

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

**Synthese von epigenetisch relevanten DNA- und RNA-
Oligonukleotiden**

Felix Arним Gnerlich
aus
Hammelburg, Deutschland

2016

Erklärung

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

Eidesstattliche Versicherung

Diese Dissertation wurde eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, 6.11.2015

Felix Gnerlich

Dissertation eingereicht am: 12.11.2015

1. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Carell
2. Gutachterin: Prof. Dr. Anja Hoffmann-Röder

Mündliche Prüfung am: 14.01.2016

“You’d be surprised how little I knew even up to yesterday.”

- Jack Kerouac

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

- 1.** O. Bogdanović, A. H. Smits, E. de la Calle Mustienes, J. J. Tena, E. Ford, R. Williams, U. Senanayake, M. D. Schultz, S. Honetez, I. van Kruisbergen, T. Rayon, **F. Gnerlich**, T. Carell, G. J. C. Veenstra, M. Manzanares, T. Sauka-Spengler, J. R. Ecker, M. Vermeulen, J. L. Gómez-Skarmeta, R. Lister, *Nat. Genet.* **2016**, DOI: 10.1038/ng.3522 *Manuskript im Druck.*
Active DNA demethylation during the vertebrate phylotypic period.
- 2.** A. Dallmann*, A. Beribisky*, **F. Gnerlich***, S. Schiesser, T. Carell, M. Sattler, *Nucleic Acids Res.* **2016**, *Manuskript eingereicht.* *Erstautoren
Selective isotope-labeling of inosine phosphoramidites facilitates NMR analysis of inosine-containing RNAs.
- 3.** K. Brunner, J. Harder, T. Halbach, J. Willibald, F. Spada, **F. Gnerlich**, K. Sparrer, A. Beil, L. Möckl, C. Bräuchle, K-K Conzelmann, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 54, 1946–1949.
Cell-Penetrating and Neurotargeting Dendritic siRNA Nanostructures.
- 4.** A. S. Schröder, J. Steinbacher, B. Steigenberger, **F. A. Gnerlich**, S. Schiesser, T. Pfaffeneder, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53, 315-318.
Synthesis of a DNA Promoter Segment Containing All Four Epigenetic Nucleosides: 5-Methyl-, 5-Hydroxymethyl-, 5-Formyl-, and 5-Carboxy-2'-Deoxycytidine
- 5.** C. G. Spruijt*, **F. Gnerlich***, A. H. Smits, T. Pfaffeneder, P. W. T. C. Jansen, C. Bauer, M. Münzel, M. Wagner, M. Müller, F. Khan, H. C. Eberl, A. Mensinga, A. B. Brinkman, K. Lepikhov, U. Müller, J. Walter, R. Boelens, H. van Ingen, H. Leonhardt, T. Carell, M. Vermeulen, *Cell.* **2013**, 152, 1146-59. *Erstautoren
Dynamic readers for 5-(hydroxy)methylcytosine and its oxidized derivatives.
- 6.** M. Münzel, U. Lischke, D. Stathis, T. Pfaffeneder, **F. A. Gnerlich**, C. A. Deiml, S. C. Koch, K. Karaghiosoff, T. Carell, *Chemistry* **2011**, 17, 13782-13788.
Improved Synthesis and Mutagenicity of Oligonucleotides Containing 5-Hydroxymethylcytosine, 5-Formylcytosine and 5-Carboxylcytosine.

Danksagung

Diese Arbeit wurde nur durch die Zusammenarbeit, die Hilfe und die Unterstützung zahlreicher Personen ermöglicht. Die Zeit im Labor und außerhalb der Uni war eine sehr schöne und unvergessliche Zeit, an der alle, der hier genannten, großen Anteil haben.

An erster Stelle bedanke ich mich bei Prof. Dr. Thomas Carell für das entgegengebrachte Vertrauen und die wissenschaftliche Freiheit, die du mir während meiner gesamten Promotionszeit zugestanden hast. Dein Optimismus und dein Enthusiasmus für die Forschung haben mich mitgerissen und motiviert. Danke, dass ich Teil dieses großartigen Arbeitskreises sein durfte und an herausragenden Forschungsprojekten mitwirken durfte.

Frau Prof. Dr. Anja Hoffmann-Röder danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens, das große Interesse an meiner Arbeit und ihre ansteckende Begeisterung für Kohlenhydrat-Chemie.

Den Mitgliedern der Prüfungskommission, Prof. Dr. Konstantin Karaghiosoff, PD Dr. Stylianos Michalakis, PD Dr. Dietmar Martin und Prof. Dr. Ingo-Peter Lorenz, danke ich für ihr zahlreiches Erscheinen zu meiner Promotionsprüfung und die angenehme Prüfungsatmosphäre. In diesem Zusammenhang danke ich auch Slava Gärtner, ohne die die Prüfung vermutlich nie stattgefunden hätte oder zumindest ohne frischen Kaffee abgelaufen wäre.

Meinen Kollaborationspartnern Dr. Cornelia Nelleke Spruijt und Prof. Dr. Michiel Vermeulen danke ich für die sehr erfolgreiche Zusammenarbeit. Dr. Ozren Bogdanovic und Prof. Dr. Ryan Lister danke ich für Berücksichtigung meiner geleisteten Arbeit. Dr. Andre Dallmann und Prof. Dr. Michael Sattler haben dazu beigetragen, dass ich ein weiteres hochinteressantes Forschungsgebiet kennen lernen durfte.

Den Mitarbeitern der Analytikabteilung, Dr. Werner Spahl und Sonja Kosak danke ich für die Anfertigung der Massenspektren. Bei Claudia Dubler und Dr. David Stevenson möchte ich mich für ihr großes Engagement bei kniffligen Kernresonanzspektren bedanken. Großer Dank gilt auch Michael Gayer für die kompetente und zupackende Hilfe.

Meinen Zöglingen Andreas Baumann, Daniel Gast, Tim Gatzenmeier und Dr. Benjamin Hackner (Bachelor- und Master-Studenten) und den unzählbaren Praktikant(innen) danke ich für die Bereicherung meines Labor-Teams und dafür, dass ihr immer Vollgas gegeben habt!

Dr. Markus Müller danke ich für sein offenes Ohr in allen Belangen, für all die erlösenden Ratschläge und die abendlichen Kaffeeraum-Runden, die vielen Essens-Einladungen und deine Freundschaft.

Meinen Laborkollegen Korbinian Brunner, Dr. Johannes Harder, Dr. Stefan Prill, Arne Schröder, Dr. Julian Willibald danke ich für die überragende Stimmung im Labor. Die Zeit hätte ohne all die Späße mit euch nur halb so viel Freude gemacht! Ich schätze eure Freundschaft, Hilfsbereitschaft, diesen grandiosen F.4001-Spirit bis zum heutigen Tag und denke freudigst an die Zeit mit euch zurück.

In der Spaß-Fraktion waren Dr. Korbinian Heil, Dr. Benjamin Hackner, Dr. Ines Pfaffeneder (geb. Thoma), Dr. Toni Pfaffeneder tragende Säulen. Danke, dass ihr meine Interpretation von „lustig“ immer verstanden und mitgemacht habt.

Um nicht den Eindruck zu erwecken, dass die Danksagung länger ist als der Experimentalteil dieser Arbeit, muss ich an dieser Stelle auf Anekdoten und Anspielungen verzichten und sage einfach Danke an:

Barbara Steigenberger, Dr. Tim Gehrke, Dr. Christian Deiml, Dr. Emine Kaya, Dr. David Pearson, Dr. Dorothea Matschkal, Mirko Wagner, Dr. Karola Gasteiger, Dr. Michael Ehrlich, Dr. Milan Vrabel, Dr. Sandra Koch, Dr. Veronika Reiter; Dr. Stefan Schießer, Dr. Thomas Reißner, Dr. Ulrike Lischke, Fußballgott Michi Gattner, Florian Kink, Silvia Laube, Olga Kotljarova, Dr. Daniel Globisch, Dr. Sabine Schneider, Jessica Steinbacher, Dr. Viviana Fluxa, Sascha Serdjukow.

Die Feiern, Fussballspiele, Ausflüge, Bootstrips, Skiwochenenden, Hochzeiten, Partys und Pausen mit euch waren spitze! Ach ja, die wissenschaftlichen Diskussionen auch! Wenn ihr alle noch da wärt, würde ich sofort nochmal eine Doktorarbeit anfangen!

Meinen Eltern gilt mein größter persönlicher Dank für die jahrelange Unterstützung, den bedingungslosen Rückhalt und die guten Voraussetzungen, die ihr mir auf den Lebensweg mitgegeben habt. Meinen Schwestern Sandra und Franziska und meinem Bruder Christian verdanke ich sehr viel. Ich bin froh, dass ihr mit euren Partnern und Kindern so ein toller Clan seid.

Die letzte und wichtigste Botschaft ist an meine Partnerin Sabrina gerichtet – ich bin sehr dankbar, dass du mir in den vielen Jahren in jeder Sekunde zur Seite gestanden hast, mir Kraft gibst, mit mir Freude und Rückschläge teilst und mich bereicherst.

Inhalt

1	Zusammenfassung	III
2	Summary	VIII
3	Einleitung	1
3.1.	DNA als Informationsträger.....	1
3.1.1.	Expressionskontrolle durch DNA-Methylierung.....	3
3.1.2.	RNA-Editing	7
3.1.3.	Festphasensynthese von Oligonukleotiden	10
4	Aufgabenstellung.....	12
5	Ergebnisse und Diskussion	14
5.1.	Optimierung der Synthese von fC- und caC-haltiger DNA	14
5.1.1.	Reaktionsbedingung während der DNA-Synthese	14
5.1.2.	Qualitätsaspekte bei der automatisierten Festphasensynthese von Oligonukleotiden	17
5.1.3.	Einbau von caC in DNA-Oligonukleotide	19
5.1.4.	Einbau von fC in DNA-Oligonukleotide.....	22
5.1.5.	Reaktivität des fC-Bausteins unter DNA-Synthesebedingungen.....	22
5.1.6.	Optimierung der Bedingungen der DNA-Festphasensynthese und Abspaltung	24
5.1.7.	Synthese eines alternativen Bausteins.....	30
5.1.8.	Verbesserter fC-Baustein für die Festphasensynthese	32
5.2.	Identifikation biologischer Interaktoren von fC-Derivaten mittels DNA-Sonden	37
5.2.1.	Quantitative Massenspektrometrie	38
5.2.2.	Versuchsanordnung zur Identifizierung der spezifischen Interaktoren	40
5.2.3.	Diskussion der identifizierten Proteine und Interaktoren.....	41
5.3.	Synthese neuer 2'-Desoxy-2'-arabinofluoro-Cytidin Nukleoside	45
5.4.	Adenosin-zu-Inosin-Editing	52
5.4.1.	Synthese des ¹³ C/ ¹⁵ N-markierten Inosin Phosphoramidits	54

6	Experimenteller Teil.....	63
6.1.	Allgemeine Arbeitstechniken und Geräte	63
6.2.	Synthesevorschriften.....	67
6.2.1.	Synthese der caC- und fC-Phosphoramidite.....	67
6.2.2.	Synthese der 2'-Fluoro-dC-Derivate	73
6.2.3.	Synthese des Inosin Phosphoramidits.....	86
7	Abkürzungsverzeichnis	101
8	Literaturverzeichnis	103

1 Zusammenfassung

Das Interesse an 5-Modifikationen des Cytosin ist seit der Entdeckung von 5-Hydroxymethyl-Cytidin (hmC) in Neuronen- und Hirnzellen enorm gewachsen. Dabei stehen insbesondere die höher oxidierten Derivate des 5-Methylcytosins (mC) in jüngerer Zeit im Fokus, welches für die Stilllegung von Genen durch das Abschalten von DNA-Abschnitten verantwortlich ist.¹

Die Grafik aus Abbildung 1 zeigt deutlich die verstärkten Forschungsbemühungen in diesem jungen Forschungsfeld anhand der Anzahl relevanter Publikationen, welche pro Jahr zu Schlüsselbegriffen veröffentlicht werden (Quelle: SciFinder).

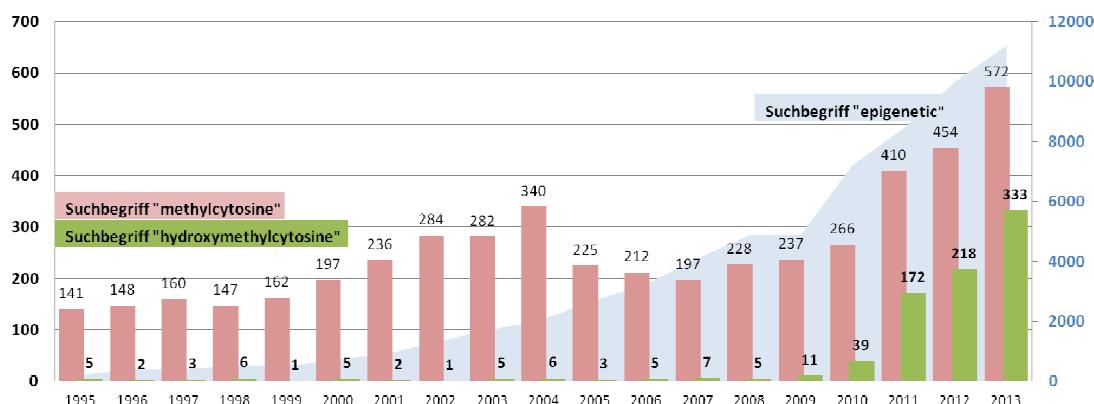


Abbildung 1: Die Entwicklung der Epigenetik-Forschung lässt sich an der Anzahl der Publikationen in diesem Gebiet leicht nachvollziehen. Die roten Balken repräsentieren die Anzahl der Treffer bei der Suche nach dem Begriff "methylcytosine" in SciFinder während die blaue Kurve die Anzahl der Publikationen zum Schlagwort "epigenetic" zeigt. Die neuesten Entwicklungen konzentrieren sich auf die höher oxidierten Derivate wie Hydroxymethylcytosin (grün).

Die in den vergangenen Jahren neu entdeckten DNA-Modifikationen könnten in diesem Kontext Schlüsselrollen spielen. Neben 5-Methylcytosin **1** sind dessen höher oxidierte Derivate Hydroxymethyl- **2** (hmC), Formyl- **3** (fC) und Carboxylcytosin **4** (caC) nun in den Fokus der Untersuchungen gerückt. Die Oxidationskaskade dieser Modifikationen wird in Abbildung 2 von links nach rechts wiedergegeben.

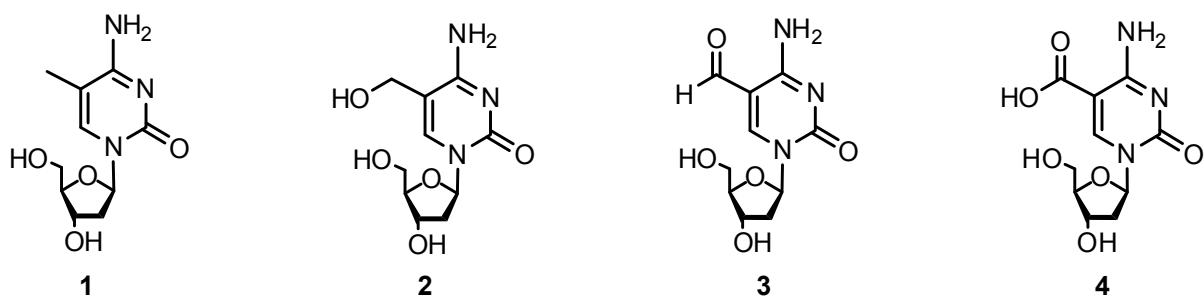


Abbildung 2: Die Stilllegung von Genen wird durch vermehrtes Auftreten von 5-Methylcytosin (**1**) in genomischer DNA vermittelt. Die Rolle der höher oxidierten Derivate Hydroxymethyl- (**2**), Formyl- (**3**) und Carboxylcytosin (**4**) ist hingegen noch nicht im Detail bekannt.

Diese Oxidationsprodukte von mC spielen möglicherweise eine Rolle bei der Entfernung der Methylgruppe durch aktive Demethylierung. Bei dieser Reaktion wird eine Kohlenstoff-Kohlenstoffbindung enzymatisch gespalten. Diese Reaktion kann aus thermodynamischen Gründen leichter an Carboxyl- als an Methylcytidin ablaufen. Eine vollständige Demethylierung genomischer DNA setzt diese in ihren Ursprungszustand zurück. Im zellulären Kontext ermöglicht dies eine Reprogrammierung der Funktion einer Zelle. Aus einer adulten Zelle kann auf diesem Weg eine pluripotente Stammzelle entstehen, welche sich in der Folge wieder in verschiedenen spezialisierte Zelltypen ausdifferenzieren kann.

Aufgrund der Beteiligung der modifizierten Cytidinderivate an fundamentalen Prozessen in Organismen, wie z. B. der Genexpression und –stilllegung, rücken therapeutische Anwendungen in den Fokus, die unter dem Stichwort "Regenerative Medizin" zusammengefasst werden können. Das Ziel der Untersuchung dieser neu entdeckten DNA-Basen ist, deren Entstehung und Funktion sowie die Dynamik des zugrunde liegenden Genregulations-Mechanismus zu verstehen.

Um diese Untersuchungen zu ermöglichen, wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene Nukleoside chemisch synthetisiert, welche in molekularbiologischen Studien zur Aufklärung zellulärer Prozesse verwendet werden. Die Nukleoside wurden mittels maßgeschneiderter Syntheseprotokolle in DNA-Stränge eingebaut. Dabei wurden die einzelnen Schritte der automatisierten Festphasensynthese von DNA systematisch optimiert um Nebenreaktionen an den empfindlichen Bausteinen zu unterdrücken. Die synthetisierten DNA-Stränge wurden in Kooperation mit Prof. Michiel Vermeulen (Department Molecular Cancer Research, UMC Utrecht, Niederlande) als Sonden verwendet um DNA-Protein-Wechselwirkungen in Proteomic-Studien aufzuklären.

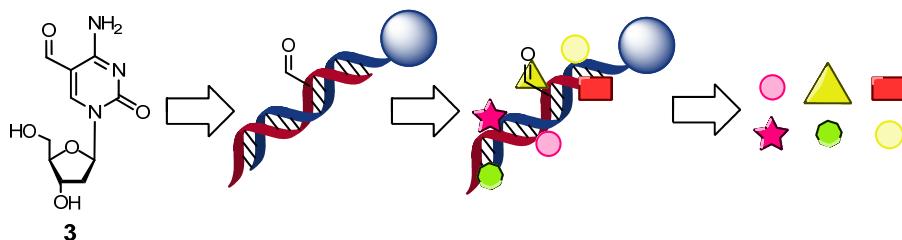


Abbildung 3: Exemplarisch für 5-Formylcytidin (3) wird der Einbau in DNA dargestellt. Diese wurde verwendet um mittels Pulldown-Experimenten Proteine zu identifizieren, welche an diese spezifische(n) Modifikation(en) binden.

Durch die Kenntnis dieser Wechselwirkungen werden Rückschlüsse auf die Funktion der Modifikationen ermöglicht. Neben zahlreichen anderen Proteinen wurde beispielsweise p53, ein DNA-Reparaturenzym und Klf4 als Bindungspartner für oxidierte Methylcytidin-DNA gefunden. Letzteres Protein zählt zu den vier Yamanaka-Transkriptionsfaktoren, welche für die Rück-Programmierung von adulten Zellen in Stammzellen verantwortlich sind.

Die Herstellung von DNA-Strängen ausgehend von 5-Formylcytidin-Monomeren ist einer der Schwerpunkte dieser Arbeit. Durch die in Abbildung 4 gekennzeichneten chemischen Motive wird die außergewöhnliche Reaktivität des Nukleosids erkennbar. Diese stellen eine besondere Herausforderung für die automatisierte Festphasensynthese von fC-DNA dar.

Nebenreaktionen
an der Formylgruppe

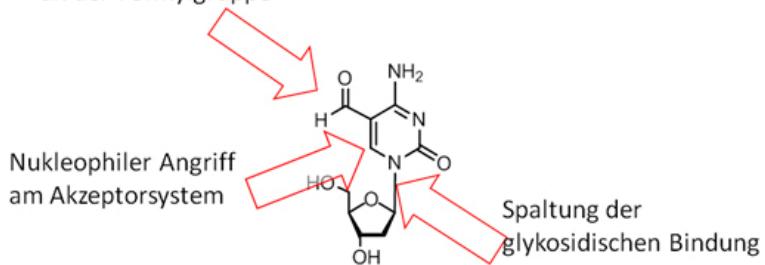


Abbildung 4: Illustration der chemischen Reaktivität des im Jahre 2011 in Stammzellen entdeckten fC-Nukleosids.²⁴

Im Rahmen dieser Arbeit wurden darüber hinaus weitere Bausteine, wie z. B. fluorierte Cytidin-Derivate, zur Herstellung von DNA synthetisiert, die diese neu entdeckten Basen enthält. Dabei wurden einerseits neue Werkzeug-Monomere und andererseits Syntheseprotokolle für die Festphasen-Synthese von DNA entwickelt. Zusätzlich wurden Triphosphat-Bausteine entwickelt, welche mit dem Einbau in DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion kompatibel sind (Abbildung 5). Durch die Fluorierung wird die chemische Reaktionsfähigkeit der Nukleoside hinsichtlich der glykosidischen Bindungsspaltung minimiert. Resultierend daraus werden mögliche Reparatur- oder Demethylierungspfade bevorzugt bzw. unterdrückt.

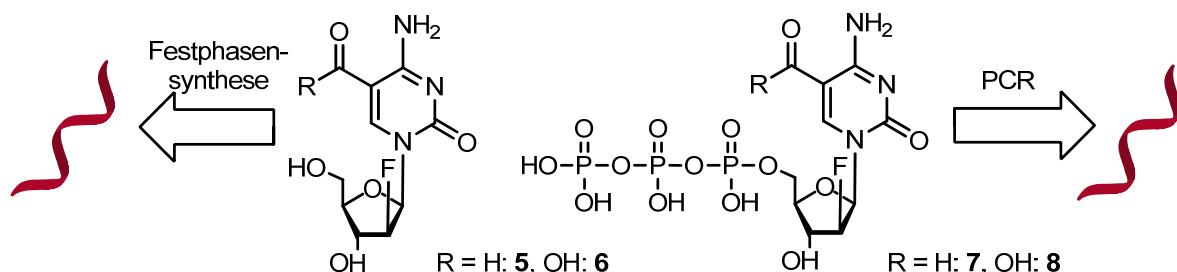


Abbildung 5: Synthetisierte 2'-Fluoro-Derivate der Formyl- und Carboxylnukleoside. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden erfordert einen entsprechenden Phosphoramidit-Baustein der Verbindungen 5 und 6 und ermöglicht den Zugang zu positionsspezifisch modifizierten DNA-Strängen. Für die DNA-Herstellung mittels PCR werden Nukleosid-Triphosphate 7 und 8 benötigt, diese Substrate für die DNA-Polymerase werden enzymatisch in DNA-Stränge eingebaut.

Ein weiterer Teilespekt der Arbeit befasst sich mit Werkzeug-Nukleosiden für die Herstellung von isotopenmarkierter RNA. Sie wird in NMR-Studien eingesetzt, um die molekularen Vorgänge bei der Gen-Regulation mittels RNA-Editing untersuchen zu können. Die genaue Rolle von editierter RNA im Organismus ist bisher weitestgehend unbekannt.

Da keine Struktur editierter, Inosin-haltiger RNA in Lösung bekannt ist, wurden im Zuge dieser Arbeit isotopenmarkierte RNA-Strände hergestellt um die dreidimensionale Struktur des Doppelstrangs mittels NMR-Spektroskopie in Lösung zu vermessen. Mit Hilfe von Strukturdaten lassen sich Wechselwirkungen eines Proteins mit unterschiedlichen Substraten bestimmen und daraus relevante Parameter für enzymatische Reaktion ableiten. Die Untersuchung der dreidimensionalen RNA-Struktur wird in Kooperation mit Prof. Michael Sattler (Chair of Biomolecular NMR Spectroscopy, TU München) durchgeführt.

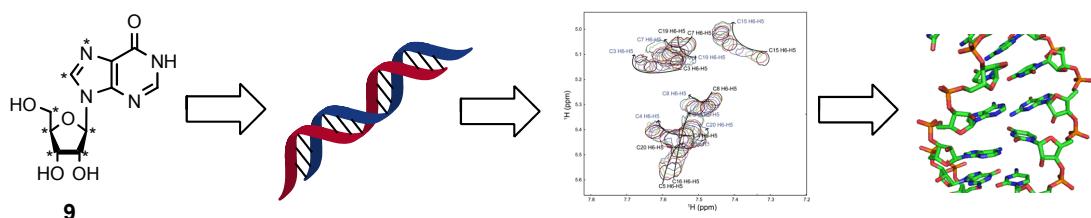


Abbildung 6: Das synthetisierte Inosin-Nukleosid 9 besitzt sieben Isotopenlabels (* = ^{13}C bzw. ^{15}N). Mittels Festphasensynthese wurden zwei komplementäre 20mere hergestellt deren Doppelstrang-Struktur mittels NMR untersucht wurde.

Der Mechanismus der posttranskriptionalen Regulation über Editing ist in Eukaryoten seit 1988 bekannt.² Anders als bei der bereits beschriebenen Genregulation durch DNA-Methylierung kann hierbei die Proteinexpression auf RNA-Niveau beeinflusst werden. Das bedeutet, dass nach der Transkription von DNA in mRNA eine weitere Regulations-Ebene vorhanden ist, welche Einfluss auf die Proteinexpression hat. Letztlich wird durch die Proteinexpression in einer Zelle deren Eigenschaften und Funktion festgelegt und gesteuert.

Beim Adenosin-zu-Inosin Editing wird Adenosin in doppelsträngiger RNA über eine enzymatische Desaminierung in Inosin umgewandelt. Das beteiligte Enzym ist die doppelstrangspezifische Adenosin Desaminase für RNA "ADAR" (*adenosine deaminase acting on RNA*). Diese wird in Abbildung 7 im Komplex mit einem DS-RNA Hexamer gezeigt.

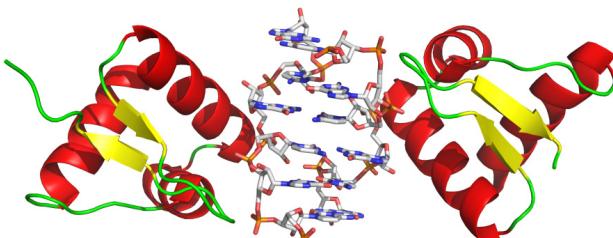


Abbildung 7: RNA Bindungs-Domäne von ADAR.³ Die hydrolytische Desaminierung verändert die Basenpaarungseigenschaften des Adenosins. Das entstehende Inosin besitzt diesbezüglich ähnliche Eigenschaften wie Guanosin und paart dementsprechend mit Cytidin.

Die A-zu-I editierte RNA besitzt andere Eigenschaften bei der Translation als die ursprüngliche RNA, da nun Inosin wie Guanosin erkannt wird. Dies kann in der Konsequenz die Diversität der Genexpression eines Organismus erhöhen.

Zudem ist die resultierende, editierte RNA ein Substrat für den p100-Kofaktor des *RNA induced silencing complex* (RISC), welcher ein Schlüsselprotein in der *Downstream*-Prozessierung bei der RNA-Interferenz ist.^{4,5}

Ausgehend von ¹³C₆-Glucose wurde das in Abbildung 8 gezeigt Inosin-Ribonukleosid **9** synthetisiert, welches anschließend mittels Festphasensynthese in RNA-Stränge eingebaut wurde.

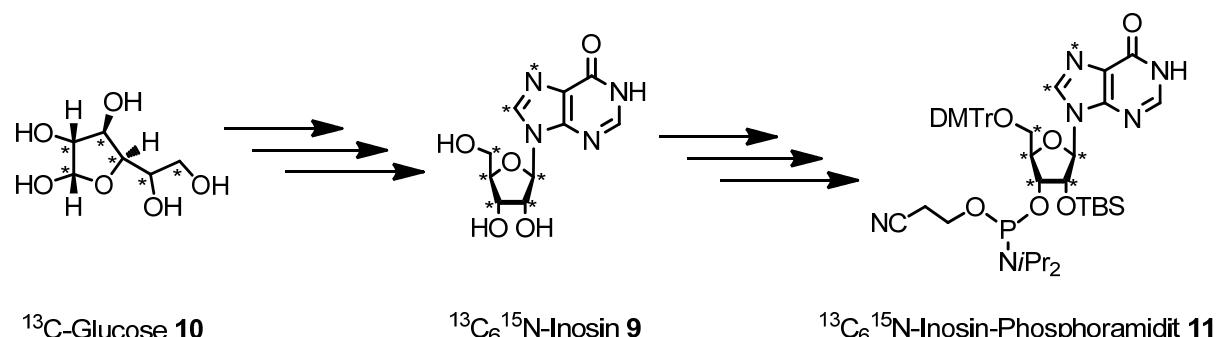


Abbildung 8: Chemische Synthese des isotopenmarkierten Inosin-Bausteins **11** für die RNA-Festphasensynthese. Zunächst wurde über neun Syntheseschritte das Nukleosid **9** hergestellt, welches dann über weitere vier Syntheseschritte für die RNA-Festphasensynthese mittels TBS-Chemie vorbereitet wurde.

Die Isotopenmarkierung dient dabei als NMR-Label, um die spektroskopische Untersuchung dieses komplexen Biomoleküls zu ermöglichen. Die Herausforderung bei der Synthese isotopenmarkierter Verbindungen liegt in der eingeschränkten Verfügbarkeit der benötigten Ausgangssubstanzen. Aufgrund deren hoher Kosten müssen die einzelnen Reaktionsschritte optimiert werden und erfordern zuverlässige Reaktionen.

Dazu wurden verschiedene Schutzgruppenstrategien getestet, diese anhand von Startmaterial mit natürlicher Isotopenverteilung optimiert und die gewonnenen Erkenntnisse schließlich auf schweratomgelabelte Substanzen übertragen. Der synthetische Baustein wurde mehrfach in einzelsträngige RNA mittels RNA-Festphasensynthese eingebaut und das im Milligramm-Maßstab erhaltenen Rohmaterial aufgereinigt und charakterisiert. Die NMR-Studien werden mit dem genannten Kooperationspartner durchgeführt, wobei die Datenaufnahme und –auswertung noch nicht vollständig abgeschlossen ist.

2 Summary

The discovery of 5-hydroxymethyl cytosine in neuronal and brain cells has added momentum to the investigation of cytidine modifications in DNA. In this context, especially oxidized derivatives of 5-methyl desoxycytidine have attracted attention. Methylated desoxycytidine is known to be a hallmark of transcriptional silencing.¹ Figure 1 displays the number of publications containing key words in this field. The graphic indicates the growing interest in understanding the role of cytidine modifications in epigenetic silencing.

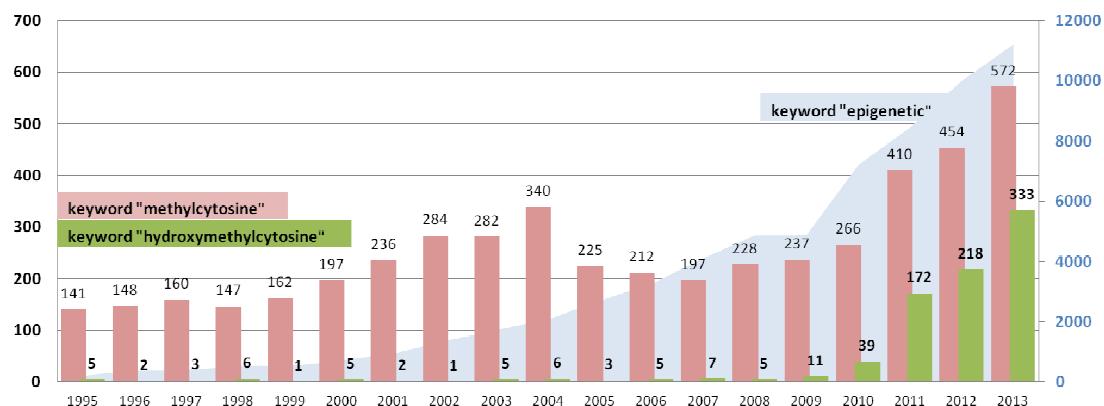


Figure 1: The development of epigenetics research is being illustrated by the number of publications containing relevant key words. The red bars represent the number of SciFinder hits containing the word *methylcytosine*, whereas the blue curve is showing the frequency of the key word *epigenetic*. More recently, the research field is concerning the the oxidized derivatives of methylcytosine is evolving as can be seen by the increasing number of publications containing *hydroxymethylcytosine* (green).

DNA modifications derived from methyl cytosine **1**, which have been discovered in recent years are supposed to be key intermediates of epigenetic regulation of gene expression. These oxidatively generated entities are hydroxymethylcytosine **2**, formylcytosine **3** and carboxylcytosine **4**, which are shown in

Figure 2. The nucleotides are displayed according to the oxidation state of the 5-methyl group from left to right.

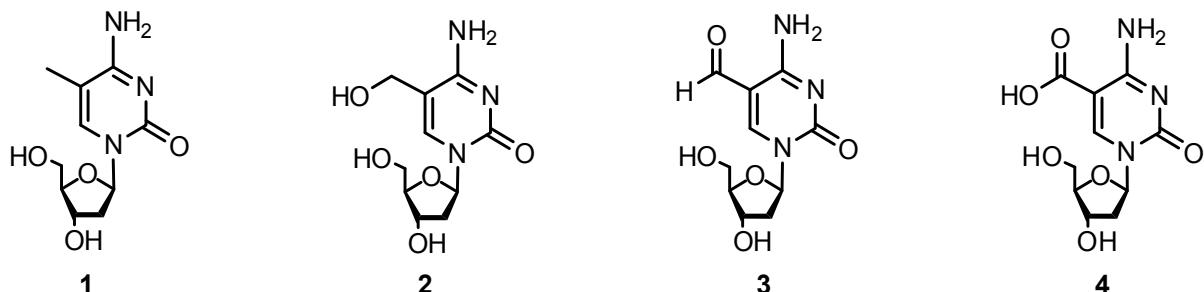


Figure 2: In genomic DNA silencing of genes is being mediated by the abundance of methylcytosine **1**. The biological role of oxidized derivatives hydroxymethylcytosine **2**, formylcytosine **3** and carboxylcytosine **4**, however, remains elusive.

The products of a methylcytosine oxidation sequence in DNA are presumably involved in removing the repressive methylation mark in an active DNA demethylation pathway. While cleavage of a carbon-carbon bond to release the methyl group is thermodynamically disfavored in methylcytosine, removal of oxidized methyl residues is more likely from a chemical reactivity perspective.

Genome wide demethylation of cytidine derivatives results in a complete loss of epigenetic information and thus in a reprogramming of somatic cells towards pluripotency. This ground state of the cellular development enables a cell to differentiate into different tissues which are defined by their epigenetic and gene expression profiles.

The fundamental regulatory mechanisms of gene silencing and expression during early cellular development are closely linked to oxidized derivatives of methyl cytosine. Thus, understanding the role of these newly discovered nucleosides points to therapeutic applications, which are commonly summarized under the term *regenerative medicine*. Investigating their origin and function can help deciphering the dynamics of the underlying gene regulation mechanism.

This work focuses on the chemical synthesis of these nucleosides and their incorporation into synthetic DNA via solid phase synthesis. These tool compounds facilitate the investigation of their biological role in order to reveal the regulation mechanisms of epigenetic gene expression. The synthesis of DNA probes containing hydroxymethyl-, formyl- and carboxylcytidine required elaborate synthesis protocols. These protocols were developed and optimized to suppress side reactions of the chemically sensitive monomers. These DNA strands were applied as chemical probes to investigate protein-DNA interactions and were analyzed in a collaborative project together with Prof. Michiel Vermeulen (Department of Molecular Cancer Research, UMC Utrecht, The Netherlands).

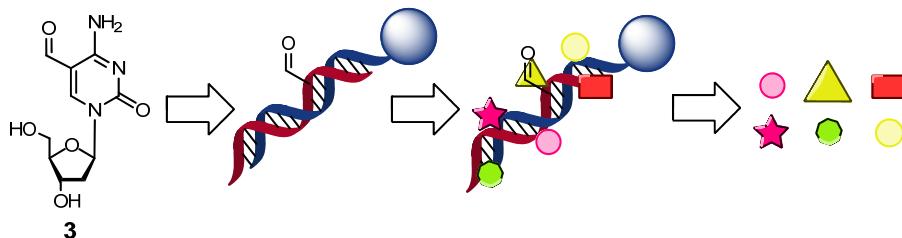


Figure 3: Formyl Cytidine 3 and other 5-modifications of cytidine are being incorporated into synthetic DNA using tailored synthetic protocols. These oligonucleotides are being used in pulldown experiments to specifically attract enzymatic interactors, which in turn are being analyzed and identified.

The analysis of interacting proteins was performed using state of the art tandem mass spectroscopy in a particular experimental setup. Assessment of the binding enzymes provides insight to the underlying biological function of the modifications. Besides the discovery of numerous specifically binding enzymes, a DNA repair enzyme p53 was identified. Another binding partner of oxidized mCDNA is Klf4, which is one of the Yamanaka transcription factors which are responsible for the reprogramming of somatic cells into pluripotent stem cells.

The chemical synthesis of formylcytidine containing DNA was one of the major topics of this thesis. Figure 4 displays the chemical entities which account for the extraordinary chemical reactivity of this

nucleoside. This challenging reactivity required tailored procedures during the solid phase synthesis process.

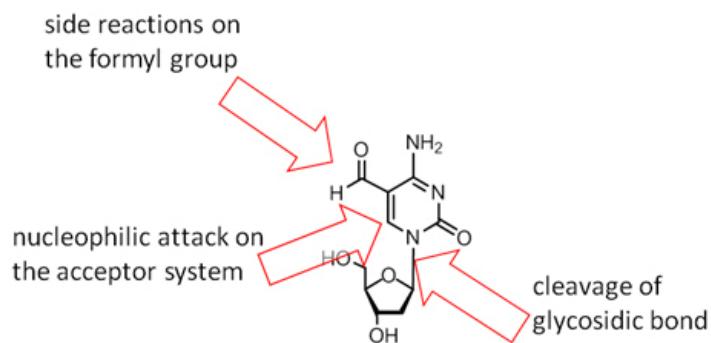


Figure 4: The fC nucleoside was discovered in embryonic stem cells 2011. The depiction illustrates the remarkable reactivity of the molecule.²⁴

In addition to the development of solid phase synthesis processes for the generation of DNA oligomers containing the discussed cytidine derivatives additional derivatisation of these moieties was effected. The synthesis of 2'-fluorinated fC and caC monomers for solid phase synthesis was established with arabino configuration on C2 of the ribose. Moreover these molecules were used in polymerase chain reactions (PCR) by attaching triphosphates on the 5'-end as enzymatic substrates. This enables the production of long DNA oligonucleotides using DNA polymerases.

The fluorinated compounds in Figure 5 are designed to investigate biological pathways within tool oligonucleotides. The chemical reactivity of this compound towards glycosidic bond cleavage is significantly reduced. This makes them precious probes to investigate active demethylation by excluding certain repair and demethylation mechanisms.

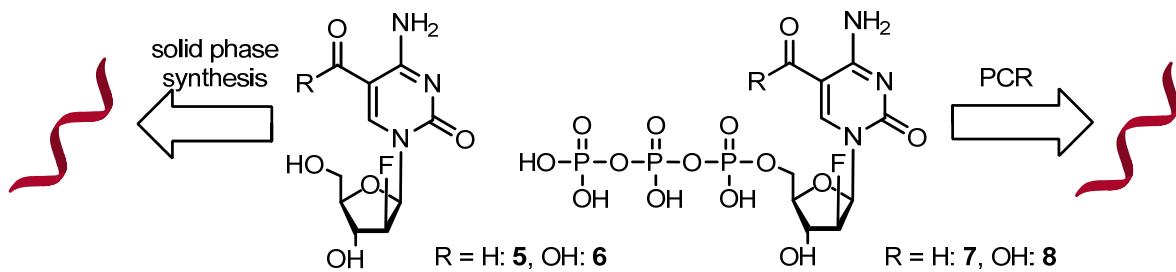


Figure 5: 2'-Deoxy-2'-fluoroarabinoformyl- and carboxylcytidine derivatives have been designed for solid phase and enzymatic synthesis of DNA. The solid phase synthesis requires a phosphoramidite building block whereas enzymatic PCR amplification of long DNA strands uses 5'-triphosphates **7** and **8** as substrates.

