

4. Alternative Oligonukleotidstrukturen

4.1 Die RNA-Welt Theorie

Betrachtet man die Basis heutiger Lebensformen, so ist allen gemeinsam, dass DNA oder RNA als Träger der Erbinformation fungiert. Die Information wird in allen Organismen in einem komplexen Prozess an dem *m*-RNA, *t*-RNA und Ribosomen beteiligt sind in eine Aminosäuresequenz übersetzt. Die Aminosäurekette faltet sich zu einer dreidimensionalen Struktur, dem fertigen Protein, welches anschließend die wichtigen Lebensfunktionen durchführt. Informationsspeicherung (Genotyp) und Funktion (Phänotyp) liegen heute in den Händen unterschiedlicher Moleküle nämlich DNA und RNA einerseits und den Proteinen andererseits; die einen werden aufgebaut aus den 4-5 Standard-Nukleotiden, die anderen bestehen aus den 20 kodierten Aminosäuren.

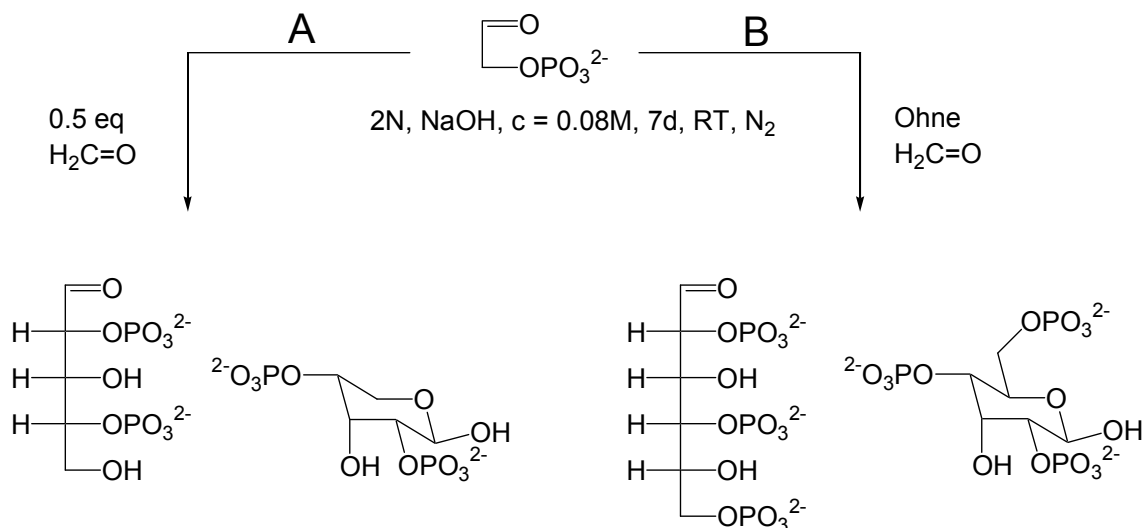
Es scheint klar, dass das Leben auf der Erde so komplex nicht begonnen haben kann. Heute geht man davon aus, dass zu Beginn des Lebens nur RNA existierte. RNA ist eines der wenigen Moleküle, welche sowohl Informationen speichern, als auch katalytische Funktionen wahrnehmen. RNA bildet also eine Brücke zwischen den Nukleinsäuren auf der einen Seite und den Proteinen auf der anderen. In der RNA-Welt Hypothese wird davon ausgegangen, dass es zu Beginn des Lebens sich selbst replizierende RNA Moleküle gegeben hat, aus der sich dann durch molekulare Darwinistische Evolution komplexere Systeme entwickelt haben könnten. Experimente von L. Orgel und G. Kiederowski haben in den letzten Jahren gezeigt, dass bereits kleine RNA Stränge die Fähigkeit zur Selbstreplikation besitzen. Zur Zeit wird intensiv versucht im Reagenzglas eine Art primitives evolutives System zu etablieren um einen experimentellen Beweis zu führen, dass die RNA-Welt Theorie eine realistische Möglichkeit beschreibt, wie das Leben auf der Erde entstanden sein könnte (siehe auch Ribozyme und evolutive Strategien).

Eine der entscheidenden Annahmen der RNA-Welt Theorie ist, dass sich in einer Art Ursuppe aus angereicherten Molekülen, RNA spontan bildet. Die RNA Nukleotide verknüpfen sich zu kurzen Strängen. Aus der Vielfalt an unterschiedlichen RNA-Strängen entstehen zufällig solche mit der Fähigkeit zur Selbstreplikation diese

vermehrten sich und setzen sich durch. Eine molekulare Darwinische Evolution kommt in Gang. Die intensive Suche nach präbiotischen Reaktionsbedingungen die zur spontanen Synthese von RNA führen könnten, ist leider bis heute erfolglos geblieben (A. Eschenmoser, G. Wächtershäuser).

