhalb von 2.38 min auf 40 % B erhöht und für 0.59 min gehalten. Anschließend wurde der Gradient innerhalb von 0.03 min auf 100 % des Elutionsmittels B erhöht und für 0.57 min gehalten. Die anschließende Rekonstitution der Ausgangsbedingungen nach 0.03 min und die erneute Äquilibrierung mit 0 % B für 6.81 min ergaben eine Gesamtanalysezeit von 11 min. Der Flüssigkeitsdurchfluss wurde auf 0,55 mL/min eingestellt. Das hochreine Wasser wurde aus einer VWR Purity PU 15 UV-Anlage gewonnen. Das Methanol wurde in HPLC-MS-Qualität von Aldrich bezogen. Die nachgeschaltete Massenanalyse wurde mit einem Agilent Technologies 6550 iFunnel Q-TOF/MS durchgeführt. Die Ionen wurden in einem Scanbereich von 40-1100 m/z analysiert. Es wurde kein vorheriges Splitting durchgeführt. Sofern nicht anders angegeben, wurden bei der Analyse die folgenden Parameter verwendet: Gastemperatur: 200 °C, Trocknungsgasfluss: 14 l/min, Zerstäuberdruck: 35 psi, Mantelgastemperatur: 275 °C, Mantelgasdurchfluss: 11 L/min, Kapillarspannung: 4 kV, Kapillarstrom: 0.0 µA, Düsenanspannung: 0 kV, Fragmentorspannung 180 V; für die interne Kalibrierung wurde die ESI-TOF-Referenzmassenlösung von Agilent Technologies verwendet, verdünnt in Acetonitril:Wasser (95:5). Die internen Referenzmassen wurden auf 122.9855 und 1033.9881 eingestellt.

6.2 Synthesevorschriften und Charakterisierungsdaten von isolierten Verbindungen

6.2.1 Herstellung von α -Aminonitrilen

Die α -Aminonitrile wurden ähnlich zu einer von Paventi und Edward beschriebenen Vorschrift synthetisiert.^[176]

1-Cyanoethan-1-aminiumchlorid

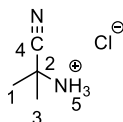


Ammoniumchlorid (1.34 g, 25.0 mmol, 1.0 Äquiv.) und Kaliumcyanid (1.63 g, 25.0 mmol, 1.0 Äquiv.) wurden zu einer Lösung aus THF (7.50 mL) und Ammoniumhydroxid (30 %, 1.75 mL) gegeben. Die Lösung wurde auf 0 °C gekühlt und Acetaldehyd (1.39 mL, 25.0 mmol, 1.0 Äquiv.) wurde zugegeben und der Kolben verschlossen. Die Mischung wurde für 10 min bei 0 °C gekühlt und anschließend weitere 35 min bei rt gerührt. Natriumsulfat (10.0 g) und Et₂O (20.0 mL) wurden zugegeben und die resultierende Suspension für 1.5 h bei rt gerührt. Die Lösung wurde abdekantiert und der Rückstand wurde mit Et₂O gewaschen. Die Lösung wurde *in vacuo* eingedunstet, bevor Et₂O (15.0 mL) und HCl in Et₂O (2 N, 5.00 mL) zugegeben wurden. Die resultierende Suspension wurde filtriert und mit Et₂O gewaschen um 1-Cyanoethan-1-aminiumchlorid als weißen Feststoff zu erhalten (1.02 g, 9.58 mmol, 38 %).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 9.05 (s, 3H, H³), 4.55 (q, ³J_{H-H} = 7.0 Hz, 1H, H²), 1.54 (d, ³J_{H-H} = 7.0 Hz, 3H, H¹).

¹³C NMR {¹H} (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 117.8 (C⁴), 36.3 (C²), 16.8 (C¹).

2-Cyanopropan-2-aminiumchlorid



Ammoniumchlorid (1.34 g, 25.0 mmol, 1.0 Äquiv.) und Kaliumcyanid (1.63 g, 25.0 mmol, 1.0 Äquiv.) wurden zu einer Lösung aus THF (7.50 mL) und Ammoniumhydroxid (30 %, 1.75 mL) gegeben. Die Lösung wurde auf 0 °C gekühlt und Aceton (1.84 mL, 25.0 mmol, 1.0 Äquiv.) wurde zugegeben und der Kolben verschlossen. Die Mischung wurde für 10 min bei 0 °C gekühlt und anschließend weitere 35 min bei rt gerührt. Natriumsulfat (10.0 g) und Et₂O (20.0 mL) wurden zugegeben und die resultierende Suspension für 1.5 h bei rt gerührt. Die Lösung wurde abdekantiert und der Rückstand wurde mit Et₂O gewaschen. Die Lösung wurde *in vacuo* eingeeengt bevor Et₂O (15.0 mL) und HCl in Et₂O (2 N, 5.00 mL) zugegeben wurden. Die resultierende Suspension wurde filtriert und mit Et₂O gewaschen um 2-Cyanopropan-2-aminiumchlorid als weißen Feststoff zu erhalten (1.63 g, 13.52 mmol, 54 %).

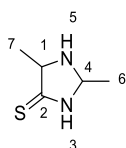
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 9.42 (s, 3H, H⁵), 1.72 (m, 6H, H^{1,3}).

¹³C NMR {¹H} (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ [ppm] = 119.8 (C⁴), 46.3 (C²), 24.8 (C^{1,3}).

6.2.2 Herstellung von Imidazolidin-4-thionen

Die Imidazolidin-4-thione wurden nach einer aus dem AK Trapp stammenden Vorschrift synthetisiert.^[178]

2,5-Dimethylimidazolidin-4-thion



Kaliumhydroxid (1.0 Äquiv.) und 1-Cyanoethan-1-aminiumchlorid (1.07 g, 10.0 mmol, 1.0 Äquiv.) wurden in Ammoniumhydroxid (30 %, 0.63 M bezogen auf Acetaldehyd) gelöst. Die Lösung wurde auf 0 °C gekühlt, anschließend wurde Acetaldehyd (558 µL, 10.0 mmol, 1.0 Äquiv.) zugegeben und Schwefelwasserstoff (4 x 17 bar) durch die Lösung geleitet. Der Kolben wurde verschlossen und die Lösung wurde unter Rühren über Nacht von 0 °C auf rt aufgewärmt. DCM und Wasser wurden zugegeben, die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase wurde mit DCM extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt um 2,5-Dimethylimidazolidin-4-thion als leicht gelblichen Feststoff zu erhalten (441 mg, 3.39 mmol, 34 %).

HRMS (ESI) m/z : berechnet für $C_5H_{11}N_2S^+$ $[M+H]^+$: 131.0637, gefunden: 131.0638.

Retardation factor: $R_f = 0.17$ (EtOAc)

Diastereomer A:

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = 8.62 (b, 1H, H³), 4.92 (qd, $^3J_{H-H} = 6.0$ Hz, $^4J_{H-H} = 1.2$ Hz, 1H, H⁴), 4.01 (qd, $^3J_{H-H} = 7.0$ Hz, $^4J_{H-H} = 1.2$ Hz, 1H, H¹), 1.65 (b, 1H, H⁵), 1.43 (d, $^3J_{H-H} = 7.0$ Hz, 3H, H⁷), 1.41 (d, $^3J_{H-H} = 6.0$ Hz, 3H, H⁶).

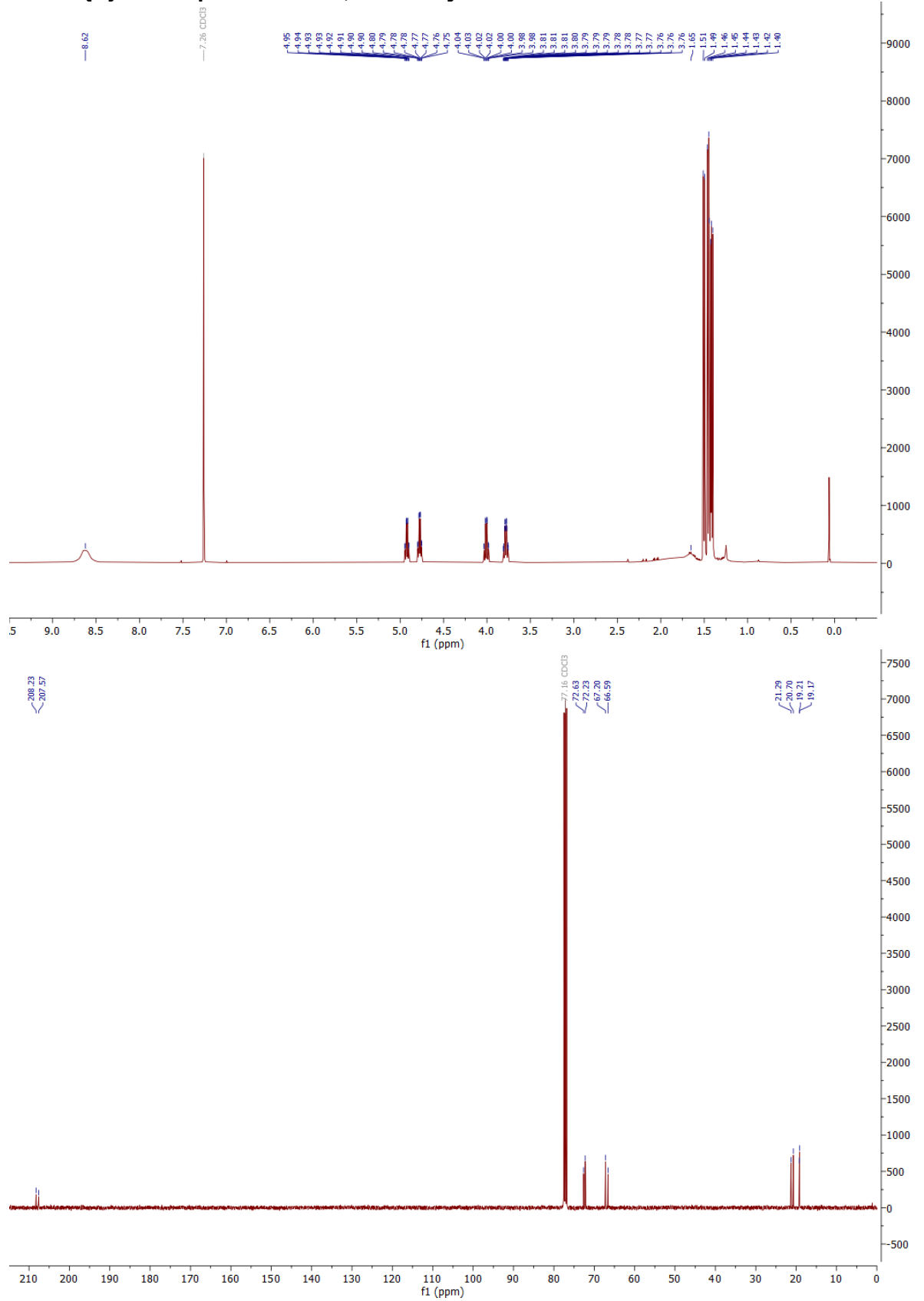
^{13}C NMR $\{^1H\}$ (101 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = 207.6 (C²), 72.6 (C⁴), 66.6 (C¹), 21.3 (C⁶), 19.2 (C⁷).

Diastereomer B:

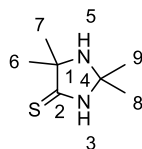
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 8.62 (b, 1H, H^3), 4.78 (qd, $^3J_{\text{H-H}} = 5.8$ Hz, $^4J_{\text{H-H}} = 1.7$ Hz, 1H, H^4), 3.78 (qd, $^3J_{\text{H-H}} = 7.5$ Hz, $^4J_{\text{H-H}} = 1.5$ Hz, 1H, H^1), 1.65 (b, 1H, H^5), 1.50 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 6.7$ Hz, 3H, H^7), 1.46 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 5.9$ Hz, 3H, H^6).

$^{13}\text{C NMR}$ $\{^1\text{H}\}$ (101 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 208.2 (C^2), 72.2 (C^4), 67.2 (C^1), 20.7 (C^6), 19.2 (C^7).

^1H und $^{13}\text{C}\{\text{H}\}$ -NMR Spektren von 2,5-Dimethylimidazolidin-4-thion



2,2,5,5-Tetramethylimidazolidin-4-thion



Kaliumhydroxid (1.0 Äquiv.) und 2-Cyanopropan-2-aminiumchlorid (602.9 mg, 5.0 mmol, 1.0 Äquiv.) wurden in Ammoniumhydroxid (30 %, 0.63 M bezogen auf Aceton) gelöst. Die Lösung wurde auf 0 °C gekühlt, anschließend wurde Aceton (368 µL, 5.0 mmol, 1.0 Äquiv.) zugegeben und Schwefelwasserstoff (4 x 17 bar) durch die Lösung geblubbert. Der Kolben wurde verschlossen und die Lösung wurde unter Rühren über Nacht von 0 °C auf rt aufwärmen gelassen. DCM und Wasser wurden zugegeben, die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase wurde mit DCM extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt um 2,2,5,5-Tetramethylimidazolidin-4-thion als weißer Feststoff zu erhalten (630 mg, 3.98 mmol, 80 %).

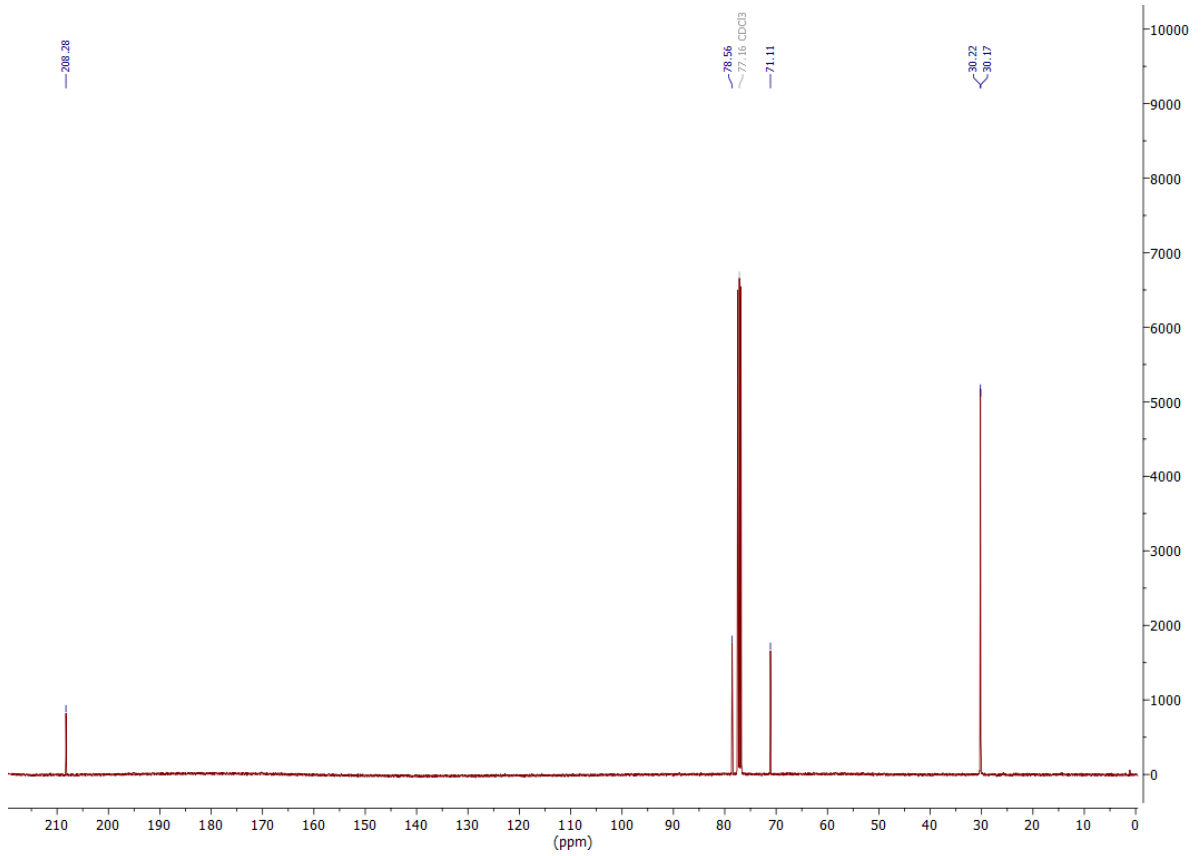
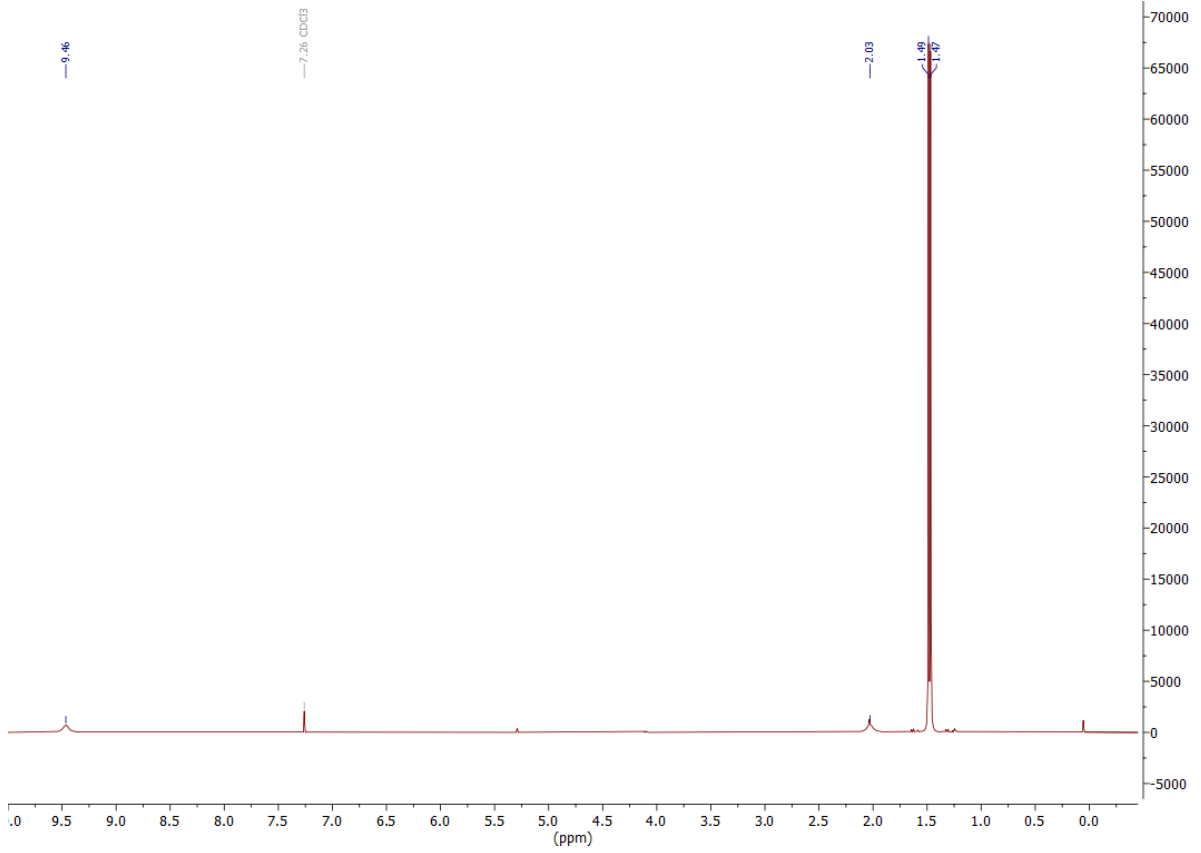
HRMS (ESI) m/z : berechnet für $C_5H_{11}N_2S^+$ $[M+H]^+$: 159.0950, gefunden: 159.0946.

Retardation factor: $R_f = 0.40$ (EtOAc)

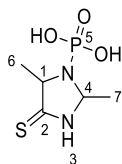
1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = 9.46 (b, 1H, H^3), 2.03 (b, 1H, H^5), 1.49 (s, 6H, $H^{6,7/8,9}$), 1.47 (s, 6H, $H^{6,7/8,9}$).

^{13}C NMR $\{^1H\}$ (101 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = 208.3 (C^2), 78.6 (C^4), 71.1 (C^1), 30.2 ($C^{6,7/8,9}$), 30.2 ($C^{6,7/8,9}$).

^1H und $^{13}\text{C}\{\text{H}\}$ -NMR Spektren von 2,2,5,5-Tetramethylimidazolidin-4-thion



6.2.3 Herstellung von 2,5-Dimethyl-4-thioxoimidazolidin-1-yl) phosphonic acid (ITO-P)



Ein flammengetrockneter Kolben wurde unter Argonatmosphäre mit 2,5-Dimethylimidazolidin-4-thion (651 mg, 5.00 mmol, 1.0 Äquiv.) beladen. Trockenes DCM (25.0 mL) und Triethylamin (624 μ L, 4.50 mmol, 0.9 Äquiv.) wurden zugegeben, bevor die Lösung auf 0 °C gekühlt wurde. Phosphoroxychlorid (456 μ L, 5.00 mmol, 1.0 Äquiv.) wurde langsam bei 0 °C zugegeben und die Lösung anschließend erst 10 min bei 0 °C und danach 7 Tage bei rt unter Argonatmosphäre gerührt. DCM und hochreines Wasser wurden zugegeben, die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase wurde mit DCM extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und *in vacuo* Entfernung des Lösungsmittels lieferte 2,5-Dimethyl-4-thioxoimidazolidin-1-yl) phosphonic acid als einen braunen hygroskopischen Feststoff (678 mg, 3.22 mmol, 64 %).

HRMS (ESI) *m/z*: berechnet für C₅H₁₀N₂O₃PS⁻ [M-H]⁻: 209.0155, gefunden: 209.0151.