Another part of this work involves the preparation of isotope labelled RNA oligonucleotides. These molecules are investigated in an NMR structural analysis to elucidate the molecular basis of gene regulation with edited RNA. To date, the role of RNA in which adenosine is edited via deamination to inosine is vastly unknown. Further on, structural data of inosine containing siRNA in solution is not available yet. In order to elucidate the structural features of inosine-edited RNA double strands, chemically defined isotope labels were introduced into synthetic RNA. These oligonucleotides are structurally characterized to determine protein interactions and derive relevant parameters for enzymatic reactions. The NMR structural analysis is performed in cooperation with Prof. Michael Sattler (Chair of Biomolecular NMR Spectroscopy, TU München)

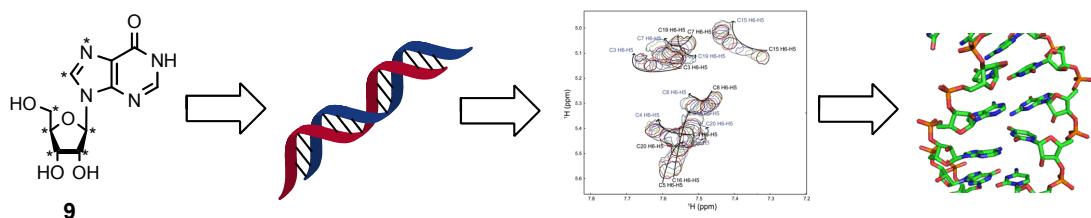


Figure 6: The synthetic inosine nucleoside contains seven isotopic labels at defined positions (* = ^{13}C or ^{15}N). The corresponding phosphoramidite is incorporated into complementary RNA 20mers via solid phase synthesis and the duplex is consecutively analyzed via NMR spectroscopy.

In eukaryotes, posttranscriptional regulation via RNA editing is known since 1988.² Unlike the described gene regulation via DNA (de)methylation, RNA editing mediates expression control on the RNA level. After DNA transcription to mRNA, this new level of translation control is generated via mRNA processing which consequently determines altered protein expression in a cell.

The particular editing of adenosine to inosine is known to occur on double stranded RNA via enzymatic deamination of adenosine. The respective enzyme is the double strand specific RNA deaminase ADAR (adenosine deaminase acting on RNA) which is shown in Figure 7 in complex with a RNA hexamer.

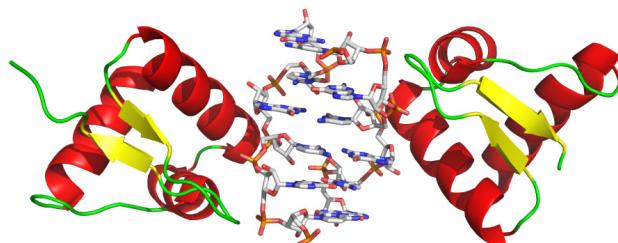


Figure 7: The RNA binding domain of ADAR is depicted.³ The base pairing features of adenosine are altered during deamination. The resulting inosine nucleotide possesses similar pairing properties as guanosine and is therefore preferably matched opposite to cytidine.

The properties of edited RNA are altered regarding the translation process. When adenosine is converted to inosine, the translation machinery recognizes this modification as guanosine. This might enhance the protein expression diversity of an organism. Further to this, the resulting edited RNA is a

substrate of the p100 cofactor of the RNA induced silencing complex (RISC) which is one of the key proteins in the downstream processing during RNA interference (RNAi).^{4,5}

Starting from ¹³C₆-glucose **10** as shown in Figure 8, the inosine building block **11** for RNA solid phase synthesis was prepared and subsequently incorporated into RNA oligonucleotides using the TBS method.

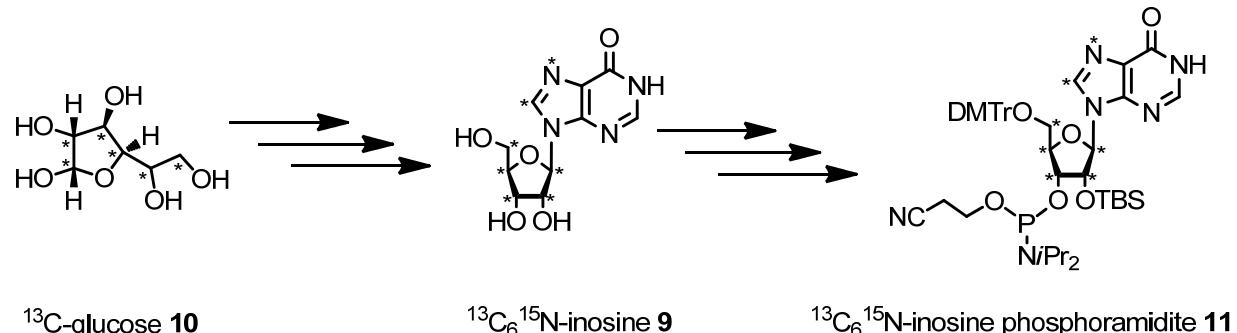


Figure 8: The key intermediates of the chemical synthesis of the isotope labelled inosine building block are displayed. The nucleoside **9** was obtained in a 9 step synthesis and was further adapted to RNA solid phase synthesis within 4 synthetic steps. It was then incorporated into RNA via the TBS method.

The incorporation of ¹³C and ¹⁵N isotopes into the monomer serves as NMR label to facilitate structural examination of this complex biomolecule. The limited availability of appropriate starting material in chemical syntheses of isotope labeled compounds requires additional synthetic steps. This also necessitates optimized and reliable reactions in order to keep the costs for the starting materials low.

To achieve this, a variety of protecting group strategies were evaluated and optimized on material with natural isotope abundance. After optimization of the reaction conditions, the reaction procedures were applied to the heavy atom labeled material. The final monomer was repeatedly incorporated into single stranded RNA via solid phase synthesis and the resulting oligonucleotide was characterized and purified. The obtained milligram amounts of pure sense and antisense RNA are being further analyzed via NMR spectroscopy together with the mentioned cooperation partner. These investigations are currently still ongoing.

3 Einleitung

3.1 DNA als Informationsträger

Die Aufklärung der Struktur⁶ und Funktion⁷ von DNA ist eine der bedeutendsten Entdeckungen in der Geschichte der Wissenschaft. Sie legte den Grundstein für das Gebiet der Molekularbiologie und hat heute nicht nur im breiten Feld der Lebenswissenschaften und der Medizin sondern darüber hinaus in der Nanotechnologie und weiteren technologischen Anwendungen enorme Bedeutung.

Nukleinsäuren sind fundamentale Bausteine lebender Organismen. In Form von Desoxyribonukleinsäure (DNA) fungieren sie als Speicher aller genetischen Informationen in Lebewesen. Dabei bilden die kanonischen Nukleobasen Adenin, Cytidin, Guanin und Thymin (A, C, G, T) das Grundgerüst, durch welches die Erbinformation codiert wird. Die einzelnen Basen sind in DNA durch 2'-Desoxyribose-5'-phosphat Einheiten verknüpft, sie bilden das strukturelle Rückgrat.

In Eukaryoten und Prokaryoten dient dieses Grundgerüst als Matrize für die Transkription der Erbinformation. Bei der Transkription wird die Abfolge der Nukleobasen A, C, G, T in Ribonukleinsäure - genauer Messenger-RNA (mRNA) - umgeschrieben. Die mRNA dient in Lebewesen wiederum als Matrize für die Herstellung von Proteinen (vgl. Abbildung 10). Der Vorgang, bei welchem aus der Basenabfolge der mRNA die Aminosäuresequenz eines Proteins entsteht, wird als Translation bezeichnet.

Dabei unterscheiden sich die Bausteine der RNA nur in wenigen strukturellen Details von DNA-Bausteinen. Diese Unterschiede werden in Abbildung 9 anhand der Strukturen der Nukleoside dargestellt.

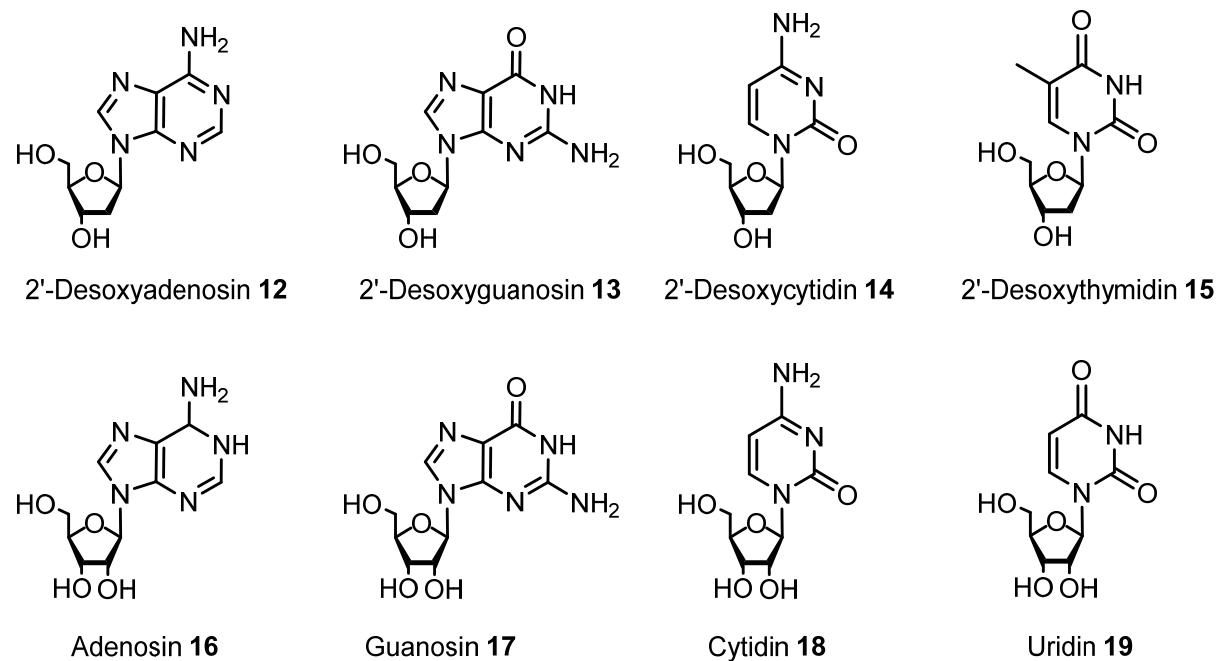


Abbildung 9: Die kanonischen DNA- (oben) und RNA-Nukleoside (unten) unterscheiden sich um den 2'-Substituenten der Riboseeinheit. Darüber hinaus besteht ein weiterer struktureller Unterschied bei 2'-Desoxythymidin bzw. Uridin. Im Uridin ist 5-Methylgruppe der Nukleobase durch ein Wasserstoffatom ersetzt.

Neben ihrer Rolle bei der Transkription ist RNA in einer Fülle weiterer zellulärer Prozesse involviert. Ein Übersichtsartikel listet die mehr als 60 RNA-Klassen mit ihren zugehörigen Funktionen auf.⁸ Dazu gehören unter vielen anderen, die Translation der mRNA in Aminosäuresequenzen, die Regulation der Genexpression sowie Katalyse biochemischer Reaktionen. Letztere Funktion überschneidet sich mit der Funktion von Proteinen, was die Vielseitigkeit dieses Biomoleküls unterstreicht.

Über die Speicherung der Erbinformation (DNA) und deren Weiterverarbeitung (RNA) üben Nukleinsäuren fundamentalen Einfluss auf die Genexpression aus. Die nach diesem Prinzip exprimierten Proteine in einer Zelle legen deren Funktion und Rolle im Organismus fest.

Die bis hier beschriebenen Vorgänge stellen die molekularbiologische Grundlage der Genetik dar, diese sind in Abbildung 10 schematisch dargestellt.

Die Komplexität eines Organismus und insbesondere dessen Lebenszyklus spiegeln sich in den darunterliegenden Kontrollmechanismen wieder. Dabei erscheint es zunächst paradox, dass zeitlich unveränderliche, statische Erbinformationen die hochgradig dynamischen zellulären Prozesse über die gesamte Lebensdauer einer Zelle kontrollieren. Dieser Dynamik wird durch verschiedene regulatorische Prozesse Rechnung getragen, welche die Variation der Genexpression ermöglichen. Dazu gehören beispielsweise die Modulation der DNA-Transkription durch Transkriptionsfaktoren, und die posttranskriptionale Prozessierung der RNA. Mit Hilfe der Transkriptionsfaktoren werden nur DNA-Bereiche ausgewählt, die in RNA umgeschrieben werden. Durch die Vorgänge bei der posttranskriptionalen Prozessierung, wie Capping, Spleißen oder Polyadenylierung werden RNA-Abschnitte herausgeschnitten oder abgebaut.

Dies hat zur Folge, dass der weitaus größere Teil des Erbguts nicht unmittelbar für die Proteinexpression benötigt wird, da Bereiche entweder nicht transkribiert werden oder transkribierte Bereiche nachträglich wieder entfernt werden.

Ein weiterer Mechanismus der auf mRNA-Ebene eingreift ist der durch microRNAs vermittelte Abbau.

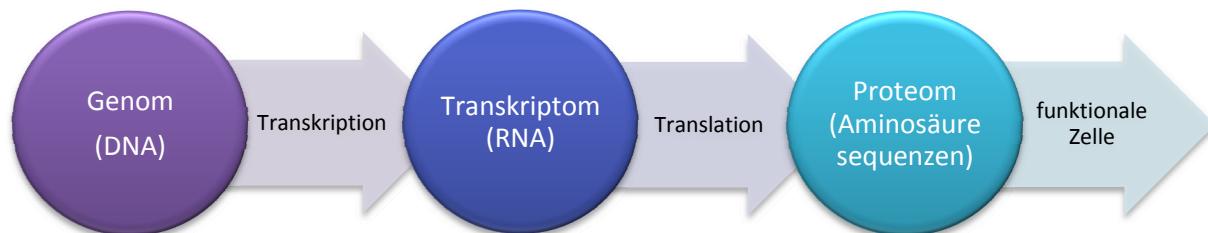


Abbildung 10: Die grundlegenden Prozesse sowie die relevanten Biomolekül bei der Genexpression. Nur ein Bruchteil des Genoms wird in RNA transkribiert (< 5%).⁹ Diese wird durch tRNA in eine Aminosäuresequenz übersetzt. Durch die Gesamtheit aller Aminosäuresequenzen, das Proteom, werden die Eigenschaften einer Zelle im Organismus festgelegt.

In diesem Kontext wurden außerdem weitere Prozesse entdeckt, welche langfristig in die Genregulation eingreifen, indem sie z. B. reversible Veränderungen an Nukleinsäuren hervorrufen. Diese erweitern den Informationsgehalt der Gene um eine zusätzliche Ebene und werden zum Teil auf Tochterzellen vererbt.

Diese zusätzlichen Prozesse, welche über die genetische Regulation durch DNA hinaus gehen, werden unter dem Begriff Epigenetik zusammengefasst.

Auf zwei wesentliche Prozesse, welche in diesem komplexen Netzwerk involviert sind, wird in der Folge weiter eingegangen.

3.1.1. Expressionskontrolle durch DNA-Methylierung

Alle Zellen eines Organismus besitzen den einen identischen Satz an Erbinformationen. Diese bilden die Grundlage aller Funktionen, die der Organismus für die Entwicklung und Funktion spezialisierter Zellen benötigt. Allerdings unterscheiden sich diese Zellen teilweise stark in ihren Funktionen, obwohl sie aus dem gleichen Erbgut entstanden sind. Diese Diskrepanz basiert darauf, dass nur ausgewählte Abschnitte des Genoms letztlich in eine Zellfunktion übersetzt werden.

Es wird also nur ein bestimmter Teil des Genoms für die Aufrechterhaltung der Prozesse einer bestimmten Zelle benötigt. Demzufolge muss eine Auswahl der relevanten Information für die entsprechende Spezialisierung der Zelle erfolgen.

Dieser Auswahl liegt eine chemische Markierung nicht benötigter Gensequenzen zugrunde. Auf DNA-Ebene werden hierfür bestimmte Nukleobasen durch Methylierung modifiziert.^{10,11} In der Natur können so nicht benötigte Gensequenzen vorübergehend ausgeschaltet werden.^{12,13} Dazu werden Cytosin-Basen in CpG-reichen Promotor-Regionen mittels enzymatischer 5-Methylierung chemisch markiert. Auf diese Weise wird der zugehörige Genabschnitt von der Transkription ausgeschlossen.

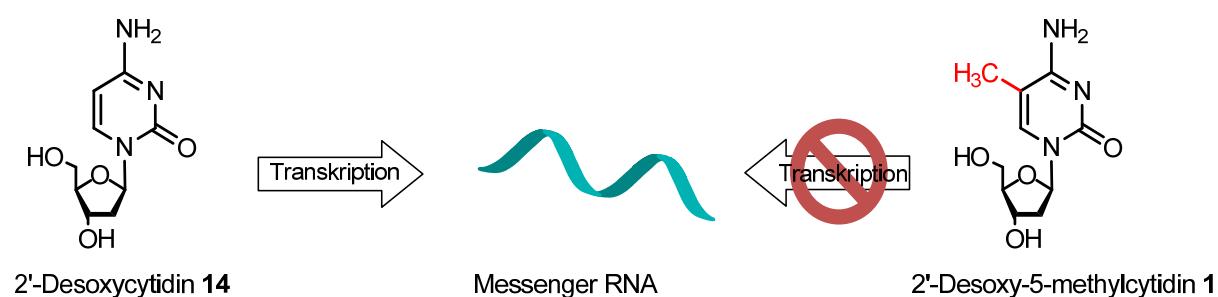


Abbildung 11: Durch 5-Methylierung von Cytidin-Basen in Promotorregionen werden diese Bereiche von der Transkription ausgeschlossen. Daraus resultiert eine Stilllegung dieser Genbereiche, da deren Proteinexpression unterdrückt wird.

Auf diese Weise stillgelegte Gene werden in bestimmten Entwicklungsstadien der Zelle durch einen bisher nicht vollständig aufgeklärten Demethylierungsmechanismus wieder zum Leben erweckt.¹⁴ Damit kann die Proteinexpression an die unterschiedlichen Anforderungen während verschiedener zellulärer Entwicklungsstadien angepasst werden.

Dabei wurde durch die Identifizierung zweier oxidierte Derivate des methylierten Cytidins (mC) in Sägerzellen ein neues Kapitel dieses Forschungsbereichs eröffnet.

Durch das Entfernen der Methylgruppen der DNA werden spezialisierte Zellen wieder in ihren Ursprungszustand zurückgesetzt: Auslöschung dieser Information erzeugt pluripotente Zellen, welche wie Stammzellen verschiedene Spezialisierungen entwickeln können.

Die Demethylierung kann in Säugetieren grundsätzlich auf aktivem oder passivem Weg erfolgen. Während der DNA-Replikation wird durch die Enzyme DNMT1 und UHRF1 das symmetrische

Methylierungsmuster des Templatstrangs in CpG-Regionen aufrecht erhalten. In Abwesenheit dieser Enzyme werden methylierte Cytidine sukzessive gelöscht. In aufeinanderfolgenden Replikationszyklen wird das an gleicher Stelle eingebaute Cytidin nicht wieder methyliert, was als passive Demethylierung in der Literatur beschrieben wird.¹⁵

Die aktive Demethylierung muss über eine oder mehrere enzymatische Reaktionen ablaufen, wobei letztendlich die Methylgruppe durch Spaltung einer Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindung entfernt werden muss. Dabei werden zunächst mögliche Pfade betrachtet, welche keine oxidative Reaktionskaskade am mC voraussetzen.

Die einfachste denkbare Möglichkeit ist die direkte Abspaltung der Methylgruppe, welche allerdings thermodynamisch sehr ungünstig ist. Diese Abspaltung mittels Enzymkatalyse durch *Methyl-CpG-Binding domain Protein 2* (MBD2) wurde von Bhattacharya et al. postuliert¹⁶ konnte aber einer weiterführenden experimentellen Überprüfung nicht standhalten.

Alternativ kann die Demethylierung durch eine Basenexzision (*Base Excision Repair*, BER) hervorgerufen werden wobei die methylierte Nukleobase enzymatisch entfernt und durch unmethyliertes Cytidin ersetzt wird. Diese Reaktion kann durch die DNA-Glykosylasen *Methyl-CpG-Binding domain Protein 4* (MBD4) oder Thymin-DNA-Glykosylase (TDG) vermittelt werden.¹⁷ Allerdings ist die Aktivität der genannten Enzyme gegenüber mC minimal, weshalb auch diese Enzymklasse bisher keine vollständige Erklärung für die Demethylierung von mC liefert.

Die *Nucleotide Excision-Reparatur* (NER) tauscht neben der betreffenden Base außerdem die flankierenden Bereiche aus. In diesem Zusammenhang wurde über die Rolle der Gadd45 Proteinfamilie bei der Demethylierung berichtet.¹⁸ Allerdings konnten keine eindeutigen Beweise erbracht werden, dass diese Proteine unter physiologischen Bedingungen für die aktive Demethylierung verantwortlich sind.

Eine weitere Reaktion, die zur Demethylierung von mC-haltiger DNA führen kann ist die Desaminierung. Aus dieser Reaktion entsteht aus mC durch Abspaltung einer Aminogruppe Thymidin. Dieses kann dann durch BER oder NER wieder durch Cytidin ersetzt werden. Die beteiligte¹⁹ APOBEC-Enzymfamilie (*apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like*) ist allerdings typischerweise bei einzelsträngigen Oligonukleotiden aktiv²⁰ und besitzt nur geringe Aktivität bei mC im Vergleich zum kanonischen Cytidin.²¹ Dennoch wird die Desaminierung als mechanistischer Schritt bei der DNA-Demethylierung von weiteren Erkenntnissen gestützt, da auch DNA-Methyltransferasen (DNMT) unter bestimmten Bedingungen möglicherweise Desaminierungs-Aktivität zeigen.²²

Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen nicht-oxidativen Pfaden sind die oxidativen, aktiven Demethylierungspfade und im Besonderen die dabei auftretenden Intermediate, für diese Arbeit von zentraler Bedeutung.

Die Suche nach den Schlüsselproteinen des Demethylierungspfads hat seit der Entdeckung der enzymatischen Oxidation von mC eine Renaissance erlebt. Mit der Entdeckung der oxidierten Derivate Hydroxymethylcytidin²³ (hmC) und Formylcytidin²⁴ (fC) wurde ein aktiver Demethylierungs-Mechanismus in Zusammenhang gebracht. Dabei spielen die oxidierten Derivate in einer chemisch-mechanistischen Betrachtung eine entscheidende Rolle, um die Hypothese der aktiven, enzymatischen Demethylierung zu belegen.

Die Oxidationen von mC zu hmC, fC und caC werden durch die TET (Ten-Eleven-Translocation) Proteinfamilie vermittelt.²⁵ Mit dem Beweis der enzymatischen Oxidation von mC zu hmC und weiter über fC zu Carboxylcytosin (caC) wurden möglicherweise jetzt die fehlenden Puzzleteile einer aktiven Demethylierungskaskade gefunden.²⁶

Die zugrunde liegenden Hypothesen werden im Folgenden kurz zusammengefasst.

Eine Möglichkeit der Demethylierung könnte eine, indirekt über die DNA-Replikation vermittelte, Auslöschung methylierter Bereiche darstellen. Dabei wird die Affinität der Methylierungs-Enzyme DNMT1 und UHRF1 durch die oxidierten Derivate reduziert.²⁷ Hierdurch wird die Methylierung neu synthetisierter DNA aktiv unterdrückt und es kommt mit fortschreitender Replikation zu einer sukzessiven Auslöschung methylierter Bereiche. Allerdings steht dieser Hypothese gegenüber, dass dieser Pfad bei der vollständigen Demethylierung des Parentalgenoms in embryonalen Vorläuferzellen auftritt, wobei diese unspezifisch und vollständig abläuft.²⁸ Dieser Pfad ermöglicht keine dynamische, positionsspezifische Demethylierung, welche bei der Transkriptionskontrolle während der zellulären Entwicklung beobachtet wurde.^{29,30}

Eine weitere mögliche Variante der Demethylierung ist die oxidations-vermittelte Basenexzision. Durch TET-Enzyme oxidiertes mC wird durch TDG erkannt und ausgeschnitten, woraufhin ein BER-Pfad (vgl. oben) ablaufen kann.²⁸ Dieser replikationsunabhängige Mechanismus wird durch zahlreiche experimentelle Ergebnisse in embryonalen Stammzellen der Maus (mESC) gestützt. Inwiefern dies auch *in vivo* Relevanz besitzt ist bisher ungeklärt.²⁸

Eine weitere auf BER basierende Demethylierungsmöglichkeit von hmC verläuft analog der AID/APOBEC-vermittelten Desaminierung von mC.²¹ Die entstehende Hydroxymethyluracil (hmU) Fehlpaarung im Doppelstrang wird durch TDG und SMUG1 Enzyme repariert. Allerdings ist die Desaminase-Aktivität von AID/APOBEC gegenüber hmC *in vitro* nicht nachweisbar.²¹ Diese Tatsache ist vermutlich auf den sterischen Anspruch der 5-Substituenten des Cytidins zurückzuführen.

Eine letzte Möglichkeit ist die direkte Abspaltung der oxidierten Methylgruppe. Durch die Oxidation wird die chemische Stabilität der C-C-Bindung der Methylgruppe herabgesetzt. Auf diese Weise konnte einerseits die Abspaltung an hmC durch DNMT3A/3B nachgewiesen werden.³¹

Andererseits liefert die Reaktivität der höher oxidierten Derivate bezügliche einer enzymatischen Demethylierung eine plausible Hypothese. Die Decarboxylierung von caC könnte auf dem *Thymidin-Salvage Pathway* ablaufen,³² wobei eine Decarboxylierung von 5-Carboxyuracil von über Iso-Orotatdecarboxylase vermittelt würde. In einem ersten Schritt wird allerdings aus Thymidin Hydroxymethyl-, Formyl- und Carboxyuracil durch Thymin-Hydroxylase generiert, welche eine Ähnlichkeit zu TET besitzt.^{33, 34}

Eine Studie aus dem Arbeitskreis Carell zeigt eine Decarboxylase-Aktivität für caC in mESCs, jedoch ist die Identifizierung des verantwortlichen Enzyms bisher nicht gelungen.³⁵

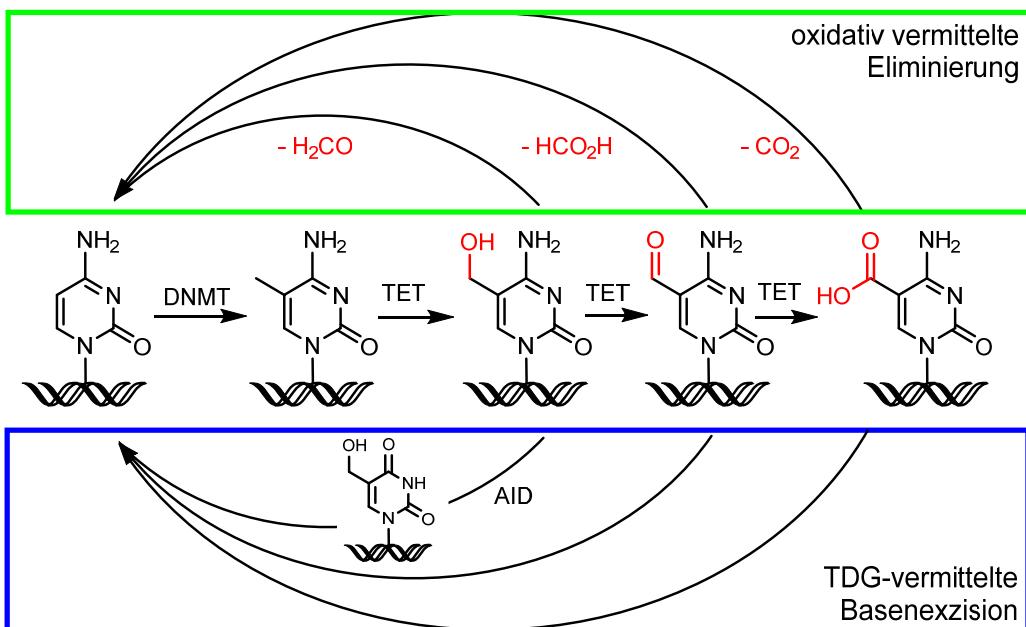


Abbildung 12: Die Regeneration von Cytosin kann über eine TET-katalysierte oxidative Kaskade ausgehend von Methylcytosin verlaufen (grüner Kasten). *In vitro* wurde außerdem eine oxidations-vermittelte Basenexzision beobachtet. Durch TET-Enzyme oxidiertes mC wird durch TDG erkannt und ausgeschnitten, woraufhin ein BER-Mechanismus abläuft (blauer Kasten).

Ein tieferes Verständnis dieses Ablaufs könnte neue Wege in der Medizin ebnen, da durch die Reprogrammierung von Zellen, körpereigene Stammzellen generiert werden können, ohne die darunterliegende Erbinformation zu verlieren.³⁶ Diese pluripotenten Zellen könnten dann gezielt in benötigte Gewebe differenziert werden, um verschiedenste Krankheiten zu heilen.^{37,38}

Die Arbeitsgruppe Carell hat mit der Entdeckung der Formylcytidin-Modifikation in embryonaler Stammzell-DNA einen wichtigen Beitrag geleistet.²⁴ Mit dieser Entdeckung wurde ein wichtiges Zwischenprodukt einer hypothetischen aktiven Demethylierung über einen oxidativen Prozess gefunden. In der Folge wurde caC als finales Oxidationsprodukt von mC entdeckt.^{26,39} Der letzte Schritt einer aktiven Demethylierung wird seitdem intensiv erforscht. Dabei geht man, wie oben beschrieben, davon aus, dass durch Abspaltung der 5-Carboxygruppe des Cytidins die unmodifizierte Nukleobase generiert wird.

Experimente die zum Verständnis dieser Prozesse beitragen erfordern geeignete Sonden und Modell-DNA welche die verschiedenen oxidativen Derivate des mC beinhalten. Diese werden im Verlauf der Arbeit näher betrachtet und deren Synthese und Einbau in DNA genauer beleuchtet.

3.1.2. RNA-Editing

Die posttranskriptionale Veränderung der Erbinformation ermöglicht in Lebewesen eine gesteigerte Expressionsvielfalt und -kontrolle. Die im vorigen Abschnitt beschriebene DNA-Methylierung stellt dabei das wesentliche Prinzip der Expressionsregulation dar, welches vor der Transkription eingreift. Posttranskriptionale Veränderungen des genetischen Codes bedeuten eine Modifikation der durch Transkription entstehenden RNA. Die bekanntesten sind Polyadenylierung, Capping und Spleißen der RNA. Ein weiterer Prozess, mit dem der Informationsgehalt des Transkriptoms variiert werden kann ist das RNA-Editing.

Beim RNA-Editing werden in höheren Eukaryoten chemische Modifikationen an Nukleotiden der RNA eingeführt und dabei deren Basenpaarungseigenschaften verändert. Beispielsweise wird im C-U-Editing Cytidin zu Uridin desaminiert. Das Produkt paart dann nicht mehr mit Guanosin sondern besitzt die zum Adenosin komplementären Eigenschaften.⁴⁰ Ähnlich der oben beschriebenen DNA-Methylierung ist das RNA-Editing eine zeitlich veränderliche Variable bei der Regulation der Genexpression. Im Gegensatz zur DNA-Methylierung ist das RNA-Editing kein reversibler Prozess. Eine editierte mRNA kann also nicht zurück-ediert werden, sondern muss durch erneute Transkription des entsprechenden Genabschnitts neu synthetisiert werden.

Im Fall von Apolipoprotein B resultieren aus einem einzigen Gen zwei verschiedene Protein-Isoformen, welche sich in der Länge ihrer Aminosäuresequenz, als auch in ihrer Funktion unterscheiden.⁴¹ Als Ursache hierfür konnte das C-U mRNA-Editing identifiziert werden.^{42,43} Dabei wird innerhalb eines codierenden Bereichs der mRNA ein CAA-Triplett in ein UAA-Triplett überführt. Statt der Verlängerung der Aminosäure-Kette um Glutamin (entspricht dem Codon CAA) codiert UAA für die Termination der Translation und die Proteinsynthese bricht ab. Das entstehende Apolipoprotein B-48 ist dementsprechend kürzer als das Translationsprodukt der uneditierten mRNA.

Eine weitere Form des Editing bestimmter RNA-Nukleoside ist A-I-Editing (Adenosin-zu-Inosin). Dabei wird wie Abbildung 13 illustriert durch eine Desaminierung des Adenins die nicht-kanonische Nukleobase Inosin generiert.

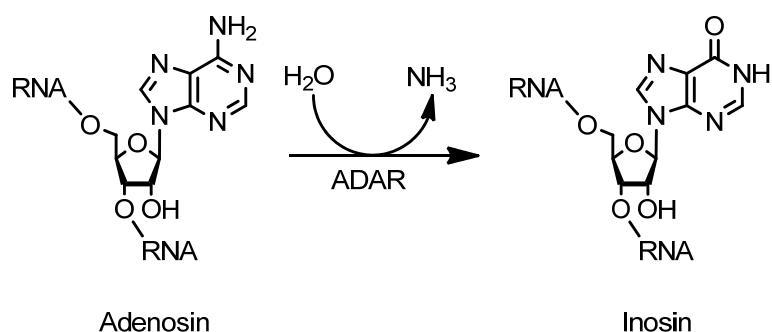


Abbildung 13: Die enzymatische Desaminierung von Adenosin in RNA erzeugt die nicht-kanonische Nukleobase Inosin. Diese Reaktion wird von der ADAR Enzymfamilie vermittelt.

Dies wurde zuerst bei Antisense-RNA Untersuchungen an doppelsträngiger RNA beobachtet.⁴⁴ Dabei wurde resultierend aus einer Duplex-Destabilisierung durch die A:U zu I:U Basenpaarumwandlung allerdings zunächst eine Helicase-Aktivität bei doppelsträngiger RNA vermutet. Erst in der Folge

wurden das A-I-Editing als Ursache und die beteiligten Enzyme *Adenosin Deaminase acting on RNA* (ADAR) identifiziert.⁴⁵ Deren Substratspezifität basiert auf einem einzigartigen Mechanismus. Nicht der Sequenzkontext der umliegenden Intrastrang-Nukleotide, sondern die Duplexstruktur aus dem Ziel-Adenosin und dessen Komplementär-Sequenz werden durch die ADAR-Enzymfamilie erkannt.⁴⁶ Hierfür ist die *dsRNA binding domain* verantwortlich, welche mit dem RNA-Rückgrat interagiert.^{47,48} Auf die Erkennung folgt das Editing, bei welchem die Base zunächst aus dem Duplex herausgedreht wird. Dieser Schritt ähnelt dem *Base Flipping* Mechanismus, welcher von DNA-Methyltransferasen bekannt ist.⁴⁹ Deren Aminosäuresequenz ist zu den ADAR-Enzymen teilweise homolog. Für die katalytische Desaminierungsaktivität ist ein ADAR-Homodimer erforderlich, was *in vivo* durch FRET-Studien belegt wurde.⁵⁰ Allerdings ist die Abhängigkeit der Dimerisierung von der Doppelstrang(DS)-Erkennung bisher nicht vollständig geklärt. Verschiedene Untersuchungen zeigen eine DS-abhängige Dimerisierung, als auch eine Dimerisierung aufgrund von Protein-Protein-Wechselwirkungen.^{51,52}

Inosin besitzt im Vergleich zu Adenosin veränderte Basenpaarungseigenschaften und nimmt gegenüber den kanonischen RNA-Nukleobasen A, G, C, U eine Sonderstellung ein. Die höchste thermodynamische Basenpaarstabilität besitzt Inosin mit Cytidin, weshalb es bei Translation und Splicing wie Guanosin erkannt wird. Inosin besitzt allerdings mit Adenosin, Cytidin und Uridin drei weitere Basenpaarungsmöglichkeiten und wird deshalb als *Wobble-Base* bezeichnet.

Die zentrale Bedeutung dieser promiskuitiven Basenpaarung tritt bei der Decodierung des DNA-Transkripts während der Translation durch tRNA in Erscheinung. Die kanonischen Nukleobasen werden dabei als Triplets abgelesen und jede Triplettkombination als Schlüssel für eine Aminosäure oder für die Termination der Translation erkannt.

Beim Auftreten von Inosin im Basentriplett der tRNA oder der mRNA wird die exakte Zuordnung gestört. Daraus resultiert ein geringerer Bedarf an tRNAs, die zur Erkennung der mRNA benötigt werden, da Inosin als variabler Platzhalter fungiert.⁵³ Dieser Prozess wird durch ADAT-Enzyme (*Adenosine Deaminase acting on tRNA*) katalysiert.⁵⁴

Neben dieser Veränderung der tRNA tritt A-I-Editing bei weiteren zellulären Prozessen in Erscheinung.⁵⁵ Allerdings ist die Umcodierung von Proteinsequenzen durch Editing der mRNA dabei eher selten. Häufiger wird A-I-Editing in nicht-codierenden Bereiche der prä-mRNA beobachtet.⁵⁶

Dieser Editing-Prozess kann als Konsequenz eine Veränderung der Spleißstellen der prä-mRNA hervorrufen.⁵⁷ Beispielsweise werden durch das A-I-Editing Intron-Abschnitte des humanen *Nuclear Prelamin A Recognition Factor* in codierende Exons umgewandelt.⁵⁸

Der Einfluss des A-I-Editing auf die RNA-Interferenz^{59,60} ist ein weiterer hochinteressanter Regulationsmechanismus.⁶¹ Allerdings ist dieser bisher noch vergleichsweise wenig untersucht. Die ADAR-Enzymfamilie besitzt eine dsRNA-Bindedomäne, welche ebenfalls bei den fundamentalen Prozessen der RNA-Interferenz eine Rolle spielt. Die dabei beteiligten Enzyme *Dicer*, *Drosha*, *DCGR8* und *TRBP* erkennen das dsRNA-Substrat auf die gleiche Weise.

Aus diesem Grund wurde vermutet, dass ADAR mit RNAi in Zusammenhang steht und durch kompetitive Bindung der siRNA die RNAi-Effizienz reduziert.⁶²

Zusätzlich ist Inosin-editierte dsRNA gegenüber dem Dicer-TRBP-Enzymkomplex stabil.⁶³ Dieser ist bei uneditierter RNA dafür verantwortlich, dass aus der langen dsRNA kurze, aktive siRNA (ca. 22 Basenpaare) generiert wird, welche die Gen-Stilllegung verursacht.

Ein zweiter Schnittpunkt aus RNA-Editing und -Interferenz ist die Erkennung der siRNA durch den *RNA-Induced Silencing Complex* (RISC). Die RISC-Untereinheit Tudor SN ist ein wesentlicher Kofaktor

für die Nukleaseaktivität und zeigt erhöhte Aktivität gegenüber editierter RNA.⁶⁴ Dies hat zur Folge, dass der enzymatische Abbau editierter siRNA die Menge der aktiven siRNA reduziert und auf diese Weise ein verminderter Silencing hervorruft.

Die beiden beschriebenen Wege, auf denen editierte RNA mit der RNA-Interferenz in Zusammenhang stehen sind bisher nicht mit strukturellen Daten belegt. Auf diese Tatsache wird in einem späteren Kapitel eingegangen. Dabei ist die Interaktion editierter siRNA mit Tudor SN im Fokus des Interesses.

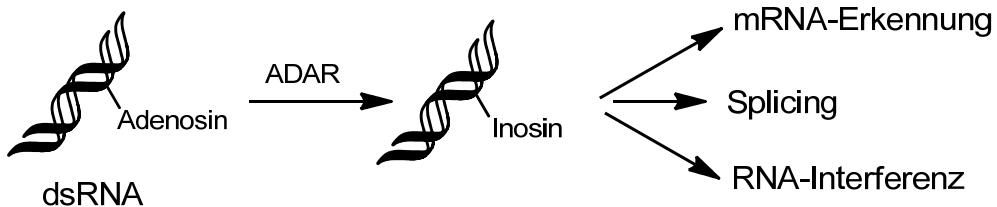


Abbildung 14: Durch die ADAR Emzymfamilie wird Adenosin desaminiert. Die entstehende Hypoxanthin-Nukleobase ist in weiteren zellulären Abläufen von Bedeutung.