4.2 Warum Synthese alternativer Oligonukleotide?

Geht man davon aus, dass auf der frühen Erde sich in einer Art Ursuppe die Moleküle des Lebens unter den damaligen Bedingungen gebildet haben, so stellt sich sogleich die Frage nach der Menge an Ribose, die sich unter den Bedingungen gebildet haben könnte. Analysiert man die Zuckerbestandteile, die sich in Ursuppen-Simulationsexperimenten bilden, so stellt man fest, dass Ribose nur zu einem sehr kleinen Teil gebildet wird. Viele andere Zucker werden ebenfalls gebildet. Ausgangspunkt der Synthese unterschiedlicher Zucker könnte z. B. die Formose-Reaktion gewesen sein. Zusätzlich liegen die Zucker nicht nur jeweils einer definierten Konstitution und Konfiguration vor, sondern sind jeweils selber wieder Gemische aus Furanosiden, Pyranosiden und der offenkettigen Form. Die Tabelle unten gibt einen kleinen Überblick über mögliche Zuckerbestandteile und die



In der Formose-Reaktion entsteht z.B. unter den Reaktionsbedingungen **A** 33% Ribose, 10% Arabinose, 16% Lyxose und 7% Xylose. Unter den Bedingungen **B** entsteht 47% Allose, 7% Manose, 17% Altrose, 6% Talose, 2% Galaktose, 8% Gulose, 3% Glucose und 2% Idose.

Die Zucker liegen bei 40°C als Gemisch der verschiedenen Konstitutionsisomeren vor. Gleichgewichtszusammensetzung bei 40°C in wässriger Lösung:

Aldose	α -Pyranose	β -Pyranose	α -Furanose	β -Furanose
Ribose	20	56	6	18
Arabinose	63	34	3	
Xylose	33	67	<1	
Lyxose	71	29	<1	
Allose	18	70	5	7
Altrose	27	40	20	13
Glucose	36	64	<1	
Mannose	67	33	<1	
Gulose	22	78	<1	
Idose	31	37	16	16
Galactose	27	73	<1	
Talose	40	29	20	11

Prozentuale Zusammensetzung der Konstitutions- und Konfigurationsisomeren von verschiedenen Aldosen.

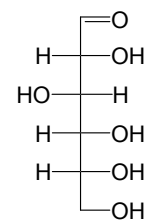
Diese Sachzusammenhänge führten zu dem Wunsch neuartige Oligonukleotide darzustellen, in denen die Ribose durch einen der obigen Zucker ausgetauscht sein sollte. Die Frage lautet: Können derartige, auf anderen Zuckern basierende Oligonukleotide, auch stabile Doppelstränge mit der Möglichkeit zur Informationsspeicherung liefern? Wenn ja, welche Kriterien haben die Natur bewogen Oligonukleotide zu wählen deren konstituierende Zuckereinheit die Ribose ist. In einem präbiotischen Zusammenhang müssen neue Oligonukleotidstrukturen nach den folgenden Gesichtspunkten untersucht werden:

1. Die Fähigkeit des Systems zur Ausbildung informationsspeichernder Basenpaarungen.
2. Die Fähigkeit des Systems zur Ausbildung eines chemischen Phänotyps. Das umfasst die Gesamtheit möglicher, in der Sequenz gespeicherter und somit vererbbarer, Reaktivitäten und katalytischer Eigenschaften. Nur diese können entlang eines Gradienten zunehmenden Selektionsdruckes durch Darwinische Evolution optimiert werden.

Unter den Aspekten 1 und 2 nimmt die Fähigkeit des Systems zur Durchführung einer nicht-enzymatischen Selbstreplikation eine besondere Position ein.

Exkurs Zucker

Zucker sind polyhydroxylierte Aldehyde (Aldosen) und Ketone (Ketosen). Der häufigste natürlich Vorkommende Zucker ist die Aldose: Glucose.



Die einfachste Aldose ist der Glycerinaldehyd. Vom Glycerinaldehyd gibt es zwei Enantiomere. Den:

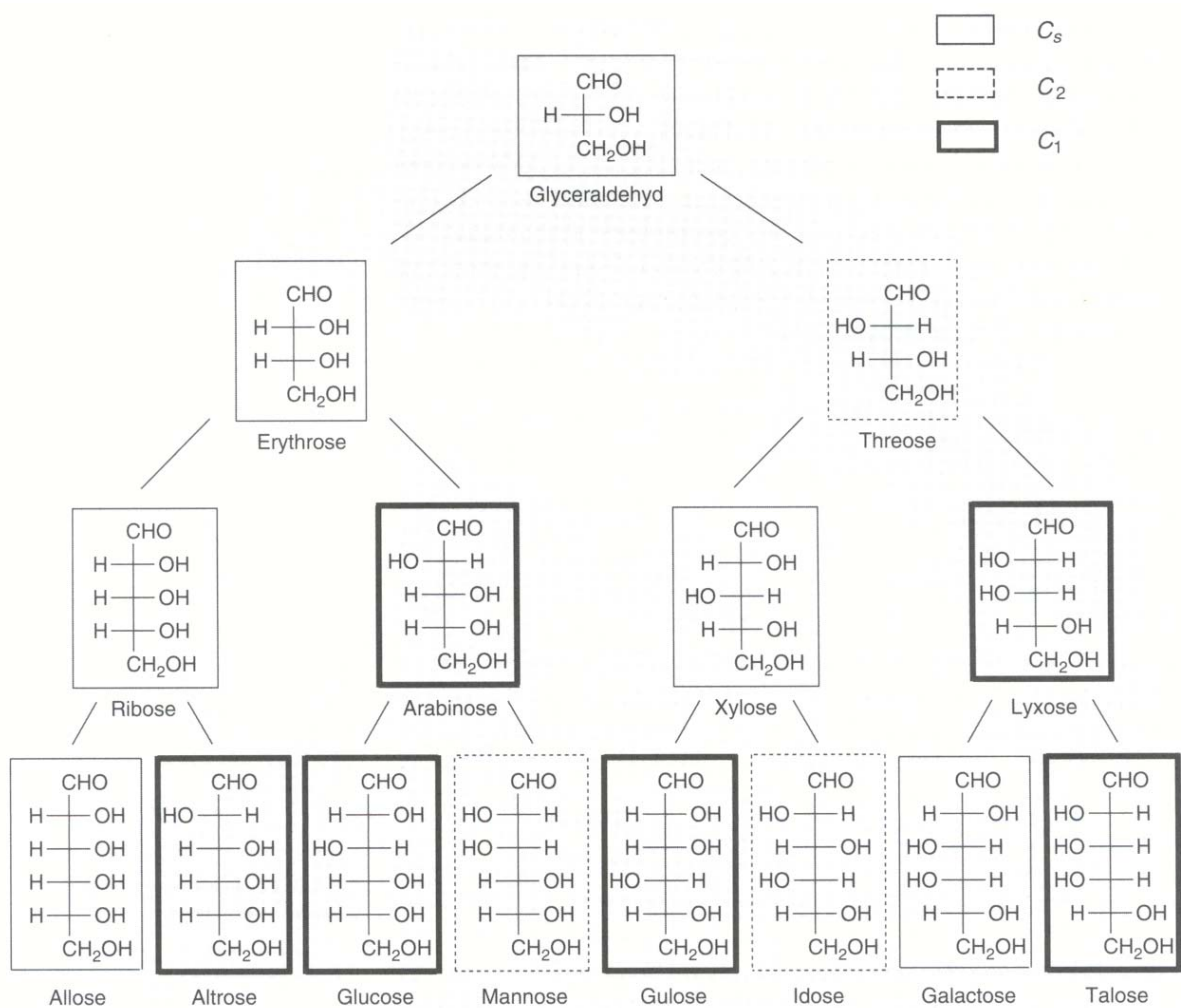
(+)-D-Glycerinaldehyd und den (-)-L-Glycerinaldehyd