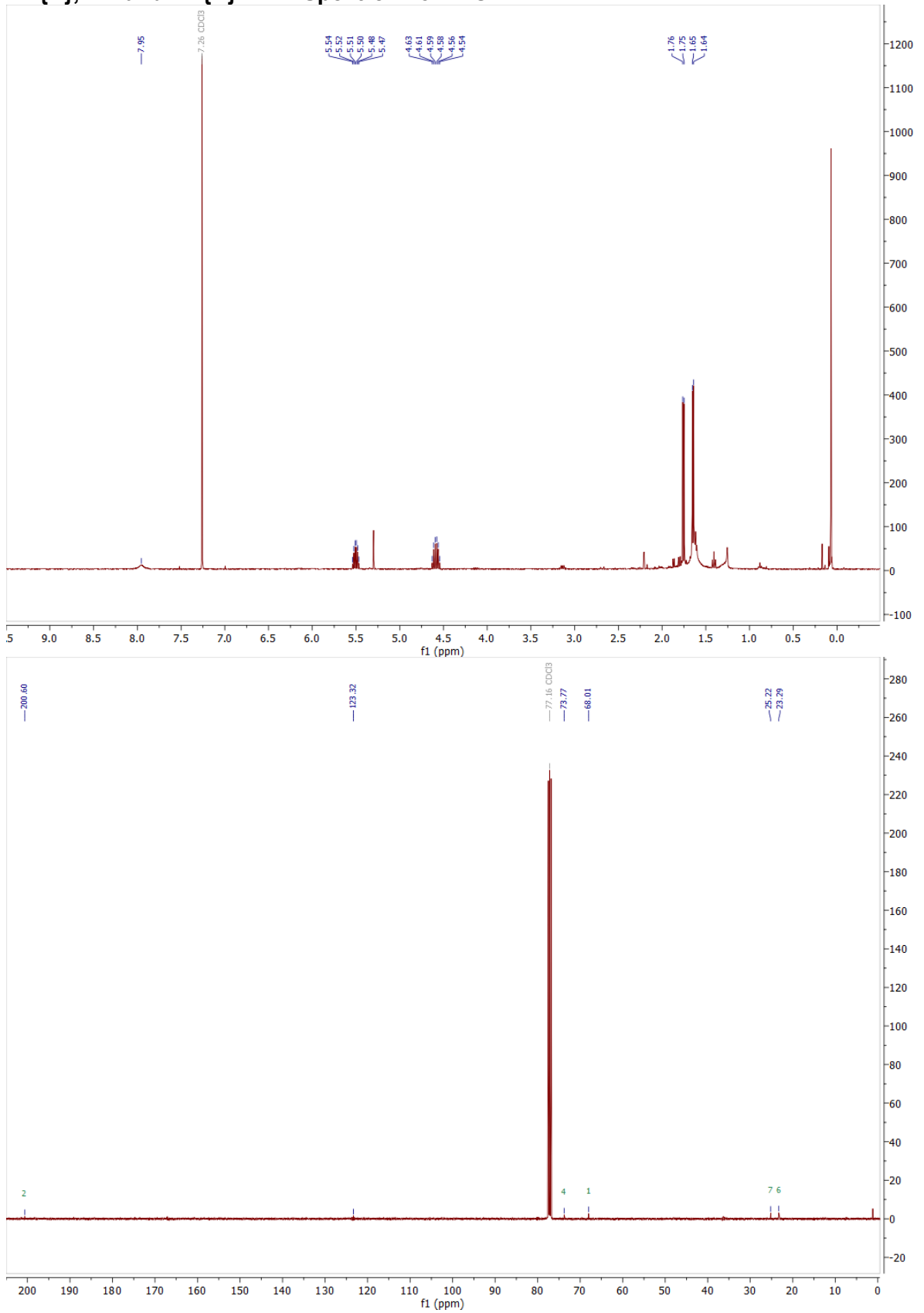
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 7.95 (s, 1H, H³), 5.50 (dq, ³J_{H-P} = 11.6 Hz, ³J_{H-H} = 5.8 Hz, 1H, H⁴), 4.59 (dq, ³J_{H-P} = 13.9 Hz, ³J_{H-H} = 6.9 Hz, 1H, H¹), 1.76 (d, ³J_{H-H} = 6.9 Hz, 3H, H⁶), 1.65 (d, ³J_{H-H} = 5.8 Hz, 3H, H⁷).

¹³C NMR {¹H} (101 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 200.6 (s, 1C, C²), 73.7 (d, ²J_{C-P} = 7.7 Hz, 1C, C⁴), 68.0 (m, 1C, C¹), 25.2 (d, ³J_{C-P} = 3.5 Hz, 1C, C⁷), 23.3 (d, ³J_{C-P} = 3.4 Hz, 1C, C⁶).

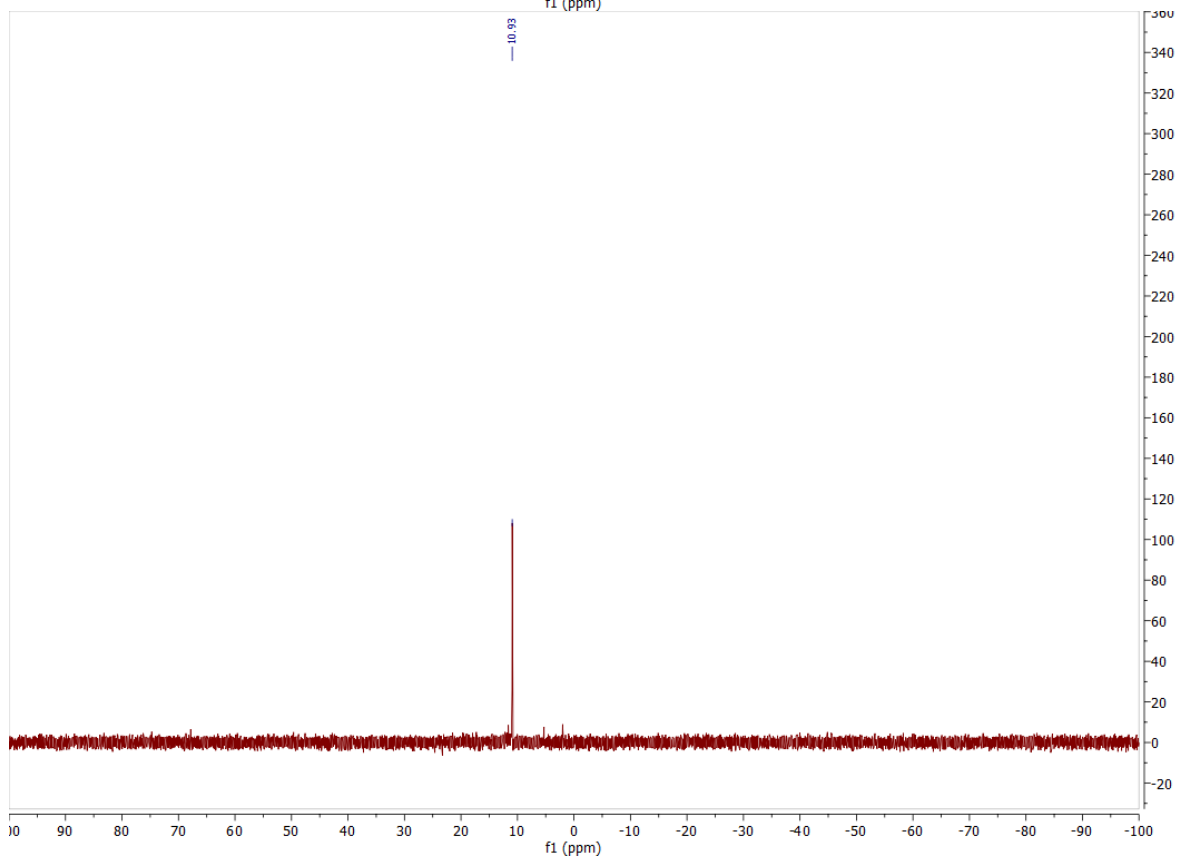
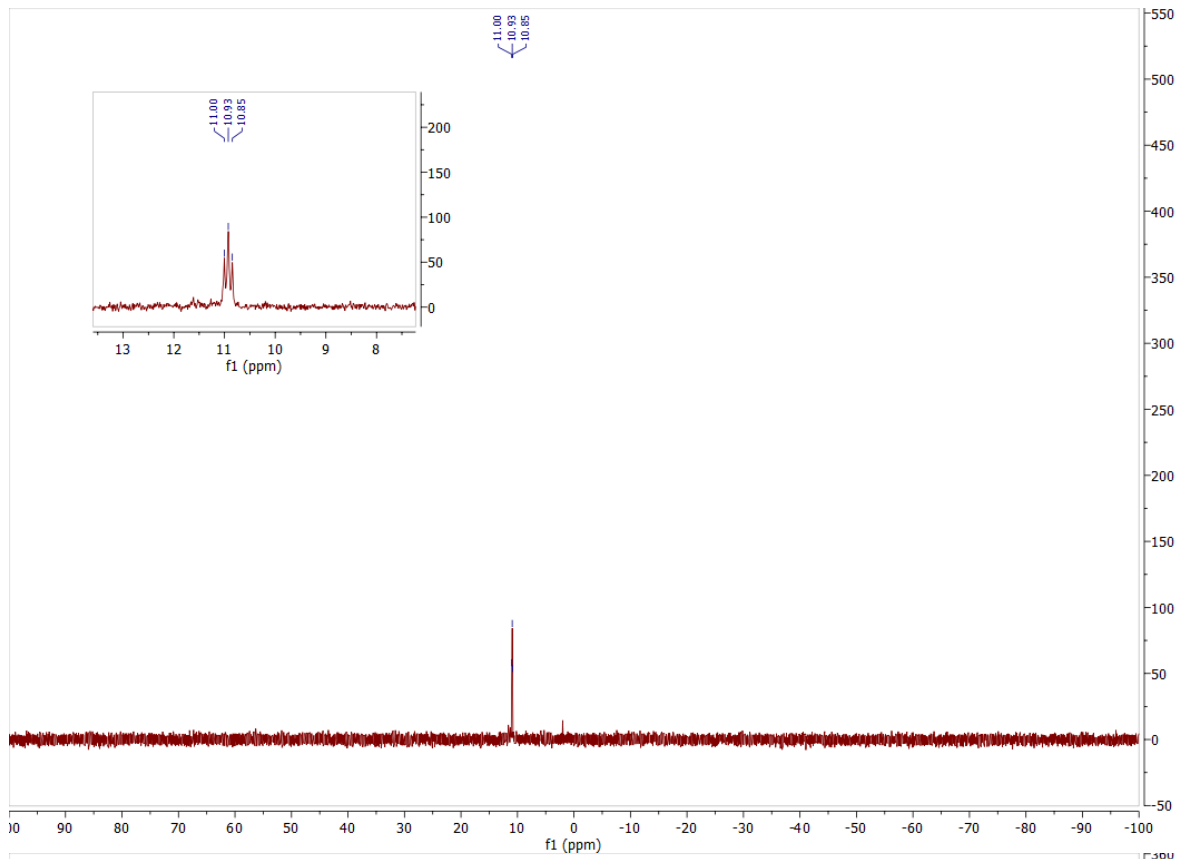
³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 10.9 (dd, ³J_{H-P} = 12.7 Hz, 1P, P⁵).

³¹P NMR {¹H} (162 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 10.9 (P⁵).

^1H , $^{13}\text{C}\{\text{H}\}$, ^{31}P und $^{31}\text{P}\{\text{H}\}$ -NMR Spektren von ITO-P

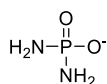


Experimenteller Teil



6.2.4 Herstellung von Natriumphosphorodiamidat (DAP)

DAP wurde nach einer von KRISHNAMURTHY veröffentlichten Syntheseroute hergestellt.^[74]

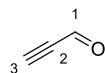


Phenylphosphorodiamidat (3.44 g, 20.0 mmol, 1.0 Äquiv.) wurde zu einer wässrigen Natriumhydroxidlösung (4 M, 10.0 mL, 40.0 mmol, 2.0 Äquiv.) gegeben. Die Reaktion wurde auf 110 °C erhitzt und 10 min bei 110 °C gerührt. Das Gemisch wurde auf rt abgekühlt und das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Ethanol (47.0 mL) wurde bei 0 °C hinzugegeben, das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand in Wasser gelöst. Die wässrige Phase wurde mit DCM (3 x) und EtOAc (2 x) gewaschen, anschließend eingeeengt und der Rückstand auf 4 °C gekühlt. Ethanol (33.0 mL) wurde unter Rühren langsam zugegeben und der entstehende Niederschlag abfiltriert. Waschen des Niederschlags mit kaltem Ethanol lieferte Natriumphosphorodiamidat als weißen Feststoff (2.02 g, 17.1 mmol, 85 %).

HRMS (ESI) *m/z*: berechnet für $\text{H}_5\text{N}_2\text{NaO}_2\text{P}^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 118.9981, gefunden: 118.9982.

³¹P NMR {¹H} (162 MHz, D₂O) δ [ppm] = 13.8 (P¹).

6.2.5 Herstellung von Propionaldehyd

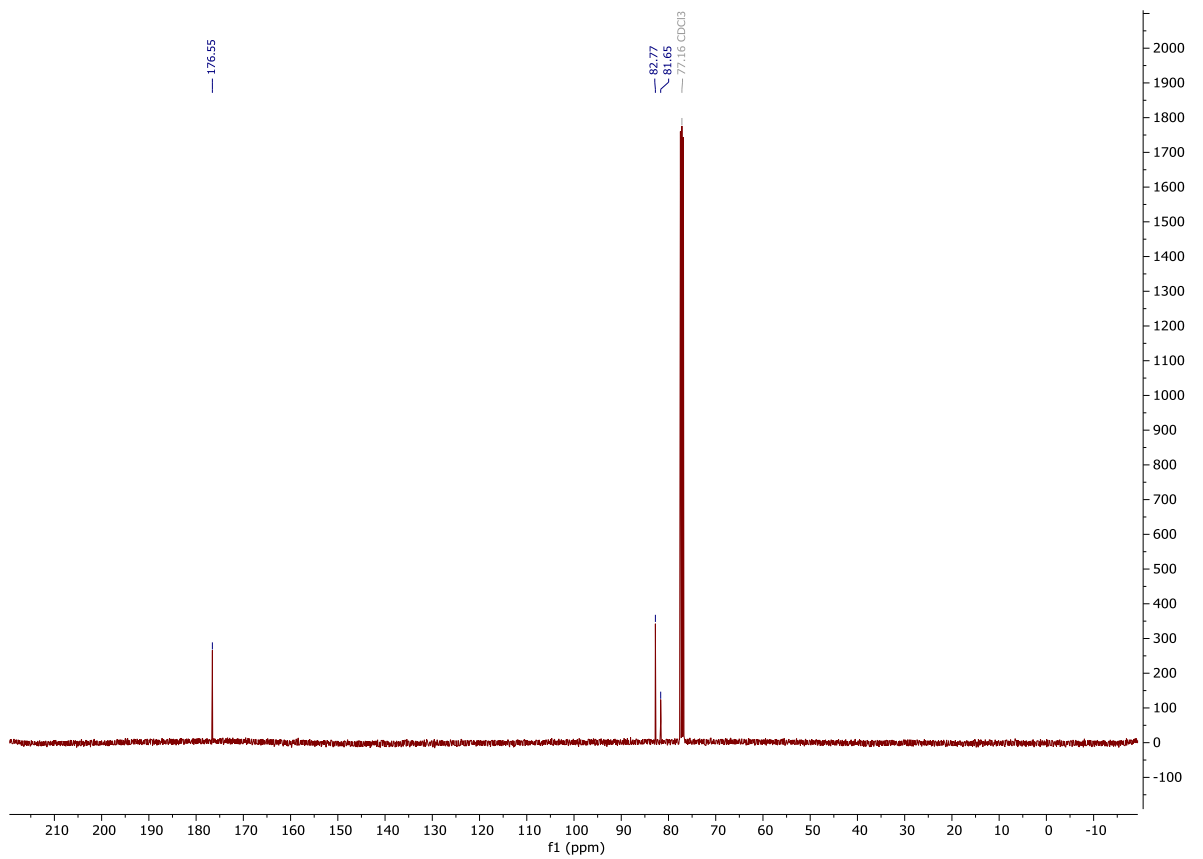
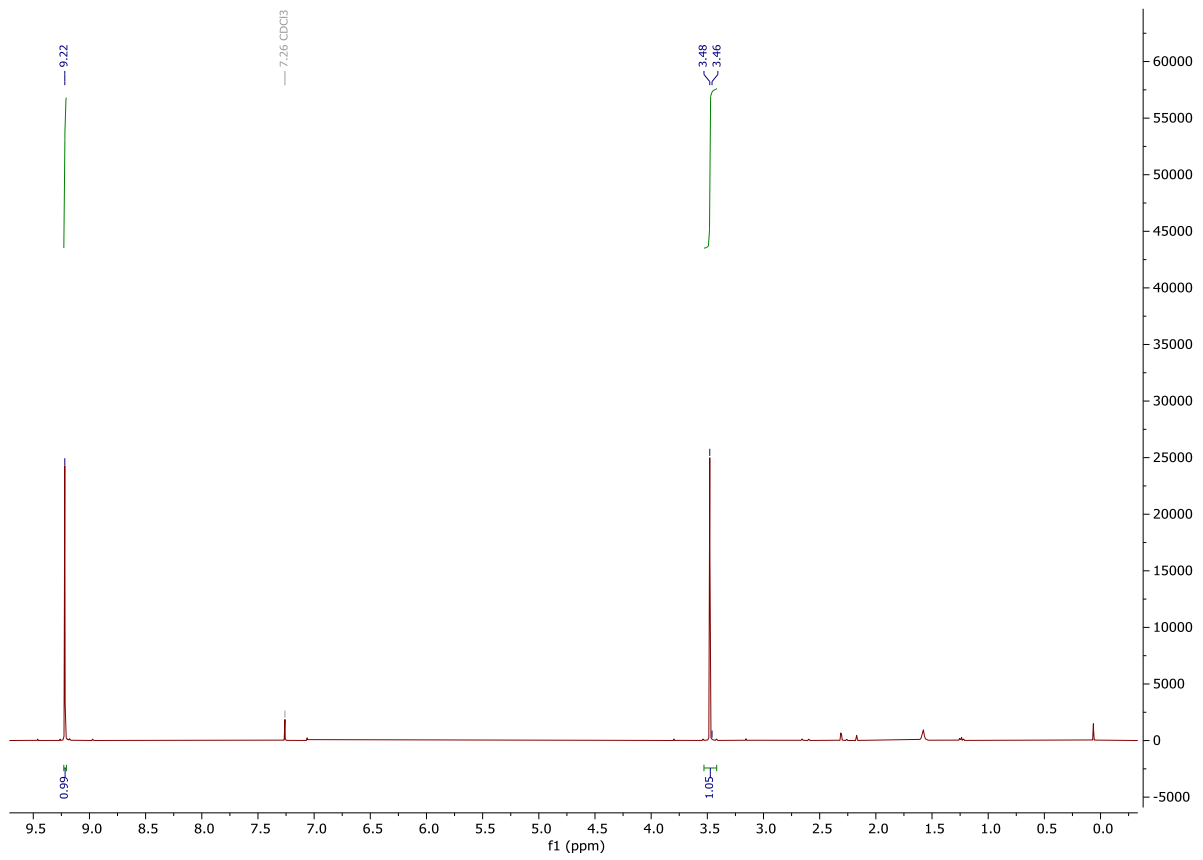


Chromtrioxid (52.5 g, 525 mmol, 1.05 Äquiv.) wurden in Wasser (100 mL) gelöst. Die Lösung wurde auf 0 °C gekühlt und konzentrierte Schwefelsäure (34.0 mL) langsam zugegeben, wobei die Temperatur bei 0 °C gehalten wurde. Propargylalkohol (29.6 mL, 500 mmol, 1.0 Äquiv.) wurden in Wasser (50.0 mL) gelöst und konzentrierte Schwefelsäure bei 0 °C zugegeben. Die Propargylalkohol enthaltende Lösung wurde auf -10 °C gekühlt und die Chromtrioxidlösung wurde über 3.5 h bei -10 °C tropfenweise zugegeben. Das Gemisch wurde nach Zugabe der kompletten Chromtrioxidlösung für bei rt für weitere 40 min gerührt. Die wässrige Lösung wurde mit Xylol extrahiert (2 x). Die vereinten organischen Phasen wurden mit Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Destillation der organischen Phase ergab Propionaldehyd als farblose Flüssigkeit (1.55 g, 28.8 mmol, 5 %).

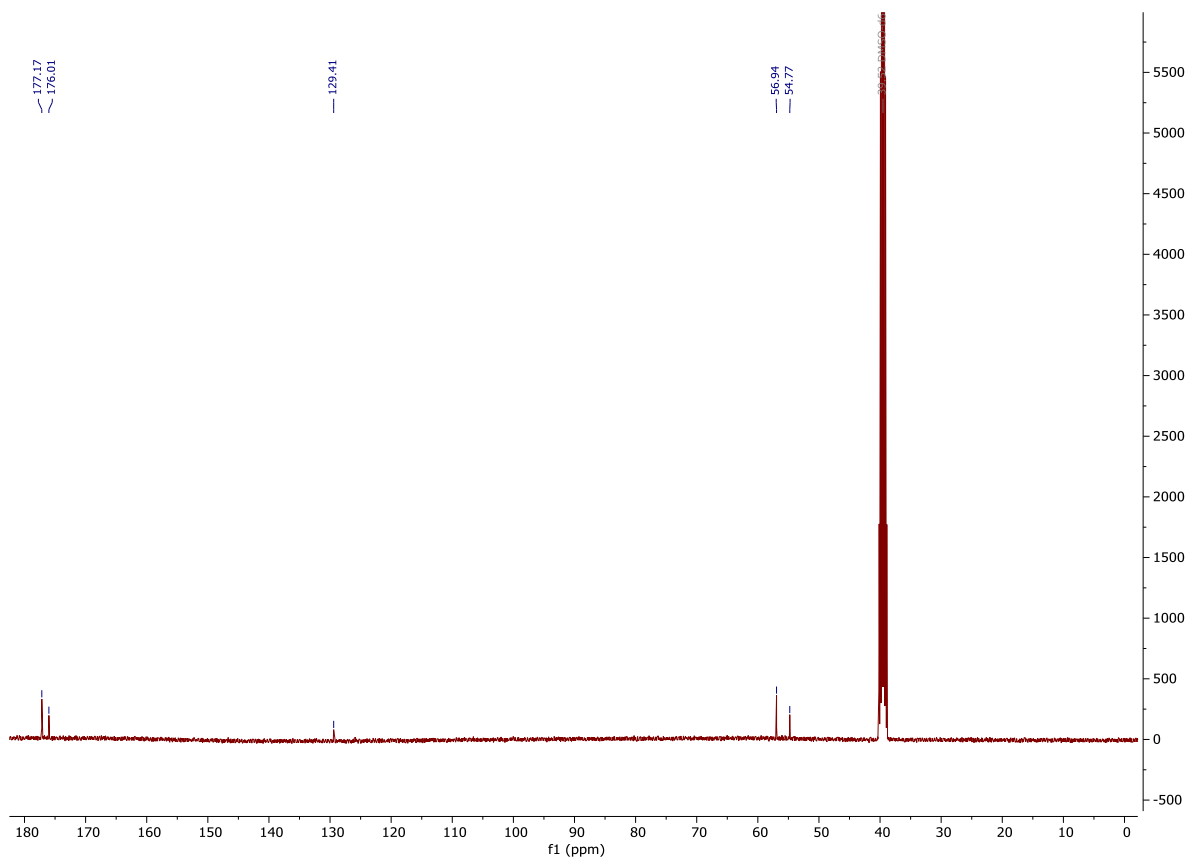
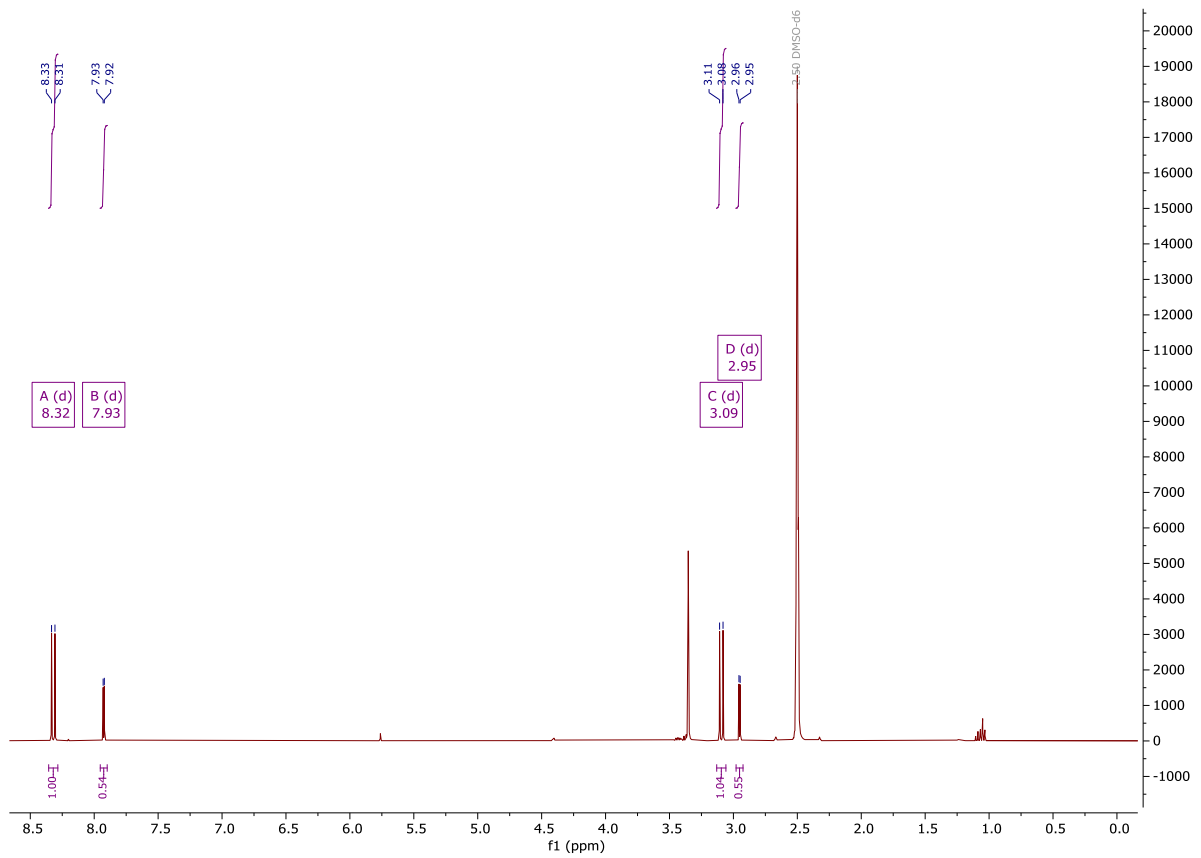
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 9.22 (s, 1H, H¹), 3.48 (s, 1H, H³).