DNA-Methylierung und RNA-Editing stellen wichtige Regulationsmechanismen der Genexpression dar. Allerdings basieren sie auf gänzlich unterschiedlichen Zielmolekülen und beteiligten Proteinen. Dennoch ist die biologische Relevanz bei beiden Mechanismen vergleichbar.

Durch die zeitlich veränderliche Modifikation von Nukleinsäuren besitzen sie einen differenziellen regulatorischen Einfluss. Im Gegensatz zur Mutation einzelner Basen in der DNA ist dieser Einfluss aber nicht permanent. Außerdem ist durch eine teilweise Methylierung oder Editing von Nukleinsäuren eine graduelle Anpassung des Expressionsprofils einer Zelle möglich.

Die Untersuchung dieser Prozesse erfordert Werkzeuge, welche auf organisch-synthetischem Weg hergestellt werden können. Die chemische Synthese solcher Oligonukleotide ist ein zentraler Aspekt dieser Arbeit. Aus diesem Grund werden in der Folge einige Gesichtspunkte dieses Herstellungsverfahrens erläutert.

3.1.3. Festphasensynthese von Oligonukleotiden

Die Herstellung von DNA und RNA Oligonukleotiden ist seit den 1950er Jahren immer weiter entwickelt worden. Der entscheidende Schritt zum heutigen Verfahren war die Entwicklung der Phospho-Triester-Methode.⁶⁵ Der daraus hervorgegangene Goldstandard in der Oligonukleotidsynthese ist die Phosphoramidit-Methode,⁶⁶ welche heute gleichermaßen zur Synthese von DNA und RNA verwendet wird. Die kontinuierliche Weiterentwicklung⁶⁷ ermöglichte heute die Herstellung der Oligonukleotide in einem automatisierten Prozess.⁶⁸ Bei diesem werden die Reagentien in einer zyklischen Abfolge zum Festphasen-Trägermaterial gefördert und das Oligonukleotid, wie in Abbildung 15 gezeigt, schrittweise um eine Base verlängert. Diese über 30 Jahre alte Technologie ist heute eine Schlüsseltechnologie für die biologische, biochemische und medizinische Forschung geworden. Ohne die schnelle, einfache und zuverlässige Herstellung von beispielsweise PCR-Primern wäre ein Durchbruch wie beispielsweise die Entschlüsselung des humanen Genoms⁶⁹ kaum möglich.

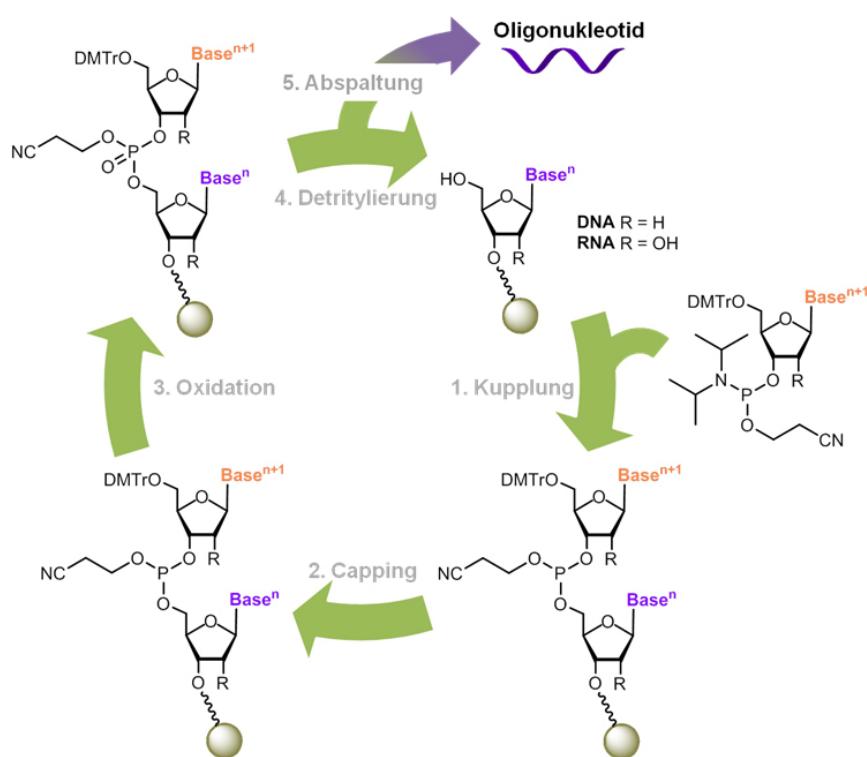


Abbildung 15: Syntheszyklus der DNA/RNA-Festphasensynthese. Die einzelnen Schritte werden weiter unten detailliert beschrieben.

Heute werden für Routine- und Hochdurchsatzanwendungen Oligonukleotide im Pico- bis Milligramm-Maßstab in automatisierten Prozessen hergestellt. Daneben werden auch pharmazeutische Wirkstoffe wie zum Beispiel der von *Isis Pharmaceuticals* entwickelte Antisense-Wirkstoff *Mipomersen* im Kilogramm-Maßstab in entsprechend dimensionierten Reaktoren produziert. Für alle dazwischen liegenden Maßstäbe gibt es ebenfalls einen Bedarf z. B. für *in vitro* oder *in vivo*-Studien in einer Vielzahl von Forschungsinstituten, Universitäten und Unternehmen.

Die zugrunde liegenden chemischen Reaktionen sind dabei fast immer identisch, müssen jedoch der Syntheseaufgabe entsprechend angepasst und optimiert werden.

Die neueren technologischen Entwicklungen zur Synthese von minimalen DNA-Mengen z. B. für die Genexpressionsanalyse basieren auf Microarray-Chips, auf welchen Tausende verschiedener Oligonukleotide auf kleinstem Raum hergestellt werden können.^{70,71}

Hierbei werden die Syntheseschritte nasschemisch und photochemisch durchgeführt. Diese Methode verlangt allerdings einen sehr großen apparativen Aufwand und wird in dieser Arbeit nicht näher betrachtet.

Die einzelnen Schritte des oben gezeigten Festphasensynthese-Zyklus werden später in Kapitel 5.1.1 beschrieben, wobei auch die Reaktionsbedingungen genauer betrachtet werden.

4 Aufgabenstellung

Das Ziel dieser Arbeit ist die Herstellung synthetischer Oligonukleotide mit bisher unbekannten oder wenig untersuchten Nukleosiden. Diese dienen in weiterführenden molekularbiologischen Untersuchungen als Hilfsmittel und Werkzeuge um unterschiedliche Fragestellungen adressieren zu können. Diese synthetischen Oligonukleotide umfassen DNA und RNA, wobei sich die Gliederung der Arbeit an diesem Unterschied orientiert.

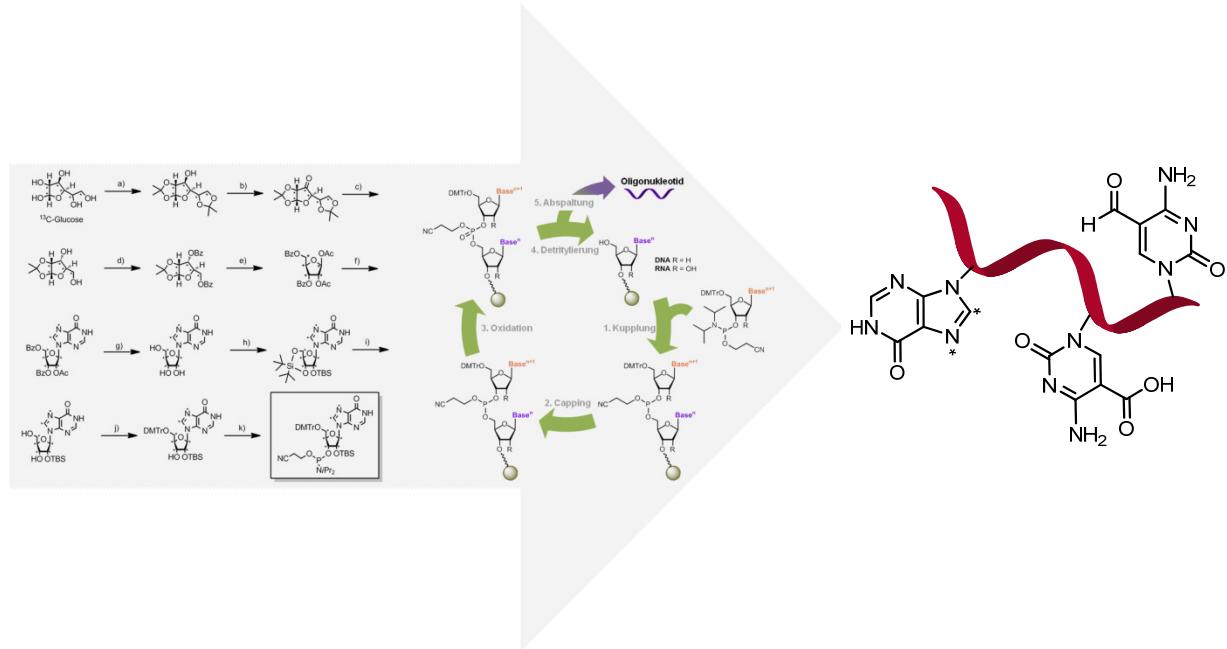


Abbildung 16: Der schematische Überblick zeigt die Arbeitspakete bei der Herstellung spezialisierter, synthetischer Oligonukleotide. Das Endprodukt illustriert die im Fokus stehenden Modifikationen, welche als Sonden zur Identifizierung von Proteinen oder zur Aufklärung biochemischer Pfade verwendet werden können.

Die monomeren DNA-Bausteine mittels organisch-chemischer Methoden zu synthetisieren, sowie geeignete Methoden zur deren Einbau in Oligonukleotide zu etablieren, war der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit. Die bisher verfügbaren Techniken, um caC- und insbesondere fC-modifizierte DNA zu generieren, unterliegen fundamentalen Einschränkungen.

In diesem Kontext sollte eine Möglichkeit gesucht werden, um 5-Formyl- und -Carboxylcytidin auf effiziente Weise in Oligonukleotide einbauen zu können. Dazu sollte eine Kombination aus einem Baustein und einer dazu kompatiblen Methode erforscht werden.

Die Motivation hierfür liegt in der wachsenden Bedeutung dieser DNA-Modifikationen als epigenetische Marker. Innerhalb dieses Themenkomplexes sollen außerdem alternative Zugangswege zu DNA mit epigenetischen Modifikationen ermöglicht werden. Dafür sollen geeignete synthetische Bausteine für die Polymerasenkettreaktion entwickelt werden, welche aufgrund ihrer speziellen Reaktivität neue Erkenntnisse hinsichtlich der Basenexzisionsreparatur und Demethylierung von DNA ermöglichen.

Ein weiterer thematischer Komplex beschäftigt sich mit der Synthese von isotopenmarkierter RNA als Sonde für NMR-Untersuchungen. Das Ziel ist die Herstellung eines siebenfach isotopenmarkierten Inosin-Phosphoramidits sowie dessen Einbau in RNA-Einzelstränge. Dabei muss eine ausreichende

Menge des reinen RNA-Materials generiert werden, um NMR-Experimente zu ermöglichen. Die Aufklärung der räumlichen Struktur von Inosin-editierter RNA ist das Ziel der Studie, welche in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Sattler an der Technischen Universität München durchgeführt wurde.

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Optimierung der Synthese von fC- und caC-haltiger DNA

5.1.1. Reaktionsbedingung während der DNA-Synthese

Die Herstellung von DNA, welche spezifisch die Oxidationsprodukte des Methylcytidins, fC und caC, enthält, ist ein wichtiges Werkzeug für die Untersuchung der Funktion dieser Modifikationen.

Die bisher bekannten und üblicherweise verwendeten Herstellungsverfahren von DNA mit diesen "neuen" Modifikationen sind jedoch in verschiedener Hinsicht unzureichend oder schlicht nicht universell anwendbar. Die schrittweise Optimierung der Oligonukleotidsynthese wird im folgenden Kapitel dargestellt. Zuvor werden die einzelnen Schritte der Festphasensynthese beschrieben und die typischen Reaktionsbedingungen zusammengefasst.

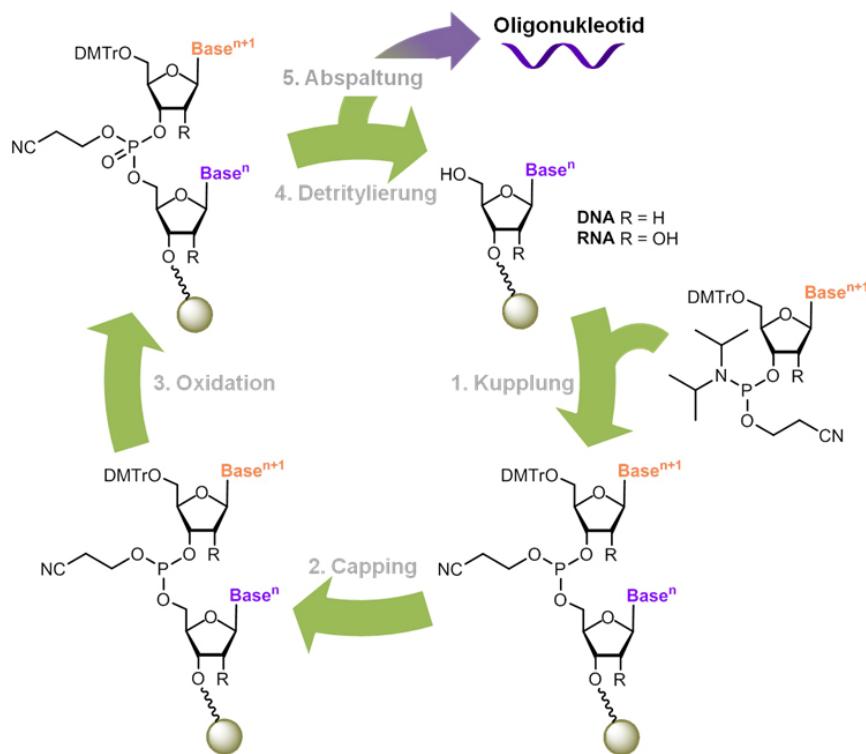
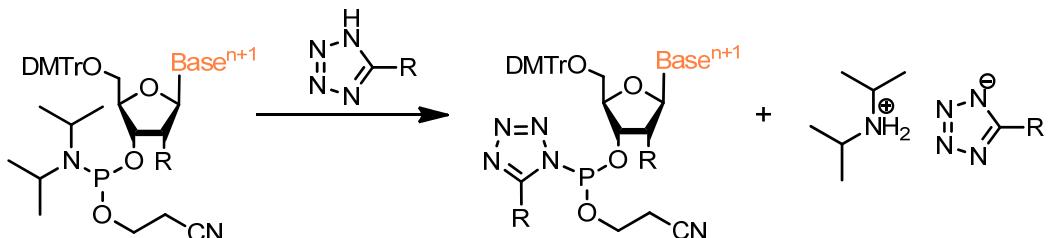


Abbildung 17: Die schematische Darstellung der Oligonukleotid-Synthese illustriert einen Syntheszyklus, bei welchem der DNA oder RNA-Strang um ein Nukleotid verlängert wird. Durch automatisierte Wiederholung der Zyklen können heute Stranglängen von weit über 100 Basen bei DNA und etwa 100 bei RNA erzielt werden.

1. Kupplung:

Der Aufbau synthetischer Oligonukleotide erfolgt in der Regel ausgehend von einer über die 3'-Hydroxyfunktion verknüpften Startbase, welche an das Festphasenmaterial gebunden ist. Die

Verlängerung des Oligonukleotids um jeweils eine Base erfolgt dann durch eine Reaktion der freien 5'-Hydroxyfunktion der Baseⁿ mit dem 3'-Phosphoramidit der darauffolgenden Baseⁿ⁺¹. Bei dieser Reaktion wird zunächst der Phosphoramidit-Baustein durch Reaktion mit einem aziden Azol wie in Schema 1 gezeigt aktiviert.^{72,73}



Schema 1: Aktivierung des Phosphoramidit-Bausteins durch Tetrazol

Für die Aktivierung stehen eine breite Auswahl von Azolen zur Verfügung, von denen die gängigsten 1*H*-Tetrazol, ETT (5-Ethylthio-1*H*-tetrazol), BTT (5-Benzylthio-1*H*-tetrazol), und *Activator 42*® (5-[3,5-Bis(trifluormethyl)phenyl]-1*H*-tetrazol) sind. Diese unterscheiden sich im Wesentlichen durch Ihre Löslichkeit in trockenem Acetonitril und besitzen verschiedene pKs-Werte. Diese Daten sind in Tabelle 1 in Kapitel 5.1.6 zusammengefasst.⁷⁴

Die Kupplung erfolgt dann durch einen Angriff der 5'-OH-Gruppe des Baseⁿ am aktivierten 3'-OH des Nukleosid-Bausteins (Baseⁿ⁺¹). Anschließend werden die Nebenprodukte, sowie die benötigten Reagentien durch Waschen des Trägers mit trockenem Acetonitril entfernt. Das Kupplungsprodukt ist über eine hydrolyseempfindliche Phosphitriester-Bindung verknüpft.

2. Capping

Die Ausbeute bei chemischen Reaktionen ist typischerweise kleiner als 100%. Demzufolge verbleibt, je nach Kopplungseffizienz der Baseⁿ⁺¹, ein Teil der unreaktierten Baseⁿ am 5'-Ende im Reaktionsgemisch. Dies führt bei der Kopplung der darauffolgenden Baseⁿ⁺² zu einem Nebenprodukt, welches um die Baseⁿ⁺¹ verkürzt ist. Über die vielfache Wiederholung des Synthesezyklus' werden in diesen Nebenreaktionen zahllose Oligonukleotid-Stränge generiert, welche eine zufällige Abfolge der Nukleotide aufweisen. Diese können aufgrund ihrer ähnlichen Länge wie das Ziel-Oligonukleotid nicht vom Produkt abgetrennt werden. Aus diesem Grund ist der Capping-Schritt notwendig. Bei diesem werden die 5'-OH Gruppen, welche nicht während der Kopplungsreaktion umgesetzt wurden, als Acetylester dauerhaft geschützt und so an einer Weiterreaktion gehindert. Dies führt zu einer erheblich erhöhten Homogenität des Rohprodukts. Typischerweise werden hierfür basische Gemische von *N*-Methylimidazol und Acetanhydrid verwendet.

3. Oxidation

Die in Schritt 1 entstandene Phosphitriester-Bindung wird in diesem Schritt durch eine Mischung aus I₂ und beispielsweise Pyridin zum natürlicherweise vorkommenden Phosphor(V)-Ester oxidiert. Dieser ist chemisch wesentlich stabiler und besteht während weiterer Synthesezyklen. Die β-Cyanoethyl-Schutzgruppe wird erst nach der Synthese durch eine Base entfernt.

4. Detritylierung

Um die wachsende Oligonukleotid-Kette am 5'-Ende für die Kupplung mit der darauffolgenden Base vorzubereiten, wird die 5'-Dimethoxytrityl-Schutzgruppe durch Di- oder Trichloressigsäure-Lösung entfernt.⁷⁵ Das dabei entstehende farbige Dimethoxytrityl-Kation wird üblicherweise photo- oder konduktometrisch gemessen und dient als Maß für die Kupplungsausbeute.

5. Abspaltung

Nach Abschluss des Synthesezyklus ist das Oligonukleotid noch an die feste Phase gebunden. Außerdem sind noch die permanenten Schutzgruppen an den einzelnen Nukleobasen, sowie die β -Cyanoethyl-Schutzgruppen am Phosphatetriester vorhanden. Diese werden in einem finalen Schritt entfernt und gleichzeitig die Bindung zur festen Phase gespalten.

Die Einzelreaktionen dabei unterscheiden sich in ihrer Kinetik, daher ist es möglich diese nacheinander durchzuführen. Dennoch wird aus praktischen Gründen meist eine Eintopf-Abspaltung in Mikroreaktionsgefäßchen bevorzugt.

Durch die Zugabe von Base wird zuerst, durch Abspaltung von Acrylnitril, der Phosphatetriester zum -diester umgesetzt. Die Abspaltung vom Träger ist unter den typischen Bedingungen die nächste Reaktion. Dabei wird das 3'-Ende freigesetzt. Letztlich werden noch die verschiedenen Schutzgruppen der Nukleobasen entfernt. Diese besitzen bei der typischen NH₄OH-Abspaltung unterschiedliche Abspaltungskinetiken, wobei sich meist die Isobutyryl-Gruppe am stabilsten erweist und die Reaktionsdauer determiniert.

Bei der RNA-Synthese schließt sich dann noch die Abspaltung der 2'-Hydroxy-Schutzgruppen an. Diese werden üblicherweise mit Fluorid-Reagentien abgespalten.

Postsynthetische Prozessierung des Oligonukleotids

Das erhaltene Roh-Oligonukleotid muss nach der Synthese und Abspaltung vom Festphasenmaterial durch Zentrifugation oder Filtration getrennt werden. Eine anschließende Fällung des Materials entfernt die im Überstand befindlichen Schutzgruppenfragmente. Je nach Anwendungsbereich des hergestellten Oligonukleotids schließen sich ein oder mehrere Reinigungsschritte an. Diese umfassen häufig *Reversed Phase* oder Ionenaustausch-Chromatographie, Gelelektrophorese, sowie Gelfiltration oder vergleichbare Entsalzungsschritte. Je nach Reinigungsaufwand steigt die Qualität des Materials, welche bei Rohsynthesen je nach Länge im Bereich von 70% liegt und bei gereinigten Strängen 95% überschreiten kann.

5.1.2. Qualitätsaspekte bei der automatisierten Festphasensynthese von Oligonukleotiden

Die Kriterien für eine erfolgreiche Festphasensynthese von Oligonukleotiden lassen sich im Allgemeinen auf wenige Aspekte zusammenfassen:

1. Qualität der Phosphoramidit-Bausteine
 - Verunreinigungen der Monomere, Phosphor(III) vs. Phosphor (V))
2. Qualität der verwendeten Reagentien
 - Aktivator, Capping, Oxidationsmittel, Detritylierungs- und Abspaltreagentien
3. Kompatibilität der Bausteine mit den verwendeten Reagentien
4. angepasstes Syntheseprotokoll bei der automatischen Synthese
 - Synthesemaßstab, Reaktionszeiten, Äquivalente, Volumina
5. Sequenzabhängige Interferenz der einzelnen Nukleotide
 - Sekundärstrukturen

Aus den oben genannten Kriterien und dem in Abbildung 17 dargestellten Synthesezyklus resultieren einige Anforderungen an das Design und die Synthese von monomeren Phosphoramidit-Baustein:

- DMT-Schützung der 5'-Hydroxyfunktion, Aktivierung der 3'-Hydroxyfunktion
- Maskierung bzw. Schützung von vorhandenen reaktiven Gruppen
- Stabilität der gewählten Schutzgruppen unter den Synthesebedingungen
- Kompatibilität der Schutzgruppen zu den kommerziellen Monomeren hinsichtlich der Abspaltung

Im Allgemeinen ist der Begriff "Reinheit" für das Produkt einer automatisierten Oligonukleotidsynthese im chemischen Sinne nicht exakt. Das gewünschte, "reine" Produkt besteht aus einer definierten Anzahl und Abfolge von Nukleotiden.

Dabei sollen alle, für die Festphasensynthese notwendigen Schutzgruppen, Reagentien und die etwaigen Nebenprodukte abgetrennt sein. Die häufigsten Nebenprodukte sind üblicherweise kürzere Polymerfragmente (n-1, n-2, etc.) welche aus unvollständiger Kopplung und Capping der einzelnen Monomere resultieren. Darüber hinaus werden meist noch unvollständig entschützte Nebenprodukte beobachtet oder eine postsynthetische Modifikation von dT oder U durch Acrylnitril, welches bei der Abspaltung der β-Cyanoethyl Schutzgruppe des Phosphor(IV) generiert werden kann. Insbesondere bei der Herstellung von Oligonukleotiden mit mehr als 50 Nukleotiden ist eine Abtrennung von Fehlsequenzen mit annähernd gleicher Basenzahl kaum mehr möglich.

Im Falle von RNA-Synthesen ist die vollständige Abspaltung der 2'-OH Schutzgruppen zusätzlich relevant. Für diesen Fall stehen eine Reihe von 2'-Schutzgruppen zur Verfügung, welche je nach Länge und Verwendung der herzustellenden RNA ausgewählt werden müssen.

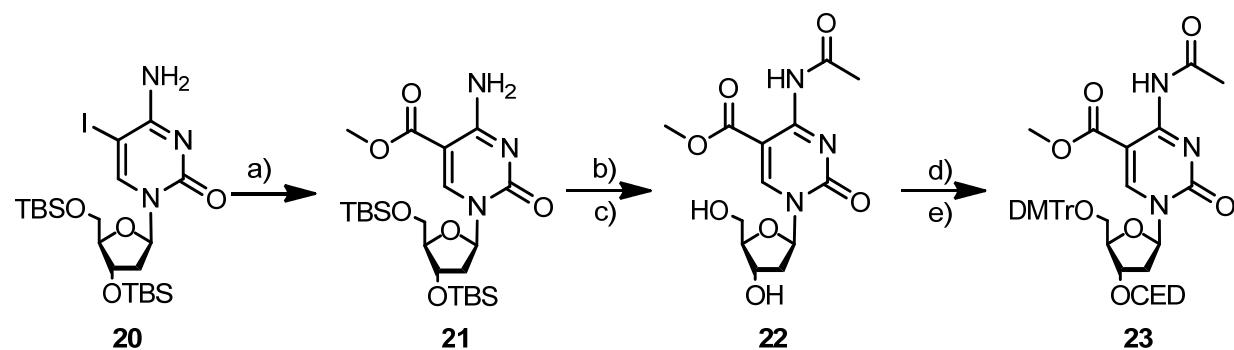
Nichtsdestotrotz sind auch nach diversen Reinigungsstufen immer noch Addukte (Na^+ , H_2O , etc.) oder andere Salze aus HPLC-Puffergemischen vorhanden. Darüber hinaus ist das Oligonukleotid abhängig vom pH-Wert nicht zwingend homogen, sondern kann bei vorhandener, partieller Komplementarität der Sequenz mit sich selbst hybridisieren. Dabei sind Intra- und Inter-Strang Sekundärstrukturen möglich. Dies ist bei der Analyse der Oligonukleotiden und deren Verwendung als Primer, Sonden, Wirkstoffe oder Ähnlichem zu berücksichtigen.

Ausgehend von den bekannten, verfügbaren Syntheseprozessen und -geräten werden für neue wissenschaftliche Fragestellungen immer neue hochspezialisierte Werkzeug-Oligonukleotide entwickelt. Dabei müssen diese Werkzeuge mit den bestehenden Verfahren in Einklang gebracht werden, wenn deren universeller Einsatz für die Forschung und Entwicklung gewünscht ist. Eine zuverlässige Reproduzierbarkeit der Synthesen und ein geringer zusätzlicher Aufwand für den Einbau und die postsynthetische Prozessierung der Sonderbasen sind dabei erforderlich.

Unter diesem Gesichtspunkt wurden im Arbeitskreis Carell Phosphoramidit-Bausteine der Nukleoside 5-Hydroxymethylcytidin,⁷⁶ 5-Formylcytidin und 5-Carboxylcytidin entwickelt, was in den folgenden Kapiteln betrachtet wird.⁷⁷

5.1.3. Einbau von caC in DNA-Oligonukleotide

Das höchst-oxidierte Produkt des Methylcytidins wurde von He et al. im Jahre 2011 in DNA-Oligonukleotide eingebaut.⁷⁸ Die Synthese basiert auf der von Carell⁷⁹ und Nomura et al. beschriebenen Route,⁸⁰ bei welcher ein C5-Trifluorethylester über eine Pd-katalysierte CO-Insertion unter Einwirkung von Trifluorethanol generiert wird. Im Schema 2 wird bei dieser Reaktion Methanol verwendet um den entsprechenden Methylester zu erhalten.



Schema 2: Synthese des caC-Phosphoramidits adaptiert von He et al.

a) CO, PPh₃, PdCl₂(MeCN)₂, MeOH, 84 %, b) Ac₂O, Pyridin, DMAP, 98 %, c) HF Pyridin, EtOAc, 76 %, d) DMTrCl, Pyridin, 62%, e) Diisopropylammoniumtetrazolid, Bannwarth Reagenz, CH₂Cl₂, 94%.

Um die biologische Bedeutung der Modifikationen zu untersuchen wurde die Synthese wie in Schema 2 gezeigt, nachvollzogen und der Einbau in Oligonukleotide angestrebt. Dabei stellten sich einige Eigenschaften des Phosphoramiditbausteins als nachteilig heraus.

Um die Rekrutierung der wechselwirkenden Proteine zu verstärken ist ein wiederholter Einbau der Modifikation in den Strang hilfreich. Außerdem muss der Sequenzkontext der Modifikation die biologische Realität möglichst gut widerspiegeln, was bedeutet, dass eine Mindestlänge der Stränge erforderlich ist, um die Erkennung und Bindung durch Interaktoren auszulösen. Diese variiert abhängig vom Protein zwischen 5-12 Nukleobasen. Insbesondere können Länge und Modifikationsgrad der Stränge dazu beitragen, dass die Spezifität der Wechselwirkung erhöht wird. Die Aussage über die rekrutierten Proteine gewinnt so an Signifikanz.

Die Arbeitsgruppe von Prof. He zeigte vorrangig den Einbau von einzelnen caC-Modifikationen in ein sehr kurzes DNA Oligomer mit nur fünf Nukleotiden. Mit dem beschriebenen Baustein sind keine langen synthetischen Oligonukleotide zugänglich, da dieser Baustein unter den typischen DNA-Synthesebedingungen nur eingeschränkt stabil ist und daher *ultramild* Synthese- und Abspaltungsbedingungen erfordert.

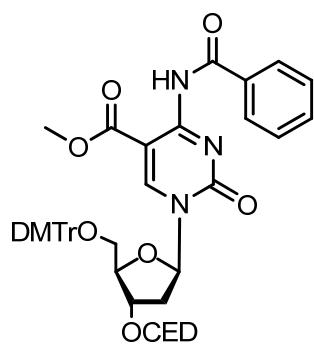
Die im Zuge dieser Arbeit durchgeführten DNA-Synthesen mit diesem Baustein führten zu vergleichbaren Ergebnissen. Das zugehörige *Reversed Phase* HPL-Chromatogramm (RP-Chromatogramm) des Rohprodukts ist in Abbildung 19A gezeigt und zeigt ein uneinheitliches Produkt mit einer Retentionszeit von 30 bis 35 min.

Allerdings wurden die verschiedenen Nebenprodukte der DNA-Synthese nicht isoliert oder detailliert analysiert. Die Stabilität der Schutzgruppe wurde anhand dünnenschichtchromatographischer Analysen beurteilt. Dabei erwies sich die Verbindung **23** in Schema 2 als instabil. Bereits nach mehrtägiger Lagerung der Verbindung bei -20 °C zeigte sich auf dem Dünnschichtchromatogramm ein zusätzliches

Signal, welches beim Erwärmen die typische orangefarbene Farbe von DMT-geschützten Verbindungen zeigt. Aufgrund der gestiegenen Polarität der Verbindung liegt die Vermutung nahe, dass das Nebenprodukt unter Abspaltung der Acetyl-Schutzgruppe entstanden ist und die exozyklische Aminogruppe frei vorliegt.

In Abhängigkeit von den verwendeten Synthesereagentien kommt es mit diesem Baustein vermutlich zu einer partiellen Abspaltung der N-Acetylgruppe und anschließend zur Bildung verzweigter Nebenprodukte die sich nachteilig auf die Reinheit und Ausbeute der isolierten DNA auswirken. Insbesondere die Synthese von hochmodifizierter DNA wird so erschwert, da die Anzahl der Nebenprodukte die Isolierung der Ziel-DNA verhindert.

Aus diesem Grund wurde im Arbeitskreis Carell eine Stabilisierung der Amino-Schutzgruppe angestrebt, welche den typischen DNA Synthesebedingungen standhält und keine gesonderte Behandlung bei der Abspaltung benötigt. In Analogie zu anderen kommerziell erhältlichen Cytidin-Phosphoramiditen wurde deshalb eine Benzoyl-Schutzgruppe an dieser Position eingeführt.



24

Abbildung 18: Verbesserter caC-Baustein für die DNA-Festphasensynthese.

Der in Abbildung 18 gezeigte, erhaltene Baustein **24** wurde hinsichtlich des Einbaus in DNA mittels Standard-Festphasensynthese untersucht. Zudem wurde die Abspaltung und Reinigung der Oligonukleotide mit dem Baustein von aus der Arbeitsgruppe He verglichen. Die hergestellte DNA weist vier modifizierte Basen auf und besitzt die folgende Sequenz:

5' AAG ATG ATG **XG XG XG XG** ATG ATG 3'

Hier ist in vier CpG-Inseln jeweils das Cytidin durch caC (**X**) ersetzt. Auf die detaillierte Beschreibung der ausgewählten Sequenz wird in einem späteren Kapitel eingegangen.

Dabei erwies sich die Benzoylgruppe als der Schlüssel für die Verbesserung und Vereinfachung der DNA-Synthese sowie der HPLC-Reinigung. Das RP-Chromatogramm (Abbildung 19B) zeigt das Rohprodukt nach Abspaltung von Träger und der permanenten Schutzgruppen. Das intensivste Signal entspricht dabei dem gewünschten Produkt, die weiteren Signale mit kürzerer Retentionszeit den Abbruchfragmenten. Die Verunreinigung mit größerer Retentionszeit ist vermutlich einer unvollständigen Abspaltung der permanenten Schutzgruppen geschuldet. Unter den gewählten Bedingungen (18h RT, 0.4 M NaOH in 4/1 MeOH/H₂O) ist die Isobutyryl-Schutzgruppe des Guanosins im Vergleich zu den anderen Basen-Schutzgruppen (Benzoyl-, Acetyl-) am stabilsten. Aus diesem

Grund liegt hier die unvollständige Spaltung dieses Amids nahe. Dennoch lässt sich das Hauptsignal isolieren und eine Verlängerung der basischen Abspaltung kann eine noch weiter gesteigerte Produktausbeute ermöglichen.

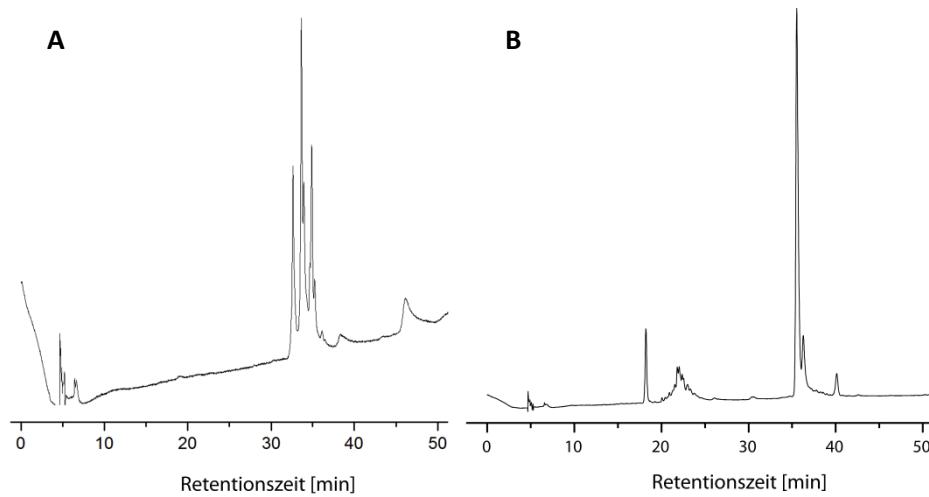


Abbildung 19: Reversed Phase-Chromatogramme des Rohmaterials mit der Sequenz
5' AAG ATG ATG AXG AXG AXG AXG ATG ATG 3' (X = caC) A) hergestellt mit dem Phosphoramidit nach He et al.
B) hergestellt mit dem, im Arbeitskreis Carell verbesserten Amidit

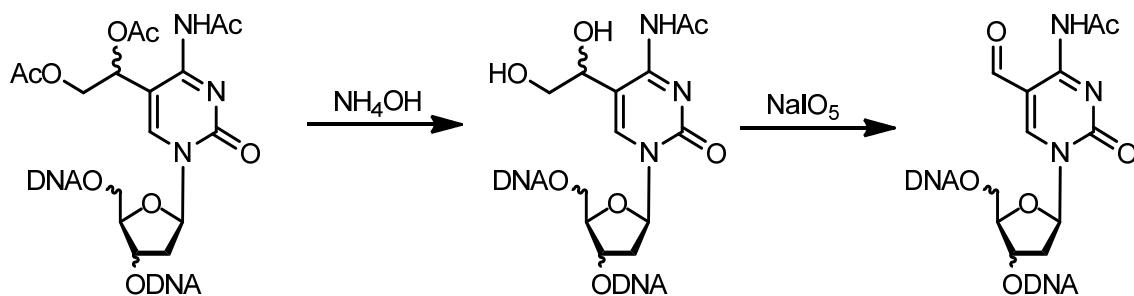
Der in dieser Dissertation entwickelte Baustein ist in leicht modifizierter Version als Carbonsäureethylester bereits bei kommerziellen Anbietern erhältlich und ermöglicht nun die Herstellung von DNA Strängen mit mehrfachen Carboxyl-Cytidin Modifikationen unter Standard-Bedingungen. Die Kompatibilität der Abspaltungsbedingungen ist mit nahezu allen anderen kommerziellen Bausteinen gegeben.

5.1.4. Einbau von fC in DNA-Oligonukleotide

5.1.5. Reaktivität des fC-Bausteins unter DNA-Synthesebedingungen

Im Hinblick auf die molekularbiologischen Untersuchungen anhand der modifizierten DNA wurden neben caC auch fC-haltige Strände benötigt.

Hierfür ist bereits ein kommerziell erhältlicher Baustein⁸¹ verfügbar. Dieser besitzt wie in Schema 3 dargestellt ein acetylgeschütztes Diol, welches postsynthetisch zunächst freigesetzt und im Anschluss gespalten wird. Die Diolspaltung mit NaIO₄ erfordert einen zusätzlichen Prozessierungsschritt und liefert nach der Aufreinigung die DNA mit der gewünschten Formyleinheit.



Schema 3: Der kommerziell erhältliche fC-Baustein wird zunächst unter basischen Bedingungen entschützt und das Diol anschließend mit Periodat gespalten.

Das hochreaktive fC unterliegt allerdings bereits in Anwesenheit von Luftsauerstoff einer langsamen Weiteroxidation zum caC.⁸² Diese Oxidation findet in erheblichem Maße als Nebenreaktion bei der oxidativen Diolspaltung statt. Das hat zur Folge, dass auf diese Weise generierte fC-haltige DNA immer auch zu einem geringen Anteil caC modifiziert ist. Die Unterscheidung von enzymatisch generiertem Oxidationsprodukt und dem, bei der postsynthetischen Prozessierung erzeugten, ist grundsätzlich nicht möglich. Dies hat bei der Untersuchung der enzymatischen Konvertierung von mC, hmC oder fC drastische Folgen. Der auf diesem Weg erhöhte Hintergrund an Oxidationsprodukt führt möglicherweise zu einer falschen Bewertung enzymatischer Prozesse und folglich auch der biologischen Bedeutung der epigenetisch relevanten Modifikationen.

Neben der Oxidationsempfindlichkeit besitzt das fC-Nukleosid ein Akzeptorsystem, welches von geeigneten Nukleophilen in einer 1,4-Addition angegriffen werden kann.⁸³ Dieser Angriff aktiviert die C5-Position des Pyrimidins was zu einer darauffolgenden C-C Bindungsspaltung und der daraus resultierenden Abspaltung der Formyl-Einheit als Ameisensäure führen kann. Diese Reaktivität wurde im Arbeitskreis Carell detailliert untersucht.^{82,84}

Dabei wurde eine thiol-vermittelte, säurekatalysierte C-C Bindungsspaltung für die Nukleobasen caC und fC entdeckt. Diese Reaktion kann am einzelnen Nukleosid als auch am Oligonukleotid ablaufen. Dabei ist die Aktivierung durch beispielsweise β-Mercaptoethanol essentiell. Die experimentellen Daten der C-C Bindungsspaltung werden dabei durch *in silico* Daten gestützt und zeigen die stärkste Bindungsspaltungstendenz für die Basen caC und fC wohingegen hmC nicht über diesen Mechanismus reagieren kann.