Die Buchstaben L und D stammen aus der Fischer Nomenklatur. Die Zuordnung erfolgt nach der Position der sekundären OH-Gruppe, die am weitesten von der Aldehyd Funktion entfernt ist. D bedeutet, die OH-Gruppe zeigt in der Fischer Projektion nach recht. L bedeutet, die OH zeigt in der Fischer Projektion nach links.

Das (+) oder (-) ist eine Messgrösse, die Angibt, ob eine Lösung des Zuckers linear polarisiertes Licht nach links (-) oder rechts (+) dreht. Die absolute Konfiguration an jedem Asymmetriezentrum kann und muss natürlich mit Hilfe der Cahn-Ingold-Prelog (CIP) Nomenklatur (R oder S) angegeben werden.

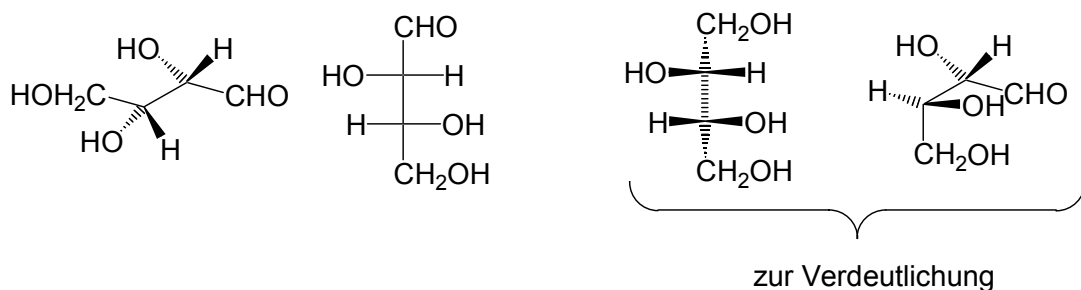
Die untenstehende Abbildung gibt den Stammbaum der Aldosen, ausgehend vom (+) Glycerinaldehyd wieder.



Epimere sind Zucker, die sich nur in der absoluten Konfiguration eines Zentrums unterscheiden. (-)-D-Threose und (-)-D-Erythrose sind z. B. Epimere.

Anomere: Sind Zucker, die sich lediglich in der absoluten Konfiguration am anomeren Zentrum.

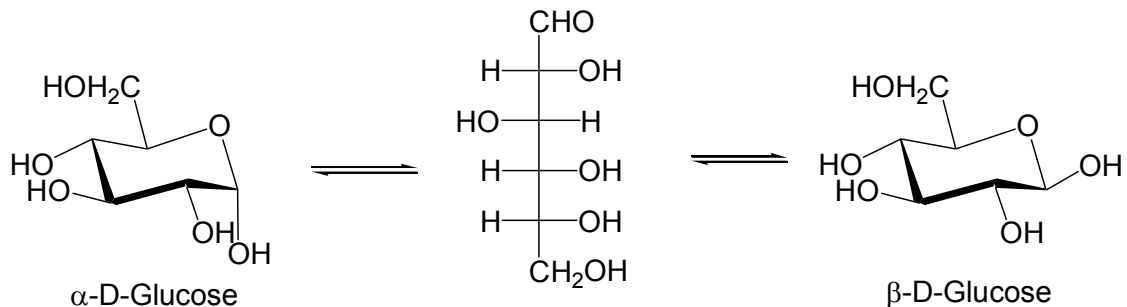
Der Aufbau von Zuckern wird anhand der Zick-Zack Formel gut deutlich.