¹³C NMR {¹H} (101 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 176.6 (1C, C¹), 82.8 (1C, C³), 81.7 (1C, C²).

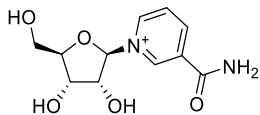
^1H und $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR Spektren von Propionaldehyd.



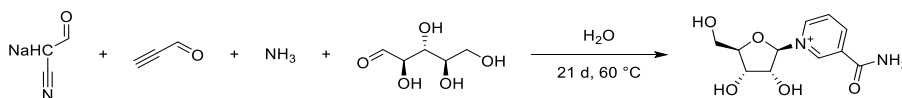
^1H und $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR Spektren von (1-cyano-2-oxoethyl)natrium.



6.2.7 Herstellung von Nikotinamidribosid



6.2.7.1 Herstellung von Nikotinamidribosid ausgehend von Ribose



Ribose (1.0 mmol, 150 mg) wurde in einer wässrigen Ammoniaklösung (1.0 M, 0.5 mL) gelöst, der Kolben verschlossen und bei 60 °C für 3 h gerührt. Eine wässrige (1-Cyano-2-oxoethylnatrium Lösung (0.1 M, 0.5 mL) wurde mit einer wässrigen Propionaldehydlösung (0.1 M, 0.5 mL) vermischt, der Kolben verschlossen und die Lösung bei 60 °C für 3 h gerührt. Die beiden Lösungen wurden vereint und bei 60 °C für 21 d gerührt. 10 µL der Lösung wurden entnommen, mit 990 µL hochreinem Wasser vermischt und mittels UHPLC-QTOF MS mit Methode A analysiert.

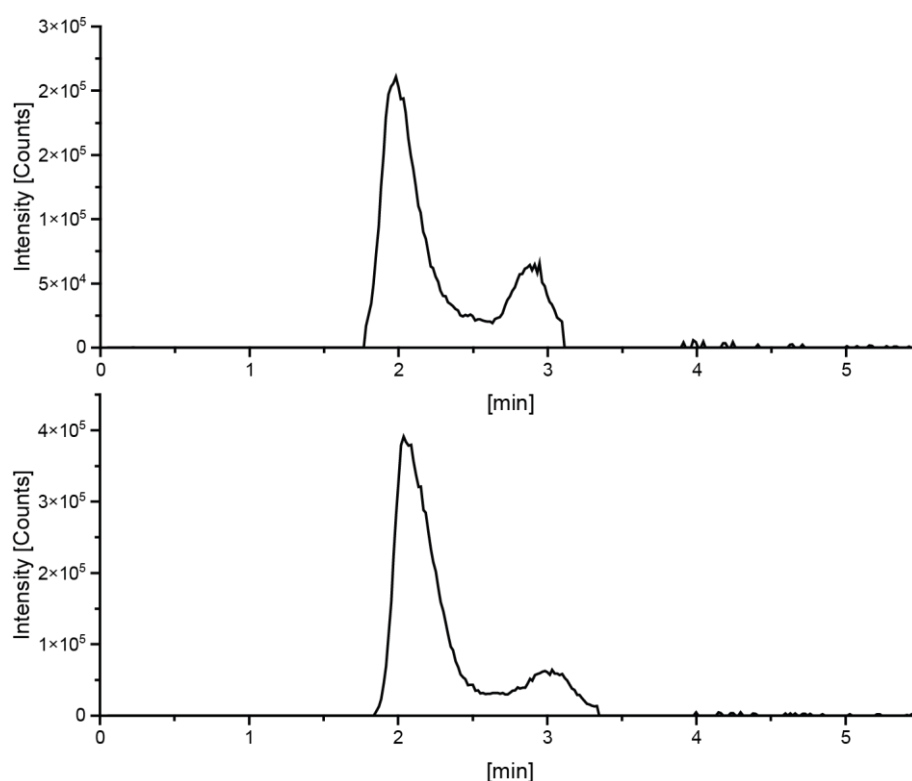
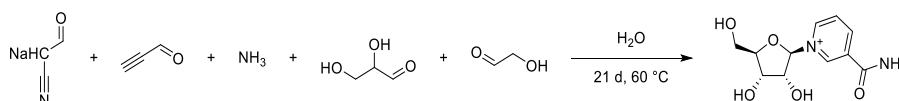


Abbildung 44: Herstellung von Nikotinamidribosid ausgehend von Ribose. Extrahiertes Ionen Chromatogramm (EIC) der Herstellung von Nikotinamidribosid aus Ribose, Propionaldehyd, Ammoniak und Cyanoacetaldehyd, mittels UHPLC QTOF MS (Massenfilter m/z 255.0924 – 255.1026) analysiert. Oberes Chromatogramm zeigt das Reaktionsgemisch nach 21 h bei 60 °C. Unteres Chromatogramm zeigt das Reaktionsgemisch nach 21 d bei 60 °C gespickt mit einer authentischen Nikotinamidribosidprobe.

6.2.7.2 Herstellung von Nikotinamidribosid ausgehend von Glykolaldehyd und Glycerinaldehyd



Glykolaldehyd (0.5 mmol, 30.0 mg, 1.0 Äquiv.) und Glycerinaldehyd (0.5 mmol, 40.5 mg, 1.0 Äquiv.) wurden in einer wässrigen Ammoniaklösung (1.0 M, 0.5 mL) suspendiert, der Kolben verschlossen und bei 60 °C für 3 h gerührt. Eine wässrige (1-Cyano-2-oxoethylnatrium Lösung (0.1 M, 0.5 mL) wurde mit einer wässrigen Propionaldehydlösung (0.1 M, 0.5 mL) vermischt, der Kolben verschlossen und die Lösung bei 60 °C für 3 h gerührt. Die beiden Lösungen wurden vereint und bei 60 °C für 21 d gerührt. 10 µL der Lösung wurden

entnommen, mit 990 μL hochreinem Wasser vermischt und mittels UHPLC QTOF MS mit Methode A analysiert.

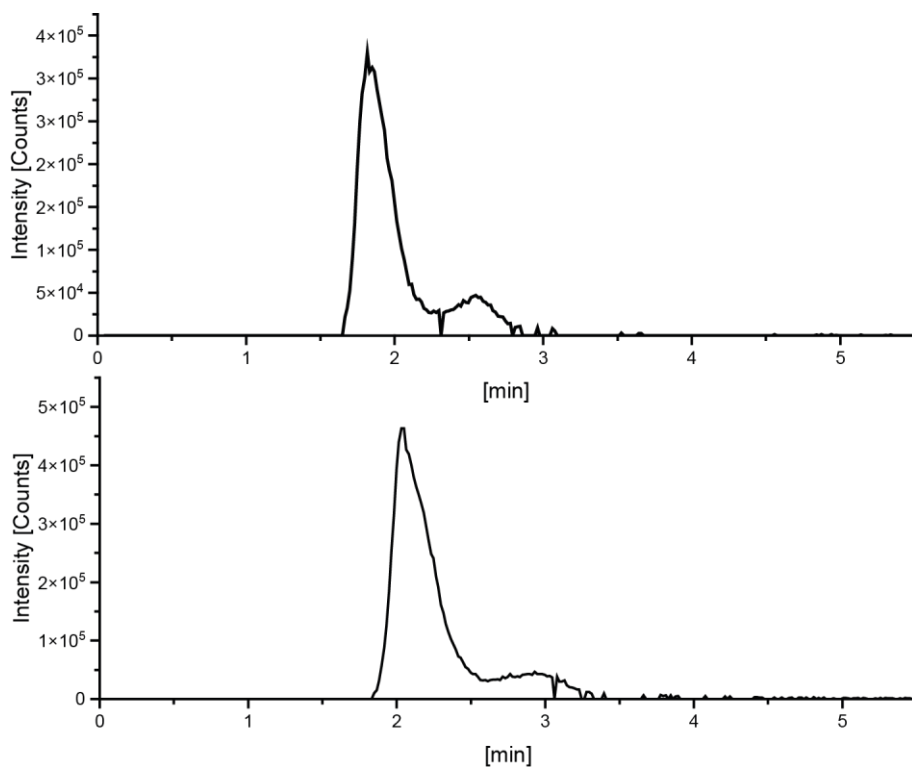
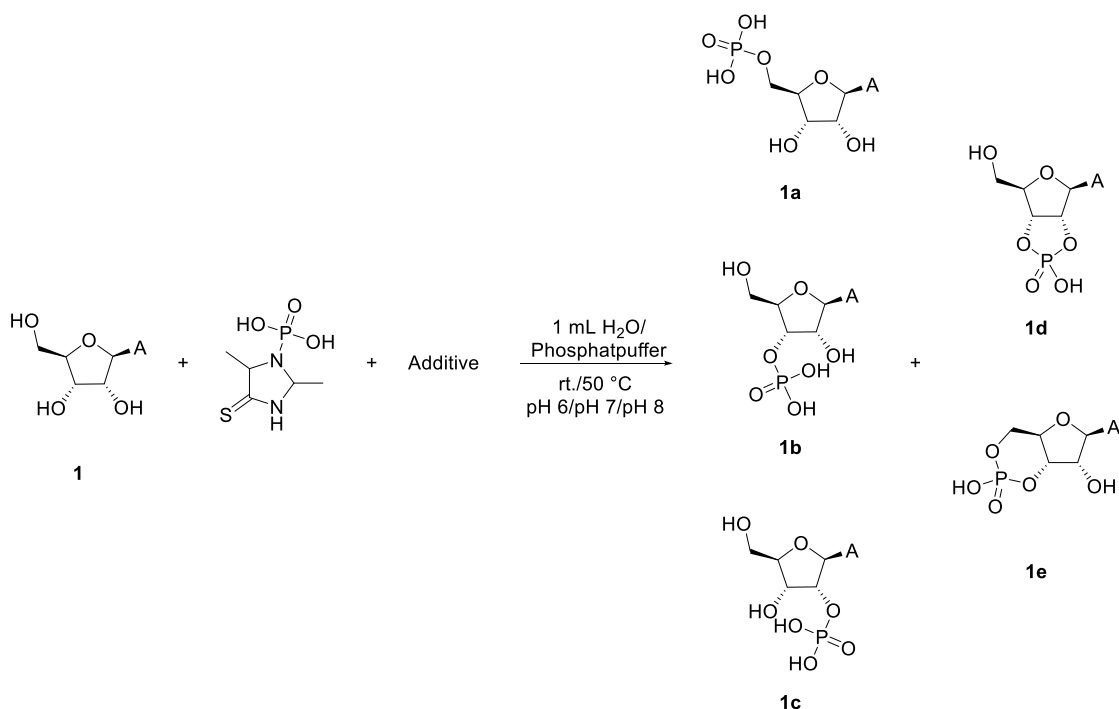


Abbildung 45: Herstellung von Nikotinamidribosid ausgehend von Glykolaldehyd und Glycerinaldehyd. Extrahiertes Ionen Chromatogramm (EIC) der Herstellung von Nikotinamidribosid aus Glykolaldehyd, Glycerinaldehyd, Propionaldehyd, Ammoniak und Cyanoacetaldehyd, mittels UHPLC-QTOF MS (Massenfilter m/z 255.0924 – 255.1026) analysiert. Oberes Chromatogramm zeigt das Reaktionsgemisch nach 21 h bei 60 °C. Unteres Chromatogramm zeigt das Reaktionsgemisch nach 21 d bei 60 °C gespiket mit einer authentischen Nikotinamidribosidprobe.

6.2.8 Phosphorylierungsreaktionen

6.2.8.1 Phosphorylierung von Adenosin mit ITO-P



Adenosin (26.7 mg, 100 μ mol, 1.0 Äquiv.) und ITO-P (105 mg, 500 μ mol, 5.0 Äquiv.) wurden in hochreinem Wasser oder Phosphatpuffer (1.0 mL) gelöst. Additive (50.0 μ mol, 0.5 Äquiv.) wurden hinzugefügt. Das Gemisch wurde bei rt für 10 min gerührt und anschließend der pH-Wert eingestellt. Das Gemisch wurde für 7 d bei der entsprechenden Temperatur gerührt. 10 μ L des Gemischs wurden entnommen, mit 990 μ L hochreinem Wasser vermischt und mittels Orbitrap MS und UHPLC-QTOF MS mit Methode D analysiert.

Experimenteller Teil

Tabelle 5: Getestete Bedingungen für Adenosin Phosphorylierungen mit ITO-P.

Eintrag	Additive	Temperatur
pH 6		
1	-	rt
2	MgCl ₂	rt
3	ZnCl ₂	rt
4*	-	rt
5#	-	rt
6	-	50 °C
7	MgCl ₂	50 °C
8	ZnCl ₂	50 °C
9*	-	50 °C
10#	-	50 °C
pH 8		
11	-	rt
12	MgCl ₂ -	rt
13	ZnCl ₂	rt
14*	-	rt
15#	-	rt
16	-	50 °C
17	MgCl ₂ -	50 °C
18	ZnCl ₂	50 °C
19*	-	50 °C
20#	-	50 °C
pH 7 Phosphatpuffer		
21	-	rt
pH 8 Phosphatpuffer		
22	-	rt

*: pH-Wert wurde täglich eingestellt; #: 1.0 Äquiv. ITO-P wurde verwendet

Tabelle 6: Ergebnisse der getesteten Reaktionsbedingungen für Adenosin Phosphorylierungen mit ITO-P.

Eintrag	Mono-/Cyclo-nukleotid	HRMS (ESI) <i>m/z</i> :		Ausbeute [$\mu\text{mol/mL}$]
		berechnet für	gefunden	
1	1a	$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_7\text{P}^-$		0.98
	1b	[M+H] ⁺ :	346.0560	0.26
			346.0558	
	1d	$\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{N}_5\text{O}_6\text{P}^-$		0.02
		[M+H] ⁺ :	328.0450	-
		328.0452		
2	1a	$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_7\text{P}^-$		1.13
	1b	[M+H] ⁺ :	346.0563	0.21
			346.0558	
	1d	$\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{N}_5\text{O}_6\text{P}^-$		0.06
		[M+H] ⁺ :	328.0453	-
		328.0452		
3	1a	$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_7\text{P}^-$		2.46
	1b	[M+H] ⁺ :	346.0559	0.50
			346.0558	
	1d	$\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{N}_5\text{O}_6\text{P}^-$		0.06
		[M+H] ⁺ :	328.0455	-
		328.0452		
4	1a	$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_7\text{P}^-$		1.18
	1b	[M+H] ⁺ :	346.0563	0.23
			346.0558	
	1d	$\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{N}_5\text{O}_6\text{P}^-$		0.08
		[M+H] ⁺ :	328.0451	-
		328.0452		
5	1a	$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_7\text{P}^-$		0.40
	1b	[M+H] ⁺ :	346.0561	0.08

Experimenteller Teil

		346.0558		
	1d	$C_{10}H_{11}N_5O_6P^-$		0.23
	1e	[M+H] ⁺ :	328.0457	-
			328.0452	
	1a	$C_{10}H_{13}N_5O_7P^-$		0.69
6	1b	[M+H] ⁺ :	346.0561	0.22
			346.0558	
	1d	$C_{10}H_{11}N_5O_6P^-$		-
	1e	[M+H] ⁺ :	-	-
		328.0452		
	1a	$C_{10}H_{13}N_5O_7P^-$		0.53
	1b	[M+H] ⁺ :	346.0559	0.14
			346.0558	
	7	1d	$C_{10}H_{11}N_5O_6P^-$	
1e		[M+H] ⁺ :	328.0443	-
			328.0452	
		1a	$C_{10}H_{13}N_5O_7P^-$	
	1b	[M+H] ⁺ :	346.0562	0.32
			346.0558	
	8	1d	$C_{10}H_{11}N_5O_6P^-$	
1e		[M+H] ⁺ :	-	-
			328.0452	
		1a	$C_{10}H_{13}N_5O_7P^-$	
	1b	[M+H] ⁺ :	346.0561	0.19
			346.0558	
	9	1d	$C_{10}H_{11}N_5O_6P^-$	
1e		[M+H] ⁺ :	329.0440	-
			328.0452	
10		1a		346.0559

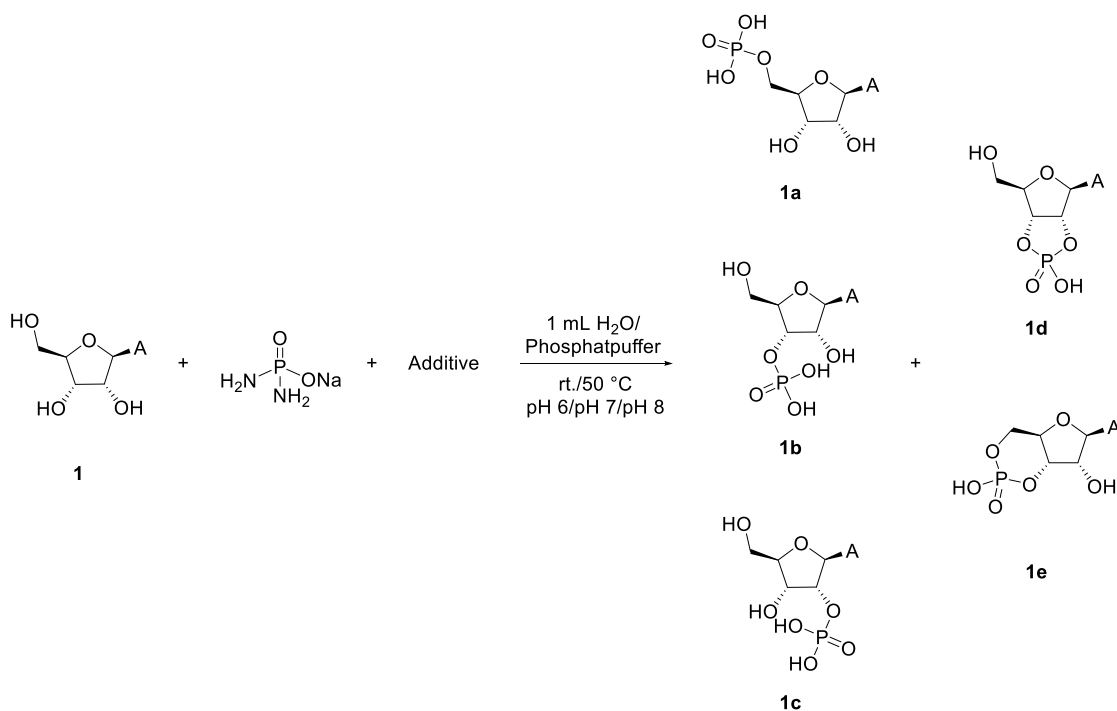
	1b	$C_{10}H_{13}N_5O_7P^-$ [M+H] ⁻ : 346.0558		0.10
	1d	$C_{10}H_{11}N_5O_6P^-$		0.04
	1e	[M+H] ⁻ : 328.0452	328.0456	-
11	1a	$C_{10}H_{13}N_5O_7P^-$		1.52
	1b	[M+H] ⁻ : 346.0558	346.0563	0.44
	1d	$C_{10}H_{11}N_5O_6P^-$		0.11
	1e	[M+H] ⁻ : 328.0452	328.0457	-
12	1a	$C_{10}H_{13}N_5O_7P^-$		1.23
	1b	[M+H] ⁻ : 346.0558	346.0564	0.32
	1d	$C_{10}H_{11}N_5O_6P^-$		0.09
	1e	[M+H] ⁻ : 328.0452	328.0452	-
13	1a	$C_{10}H_{13}N_5O_7P^-$		1.86
	1b	[M+H] ⁻ : 346.0558	346.0562	0.34
	1d	$C_{10}H_{11}N_5O_6P^-$		0.16
	1e	[M+H] ⁻ : 328.0452	328.0451	-
14	1a	$C_{10}H_{13}N_5O_7P^-$		1.07
	1b	[M+H] ⁻ : 346.0558	346.0561	0.21
	1d	$C_{10}H_{11}N_5O_6P^-$		0.11
	1e	[M+H] ⁻ :	328.0457	-

Experimenteller Teil

		328.0452		
15	1a	$C_{10}H_{13}N_5O_7P^-$		0.37
	1b	[M+H] ⁺ :	346.0559	0.11
			346.0558	
	1d	$C_{10}H_{11}N_5O_6P^-$		0.69
	1e	[M+H] ⁺ :	328.0455	-
		328.0452		
16	1a	$C_{10}H_{13}N_5O_7P^-$		0.61
	1b	[M+H] ⁺ :	346.0559	0.17
			346.0558	
	1d	$C_{10}H_{11}N_5O_6P^-$		0.03
	1e	[M+H] ⁺ :	328.0459	-
		328.0452		
17	1a	$C_{10}H_{13}N_5O_7P^-$		0.48
	1b	[M+H] ⁺ :	346.0562	0.18
			346.0558	
	1d	$C_{10}H_{11}N_5O_6P^-$		0.02
	1e	[M+H] ⁺ :	328.0459	-
		328.0452		
18	1a	$C_{10}H_{13}N_5O_7P^-$		0.86
	1b	[M+H] ⁺ :	346.0560	0.23
			346.0558	
	1d	$C_{10}H_{11}N_5O_6P^-$		0.03
	1e	[M+H] ⁺ :	328.0447	-
		328.0452		
19	1a	$C_{10}H_{13}N_5O_7P^-$		0.67
	1b	[M+H] ⁺ :	346.0562	0.19
			346.0558	
	1d	$C_{10}H_{11}N_5O_6P^-$	328.0468	0.02

	1e	[M+H] ⁺ : 328.0452		-
	1a	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₇ P ⁻		0.30
	1b	[M+H] ⁺ : 346.0558	346.0558	0.08
20	1d	C ₁₀ H ₁₁ N ₅ O ₆ P ⁻		0.04
	1e	[M+H] ⁺ : 328.0452	328.0461	-
	1a	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₇ P ⁻		1.44
	1b	[M+H] ⁺ : 346.0558	346.0562	0.56
21	1d	C ₁₀ H ₁₁ N ₅ O ₆ P ⁻		-
	1e	[M+H] ⁺ : 328.0452	-	-
	1a	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₇ P ⁻		1.74
	1b	[M+H] ⁺ : 346.0558	346.0562	0.5
22	1d	C ₁₀ H ₁₁ N ₅ O ₆ P ⁻		-
	1e	[M+H] ⁺ : 328.0452	-	-

6.2.8.2 Phosphorylierung von Adenosin mit DAP (mit Imidazol)



Adenosin (26.7 mg, 100 μ mol, 1.0 Äquiv.) und DAP (105 mg, 500 μ mol, 5.0 Äquiv.) wurden in hochreinem Wasser oder Phosphatpuffer (1.0 mL) gelöst. Additive (50.0 μ mol, 0.5 Äquiv.) und Imidazol (6.81 mg, 100 μ mol, 1.0 Äquiv.) wurden hinzugefügt. Das Gemisch wurde bei rt für 10 min gerührt und anschließend der pH-Wert eingestellt. Das Gemisch wurde für 7 d bei der entsprechenden Temperatur gerührt. 10 μ L des Gemischs wurden entnommen, mit 990 μ L hochreinem Wasser vermischt und mittels Orbitrap MS und UHPLC-QTOF MS mit Methode D analysiert.