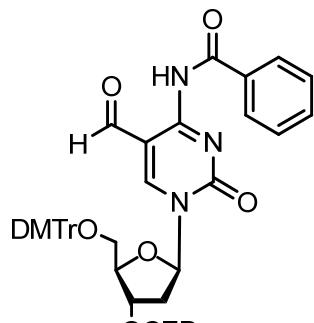
Aus den hier beschriebenen Reaktionsmöglichkeiten des Nukleosids kann, insbesondere bei wiederholtem Einbau der Modifikation, ein statistisches Gemisch an DNA-Spezies entstehen, welche chromatographisch schwer zu analysieren und isolieren sind.

Die Notwendigkeit eines robusten Bausteins, welcher diese spezifischen Nachteile umgeht, ist mit der intensiven Untersuchung von DNA Modifikationen hinsichtlich ihrer (epi)genetischen Bedeutung in den Fokus gerückt. Der Bedarf an einem Monomeren mit besseren Eigenschaften lässt sich auch am Interesse von kommerziellen Anbietern von DNA-Synthesematerialien bemessen, die diesen Baustein vermarkten wollen.

Vor diesem Hintergrund wurden im Arbeitskreis Carell und von anderen Gruppen⁷⁸ verbesserte Bausteine entwickelt. Die im Arbeitskreis Carell entwickelte Ausgangssubstanz für die Festphasensynthese trägt am exozyklischen Amin eine stabile Benzoyl-Schutzgruppe und ist in Abbildung 20 dargestellt. Der Baustein konnte von Martin Münzel (AK Carell) erfolgreich mittels Festphasensynthese eingebaut werden und die gewünschte Produkt-DNA isoliert werden.⁸⁵

In Analogie zu dem im oberen Abschnitt beschriebenen caC-Baustein entwickelte auch die Gruppe von Prof. He einen fC Baustein dessen Synthese ebenfalls über eine Pd-katalysierte Carbonylierungsreaktion verläuft. Dabei wird, wie beim caC das exozyklische Amin mittels eines Acylesters geschützt.

Dabei zeigte sich allerdings auch, dass der Mehrfacheinbau dieses Phosphoramidits hinsichtlich der Aufreinigung problematisch ist und die Ausbeuten nicht mit Standard-DNA Synthesen konkurrieren können.



25

Abbildung 20: Die erste Generation des im Arbeitskreis Carell entwickelten Formyl-Cytidin Baustein.

Mit diesem Wissen wurde eine DNA-Synthesemethode gesucht, mit der sich trotz der eingeschränkten chemischen Stabilität des fC-Monomers hochspezifisch DNA-Stränge mit Formyl-Cytidin-Nukleobasen herstellen lassen. Wie bereits im oberen Abschnitt beschrieben spielt die Häufigkeit einer Modifikation zusammen mit der Länge des DNA-Fragments eine wesentliche Rolle bei der Erkennung durch biologische Interaktoren, weshalb der Einsatz von kurzen Oligomeren meist nicht zielführend ist.

5.1.6. Optimierung der Bedingungen der DNA-Festphasensynthese und Abspaltung

Die Synthese der bereits oben aufgeführten DNA-Sequenz wurde mit X = 5-Formylcytidin als Phosphoramidit-Baustein (Verbindung **25**) am ABI 394-Synthesizer durchgeführt. Zunächst wurde mit den Standard-Bedingungen, wie sie im Experimentalteil aufgeführt sind, gearbeitet.

Dabei wurden gute Kopplungseffizienzen erzielt. Jedoch zeigten die resultierenden RP-Chromatogramme der Roh-DNA, ein breites Signal. Das zugehörige Chromatogramm ist in Abbildung 21A dargestellt. Die gewünschte Produkt-DNA ließ sich aus diesem Gemisch mittels präparativer RP-HPLC isolieren, jedoch ist die Ausbeute aufgrund der zahlreichen Nebenprodukte wesentlich geringer als beim Einbau von Standard-Monomeren. Zum Vergleich ist in Abbildung 21B das RP-Chromatogramm der DNA-Synthese mit dem analogen caC-Baustein (Verbindung **24** Abbildung 18) gezeigt, welche unter identischen Bedingungen durchgeführt wurde. Man erkennt ein wesentlich breiteres Signal beim Einbau der fC-Modifikation.

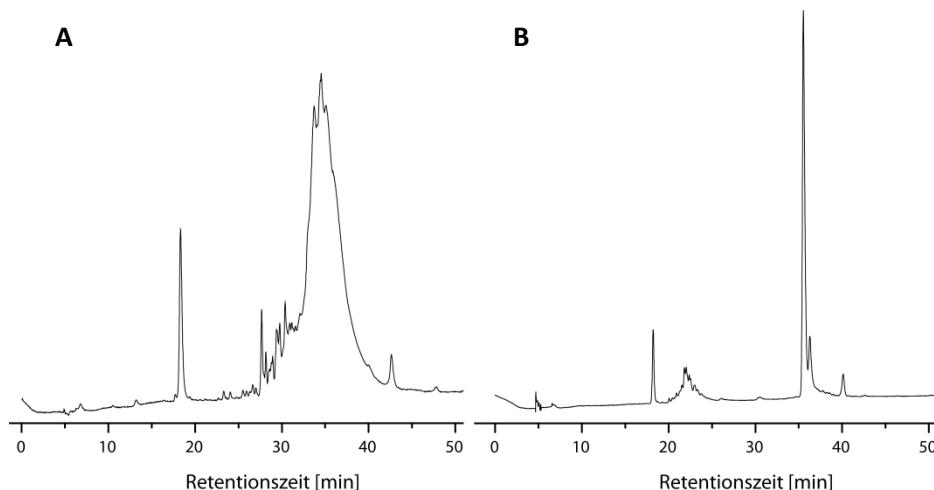


Abbildung 21: Revered Phase Chromatogramm der fC haltigen DNA (A) nach Abspaltung unter Standard Bedingungen im Vergleich mit der entsprechenden caC-haltigen Sequenz (B).

Ein verbessertes Syntheseprotokoll für die automatisierte Festphasensynthese soll die Nebenprodukte minimieren. Die bereits in der Einleitung beschriebenen Einzelschritte der Oligonukleotid-Synthese wurden deshalb hinsichtlich ihres Einflusses auf die Reinheit und Homogenität des erzeugten Materials untersucht.

Abspaltung

Die üblicherweise bei der Abspaltungsreaktion eingesetzten Protokolle basieren auf der Verwendung von ethanolischer NH₄OH-Lösung oder wässriger Ammoniak/Methylamin-Gemische.^{86,87} Dabei werden, je nach gewähltem Reagens und Temperatur, Reaktionszeiten von 10 min bis 48 h eingehalten. Im Falle der formylhaltigen DNA ist eine Verwendung von ammoniakalischen Abspaltreagentien nicht geeignet, da die Formylgruppe unter Bildung eines Imins reagiert. Aus

diesem Grund wird für die Formyl- und Carboxyl-DNA stattdessen meist die im Experimentalteil beschriebene 0.4 M NaOH-Lösung eingesetzt.

Abhängig von den, an der DNA eingeführten Modifikationen, wie zum Beispiel Farbstoffen, Dithiol-Linkern oder reaktiven Gruppen für Konjugationen (z. B. Maleimide) müssen die Abspaltungsbedingungen individuell abgestimmt werden. Fast immer stellen diese Modifikationen hinsichtlich ihrer chemischen Stabilität den Flaschenhals bei der Herstellung von Oligonukleotiden dar. Zudem sind die Bedingungen bei der Abspaltung im Vergleich zu den Syntheseschritten (Abbildung 17, Schritte 1-4) wesentlich harscher und daher häufig verantwortlich für die Bildung von Nebenprodukten und Produktgemischen.

Unter der Annahme, dass im Falle der Formyl-Modifikation ebenfalls der Abspaltungsschritt für die Entstehung des Produktgemisches verantwortlich ist, wurde zunächst dieser Syntheseparameter untersucht. Die Bedingungen während der automatisierten Festphasensynthese wurden zunächst beibehalten und die Abspaltung des Strangs vom Träger und der permanenten Schutzgruppen variiert.

Methoden, die besonders milde Bedingungen ermöglichen und deshalb typischerweise bei empfindlichen Modifikationen eingesetzt werden enthalten z. B. *tert*-Butylamin als basische Komponente.⁸⁸ Diese kommen aber im Falle der Formyl-Modifikation nicht infrage, da eine erwartete Imin-Bildung einen weiteren Hydrolyse-Schritt erfordern würde. Eine, in der Literatur auch als "Ultra-Ultramild Methode" beschriebene Entschützung, verwendet Diisopropylamin in einer methanolischen β-Mercaptoethanol Lösung.⁸⁹ Auch diese Methode ist für die fC-DNA aus bereits beschriebenen Gründen nicht denkbar.

Die mildeste praktische Alternative zu den beschriebenen Abspaltungsbedingungen verwendet K₂CO₃ als 0.05 M Lösung in Methanol, sie wird in der Literatur als "Ultramild-Methode" beschrieben.⁹⁰ Hierfür müssen allerdings besondere Monomer-Bausteine verwendet werden sowie im Capping-Reagenz Acetanhydrid durch Phenoxyacetylanhydrid ersetzt werden.

Dies wurde für die oben beschriebene DNA-Sequenz durchgeführt, jedoch konnte auf diesem Wege keine höhere Reinheit im Rohprodukt erzielt werden. Auch eine Variation der Reaktionszeiten bei der NaOH-Entschützung lieferte kein verbessertes Ergebnis.

Die oben beschriebenen Reaktivität der C5-Position bezüglich eines nukleophilen Angriffs am Formyl-Nukleosids birgt eine weitere potentielle Nebenreaktion. Die Cyanoethyl-Schutzgruppe des Phosphatrückgrats kann unter entsprechenden Reaktionsbedingungen als Nukleophil in dieser fungieren. Um diese Michael-Addition von Acrylnitril zu unterdrücken werden können Di- oder Triethylamin als Abfangreagentien eingesetzt werden. Jedoch konnte weder der Einsatz von 5% als auch 10% Triethylamin bei der Abspaltung keine bessere Ausbeute liefern.

Nachdem die Variation der Abspaltbedingungen keine signifikante Verbesserung liefern konnte, wurden die weiteren Syntheseschritte gezielt untersucht.

Oxidationsschritt

Beim Oxidationsschritt (Abbildung 17 Schritt 3) wird die Reaktion zyklisch mittels einer 0.025 M Iodlösung in Lutidin/MeCN/Wasser durchgeführt.⁹¹ Unter Verwendung der Phosphoramidit-Methode zur DNA-Synthese stehen vor allem wasserfreie Oxidationsreagentien zur Verfügung.⁹²⁻⁹⁵ Bei diesen wird Iod durch organische Peroxide wie beispielsweise *m*CPBA oder (1*S*)-(+)-(10-Camphorsulfonyl)-oxaziridin ersetzt, welche in wasserfreiem organischen Lösungsmittel gelöst werden. Dabei resultiert

aus der mangelnden Stabilität der Peroxide in der Praxis ein erheblicher Zusatzaufwand, da diese Lösungen immer frisch angesetzt werden müssen um nachlassende Reaktivität auszuschließen.

Ein Resultat unvollständiger Oxidation bei der Festphasensynthese ist die Entstehung von kürzeren DNA-Fragmenten als Nebenprodukte. Die Phosphor(III)-Spezies ist nicht stabil und wird insbesondere bei der Behandlung mit Säure während der Detritylierung gespalten.

Bei der fC-DNA Synthese wurde die Oxidation allerdings als unkritischer Schritt identifiziert. Das mögliche Nebenprodukt das bei der Oxidation der Formylgruppe zur Carbonsäure entstehen kann wurde nicht detektiert. Aus diesem Grund wurde dieser Schritt unter Beibehaltung der Standardbedingungen durchgeführt.

Aktivierung

Die Aktivierung des Phosphoramidits (Abbildung 17, Schritt 1) ist der initiale Schritt des Phosphoramidit-Synthesezyklus. Der Mechanismus ist in Schema 1 gezeigt. Ein ausführlicher Übersichtsartikel zu diesem Thema gibt die gesamte Bandbreite verschiedener Aktivatoren wieder. Dazu gehören die verschiedenen Substanzklassen: Tetrazole und weitere Azole, Salzkomplexe (z. B. Pyridinium-Salze), sowie Carbonsäuren, Lewis-Säuren oder geeignete azide Phenole.⁹⁶

Die in Tabelle 1 aufgelistete Auswahl verschiedener Aktivatoren verdeutlicht einerseits das Spektrum der Substanzklassen, als auch deren Spanne hinsichtlich der Azidität. Die grau hinterlegten Substanzen wurden im Zuge dieser Arbeit für die Synthese von fC-haltiger DNA eingesetzt. Die Auswahl reflektiert das Spektrum der pKs-Werte um eine Aussage über die Empfindlichkeit des fC-Einbaus hinsichtlich der Aktivator-Acidität zu erlauben.

Aktivator-Substanz	pKs-Wert
5-Nitrobenzimidazoliumtriflat	2.76
5-(Bis-3,5-trifluoromethylphenyl)-1 <i>H</i> -tetrazol "Activator-42"	3.4
1-Phenyl-5-mercaptopotetrazol	3.65
5-(4-Nitrophenyl)-1 <i>H</i> -tetrazol	3.7
2,4-Dinitrobenzoësäure	3.7
1-Methyl-5-mercpto-tetrazol	3.86
5-Benzylthio-1 <i>H</i> -tetrazol	4.08
2,4-Dinitrophenol	4.1
5-(Methylthio)-1 <i>H</i> -tetrazol	4.15
5-(Ethylthio)-1 <i>H</i> -tetrazol	4.3
Benzimidazoliumtriflat	4.5
1 <i>H</i> -Tetrazol	4.8
Pyridiniumhydrochlorid	5.1
4,5-Dicyanoimidazol	5.2
Imidazoliumtriflat	6.9

Tabelle 1: Ausgewählte Aktivatoren für die Festphasensynthese mittels Phosphoramidit-Methode und deren pKs-Werte.

Die daraus resultierenden RP-Chromatogramme des Rohmaterials sind in Abbildung 22 gezeigt. Man erkennt in beiden Chromatogrammen ein sehr stark verbreitetes Signal. Dabei weist die mit DCI aktivierte DNA-Synthese (B) ein Doppelsignal auf wohingegen bei der Verwendung von Aktivator 42 das Signal zu einem kaum getrennten Peak verschmilzt. Dieser Unterschied basiert nicht auf wesentlichen strukturellen Merkmalen des Roh-DNA-Materials und wird Konzentrationsschwankungen im HPLC-Puffersystem sowie variablen Analytmengen zugeordnet.

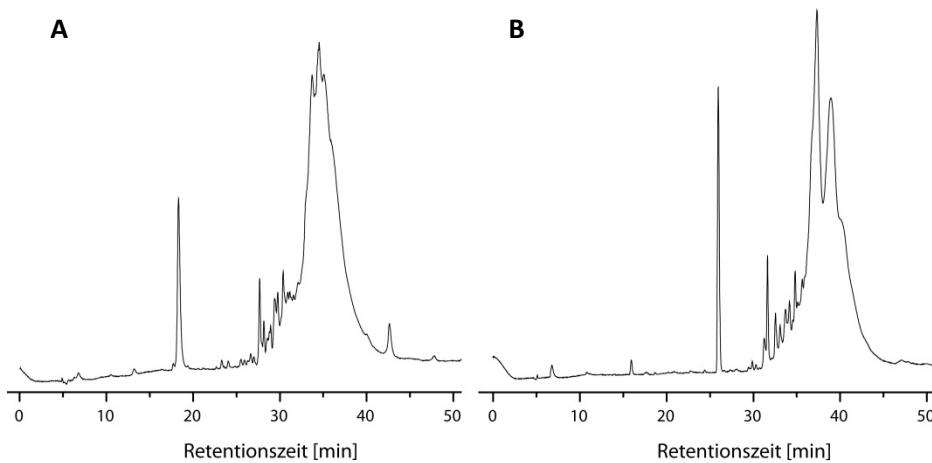


Abbildung 22: Die *Reversed Phase Chromatogramme* der Roh-DNA jeweils mit der vierfach fC-modifizierten Sequenz 5' AAG ATG ATG AXG AXG AXG AXG ATG ATG ATG 3' A) mittels Aktivator 42 hergestellter fC-DNA sowie B) mittels Dicyanoimidazol-Aktivierung hergestellter fC-DNA.

Die Chromatogramme der beiden Aktivatoren mit mittlerem pKs-Wert, BTT und ETT (nicht gezeigt), zeigen ein vergleichbares Bild. Das breite Signal weist auf eine Vielzahl ähnlicher Produktspezies hin, was für eine handhabbare Festphasensynthese nicht akzeptabel ist.

Mit dieser Betrachtung konnte auch der Aktivierungsschritt als Ursache für die Nebenreaktionen ausgeschlossen werden. Die Annahme der Hydrolyse der glykosidischen Bindung des fC durch die sauren Bedingungen während der Aktivierung konnte somit nicht bestätigt werden. Dennoch erscheint die Hypothese der N-glykosidischen Bindungsspaltung aufgrund der strukturellen Merkmale des fC-Nukleosids plausibel. Durch die elektronenziehende Formyleinheit an der Nukleobase ist die Tendenz des Nukleosids zur Bildung von abasischen Stellen im Vergleich zum Cytidin gesteigert.

Die Bildung von abasischen Stellen in der DNA wird insbesondere bei den Purinbasen Adenin und Guanin beobachtet. Diese werden im Sauren abgespalten was in einer apurinischen Stelle resultiert.⁹⁷ Die Reaktionsschritte der Festphasensynthese, welche saure Bedingungen erfordern sind somit möglicherweise verantwortlich für die Entstehung dieser Produktgemische. Insbesondere bei der Synthese von langen Oligonukleotiden spielt diese Nebenreaktion eine signifikante Rolle.⁹⁷ Durch die wiederholte, zyklische Behandlung mit Aktivator oder essigsaurer Detritylierungs-Lösung⁹⁸ werden inkrementell Nebenprodukte gebildet. Diese sind allerdings nur bei kurzen Oligomeren durch präparative Chromatographie abtrennbar.

Detrytylierung

Die im vorherigen Abschnitt beschrieben Säureempfindlichkeit des fC-Nukleosids ist natürlich auch bei der Abspaltung der 5'-DMT Gruppe relevant. Bei diesem Schritt (Abbildung 17, Schritt 4) wird das Oligonukleotid zyklisch mit einer Lösung von Dichloressigsäure in Dichlormethan behandelt. Dadurch können die, im vorherigen Abschnitt beschriebenen, Nebenreaktionen begünstigt werden. Da diese Säurebehandlung aber systematisch wichtig ist kann dieser Schritt nicht umgangen werden. Abwandlung der Standardbedingungen wurden lediglich hinsichtlich der Säurekonzentration (3%, 1%) und der Reaktionsdauer (30 sec, 15 sec) untersucht. Alternative organische Säuren wie Trichloressigsäure welche typischerweise bei die Festphasensynthese eingesetzt werden wurden nicht getestet.⁹⁹ Ein Vergleich der pK_s-Werte (DCA 1.29, TCA 0.65) gibt keinen Anhaltspunkt für eine bessere Syntheseausbeute beim Ersatz von DCA durch TCA.

Das Reaktionsverhalten des fC-Nukleosids wurde dünnenschichtchromatographisch analysiert. Bei der Behandlung des 2',5'-TBS geschützten Nukleosids mit den genannten DCA-Konzentrationen wurde keine Abspaltung der Nukleobase beobachtet.

Für eine genauere Analyse der Detritylierung wurden zudem DNA-Synthesen der folgenden Sequenzen durchgeführt.

- a) 5' **X**AC GTA CGT ACG T 3'
- b) 5' ACG TAC GTA CG**X** T 3'

Durch die Positionierung der fC-Modifikation (X) durchläuft die Modifikation in der Sequenz a) nur ein Mal den Detritylierungsschritt, wohingegen bei Sequenz b) 13 Mal detrityliert wird.

Die auf diesem Wege hergestellte DNA zeigt in der RP-HPLC (nicht gezeigt) keine signifikanten Unterschiede. Die saure Abspaltung der 5'-DMT Gruppe ist deshalb ebenfalls nicht der kritische Punkt bei der Herstellung fC-haltiger DNA.

Capping

Der Capping-Schritt (Abbildung 17, Schritt 2) verhindert, wie einleitend beschrieben, die statistisch verteilte Bildung verkürzter DNA-Stränge aufgrund unvollständiger Kupplung. Die nicht reagierten 5'-Enden werden mittels Veresterung blockiert und auf diese Weise aus dem Synthesezyklus ausgeschlossen.

Für diese Reaktion werden üblicherweise Gemische aus Ac₂O, Lutidin und Methylimidazol verwendet. Alternativ kann man weniger stabile Ester durch die Verwendung von Phenoxyacetylanhydrid erzeugen, welche sich im Abspaltungsschritt unter milder Bedingungen entfernen lassen (Ultramild Methode). Nachdem die Standardbedingungen unbefriedigende Ergebnisse lieferten wurden zwei alternative Reagentien getestet. Dabei wurde darauf abgezielt, die Schutzgruppen unter milden Bedingungen entfernen zu können. Die Phenoxyacetyl-Ester wurden zu diesem Zweck einerseits mit Methylimidazol und andererseits durch die Verwendung von DMAP eingeführt. Da auch diese Variation kein besseres Ergebnis lieferte wurde der Synthesezyklus ohne den Capping-Schritt untersucht.

Tatsächlich konnten auf diese Weise, wie in Abbildung 23 dargestellt wesentliche Verbesserungen erzielt werden. Die Synthese eines modifizierten 13mers gelang mit bisher beispielloser Qualität.

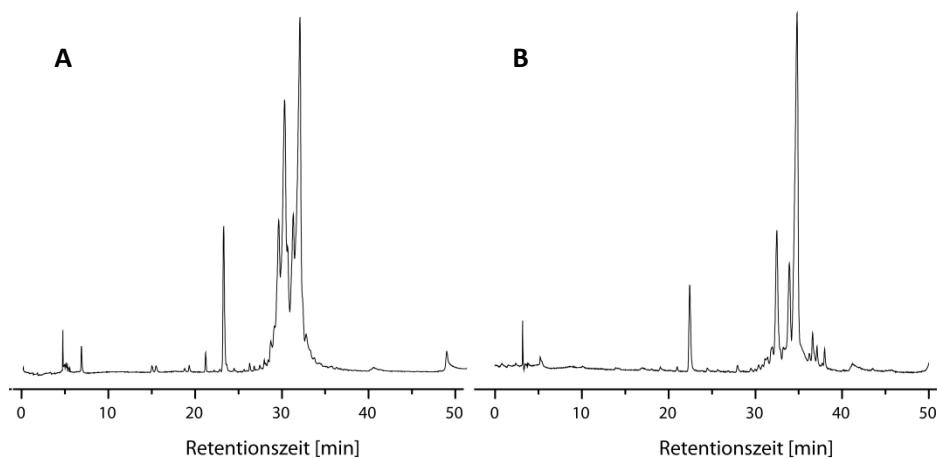


Abbildung 23: RP-Chromatogramme mit (A) und ohne (B) Capping 5' GTA ATG XGC TAG G 3'

Mit dieser Methode wurden weitere fC-haltige Stränge hergestellt, die unter anderem in den Experimenten im Abschnitt 5.2 verwendet werden.

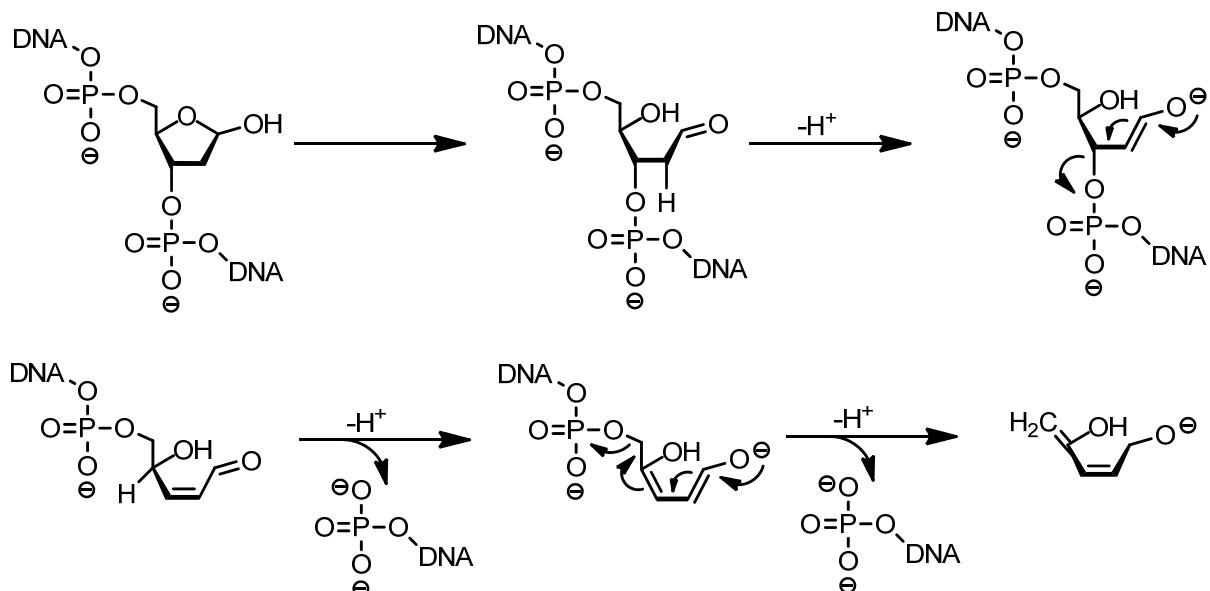
Für die Synthese von langen Oligonukleotiden stößt diese Methode allerdings an ihre Grenze. Außerdem ist ihr routinemäßiger Einsatz bei kommerziellen Anbietern von DNA-Synthesen unbeliebt. In diesen Fällen ist der Capping-Schritt für die Reinheit und Sequenztreue erforderlich, um effiziente Syntheseprozesse und postsynthetische Prozessierung zu gewährleisten.

5.1.7. Synthese eines alternativen Bausteins

Mit dem Ziel der Verbesserung der kommerziell erhältlichen Bausteine sollte eine erhöhte Kompatibilität mit Standardprotokollen sowie die optimale Effizienz hinsichtlich Synthese und postsynthetischer Prozessierung ermöglicht werden. Allerdings konnte bei der beschriebenen Variation der Synthesebedingungen kein zuverlässiges Protokoll etabliert werden, das auch den Anforderungen kommerzieller Synthesefirmen genügen kann.

Aus den oben beschriebenen Untersuchungen der einzelnen Syntheseschritte konnte eine Tendenz zu Nebenreaktionen abgeleitet werden. Diese werden durch saure Bedingungen begünstigt. Unter Spaltung der glykosidischen Bindung kann eine abasische Stelle gebildet werden, welche während der basischen Entschützung oder bei Anwesenheit basischer Amine zu Strangbrüchen führt. Der zugrunde liegende Mechanismus wird in Schema 4 dargestellt.

Die offenkettige Aldehydform der Desoxyribose **II** wird hier zunächst in einer β -Eliminierung am C2 deprotoniert, die darauffolgenden Elektronenverschiebungen **III** spalten den 3'-Phosphodiester. Der nun am 3'-Ende verbleibende Zucker liegt nun als ungesättigter Aldehyd **IV** vor. Dessen Abspaltung wird wieder durch eine Deprotonierung **V**, dieses Mal am C4, initiiert.¹⁰⁰ Die δ -Eliminierung **VI** kann nur als Folgereaktion der β -Eliminierung ablaufen. Damit ist die Reihenfolge der Spaltungen festgelegt. Wie in Schema 4 gezeigt, wird im ersten Reaktionsschritt zunächst der 3'-Phosphodiester gespalten **I – IV** und erst in der Folge der 5'-Phosphodiester.



Schema 4: Spaltung einer abasischen Stellen in der DNA durch beispielsweise basische Amine. Die entstehenden Fragmente besitzen charakteristischerweise Phosphatgruppen am 5' beziehungsweise 3'-Ende.

Diese Nebenreaktion bildet im Falle des oben erwähnten 13mers (5' GTA ATG XGC TAG G 3') zwei wesentlich kürzere Strangfragmente (5' GTA ATG 3' und 5' GCT AGG 3'). Allerdings wurden diese weder in den RP-Chromatogrammen, noch in den MALDI-Massenspektren detektiert. Das erhaltene Produktgemisch besitzt eine ähnliche Retentionszeit wie die Zielverbindung und muss daher hinsichtlich der Stranglänge ähnlich sein. Ebenso verhält es sich mit den detektierten Massen, welche keinen Hinweis auf einen Strangbruch liefern.

Darüber hinaus stehen die in Abbildung 24 dargestellten chemischen Reaktivitäten im Fokus der Entwicklung. Der nukleophile Angriff am Akzeptorsystem wurde bereits zusammen mit der Diskussion der Abspaltungsbedingungen behandelt und wird nun nicht weiter beleuchtet. Ebenso verhält es sich mit den Nebenreaktionen an der Formyl-Einheit die vorrangig durch Amine hervorgerufen wird.

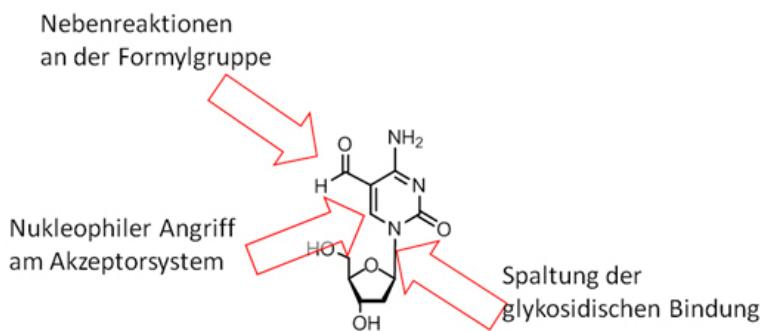


Abbildung 24: Potentielle Reaktionswege des fC-Monomers. Die genannten Reaktionen können entweder auf Monomer-Ebene ablaufen oder an fC-haltiger DNA.

Allerdings konnte, bei isolierter Betrachtung und Simulation der Reaktionsbedingungen am Monomer, keine dieser Reaktionsmöglichkeiten als ausschlaggebend für die Ausbeuteneinbußen identifiziert werden.

Die einzigartige Reaktivität des fC-Bausteins wird deshalb vermutlich durch kooperative Effekte der verschiedenen Reaktivitäten hervorgerufen.

Aus diesem Grund kann die Optimierung der Synthese nur durch eine organisch-synthetische Optimierung des Phosphoramidit-Bausteins erzielt werden.

Eine aussichtsreiche Strategie hierfür muss die oben beschriebenen Reaktionswege unterdrücken oder ganz verhindern, sowie die einleitend dargelegten Qualitäts-Kriterien für Oligonukleotidsynthese erfüllen. Darüber hinaus muss sie für eine erfolgreiche Anwendung mit den gängigen Synthese-Prozessen kompatibel sein und nur wenig oder keinen zusätzlichen Aufwand bei der Herstellung der DNA-Stränge erfordern.

5.1.8. Verbesserter fC-Baustein für die Festphasensynthese

Das Design des verbesserten fC-Monomers erfolgte auf der Grundlage der Standard-Bedingungen während der DNA-Synthese. Die Reaktivität des fC-Bausteins wird vermutlich vorrangig durch die elektronenziehende Formylgruppe und den daraus resultierenden elektronenarmen Heterozyklus geprägt. Eine Maskierung der Formylgruppe sollte daher die Mesomerie des Akzeptorsystems stören und so die Reaktivität reduzieren. Als weiteres Kriterium wurde die Kompatibilität mit der etablierten Phosphoramidit-Syntheseroute⁸⁵ analog Schema 2d) und e) festgelegt.

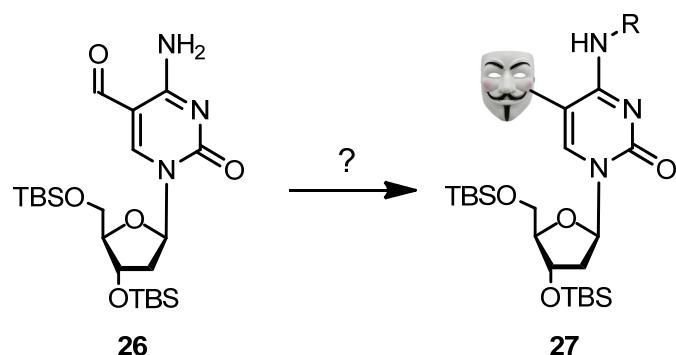
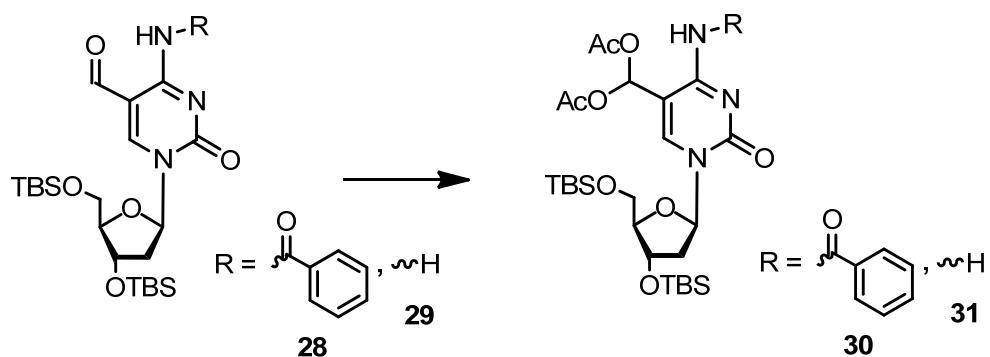


Abbildung 25: Geplante Schutzgruppenstrategie für die Herstellung des verbesserten fC-Monomers. Dabei soll die in 5-Position befindliche Formylgruppe durch eine Schutzgruppe maskiert werden, sodass sie keinen störenden Einfluss auf die DNA-Synthese nimmt und nach der Synthese einfach regeneriert werden kann.

Um diese Eigenschaften in einem Molekùl zu vereinigen, wurde die Maskierung des Aldehyds als Acylal angestrebt, diese Reaktion ist in Schema 5 dargestellt.



Schema 5: Acylal geschütztes fC-Nukleosid. Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

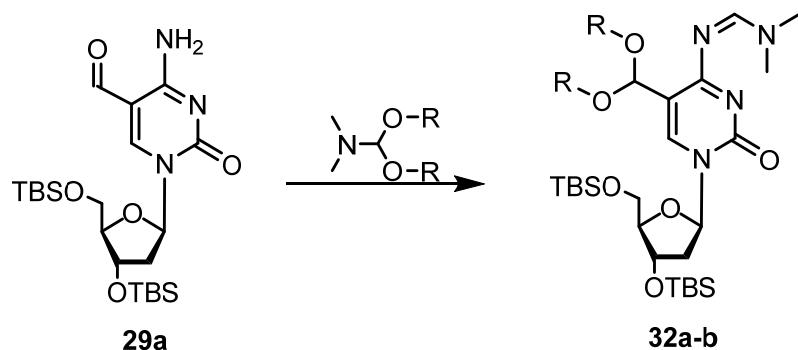
Diese Reaktion wird durch die Einwirkung von Essigsäureanhydrid und geeigneter Katalysatoren wie zum Beispiel TMSCl , NaI , Iod, Schwefelsäure, NBS , ZnCl_2 oder FeCl_3 ermöglicht.¹⁰¹ Die Reaktionsbedingungen für diese Umsetzungen werden in Tabelle 2 zusammengefasst.

Unter den gewählten Bedingungen konnte das Acylal jedoch nicht erhalten werden. Möglicherweise verhindert das konjugierte Elektronensystem den nukleophilen Angriff am Carbonyl-Kohlenstoff indem es eine intermediär auftretende positive Ladung über den Heterozyklus kompensiert.

Als weitere Alternative wurde die Schützung als Acetal evaluiert. Acetale werden im Sauren gespalten, ermöglichen aber durch ihre vielfältigen Substitutionsmöglichkeiten eine Feinjustierung der chemischen Reaktivität. Diesbezüglich wurden zyklische und azyklische Acetale untersucht.

Um eine gleichzeitige Einführung geeigneter Schutzgruppen am exozyklischen Amin als auch an der Formylgruppe zu ermöglichen wurde die Reaktion des Nukleosids mit Dimethylformamidinacetalen untersucht. Die Reaktion ist in Schema 6 illustriert.

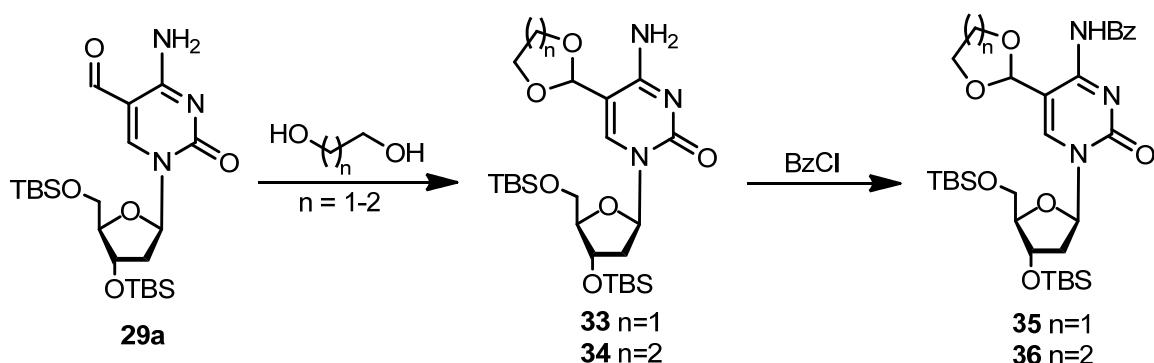
Diese Eintopf-Umsetzung führt in einem Reaktionsschritt die in der Oligonukleotidsynthese häufig eingesetzte DMF-Schutzgruppe ein und ermöglicht zudem eine Maskierung des Aldehyds. Reaktionsbedingungen sind in der Tabelle 2 aufgeführt. Das entstehende Produkt weist einen weniger elektronenarmen Heterozyklus auf und sollte so die glykosidische Bindung gegenüber sauren Bedingungen oder Nukleophilen stabilisieren.



Schema 6: Die zweifache Schutzgruppenstrategie für das fC-Monomer.

Die unterschiedlichen Reaktionsführungen (Tabelle 2) und Schutzgruppen lieferten in allen Fällen nur geringe bis mäßige Ausbeuten und zeigten zum Teil eine Zersetzung des Startmaterials. Aus diesem Grund musste eine alternative Strategie gewählt werden.

Diese basiert auf einer schrittweisen Einführung der beiden Schutzgruppen am Heterozyklus. Zunächst sollte die Formylgruppe durch Einführung eines zyklischen Acetals maskiert werden um in einem zweiten Schritt die Aminofunktion mit einer Benzoylschutzgruppe zu blockieren (Schema 7).