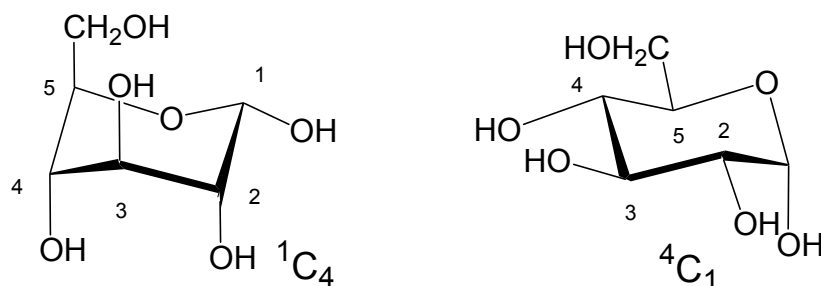
Die Pyranosen

Die Zucker liegen nur zu einem sehr kleinen Anteil in der offenkettigen Form vor. Sie stehen in Gleichgewicht mit den zyklischen Halbacetalformen. Es bilden sich vor

allem 6-Ringe, die Pyranoside als α - und β -Anomere. Durch den Prozess der Mutarotation wandeln sich die Anomeren ineinander um. Neben den Pyranosen existiert ein kleiner Anteil der Zucker auch in der furanosidischen Form, d.h. als 5-Ring (s. u.).



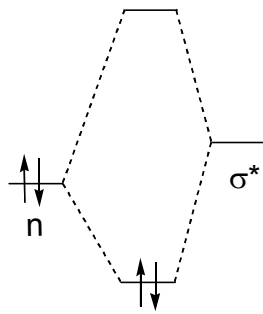
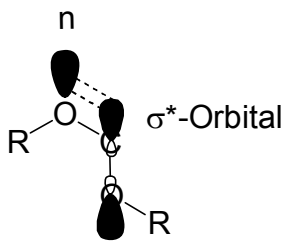
Im Fall der Pyranoside ist der Sessel natürlich die energieärmste Konformation. Boot- und Twist-Konformationen sind deutlich ungünstiger. Die grossen Substituenten sollten möglichst equatorial stehen. So wird das Auftreten einer ungünstigen



syn-Pentanwechselwirkungen vermieden. Eine *syn*-Pentanwechselwirkung kostet ca. xx kcal/mol. Es können immer verschiedene Sesselkonformationen gezeichnet werden. 4-Atome liegen hierbei in einer Ebene. Zwei gegenüberliegende sind jeweils in entgegengesetzter Weise aus der Ringebene herausgehoben. Zur Bezeichnung der unterschiedlichen Sessel hat sich eine Nomenklatur bewährt, die unten beschrieben wird. Hierbei wird der Buchstabe C für Chair verwendet. (Erklärung der Nomenklatur siehe unten)

Die Glucose liegt zu 36% bei 40°C in wässriger Lösung als α -D-Glucopyranose (s.o) vor, obwohl sich die 1'-OH Gruppe in der axialen Position befindet. Diesen noch recht hohen Anteil erklärt man mit dem anomeren Effekt. Er tritt dann auf wenn es sich um einen elektronenziehende Gruppe handelt, also um die besagte OH-Gruppe oder z.B. auch um ein Fluor-Atom. Entscheidend beim anomeren Effekt ist eine

stabilisierende, d.h. energie-senkende, Wechselwirkung zwischen einem der beiden



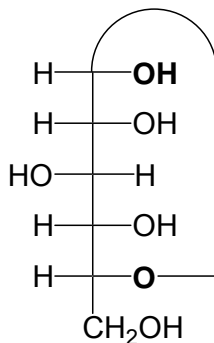
am Ringsauerstoff befindlichen doppelt besetzten freien Elektronenpaare (n-Orbital) und dem leeren σ^* -Orbital. Diese Wechselwirkung ist nur dann ausgeprägt wenn die

Überlappungsmöglichkeit beider Orbitale möglichst gross ist. Das begünstigt einen Substituenten am anomeren Zentrum in der axialen Position wird wirkt der *syn*-Pentan-Wechselwirkung entgegen.

Zucker werden in verschiedenen Darstellungsformen gezeichnet. Man unterscheidet die Fischer-Projektion, die Harworth-Projektion und die Sessel-Projektion. Wichtig ist wie die einzelnen Projektionen zusammenhängen.

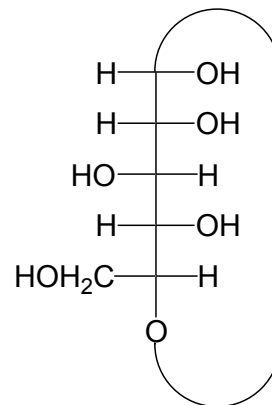
Beispiel:

α -D-Glucopyranose

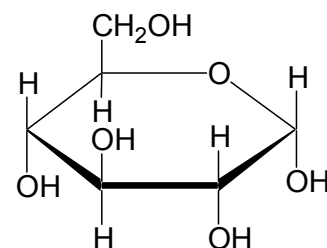


Fischer-Projektion

So umgruppieren, dass alle **Ringatome** vertikal stehen.



Für die Harworth-Projektion werden allen in der Fischer-Projektion links stehenden Gruppen nach oben gezeichnet. Die rechtsstehenden kommen nach unten



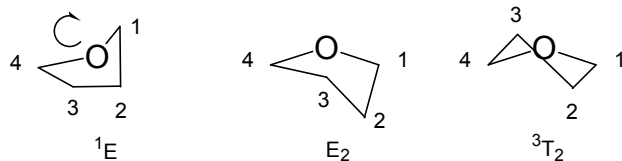
Harworth-Projektion

α/β -Nomenklatur: Das Referenzzentrum ist die OH-Gruppe des stereogenen Zentrums mit dem höchsten Lokanten in der Fischer Projektion. Steht die OH-Gruppe

auf der gleichen Seite wie die OH-Gruppe am anomeren Zentrum so handelt es sich um einen α -Zucker, sonst β .