Tabelle 7: Getestete Bedingungen für Adenosin Phosphorylierungen mit DAP und Imidazol.

Eintrag	Additive	Temperatur
pH 6		
1	-	rt.
2	MgCl ₂	rt.
3	ZnCl ₂	rt.
4*	-	rt.
5 [#]	-	rt.
6	-	50 °C
7	MgCl ₂	50 °C
8	ZnCl ₂	50 °C
9*	-	50 °C
10 [#]	-	50 °C
11 ⁺	-	rt.
12 ⁺	MgCl ₂	rt.
13 ⁺	ZnCl ₂	rt.
14 ^{**}	-	rt.
15 ^{#+}	-	rt.
16 ⁺	-	50 °C
17 ⁺	MgCl ₂	50 °C
18 ⁺	ZnCl ₂	50 °C
19 ^{**}	-	50 °C
20 ^{#+}	-	50 °C
pH 8		
21	-	rt.
22	MgCl ₂	rt.
23	ZnCl ₂	rt.
24*	-	rt.
25 [#]	-	rt.

Experimenteller Teil

26	-	50 °C
27	MgCl ₂	50 °C
28	ZnCl ₂	50 °C
29*	-	50 °C
30#	-	50 °C
31 ⁺	-	rt.
32 ⁺	MgCl ₂	rt.
33 ⁺	ZnCl ₂	rt.
34**	-	rt.
35# ⁺	-	rt.
36 ⁺	-	50 °C
37 ⁺	MgCl ₂	50 °C
38 ⁺	ZnCl ₂	50 °C
39**	-	50 °C
40# ⁺	-	50 °C
<hr/> pH 7 Phosphatpuffer <hr/>		
41	-	rt
42 ⁺	-	rt
<hr/> pH 8 Phosphatpuffer <hr/>		
43	-	rt
44 ⁺	-	rt

*: pH-Wert wurde täglich eingestellt; #: 1.0 Äquiv. DAP wurde verwendet; ⁺: Imidazol wurde nicht zugegeben

Tabelle 8: Ergebnisse der getesteten Reaktionsbedingungen für Adenosin Phosphorylierungen mit DAP und Imidazol.

Eintrag	Mono-/Cyclo-nukleotid	HRMS (ESI) <i>m/z</i> :		Ausbeute [μmol/mL]
		berechnet für	gefunden	
1	1a	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₇ P ⁻		0.29
	1b	[M+H] ⁺ :	346.0559	0.17
			346.0558	
	1d	C ₁₀ H ₁₁ N ₅ O ₆ P ⁻		0.75
		[M+H] ⁺ :	328.0453	-
		328.0452		
2	1a	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₇ P ⁻		0.30
	1b	[M+H] ⁺ :	346.0558	0.19
			346.0558	
	1d	C ₁₀ H ₁₁ N ₅ O ₆ P ⁻		1.03
		[M+H] ⁺ :	328.0453	-
		328.0452		
3	1a	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₇ P ⁻		0.18
	1b	[M+H] ⁺ :	346.0557	0.64
			346.0558	
	1d	C ₁₀ H ₁₁ N ₅ O ₆ P ⁻		0.78
		[M+H] ⁺ :	328.0454	-
		328.0452		
4	1a	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₇ P ⁻		0.43
	1b	[M+H] ⁺ :	346.0560	0.11
			346.0558	
	1d	C ₁₀ H ₁₁ N ₅ O ₆ P ⁻		0.42
		[M+H] ⁺ :	328.0455	-
		328.0452		
5	1a		346.0559	0.39

Experimenteller Teil

	1b	$C_{10}H_{13}N_5O_7P^-$ [M+H] ⁻ : 346.0558		-
	1d	$C_{10}H_{11}N_5O_6P^-$		0.17
	1e	[M+H] ⁻ : 328.0452	328.0454	-
6	1a	$C_{10}H_{13}N_5O_7P^-$		0.48
	1b	[M+H] ⁻ : 346.0558	346.0557	0.55
	1d	$C_{10}H_{11}N_5O_6P^-$		0.20
	1e	[M+H] ⁻ : 328.0452	328.0450	-
	1a	$C_{10}H_{13}N_5O_7P^-$		0.36
	1b	[M+H] ⁻ : 346.0558	346.0558	0.50
7	1d	$C_{10}H_{11}N_5O_6P^-$		0.36
	1e	[M+H] ⁻ : 328.0452	328.0452	-
	1a	$C_{10}H_{13}N_5O_7P^-$		0.31
	1b	[M+H] ⁻ : 346.0558	346.0557	1.23
8	1d	$C_{10}H_{11}N_5O_6P^-$		0.36
	1e	[M+H] ⁻ : 328.0452	328.0452	0.27
	1a	$C_{10}H_{13}N_5O_7P^-$		0.47
	1b	[M+H] ⁻ : 346.0558	346.0560	0.25
9	1d	$C_{10}H_{11}N_5O_6P^-$		0.37
	1e	[M+H] ⁻ :	328.0452	-

328.0452				
10	1a	$C_{10}H_{13}N_5O_7P^-$		0.20
	1b	[M+H] ⁻ :	346.0558	0.08
			346.0558	
	1d	$C_{10}H_{11}N_5O_6P^-$		0.12
	1e	[M+H] ⁻ :	328.0454	-
		328.0452		
11	1a	$C_{10}H_{13}N_5O_7P^-$		0.23
	1b	[M+H] ⁻ :	346.0559	0.07
			346.0558	
	1d	$C_{10}H_{11}N_5O_6P^-$		0.18
	1e	[M+H] ⁻ :	328.0454	-
		328.0452		
12	1a	$C_{10}H_{13}N_5O_7P^-$		0.23
	1b	[M+H] ⁻ :	346.0557	0.07
			346.0558	
	1d	$C_{10}H_{11}N_5O_6P^-$		0.12
	1e	[M+H] ⁻ :	328.0452	-
		328.0452		
13	1a	$C_{10}H_{13}N_5O_7P^-$		0.20
	1b	[M+H] ⁻ :	346.0559	0.10
			346.0558	
	1d	$C_{10}H_{11}N_5O_6P^-$		0.29
	1e	[M+H] ⁻ :	328.0451	-
		328.0452		
14	1a	$C_{10}H_{13}N_5O_7P^-$		0.47
	1b	[M+H] ⁻ :	346.0557	0.08
			346.0558	
	1d	$C_{10}H_{11}N_5O_6P^-$	328.0449	0.10

Experimenteller Teil

	1e	[M+H] ⁻ : 328.0452	-
15	1a	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₇ P ⁻	0.26
	1b	[M+H] ⁻ : 346.0558	346.0557 0.07
	1d	C ₁₀ H ₁₁ N ₅ O ₆ P ⁻	0.15
	1e	[M+H] ⁻ : 328.0452	328.0454 -
16	1a	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₇ P ⁻	0.17
	1b	[M+H] ⁻ : 346.0558	346.0558 0.23
	1d	C ₁₀ H ₁₁ N ₅ O ₆ P ⁻	0.17
	1e	[M+H] ⁻ : 328.0452	328.0453 -
17	1a	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₇ P ⁻	0.22
	1b	[M+H] ⁻ : 346.0558	346.0556 0.35
	1d	C ₁₀ H ₁₁ N ₅ O ₆ P ⁻	0.13
	1e	[M+H] ⁻ : 328.0452	328.0452 -
18	1a	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₇ P ⁻	0.36
	1b	[M+H] ⁻ : 346.0558	346.0558 0.60
	1d	C ₁₀ H ₁₁ N ₅ O ₆ P ⁻	0.20
	1e	[M+H] ⁻ : 328.0452	328.0449 -
19	1a	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₇ P ⁻	0.48
	1b	[M+H] ⁻ : 346.0558	346.0557 0.14

	1d	$C_{10}H_{11}N_5O_6P^-$		0.15
	1e	[M+H] ⁻ :	328.0453	-
			328.0452	
	1a	$C_{10}H_{13}N_5O_7P^-$		0.09
	1b	[M+H] ⁻ :	346.0555	0.08
			346.0558	
20	1d	$C_{10}H_{11}N_5O_6P^-$		0.11
	1e	[M+H] ⁻ :	328.0456	-
			328.0452	
	1a	$C_{10}H_{13}N_5O_7P^-$		0.23
	1b	[M+H] ⁻ :	346.0559	0.13
			346.0558	
21	1d	$C_{10}H_{11}N_5O_6P^-$		0.48
	1e	[M+H] ⁻ :	328.0454	-
			328.0452	
	1a	$C_{10}H_{13}N_5O_7P^-$		0.20
	1b	[M+H] ⁻ :	346.0557	0.57
			346.0558	
22	1d	$C_{10}H_{11}N_5O_6P^-$		0.23
	1e	[M+H] ⁻ :	328.0453	-
			328.0452	
	1a	$C_{10}H_{13}N_5O_7P^-$		0.23
	1b	[M+H] ⁻ :	346.0557	0.38
			346.0558	
23	1d	$C_{10}H_{11}N_5O_6P^-$		0.64
	1e	[M+H] ⁻ :	328.0452	-
			328.0452	
	1a	$C_{10}H_{13}N_5O_7P^-$		0.28
24	1b	[M+H] ⁻ :	346.0558	0.10

Experimenteller Teil

		346.0558	
	1d	$C_{10}H_{11}N_5O_6P^-$	0.74
	1e	[M+H] ⁻ : 328.0452	328.0454 -
	1a	$C_{10}H_{13}N_5O_7P^-$	0.36
	1b	[M+H] ⁻ : 346.0558	346.0558 -
25	1d	$C_{10}H_{11}N_5O_6P^-$	0.15
	1e	[M+H] ⁻ : 328.0452	328.0454 -
	1a	$C_{10}H_{13}N_5O_7P^-$	0.23
	1b	[M+H] ⁻ : 346.0558	346.0557 1.38
26	1d	$C_{10}H_{11}N_5O_6P^-$	0.44
	1e	[M+H] ⁻ : 328.0452	328.0453 -
	1a	$C_{10}H_{13}N_5O_7P^-$	0.34
	1b	[M+H] ⁻ : 346.0558	346.0558 1.87
27	1d	$C_{10}H_{11}N_5O_6P^-$	0.37
	1e	[M+H] ⁻ : 328.0452	328.0454 -
	1a	$C_{10}H_{13}N_5O_7P^-$	0.27
	1b	[M+H] ⁻ : 346.0558	346.0558 0.96
28	1d	$C_{10}H_{11}N_5O_6P^-$	0.32
	1e	[M+H] ⁻ : 328.0452	328.0453 -
29	1a		346.0558 0.47

	1b	$C_{10}H_{13}N_5O_7P^-$ [M+H] ⁻ : 346.0558		0.25
	1d	$C_{10}H_{11}N_5O_6P^-$		0.37
	1e	[M+H] ⁻ : 328.0452	328.0453	-
30	1a	$C_{10}H_{13}N_5O_7P^-$		0.14
	1b	[M+H] ⁻ : 346.0558	346.0558	0.21
	1d	$C_{10}H_{11}N_5O_6P^-$		0.33
	1e	[M+H] ⁻ : 328.0452	328.0452	-
31	1a	$C_{10}H_{13}N_5O_7P^-$		0.12
	1b	[M+H] ⁻ : 346.0558	346.0560	-
	1d	$C_{10}H_{11}N_5O_6P^-$		0.08
	1e	[M+H] ⁻ : 328.0452	328.0460	-
32	1a	$C_{10}H_{13}N_5O_7P^-$		0.21
	1b	[M+H] ⁻ : 346.0558	346.0563	0.08
	1d	$C_{10}H_{11}N_5O_6P^-$		0.08
	1e	[M+H] ⁻ : 328.0452	328.0456	-
33	1a	$C_{10}H_{13}N_5O_7P^-$		0.17
	1b	[M+H] ⁻ : 346.0558	346.0557	-
	1d	$C_{10}H_{11}N_5O_6P^-$		0.02
	1e	[M+H] ⁻ :	328.0452	-

Experimenteller Teil

		328.0452		
34	1a	$C_{10}H_{13}N_5O_7P^-$		0.26
	1b	[M+H] ⁻ :	346.0560	0.07
			346.0558	
	1d	$C_{10}H_{11}N_5O_6P^-$		0.14
	1e	[M+H] ⁻ :	328.0456	-
		328.0452		
35	1a	$C_{10}H_{13}N_5O_7P^-$		0.29
	1b	[M+H] ⁻ :	346.0559	-
			346.0558	
	1d	$C_{10}H_{11}N_5O_6P^-$		0.04
	1e	[M+H] ⁻ :	328.0452	-
		328.0452		
36	1a	$C_{10}H_{13}N_5O_7P^-$		0.07
	1b	[M+H] ⁻ :	346.0557	0.17
			346.0558	
	1d	$C_{10}H_{11}N_5O_6P^-$		0.16
	1e	[M+H] ⁻ :	328.0450	-
		328.0452		
37	1a	$C_{10}H_{13}N_5O_7P^-$		0.15
	1b	[M+H] ⁻ :	346.0558	0.51
			346.0558	
	1d	$C_{10}H_{11}N_5O_6P^-$		0.08
	1e	[M+H] ⁻ :	328.0453	-
		328.0452		
38	1a	$C_{10}H_{13}N_5O_7P^-$		0.28
	1b	[M+H] ⁻ :	328.0453	0.81
			346.0558	
	1d	$C_{10}H_{11}N_5O_6P^-$	346.0557	0.05

	1e	[M+H] ⁺ : 328.0452	-
39	1a	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₇ P ⁻	0.24
	1b	[M+H] ⁺ : 346.0558	346.0555 0.13
	1d	C ₁₀ H ₁₁ N ₅ O ₆ P ⁻	0.25
	1e	[M+H] ⁺ : 328.0452	328.0452 -
40	1a	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₇ P ⁻	0.12
	1b	[M+H] ⁺ : 346.0558	346.0556 0.07
	1d	C ₁₀ H ₁₁ N ₅ O ₆ P ⁻	0.10
	1e	[M+H] ⁺ : 328.0452	328.0454 -
41	1a	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₇ P ⁻	0.08
	1b	[M+H] ⁺ : 346.0558	346.0558 -
	1d	C ₁₀ H ₁₁ N ₅ O ₆ P ⁻	0.08
	1e	[M+H] ⁺ : 328.0452	328.0447 -
42	1a	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₇ P ⁻	0.05
	1b	[M+H] ⁺ : 346.0558	346.0555 -
	1d	C ₁₀ H ₁₁ N ₅ O ₆ P ⁻	-
	1e	[M+H] ⁺ : 328.0452	- -
43	1a	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₇ P ⁻	0.18
	1b	[M+H] ⁺ : 346.0558	346.0554 0.08

Experimenteller Teil

	1d	$C_{10}H_{11}N_5O_6P^-$		0.08
	1e	[M+H] ⁺ : 328.0452	328.0445	-
	1a	$C_{10}H_{13}N_5O_7P^-$		0.05
	1b	[M+H] ⁺ : 346.0558	346.0551	-
44	1d	$C_{10}H_{11}N_5O_6P^-$		-
	1e	[M+H] ⁺ : 328.0452	-	-

6.2.8.3 Phosphorylierungsreaktionen mit Guanosin, Cytidin und Uridin

Methode A:

Nukleosid (100 μmol , 1.0 Äquiv.) und das entsprechende Phosphorylierungsmittel (5.0 Äquiv.) wurden in hochreinem Wasser (1.0 mL) gelöst. Zinkchlorid (6.81 mg, 50.0 μmol , 0.5 Äquiv.) und Imidazol (6.81 mg, 100 μmol , 1.0 Äquiv.), falls nötig, wurden hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde für 10 min gerührt und anschließend der pH-Wert auf pH 6 eingestellt. Das Gemisch wurde für 7 d bei rt gerührt. 10 μL des Gemischs wurden entnommen, mit 990 μL hochreinem Wasser vermischt und mittels Orbitrap MS und UHPLC-QTOF MS mit Methode D analysiert. 10 μL des Gemischs wurden entnommen, mit 990 μL hochreinem Wasser vermischt und mittels Orbitrap MS und UHPLC-QTOF MS mit Methode D analysiert.

Methode B:

Nukleosid (100 μmol , 1.0 Äquiv.) und das entsprechende Phosphorylierungsmittel (5.0 Äquiv.) wurden in hochreinem Wasser (1.0 mL) gelöst. Zinkchlorid (6.81 mg, 50.0 μmol , 0.5 Äquiv.) und Imidazol (6.81 mg, 100 μmol , 1.0 Äquiv.), falls nötig, wurden hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde für 10 min gerührt und anschließend der pH-Wert auf pH 8 eingestellt. Das Gemisch wurde für 7 d bei rt gerührt. 10 μL des Gemischs wurden entnommen, mit 990 μL hochreinem Wasser vermischt und mittels Orbitrap MS und UHPLC-QTOF MS mit Methode D analysiert.

Methode C:

Nukleosid (100 μmol , 1.0 Äquiv.) und das entsprechende Phosphorylierungsmittel (5.0 Äquiv.) wurden in pH 7 Phosphatpuffer gelöst. Imidazol (6.81 mg, 100 μmol , 1.0 Äquiv.), falls nötig, wurde hinzugegeben. Das Gemisch wurde für 7 d bei rt gerührt. 10 μL des Gemischs wurden entnommen, mit 990 μL hochreinem Wasser vermischt und mittels Orbitrap MS und UHPLC-QTOF MS mit Methode D analysiert.

Methode D:

Nukleosid (100 μmol , 1.0 Äquiv.) und das entsprechende Phosphorylierungsmittel (5.0 Äquiv.) wurden in pH 8 Phosphatpuffer gelöst. Imidazol (6.81 mg, 100 μmol , 1.0 Äquiv.), falls nötig, wurde hinzugegeben. Das Gemisch wurde für 7 d bei rt gerührt. 10 μL des Gemischs wurden entnommen, mit 990 μL hochreinem Wasser vermischt und mittels Orbitrap MS und UHPLC-QTOF MS mit Methode D analysiert.

Phosphorylierung der RNA-Nucleoside

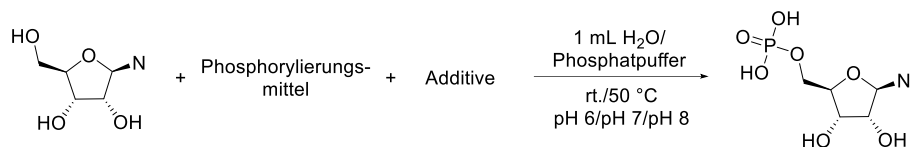


Tabelle 9: Getestete Bedingungen für RNA-Nucleosid Phosphorylierungen.

Eintrag	Nucleosid	Methode	Phosphorylierungs- mittel	pH-Wert
1	Guanosin	A	ITO-P	6
2		B	ITO-P	8
3		C	ITO-P	7
4		D	ITO-P	8
5		A	DAP	6
6		B	DAP	8
7		C	DAP	7
8		D	DAP	8
9		A	DAP + Imidazol	6
10		B	DAP + Imidazol	8
11		C	DAP + Imidazol	7
12		D	DAP + Imidazol	8
13	Cytidin	A	ITO-P	6
14		B	ITO-P	8
15		C	ITO-P	7
16		D	ITO-P	8
17		A	DAP	6
18		B	DAP	8
19		C	DAP	7
20		D	DAP	8

Experimenteller Teil

21		A	DAP + Imidazol	6
22		B	DAP + Imidazol	8
23		C	DAP + Imidazol	7
24		D	DAP + Imidazol	8
<hr/>				
25		A	ITO-P	6
26		B	ITO-P	8
27		C	ITO-P	7
28		D	ITO-P	8
29		A	DAP	6
30	Uridin	B	DAP	8
31		C	DAP	7
32		D	DAP	8
33		A	DAP + Imidazol	6
34		B	DAP + Imidazol	8
35		C	DAP + Imidazol	7
36		D	DAP + Imidazol	8

Tabelle 10: Ergebnisse für RNA-Nukleosid Phosphorylierungen.