Schema 7: Alternative Syntheseroute über ein zyklisches Acetal mit anschließender Einführung eines Benzylamids

Letztlich konnte die in Tabelle 2 gelisteten Reaktionsführungen im Falle von Ethandiol als Nukleophil nur sehr geringe Mengen des Produkts liefern. Bessere Ergebnisse lieferte Propandiol, welches durch

Acetalbildung einen Sechsring erzeugt. Dieser Dialkohol konnte bereits als Schutzgruppe in der Festphasensynthese eingesetzt werden.¹⁰² Allerdings wurde die Stabilität der Schutzgruppe in genannter Arbeit nicht belegt, da auch freie Aldehyde in der Regel mit der Festphasensynthese kompatibel sind. Diese Kompatibilität wirkt sich bei einer teilweisen Spaltung des Acetals während der Detritylierung günstig aus.^{103,104}

Die Optimierung der Reaktionsbedingungen wurde gemeinsam mit Arne Schröder im Arbeitskreis Prof. Carell durchgeführt. Dabei lieferte ausschließlich die Verwendung von TiCl₄ als Lewissäure gute Ergebnisse.¹⁰⁵

	Ausgangsverbindung	Zielverbindung	Reagentien und Bedingungen	Ergebnis
1			Ac ₂ O, H ₂ SO ₄ (katalytisch), 3 h, RT	Keine Produktbildung
2			Ac ₂ O, FeCl ₃ (katalytisch), 1 h, 0 °C	Keine Produktbildung
3			Ac ₂ O, ZnCl ₂ (katalytisch), 1 h, 0 °C	Keine Produktbildung
4			Ac ₂ O, I ₂ (katalytisch), 3 h, RT	Keine Produktbildung
5			Propandiol, Triethylorthoformiat, Tetrabutylammonium-bromid, 16 h, RT	Keine Produktbildung
6			Propandiol, Amberlite IR120, 72 h, RT, Benzol	Produktbildung (Spuren)
7			Propandiol, CeCl ₃ (katalytisch), 16h, RT	Produktbildung (Spuren)
8			Propandiol, p-Toluolsulfonsäure, 14 h, Reflux, Benzol	Produktbildung (Spuren)
9			Ethanol, p-Toluolsulfonsäure, 14 h, Reflux, Benzol	Produktbildung (Spuren)

	Ausgangsverbindung	Zielverbindung	Reagentien und Bedingungen	Ergebnis
10			N,N-Dimethylformamid-dimethylacetal, Molsieb 3 Å, 16 h, 60 °C, Methanol	Produktbildung (Spuren)
11			N,N-Dimethylformamid-diethylacetal, Molsieb 4 Å, MeOH, 36 h, RT	unvollständiger Umsatz
12			2-N,N-Dimethylamino-1,3-dioxan, Aceton, 36 h	Produktbildung (Spuren)
13			2-N,N-Dimethylamino-1,3-dioxan, p-Toluolsulfonsäure, Propandiol, Toluol, 70 °C, 16 h	Produkt wurde im Gemisch mit Edukt erhalten
14			2-N,N-Dimethylamino-1,3-dioxan, p-Toluolsulfonsäure, Propandiol, Triethylorthoformiat, 60 °C, 72 h	Produkt wurde im Gemisch mit Edukt erhalten
15			CeCl ₃ , Triethylorthoformiat, EtOH, 48 h	unvollständiger Umsatz, Produkt isoliert
16			CeCl ₃ , Triethylorthoformiat, Propandiol, 48 h	unvollständiger Umsatz, Produkt isoliert

Tabelle 2: Zusammenfassung der Reaktionsbedingungen für die Umsetzung des fC-Nukleosids zum Acylal sowie Acetal.

Die darauffolgende Etablierung der Aminoschutzgruppe wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr angestrebt. Die Arbeit wurde von Arne Schröder (Arbeitskreis Prof. Carell) fortgesetzt. Dabei fand er heraus, dass die Benzoyl-Schutzgruppe am Amin eine Methoxysubstitution in *para*-Stellung erfordert um die Stabilität der Schutzgruppe zu erhöhen. Die typischerweise eingesetzte Benzoylschutzgruppe erwies sich in diesem System als zu instabil.

Der Baustein (Abbildung 26) wurde im Arbeitskreis Carell vollständig geschützt hergestellt und in DNA-Stränge eingebaut.¹⁰⁵

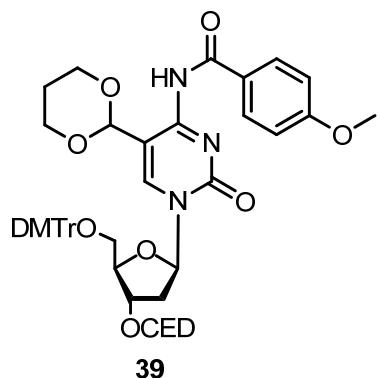


Abbildung 26: Die neueste Generation des fC-Monomers für die automatisierte Festphasensynthese liefert bisher unerreichte Reinheit des Rohprodukts und ermöglicht daraus resultierend ausgezeichnete Ausbeuten

Mit diesem Baustein konnte durch Arne Schröder (Arbeitskreis Prof. Carell) erstmals DNA hergestellt werden, die sequenztreu und hochspezifisch alle epigenetisch relevanten Derivate des Desoxycytidins enthält. Darüber hinaus liefert der Baustein hervorragende Ausbeuten bei der DNA-Synthese und ermöglicht hochreine RP-Chromatogramme nach Abspaltung der Schutzgruppen. Die oben beschriebenen, idealen Eigenschaften eines Monomers konnten auf diese Weise in einem Phosphoramidit-Baustein realisiert werden. Der Baustein ist aufgrund seines robusten Designs und der beispiellosen Qualität der synthetischen DNA auch bei kommerziellen Anbietern, wie *Glen Research* (Katalognummer 10-1564) und *Link* (Katalognummer 2548) von hohem Interesse.

5.2 Identifikation biologischer Interaktoren von fC-Derivaten mittels DNA-Sonden

Die im Zuge dieser Arbeit hergestellte DNA-Stränge wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Vermeulen (*Department of Molecular Cancer Research, Proteomics and Chromatin Biology, UMC Utrecht, Niederlande*) in proteomischen Studien untersucht.¹⁰⁶ Die beiden Sequenzen der hergestellten DNA beinhalten mehrere Cytosin-phosphatidyl-Guanin-Motive (5'-CpG-3'), welche auch in bestimmten Bereichen genomischer DNA methyliert vorliegen können. In diesen Bereichen tritt eine höhere Dichte von Cytosin-Guanosin-Nukleosidpaaren auf. Es wird vermutet, dass diese Bereiche für die Regulation der Transkription verantwortlich sind indem sie die Rekrutierung von Enzymen hervorrufen, welche die Transkriptionsaktivität unterdrücken.¹⁰⁷

Die Sequenzen werden jeweils mit dC und den entsprechenden, höher oxidierten Derivaten (X) hergestellt. Für jede Modifikation wurden zwei Stränge hergestellt, um die Affinität der Interaktoren, in den weiter unten erläuterten *Pulldown*-Experimenten, zu erhöhen.

Die Sequenz des FW-Strangs lautet:

5' AAG ATG ATG AXG AXG AXG AXG ATG ATG 3'

Die Gegenstrang-Sequenz (RV) besitzt ebenfalls mehrere CpG-Dinukleotide.

5' TTC ATC ATX GTX GTX GTX GTC ATC ATC 3'

Die Bezeichnungen FW und RV dienen in diesem Kontext nur der Unterscheidung der beiden Einzelstränge (Strang und Gegenstrang). Für das unten beschriebene *label swap*-Experiment werden die Bezeichnungen "Forward" und "Reverse" verwendet, allerdings besitzt diese begriffliche Überschneidung bei den Bezeichnungen keine systematische Bedeutung.

Die RP-Chromatogramme der HPLC-gereinigten Stränge sind in Abbildung 27 dargestellt.

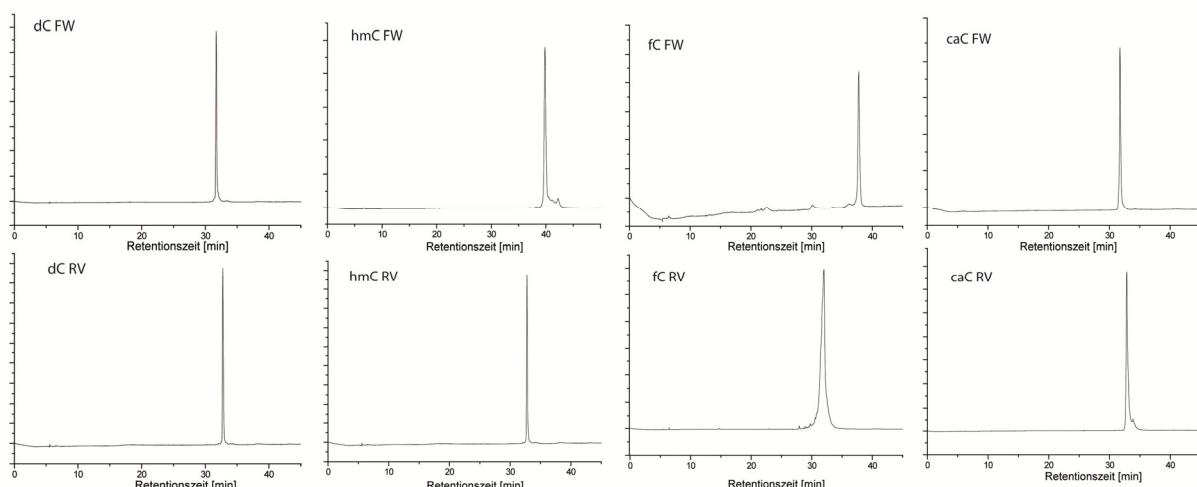


Abbildung 27: Reversed Phase Chromatogramme der gereinigten DNA-Stränge. Jeweils ein Strang (FW) und der zugehörige Gegenstrang (RV) wurden mit den entsprechenden Modifikationen hergestellt.

Der entstehende Doppelstrang weist am 5'-Ende des Gegenstrangs noch ein TT-Überhang auf, welcher als Angriffspunkt für eine DNA-Polymerase (Klenow Exo-) geeignet ist (siehe unten).

Ziel der Untersuchung ist die Identifizierung von Proteinen, welche an modifizierte DNA-Stränge binden. Es wurden hierfür die Cytidin Modifikationen 5-Methylcytidin, 5-Hydroxymethylcytidin, 5-Formylcytidin und 5-Carboxylcytidin in Einzelstrang-DNA eingebaut. Diese wurde mit dem entsprechenden modifizierten Gegenstrang hybridisiert und mit Zellextrakten verschiedener Zelllinien in *Pulldown-Assays* inkubiert. Die verwendeten Zellkerneextrakte wurden aus Stammzellen (mESC) und neuronalen Vorläuferzellen (NPC) der Maus gewonnen. Die NPCs wurden dabei durch Differenzierung der mESCs gewonnen und ermöglichen so, die Dynamik der Modifikationslevel in verschiedenen zellulären Entwicklungsphasen zu untersuchen.

Für das Experiment wird die dsDNA markiert um die Anreicherung nach der Inkubation zu gewährleisten. Dies wurde auf molekularbiologischem Wege erzielt, indem mittels Klenow Exo-Polymerase ein Biotin-Label am 5'-TT-Überhang angebracht wurde, welches an Streptavidin-Beads bindet.

Die auf diese Weise vorbereitete DNA-Sonde wurde den Zellextrakten inkubiert und schließlich zusammen mit den interagierenden Proteinen isoliert. Die erhaltenen Treffer wurden mittels Gelektrophorese angereichert, tryptisch verdaut und anschließend mit massenspektrometrischen Methoden identifiziert und quantifiziert. Dabei konnten unspezifisch bindende Proteine durch die Versuchsanordnung identifiziert und von spezifischen Interaktoren unterschieden werden. Die hierfür eingesetzte Methode wird in der Folge beschrieben.

5.2.1. Quantitative Massenspektrometrie

Für die quantitative Massenspektrometrie in der Proteomanalyse stehen grundsätzlich zwei Methoden zur Verfügung.

Die relative Quantifizierung anhand des MS-Signals, genauer gesagt des "extracted ion current" der einzelnen Peptidfragmente bietet die Möglichkeit der Korrelation gleicher Peptidfragmente, sie wird auch als "*label free quantitation*" bezeichnet. Dabei werden die einzelnen Spektren der jeweiligen Peptidfragmente anhand ihres MS-Signal quantifiziert und können dann mit den gleichen Peptidfragmenten aus einer identisch extrahierten, anderen Probe verglichen werden. Da die Massenspektrometrie keine inhärent quantitative Methode ist, ist der Vergleich von unterschiedlichen Peptiden aufgrund deren variabler Ionisierbarkeit nicht möglich. Darüber hinaus erschweren die unterschiedliche Anreicherung der Peptide während der Probenvorbereitung oder störende Substanzen (Detergentien, Hintergrundproteine) den quantitativen Vergleich.

Die in dieser Studie eingesetzte SILAC-Methode¹⁰⁸ ermöglicht im Gegensatz dazu die Erhebung absoluter Daten. Sie beruht auf der Markierung der Peptidfragmente mit schweren Isotopen. Diese wird beispielsweise durch die Inkubation der Zellen in Medium mit schweratom-haltigem (¹³C, ¹⁵N) Aminosäuren erzielt. Dabei kommen kommerziell erhältliche Aminosäuren ¹³C₆¹⁵N₂-L-Lysin und ³C₆¹⁵N₄-L-Arginin zum Einsatz. Der Einbau der schweren Aminosäuren in die endogenen Proteine führt schließlich zu isotopologen Peptidfragmenten. Parallel werden Zellen in Medium mit natürlich verteiltem Isotopen inkubiert. Die gemeinsame massenspektrometrische Untersuchung der Fragmente mit und ohne Schweratomlabel ergibt zwei Massensignale ("schwer" und "leicht"), welche abhängig von der Anzahl der schweren Atome in der Isotopen-Probe differieren. Das Verhältnis der Massensignale der beiden chemisch identischen, isotopologen Peptide repräsentiert

deren Verhältnis mit höchster Genauigkeit. Dabei macht man sich zunutze, dass beide Varianten identische Ionisierbarkeit besitzen und deshalb, abgesehen von der Massendifferenz, im MS identisches Ansprechverhalten aufweisen. Diese Methode hat sich aufgrund ihrer überlegenen Genauigkeit in den letzten Jahren zum Gold-Standard der quantitativen Proteomforschung entwickelt.¹⁰⁹

Die Massenunterschiede zwischen schwerem und leichtem Peptid sollten für maximale Genauigkeit mindestens 4 Da betragen. Diese Differenz eliminiert quantitative Fehler, welche durch die Überlappung der Massensignale aufgrund der natürlichen Isotopenhäufigkeit entsteht. Auf dieses Thema wird in einem späteren Kapitel der Arbeit noch genauer eingegangen.

Eine absolute Quantifizierung kann auf diesem Wege durch Zugabe bekannter Mengen von Isotopenstandards erzielt werden und wird in ähnlicher Form im Arbeitskreis Carell angewendet um beispielsweise nichtkanonische Nukleoside in Geweben zu quantifizieren.¹¹⁰⁻

5.2.2. Versuchsanordnung zur Identifizierung der spezifischen Interaktoren

Bei der einleitend beschriebenen Anreicherung von Proteinen mit DNA-Sonden wird eine enorme Zahl an Hintergrundproteinen oder unspezifischen Interaktoren detektiert. Diese sind für eine Aussage über spezifische Wechselwirkungen mit der Sonde unbrauchbar. Aus diesem Grund wird ein Versuchsaufbau mit einer entsprechenden Auswertung verwendet der eine Unterscheidung ermöglicht.¹¹⁶

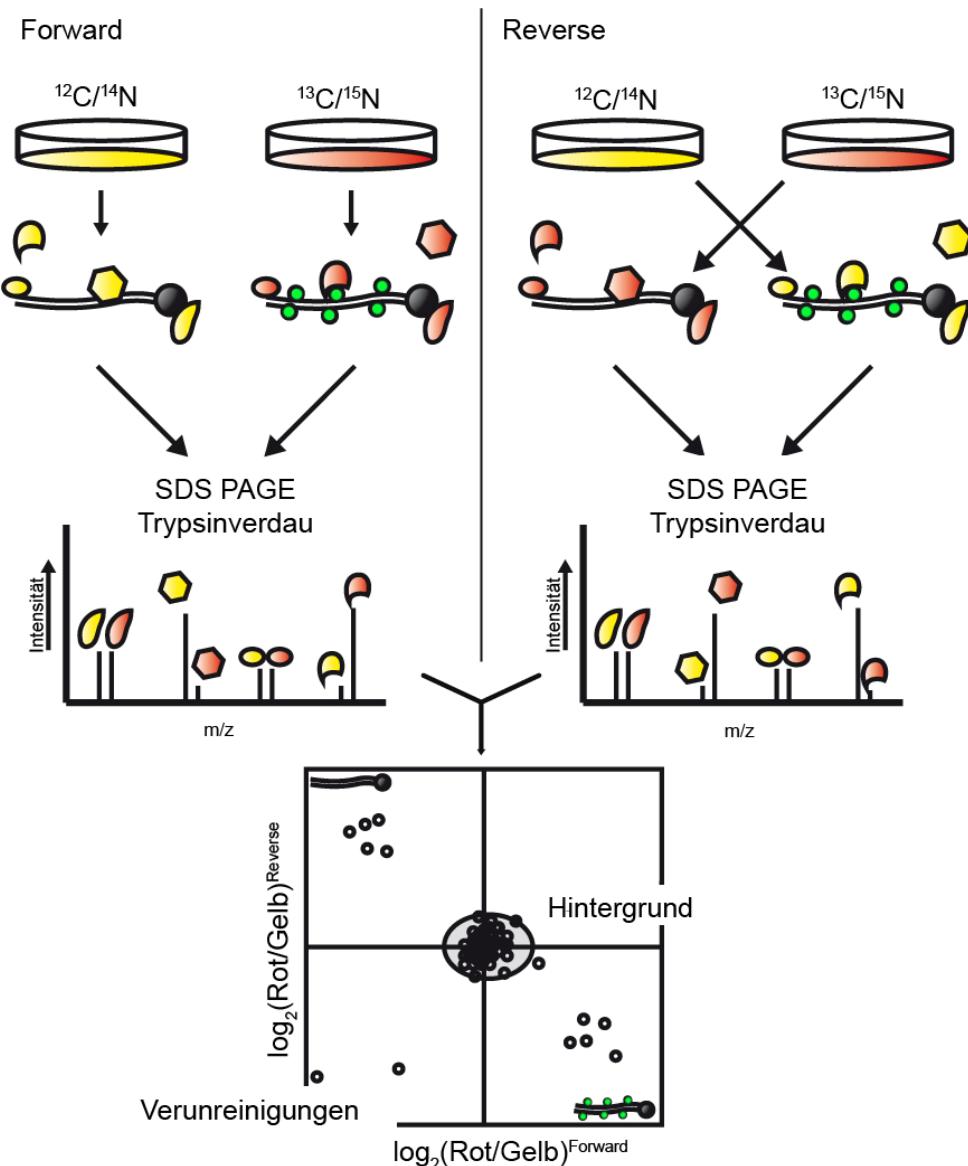


Abbildung 28: Unterscheidung zwischen spezifischen und unspezifischen Interaktoren unter Verwendung der Quantitativen Filter-Methode. Diese Methode wird auch als *label swap* Experiment bezeichnet.

Durch diese doppelte Versuchsanordnung (*Forward* und *Reverse*) kann die eindeutige Identifizierung von wechselwirkenden Proteinen trotz eines hohen Hintergrunds an unspezifischen Interaktoren erreicht werden. Diese Herangehensweise wird auch als *label swap*-Experiment bezeichnet. Dazu werden, wie in Abbildung 28 beschrieben, die DNA-Sonden (Grün) mit Zell-Lysaten behandelt welche

einerseits in Medium mit natürlicher Isotopenverteilung (^{12}C und ^{14}N , Gelb) und andererseits mit Isotopenreichem Medium (^{13}C und ^{15}N , Rot) kultiviert wurden.

Im *Forward*-Experiment werden die unmodifizierte Referenz-DNA und die cytidin-modifizierte Sonden-DNA mit den verschiedenen Lysaten (leicht und schwer) behandelt und rekrutieren dabei zweierlei Sätze von wechselwirkenden Proteinen. Die anschließende Anreicherung der Sonden und der tryptische Verdau führen dann zu zwei Sätzen von Peptidfragmenten, wobei die spezifischen Interaktoren für die Cytidinmodifikationen die schwereren Massen besitzen.

Im *Reverse*-Experiment wird die Inkubation der Sonden mit "schwerem" und "leichtem" Zellysat umgekehrt. Der Anreicherungsschritt und der tryptische Verdau werden unverändert durchgeführt. Abschließend werden die Verhältnisse der Intensitäten von schweren zu leichten Peptiden gebildet und wie in der Abbildung dargestellt logarithmisch aufgetragen.

Dabei liegen die spezifischen Interaktoren im unteren rechten Quadranten, da ihr Verhältnis von "schwer zu leicht" im *Forward*-Experiment groß und im *Reverse*-Experiment klein ist. Für spezifische Interaktoren der unmodifizierten DNA Sonde verhält es sich umgekehrt und diese Treffer liegen im oberen linken Quadrant. Statistisch verteilte und durch unspezifische Bindung isolierte Proteine besitzen kein charakteristisches "schwer-zu-leicht"-Verhältnis und befinden sich in der Diagrammitte.

Auf diese Weise wird höchste Genauigkeit bei der Erkennung von spezifischen Bindungen an bestimmte Strukturmotive erzielt. Diese Methode ist besonders geeignet, wenn Proteine, welche nur in geringen Mengen vorkommen identifiziert werden sollen oder diese Proteine von einem hohen Hintergrund überlagert werden. Insbesondere bei der hier durchgeföhrten Suche nach Interaktoren für seltene Modifikationen, ist dies von Vorteil.

5.2.3. Diskussion der identifizierten Proteine und Interaktoren

Aufgrund der hohen Anzahl der spezifischen Proteine, die in den Untersuchungen von Cornelia Spruijt (Prof. Vermeulen, UMC Utrecht) mit mC, hmC, fC und caC gefunden wurden, können in der Folge nur eine Auswahl diskutiert werden.

Für die mC-Modifikation wurden 19 spezifische Interaktoren in mESC-Extrakten identifiziert. Darunter befinden sich drei Proteine aus der Klf-Familie: Klf 2, -4 und -5 wurden als mC-spezifische Interaktoren entdeckt.

Klf4 ist ein Gen welches neben Oct4, Sox2 und cMyc zu den Yamanaka-Transkriptionsfaktoren gezählt wird und für deren Entdeckung im Jahr 2012 der Nobelpreis in Medizin verliehen wurde.¹¹⁷⁻¹¹⁸ Die Forscher konnten durch die Einführung der vier oben genannten Gene in somatische Zellen deren Reprogrammierung in pluripotente Zellen erzielen.

Die Bedeutung dieser Entdeckung ist im Hinblick auf medizinische Anwendungen bahnbrechend. Mit dieser Methode könnten aus beinahe jedem Zelltyp eines Patienten pluripotente Zellen erzeugt werden, welche sich dann in verschiedene differenzierte Zelltypen weiterentwickeln können. Dies ist ein hoffnungsvolles Forschungsgebiet für die regenerative Medizin, da sich auf diese Weise körpereigene Stammzellen generieren lassen. Diese können dann durch Transplantation in erkrankte, funktionsgestörte Gewebe oder Organe eine Wiederherstellung der Funktion durch körpereigene Regenerationsprozesse ermöglichen.

Interessanterweise wurde eine verringerte DNA-Methylierung in Klf-Bindungsbereichen embryonalen Stammzellen im Vergleich mit neuronalen Vorläuferzellen entdeckt.¹¹⁹ Das bedeutet im

Umkehrschluss, dass die Methylierung bestimmter DNA-Motive im Verlauf der Zelldifferenzierung beim Übergang von Stamm- zu Vorläuferzelle steigt. Dies impliziert eine wichtige Bedeutung der Cytidin-Methylierung bei der zellulären Reprogrammierung durch Klf. Während der Reprogrammierung bindet Klf vermutlich an diese hypermethylierten Genabschnitte und verursacht so ein stammzell-typisches Expressionsverhalten. Dies kann dann möglicherweise zur Umkehr der Zelldifferenzierung beitragen.

Für hmC konnte in den Experimenten eine teilweise Überlappung der Interaktoren mit denen für mC gezeigt werden. Insgesamt ist die Zahl der hmC-Binder aber deutlich geringer als die der mC- oder Cytidin-Interaktoren. Neben den spezifischen Proteinen wurden zwei DNA-Glycosylasen (Mpg und Neil3) und eine Helicase (Recql) als hmC spezifische Binder identifiziert. Vermutlich sind die Glycosylasen für die aktive Demethylierung von hmC-DNA über *Base Excision* Reparatur (BER) verantwortlich.^{120,121} Auf diesem Wege können methylierte Basen durch schrittweises Ausschneiden der Nukleobase und Ersatz durch unmethyliertes Cytosin ausgetauscht werden.

Im Vergleich der Datensätze für Stammzellen und daraus entstehenden neuronalen Vorläuferzellen wurden geringere Affinitäten der CpG-Interaktoren Rfxap und Rfxank¹²² für hmC im Vergleich zu dC festgestellt. Weiterführende Untersuchungen mit rekombinantem Protein belegen diesen Trend. Sie zeigen, dass die Oxidation von mC zu hmC eine Umkehr der Protein-Wechselwirkung zur Folge hat. mESC-Proteine, welche stark an mC binden verlieren in weiter differenzierten Zellen ihre Affinität für das Oxidationsprodukt. Dies untermauert die These, dass durch die Oxidation von mC zu hmC eine Demethylierungskaskade in Gang gesetzt werden könnte.

Insgesamt betrachtet wurde eine dynamische Veränderung der Interaktoren für mC und hmC im Verlauf der Differenzierung von Stamm-zu Vorläuferzellen entdeckt. Dennoch lassen die identifizierten Proteine keine endgültigen Schlüsse auf die Funktion dieser Modifikationen zu, da einige der gefundenen Interaktoren ebenfalls deren Rolle als Transkriptionsregulatoren nahelegen.

Der Differenzierungsprozesse einer Zelle zielt im Allgemeinen auf die Entwicklung einer funktionalen, somatischen (adulten) Zelle mit definierten Eigenschaften ab. Im Arbeitskreis Carell wurde das Expressionslevel von hmC in verschiedenen adulten Geweben verglichen.¹¹² Dabei wurden die höchsten hmC-Level im Gehirn festgestellt. Konsequenterweise wurden Zellextrakte aus diesem Gewebe ebenfalls hinsichtlich der Proteinaffinität für hmC untersucht. Dabei kehrt sich der oben angedeutete Trend um, welcher aus mESCs und NPCs abgeleitet werden kann. In Hirngewebe finden sich mehr Interaktoren für hmC als für mC, was auf eine besondere Rolle von hmC im Hirn hinweist.

Eine graphische Übersicht einiger identifizierter Proteine in den verschiedenen Geweben für mC und hmC ist in Abbildung 29 dargestellt.

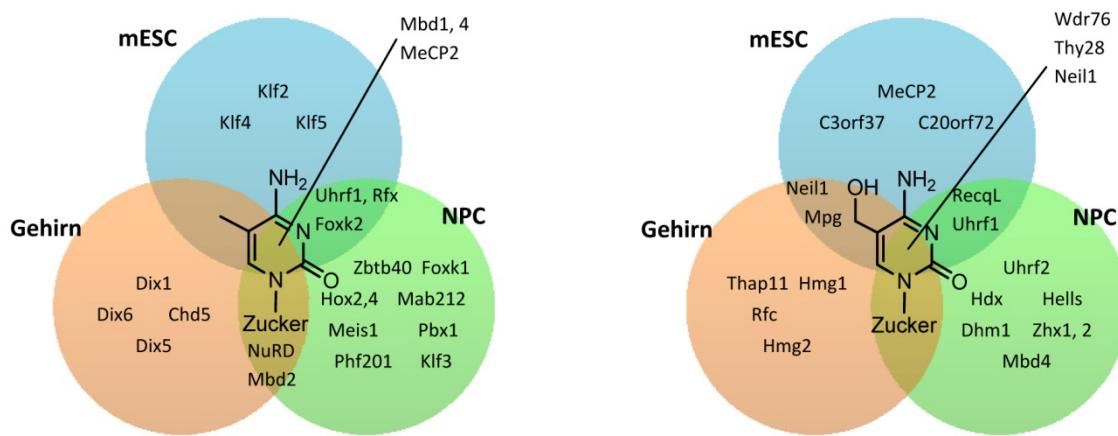


Abbildung 29: Venn-Diagramme veranschaulichen die Protein-DNA-Interaktionen mit mC (links) und hmC (rechts) in mESC, NPC und Hirnzellen.

Im Gegensatz zu hmC rekrutieren die beiden höchst-oxidierten Cytidin-Modifikationen eine weitaus größere Zahl an Proteinen in mESC, darunter einige Glycosylasen und Transkriptionsfaktoren. Dabei gibt es für fC und caC kaum Überschneidungen bei den interagierenden Proteinen, wobei Tdg hierfür eine Ausnahme darstellt. Dieses Protein bindet nicht an hmC¹²³ und kann ebenfalls über BER einen Ersatz der modifizierten Base ermöglichen. Dabei wäre eine DNA-Demethylierung über eine Tet-vermittelte Oxidation von mC zu fC oder caC mit deren anschließendem Austausch durch Cytosin denkbar. Auf diesem Reaktionsweg wäre Existenz einer Decarboxylase für die DNA-Demethylierung nicht erforderlich.

Ein spezifischer Interaktor für caC ist Dnmt1, eine Methyltransferase für hemi-methylierte DNA welche für die *de novo* Methylierung von Cytidin und folglich für die Stilllegung von Gensequenzen verantwortlich ist.

Da für fC und caC keine Datensätze aus variablen Geweben zur Verfügung stehen werden für diese Basen keine Venn-Diagramme gezeigt.

Um die Rekrutierung von Proteinen auszuschließen, welche an geschädigte oder abasische DNA-Abschnitte binden wurden die eingesetzten DNA-Sonden mittels Massenspektrometrie validiert. Hierfür wurde die Homogenität des Materials vor und nach den Pulldown-Experimenten erfasst. Die MALDI-Spektren in Abbildung 30 zeigen die erwarteten Massen der modifizierten DNA-Stränge. Diese Ergebnisse wurden durch eine detaillierte LC-MS/MS-Untersuchung des nachträglich restriktionsverdauten DNA-Materials bestätigt, wobei keine signifikant niedrigeren der modifizierten Basen gefunden wurden.

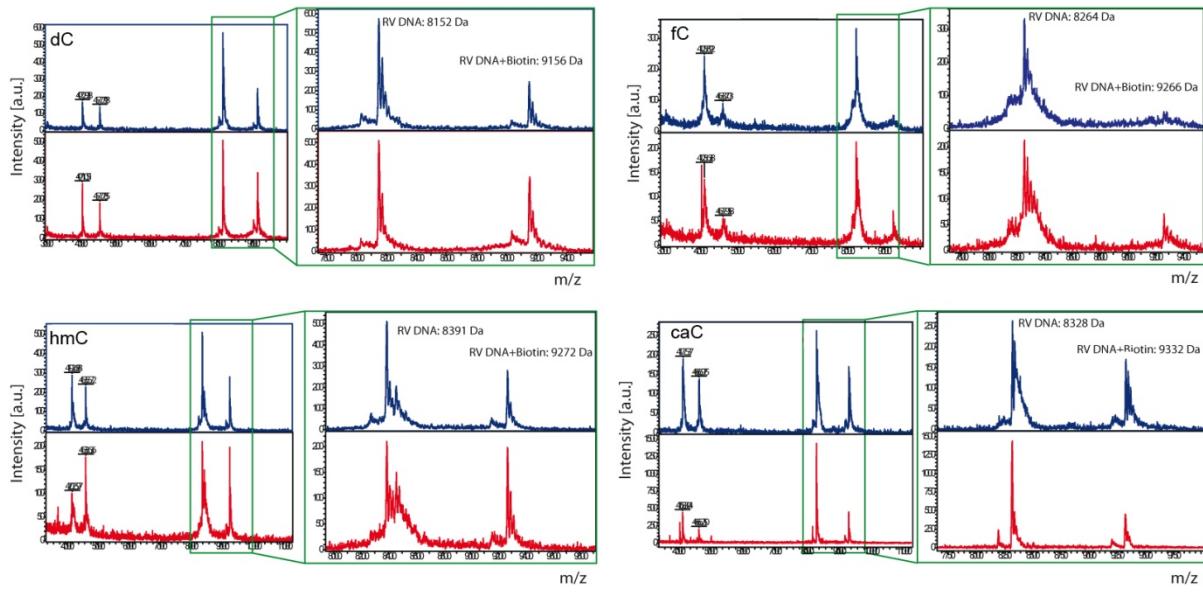


Abbildung 30: MALDI-TOF-MS der Lysat-inkubierten DNA. Die Spektren zeigen, dass das Material vor (blau) und nach der Inkubation (rot) nicht durch Strangspaltung oder Basenexzision geschädigt ist.

Zusammenfassend wurden für fC und caC eine Reihe von DNA-Reparaturproteinen sowie jeweilige Transkriptionsfaktoren detektiert. Dabei bestehen nur geringfügige Überschneidungen der beiden Modifikationen in Bezug auf die rekrutierten Proteine. Dies unterstreicht deren individuell verschiedene Funktion im Organismus. Die Ergebnisse weisen außerdem darauf hin, dass fC und caC bei der DNA-Demethylierung eine Rolle spielen, indem sie durch BER-Proteine erkannt werden können.

Aktuelle Studien methylierter DNA, beschäftigen sich mit der Verteilung der oxidativen Cytidin-Modifikationen bei der Embryogenese in Wirbeltieren.¹²⁴ Dabei konnte unter anderem die Bedeutung von hmC und mC bei der Entwicklung Wirbeltier-Morphologie gezeigt werden und die dynamische (De)Methylierung von CpG-inseln während der Embryogenese untersucht werden.

Die Bedeutung der oxidativen mC-Modifikationen ist trotz beträchtlicher Forschungsanstrengungen in zahlreichen biologisch-chemischen Gruppen noch nicht hinreichend verstanden um die biologischen Konsequenzen der (dynamischen) DNA-Methylierung zu beschreiben. Ob Transkriptionsregulation oder Bindungsverstärkung (bzw.- reduktion) bei der Zellhomöostase oder der Einfluss auf Proliferation und Differenzierung letztlich durch die mC-Derivate hervorgerufen wird, ist weiterhin Gegenstand intensiver Forschung.

5.3 Synthese neuer 2'-Desoxy-2'-arabinofluoro-Cytidin Nukleoside

Die Suche nach Derivaten und Metaboliten methylierter DNA-Nukleoside hat sich seit der Entdeckung von Hydroxymethyl- und Formylcytidin zu einem sehr kompetitiven Forschungsgebiet entwickelt. Dabei ist der Einsatz geeigneter Werkzeuge zur Aufklärung der biologisch-chemischen Prozesse ein entscheidender Erfolgsfaktor. Synthetisch hergestellte Analoga der natürlich vorkommenden Nukleoside können dazu wesentlich beitragen.

Insbesondere die schwierige Herstellung von reiner DNA mit positionsspezifischem Auftreten der modifizierten Basen limitierte lange die Aufklärung der biologischen Funktion der Methylcytidin-Derivate. Diese konnte bereits in der oben beschriebenen Optimierung des Herstellungsverfahrens für synthetische DNA-Oligonukleotide adressiert werden. Darüber hinaus ermöglicht die Herstellung von DNA-Strängen mittels *in vitro* Transkription die Untersuchung langer Sequenzen, die durch vollständigen Ersatz des Cytidins eine stärkere molekularbiologische Antwort erwarten lassen.

Jedoch sind für ein umfassendes Verständnis der epigenetischen Funktion der Cytidin-Derivate weitere Experimente nötig. Dabei sind die enzymatische Umwandlung der modifizierten DNA sowie die Analyse der Reaktionsprodukte aussichtsreiche Ansatzpunkte für detaillierte Untersuchungen. Die vielseitige Reaktivität der Nukleobasen erschwert dabei das Verständnis der biologischen Prozesse. Eine systematische Analyse erfordert deshalb spezialisierte Verbindungen um bestimmte Reaktionswege zu unterdrücken, den Umsatz der Metabolisierung zu steigern oder die Sensitivität der Analysenmethoden zu verbessern.

Dabei bieten 2'-fluorierte Cytidin-Nukleoside interessante Vorteile. Fluor besitzt als zweitkleinstes Atom eine geringe räumliche Ausdehnung und sollte aus diesem Grund kein sterisches Hindernis für die Erkennung und Bindung der DNA am Enzym darstellen. Dennoch ist die Bindungslänge der C-F Bindung (1.35 Å) im Vergleich zur C-H Bindung (1.09 Å) leicht erhöht. Allerdings stehen unter organisch-synthetischen Aspekten keine besseren Alternativen in Sinne eines bioisosteren Ersatzes zur Verfügung. Die strukturellen Alternativen wie z. B. carbocyklische, 2'-O-Methyl-, 2'-5'- oder Didesoxy-Nukleoside, etc. sind deutlich weniger geeignet. Im Falle des Carbozyklus oder der 2'-OMe Gruppe werden zusätzliche Störungen der Struktur eingeführt oder im Falle eines Didesoxynukleosids ist nur der Einbau als terminale Base in DNA Sequenzen möglich. Allgemein können diese Verbindungen nicht an die, im Folgenden Abschnitt beschriebenen Vorteile der Fluorierung heranreichen, da sie eine erhebliche Störung des DNA-Doppelstrangs verursachen, welcher sich dann nicht mehr als Modell für biologische Untersuchungen verwenden lässt.

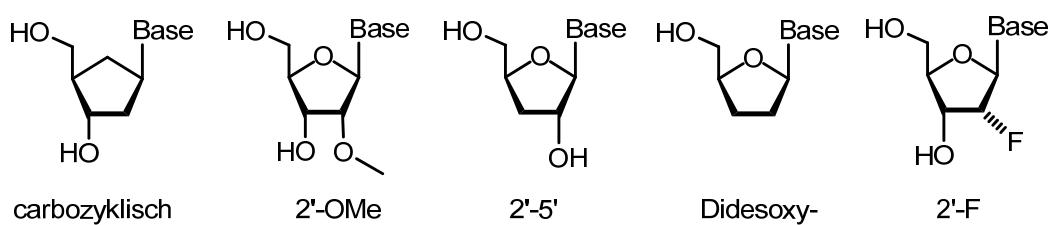


Abbildung 31: Potentielle Ribosederivate als Isosterer Ersatz der Desoxyribose.

Durch den Elektronenzug des stark elektronegativen Fluors wird das Carbokation an C1 als Intermediat einer, nach S_N1 -Mechanismus ablaufenden, glykosidischen Bindungsspaltung stark

destabilisiert. Dies resultiert in einer erhöhten Stabilität der glykosidischen Bindung. Auf diesem Wege wird eine Bildung von abasischen Stellen in der DNA verminderd,¹²⁵ womit sich die Metabolisierung von Methylcytidin bei unterdrückter *base excision repair* untersuchen lässt.

Allerdings ist die Stereochemie der Fluorierung für die biologischen Untersuchungen relevant. Die beiden möglichen Konfigurationen am C2 des Zuckers werden in Abbildung 32 dargestellt und die verschiedenen Konfigurationen in der Folge bewertet.



Abbildung 32: Ribo- und Arabinokonfiguration der Furanose in Nukleosiden.

Die Konfiguration am C2' beeinflusst die Konformation des Zuckers und in der Konsequenz auch die Konformation der daraus hergestellten Oligonukleotide. Abhängig von der 2'-Substitution des Zuckers kann im Doppelstrang eine A-DNA oder B-DNA Konformation vorliegen. Die weiteren möglichen Doppelstrang-Konformationen (C-, D-, E- und Z-DNA) sind sehr selten und liegen nur unter besonderen Bedingungen, wie z. B. hohen Salzkonzentrationen oder bei speziellen Basenabfolgen vor.

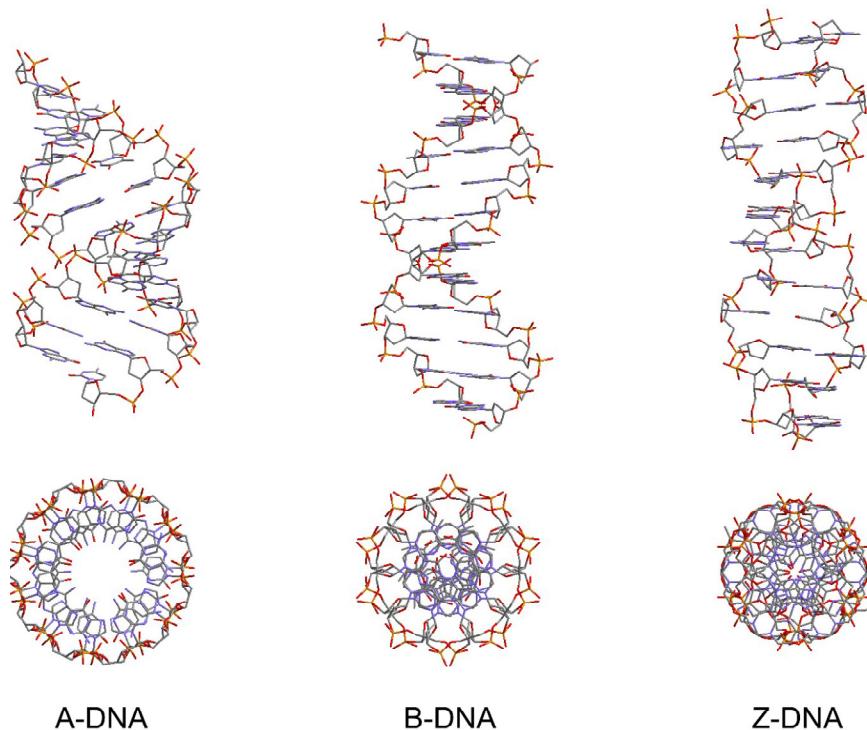


Abbildung 33: Übersicht der Geometrien von A-, B- und Z-DNA. Die in genomischer DNA häufigste Tertiärstruktur ist B-DNA.¹⁰²

Für genetisches DNA-Material natürlichen Ursprungs ist die B-Konformation am häufigsten.⁶ Sie bildet eine rechtsgängige Doppelhelix in welcher aufeinanderfolgende Basen einen Abstand von 0.34 Å besitzen. Hierfür ist die bevorzugte C2' endo Konformation der Zuckerphosphat-Rückgrats verantwortlich. Dabei steht wie in Abbildung 34A dargestellt der C2'-Kohlenstoff oberhalb der Furanosyl-Ebene. Die nebenstehende Konformation Abbildung 34B zeigt die in B-DNA auftretende C3 endo-Konformation.