Die Furanosen

Die Furanosen sind in ihrer Vorzugskonformation nicht so genau festgelegt. Die energieunterschiede zwischen den einzelnen Konformationen sind kleiner. Man unterscheidet im wesentlichen zwei unterschiedliche Konformationen. In der Briefumschlagsform **E** (*Envelope*) liegen vier der fünf Ringatome in einer Ebene. Ein Ringatom ist aus der Ebene herausgehoben. In der Twist-Konformation **T** liegen drei



Ringatome in der Ebene. Die zwei anderen Ringatome sind in entgegengesetztem Sinn aus der Ringebene herausgehoben. 1E bedeutet, dass sich die Furanose in

einer Briefumschlags-Konformation befindet. Das Atom 1 (hier C(1)) ist aus der Ringebene herausgedreht und zwar auf die Seite, von der aus die Atome in der Ebene im Uhrzeigersinn gelesen werden.

Wie wir schon gesehen haben sind die unterschiedlichen Konformationen der Ribose für die A- und die B-Konformation der DNA und RNA verantwortlich.

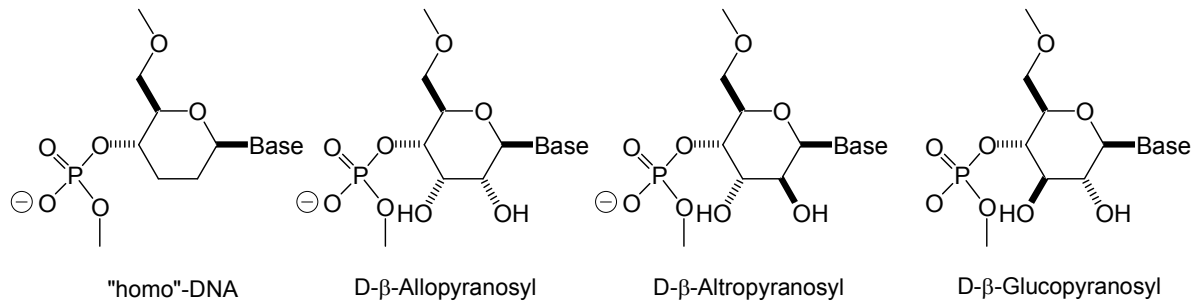
C(2')-endo entspricht 2E

C(3')-endo entspricht 3E

4.3 Gibt es zu DNA und RNA alternative Nukleinsäure-strukturen und welche Eigenschaften haben sie?

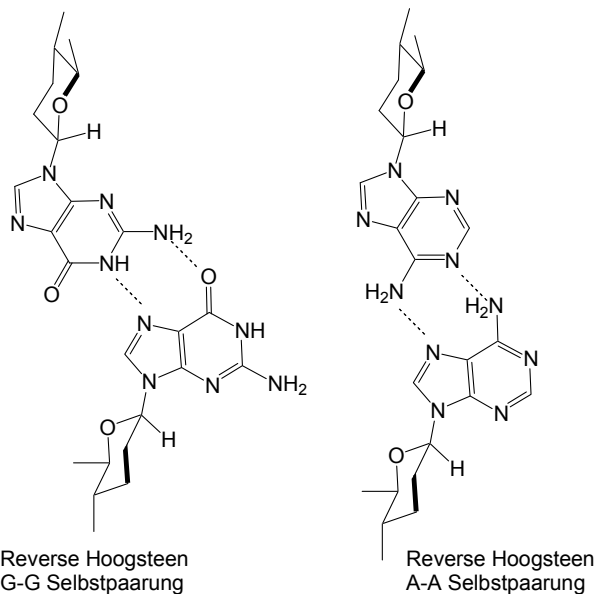
Die Synthese neuartiger Oligonukleotide unter präbiotischen Gesichtspunkten wurde systematisch von der Gruppe A. Eschenmoser durchgeführt.

4.3.1 (4'→6')-Hexopyranosyl-Oligonukleotide



Aus diesen Bausteinen wurde Oligonukleotide aufgebaut. Am intensivsten untersucht wurde die homo-DNA als ein erstes Beispiel eines Oligonukleotids welches in jeder konstituierenden Einheit eine CH_2 -Gruppe mehr besitzt.

Werden die „homo“-DNA Oligonukleotide bezüglich ihrer Basenpaarungsstärke (s.u.) untersucht, so stellt man fest, dass das System wesentlich stärkere Watson-Crick Basenpaarung eingeht. Die grössere thermodynamische Stabilität von Hexopyranosyl-Oligonukleotiddoppelsträngen kann man auf die grössere Steifheit der konstituierenden Pyranosyleinheit zurückführen. Der Pyranosylsechsring ist viel stärker präorganisiert, so dass weniger Beweglichkeit bei der Bildung des Doppelstranges eingefroren werden muss. Daraus resultiert ein wesentlich günstigerer ΔS -Term in der Gleichung $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$.