Eintrag	Nukleosid	HRMS (ESI) m/z :		Ausbeute [$\mu\text{mol/mL}$]
		berechnet für	gefunden	
1	Guanosin	$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_8\text{P}^-$ [M+H] $^-$: 362.0507	362.0503	0.66
2		$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_8\text{P}^-$ [M+H] $^-$: 362.0507	362.0505	1.61
3		$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_8\text{P}^-$ [M+H] $^-$: 362.0507	362.0500	2.93
4		$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_8\text{P}^-$ [M+H] $^-$: 362.0507	362.0502	1.59
5		$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_8\text{P}^-$ [M+H] $^-$: 362.0507	-	-
6		$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_8\text{P}^-$ [M+H] $^-$: 362.0507	362.0502	-
7		$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_8\text{P}^-$ [M+H] $^-$: 362.0507	362.0498	-
8		$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_8\text{P}^-$ [M+H] $^-$: 362.0507	362.0500	-
9		$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_8\text{P}^-$ [M+H] $^-$: 362.0507	362.0504	-

Experimenteller Teil

10		$C_{10}H_{13}N_5O_8P^-$ [M+H] ⁻ : 362.0507	362.0506	-
11		$C_{10}H_{13}N_5O_8P^-$ [M+H] ⁻ : 362.0507	362.0501	-
12		$C_{10}H_{13}N_5O_8P^-$ [M+H] ⁻ : 362.0507	-	-
13		$C_9H_{13}N_3O_8P^-$ [M+H] ⁻ : 322.0446	322.0439	2.02
14		$C_9H_{13}N_3O_8P^-$ [M+H] ⁻ : 322.0446	322.0440	2.79
15		$C_9H_{13}N_3O_8P^-$ [M+H] ⁻ : 322.0446	322.0441	2.17
16	Cytidin	$C_9H_{13}N_3O_8P^-$ [M+H] ⁻ : 322.0446	322.0436	2.00
17		$C_9H_{13}N_3O_8P^-$ [M+H] ⁻ : 322.0446	322.0439	0.26
18		$C_9H_{13}N_3O_8P^-$ [M+H] ⁻ : 322.0446	322.0440	0.21
19		$C_9H_{13}N_3O_8P^-$ [M+H] ⁻ : 322.0446	322.0443	0.16
20		$C_9H_{13}N_3O_8P^-$	-	0.07

		[M+H] ⁻ : 322.0446		
21		C ₉ H ₁₃ N ₃ O ₈ P ⁻ [M+H] ⁻ : 322.0446	322.0439	-
22		C ₉ H ₁₃ N ₃ O ₈ P ⁻ [M+H] ⁻ : 322.0446	322.0440	0.21
23		C ₉ H ₁₃ N ₃ O ₈ P ⁻ [M+H] ⁻ : 322.0446	322.0438	0.13
24		C ₉ H ₁₃ N ₃ O ₈ P ⁻ [M+H] ⁻ : 322.0446	322.0443	0.05
25		C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₉ P ⁻ [M+H] ⁻ : 323.0286	323.0280	3.10
26		C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₉ P ⁻ [M+H] ⁻ : 323.0286	323.0281	1.12
27	Uridin	C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₉ P ⁻ [M+H] ⁻ : 323.0286	323.0280	3.15
28		C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₉ P ⁻ [M+H] ⁻ : 323.0286	323.0280	7.04
29		C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₉ P ⁻ [M+H] ⁻ : 323.0286	323.0282	0.35
30		C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₉ P ⁻ [M+H] ⁻ : 323.0286	323.0280	-

Experimenteller Teil

	323.0286		
31	$C_9H_{12}N_2O_9P^-$ [M+H]: 323.0286	-	-
32	$C_9H_{12}N_2O_9P^-$ [M+H]: 323.0286	323.0279	-
33	$C_9H_{12}N_2O_9P^-$ [M+H]: 323.0286	323.0279	0.13
34	$C_9H_{12}N_2O_9P^-$ [M+H]: 323.0286	323.0278	-
35	$C_9H_{12}N_2O_9P^-$ [M+H]: 323.0286	323.0280	-
36	$C_9H_{12}N_2O_9P^-$ [M+H]: 323.0286	323.0280	-

Phosphorylierung der DNA-Nukleoside



Tabelle 11: Getestete Bedingungen für DNA-Nukleosid Phosphorylierungen.

Eintrag	Nukleosid	Methode	Phosphorylierungs- Mittel	pH-Wert
1		A	ITO-P	6
2		B	ITO-P	8
3		C	ITO-P	7
4		D	ITO-P	8
5		A	DAP	6
6	deoxyAdenosin	B	DAP	8
7		C	DAP	7
8		D	DAP	8
9		A	DAP + Imidazol	6
10		B	DAP + Imidazol	8
11		C	DAP + Imidazol	7
12		D	DAP + Imidazol	8
13		A	ITO-P	6
14		B	ITO-P	8
15		C	ITO-P	7
16	deoxyGuanosin	D	ITO-P	8
17		A	DAP	6
18		B	DAP	8
19		C	DAP	7
20		D	DAP	8

Experimenteller Teil

21		A	DAP + Imidazol	6
22		B	DAP + Imidazol	8
23		C	DAP + Imidazol	7
24		D	DAP + Imidazol	8
<hr/>				
25		A	ITO-P	6
26		B	ITO-P	8
27		C	ITO-P	7
28		D	ITO-P	8
29		A	DAP	6
30	deoxyCytidin	B	DAP	8
31		C	DAP	7
32		D	DAP	8
33		A	DAP + Imidazol	6
34		B	DAP + Imidazol	8
35		C	DAP + Imidazol	7
36		D	DAP + Imidazol	8
<hr/>				
37		A	ITO-P	6
38		B	ITO-P	8
39		C	ITO-P	7
40		D	ITO-P	8
41		A	DAP	6
42	deoxyThymidin	B	DAP	8
43		C	DAP	7
44		D	DAP	8
45		A	DAP + Imidazol	6
46		B	DAP + Imidazol	8
47		C	DAP + Imidazol	7
48		D	DAP + Imidazol	8

Tabelle 12: Ergebnisse für DNA-Nukleosid Phosphorylierungen.

Eintrag	Nukleosid	HRMS (ESI) m/z :		Ausbeute [$\mu\text{mol/mL}$]
		berechnet für	gefunden	
1	deoxyAdenosin	$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_6\text{P}^-$ [M+H]: 330.0609	330.0599	0.09
2		$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_6\text{P}^-$ [M+H]: 330.0609	330.0614	0.10
3		$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_6\text{P}^-$ [M+H]: 330.0609	330.0606	0.05
4		$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_6\text{P}^-$ [M+H]: 330.0609	330.0602	0.05
5		$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_6\text{P}^-$ [M+H]: 330.0609	330.0613	0.09
6		$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_6\text{P}^-$ [M+H]: 330.0609	330.0605	0.04
7		$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_6\text{P}^-$ [M+H]: 330.0609	330.0612	0.03
8		$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_6\text{P}^-$ [M+H]: 330.0609	330.0595	0.03
9		$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_6\text{P}^-$ [M+H]: 330.0609	330.0612	0.09
10		$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_6\text{P}^-$	330.0608	0.05

Experimenteller Teil

		[M+H]: 330.0609		
11		C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₆ P ⁻ [M+H]: 330.0609	330.0588	0.03
12		C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₆ P ⁻ [M+H]: 330.0609	330.0586	0.03
13		C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₇ P ⁻ [M+H]: 346.0558	346.0544	0.35
14		C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₇ P ⁻ [M+H]: 346.0558	346.0560	0.51
15		C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₇ P ⁻ [M+H]: 346.0558	346.0553	0.37
16	deoxyGuanosin	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₇ P ⁻ [M+H]: 346.0558	-	-
17		C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₇ P ⁻ [M+H]: 346.0558	346.0564	0.47
18		C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₇ P ⁻ [M+H]: 346.0558	346.0562	0.33
19		C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₇ P ⁻ [M+H]: 346.0558	346.0563	0.35
20		C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₇ P ⁻	346.0556	0.35

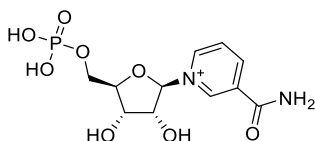
		[M+H]: 346.0558		
21		C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₇ P ⁻ [M+H]: 346.0558	346.0563	0.47
22		C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₇ P ⁻ [M+H]: 346.0558	346.0555	0.36
23		C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₇ P ⁻ [M+H]: 346.0558	346.0544	0.34
24		C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₇ P ⁻ [M+H]: 346.0558	346.0551	0.34
25		C ₉ H ₁₃ N ₃ O ₇ P ⁻ [M+H]: 306.0497	306.0492	4.19
26		C ₉ H ₁₃ N ₃ O ₇ P ⁻ [M+H]: 306.0497	306.0491	4.14
27	deoxyCytidin	C ₉ H ₁₃ N ₃ O ₇ P ⁻ [M+H]: 306.0497	306.0493	4.78
28		C ₉ H ₁₃ N ₃ O ₇ P ⁻ [M+H]: 306.0497	306.0492	3.57
29		C ₉ H ₁₃ N ₃ O ₇ P ⁻ [M+H]: 306.0497	306.0492	0.36
30		C ₉ H ₁₃ N ₃ O ₇ P ⁻ [M+H]:	306.0490	0.29

Experimenteller Teil

		306.0497	
31		$C_9H_{13}N_3O_7P^-$ [M+H]: 306.0497	306.0494 0.29
32		$C_9H_{13}N_3O_7P^-$ [M+H]: 306.0497	306.0474 0.28
33		$C_9H_{13}N_3O_7P^-$ [M+H]: 306.0497	306.0490 0.29
34		$C_9H_{13}N_3O_7P^-$ [M+H]: 306.0497	306.0491 0.29
35		$C_9H_{13}N_3O_7P^-$ [M+H]: 306.0497	306.0495 0.28
36		$C_9H_{13}N_3O_7P^-$ [M+H]: 306.0497	306.0489 -
37		$C_{10}H_{14}N_2O_8P^-$ [M+H]: 321.0493	321.0487 2.68
38	deoxyThymidin	$C_{10}H_{14}N_2O_8P^-$ [M+H]: 321.0493	321.0488 2.79
39		$C_{10}H_{14}N_2O_8P^-$ [M+H]: 321.0493	321.0488 2.48
40		$C_{10}H_{14}N_2O_8P^-$ [M+H]: 321.0493	321.0489 2.95

41	$C_{10}H_{14}N_2O_8P^-$ [M+H]: 321.0493	321.0487	0.25
42	$C_{10}H_{14}N_2O_8P^-$ [M+H]: 321.0493	-	-
43	$C_{10}H_{14}N_2O_8P^-$ [M+H]: 321.0493	-	-
44	$C_{10}H_{14}N_2O_8P^-$ [M+H]: 321.0493	-	-
45	$C_{10}H_{14}N_2O_8P^-$ [M+H]: 321.0493	321.0487	0.21
46	$C_{10}H_{14}N_2O_8P^-$ [M+H]: 321.0493	321.0486	-
47	$C_{10}H_{14}N_2O_8P^-$ [M+H]: 321.0493	321.0486	-
48	$C_{10}H_{14}N_2O_8P^-$ [M+H]: 321.0493	321.0488	-

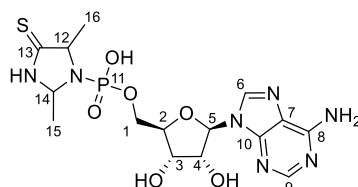
6.2.8.4 Phosphorylierung von Nikotinamidmononukleotid (NMN)



Nikotinamidribosid chlorid (29.0 mg, 0.1 mmol, 1.0 Äquiv.) und ITO-P (105 mg, 0.5 mmol, 5.0 Äquiv.) wurden in Zinkchlorid (7.0 mg, 50 μ mol, 0.5 Äquiv.) enthaltenem hochreinem Wasser (1.0 mL) oder in Phosphatpuffer (1.0 mL) gelöst. Die Reaktionen in Wasser wurde mit NaOH (2.0 M) und wässriger HCl (2.0 M) auf den entsprechenden pH-Wert eingestellt. Die Gemische wurden für 7 d bei rt gerührt. 10 μ L der Lösung wurde entnommen, mit 990 μ L hochreinem Wasser vermischt und mittels UHPLC-QTOF MS mit Methode B analysiert.

Eintrag	Lösungsmittel	pH	Ausbeute [μ mol/mL]
1	Hochreines Wasser	6	1.4
2	Hochreines Wasser	8	0.8
3	Phosphatpuffer	7	1.6
4	Phosphatpuffer	8	0.4

6.2.9 Herstellung von Adenosin 5'-phosphoro-2,5-dimethylimidazolidin-4-thion (ITO-AMP)



In einen flammengetrockneten Kolben wurde unter Argonatmosphäre Adenosin 5'-monophosphat (347 mg, 1.0 mmol, 1.0 Äquiv.) und 2,5-Dimethylimidazolidin-4-thion gegeben. DMSO (10 mL) und DMF (10 mL) wurden zugegeben und das Gemisch wurde bei rt gerührt, bis sich alles löste. Triphenylphosphin (506 mg, 1.9 mmol, 1.9 Äquiv.) und 1,2-Di(Pyridin-2-yl)sulfan (263 mg, 2.6 mmol, 2.6 Äquiv.) wurden zugegeben und das Gemisch wurde bei rt gerührt, bis sich löste. Triethylamin (0.36 mL, 2.6 mmol, 2.6 Äquiv.) wurde zugegeben und die Reaktion wurde bei rt für 8 h gerührt. Das Gemisch wurde tropfenweise zu einer stark rührenden Lösung aus Aceton (300 mL), trockenem Et₂O (170 mL), Triethylamin (20 mL) und einer gesättigten NaClO₄-Lösung in Aceton (1.4 mL) gegeben. Der Niederschlag wurde abfiltriert und erst mit Aceton:trockenem Et₂O (1:1) und anschließend mit trockenem Et₂O gewaschen. Der Feststoff wurde in einem Exsikkator über NaOH-Plättchen und P₄O₁₀ *in vacuo* über Nacht getrocknet. ITO-P wurde als sein Natriumsalz als weißer Feststoff erhalten (379 mg, 0.79 mmol, 79 %).

HRMS (ESI) *m/z*: berechnet für C₁₅H₂₃N₇O₆PS⁺ [M+H]⁺: 460.1163, gefunden: 460.1160

¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ [ppm] = 8.32 (s, 1H, H⁹), 8.14 (s, 1H, H⁶), 6.03 (d, ³J_{H-H} = 5.4 Hz, 1H, H⁵), 5.21 – 5.10 (m, 1H, H¹⁴), 4.74 – 4.69 (m, 1H, H⁴), 4.45 (dd, ³J_{H-H} = 5.2, 4.0 Hz, 1H, H³), 4.30 (ddd, ³J_{H-H} = 5.1, 2.7 Hz, 1H, H²), 4.18 – 4.09 (m, 1H, H¹²), 4.01 – 3.94 (m, 2H, H¹), 1.34 (d, ³J_{H-H} = 7.0 Hz, 3H, H¹⁶), 1.27 (d, ³J_{H-H} = 5.8 Hz, 3H, H¹⁵).

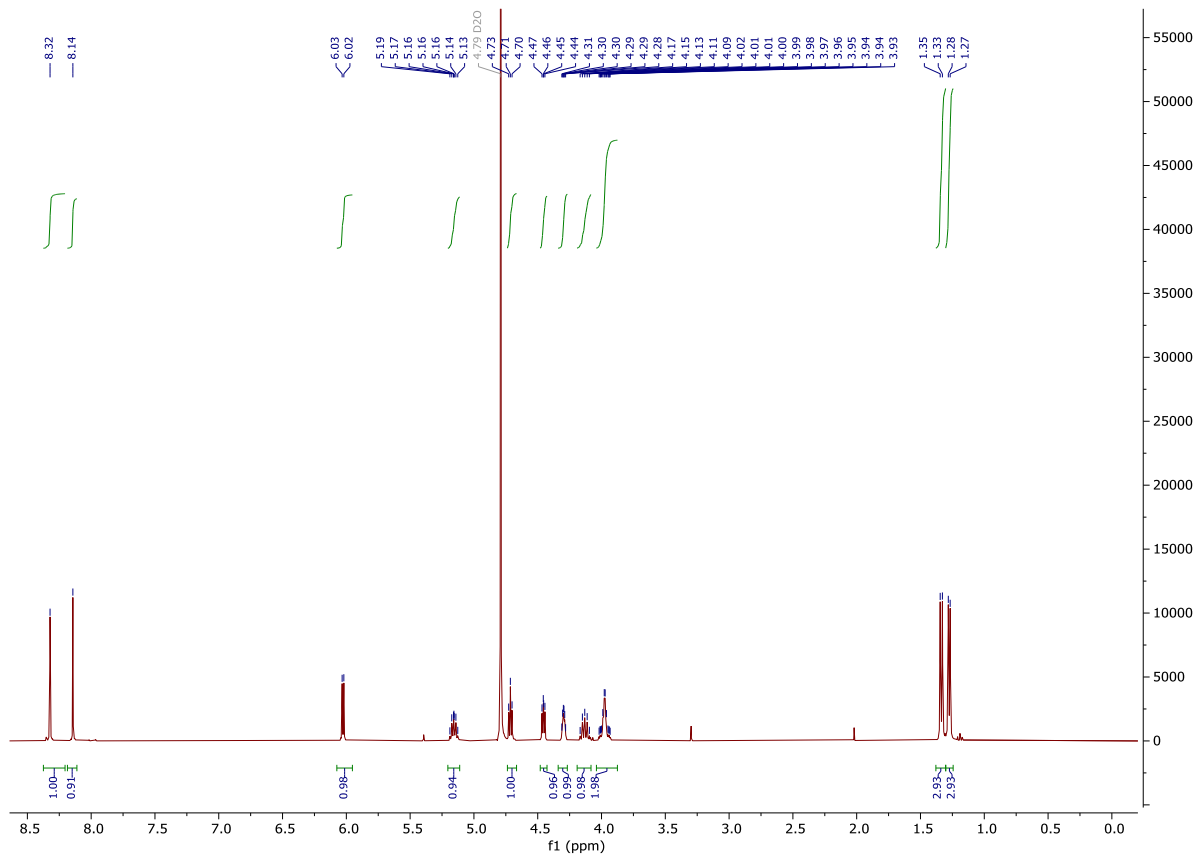
¹³C NMR {¹H} (101 MHz, D₂O) δ [ppm] = 201.8 (d, ³J_{C-P} = 6.9 Hz, 1C, C¹³), 155.6 (1C, C⁸), 152.8 (1C, C⁶), 149.0 (1C, C¹⁰), 139.4 (1C, C⁹), 118.7 (1C, C⁷), 87.1 (1C, C⁵), 83.8 (d, ³J_{C-P} = 9.3 Hz, 1C, C²), 74.6 (d, ²J_{C-P} = 7.0 Hz, 1C, C¹⁴), 73.9 (1C, C⁴), 70.3 (1C, C³), 67.4 (d, ²J_{C-P} = 3.1 Hz, 1C, C¹²), 63.8 (d, ²J_{C-P} = 5.3 Hz, 1C, C¹), 24.4 (d, ³J_{C-P} = 1.8 Hz, 1C, C¹⁵), 23.3 (d, ³J_{C-P} = 1.8 Hz, 1C, C¹⁶).

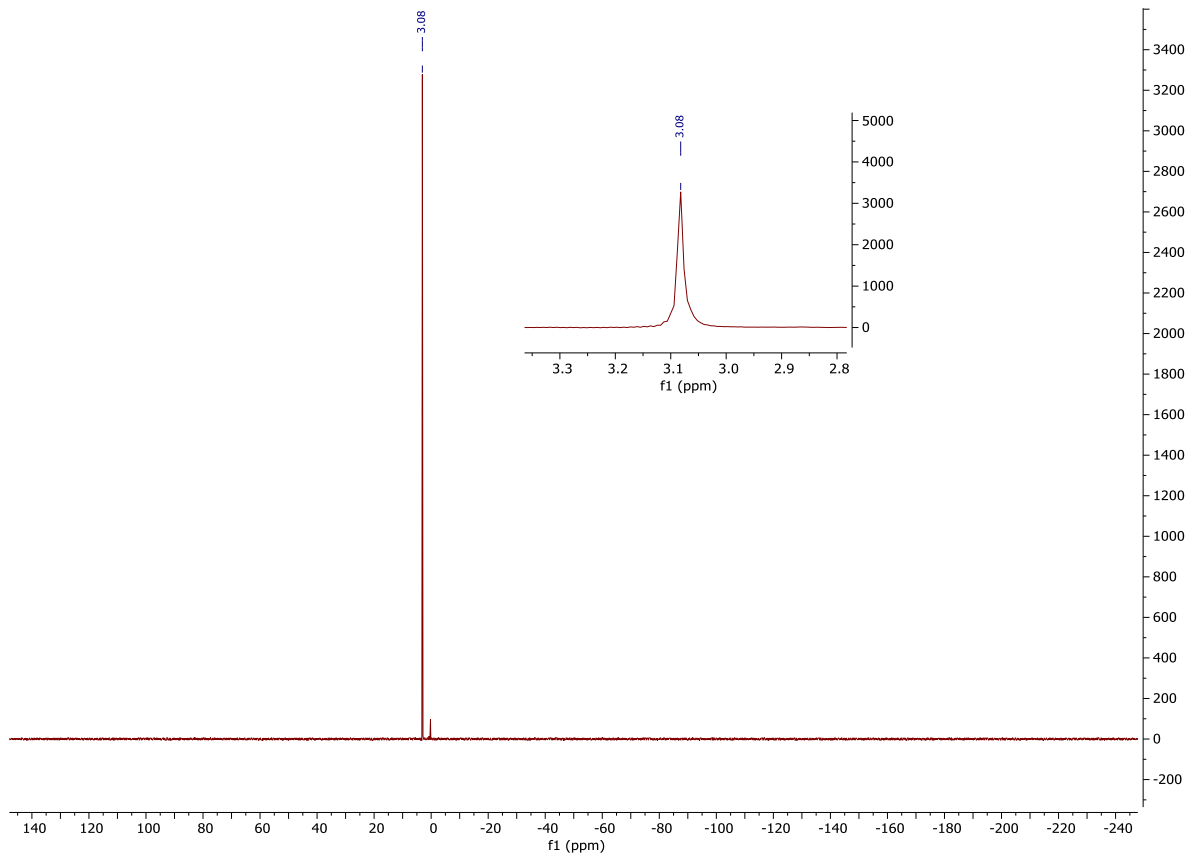
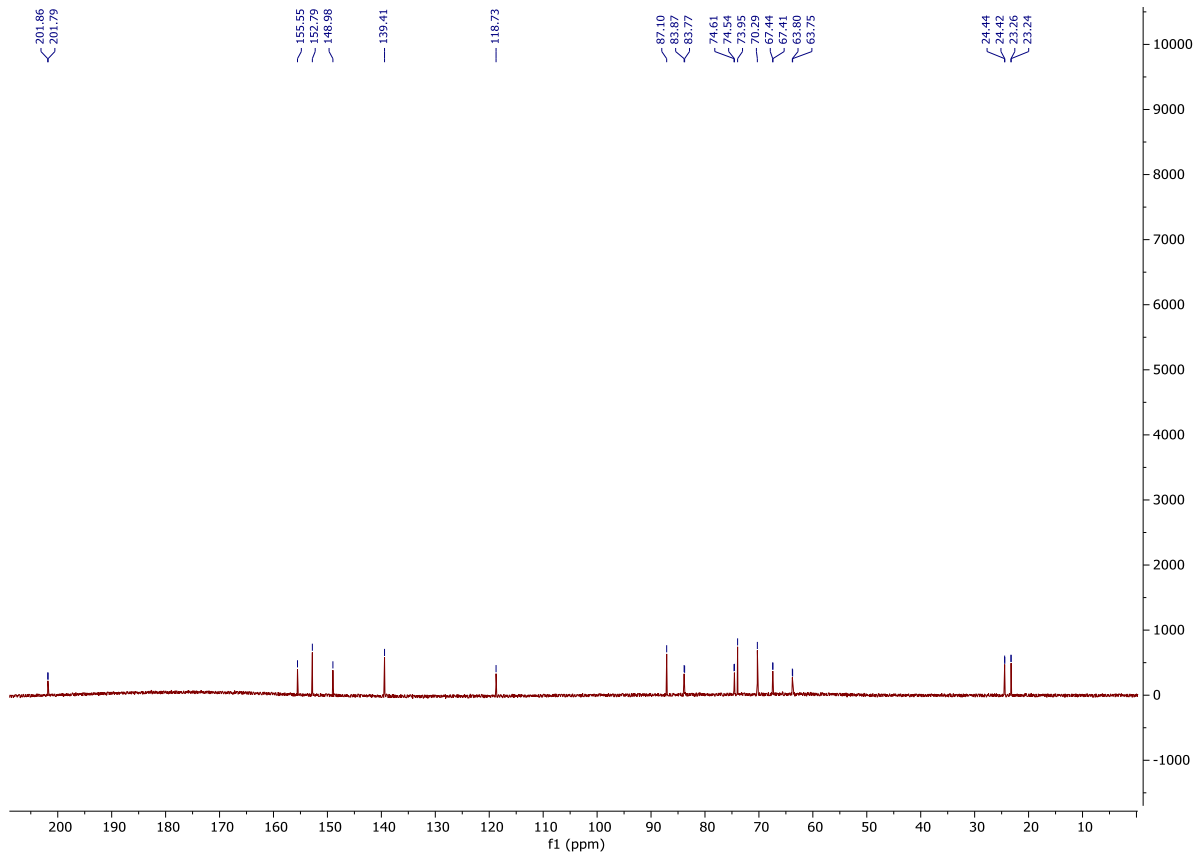
³¹P NMR {¹H} (162 MHz, D₂O) δ [ppm] = 3.08.