Allerdings stehen diese beiden möglichen Zucker-*Pucker* (= Faltungen) in natürlich vorkommenden 2'-Desoxy-oligonukleotiden in einem Gleichgewicht und sind durch eine relativ geringe energetische Barriere getrennt. Dies hat eine hohe Flexibilität des DNA Duplexes zur Folge.¹²⁶ Dennoch liegt in biologischer DNA das Gleichgewicht auf der Seite der C2' endo Konformation des Zuckers und demzufolge bei der B-Doppelhelix.

Wie oben erwähnt ist die Konformation auch durch die Art des Substituenten am C2' des Zuckers beeinflusst. Die Einführung elektronenziehender Reste in die Ribosyl-Konfiguration fixiert die Konfiguration. Im Falle eines Hydroxyl-Rests ist die C3' endo Konformation energetisch begünstigt. Dies trifft auf natürliche RNA-Oligonukleotide zu, weshalb diese eine A-Doppelhelix bilden.

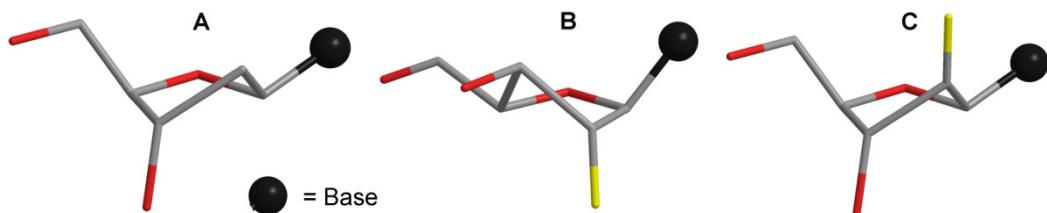


Abbildung 34: Perspektivische Darstellung der Zuckerfaltungen von A) Desoxyribosid in C2' endo Konformation B) 2'-Fluororibosid (C3 endo) und C) 2'-Fluoroarabinosid (C2 endo)

Die in Abbildung 32 links dargestellte Ribosylkonfiguration erzeugt bei C2'-Fluorierung eine C3' endo Konformation des Nukleosids und demzufolge eine RNA-artige Konformation.^{125d,127} Die Arabinosylkonfiguration (Abbildung 32 rechts) erzeugt im Gegensatz dazu ein B-DNA Konformation.¹²⁸ Aus diesem Grund wurde die Arabino-Fluor Verbindung ausgewählt, da diese die geometrischen Eigenschaften natürlicher DNA besser wiederspiegelt und Störungen der Konformation minimal sind.

Das weitere Potential der Verbindung liegt in ihrer erhöhten Masse. Die im Arbeitskreis Carell etablierte Methode der massenspektrometrischen Quantifizierung von Nukleosiden basiert auf der Verwendung von isotopologen Verbindungen. Diese werden in bekannter Menge zu einer Probe unbekannter Konzentration zugesetzt. Aufgrund der identischen Ionisation und chromatographischer Eigenschaften kann aus den Verhältnissen der Integrale der Massensignale auf die Stoffmenge geschlossen werden. Dabei wird die Identität der Verbindung über ein gekoppeltes Massenspektrometer bestimmt, welches für die synthetischen Isotopologen das entsprechend höhere Masse-zu-Ladung Verhältnis detektiert. Diese Methode besitzt Ähnlichkeit mit der bereits in einem früheren Kapitel erläuterten SILAC-Methode zur Quantifizierung von Proteinen aus biologischen Proben.

In den Experimenten zur Untersuchung der enzymatischen Umwandlung der Cytidin-Derivate wird der entsprechende DNA-Strang mit dem aktiven Enzym inkubiert, die resultierende DNA enzymatisch

verdaut und mittels der beschriebenen LCMS-Methode analysiert. Dabei ist einerseits der Eintrag von natürlichem Cytidin in Form von Verunreinigungen der Enzyme für den spektrometrischen Hintergrund verantwortlich. Andererseits ist die enzymatische Umwandlung der DNA durch potentiell Cytidin modifizierende Enzyme ein weiterer Faktor. Als Resultat der oftmals aufwändigen molekularbiologischen Herstellung der Enzyme sind diese nur in geringen Mengen verfügbar. Darüber hinaus besitzen sie häufig nur eine geringe Aktivität. Die Kombination der genannten Einschränkungen führt dazu, dass der Umsatz der modifizierten DNA in sehr geringem Maße stattfindet und deshalb hochsensitive Methoden zur Detektion der enzymatischen Prozesse zum Einsatz kommen müssen.

Die beschriebene Methode unter Verwendung von Isotopen-gelabelten Referenzverbindungen mit Massendifferenzen unterhalb von 4 – 5 Da ist ungeeignet für Quantifizierungen im unteren picomol-Bereich. Hier ist der natürliche Hintergrund von Isotopologen mit dieser Massendifferenz nicht mehr vernachlässigbar. Daher stoßen die vorhandenen Referenzverbindungen, wie z. B. [¹⁵N₂]-caC an das Detektionslimit unterhalb dessen es nicht mehr möglich ist, die enzymatisch metabolisierten isotopenhaltigen Verbindungen von natürlich vorkommenden Isotopologen zu unterscheiden.

Die Massendifferenz zwischen den 2'-Desoxynukleotiden und den hergestellten 2'-Fluoro-Cytidin Derivaten beträgt 18 Da und ermöglicht massenspektrometrische Untersuchungen der Oxidationsprodukte von 5-Hydroxymethylcytidin welche aufgrund der Enzymaktivität nur im picomol-Bereich vorliegen und deren Detektion vor dem Hintergrund der natürlich vorkommenden Isotopologe des Cytidins und dessen Derivate bisher nicht möglich ist. Die Abbildung 35 zeigt exemplarisch die relative Häufigkeit von Formyl- und Carboxylcytidin sowie der synthetisch hergestellten Analoga zur massenspektrometrischen Quantifizierung. Daraus wird ersichtlich, dass *m/z* +18 natürlicherweise nicht vorhanden ist.

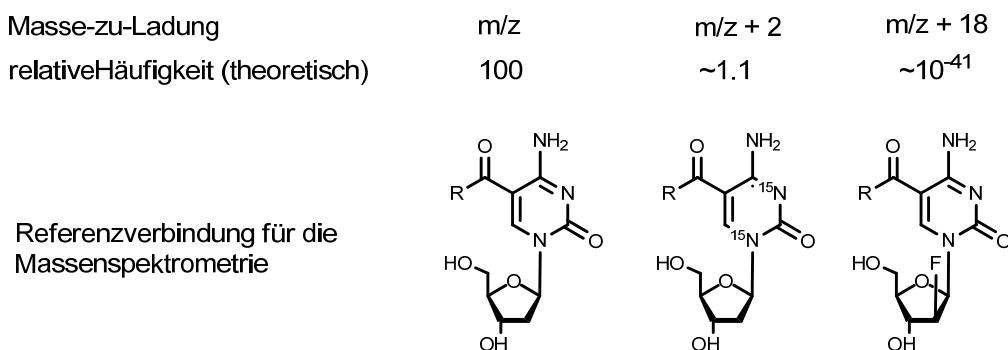
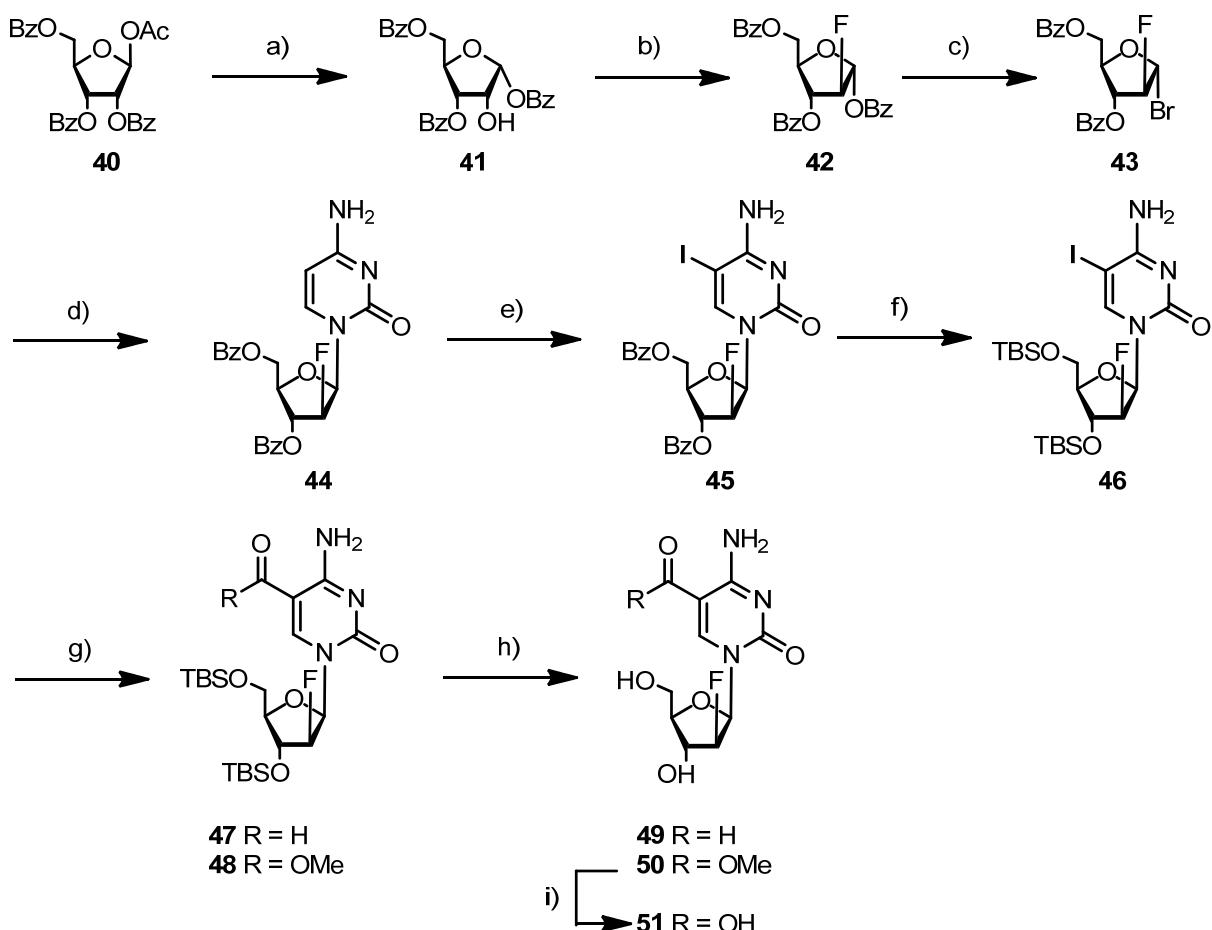


Abbildung 35: Die natürliche Häufigkeit der schweren Isotopologen (*m/z* + 2 und *m/z* + 18) von FC bzw. caC nimmt mit zunehmender Massendifferenz erheblich ab. Die gezeigten Verbindungen stellen die zugehörigen Referenzsubstanzen für die massenspektrometrischen Untersuchungen dar.

Die zahlreichen Varianten der Synthese von fluorierten Nukleosiden und die dabei auftretenden Schwierigkeiten werden ausführlich von Liu et al. beschrieben.¹³⁰ Die Synthese der 2'-Arabinofuranosylcytidin-Derivate wurde ausgehend von dem 1-O-Acetyl-2,3,5-tri-O-benzoyl-β-D-Ribofuranose durchgeführt. Dabei werden im ersten Schritt die Schutzgruppen an den für die Fluorierung erforderlichen Positionen angeordnet. Die 2'-Hydroxyverbindung **41** wird dabei durch die Behandlung von **40** mit Bromwasserstoff in Essigsäure gewonnen. Dabei entsteht

intermediär das β -Bromoanomer, das bei wässriger Aufarbeitung zur Hydroxyverbindung hydrolysiert und eine Migration der Benzoylgruppe an die gewünschte Position zur Folge hat.¹²⁹ Die so angeordneten Schutzgruppen erlauben eine anschließende Fluorierung des Ribofuranosids an der 2'-Position unter Inversion der Konfiguration am Kohlenstoffatom mit Diethylaminoschweifeltrifluorid.



Schema 8: Die Synthese der 2'-Desoxy-2'-arabinofluor-Cytidin-Derivate von Formyl-(49) und Carboxylicytidin (51).
a) HBr in AcOH, CH₂Cl₂, 67%, b) DAST, CH₂Cl₂, 42%, c) HBr in AcOH, CH₂Cl₂, Ausbeute nicht bestimmt (Rohprodukt), d) 1. Cytosin, HMDS, (NH₄)₂SO₄, 2. **43**, DCE, $\alpha:\beta = 1:5$, 78%, e) (NH₄)₂Ce(NO₃)₆, I₂, MeCN, 88%, f) 1. NH₃, MeOH, 2. TBSCl, DMF/Pyridin, 86%, g) **47**: Pd₂(dba)₃, PPh₃, CO (3 bar), Bu₃SnH, Toluol, 57%, **48**: Pd(II)Cl₂·(MeCN)₂, DIPEA, CO (3 bar), MeOH, 90%, h) HF-Pyridin, EtOAc, 86-95%, i) LiOH, MeCN/H₂O, 89%.

Idealerweise fände die Einführung des Fluoratoms am Nukleosid statt. Dafür stehen theoretisch verschiedene Methoden zur Verfügung.¹³⁰ Mit Hilfe einer S_N2-Fluorierung unter Verwendung von HF-NEt₃ und einer Sulfonat-Abgangsgruppe lassen sich vorrangig Purin-Nukleoside zur Arabinofluoro-Verbindung umsetzen. Diese Methode eignet sich allerdings nicht für Pyrimidin-Basen, da das O2 des Heterozyklus an der aktivierten C2' Position des Ribosids angreifen kann, wobei ein 2,2'-Anhydropurin-Nebenprodukt entsteht. Versucht man nun dieses Nebenprodukt unter Ringöffnung mittels DAST umzusetzen erhält man die unerwünschte Ribo-Fluorverbindung. Ebenso verhält es sich bei der direkten Einführung am 2'-Hydroxyarabino-Cytidin.

Demzufolge bleibt nur der aufwändiger Zugang ausgehend von der oben bereits beschriebenen Riboseverbindung mit anschließender Glykosylierung. Diese wird nach Aktivierung des Zuckers als Bromid unter Vorbrüggen-Bedingungen in 78% Ausbeute über zwei Stufen durchgeführt. Zunächst wird bei der Reaktion des 2'-Fluorozuckers **42** mit 30% Bromwasserstoff in Essigsäure 1- α -Bromozucker **43** hergestellt und als Rohprodukt in der Folge weiterverwendet. Bei dieser Reaktion wird die Stereoselektivität durch die stabilisierende Wechselwirkung der freien Elektronenpaare des Fluors und des Sauerstoffs mit dem nichtbindenden σ^* -Orbital der C-Br Bindung begünstigt. Daraus ergibt sich die Stereoselektivität der Glykosylierung zugunsten des β -Nukleosids. Es entstehen die α/β -Anomere **44** im Verhältnis 1/5, was anhand der NMR-Kopplungskonstanten ermittelt werden konnte. Das erwünschte β -Anomer ließ sich auf dieser Stufe nicht isolieren, weshalb zunächst mit dem Anomerengemisch weitergearbeitet wurde. Die Einführung des Iods an C5 des Heterozyklus gelang unter Verwendung von Cer(IV)ammoniumnitrat und Iod nach einer Vorschrift von Asakura et al.¹³¹ Das Cerammoniumnitrat oxidiert dabei das Iod zum Iodonium-Ion, welches an C5 angreift und unter Abspaltung eines Protons das aromatische System regeneriert. In der Folgereaktion wurden die Ester-Schutzgruppen zugunsten von Silyl-Schutzgruppen ausgetauscht (Verbindung **46**), da diese in der anschließenden Umsetzung zur Carbonylverbindung stabil sind. Ausgehend von der iodierten Verbindung **46** werden die beiden verschiedenen 5-Derivate des Cytidins hergestellt. Zum einen wird an der genannten Position eine Carboxylgruppe eingeführt **48** und in einer anderen Umsetzung die Formyl-Einheit synthetisiert (Verbindung **47**). Letztere erfolgt durch eine carbonylierende Stille-Kupplung. Dabei insertiert zunächst Pd(0) via einer oxidativen Addition in die Kohlenstoff-Halogen-Bindung und bildet einen Alkyliodopalladium-Komplex. In diesen wird anschließend Kohlenstoffmonoxid insertiert und schließlich in einer Transmetallierung mittels Tributylzinnhydrid der Hydrido-Komplex gebildet, welcher über die reduktive Eliminierung von Pd(0) die Formylverbindung erzeugt und gleichzeitig die aktive Katalysatorspezies regeneriert.

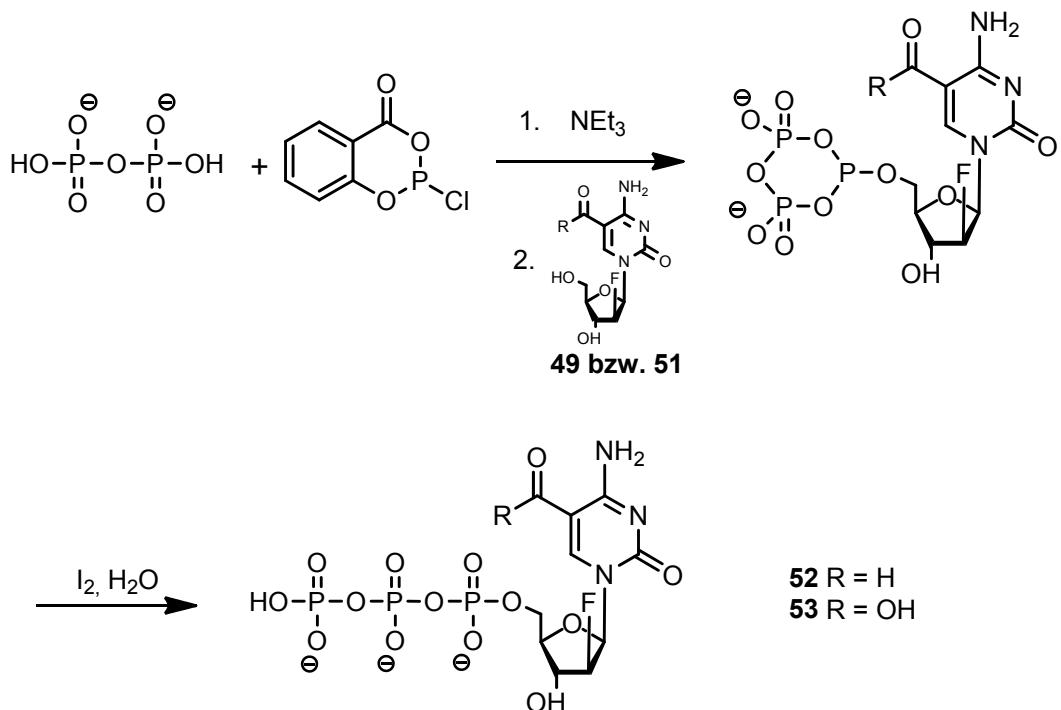
Nach der Abspaltung der Silyl-Schutzgruppen mit Hilfe von Fluorid wurde das erhaltene Material mittels Reversed Phase HPLC gereinigt und die bereits erwähnten Anomeren getrennt. Das 2'-Desoxy-2'-fluoro-D-arabinofuranosyl-5-carboxylcytosin **51** wurde erstmals im Jahr 2011 von He et al. synthetisiert publiziert, wobei mit einem leicht abgewandelten Protokoll gearbeitet wurde. Die hier verwendete Route bietet den Vorteil, dass das Anomerieverhältnis zugunsten des gewünschten β -Anomers verschoben werden konnte. Die analoge Formyl-Verbindung **49** ist bisher nicht literaturbekannt.

Parallel dazu wurde die Synthese der analogen Ribofuranosyl-Verbindung etabliert (Experimenttalteil, Verbindungen **72 - 74**), um die Edukte für Phosphoramidit und Triphosphat-Synthese verfügbar zu machen. Diese Synthese wurde im Arbeitskreis Carell anschließend von Arne Schröder weiter bearbeitet.

Das HPLC-gereinigte Material des Arabino-Nukleosids wurde in der Folge zum Triphosphat umgesetzt um es mittels PCR in lange DNA Sequenzen einzubauen.

Dabei wurde das Protokoll von Eckstein¹³² et al. in adaptierter Form angewendet. Der Vorteil liegt in der Schutzgruppenfreien Umsetzung mit Hilfe eines Phosphitylierung-Reagens, das dank seiner moderaten Reaktivität die Bildung von Nebenprodukten minimiert. Es wird zunächst aus 2-Chloro-1,3,2-benzodioxaphosphorin-4-on und Pyrophosphat das Phosphitylierungs-Reagenz hergestellt. Zu diesem Intermediat wird in einer Eintopf-Reaktion das 5'-Hydroxynukleosid (**49** bzw. **51**) gegeben

und das entstehende, cyclische Triphosphat durch Zugabe einer wässrigen Iodlösung hydrolysiert und zum entsprechenden Produkt **52** bzw. **53** oxidiert (Schema 9).



Schema 9: Synthese der Triphosphate aus den Formyl- und Carboxylnukleosiden nach Eckstein.¹³²

Auf diese Weise konnte 2'-Desoxy-2'-fluoro-D-arabinofuranosyl-5-carboxylcytosin-5'-triphosphat **53** und 2'-Desoxy-2'-fluoro-D-arabinofuranosyl-5-formylcytosin-5'-triphosphat **52** erstmals hergestellt werden.

Die Ausbeuten der Triphosphate nach HPLC Aufreinigung betragen zwischen 3% für das Formyl- **52** und 8% für das Carboxylcytidin **53**. Die erhaltenen Mengen sind gering aber dennoch ausreichend um den Einbau in DNA mittels Polymerasenkettenreaktion durchzuführen. Aus diesem Grund wurde keine Optimierung der Reaktionsbedingungen angestrebt.

Parallel wurde in der Arbeitsgruppe Carell Synthese des entsprechenden Phosphoramidits durchgeführt. Mit diesem ist es nun möglich einerseits eine positionsspezifisch carboxylierte als auch formyierte 2'-Fluor-haltige DNA zu synthetisieren. Andererseits ermöglicht das Triphosphat die Darstellung langer DNA-Stränge unter Einbau der epigenetischen Basen mittels *in vitro* Transkription. Die mittels organischer Synthese zugänglichen Werkzeuge sollen nun in weiteren Untersuchungen dazu beitragen, grundlegende Fragestellungen der Epigenetik zu adressieren.

Im den folgenden Abschnitten wird ein weiteres Oligonukleotidsynthese-Projekt beschrieben, wobei nun eine RNA-Modifikation im Fokus steht.

5.4 Adenosin zu Inosin-Editing

Eine besondere Form der Genregulierung durch RNA-Prozessierung ist der Adenosin-Inosin Austausch (*A-to-I-editing*). Die Bildung des Inosins aus dem Adenosin erfolgt, katalysiert durch ein dsRNA bindendes ADAR Enzym (*adenosine deaminase acting on RNA*) in Form einer hydrolytischen Desaminierung.

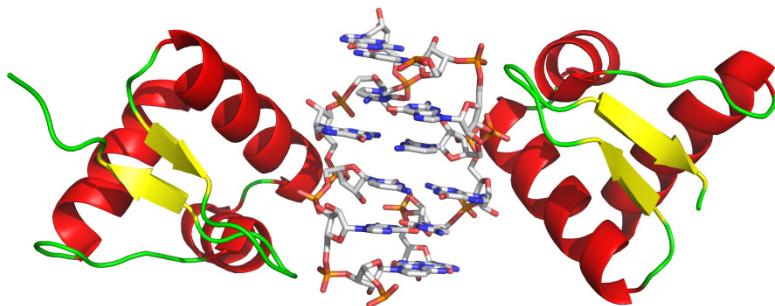
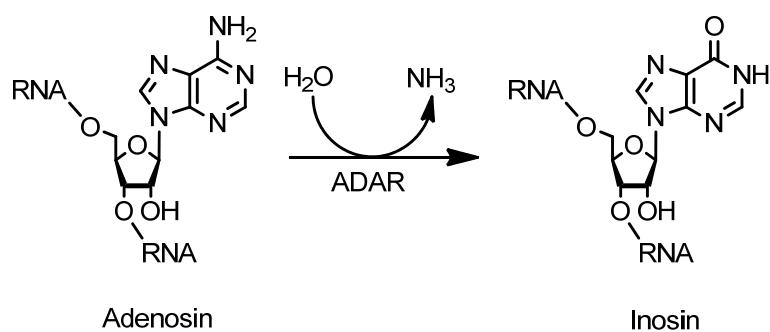


Abbildung 36:¹³³ Die Bindedomäne des ADAR1 Homodimers im Komplex mit doppelsträngiger RNA.

Dabei geht das Amin als Wasserstoffbrückendonator verloren, wie in Schema 10 dargestellt und wird gegen einen Carbonylsauerstoff mit Wasserstoffbrückenakzeptor-Eigenschaften ausgetauscht. Dies verändert nun die Basenpaarungseigenschaften drastisch. Während Adenosin ein Watson-Crick-Basenpaar mit dem Uridin bildet, zeigt das Inosin dem Guanosin analoge Paarungseigenschaften. Erfolgt der Austausch Adenosin gegen Inosin an einer bereits bestehenden doppelsträngigen RNA (z.B. primäre miRNA) führt dies zur Bildung eines I:U Wooble Basenpaares.



Schema 10: Durch die ADAR-Enzymfamilie katalysierte Desaminierung von Adenosin zu Inosin.

Dieser Prozess stellt daher eine zusätzliche Ebene der posttranskriptionalen Regulation der Genexpression dar. Dadurch kann die Transkriptions-Vielfalt erhöht und so eine höhere strukturelle und funktionelle Proteinexpression ermöglicht werden.

Der Adenosin-Inosin Austausch ist in zahlreichen zellulären Prozessen eingebunden und tritt beispielsweise im Nervensystem, bei der Codierung der Ionenkanäle durch mRNA auf.¹³⁴ Außerdem wird spekuliert, ob diese Form der RNA Prozessierung dazu dient, virale RNA zu markieren um sie anschließend zu spalten und unschädlich zu machen.¹³⁵

Dennoch ist die Funktion hochgradig editierter, inosinhaltiger dsRNA bisher kaum bekannt. Die Untersuchung der Protein-RNA Wechselwirkung von inosinhaltiger RNA hat Tudor SN als spezifischen Interaktionspartner ergeben. Dieses Protein tritt nicht bei kanonischer RNA mit entsprechender Sequenz in Erscheinung.¹⁴⁰ Es ist außerdem in weiteren elementaren Prozessen, wie Splicing, Transkriptionskontrolle und Apoptose involviert.

Beispielsweise wird durch die Erkennung und Spaltung der editierten RNA durch p100 diese von der weiteren Downstream-Prozessierung durch RNAi ausgeschlossen.

Um diese Unterscheidung der Erkennung genauer zu untersuchen ist eine strukturelle Charakterisierung dieser RNA außerordentlich wertvoll. Dies wurde bereits über eine Röntgenstrukturanalyse versucht und dabei eine Ähnlichkeit des I:U Basenpaars in Bezug auf die Geometrie zum G:U Basenpaar gefunden.¹³⁶ Dies widerspricht jedoch Schmelzpunktstudien mit diesem Strukturmotiv.¹³⁷ Die Schwachstelle der Strukturuntersuchung am Kristall liegt insbesondere in der nicht-nativen Umgebung des RNA-Doppelstrangs. Sie erlaubt daher nur begrenzt Rückschlüsse auf die Geometrie und keine auf die Dynamik des Moleküls in Lösung oder der Interaktion mit Proteinen.

Die Strukturaufklärung mittels NMR bietet diesbezüglich einen Ausweg. Dennoch unterliegt auch diese Methode bestimmten Einschränkungen, welche im folgenden Abschnitt kurz beleuchtet werden.

Mechanistische Studien von Biomolekülen mittels NMR werden durch die hohe Anzahl an Signalen im betrachteten Frequenzbereich erschwert (*spectral crowding*). Insbesondere die redundanten Strukturelemente in Biomolekülen tragen zu diesem Effekt bei. In RNA ist beispielsweise die wiederkehrende Ribose-Einheit ein Grund für Überlappung der Protonensignale. Durch die Einführung von Isotopenlabels an spezifischen Positionen im Molekül wird die Signalüberlappung reduziert und eine eindeutige Zuordnung der Signale ermöglicht. Dies wurde mittels *in vitro* Transkription hergestellten RNA-Oligonukleotiden bereits erfolgreich gezeigt.¹³⁸⁻¹³⁹

Die *in vitro* Transkription ist besonders für die Herstellung langer (>30nt), isotopengelabelter RNA geeignet, weist aber Nachteile bei der Herstellung kurzer RNA-Oligonukleotide auf. Darüber hinaus ist sie für den gezielten Einbau nicht-kanonischer Nukleotide in Anwesenheit aller vier kanonischen Basen ungeeignet. Die Ursache dafür ist, dass nicht-kanonische Nukleotide vergleichbare Basenpaarungseigenschaften wie die kanonischen besitzen können, was sich negativ auf die Sequenztreue der Transkription auswirkt. Dies trifft auf die untersuchte Sequenz zu, da hier Inosin und Guanin in den gleichen Strang eingebaut werden sollen. Eine alternative Herstellung dieser Sequenz mittels *in vitro* Desaminierung von Adenosin an ausgewählten Positionen ist ebenfalls nicht handhabbar, da die Positionsspezifität von ADAR für die exklusive Desaminierung im Bereich des Motivs nicht ausreicht. Zudem wären hierfür längere RNA-Substrate nötig^{140,141} welche die Komplexität der Signalzuordnung nur unnötig weiter erhöhen.

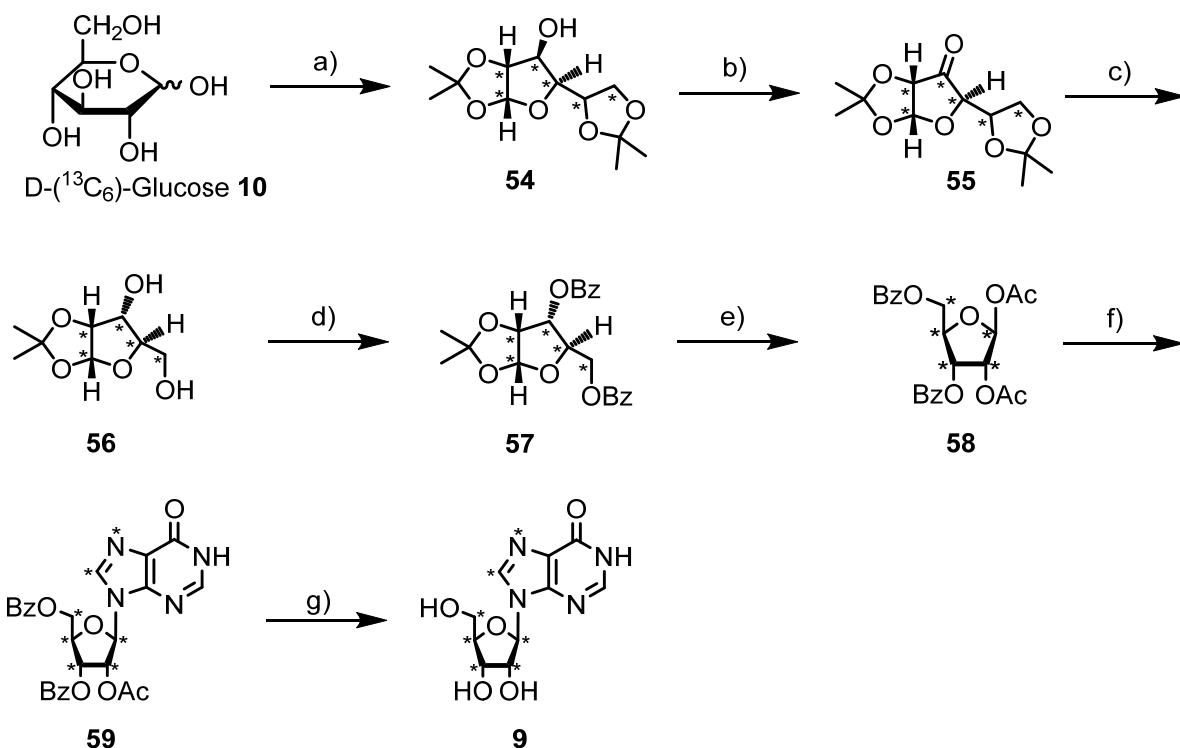
Aus genannten Gründen ist die chemische Synthese die einzige attraktive Möglichkeit, Material für die Untersuchung von modifizierten RNA-Oligonukleotiden herzustellen. Die zwei wesentlichen Vorteile sind der positionsgenaue Einbau der Nukleotide in den Einzelstrang sowie der positionsselektive Ersatz der natürlichen Atome durch das gewünschte Isotop im Monomer. Zudem besteht unter synthetischen Gesichtspunkten die Möglichkeit den Isotopeneinbau in die Monomere zu variieren oder wie in der hier beschriebenen Synthese positionsselektiv und einheitlich zu ermöglichen.

Die durch chemische Synthese hergestellten RNA-Oligonukleotide ermöglichen durch die Isotopenmarkierung eine hochauflöste Strukturaufklärung des Doppelstrangs und darüber hinaus insbesondere im Bereich der Inosin-Basen eine präzise Ermittlung intramolekularer Abstände. Zudem ermöglicht diese RNA eine Konformationsdynamik-Analyse der Protein-Interaktion in wässriger Lösung und bietet so erstmals einen möglichen Einblick in die Bindung und Spaltung von RNA durch den RISC-Kofaktor p100.

5.4.1. Synthese des $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -markierten Inosin Phosphoramidits

Die Herstellung der isotopenmarkierten Verbindung ist auf organisch-synthetischem Wege auf mehreren Routen denkbar. Aufgrund der kommerziellen Verfügbarkeit vollständig ^{13}C -markierter Glucose ist die beschriebene chemische Synthese trotz des präparativen Aufwands durch zusätzliche Syntheseschritte und der nachteiligen Atomeffizienz allen anderen synthetischen und biotechnologischen Zugangsmöglichkeiten überlegen. Eine alternative Herstellung des RNA-Phosphoramidit-Bausteins auf semisynthetischem Wege scheitert an der geringen Ausbeute und Homogenität des biochemisch hergestellten Nukleotids. Aus diesem Grund wurde eine von Saito et al.¹⁴² beschriebene Synthese des Glucosids gewählt. Dabei wurden die Reaktionen zunächst an dem deutlich günstigeren Material mit natürlicher Isotopenverteilung optimiert. Diese Ergebnisse werden im Folgenden nicht im Detail diskutiert sondern ausschließlich die Synthese der isotopenmarkierten Verbindung behandelt. Die Reaktionsbedingungen für die Herstellung der ungelabelten Substanz werden im Experimentalteil aufgeführt (Verbindungen **75 - 81, 83, 84**).

Ausgehend von vollständig ^{13}C -markierter Glucose wurden zunächst Hydroxyfunktionen an den Positionen 1'-2', und 5'-6' mittels zweier Isopropyliden-Acetale geschützt. Die 1,2:5,6-Di-*O*-isopropyliden-D-glucofuranose **54** konnte mittels Iod-Katalyse in Aceton in guter Ausbeute erhalten werden. Die Herstellung nach Saito et al.¹⁴² unter Verwendung von ZnCl_2 und *ortho*-Phosphorsäure lieferte keine zufriedenstellende Ausbeute, da sich die Reisolierung des Startmaterials und dessen wiederholte Umsetzung als sehr aufwändig herausstellten und sich die iterative Umsetzung negativ auf die Reinheit des Produkts auswirkte.



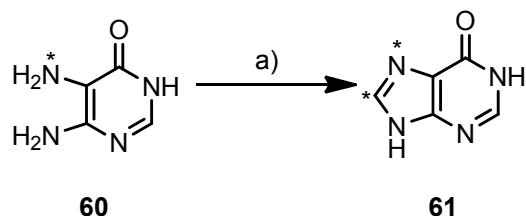
Schema 11: Synthese des isotopengelabelten Inosins ausgehend von vollständig ^{13}C -gelabelter Glucose.

a) I_2 , Aceton, 80%, b) PDC, Ac_2O , CH_2Cl_2 , 94%, c) 1. H_5IO_6 , EtOAc , 2. NaBH_4 , EtOH , 67%, d) BzCl , Pyridin, CH_2Cl_2 , 35%, e) Ac_2O , H_2SO_4 , AcOH , 84%, f) 1. Hypoxanthin **61**, HMDS , 2. TMSOTf , DCE , 92%, g) NH_3 , MeOH , 92%.

Die Verbindung wurde anschließend einer Oxidation unterworfen wobei die Alkoholfunktion am C3 in das entsprechende Keton überführt. Die Reaktion konnte auf eine Ausbeute von 94% optimiert werden, wobei die Verwendung von Pyridiniumdichromat als Oxidationsmittel im Vergleich zu Pyridiniumchlorochromat die bessere Ausbeute lieferte. Die so erhaltene Verbindung **55** weist am C3 einen sp^2 -hybridisierten Kohlenstoff auf. Dieser ist demzufolge planar und wird in der darauffolgenden Oxidations-Reduktionssequenz stereoselektiv in das D-Ribose-Derviat **56** überführt. Dabei wird zunächst unter Verwendung *ortho*-Periodsäure das C5,C6-Acetal entfernt und das intermediär entstehende Diol gespalten. Der entstandene Aldehyd wurde in einer Eintopfreaktion zum Alkohol reduziert und gleichzeitig das Keton am C3 in die stereochemisch gewünschte Konfiguration zum Ribose-Derivat **56** in 67% Ausbeute umgesetzt. Die darauffolgende Einführung der Schutzgruppen an den Positionen 3 und 5 wurde mit Benzoylchlorid durchgeführt wobei nur mäßige Ausbeuten erreicht wurden. Die Entfernung des Acetals sowie die Vorbereitung des

Glykosylbausteins für die Silyl-Hilbert-Johnson Reaktion wurde mit Acetanhydrid unter Säurezugabe in guter Ausbeute erreicht.

Die Herstellung dieser zweifach isotopenmarkierten (^{13}C und ^{15}N) Nukleobase wurde in Zusammenarbeit mit Stefan Schiesser im Arbeitskreis Carell erarbeitet und präparativ von ihm durchgeführt. Dabei wurde [$5\text{-}^{15}\text{N}$]-5,6-diamino-4(3H)-pyrimidin in schwefelsaurer, wässriger Lösung mit ^{13}C -Ameisensäure kondensiert um den Heterozyklus **61** darzustellen.



Schema 12: Darstellung der zweifach isotopenmarkerten Nukleobase Hypoxanthin. a) H^{13}COOH , H_2SO_4 , H_2O , 59%.

Bei der Glykosylierungsreaktion zum Nucleosid wurde nach Optimierung mit der entsprechenden Nukleobase unter Vorbrüggen-Bedingungen eine Ausbeute von 92% erzielt. Die Bildung des unerwünschten α -substituierten Nukleosids wurde nicht nachgewiesen. Vermutlich ist der Übergangszustand, in welchem das intermediaire Carbokation durch den Acetylrest am C2 stabilisiert wird ungünstig für den Angriff der Nukleobase von der Unterseite des Zuckers. Allerdings führt die Nukleophilie des N1 zur Bildung eines unerwünschten Nebenprodukts, in welchem sowohl das Stickstoffatom an Position 1 als auch an Position 9 mit jeweils einem Riboserest verknüpft sind. Die Produktkontrolle wird hierbei durch den Einsatz von 2.2 Äquivalenten Hypoxanthin gewährleistet. Die Identität des Nebenprodukts konnte mittels Massenspektrometrie geklärt werden, da Standard-NMR-Methoden aufgrund der hochgradig aufgespalteten und vielfach überlappenden Signale nicht zielführend sind.