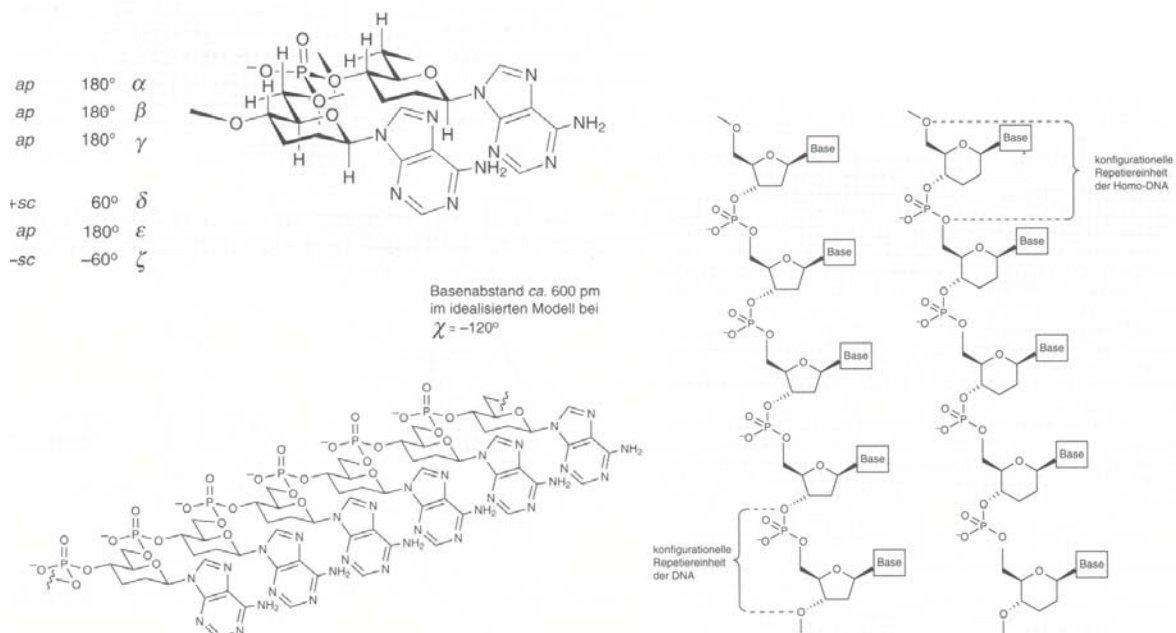


Problematisch ist allerdings, dass „homo“-DNA Hexopyranosylstränge zur Selbstpaarung von Adenin und Guanin im reversen Hoogsteen Modus neigen (anti-Konformation der glykosidischen Bindung und antiparallele Strangorientierung). Das ist der auffälligste Unterschied zwischen der „homo“-DNA und der DNA selber.

Für die anderen Vertreter dieser Reihe, nämlich β -Allo-, β -Altro und β -Glucopyranosyl-Oligonukleotiden gilt, dass sie keine nennenswerten Watson-Crick Basenpaare ausbilden können. In den

β -Allo und β -Altopyranosyl-Serien wird lediglich die schon bei der „homo“-DNA beobachtete Purin-Purin-Selbstpaarung im reversen Hoogsteen Modus beobachtet. Es zeigt sich demnach, dass die „homo“-DNA **keine** sehr selektive und damit für eine Informationsspeicherung geeignete Watson-Crick Basenpaare ausbilden kann.

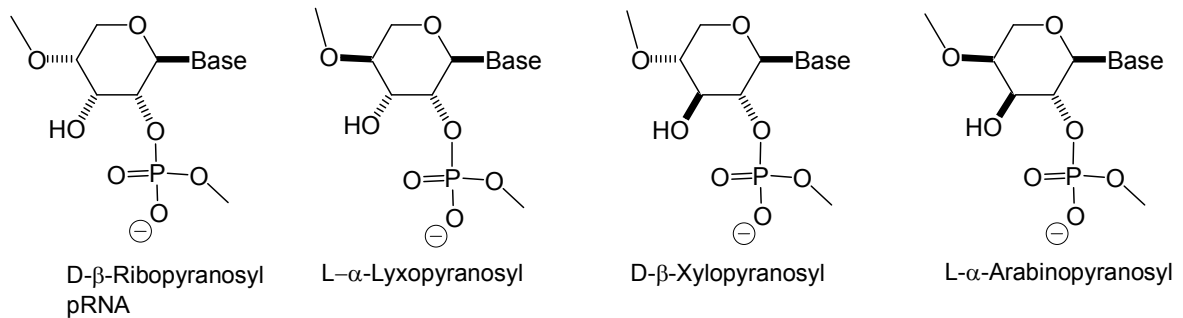
Die stärker hydroxylierten Vertreter in der Reihe sind zur Ausbildung von Watson-Crick Basenpaarungen überhaupt nicht fähig. Modellstudien zeigen, dass sterische Gründe hierfür verantwortlich sind. Innerhalb eines Stranges (Intrastrang) stören die OH-Gruppen (C2') sterisch die Ausbildung eines regulären, wie auch immer gearteten Doppelstranges. Equatorial angeordnete C2'-OH Gruppe stören stärker als die axialen.