Experimenteller Teil

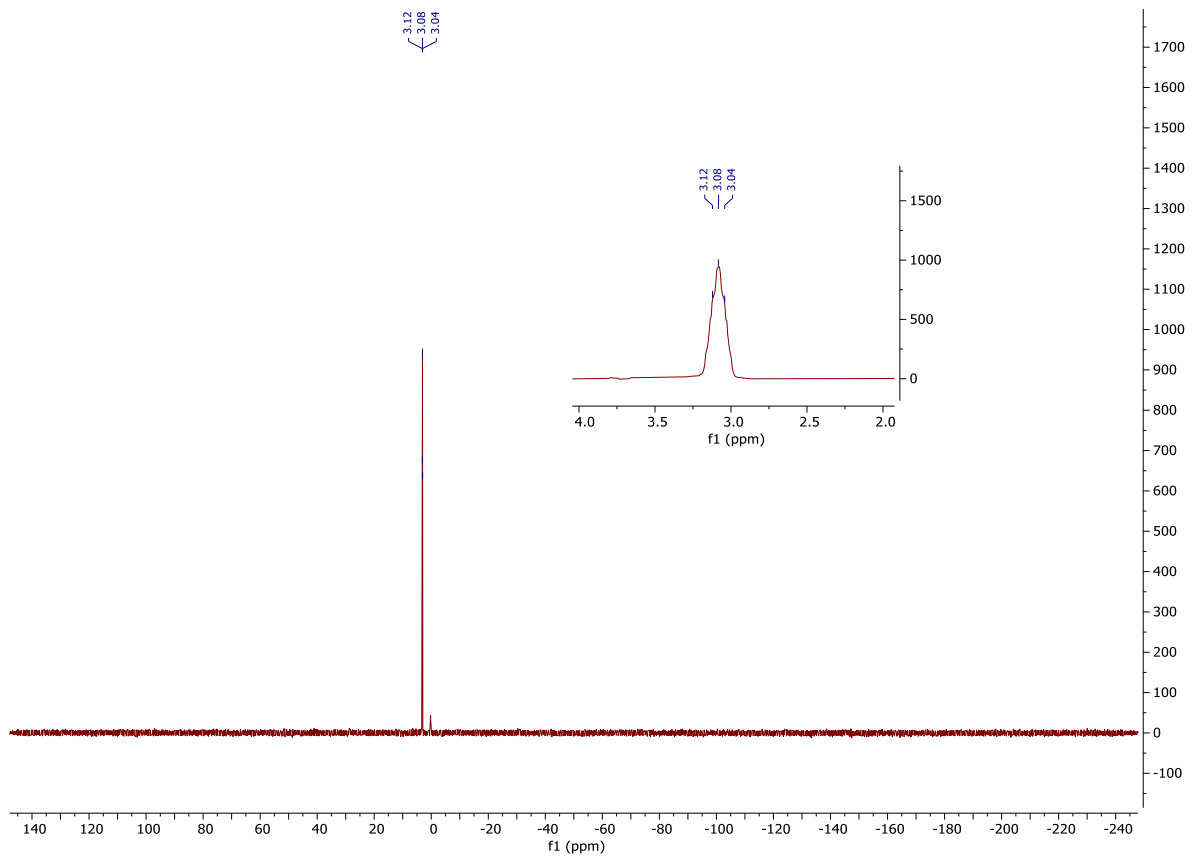
^{31}P NMR (162 MHz, D_2O) δ [ppm] = 3.08 (t, $^3J_{\text{H-P}} = 6.5$ Hz).

^1H , ^{13}C , ^{31}P und $^{31}\text{P}\{\text{H}\}$ -NMR Spektren von ITO-AMP.

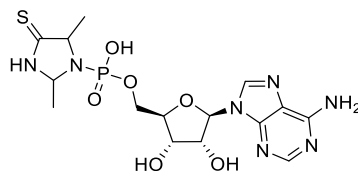




Experimenteller Teil

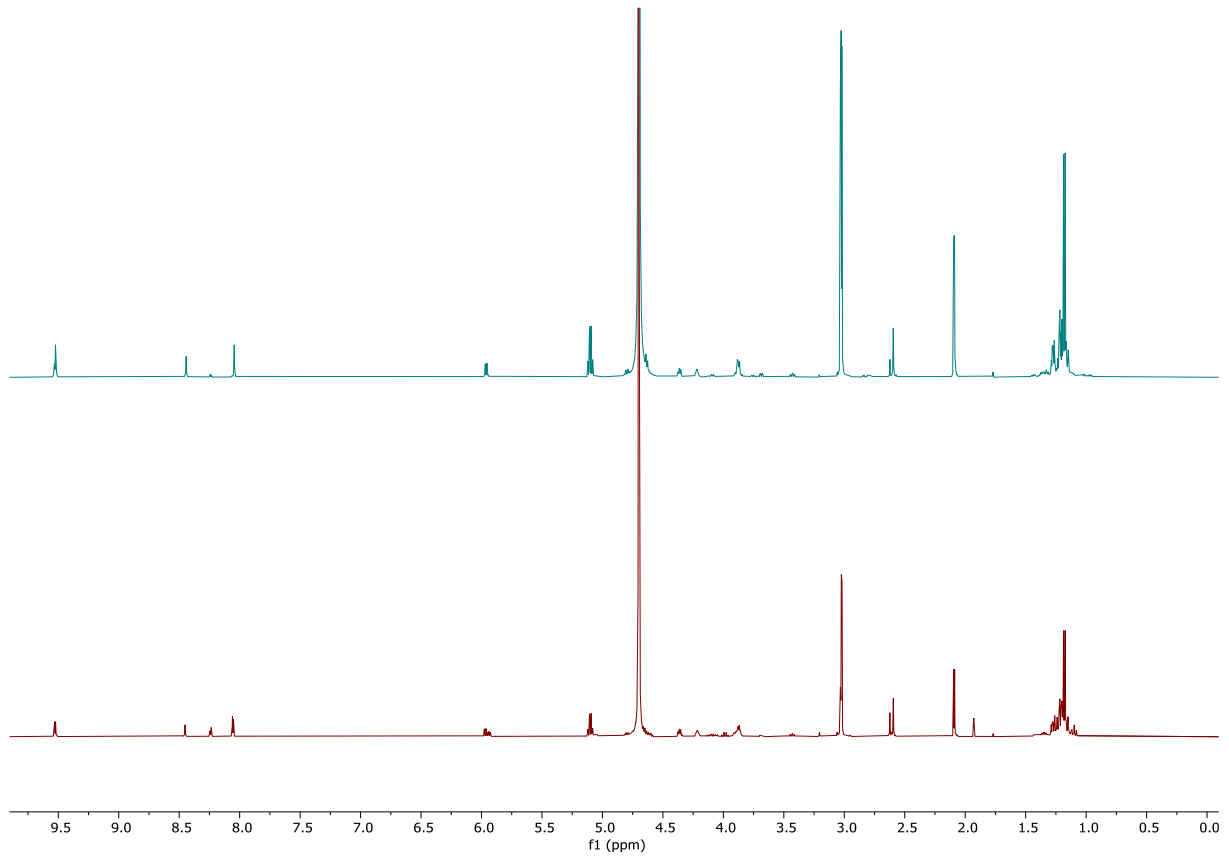


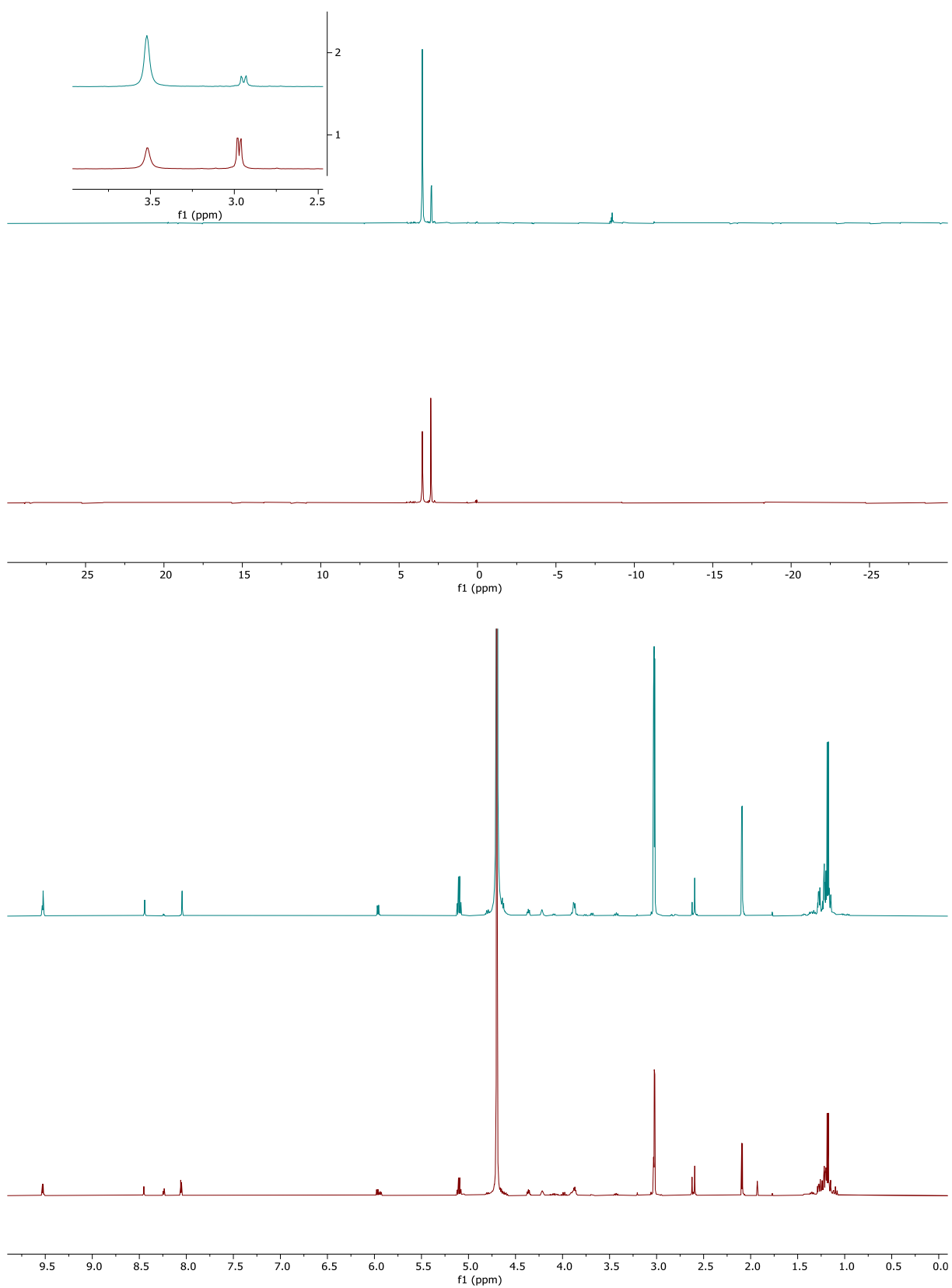
6.2.10 Herstellung von Adenosin 5'-phosphoro-2,5-dimethylimidazolidin-4-thion (ITO-AMP) (Präbiotische Bedingungen)



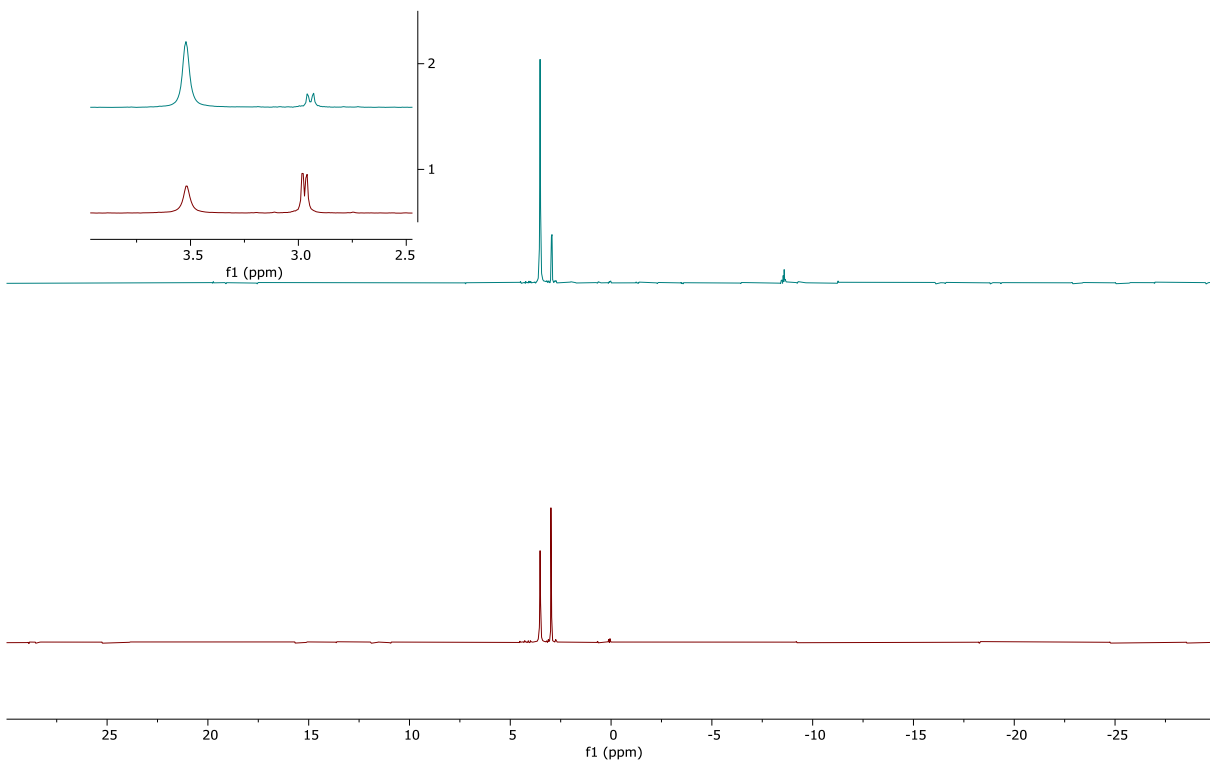
2,5-Dimethylimidazolidin-4-thion (17.4 mg, 0.05 mmol, 1.0 Äquiv.) wurden in D₂O (1.0 mL) gelöst und Adenosin 5'monophosphat (17.4 mg, 0.05 mmol, 1.0 Äquiv.) zugegeben. Der pH-Wert wurde mit wässriger HCl (2 M) und wässriger NaOH (2 M) auf pH 6.5 eingestellt. Acetaldehyd (22.3 µL, 400 µmol, 8.0 Äquiv.) und Methylisocyanid (23.8 µL, 400 µmol, 8.0 Äquiv.) wurden zu dem Gemisch zugegeben und die Lösung mittels NMR Spektroskopie analysiert. Die Ausbeute wurde anhand von relativer Integration der ³¹P NMR Spektren bestimmt. Ausbeute: 16 %.

**^1H und $^{31}\text{P}\{\text{H}\}$ -NMR Spektren von ITO-AMP. Oben: Spektrum des Reaktionsgemischs;
Unten: Spektrum des Reaktionsgemischs, gespiked mit einer authentischen ITO-AMP Probe.**

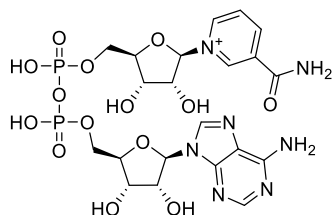




Experimenteller Teil



6.2.11 Herstellung von Nikotinamidadenindinukleotid (NAD⁺)

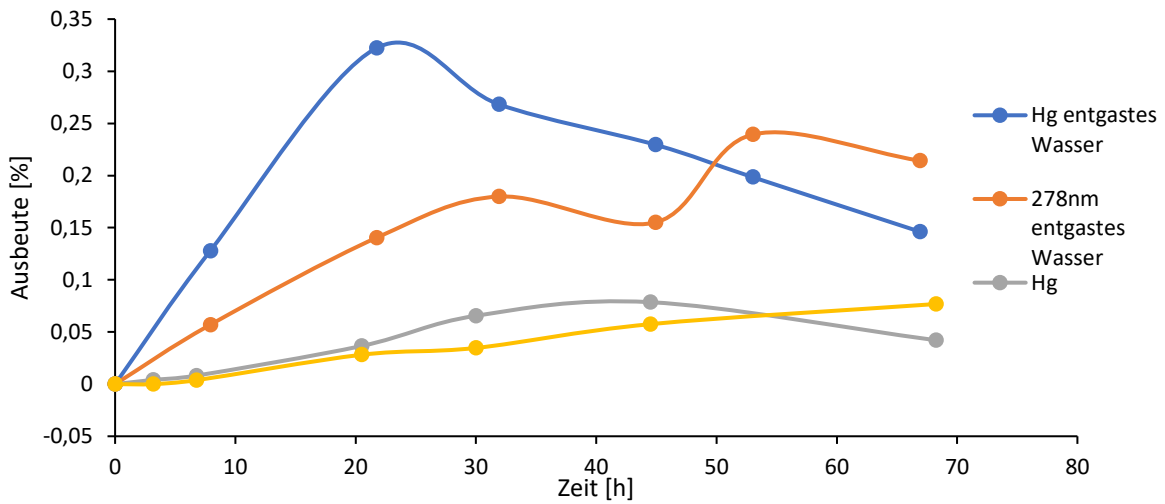
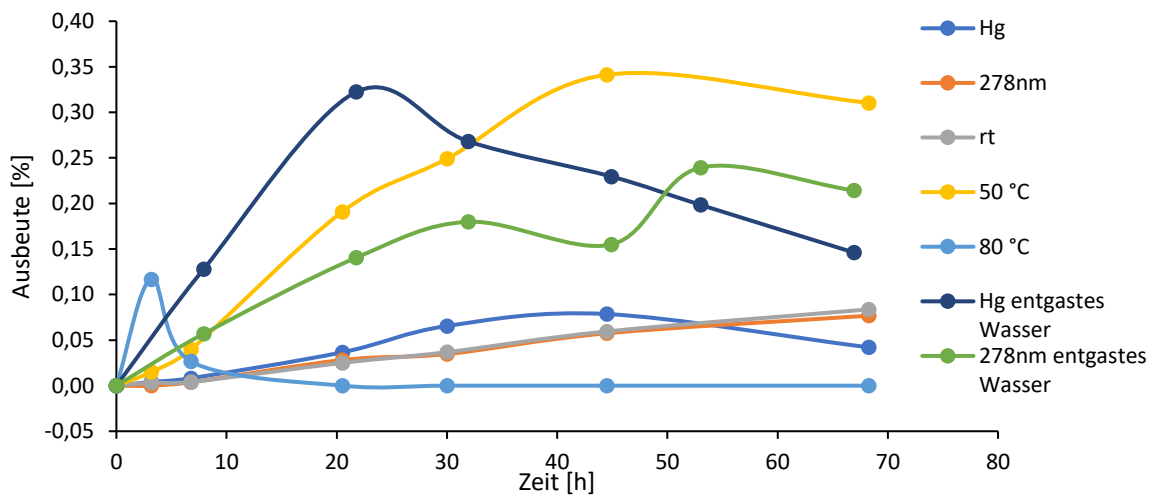


Adenosin 5'-phosphoro-2,5-dimethylimidazolidin-4-thion (50 μmol , 23.0 mg, 1.0 Äquiv.) und Nikotinamidmononukleotid (18.6 mg, 55.7 μmol , 1.0 Äquiv.) wurde in hochreinem Wasser gelöst (500 μL). Die Reaktionslösung wurde bei der entsprechenden Temperatur Bestrahlung für 3 d gerührt. 10 μL der Lösung wurde entnommen, mit 990 μL hochreinem Wasser vermischt und mittels UHPLC-QTOF MS mit Methode C analysiert.