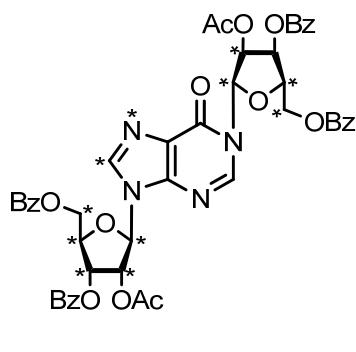


Abbildung 37: Zweifach glykosyierte Nebenprodukt welches während der Glykosylierungsreaktion entsteht und massenspektrometrisch detektiert wurde.

Das so erhaltene Nukleosid **59** wurde mit Ammoniak in Methanol versetzt um die Schutzgruppen zu entfernen. In diesem Schritt wurde das ungeschützte Nukleosid **9** in quantitativer Ausbeute isoliert. Diese Verbindung sowie die nachfolgend hergestellten Derivate sind mit dem spezifischen Isotopenmuster bisher nicht literaturbekannt.

Die ^1H - sowie ^{13}C -NMR Spektren der Verbindung **9** werden in Abbildung 38 veranschaulicht. Die an ^{13}C -Atome gebundenen Protonen erfahren durch die heteronukleare Kopplung eine weitere Aufspaltung zusätzlich zur vicinalen Kopplung der Protonen untereinander. Das führt in den ^1H -Spektrum dazu, dass die Signale stärker überlagert sind als in Spektren von Zuckern mit natürlicher Isotopenverteilung, wie in der Überlagerung der Spektren von isotopenmarkierten und natürlichem Inosin zu sehen ist (Abbildung 38A). Zur besseren Übersicht wird nur der Bereich der Zuckerprotonen gezeigt.

In den ^{13}C -Spektren (Abbildung 38B) führt die unnatürliche Anreicherung des NMR-sensitiven ^{13}C -Kerns zu einer Unterdrückung der Signale der nicht-markierten Kohlenstoffe, welche aus diesem Grund nur schwer detektierbar sind. Darüber hinaus erfahren die ^{13}C -Atome eine Spinkopplung weshalb diese Signale wie in einem Protonen-Spektrum aufgespaltet werden. Die Signale der ^{12}C -Verbindung wurden anhand literaturbekannter NMR-Daten zugeordnet. Die nicht zugeordneten Signale im Bereich von 150-140 ppm stammen von Verunreinigungen durch die, in der vorhergegangenen Reaktion abgespaltenen Benzoylgruppen.

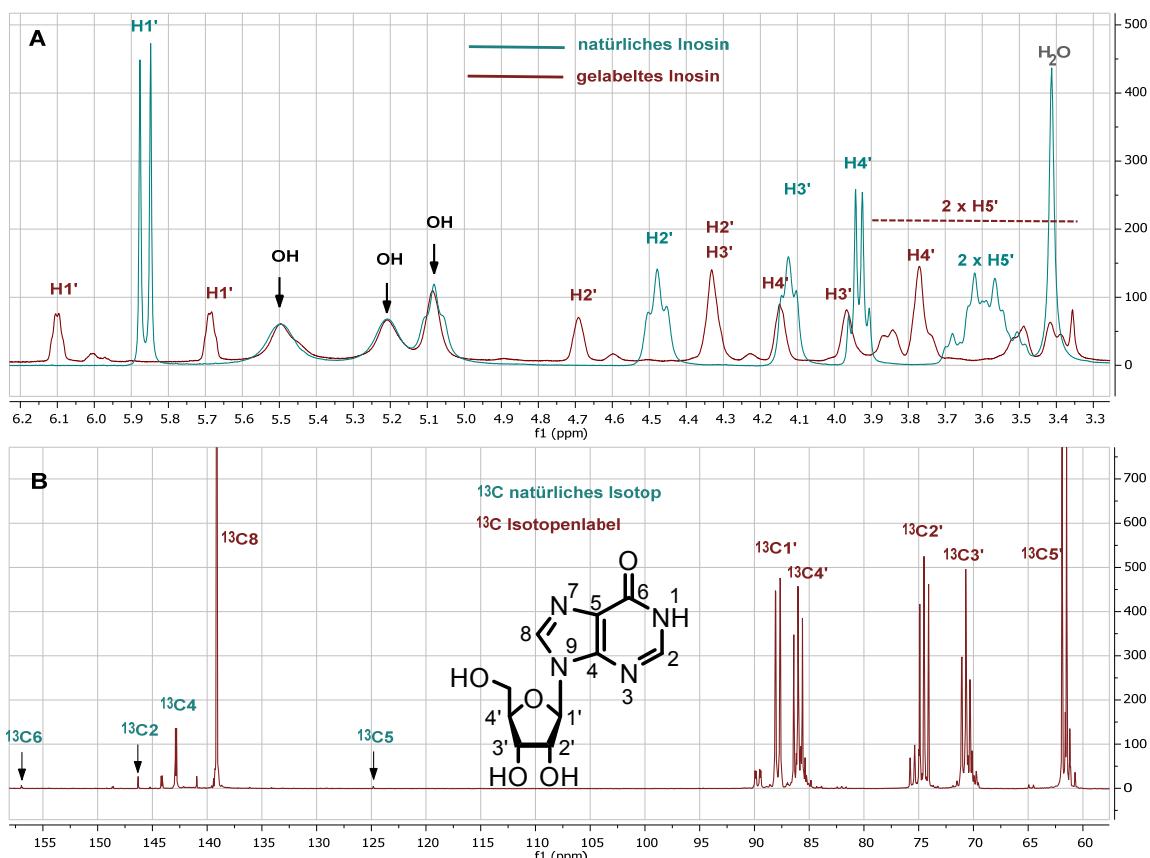
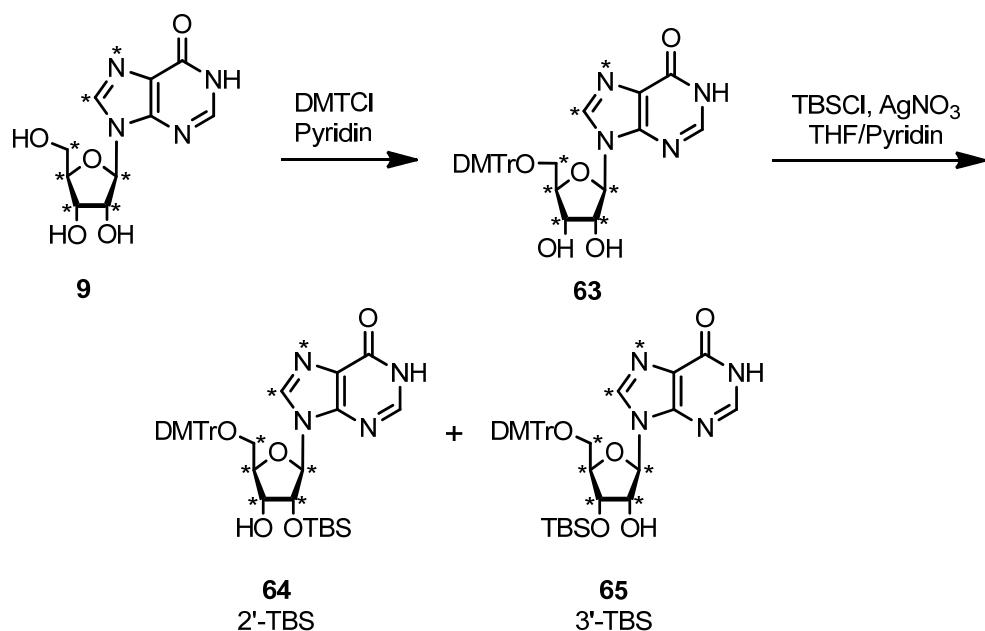


Abbildung 38: NMR-Spektren von Verbindung 9. A) Überlagerung der ^1H -Spektren von ^{13}C markiertem und natürlichem Inosin (nur Zuckerprotonen) und B) Zuordnung der Signale der ^{13}C -gelabelten Verbindung zu den entsprechenden Kohlenstoffatomen.

Die anschließende Derivatisierung des Nukleosids in Vorbereitung der RNA-Festphasensynthese bedurfte einiger Optimierung. Der von Green et. al beschriebene Weg¹⁴³ (Schema 13) ist bezüglich der Ausbeute nicht zufriedenstellend. Die Synthese wurde daher von Beigelmann et al. verbessert.¹⁴⁴ Zunächst sollte wie beschrieben die 5'-Hydroxygruppe mittels Dimethoxytritylchlorid geschützt

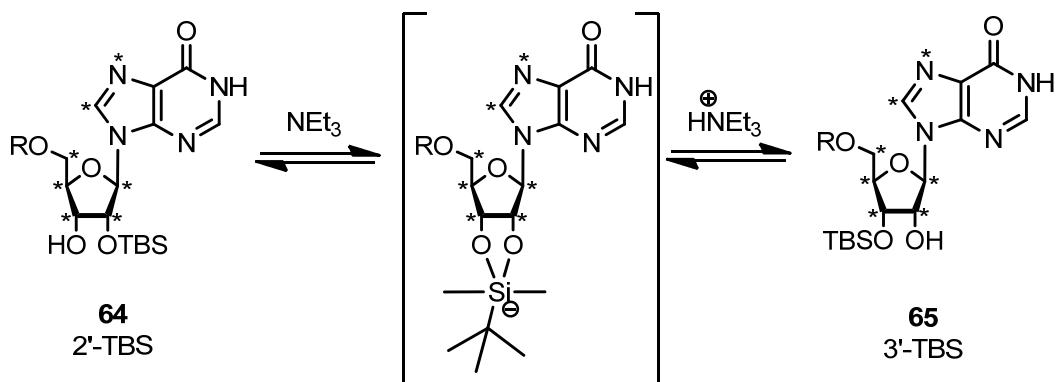
werden, bei dieser Reaktion wurden 71% Ausbeute erzielt (nicht beschrieben) und im Anschluss die TBS-Gruppe an der 2'-Hydroxyfunktion eingeführt werden. Die in der Literatur¹⁴⁴ beschriebene Ausbeute und Reinheit des TBSgeschützten Phosphoramidit-Vorläufers konnte in der praktischen Durchführung jedoch nicht nachvollzogen werden. Dabei stellt die konkurrierende Reaktivität der freien Hydroxylgruppen an den Positionen 2' und 3' die Hauptschwierigkeit dar. Die literaturbeschriebene Synthese wird im Multi-Gramm Maßstab durchgeführt und das reine 2'-TBS Regioisomer durch mehrfache Umkristallisation erhalten. Die beschriebene einfache Umkristallisation ergab das gewünschte Regioisomer in 45% Ausbeute. Aufgrund der geringen eingesetzten Mengen ist diese Trennmethode für die ¹³C-Substanz nicht zielführend, da einerseits die Ausbeute zu gering ist und andererseits eine Umkristallisation mit den verfügbaren Substanzmengen praktisch nicht sinnvoll ist. Aus den genannten Gründen konnte bei dieser Reaktionsführung mit ¹²C-Inosin nur eine Ausbeute von 34% erzielt werden und daher auf eine Umkristallisation zugunsten einer säulenchromatographischen Trennung verzichtet.



Schema 13: Die Syntheseroute nach Beigelmann et al. liefert keine ausreichende Ausbeute des Phosphoramidit-Bausteins. Aufgrund mangelnder Selektivität für die 2'-Silylierung und der Isomerisierung bei der Aufarbeitung ist diese Route ungeeignet.

Der notwendige Einsatz einer Base bei der Umsetzung von **63** kann die Bildung des 3'-silylierten Nebenprodukts durch basenkatalysierte Isomerisierung (Schema 14) begünstigen, welches sich säulenchromatographisch zunächst nicht vollständig entfernen ließ. Dabei ist das Hauptprodukt der Umsetzung mit TBSCl das gewünschte 2'-Produkt, wie aus dünnsschichtchromatographischer Analyse ermittelt werden konnte. Mit einem ternären Laufmittelgemisch (*i*-Hexan/CH₂Cl₂/Aceton) unter zusätzlicher Zugabe von Triethylamin konnte eine vollständige Trennung der beiden entstandenen Spezies erzielt werden. Dabei ist das Verhältnis der Regioisomeren bei 2'/3' = 62/38.

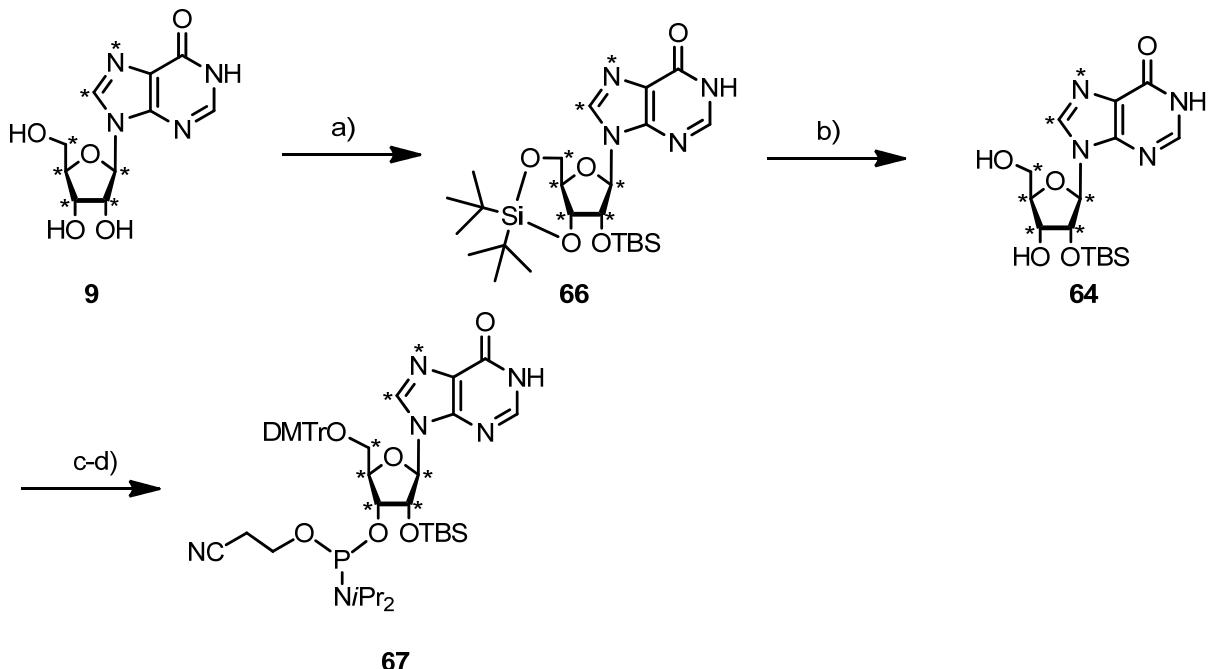
In der präparativen Durchführung stellte sich allerdings eine weitere Nebenreaktion ein, bei welcher das gereinigte Produkt unter Wanderung der Silylgruppe isomerisiert wie in Schema 14 zu sehen.



Schema 14: Die basenkatalysierte Isomerisierung des Silylierungsprodukts 64 findet in der Reaktionslösung als auch bei der Entfernung des Säulenchromatographie-Lösungsmittels nach der Isomerentrennung statt.

Zu Ungunsten der Produktreinheit tritt dieser Effekt insbesondere bei der Entfernung des organischen Lösungsmittelgemischs nach der Säulenchromatographie auf. Die bei der Säulenchromatographie zugesetzte Aminbase verhindert die saure Hydrolyse der labilen DMT-Schutzgruppe an der 5'-Position des Zuckers während des Kontakts mit dem Kieselgel. Die Anwesenheit der Base im Laufmittelgemisch hat zur Folge, dass aus dem isolierten, reinen Produkt wieder das unerwünschte Nebenprodukt regeneriert wird, da beim Eindampfen auch die Base Triethylamin angereichert wird. Mit dieser Syntheseroute konnte daher keine ausreichenden Mengen des reinen Ziellmaterials hergestellt werden.

Um die beschriebenen Nachteile zu umgehen wurde schließlich eine alternative Schutzgruppenstrategie etabliert. Hierbei wird unter Verwendung von Di-*tert*-Butylsilylditriflat eine selektive Reaktion an der 3'- und 5'-Hydroxylgruppe und nach Einführung der 2'-TBS Schutzgruppe deren Freisetzung unter milden Bedingungen ermöglicht (Schema 15).



Schema 15: Verbesserte Synthese des Inosin Phosphoramidits.

a) 1. $^t\text{Bu}_2\text{Si}(\text{OTf})_2$, Imidazol, 2. TBSCl, DMF, 88%; b) HF-Pyridin, 76%, c) DMTrCl, Pyridin, 65% (Verbindung 82 ohne Abbildung); d) CEDCl, DIPEA, CH_2Cl_2 , 97%.

Die Schützung des 2'-Hydroxyfunktion erfolgte durch Zugabe von TBSCl zur Reaktionslösung. Man erhielt die Verbindung 66 ohne weitere Aufreinigung in guter Ausbeute über zwei Schritte.

Im nächsten Schritt wurden die C5'-, C3'- Alkohole durch Entschützung mit HF·Pyridin bei 0°C freigesetzt. Die anschließende Einführung der DMT-Gruppe erfolgt wieder mit Pyridin als Lösungsmittel, jedoch wird bei der Evaporation des Lösungsmittels die Temperaturzufuhr bei 23 °C im Wasserbad gering gehalten.

Bei der säulenchromatographischen Aufreinigung wurden 3% der unerwünschten 3'-TBS Verbindung isoliert allerdings wurde bei diesem Reinigungsschritt auf Zugabe einer Base zum Laufmittelgemisch verzichtet und die Kontaktzeit des Materials mit dem schwach sauren Silica-Material gering gehalten. Dies ermöglichte die Isolierung der gewünschten Verbindung 82 (ohne Abbildung) in 65% Ausbeute. Die Umsetzung zur RNA-Festphasen kompatiblen Phosphor(III)-Verbindung 67 erfolgte mit CEDCl und DIPEA, wobei das Produkt im Gemisch mit DIPEA erhalten wurde. Das Material wurde ohne weitere Aufreinigung in das RNA 21mer eingebaut. Zunächst wurden allerdings die Bedingungen für die RNA-Festphasensynthese unter Verwendung von Inosin mit natürlicher Isotopenverteilung optimiert. Das entsprechende Phosphoramidit ist in einer 4-stufigen Synthese ausgehend von kommerziell erhältlichem Inosin hergestellt. Dabei wurden die Reaktionsbedingungen wie in Schema 15 dargestellt gewählt.

Es wurden ein Sense- und der entsprechende Antisense-Strang mit den folgenden Sequenzen hergestellt, wobei **I** das $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -markierte Inosin repräsentiert. Der blau hinterlegte Bereich ist für die Protein-Interaktion relevant, da hier Adenosin gegen Inosin ausgetauscht ist.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20		
Sense	5'-	A	C	U	G	G	A	C	A	I	I	U	I	C	U	C	C	G	A	G	G	-3'
Antisense	3'-	U	G	A	C	C	U	G	U	U	I	U	G	A	G	G	C	U	C	C	-5'	
	40	39	38	37	36	35	34	33	32	31	30	29	28	27	26	25	24	23	22	21		

Abbildung 39: Durch Festphasensynthese hergestellte RNA Sequenzen. Blau hinterlegt ist das, für die Proteinwechselwirkung relevante Motiv.

Details der Festphasensynthese werden im Experimentalteil der Arbeit beschrieben. Hierbei wurden TBDMS-RNA-Bausteine verwendet und das selbst synthetisierte Monomer mit verdoppelter Reaktionsdauer im Vergleich zu den Standardbausteinen in das Oligomer eingebaut. Die Aufarbeitung des synthetischen RNA-Strangs erfolgte unter Standardbedingungen wobei das gewünschte Produkt mittels *Reversed Phase* HPLC isoliert wurde.

Für die geplante NMR-Studie wurden jeweils 200 nmol der RNA Einzelstränge benötigt um die Messzeiten an den Spektrometern möglichst in einem praktikablen Rahmen zu halten. Das *Annealing* zur Herstellung der doppelsträngigen siRNA sowie die NMR-Experimente wurden am Lehrstuhl für biomolekulare NMR-Spektroskopie der Technischen Universität München im Arbeitskreis von Prof. Michael Sattler durchgeführt.

Die mehrdimensionale NMR-Spektroskopie und eine geeignete Kombination verschiedener abstandsabhängiger NMR-Methoden wie $^1\text{H}-^1\text{H}$ NOESY und $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ NOESY-HSQC ermöglicht hochaufgelöste Strukturaufklärung an biologischen Makromolekülen. Dabei werden hier intra- und inter-Strang Resonanzen betrachtet um die Molekülgeometrie zu bestimmen. Das experimentelle Vorgehen bei der Auswahl der Pulssequenzen und NMR-Parameter wird in dieser Arbeit nicht beleuchtet. Dennoch werden die Ergebnisse der Untersuchungen hier zusammengefasst.

Die spektrometrische Analyse der Doppelstrang-Geometrie zeigt für die Bereiche, welche das Inosin-Motiv flankieren eine RNA-typische A-Konformation.

Innerhalb der vier Basen langen Inosin-haltigen Sequenz gestaltete sich die Detailanalyse der Geometrie zunächst schwierig, da eine Überlagerung der Signale eine eindeutige Zuordnung kompliziert. Dies betrifft insbesondere die beiden benachbarten Inosin-Basen im Sense-Strang. Dennoch ermöglicht die Kombination verschiedener NMR-Methoden eine Verzerrung der A-Konformation in diesem Bereich zu belegen. Dies konnte aufgrund der abweichenden Abstände der gegenüberliegenden Basen gezeigt werden. Die Zuordnung der Signale konnte letztlich nur mit Hilfe der Isotopenlabels eindeutig durchgeführt werden, da die Überlappung der Ribose- als auch der Aromaten-Signale in ungelabelter RNA die Zuordnung der Kreuzkopplungs-Signale unmöglich macht. Der Beweis der Verzerrung der siRNA A-Konformation im Bereich des editierten Inosin-Motivs bestätigt die Hypothese, dass die enzymatische Erkennung des Inosin-Duplex durch den RISC-Cofaktor p100 aufgrund einer Abweichung von der idealen A-Form stattfindet.¹⁴⁵

Die Untersuchung der Protein-RNA Interaktion und der zugrunde liegenden strukturellen Eigenschaften der RNA ist zu diesem Zeitpunkt noch nicht abgeschlossen und wird im Arbeitskreis von Prof. Sattler an der TU München weiter verfolgt.

6 Experimenteller Teil

6.1 Allgemeine Arbeitstechniken und Geräte

Für Arbeiten mit luft- und wasserempfindlichen Substanzen wurde die Schlenk-Technik angewendet. Dabei wurden die Reaktionen in Glasapparaturen durchgeführt, die zuvor im Ölpumpenvakuum mehrfach mit einem Heißluftföhn ausgeheizt wurden und mit über CuSO₄ vorgetrocknetem Stickstoff gefüllt wurden. Die Reaktionsgefäße wurden bei Reaktionszeiten um 16 h mit einem Überdruckventil verschlossen, bei kürzeren Reaktionen wurde ein Gummiseptum in Kombination mit N₂-gefülltem Luftballon zum Druckausgleich verwendet. Die zum Transfer von Lösungen und Reagenzien verwendeten Kanülen und Spritzen wurden zuvor mehrfach mit N₂ gespült.

Lösungsmittel für die Säulen- und Dünnschichtchromatographie sowie den Einsatz in feuchtigkeitsunempfindlichen Reaktionen wurden im Membranpumpenvakuum am Rotationsverdampfer destilliert. Trockene Lösungsmittel für den Einsatz bei feuchtigkeitsempfindlichen Reaktionen wurden von den Firmen Acros und Fluka mit einem Wassergehalt < 50 ppm bezogen. Die verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Acros, Fluka, Sigma oder Merck in den erhältlichen Qualitäten (*puriss.*, *p.a.*, *purum*) bezogen.

Säulenchromatographie

Säulenchromatographie (auch Flash-Chromatographie) wurde unter der Verwendung von Kieselgel 60 (Korngröße 0.040-0.063 mm) der Firma Merck durchgeführt. Die Elution erfolgte bei RT unter Stickstoff-Überdruck. Die Angabe der eingesetzten Lösungsmittelverhältnisse erfolgt in Volumenprozent.

Dünnschichtchromatographie

Dünnschichtchromatographie wurde auf Aluminium-Fertigplatten der Firma Merck (Kieselgel 60, F₂₅₄) ausgeführt. Die Substanzen wurden durch Bestrahlung mit UV-Licht ($\lambda = 254$ nm bzw. $\lambda = 366$ nm) oder durch Anfärben mit CAM-Lösung (800 ml 10%ige Schwefelsäure, 120 g (NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 24 H₂O und 5 g (NH₄)₂Ce(NO₃)₆) mit anschließender Wärmebehandlung qualitativ nachgewiesen.

Kernresonanzspektroskopie

Die Spektren wurden mit den Geräten *Varian Mercury 200*, *Varian INOVA 400*, *Varian VNMRS 300* und *Varian VNMRS 600* aufgenommen. Die Spektren wurden am *Varian Mercury 200* selbstständig und bei den höherfrequenten Spektrometern durch die NMR-Service Abteilung des Departments Chemie und Biochemie, Ludwig-Maximilian-Universität München aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen sind als δ -Werte in ppm, bezogen auf Tetramethylsilan gegen den

Restprotonengehalt des verwendeten deuterierten Lösungsmittels, bzw. dessen Kohlenstoffatome angegeben. Zur Beschreibung der Signalmultiplizitäten werden die Abkürzungen s (Singulett), d (Dublett), t (Triplet), q (Quartett), m (Multiplett), b (breit), virt. (virtuell) sowie deren Kombinationen. Die Beschreibung der Zuordnung der Signale erfolgt durch Angabe der umgebenden Kerne beziehungsweise durch Nummerierung. Die Kopplungskonstanten zu Heteroatomen (¹⁹F) sowie zu Isotopen (¹³C) werden zusammen mit der Protonenkopplungen aufgelistet. Bei überlagerten Multipletts werden die Heterokopplungen, wenn möglich, explizit angegeben.

Massenspektrometrie

Elektronentoßionisations-Massenspektren (EI) wurden an den Geräten Finnigan *MAT95Q* (Sektorfeld-Quadrupol-Hybrid) oder *Finnigan MAT90* (Sektorfeld) aufgenommen. Die Ionisierung erfolgt mit 70 keV Elektronenenergie. Elektrospray-Ionisation-Massenspektren (ESI) werden an einem *Thermo Finnigan LTQ-FT* aufgenommen. Massenspektren mit matrixunterstützter Laserdesorptions-Ionisation (MALDI) wurden an einem *Bruker Autoflex II* Gerät in Kombination mit einem *MTP AnchorChip var/384* aufgenommen (Beschleunigungsspannung 20 kV). Die Proben wurden vor der Messung mittels *MF-Millipore Membranfilter* und ddH₂O entsalzt.

Als Matrix wurde 3-Hydroxypicolinsäure (50 mg), 15-Krone-5 (10 µl), Ammoniumhydrogencitrat (10 mg) in 500 µL ddH₂O and 500 µL MeCN verwendet.

MS/MS-Spektren wurden an einem *LTQ Orbitrap XL* Massenspektrometer der Firma *Thermo Scientific* aufgenommen und die Sequenzsuche mit *Xcalibur*-Software durchgeführt. Die weitere Prozessierung der Daten erfolgte mit *BioworksBrowser*-Software.

RNA-Festphasensynthese

Die Oligonukleotidsynthese wurde an einem ABI 394 Synthesizer (*Applied Biosystems*) durchgeführt, wobei die typischen Reagentienkonzentrationen eingehalten wurden:

Aktivator: 0.10 M Activator 42° in MeCN

Detrylierung: 3 Vol% Dichloressigsäure in CH₂Cl₂

Oxidation: 25 mM I₂ in MeCN/H₂O/2,6-Lutidin (11/5/1 %v/v/v)

Capping-Reagenz A: Ac₂O/2,6-Lutidin/MeCN (20/30/50 %v/v/v)

Capping-Reagenz B: 20% N-Methylimidazol in MeCN.

Die Synthesen wurden im 1000 nmol Maßstab mit Polystyrol-Trägern von *Link Technologies* und 0.1 M RNA TBS-Phosphoramiditen, A (Bz-A), C (Bz-C), G (dmf-G), U, ebenfalls von *Link Technologies* durchgeführt. In den erforderlichen Lösungen wurde MeCN mit einem Wassergehalt <10 ppm verwendet. Das [¹³C₅¹⁵N]-Inosin Phosphoramidit wurde gemäß unten stehender Vorschrift hergestellt und unter Annahme von 80% Reaktionsausbeute als 0.1 M Lösung eingesetzt. Die Kopplungszeit für die Modifikation wurde auf 20 min erhöht um die Effizienz des Einbaus zu maximieren.

Die Stränge wurden mit 1 mL Ammoniumhydroxid (28%)/Methylamin (40%) (1/1 v/v) für 10 min bei 60 °C behandelt um den Träger und die permanenten Schutzgruppen abzuspalten. Die Probe wurde

zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde mit 0.25 mL ddH₂O gewaschen und die vereinigten Lösungsmittel an der Vakuumzentrifuge zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wurde in 115 µL DMSO, 60 µL Triethylamin und 75 µL HF-Triethylamin aufgenommen und für 1.5 h bei 65 °C inkubiert. Anschließend wurde die RNA durch Zugabe von 25 µL NaOAc (3 M) und 1 mL n-Butanol für 1 h bei -80 °C gefällt. Die Probe wurde erneut zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet zwei Mal mit 0.25 mL 80% Ethanol gewaschen.

Die Analyse und Aufreinigung der Stränge wurde mittels *Reversed Phase* HPLC durchgeführt. Die Qualität der Stränge wurde mittels MALDI-MS bestimmt.

DNA-Festphasensynthese

Sofern nicht anders angegeben wurden die DNA-Festphasensynthesen am ABI 394 Synthesizer (*Applied Biosystems*) durchgeführt. Die Standard-Reagenzien und Konzentrationen sind folgend aufgelistet.

Aktivator: 0.25 M BTT in MeCN

Detritylierung: 3 Vol% Dichloressigsäure in CH₂Cl₂

Oxidation: 25 mM I₂ in MeCN/H₂O/2,6-Lutidin (11/5/1 %v/v/v)

Capping-Reagenz A: Ac₂O/2,6-Lutidin/MeCN (20/30/50 %v/v/v)

Capping-Reagenz B: 20% N-Methylimidazol in MeCN.

Die Synthesen wurden im 200 nmol Maßstab mit Polystyrol-Trägern von *Link Technologies* und 0.1 M DNA-Phosphoramiditen, dA (Bz-dA), dC (Bz-C), dG (ibu-dG), dT, von *Glen Research* durchgeführt. In den erforderlichen Lösungen wurde MeCN mit einem Wassergehalt <10 ppm verwendet. Die Kopplungszeit für die Modifikation wurde auf 5 min erhöht um die Effizienz des Einbaus zu maximieren. Die synthetisierten Stränge wurden mit 0.4 M NaOH in MeOH/H₂O (4/1 v/v) für 18h bei RT vom Träger abgespalten. Die Lösung wurde filtriert, und der Träger mit 600 µL 1 M Triethylammoniumacetat-Lösung gewaschen und ebenfalls filtriert. Die vereinigten Filtrate werden in der SpeedVac auf ca. 30% des Ausgangsvolumens reduziert und im Anschluss analysiert.

"DMT-on" Synthesen wurden zur Trockene eingedampft und mit 100 mL 80% Essigsäure aufgenommen. Der Ansatz wurde für 20 min bei RT geschüttelt und die DNA durch Zugabe von 60 µL 3 M NaOAc sowie 1600 µL EtOH ausgefällt. Die Fällung wurde mindestens 60 min bei -20 °C gelagert und die DNA anschließend durch Zentrifugation vom Überstand abgetrennt.

Die Analyse und Aufreinigung der Stränge wurde mittels *Reversed Phase* HPLC durchgeführt. Die Qualität der Stränge wurde mittels MALDI-MS bestimmt.

HPL-Chromatographie der synthetisierten Oligonukleotide

Verwendet wurde ein *Waters* HPLC-System (Waters Alliance 2695 mit PDA 2996, Präparative HPLC: 1525EF mit 2482 UV Detektor) und VP 250/10 Nucleosil 100-7 C 18 Säulen des Herstellers *Macherey Nagel*. Dabei wurde ein Gradient aus 0.1 M Triethylammoniumacetat jeweils in Wasser und 80% MeCN eingesetzt.

Die präparativen Trennungen wurden auf folgenden *Reversed Phase* Säulen durchgeführt: *CC 250/10 Nucleosil 100-7 C18* oder *CC 250/10 Nucleodur 100-7 C18* (Firma *Macherey-Nagel*). Für die analytischen HPLC Trennungen wurden die Säulen *CC 250/4 Nucleosil 4 120-3 C18* und *CC 250/4 Nucleodur 4 120-3 C18* eingesetzt.

DNA Konzentrationsbestimmung

Die Extinktionskoeffizienten der synthetischen DNA wurden mit dem Spektrometer NanoDrop ND-1000 (Firma *peqlab*) bei 260 nm bestimmt und daraus die Konzentration mit Hilfe frei zugänglicher Programme berechnet. (Verwendete Extinktionskoeffizienten: dA: 15 L/mmol·cm, dC: 7 L/mmol·cm, dG: 12 L/mmol·cm und dT: 8.4 L/mmol·cm)

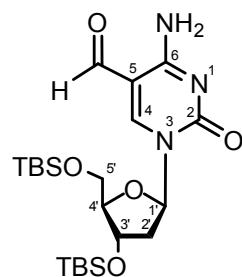
Kommerziell erhältliche Oligonukleotide

Soweit nicht selbst hergestellt wurden die verwendeten Oligonukleotide von den Firmen *Metabion GmbH* und *Ella Biotech GmbH* (in HPLC-gereinigter Qualität) bezogen.

6.2 Synthesevorschriften

6.2.1. Synthese der caC- und fC-Phosphoramidite

5-Formyl-(3',5'-di-O-*tert*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxycytidin (26)



In einem Hochdruckautoklaven wurde 5-Iodo-2'-desoxycytidin (3.50 g, 6.02 mmol, 1.0 Äq.) zusammen mit Triphenylphosphin (0.95 g, 3.71 mmol, 0.6 Äq.) und $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (0.55 g, 0.60 mmol, 0.1 Äq.) in 90 mL tr. Toluol vorgelegt. Das Reaktionsgefäß wurde zweimal mit Kohlenstoffmonoxid gespült und auf einen konstanten Gasdruck von 3.0 bar eingestellt. Anschließend wurde Bu_3SnH (2.10 g, 2.05 mL, 7.22 mmol, 1.2 Äq.) mit einer Flussrate von 0.30 mL/h bei einer Temperatur von 60 °C zugetropft. Nach Abschluss der Bu_3SnH Zugabe wurde für weitere 14 h bei 60 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde, nach dem Belüften des Reaktionsgefäßes, *in vacuo* entfernt. Das Produkt wurde anschließend mittels Säulenchromatographie über Silicagel gereinigt (Isohexan/EtOAc = 4/1 → 1/1). Man erhielt Verbindung **26** (2.84 g, 5.88 mmol, 98%) als roten Feststoff.

¹H-NMR (599 MHz, CDCl_3 , ppm) δ = 9.46 (s, 1 H, HC=O), 8.51 (s, 1 H, H4), 8.16 (s, 1 H, NH₂), 6.89 (s, 1 H, NH₂), 6.19 (t, J = 6.2 Hz, 1 H, H1'), 4.33 (dt, J = 6.2 Hz, J = 3.7 Hz, 1 H, H3'), 4.03 (dd, J = 6.0 Hz, J = 2.6 Hz, 1 H, H4'), 3.93 (dd, J = 11.6 Hz, J = 2.6 Hz, 1 H, H5'_α), 3.76 (dd, J = 11.6 Hz, J = 2.5, 1 H, H5'_β), 2.59 (ddd, J = 13.5 Hz, J = 6.2 Hz, J = 3.9 Hz, 1 H, H2'_α), 2.12-1.99 (m, 1 H, H2'_β), 0.89 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 0.88 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 0.09 (s, 3 H, CH₃), 0.08 (s, 3 H, CH₃), 0.07 (s, 3 H, CH₃), 0.06 (s, 3 H, CH₃).

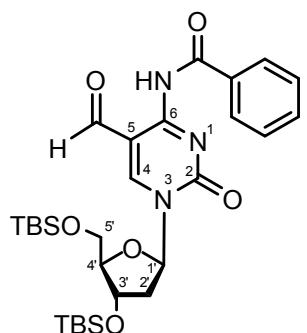
¹³C-NMR (151 MHz, CDCl_3 , ppm): δ = 187.1 (HC=O), 162.7 (C6), 153.2 (C2), 152.9 (C4), 104.8 (C5), 88.7 (C4'), 87.7 (C1'), 71.6 (C3'), 62.5 (C5'), 42.8 (C2'), 25.9 (3 C, C(CH₃)₃), 25.7 (3 C, C(CH₃)₃), 18.4 (SiC(CH₃)₃), 17.9 (SiC(CH₃)₃), -4.6 (CH₃), -4.9 (CH₃), -5.3 (CH₃), -5.4 (CH₃).

HRMS (ESI+): berechnet für $\text{C}_{22}\text{H}_{42}\text{N}_3\text{O}_5\text{Si}_2^+$ [M+H]⁺: 484.2658, gefunden: 484.2654.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3405 (w), 3362 (w), 2949 (w), 2927 (w), 2856 (w), 1671 (m), 1650 (s), 1501 (w), 1461 (w), 1326 (w), 1243 (m), 1083 (m), 1056 (m), 837 (s), 775 (s).

Schmelzbereich: 153-154 °C.

5-Formyl-(3',5'-di-O-tert-butylidemethylsilyl)-4-N-benzoyl-2'-desoxycytidin (29b)



In einem ausgeheizten Rundkolben wurden **26** (0.93 g, 1.93 mmol, 1.0 Äq.) in 30 mL tr. Pyridin bei 0 °C vorgelegt. Die Reaktionslösung wurde tropfenweise mit Benzoylchlorid (1.45 g, 1.20 mL, 10.3 mmol, 5.3 Äq.) versetzt und für 0.5 h bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde für weitere 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Eis gestoppt und das Produkt mit 2 × 200 mL EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 300 mL ges. NaHCO₃ Lösung und 300 mL gesättigter NH₄Cl Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde schließlich über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Das Produkt wurde mittels Säulenchromatographie (Isohexan/EtOAc = 10/1 → 1/1) gereinigt. Man erhielt die Verbindung **29** (320 mg, 0.54 mmol, 28%) als klares Öl.

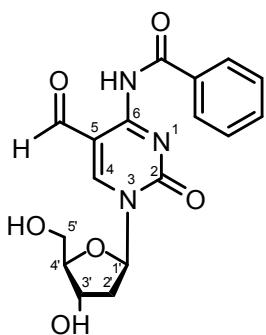
¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃, ppm): δ = 9.51 (s, 1 H, HC=O), 8.75 (s, 1 H, H4), 8.05-7.95 (m, 2 H, Ar), 7.56-7.45 (m, 2 H, Ar), 7.44-7.30 (m, 1 H, Ar), 6.18 (d, J = 5.5 Hz, 1 H, H1'), 4.34 (d, J = 5.6 Hz, 1 H, H3'), 4.07 (dd, J = 6.0 Hz, 2.7 Hz, 1 H, H4'), 4.00-3.96 (m, 1 H, H5'_α), 3.77 (dd, J = 11.6 Hz, 2.6 Hz, 1 H, H5'_β), 2.71-2.59 (m, 1 H, H2'_α), 2.21-2.06 (m, 1 H, H5'_β), 0.85 (s, 18 H, 2 × C(CH₃)₃), 0.08 (s, 3 H, CH₃), 0.06 (s, 6 H, 2 × CH₃), 0.04 (s, 3 H, CH₃).

¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃, ppm): δ = 187.9 (HC=O), 163.0 (C6), 159.7 (C=OPh), 154.14 (C4), 152.6 (C2), 133.7 (C-Ar), 133.0 (CH-Ar), 130.0 (2 C, CH-Ar), 128.0 (2 C, CH-Ar), 105.5 (C5), 89.0 (C4'), 88.6 (C1'), 71.4 (C3'), 62.5 (C5'), 42.6 (C2'), 25.9 (3 C, C(CH₃)₃), 25.7 (3 C, C(CH₃)₃), 18.4 (SiC(CH₃)₃), 18.0 (SiC(CH₃)₃), -4.6 (CH₃), -4.9 (CH₃), -5.3 (CH₃), -5.4 (CH₃).