4.3.2 (2'→4')-Pentopyranosyl-Oligonukleotide

Bleibt man bei der Konstruktion von neuen Oligonukleotiden bei den Pentosen, so lässt sich die sterische Überfrachtung vermeiden. Von den Hexopyranosen haben wir gelernt, dass das Vorliegen eines konformativ starreren Sechsringszuckers die Paarungseigenschaften günstig beeinflusst. Beide Gedanken zusammen führten zu der Idee Pentopyranosyl-Rückgrade darzustellen und bezüglich ihrer Paarungseigenschaften zu untersuchen. Im Fall der RNA wird also die sowieso

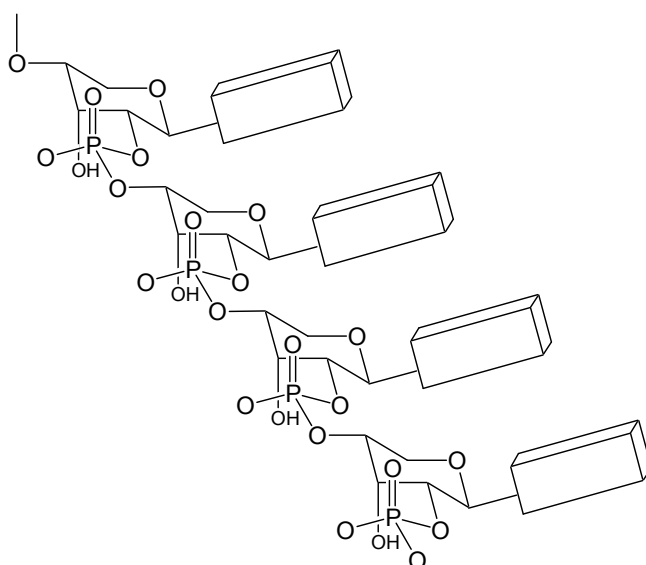
thermodynamisch günstigere Pyranose-Konstitution des Zucker als Rückgrad Baustein gewählt; man erhält die pRNA als ein Konstitutionsisomer der RNA.



Untersuchungen der Paarungsstärke zeigte in der ganzen Serie, dass Pentopyranosyl-Oligonukleotide thermodynamisch sehr stabile Doppelstränge bilden. Die Stränge sind antiparallel abgeordnet. Das bislang stärkste Paarungssystem ist das L-α-Arabinopyranosylsystem. Die Basenpaarung erfolgt hier immer im Watson-Crick Modus.

Genauere Untersuchungen der pRNA zeigte, dass die Basenpaarung nicht nur wesentlich stabiler sondern auch sehr viel selektiver ist. Die Verbindungen bilden somit ein völlig neuartiges Paarungssystem. Crosspaarung unter den Mitgliedern der Familie ist sehr ausgeprägt. Paarung mit natürlicher DNA oder RNA erfolgt hingegen nicht.

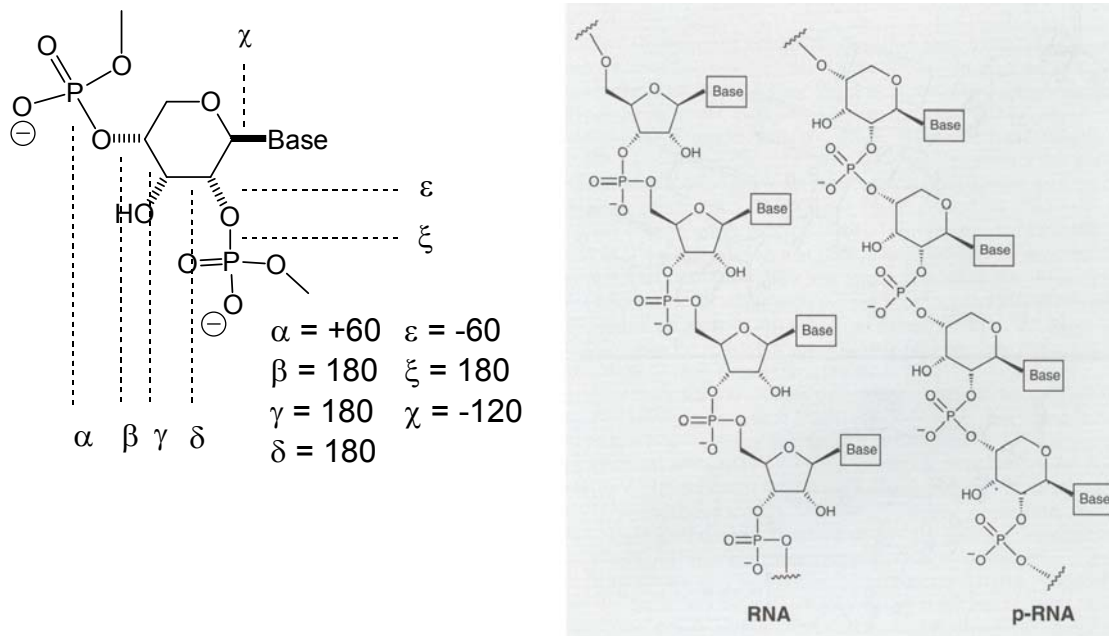
Für die besonders günstige Doppelstrangbildung ist sicher die grössere Rigidität des Rückgrades mit verantwortlich. Das alleine kann die überraschend starke



Komplexbildung aber nicht erklären.