Eintrag	Bestrahlung	Temperatur	Wasser*
1	-	rt	entgast
2	-	50 °C	entgast
3	-	80 °C	entgast
4	278 nm	rt	entgast
5	Hg	rt	entgast
6	278 nm	rt	normales Wasserr
7	Hg	rt	normales Wasser

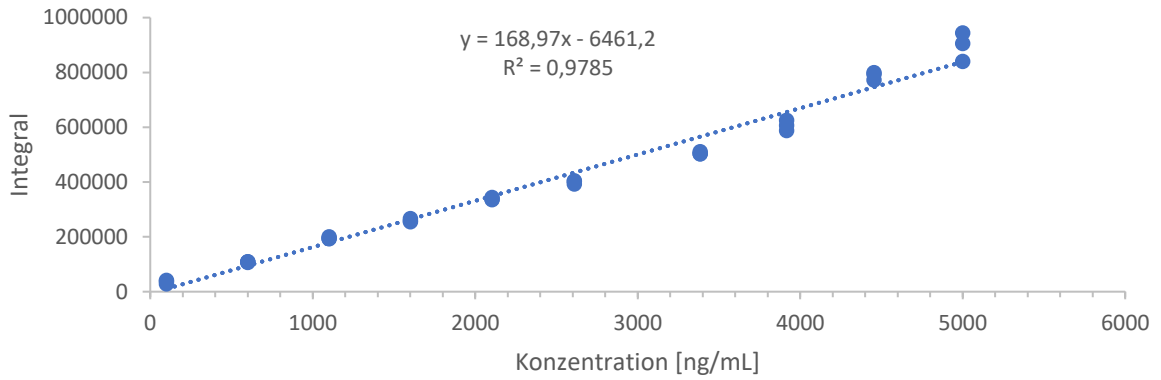
*Hochreines Wasser wurde für alle Reaktionen verwendet; Wasser wurde für einzelne Reaktionen zusätzlich entgast.

Entstehung von NAD⁺ im Verlauf von 3 d.

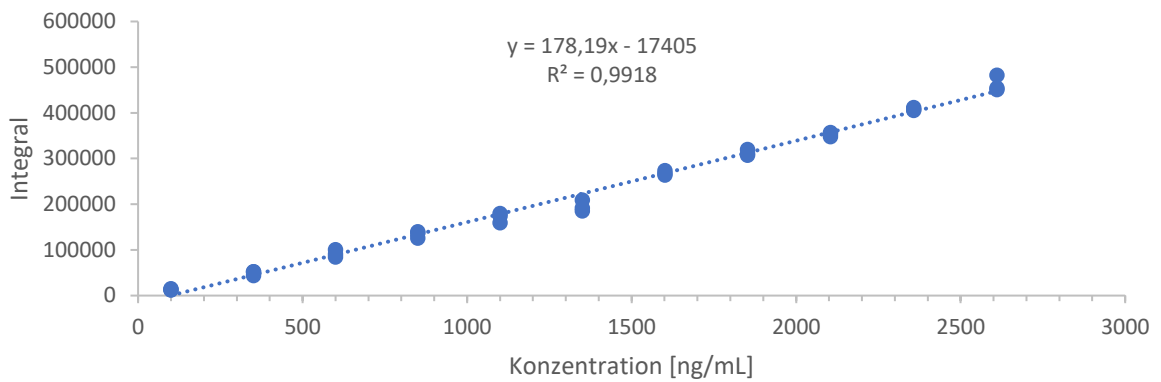


6.3 Verdünnungsreihen

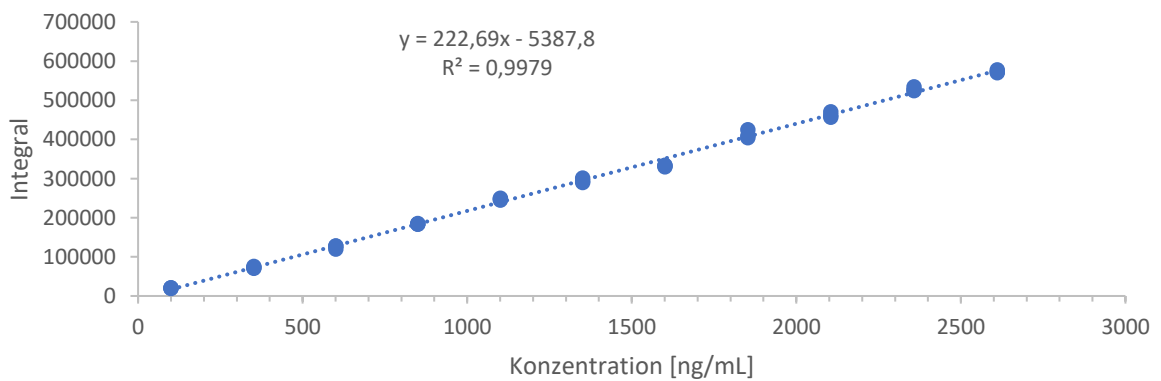
Verdünnungsreihe 5'AMP



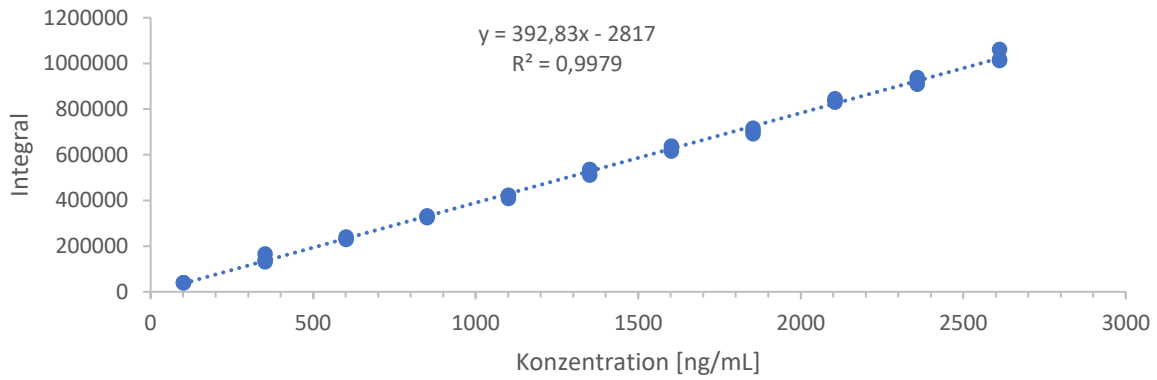
Verdünnungsreihe 3'AMP



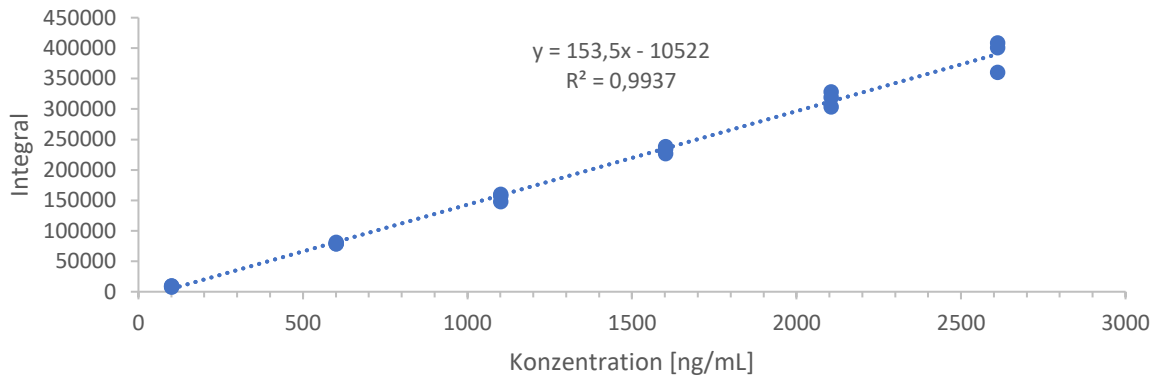
Verdünnungsreihe 2'3'cAMP



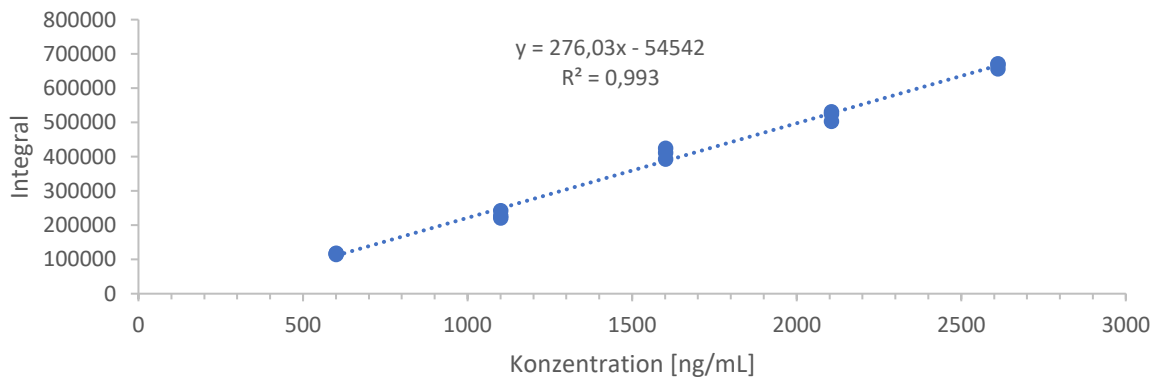
Verdünnungsreihe 3'5'cAMP



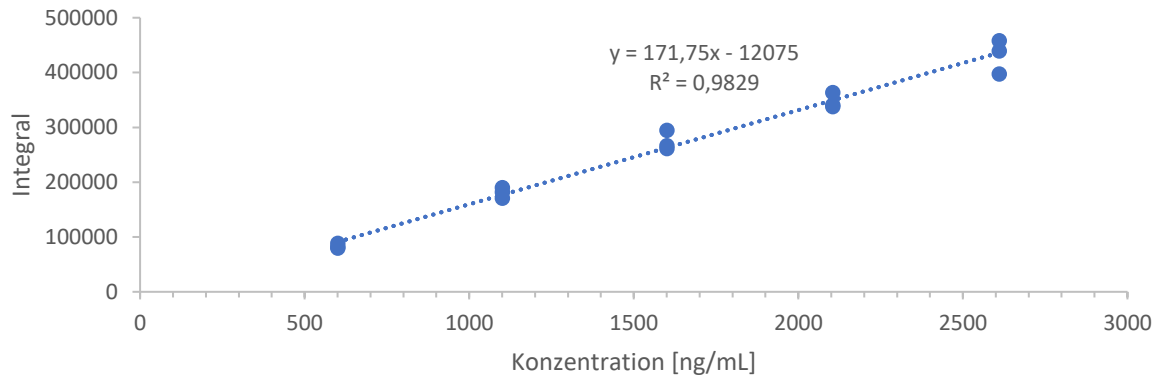
Verdünnungsreihe 5'CMP



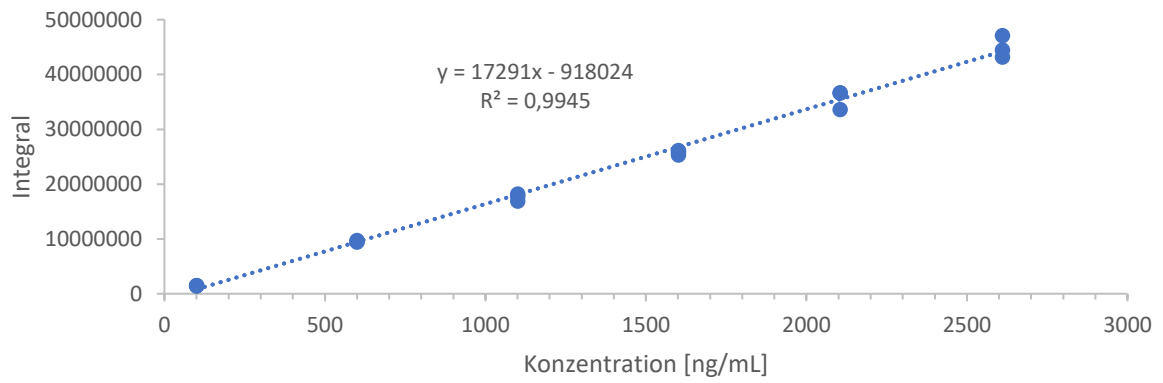
Verdünnungsreihe 5'TMP



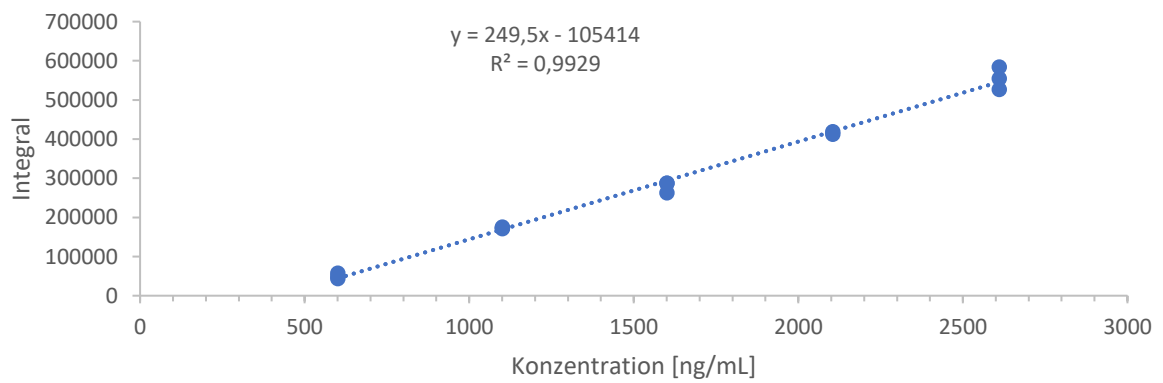
Verdünnungsreihe 5'UMP



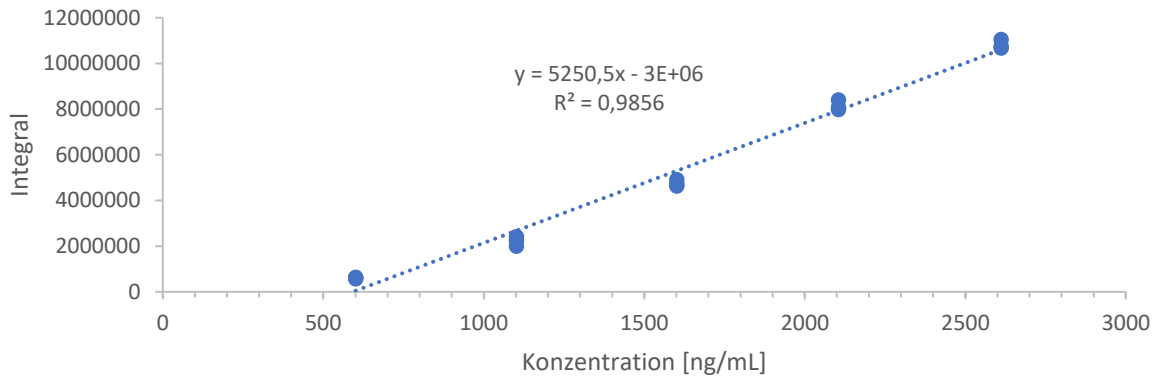
Verdünnungsreihe 5'dAMP



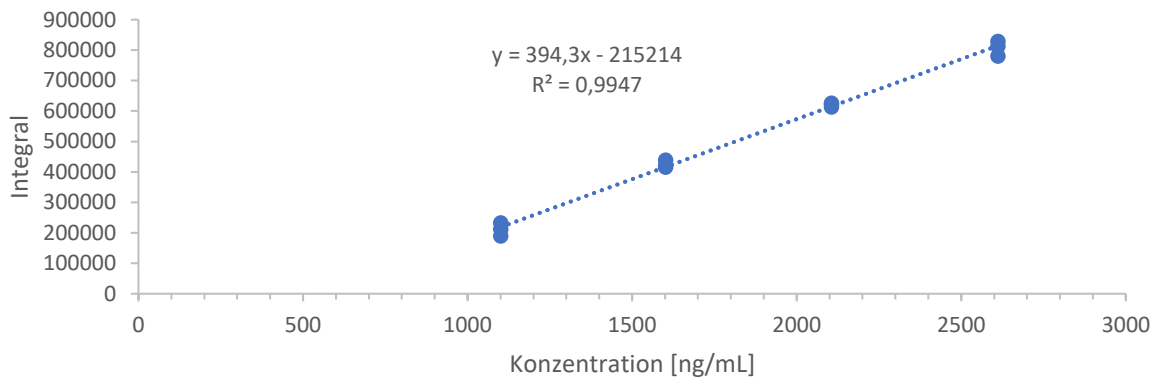
Verdünnungsreihe 5'dCMP



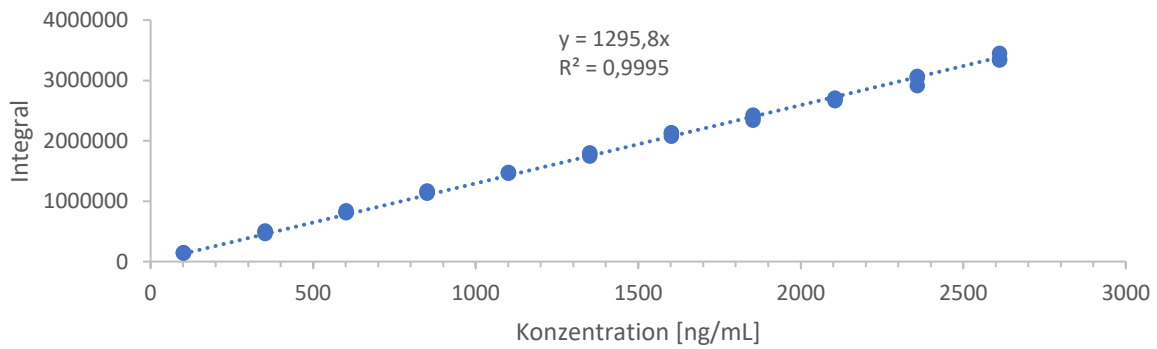
Verdünnungsreihe 5'dGMP

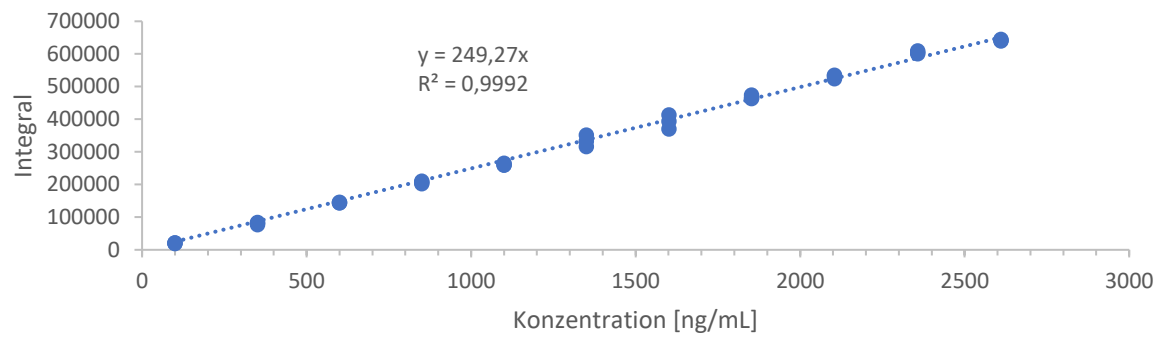


Verdünnungsreihe 5'GMP



Verdünnungsreihe Nicotinamid mononukleotide (NMN)



Verdünnungsreihe von Nikotinamidadenosindinukleotid
(NADH)

7 Literaturverzeichnis

- [1] R. Hyodo, T. Usui, *Science* **2021**, *373*, 742-742.
- [2] M. J. Way, A. D. Del Genio, N. Y. Kiang, L. E. Sohl, D. H. Grinspoon, I. Aleinov, M. Kelley, T. Clune, *Geophysical Research Letters* **2016**, *43*, 8376-8383.
- [3] S. A. Tsokolov, *Astrobiology* **2009**, *9*, 401-412.
- [4] D. E. Koshland, *Science* **2002**, *295*, 2215-2216.
- [5] E. N. Trifonov, *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* **2011**, *29*, 259-266.
- [6] D. Trail, E. B. Watson, N. D. Tailby, *Nature* **2011**, *480*, 79-82.
- [7] J. F. Kasting, *Science* **1993**, *259*, 920-926.
- [8] F. Tian, O. B. Toon, A. A. Pavlov, H. De Sterck, *Science* **2005**, *308*, 1014-1017.
- [9] F. N. Spiess, K. C. Macdonald, T. Atwater, R. Ballard, A. Carranza, D. Cordoba, C. Cox, V. M. D. Garcia, J. Francheteau, J. Guerrero, J. Hawkins, R. Haymon, R. Hessler, T. Juteau, M. Kastner, R. Larson, B. Luyendyk, J. D. Macdougall, S. Miller, W. Normark, J. Orcutt, C. Rangin, *Science* **1980**, *207*, 1421-1433.
- [10] J. B. Corliss, J. A. Baross, S. E. Hoffman, *Oceanologica Acta, Special issue* **1981**.
- [11] J. B. Corliss, J. Dymond, L. I. Gordon, J. M. Edmond, R. P. von Herzen, R. D. Ballard, K. Green, D. Williams, A. Bainbridge, K. Crane, T. H. van Andel, *Science* **1979**, *203*, 1073-1083.
- [12] Y. Yamagata, H. Watanabe, M. Saitoh, T. Namba, *Nature* **1991**, *352*, 516-519.
- [13] W. Gilbert, *Nature* **1986**, *319*, 618.
- [14] G. Wächtershäuser, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1990**, *87*, 200-204.
- [15] L. E. Orgel, *Journal of Molecular Biology* **1968**, *38*, 381-393.
- [16] F. H. C. Crick, *Journal of Molecular Biology* **1968**, *38*, 367-379.
- [17] D. M. Fialho, T. P. Roche, N. V. Hud, *Chemical Reviews* **2020**, *120*, 4806-4830.
- [18] R. Güsten, H. Wiesemeyer, D. Neufeld, K. M. Menten, U. U. Graf, K. Jacobs, B. Klein, O. Ricken, C. Risacher, J. Stutzki, *Nature* **2019**, *568*, 357-359.
- [19] R. A. Alpher, R. Herman, *Nature* **1948**, *162*, 774-775.
- [20] G. Gamow, *Physical Review* **1946**, *70*, 572-573.
- [21] G. Gamow, *Physical Review* **1948**, *74*, 505-506.
- [22] A. Joyce, B. Jain, J. Khoury, M. Trodden, *Physics Reports* **2015**, *568*, 1-98.
- [23] W. F. Bottke, D. Vokrouhlický, S. Marchi, T. Swindle, E. R. D. Scott, J. R. Weirich, H. Levison, *Science* **2015**, *348*, 321-323.
- [24] S. A. Wilde, J. W. Valley, W. H. Peck, C. M. Graham, *Nature* **2001**, *409*, 175-178.
- [25] S. J. Mojzsis, T. M. Harrison, R. T. Pidgeon, *Nature* **2001**, *409*, 178-181.
- [26] G.-F. Xing, X.-L. Wang, Y. Wan, Z.-H. Chen, Y. Jiang, K. Kitajima, T. Ushikubo, P. Gopon, *Scientific Reports* **2014**, *4*, 5143.
- [27] S. Marchi, W. F. Bottke, L. T. Elkins-Tanton, M. Bierhaus, K. Wuennemann, A. Morbidelli, D. A. Kring, *Nature* **2014**, *511*, 578-582.
- [28] N. H. Sleep, K. Zahnle, *Journal of Geophysical Research: Planets* **1998**, *103*, 28529-28544.
- [29] O. Abramov, S. J. Mojzsis, *Nature* **2009**, *459*, 419-422.
- [30] J. F. Kasting, in *Treatise on Geochemistry (Second Edition)* (Eds.: H. D. Holland, K. K. Turekian), Elsevier, Oxford, **2014**, pp. 157-175.