Genauere Analyse der Doppelstrangkongformation zeigt, dass der Doppelstrang eine quasi lineare, leicht linksgängig gedrehte Kongformation einnimmt. Die beiden Stränge sind stark gegeneinander verschoben. Hierdurch wird der Basenpaar-Abstand so verringert,

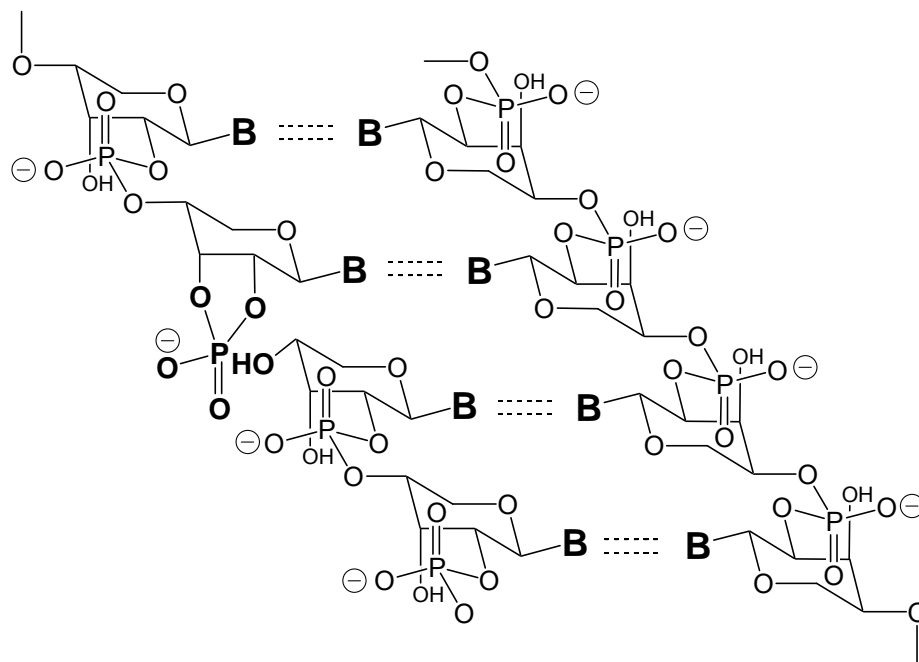
dass optimales *stacking* erreicht wird. Tatsächlich beobachtet man in diesem Paarungssystem hauptsächlich Interstrang-Basen*stacking* und nicht! Intrastrang-*stacking*.



Intensive Untersuchungen des pRNA Paarungssystems ergeben, dass pRNA ebenso wie RNA Haarnadelstrukturen zu bilden vermag und damit in der Lage ist auch komplexe dreidimensionale Strukturen zu bilden. auf jeden Fall ist sehr überraschend, dass eine ganze Familie von einfachen RNA-Konstitutionsisomeren die Fähigkeit zur Ausbildung sehr viel stabilerer und selektiverer Watson-Crick Basenpaarungen hat, ist schon sehr bemerkenswert.

Bezüglich der Phänotyp-Eigenschaften ist heute klar, dass pRNA ebenso wie RNA zur nicht-enzymatischen Selbstreplikation und zur Templat-dirigierten Oligomerisierung befähigt ist. pRNA ist demnach ein völlig neues Paarungssystem das nicht ohne weiteres dem von der Natur bevorzugten RNA und DNA System unterlegen ist. Damit könnte pRNA ein ersten Baustein auf dem Weg zu einer „artifizellen“ Biologie sein. Was auch immer die Natur veranlasst haben könnte RNA auszuwählen, es war sicher nicht Paarungsstärke und maximal Paarungsselektivität. (Hier setzen wird nun voraus, dass die Natur aus einer Vielzahl von möglichen Strukturen gewählt hat. Das heisst wie glauben, dass unser DNA-Informationssystem durch Selektion aus einer kombinatorischen Vielfalt heraus entstanden ist. Dieser Hypothese steht die alternative These vom *frozen accident* gegenüber).

Bei der Templat gesteuerten Oligomerisierung wird überprüft, ob ein kleiner Templatstrang z. B. ein Tetramer in der Lage ist die Bildung längerer Oligonukleotide zu katalysieren. Im Beispiel unten wird ein Tetramer als Cyclophosphat aktiviert. Das zweite Tetramer wird durch das Templat so positioniert, dass die freie OH-Gruppe am Cyclophosphat unter Ausbildung einer Phosphordiesterbindung angreifen kann. Das Templat katalysiert so, rein entropisch, durch Zusammenbringen der einzelnen Stränge die Bildung langkettiger Oligos. Erreicht wird das durch die partielle Überlappung des Templates mit jeweils einem Ende der beiden Dimere.



Bei der templatgesteuerten Selbstreplikation werden zwei Dinukleotidfragmente, die sich frei in Lösung befinden molekular erkannt und am Templat so fixiert, das erneut eine Phosphordiesterbindung gebildet werden kann. Ist das neugebildete Tetramer mit dem Templat identisch so findet eine autokatalytische Reaktion statt, die man hier Selbstreplikation nennt. z.B. 2'-AGCT-4' erkennt 4'-TC-2' und 4'-GA-2'. Es bildet sich ein ternärer Komplex mit nachfolgender Bildung von 4'-TCGA-2', einem Strang, der mit dem Templat identisch ist. Auch kompliziertere Replikationsmuster sind denkbar und können im Labor nachgestellt werden. Z.B 2'-AGGA-4' erkennt 4'-TC-2' und 4'-CT-2' verknüpft beide zu 4'-TCCT-2'. Dieses fungiert als ein neues Templat und erkennt nun 2'-AG-4' und 2'-GA-4' unter Verknüpfung zu 2'-AGGA-4' welches nun mit dem ersten Templat identisch ist.

Man kann sogar drei oder mehr „Replikatoren“ miteinander und/oder gegeneinander replizieren lassen. Vielleicht konkurrieren sie ja sogar um Edukt und nur der fitteste Replikator setzt sich im Sinn einer Darwinischen Evolution durch. Dieses Spiel wird derzeit intensiv betrieben. Ziel der Aufbau eines molekularen Ökosystems und das Inangangsetzen einer Evolution der Moleküle.