- [31] P. Cloud, *American Journal of Science* **1972**, 272, 537-548.
- [32] E. G. Nisbet, N. H. Sleep, *Nature* **2001**, 409, 1083-1091.
- [33] M. R. Walter, R. Buick, J. S. R. Dunlop, *Nature* **1980**, 284, 443-445.
- [34] A. C. Allwood, M. R. Walter, B. S. Kamber, C. P. Marshall, I. W. Burch, *Nature* **2006**, 441, 714-718.
- [35] Y. Furukawa, Y. Chikaraishi, N. Ohkouchi, N. O. Ogawa, D. P. Glavin, J. P. Dworkin, C. Abe, T. Nakamura, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2019**, 116, 24440-24445.
- [36] U. J. Meierhenrich, L. Nahon, C. Alcaraz, J. H. Bredehöft, S. V. Hoffmann, B. Barbier, A. Brack, *Angewandte Chemie International Edition* **2005**, 44, 5630-5634.
- [37] C. Meinert, S. V. Hoffmann, P. Cassam-Chenai, A. C. Evans, C. Giri, L. Nahon, U. J. Meierhenrich, *Angewandte Chemie International Edition* **2014**, 53, 210-214.
- [38] J. R. Cronin, S. Pizzarello, *Science* **1997**, 275, 951-955.
- [39] D. P. Glavin, J. P. Dworkin, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2009**, 106, 5487-5492.
- [40] K. Soai, T. Shibata, H. Morioka, K. Choji, *Nature* **1995**, 378, 767-768.
- [41] G. E. Tranter, *Nature* **1985**, 318, 172-173.
- [42] J. Crassous, C. Chardonnet, T. Saue, P. Schwerdtfeger, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2005**, 3, 2218-2224.
- [43] G. E. Tranter, *Biosystems* **1987**, 20, 37-48.
- [44] M. Quack, *Angewandte Chemie International Edition* **2002**, 41, 4618-4630.
- [45] A. Collet, M. J. Brienne, J. Jacques, *Chemical Reviews* **1980**, 80, 215-230.
- [46] C. Viedma, *Origins of life and evolution of the biosphere* **2001**, 31, 501-509.
- [47] P. Parsons, *Nature* **1996**, 383, 221.
- [48] C. F. Chyba, P. J. Thomas, L. Brookshaw, C. Sagan, *Science* **1990**, 249, 366-373.
- [49] F. Sauer, M. Haas, C. Sydow, A. F. Siegle, C. A. Lauer, O. Trapp, *Nature Communications* **2021**, 12, 7182.
- [50] C. Ponnampertuma, R. Mack, *Science* **1965**, 148, 1221-1223.
- [51] U. Schreiber, O. Locker-Grütjen, C. Mayer, *Origins of Life and Evolution of Biospheres* **2012**, 42, 47-54.
- [52] B. L. Hess, S. Piazzolo, J. Harvey, *Nature Communications* **2021**, 12, 1535.
- [53] S. L. Miller, *Science* **1953**, 117, 528-529.
- [54] S. L. Miller, H. C. Urey, *Several questions about the origin of life have been answered, but much remains to be studied* **1959**, 130, 245-251.
- [55] Z. Liu, L.-F. Wu, C. L. Kufner, D. D. Sasselov, W. W. Fischer, J. D. Sutherland, *Nature Chemistry* **2021**, 13, 1126-1132.
- [56] W. M. Garrison, D. C. Morrison, J. G. Hamilton, A. A. Benson, M. Calvin, *Science* **1951**, 114, 416-418.
- [57] J. Peretó, J. L. Bada, A. Lazcano, *Origins of Life and Evolution of Biospheres* **2009**, 39, 395-406.
- [58] A. I. Oparin, *Izd. Moskovhii Rabochil, Moscow* **1924**.
- [59] S. Tirard, *Journal of Genetics* **2017**, 96, 735-739.
- [60] Deborah S. Kelley, a. John A. Baross, J. R. Delaney, *Annual Review of Earth and Planetary Sciences* **2002**, 30, 385-491.
- [61] W. Martin, J. Baross, D. Kelley, M. J. Russell, *Nature Reviews Microbiology* **2008**, 6, 805.
- [62] A. Koschinsky, D. Garbe-Schönberg, S. Sander, K. Schmidt, H.-H. Gennerich, H. Strauss, *Geology* **2008**, 36, 615-618.
- [63] D. S. Kelley, J. A. Karson, D. K. Blackman, G. L. Früh-Green, D. A. Butterfield, M. D. Lilley, E. J. Olson, M. O. Schrenk, K. K. Roe, G. T. Lebon, P. Rivizzigno, A. T. S. P. the, *Nature* **2001**, 412, 145.

- [64] G. L. Früh-Green, D. S. Kelley, S. M. Bernasconi, J. A. Karson, K. A. Ludwig, D. A. Butterfield, C. Boschi, G. Proskurowski, *Science* **2003**, *301*, 495-498.
- [65] G. Proskurowski, M. D. Lilley, J. S. Seewald, G. L. Früh-Green, E. J. Olson, J. E. Lupton, S. P. Sylva, D. S. Kelley, *Science* **2008**, *319*, 604-607.
- [66] J. A. Baross, S. E. Hoffman, *Origins of life and evolution of the biosphere* **1985**, *15*, 327-345.
- [67] S. L. Miller, J. L. Bada, *Nature* **1988**, *334*, 609-611.
- [68] D. Ross, D. Deamer, *Astrobiology* **2019**, *19*, 517-521.
- [69] M. A. Pasek, *Chemical Reviews* **2020**, *120*, 4690-4706.
- [70] N. Lahav, S. Chang, *Journal of Molecular Evolution* **1976**, *8*, 357-380.
- [71] S. Becker, I. Thoma, A. Deutsch, T. Gehrke, P. Mayer, H. Zipse, T. Carell, *Science* **2016**, *352*, 833-836.
- [72] S. Becker, J. Feldmann, S. Wiedemann, H. Okamura, C. Schneider, K. Iwan, A. Crisp, M. Rossa, T. Amatov, T. Carell, *Science* **2019**, *366*, 76-82.
- [73] N. Lahav, D. White, S. Chang, *Science* **1978**, *201*, 67-69.
- [74] C. Gibard, S. Bhowmik, M. Karki, E.-K. Kim, R. Krishnamurthy, *Nature Chemistry* **2018**, *10*, 212-217.
- [75] K. Kruger, P. J. Grabowski, A. J. Zaug, J. Sands, D. E. Gottschling, T. R. Cech, *Cell* **1982**, *31*, 147-157.
- [76] C. Guerrier-Takada, K. Gardiner, T. Marsh, N. Pace, S. Altman, *Cell* **1983**, *35*, 849-857.
- [77] W. D. Fuller, R. A. Sanchez, L. E. Orgel, *Journal of Molecular Biology* **1972**, *67*, 25-33.
- [78] M. W. Powner, B. Gerland, J. D. Sutherland, *Nature* **2009**, *459*, 239-242.
- [79] D. R. Mills, R. L. Peterson, S. Spiegelman, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1967**, *58*, 217-224.
- [80] H. B. White, *Journal of Molecular Evolution* **1976**, *7*, 101-104.
- [81] S. Wang, E. T. Kool, *Biochemistry* **1995**, *34*, 4125-4132.
- [82] J. Oró, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1960**, *2*, 407-412.
- [83] M. Levy, S. L. Miller, J. Oró, *Journal of Molecular Evolution* **1999**, *49*, 165-168.
- [84] M. P. Robertson, M. Levy, S. L. Miller, *Journal of Molecular Evolution* **1996**, *43*, 543-550.
- [85] R. A. Sanchez, J. P. Ferris, L. E. Orgel, *Science* **1966**, *154*, 784-785.
- [86] M. P. Robertson, S. L. Miller, *Nature* **1995**, *375*, 772-774.
- [87] J. Oró, *Nature* **1961**, *191*, 1193-1194.
- [88] A. Butlerov, *Justus Liebigs Annalen der Chemie* **1861**, *120*, 295-298.
- [89] R. Breslow, *Tetrahedron Letters* **1959**, *1*, 22-26.
- [90] W. Löub, *Zeitschrift für Elektrochemie und angewandte physikalische Chemie* **1906**, *12*, 282-312.
- [91] K. Usami, A. Okamoto, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2017**, *15*, 8888-8893.
- [92] A. Ricardo, M. A. Carrigan, A. N. Olcott, S. A. Benner, *Science* **2004**, *303*, 196-196.
- [93] H.-J. Kim, A. Ricardo, H. I. Illangkoon, M. J. Kim, M. A. Carrigan, F. Frye, S. A. Benner, *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133*, 9457-9468.
- [94] W. D. Fuller, R. A. Sanchez, L. E. Orgel, *Journal of Molecular Evolution* **1972**, *1*, 249-257.
- [95] H.-J. Kim, S. A. Benner, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2017**, *114*, 11315-11320.
- [96] W. Traube, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1900**, *33*, 3035-3056.
- [97] M. W. Powner, J. D. Sutherland, *Angewandte Chemie International Edition* **2010**, *49*, 4641-4643.
- [98] J. Xu, M. Tsanakopoulou, C. J. Magnani, R. Szabla, J. E. Šponer, J. Šponer, R. W. Góra, J. D. Sutherland, *Nature Chemistry* **2017**, *9*, 303-309.
- [99] L. Frick, J. P. Mac Neela, R. Wolfenden, *Bioorganic Chemistry* **1987**, *15*, 100-108.

- [100] J. Xu, N. J. Green, C. Gibard, R. Krishnamurthy, J. D. Sutherland, *Nature Chemistry* **2019**, *11*, 457-462.
- [101] J. Xu, V. Chmela, Nicholas J. Green, David A. Russell, Mikołaj J. Janicki, Robert W. Góra, R. Szabla, Andrew D. Bond, John D. Sutherland, *Nature* **2020**, *582*, 60-66.
- [102] J. S. Teichert, F. M. Kruse, O. Trapp, *Angewandte Chemie International Edition* **2019**, *58*, 9944-9947.
- [103] J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature* **1953**, *171*, 737-738.
- [104] T. Harayama, H. Riezman, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2018**, *19*, 281-296.
- [105] J. R. Knowles, *Annual Review of Biochemistry* **1980**, *49*, 877-919.
- [106] A. M. Schoffstall, E. M. Laing, *Origins of life and evolution of the biosphere* **1985**, *15*, 141-150.
- [107] A. M. Schoffstall, *Origins of life* **1976**, *7*, 399-412.
- [108] G. Costanzo, R. Saladino, C. Crestini, F. Ciciriello, E. Di Mauro, *Journal of Biological Chemistry* **2007**, *282*, 16729-16735.
- [109] T. Georgelin, M. Jaber, T. Onfroy, A.-A. Hargrove, F. Costa-Torro, J.-F. Lambert, *The Journal of Physical Chemistry C* **2013**, *117*, 12579-12590.
- [110] M. Akouche, M. Jaber, M.-C. Maurel, J.-F. Lambert, T. Georgelin, *Angewandte Chemie International Edition* **2017**, *56*, 7920-7923.
- [111] M. Gull, *Challenges* **2014**, *5*, 193-212.
- [112] M. A. Pasek, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2008**, *105*, 853-858.
- [113] F. H. Westheimer, *Science* **1987**, *235*, 1173-1178.
- [114] K. W. Knouse, D. T. Flood, J. C. Vantourout, M. A. Schmidt, I. M. McDonald, M. D. Eastgate, P. S. Baran, *ACS Central Science* **2021**, *7*, 1473-1485.
- [115] S. L. Beaucage, M. H. Caruthers, *Tetrahedron Letters* **1981**, *22*, 1859-1862.
- [116] J. Caton-Williams, L. Lin, M. Smith, Z. Huang, *Chemical Communications* **2011**, *47*, 8142-8144.
- [117] R. H. Alul, C. N. Singman, G. Zhang, R. L. Letsinger, *Nucleic Acids Research* **1991**, *19*, 1527-1532.
- [118] A. W. Schwartz, M. van der Veen, T. Bisseling, G. J. F. Chittenden, *Origins of life* **1975**, *6*, 163-168.
- [119] A. W. Schwartz, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Nucleic Acids and Protein Synthesis* **1972**, *281*, 477-480.
- [120] B. Burcar, M. Pasek, M. Gull, B. J. Cafferty, F. Velasco, N. V. Hud, C. Menor-Salván, *Angewandte Chemie International Edition* **2016**, *55*, 13249-13253.
- [121] R. Lohrmann, L. E. Orgel, *Science* **1968**, *161*, 64-66.
- [122] C. Gibard, I. B. Gorrell, E. I. Jiménez, T. P. Kee, M. A. Pasek, R. Krishnamurthy, *Angewandte Chemie International Edition* **2019**, *58*, 8151-8155.
- [123] R. Krishnamurthy, S. Guntha, A. Eschenmoser, *Angewandte Chemie International Edition* **2000**, *39*, 2281-2285.
- [124] E. I. Jiménez, C. Gibard, R. Krishnamurthy, *Angewandte Chemie International Edition* **2021**, *60*, 10775-10783.
- [125] O. R. Maguire, I. B. A. Smokers, W. T. S. Huck, *Nature Communications* **2021**, *12*, 5517.
- [126] C. Cheng, C. Fan, R. Wan, C. Tong, Z. Miao, J. Chen, Y. Zhao, *Origins of life and evolution of the biosphere* **2002**, *32*, 219-224.
- [127] M. Gull, T. Feng, H. A. Cruz, R. Krishnamurthy, M. A. Pasek, *Life* **2023**, *13*, 920.
- [128] A. Omran, J. Abbatiello, T. Feng, M. A. Pasek, *Life* **2022**, *12*, 198.
- [129] A. Schwartz, C. Ponnampereuma, *Nature* **1968**, *218*, 443-443.
- [130] Y. Yamagata, H. Inoue, K. Inomata, *Origins of Life and Evolution of the Biosphere* **1995**, *25*, 47-52.
- [131] H. Mutschler, P. Holliger, *Journal of the American Chemical Society* **2014**, *136*, 5193-5196.

- [132] E. Y. Song, E. I. Jiménez, H. Lin, K. Le Vay, R. Krishnamurthy, H. Mutschler, *Angewandte Chemie International Edition* **2021**, *60*, 2952-2957.
- [133] M. S. Verlander, R. Lohrmann, L. E. Orgel, *Journal of Molecular Evolution* **1973**, *2*, 303-316.
- [134] M. S. Verlander, L. E. Orgel, *Journal of Molecular Evolution* **1974**, *3*, 115-120.
- [135] A. V. Dass, S. Wunnava, J. Langlais, B. von der Esch, M. Krusche, L. Ufer, N. Chrisam, R. C. A. Dubini, F. Gartner, S. Angerpointner, C. F. Dirscherl, P. Rovó, C. B. Mast, J. E. Šponer, C. Ochsenfeld, E. Frey, D. Braun, *ChemSystemsChem* **2023**, *5*, e202200026.
- [136] G. Costanzo, S. Pino, A. M. Timperio, J. E. Šponer, J. Šponer, O. Nováková, O. Šedo, Z. Zdráhal, E. Di Mauro, *PLOS ONE* **2016**, *11*, e0165723.
- [137] G. Costanzo, A. Giorgi, A. Scipioni, A. M. Timperio, C. Mancone, M. Tripodi, M. Kapralov, E. Krasavin, H. Kruse, J. Šponer, J. E. Šponer, V. Ranc, M. Otyepka, S. Pino, E. Di Mauro, *ChemBioChem* **2017**, *18*, 1535-1543.
- [138] J. E. Šponer, J. Šponer, A. Giorgi, E. Di Mauro, S. Pino, G. Costanzo, *The Journal of Physical Chemistry B* **2015**, *119*, 2979-2989.
- [139] M. Morasch, C. B. Mast, J. K. Langer, P. Schilcher, D. Braun, *ChemBioChem* **2014**, *15*, 879-883.
- [140] S. Wunnava, C. F. Dirscherl, J. Výravský, A. Kovařík, R. Matyášek, J. Šponer, D. Braun, J. E. Šponer, *Chemistry – A European Journal* **2021**, *27*, 17581-17585.
- [141] J. E. Šponer, J. Šponer, J. Výravský, O. Šedo, Z. Zdráhal, G. Costanzo, E. Di Mauro, S. Wunnava, D. Braun, R. Matyášek, A. Kovařík, *ChemSystemsChem* **2021**, *3*, e2100017.
- [142] A. Schimpl, R. M. Lemmon, M. Calvin, *Science* **1965**, *147*, 149-150.
- [143] M. P. Bernstein, S. A. Sandford, L. J. Allamandola, S. Chang, *The Journal of Physical Chemistry* **1994**, *98*, 12206-12210.
- [144] F. Duvernay, T. Chiavassa, F. Borget, J.-P. Aycard, *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 7772-7773.
- [145] F. Duvernay, T. Chiavassa, F. Borget, J.-P. Aycard, *The Journal of Physical Chemistry A* **2005**, *109*, 603-608.
- [146] M. Röthlingshöfer, C. Richert, *The Journal of Organic Chemistry* **2010**, *75*, 3945-3952.
- [147] M. Jauker, H. Griesser, C. Richert, *Angewandte Chemie International Edition* **2015**, *54*, 14564-14569.
- [148] M. Jauker, H. Griesser, C. Richert, *Angewandte Chemie International Edition* **2015**, *54*, 14559-14563.
- [149] B. J. Weimann, R. Lohrmann, L. E. Orgel, H. Schneider-Bernloehr, J. E. Sulston, *Science* **1968**, *161*, 387-387.
- [150] J. P. Ferris, A. R. Hill, R. Liu, L. E. Orgel, *Nature* **1996**, *381*, 59-61.
- [151] J. P. Ferris, G. Ertem, *Science* **1992**, *257*, 1387-1389.
- [152] T. Inoue, L. E. Orgel, *Journal of the American Chemical Society* **1981**, *103*, 7666-7667.
- [153] L. Li, V. S. Lelyveld, N. Prywes, J. W. Szostak, *Journal of the American Chemical Society* **2016**, *138*, 3986-3989.
- [154] T. Wu, L. E. Orgel, *Journal of the American Chemical Society* **1992**, *114*, 5496-5501.
- [155] T. Walton, J. W. Szostak, *Journal of the American Chemical Society* **2016**, *138*, 11996-12002.
- [156] L. Li, N. Prywes, C. P. Tam, D. K. O'Flaherty, V. S. Lelyveld, E. C. Izgu, A. Pal, J. W. Szostak, *Journal of the American Chemical Society* **2017**, *139*, 1810-1813.
- [157] G. F. Joyce, L. E. Orgel, *Cold Spring Harbor Monograph Series* **1999**, *37*, 49-78.
- [158] R. Lohrmann, *Journal of Molecular Evolution* **1977**, *10*, 137-154.
- [159] A. Mariani, D. A. Russell, T. Javelle, J. D. Sutherland, *Journal of the American Chemical Society* **2018**, *140*, 8657-8661.

- [160] W. Zhang, C. P. Tam, T. Walton, A. C. Fahrenbach, G. Birrane, J. W. Szostak, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2017**, *114*, 7659-7664.
- [161] K. A. Denessiouk, V.-V. Rantanen, M. S. Johnson, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **2001**, *44*, 282-291.
- [162] J. E. Van Trump, S. L. Miller, *Science* **1972**, *178*, 859-860.
- [163] A. D. Keefe, G. L. Newton, S. L. Miller, *Nature* **1995**, *373*, 683-685.
- [164] C. Sydow, F. Sauer, A. F. Siegle, O. Trapp, *ChemSystemsChem* **2023**, *5*, e202200034.
- [165] M. G. Schwendinger, B. M. Rode, *Analytical Sciences* **1989**, *5*, 411-414.
- [166] B. M. Rode, M. G. Schwendinger, *Origins of life and evolution of the biosphere* **1990**, *20*, 401-410.
- [167] M. G. Schwendinger, B. M. Rode, *Origins of life and evolution of the biosphere* **1992**, *22*, 349-359.
- [168] J. P. T. Baú, C. E. A. Carneiro, A. C. S. da Costa, D. F. Valezi, E. di Mauro, E. Pilau, D. A. M. Zaia, *Origins of Life and Evolution of Biospheres* **2021**, *51*, 299-320.
- [169] J.-F. Lambert, *Origins of Life and Evolution of Biospheres* **2008**, *38*, 211-242.
- [170] M. Rao, D. G. Odom, J. Oró, *Journal of Molecular Evolution* **1980**, *15*, 317-331.
- [171] R. Breslow, Z.-L. Cheng, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2010**, *107*, 5723-5725.
- [172] A. L. Weber, S. Pizzarello, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2006**, *103*, 12713-12717.
- [173] L. Burroughs, P. A. Clarke, H. Forintos, J. A. R. Gilks, C. J. Hayes, M. E. Vale, W. Wade, M. Zbytniewski, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2012**, *10*, 1565-1570.
- [174] R. Breslow, V. Ramalingam, C. Appayee, *Origins of Life and Evolution of Biospheres* **2013**, *43*, 323-329.
- [175] L. Burroughs, M. E. Vale, J. A. R. Gilks, H. Forintos, C. J. Hayes, P. A. Clarke, *Chemical Communications* **2010**, *46*, 4776-4778.
- [176] M. Paventi, J. T. Edward, *Canadian Journal of Chemistry* **1987**, *65*, 282-289.
- [177] N. A. Paras, D. W. C. MacMillan, *Journal of the American Chemical Society* **2001**, *123*, 4370-4371.
- [178] A. C. Closs, E. Fuks, M. Bechtel, O. Trapp, *Chemistry - A European Journal* **2020**, *26*, 10702-10706.
- [179] A. C. Closs, M. Bechtel, O. Trapp, *Angewandte Chemie International Edition* **2022**, *61*, e202112563.
- [180] W. A. Bonner, *Origins of life and evolution of the biosphere* **1991**, *21*, 59-111.
- [181] M. Smith, G. I. Drummond, H. G. Khorana, *Journal of the American Chemical Society* **1961**, *83*, 698-706.
- [182] J. D. Toner, D. C. Catling, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2020**, *117*, 883-888.
- [183] H.-J. Kim, S. A. Benner, *Chemistry – A European Journal* **2018**, *24*, 581-584.
- [184] N. Pollak, C. Dölle, M. Ziegler, *Biochemical Journal* **2007**, *402*, 205-218.
- [185] M. J. Dowler, W. D. Fuller, L. E. Orgel, R. A. Sanchez, *Science* **1970**, *169*, 1320-1321.
- [186] E.-K. Kim, C. Switzer, *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry* **2009**, *39*, 3.18.11-13.18.13.
- [187] A. C. Closs, Doctoral Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München **2021** Doi: 10.5282/edoc.28425.
- [188] S. Neubauer, A. Rugova, D. B. Chu, H. Drexler, A. Ganner, M. Sauer, D. Mattanovich, S. Hann, G. Koellensperger, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2012**, *404*, 799-808.
- [189] J. P. Ferris, R. A. Sanchez, L. E. Orgel, *Journal of Molecular Biology* **1968**, *33*, 693-704.