HRMS (ESI+): berechnet für C₂₉H₄₆N₃O₆Si₂⁺ [M+H][†]: 588.2920, gefunden: 588.2915.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 2954 (w), 2929 (w), 2885 (w), 2856 (w), 1718 (m), 1692 (m), 1658 (s), 1567 (s), 1471 (s), 1250 (s), 1080 (s), 829 (s), 776 (s).

5-Formyl-4-N-benzoyl-2'-desoxycytidin (69)



In einem Polypropylengefäß wurde Verbindung **29** (600 mg, 1.02 mmol, 1.0 Äq.) in EtOAc vorgelegt und mit tr. Pyridin (0.40 mL, 5.00 mmol, 4.9 Äq.) versetzt. Unter starkem Rühren wurde eine 70% HF·Pyridin-Lösung (0.39 mL, 15.0 mmol, 14.7 Äq.) zugetropft und die Reaktionslösung für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 16 mL Methoxytrimethylsilan gestoppt und das ausgefallene Produkt mittels Zentrifugation abgetrennt. Das Produkt wurde nochmals in EtOAc aufgenommen und erneut durch Zentrifugation abgetrennt. Man erhielt Verbindung **69** (215 mg, 0.60 mmol, 59%) als gelblichen Feststoff.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO, ppm): $\delta = 11.7$ (bs, 1 H, NH), 9.54 (s, 1 H, HC=O), 9.12 (s, 1 H, H4), 7.92 (d, $J = 7.4$ Hz, 2 H, Ar), 7.65 (d, $J = 7.0$ Hz, 1 H, Ar), 7.58 (t, $J = 7.1$ Hz, 2 H, Ar), 6.04 (t, $J = 5.9$, 1 H, H1'), 5.27 (bs, 1 H, OH), 5.13 (bs, 1 H, OH), 4.22 (d, $J = 4.8$ Hz, 1 H, H3'), 3.91 (d, $J = 3.7$ Hz, 1 H, H4'), 3.68 (d, $J = 11.4$ Hz, 1 H, H5' $_{\alpha}$), 3.59 (d, $J = 12.1$ Hz, 1 H, H5' $_{\beta}$), 2.39-2.37 (m, 1 H, H2' $_{\alpha}$), 2.18-2.14 (m, 1 H, H2' $_{\beta}$).

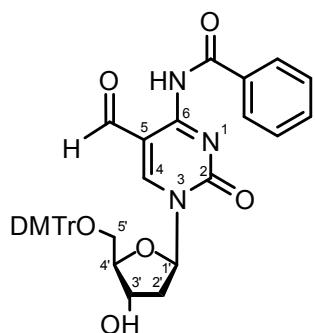
¹³C-NMR (100MHz, DMSO, ppm): $\delta = 189.7$ (HC=O), 164.2 (C6), 159.8(C=OPh), 155.0 (C4), 153.0 (C2), 133.7 (C-Ar), 133.5 (CH-Ar), 129.5 (2 C, CH-Ar), 128.0 (2 C, CH-Ar), 106.4 (C5), 89.0 (C4'), 88.0 (C1'), 69.6 (C3'), 60.8 (C5'), 41.2 (C2').

HRMS (ESI $^-$): berechnet für $C_{17}H_{16}N_3O_6^-$ [M-H] $^-$: 358.1045, gefunden: 358.1041.

IR (ATR) $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3477 (br, m), 3306 (br, m), 2988 (w), 2931 (w), 2906 (w), 2851 (w), 1721 (s), 1650 (s), 1570 (s), 1473 (s), 1251 (s), 1238 (s), 1092 (s), 795 (m).

Schmelzbereich: >200 °C Zersetzung.

5'-O-dimethoxytrityl-5-formyl-4-N-benzoyl-2'-desoxycytidin (70)



In einem Rundkolben wurden Verbindung **69** (200 mg, 0.56 mmol, 1.0 Äq.) und 3 Å Molsieb in 6 mL tr. Pyridin vorgelegt. Anschließend wurden DMT-Cl (210 mg, 0.62 mmol, 1.1 Äq.) zugegeben und die klare Lösung für 48 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Molsieb wurde filtriert und die Lösung *in vacuo* bis zur Trockne eingeengt. Das Produkt wurde mittels Säulenchromatographie gereinigt ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NEt}_3 = 50/1/0.05$). Man erhielt die Zielverbindung **70** (140 mg, 0.21 mmol, 38%) als farblosen Feststoff.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl_3 , ppm): $\delta = 8.63$ (s, 1 H, H4), 8.53 (s, 1 H, HC=O), 7.96-7.94 (m, 2 H, Ar), 7.56 (t, $J = 7.4$ Hz, 1 H, Ar), 7.49-7.44 (m, 2 H, Ar), 7.42-7.36 (m, 4 H, Ar_{DMTr}), 7.30-7.22 (m, 5 H, Ar_{DMTr}), 6.80 (dd, $J = 8.9$ Hz, 3.4 Hz, 4 H, Ar_{DMTr}), 6.24 (t, $J = 5.7$ Hz, 1 H, H1'), 4.47-4.55 (m 1 H, H3'), 4.26-4.16 (m, 1 H, H4'), 3.74 (s, 6 H, 2 \times OCH₃), 3.58-3.35 (m, 2 H, H5'), 2.76-2.59 (m, 1 H, H2'_α), 2.48-2.31 (m, 1 H, H2'_β).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl_3 , ppm): $\delta = 187.8$ (HC=O), 169.6 (C6), 159.6 (C=OPh), 158.9 (2 C, DMTr-C), 153.6 (C4), 152.9 (C2), 144.6 (C-Ar), 140.9 (2 C, C-Ar), 136.4 (2 C, C-Ar), 133.5 (C-Ar), 133.3 (C-Ar), 133.1 (C-Ar), 130.1 (4 C, C-Ar), 128.4 (2 C, C-Ar), 128.2 (2 C, C-Ar), 127.2 (2 C, C-Ar), 113.4 (4 C, C-Ar), 108.5 (C5), 90.2 (OC(C-Ar)₃), 87.3 (C1'), 86.6 (C4'), 70.3 (C3'), 62.4 (C5'), 55.2 (2 C, OCH₃), 42.2 (C2').

HRMS (ESI+): berechnet für $\text{C}_{38}\text{H}_{36}\text{N}_3\text{O}_8^+ [\text{M}+\text{H}]^+$: 662.2497, gefunden: 662.2492.

IR (ATR) $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹): 2934 (w), 1716 (m), 1650 (s), 1601 (m), 1565 (s), 1508 (m), 1470 (s), 1247 (s), 1174 (m), 1089 (m), 1068 (m), 1031 (m), 827 (m), 790 (m), 701 (s).

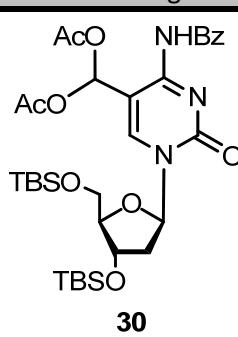
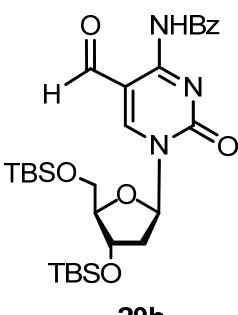
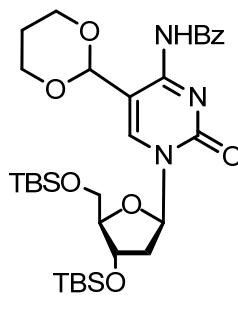
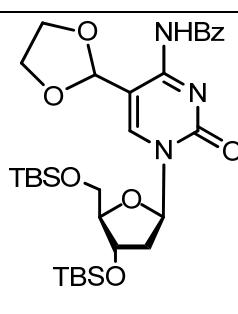
Schmelzbereich: 116-118 °C.

Einführung der Schutzgruppen am 5-Formylcytidin

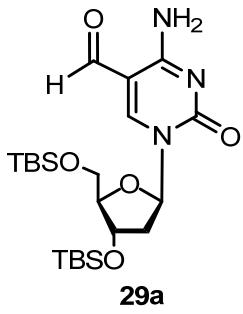
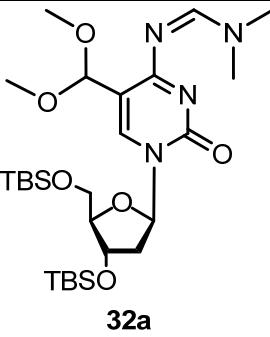
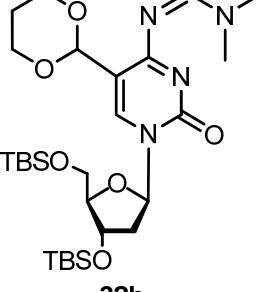
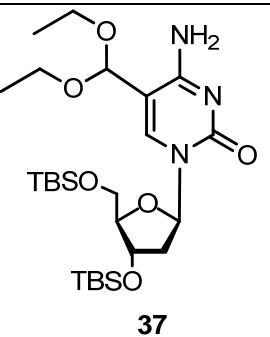
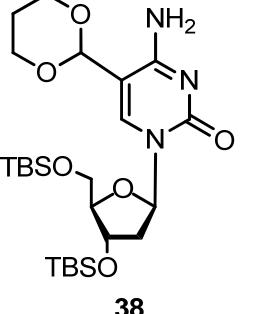
Allgemeine Arbeitsvorschrift:

Die Ausgangssubstanzen wurden in einem trockenen Kolben vorgelegt und unter Inertgasatmosphäre gerührt.

Typische Ansatzgröße: 30 mg (0.05 mmol) der Ausgangsverbindung in purem Reagentengemisch bzw. als 0.05-0.1 M Lösung. Nach wässriger Aufarbeitung wurde die organische Phase eingeengt und massenspektrometrisch (ESI) analysiert.

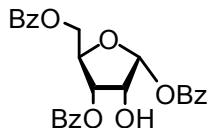
Ausgangsverbindung	Zielverbindung	Reagentien und Bedingungen	Ergebnis
	 30	Ac ₂ O, H ₂ SO ₄ (katalytisch), 3 h, RT Ac ₂ O, FeCl ₃ (katalytisch), 1 h, 0 °C Ac ₂ O, ZnCl ₂ (katalytisch), 1 h, 0 °C Ac ₂ O, I ₂ (katalytisch), 3 h, RT	Keine Produktbildung Keine Produktbildung Keine Produktbildung Keine Produktbildung
 29b	 36	Propandiol, Triethylorthoformiat, Tetrabutylammoniumbromid, 16 h, RT	Keine Produktbildung
	 35	Propandiol, Amberlite IR120, 72 h, RT, Benzol	Produktbildung (Spuren)
		Propandiol, CeCl ₃ (katalytisch), R	Produktbildung (Spuren)
		Propandiol, p-Toluolsulfonsäure, 14 h, Reflux, Benzol	Produktbildung (Spuren)
		Ethanol, p-Toluolsulfonsäure, 14 h, Reflux, Benzol	Produktbildung (Spuren)

Im Falle eines erfolgreichen massenspektrometrischen Nachweises der Produktbildung wurde versucht das Produkt säulenchromatographisch zu isolieren. Dabei wurden typischerweise Laufmittelgemische aus CH₂Cl₂ und Methanol (100/1 → 40/1) verwendet. Die isolierten Mengen konnten waren allerdings zu gering um NMR-spektroskopische Analysen durchzuführen.

Ausgangsverbindung	Zielverbindung	Reagentien und Bedingungen	Ergebnis
 29a	 32a	N,N-Dimethylformamid-dimethylacetal, Molsieb 3 Å, 16 h, 60 °C, Methanol	Produktbildung (Spuren)
		N,N-Dimethylformamid-diethylacetal, Molsieb 4 Å, MeOH, 36 h, RT	unvollständiger Umsatz
		2-N,N-Dimethylamino-1,3-dioxan, Aceton, 36 h	Produktbildung (Spuren)
	 32b	2-N,N-Dimethylamino-1,3-dioxan, <i>p</i> -Toluolsulfonsäure, Propandiol, Toluol, 70 °C, 16 h	Produkt wurde im Gemisch mit Edukt erhalten
		2-N,N-Dimethylamino-1,3-dioxan, <i>p</i> -Toluolsulfonsäure, Propandiol, Triethylorthoformiat, 60 °C, 72 h	Produkt wurde im Gemisch mit Edukt erhalten
	 37	CeCl ₃ , Triethylorthoformiat, EtOH, 48 h	unvollständiger Umsatz, Produkt isoliert
	 38	CeCl ₃ , Triethylorthoformiat, Propandiol, 48 h	unvollständiger Umsatz, Produkt isoliert

6.2.2. Synthese der 2'-Fluoro-dC-Derivate

1,3,5-Tri-O-benzoyl- α -L-ribofuranose (41)



1-O-Acetyl-2,3,5-tri-O-benzoyl- β -D-Ribofuranose (10.0 g, 19.8 mmol, 1.0 Äq.) wurde in 150 mL CH₂Cl₂ vorgelegt und HBr (33% in AcOH, 19.7 mL, 21.8 mmol, 1.1 Äq.) über einen Tropftrichter bei 0 °C zugegeben. Die Reaktionslösung wurde für 1 h bei 0 °C gerührt und im Anschluss 50 mL H₂O zugegeben und für weitere 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Gemisch wurde mit CH₂Cl₂ (2 × 150 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit NaHCO₃ (2 × 100 mL) gewaschen und neutralisiert. Nachdem man das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt hatte, wurde das Rohprodukt an Kieselgel adsorbiert und mittels Flash-Chromatographie gereinigt (Isohexan/EtOAc = 5/1 → 1/1). Das Produkt wurde als weißer Schaum isoliert (6.13 g, 13.3 mmol, 67%).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, ppm): δ = 8.11 (ddd, J = 14.0 Hz, 8.4 Hz, 1.3 Hz, 4 H, Ar), 8.04 (dd, J = 8.4 Hz, 1.3 Hz, 2 H, Ar), 7.66-7.57 (m, 3 H, Ar), 7.49-7.45 (m, 4 H, Ar), 7.42-7.38 (m, 2 H, Ar), 6.86 (d, J = 4.5 Hz, 1 H, H1), 5.59 (dd, J = 6.6 Hz, 1.9 Hz, 1 H, H3), 4.76-4.74 (m, 2 H, H2+H4), 4.65-4.64 (t, J = 3.2 Hz, 2 H, H5), 2.69 (bs, 1 H, OH)

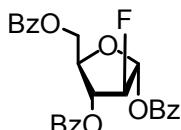
¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃, ppm): δ = 166.0 (C=O), 165.8 (C=O), 165.3 (C=O), 133.8 (CH-Ar), 133.6 (CH-Ar), 133.4 (CH-Ar), 129.9 (2 × CH-Ar), 129.8 (2 × CH-Ar), 129.6 (2 × CH-Ar), 129.5 (C-Ar), 129.4 (C-Ar), 129.1 (C-Ar), 128.6 (2 × CH-Ar), 128.5 (2 × CH-Ar), 128.4 (2 × CH-Ar), 95.8 (C1), 83.1 (C4), 72.2 (C3), 71.9 (C2), 64.1 (C5)

HRMS (ESI+): berechnet für C₂₆H₂₆O₈N⁺ [M+NH₄]⁺: 480.1653, gefunden: 480.1650.

IR (ATR): $\bar{\nu}$ (cm⁻¹) = 2916 (w), 2848 (w), 2550 (w), 1715 (m), 1684 (m), 1600 (m), 1583 (m), 1451 (m), 1429 (w), 1322 (m), 1266 (s), 1177 (m), 1108 (m), 1096 (m), 1025 (m), 933 (m), 803 (m).

Schmelzbereich: 129-132 °C.

2-Desoxy-2-fluoro-1,3,5-tri-O-benzoyl- α -D-arabinofuranose (42)



Das Ribofuranosid **41** (2.30 g, 4.98 mmol, 1.0 Äq.) wurde in 50 mL abs. CH₂Cl₂ vorgelegt und bei 0 °C DAST (1.60 g, 1.31 mL, 9.94 mmol, 2.0 Äq.) zugetropft. Es wurde für 16 h bei 40 °C gerührt und im Anschluss nochmals DAST (0.80 g, 0.65 mL, 4.98 mmol, 1.0 Äq.) zugetropft. Nach weiteren 5 h bei 40 °C wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und mit ges. 30 mL NaHCO₃-Lösung hydrolysiert. Die organische Phase wurde mit H₂O (2 × 50 mL) und abschließend nochmals mit 50 mL ges. NaHCO₃-

Lösung gewaschen. Nach dem Trocknen der organischen Phase über MgSO_4 und Filtration wurde das Lösungsmittel entfernt und das Rohprodukt schließlich mittels Säulenchromatographie (Isohexan/EtOAc = 20/1 → 4/1) gereinigt. Die Verbindung **42** wurde als schwach gelbes Öl isoliert (0.96 g, 2.07 mmol, 42%).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , ppm): δ = 8.11-8.04 (m, 6 H, Ar), 7.63-7.53 (m, 3 H, Ar), 7.48-7.38 (m, 6 H, Ar), 6.76 (d, J = 9.2 Hz, 1 H, H1), 5.63 (dd, J = 19.5 Hz, 3.1 Hz, 1 H, H3), 5.39 (d, J = 48.3 Hz, 1 H, H2), 4.80-4.71 (m, 3 H, H4+H5).

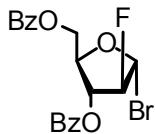
$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3 , ppm): δ = 166.2 (C=O), 165.4 (C=O), 164.5 (C=O), 133.9 (CH-Ar), 133.7 (CH-Ar), 133.2 (CH-Ar), 129.9 (2 × CH-Ar), 129.8 (4 × CH-Ar), 129.7 (C-Ar), 129.6 (C-Ar), 129.1 (C-Ar), 128.6 (2 × CH-Ar), 128.5 (2 × CH-Ar), 128.4 (2 × CH-Ar), 99.3 (d, J = 36.4 Hz, C1), 96.9 (d, J = 184.7 Hz, C2), 84.0 (C4), 76.7 (d, J = 30.8 Hz, C3), 63.5 (C5).

$^{19}\text{F NMR}$ (282 MHz, CDCl_3 , ppm): δ = -190.8 (ddd, J = 48.4 Hz, 19.5 Hz, 9.2 Hz).

HRMS (ESI+): berechnet für $\text{C}_{26}\text{H}_{21}\text{FO}_7\text{Na}^+$ [M+Na]⁺: 487.1163, gefunden: 487.1161.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3062 (w), 3039 (w), 1720 (s), 1707 (s), 1600 (m), 1449 (m), 1323 (m), 1273 (s), 1247 (s), 1177 (w), 1119 (m), 1108 (m), 1086 (s), 1068 (s), 1023 (m), 940 (s), 847 (m), 727 (m).

2-Desoxy-2-fluoro-3,5-tri-O-benzoyl- α -D-arabinofuranosylbromid (43)



Der Fluoro-Zucker **42** (960 mg, 2.07 mmol, 1.0 Äq.) wurde in 12 mL abs. CH_2Cl_2 aufgenommen und 30% HBr in AcOH (2.24 g, 1.60 mL, 8.28 mmol, 4.0 Äq.) bei 0 °C zugetropft. Die Lösung wurde für 20 h bei Raumtemperatur gerührt, anschließend mit 100 mL CH_2Cl_2 verdünnt und mit ges. NaHCO_3 -Lösung (2 × 100 mL) gewaschen. Nach dem Trocknen über MgSO_4 wurde vom Trockenmittel abfiltriert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Das erhaltene braune Öl (831 mg, 1.97 mmol, 95%) wurde ohne weitere Aufreinigung in der Folgereaktion eingesetzt.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3 , ppm): δ = 8.09 (dd, J = 26.5 Hz, 8.4 Hz, 4 H, Ar), 7.60 (t, J = 7.5 Hz, 2 H, Ar), 7.47 (dd, J = 35.2 Hz, 8.2 Hz, 4 H, Ar), 6.64 (d, J = 12.2 Hz, 1 H, H1), 5.60 (d, J = 50.0 Hz, 1 H, H2), 5.55 (ddd, J = 22.0 Hz, 4.0 Hz, 1.2 Hz, 1 H, H3), 4.83 (m, 1 H, H4), 4.80 (dd, J = 8.2 Hz, 3.8 Hz, 0.78 Hz), 4.78 (ddd, J = 61.2 Hz, 11.8 Hz, 4.1 Hz, 2 H, H5).

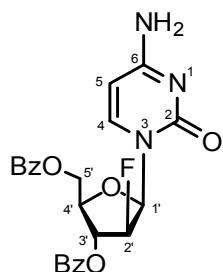
$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3 , ppm): δ = 166.0 (C=O), 165.5 (C=O), 133.9 (CH-Ar), 133.3 (CH-Ar), 130.0 (2 × CH-Ar), 129.8 (2 × CH-Ar), 129.4 (C-Ar), 128.7 (2 × CH-Ar), 128.5 (C-Ar), 128.4 (2 × CH-Ar), 100.6 (d, J = 191.6 Hz, C2), 87.6 (d, J = 31.7 Hz, C1), 84.7 (C4), 76.2 (d, J = 31.7, C3), 62.5 (C5).

$^{19}\text{F NMR}$ (282 MHz, CDCl_3 , ppm): δ = -166.0 (ddd, J = 50.1 Hz, 22.1 Hz, 12.2 Hz).

HRMS (ESI+): berechnet für $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{FO}_5^+$ [M-Br]⁺: 343.0976, gefunden: 343.0975.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3359 (w), 3192 (w), 1716 (s), 1664 (m), 1624 (m), 1476 (m), 1449 (m), 1263 (s), 1093 (s), 1067 (m), 1026 (m), 802 (w), 783 (w), 705 (s), 685 (m).

1-(2'-Desoxy-2'-fluoro-3',5'-di-O-benzoyl- β -D-arabinofuranosyl)cytidin (44)



Cytosin (1.69 g, 15.25 mmol, 1.2 Äq.) wurde in HMDS (15 mL) mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (20 mg, 0.15 mmol, 0.01 Äq.) bei 127 °C unter Argonatmosphäre am Rückfluss gekocht. Nach 2 h wurden die flüchtigen Reagenzien im Vakuum abdestilliert und der Rückstand zunächst mit abs. CH_2Cl_2 und dann mit MeCN (je 25 mL) koevaporiert. Der erhaltene weiße Feststoff wurde in 65 mL Dichlorethan aufgenommen und die Verbindung **43** (5.36 mg, 12.70 mmol, 1.0 Äq.) gelöst in 20 mL Dichlorethan zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 20 h unter Rückfluss bei 84 °C gekocht und nach dem Abkühlen mit NaHCO_3 (5 × 100 mL) gewaschen. Die wässrige Phase wurde dann mit CH_2Cl_2 extrahiert (3 × 80 mL) und die vereinigten organischen Phasen ein weiteres Mal mit 100 mL H_2O gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und nach Filtration am Rotationsverdampfer eingeengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Isohexan/EtOAc = 30/1 → 10/1) gereinigt und das erhaltene Produkt aus Methanol umkristallisiert. Es wurde Verbindung **44** (4.48 g, 9.89 mmol, 78%) als Gemisch der beiden Anomere im Verhältnis $\alpha/\beta = 1/5$ erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , ppm): $\delta = 8.06$ (dd, $J = 18.3$ Hz, 8.4 Hz, 4 H, Ar), 7.62 (dt, $J = 8.4$ Hz, 7.3 Hz, 2 H, Ar), 7.57 (d, $J = 7.4$ Hz, 1 H, H5), 7.46 (dd, $J = 22.0$ Hz, 7.5 Hz, 4 H, Ar), 6.40 (dd, $J = 22.0$ Hz, 2.6 Hz, 1 H, H1'), 5.73 (d, $J = 7.4$ Hz, 1 H, H4), 5.59 (dd, $J = 16.9$ Hz, 2.7 Hz, 1 H, H4'), 5.41 (dd, $J = 49.1$ Hz, 2.7 Hz, 1 H, H2'), 4.76 (d, $J = 4.5$ Hz, 2 H, H5'), 4.50 (td, $J = 4.4$ Hz, 2.9 Hz, 1 H, H3').

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3 , ppm): $\delta = 166.2$ (C=O), 165.8 (C=O), 165.2 (C6), 155.4 (C2), 142.1 (CH-Ar), 134.0 (CH-Ar), 133.3 (C5), 129.9 (2 × CH-Ar), 129.4 (C-Ar), 129.7 (2 × CH-Ar), 128.7 (2 × CH-Ar), 128.5 (2 × CH-Ar), 128.2 (C-Ar), 94.1 (C4), 92.2 (d, $J = 190.8$ Hz, C2'), 85.9 (d, $J = 16.9$ Hz, C1'), 81.3 (C3'), 76.9 (C4'), 63.5 (C5').

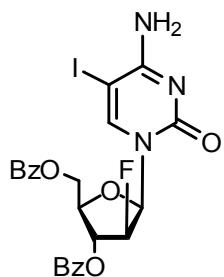
$^{19}\text{F NMR}$ (282 MHz, CDCl_3 , ppm): $\delta = -201.9$ (ddd, $J = 50.7$ Hz, 21.9 Hz, 17.2 Hz).

HRMS (ESI+): berechnet für $\text{C}_{23}\text{H}_{21}\text{FN}_3\text{O}_6^+$ [M+H]⁺: 454.1409, gefunden: 454.1406.

IR (ATR): $\bar{\nu}$ (cm^{-1}) = 2361 (w), 1717 (s), 1652 (m), 1472 (m), 1263 (s), 1175 (m), 1093 (s), 1068 (m), 1026 (m), 783 (m), 706 (s), 685 (m).

Schmelzbereich: 208–210 °C.

5-Iodo-1-(2'-desoxy-2'-fluoro-3',5'-di-O-benzoyl- β -D-arabinofuranosyl)cytidin (45)



Das Nukleosid **44** (200 mg, 0.44 mmol, 1.0 Äq.) wurde in tr. MeCN (10 mL) vorgelegt und nach Zugabe von Cer(IV)-Ammoniumnitrat (121 mg, 0.22 mmol, 0.5 Äq.) und Iod (56 mg, 0.22 mmol, 0.5 Äq.) für 20 h am Rückfluss gekocht. Während der Reaktion verblasste die anfänglich braune Lösung und das schwach braun gefärbte Reaktionsgemisch wurde am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} = 20/1$) und man erhielt einen gelben Feststoff **45** (225 mg, 0.39 mmol, 88%) als Gemisch $\alpha/\beta = 1/4.9$

$^1\text{H-NMR}$ (599 MHz, CDCl_3 , ppm): $\delta = 8.40$ (bs, 1 H, NH_2), 8.11 (dd, $J = 8.4$ Hz, 1.3 Hz, 2 H, Ar), 8.04 (dd, $J = 8.4$ Hz, 1.3 Hz, 2 H, Ar), 7.93 (d, $J = 1.6$ Hz, 1 H, H4), 7.59 (m, 2 H, Ar), 7.46 (m, 4 H, Ar), 6.36 (dd, $J = 21.5$ Hz, 2.7 Hz, 1 H, H1'), 5.67 (bs, 1 H, NH_2), 5.60 (dd, $J = 16.7$ Hz, 2.6 Hz, 1 H, H4'), 5.40 (dd, 1 H, $J = 49.8$ Hz, 2.7 Hz, 1 H, H2'), 4.80 (dd, $J = 4.2$ Hz, 1.7 Hz, 2 H, H5'), 4.52 (dd, $J = 4.2$ Hz, 1.3 Hz, 1 H, H3').

$^{13}\text{C-NMR}$ (111 MHz, CDCl_3 , ppm): $\delta = 166.2$ (C=O), 165.2 (C=O), 164.0 (C6), 154.3 (C2), 147.6 (C4), 134.1 (CH-Ar), 133.4 (CH-Ar), 129.9 (2 \times CH-Ar), 129.8 (2 \times CH-Ar), 129.4 (C-Ar), 128.7 (2 \times CH-Ar), 128.6 (2 \times CH-Ar), 128.5 (C-Ar), 92.0 (d, $J = 191$ Hz, C2'), 86.0 (d, $J = 16.7$ Hz, C1'), 81.8 (C3'), 76.9 (C4'), 63.2 (C5'), 56.5 (C5).

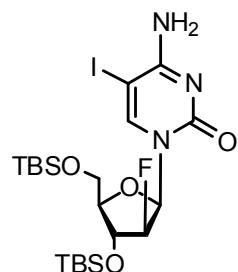
$^{19}\text{F-NMR}$ (282 MHz, CDCl_3 , ppm): $\delta = -201.5$ (ddd, $J = 50.0$ Hz, 21.4 Hz, 17.1 Hz).

HRMS (ESI+): berechnet für $\text{C}_{23}\text{H}_{20}\text{FIN}_3\text{O}_6^+$ [M+H] $^+$: 580.0375, gefunden: 580.0369.

IR (ATR): $\bar{\nu}$ (cm^{-1}) = 2060 (w), 1718 (m), 1623 (s), 1599 (m), 1584 (m), 1484 (m), 1450 (m), 1261 (s), 1179 (w), 1092 (s), 1067 (s), 1025 (m), 1025 (m), 802 (m), 773 (w), 709 (s), 684 (m).

Schmelzbereich: 117-119 °C.

5-Iodo-1-(2'-desoxy-2'-fluoro-3',5'-di-O-*tert*-butyldimethylsilyl-β-D-arabinofuranosyl)cytidin (46)



Die Verbindung **45** (4.30 g, 7.40 mmol, 1.0 Äq.) wurde in 100 mL 7 N Ammoniak in Methanol vorgelegt und für 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde anschließend im Vakuum entfernt und der Rückstand in DMF/Pyridin = 2/3 (50 mL) aufgenommen. Nach Zugabe von TBSCl (2.33 g, 15.54 mol, 2.1 Äq.) und Imidazol (2.52 g, 37.0 mmol, 5.0 Äq.) für 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde dann mit 50 mL Eiswasser versetzt um die Reaktion zu beenden. Anschließend wurde das Gemisch mit EtOAc (2 × 100 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phase mit NH₄Cl (100 mL) gewaschen und das Lösungsmittel schließlich *in vacuo* entfernt. Nach Säulenchromatographie (CH₂Cl₂/MeOH = 100/1 → 40/1) eines Teils (70%) des Rohprodukts wurde das silylierte Nukleosid **46** als klares Öl im Gemisch mit dem β-Anomer erhalten. Das Verhältnis der Anomere betrug α/β = 1/4.5. Die extrapolierte Ausbeute Betrug 3.81 g, 6.36 mmol, 86%. Tatsächlich wurden 2.65 g, 4.42 mmol, 60% aufgereinigt erhalten. Das übrige Rohprodukt (2.00 g) wurde ohne weitere Aufreinigung zur Carboxylverbindung **48** umgesetzt.

¹H-NMR (599 MHz, CDCl₃, ppm): δ = 8.70 (bs, 1 H, NH₂), 7.83 (d, J = 1.4 Hz, 1 H, H4), 6.18 (dd, J = 19.8 Hz, 3.2 Hz, 1 H, H1'), 5.62 (bs, 1 H, NH₂), 4.97 (ddd, J = 51.7 Hz, 3.2 Hz, 1.4 Hz, 1 H, H2'), 4.39 (ddd, J = 18.3 Hz, 3.5 Hz, 1.4 Hz, 1 H, H4'), 3.91 (dd, J = 4.6 Hz, 1.5 Hz, 1 H, H3'), 3.79 (d, J = 4.6 Hz, 2 H, H5'), 0.93 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 0.88 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 0.11 (s, 6 H, 2 × CH₃), 0.10 (s, 6 H, 2 × CH₃).

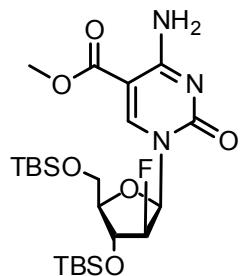
¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃, ppm): δ = 163.9 (C6), 154.4 (C2), 147.6 (C4), 94.9 (d, J = 192.7 Hz, C2'), 85.4 (C1'), 85.3 (C4'), 75.4 (d, J = 26.7 Hz, C3'), 61.6 (C5'), 56.0 (C5), 25.9 (C(CH₃)₃), 25.6 (C(CH₃)₃), 18.4 (C(CH₃)₃), 17.9 (C(CH₃)₃), -4.8 (SiCH₃), -5.0 (SiCH₃), -5.2 (SiCH₃), -5.3 (SiCH₃).

¹⁹F-NMR (282 MHz, CDCl₃, ppm): δ = -197.8 (ddd, J = 51.7 Hz, 19.1 Hz, 18.7 Hz)

HRMS (ESI+): berechnet für C₂₁H₄₀FIN₃O₄Si₂⁺ [M+H]⁺: 600.1581, gefunden: 600.1578.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3108 (w), 2953 (m), 2928 (m), 2884 (w), 2856 (m), 1641 (s), 1486 (m), 1471 (m), 1388 (w), 1361 (w), 1336 (w), 1286 (m), 1253 (m), 1104 (m), 1050 (m), 1005 (m), 939 (w), 823 (s), 777 (s).

5-Carboxymethyl-1-(2'-desoxy-2'-fluoro-3',5'-di-O-*tert*-butyldimethylsilyl-β-D-arabinofuranosyl)cytidin (48)



Das Rohprodukt **46** (2.00 g, theoretisch: 1.18 g, 1.96 mmol, 1.0 Äq.) wurde in einem Hochdruckautoklaven in 27 mL tr. MeOH gelöst und Bis(acetonitril)-palladium(II)-chlorid (59 mg, 0.23 mmol, 0.1 Äq.) sowie Hünig-Base (1.17 g, 1.54 mL, 9.10 mmol, 4.6 Äq.) zugegeben. Anschließend wurde mit CO begast, nach einmaligem Belüften ein CO-Druck von 3.0 bar angelegt und die Suspension für 20 h bei 60 °C gerührt. Nach dem Abkühlen und Belüften des Reaktionsgefäßes wurde das Rohprodukt an Kieselgel adsorbiert und mittels Säulenchromatographie (CH₂Cl₂/MeOH = 100/1 → 50/1) gereinigt. Es wurden 0.94 g (1.77 mmol, theoretische Ausbeute 90%) des Anomerengemisches ($\alpha/\beta = 1/4.6$) als Öl erhalten.

¹H-NMR (599 MHz, CDCl₃, ppm): δ = 8.45 (d, J = 1.3 Hz, 1 H, H4), 8.03 (bs, 1 H, NH₂), 6.87 (bs, 1 H, NH₂), 6.20 (dd, J = 20.2 Hz, 3.1 Hz, 1 H, H1'), 5.03 (ddd, J = 51.6 Hz, 3.1 Hz, 0.9 Hz, 1 H, H2'), 4.42 (dd, J = 18.4 Hz, 3.2 Hz, 1 H, H3'), 3.94 (dd, J = 4.6 Hz, 1.3 Hz, 1 H, H4'), 3.83-3.82 (m, 2 H, H5'), 3.82 (s, 3 H, OCH₃), 0.92 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 0.89 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 0.12 (s, 3 H, CH₃), 0.11 (s, 3 H, CH₃), 0.10 (s, 3 H, CH₃), 0.09 (s, 3 H, CH₃).

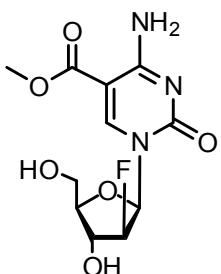
¹³C-NMR (111 MHz, CDCl₃, ppm): δ = 165.1 (COOMe), 163.7 (C6), 153.6 (C2), 148.9 (C4), 95.6 (C5), 94.9 (dd, J = 180.9 Hz, C2'), 85.9 (d, J = 22.4 Hz, C1'), 85.7 (C4'), 75.5 (d, J = 27.1 Hz, C3'), 61.5 (C5'), 51.9 (OCH₃), 27.9 (C(CH₃)₃), 25.6 (C(CH₃)₃), 18.3 (C(CH₃)₃), 17.9 (C(CH₃)₃), -4.8 (SiCH₃), -5.0 (SiCH₃), -5.4 (SiCH₃), -5.5 (SiCH₃).

¹⁹F NMR (282 MHz, CDCl₃, ppm): δ = -197.6 (ddd, J = 51.6 Hz, 19.5 Hz, 19.2 Hz).

HRMS (ESI+): berechnet für C₂₃H₄₃FN₃O₆Si₂⁺ [M+H]⁺: 532.2669, gefunden: 532.2665.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 2951 (w), 2928 (w), 2856 (w), 1714 (m), 1673 (s), 1504 (m), 1471 (w), 1324 (w), 1252 (m), 1088 (s), 1052 (m), 828 (s), 806 (m), 790 (m), 774 (s).

5-Carboxymethyl-1-(2'-desoxy-2'-fluoro- β -D-arabinofuranosyl)cytidin (50)



Die Verbindung **48** (800 mg, 1.51 mmol, 1.0 Äq.) wurde in einem Polypropylen-Zentrifugengefäß in 25 mL EtOAc gelöst und Pyridin (596 mg, 7.55 mmol, 5.0 Äq.) sowie 70% HF-Pyridin (647 mg, 22.65 mmol, 15.0 Äq.) zugegeben. Die Reaktion wurde für 16 h bei Raumtemperatur gerührt und durch Zugabe von Methoxytrimethylsilan im Überschuss beendet. Nach 30 min wurde der entstandene Feststoff abzentrifugiert und das Pellet mit 10 mL Isohexan gewaschen. Die Verbindung **50** wurde als weißer Feststoff im Gemisch mit dem α -Anomer erhalten (432 mg, 1.43 mmol, 95%). Das Verhältnis der Anomeren betrug dabei $\alpha/\beta = 1/4.7$.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO, ppm): $\delta = 8.61$ (s, 1 H, H4), 8.10 (bs, 1 H, NH_2), 7.72 (bs, 1 H, NH_2), 6.11 (dd, $J = 16.4$ Hz, 3.9 Hz, 1 H, H1'), 5.89 (d, $J = 4.9$ Hz, 1 H, H4'), 5.06 (ddd, $J = 52.3$ Hz, 3.8 Hz, 2.7 Hz, 1 H, H2'), 4.22 (ddd, $J = 19.1$ Hz, 4.6 Hz, 2.7 Hz, 1 H, H3'), 3.76 (s, 3 H, OCH_3), 3.67-3.56 (m, 2 H, H5').

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3 , ppm): $\delta = 165.2$ (COOMe), 163.4 (C6), 154.2 (C2), 149.1 (C4), 95.5 (d, $J = 190.8$ Hz, C2'), 95.2 (C5), 84.9 (d, $J = 13.0$ Hz, C1'), 84.8 (C4'), 73.4 (d, $J = 24.4$ Hz, C3'), 60.3 (C5'), 52.4 (CH_3).

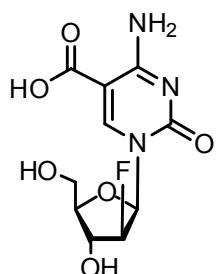
$^{19}\text{F NMR}$ (282 MHz, CDCl_3 , ppm): $\delta = -198.0$ (ddd, $J = 52.3$ Hz, 18.2 Hz, 17.7 Hz).

HRMS (ESI+): berechnet für $\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{FN}_3\text{O}_6^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 304.0939, gefunden: 304.0939.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3383 (w), 2361 (w), 1733 (m), 1716 (m), 1652 (s), 1617 (s), 1506 (m), 1456 (m), 1327 (m), 1252 (m), 1098 (m), 1032 (s), 793 (s), 672 (m).

Schmelzbereich: 162-164 °C.

5-Carboxy-1-(2'-desoxy-2'-fluoro- β -D-arabinofuranosyl)cytidin (51)



Die Verbindung **50** (400 mg, 1.32 mmol, 1.0 Äq.) wurde 13 mL MeCN/ H_2O (v/v = 5.5/1) gelöst und LiOH (317 mg, 13.20 mmol, 10 Äq.) zugegeben. Nach 16 h Rühren bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand in 8 mL Isopropanol gelöst. Durch Zugabe von

konz. HCl wurde das gewünschte Produkt ausgefällt. Es wurde das Anomerengemisch (NMR: $\alpha/\beta = 13/87$, HPLC: 12/88) als weißer Feststoff (340 mg, 1.18 mmol, 89%) erhalten. Für die folgende Reaktion wurde eine Portion mittels *Reversed Phase* HPLC (H_2O isokratisch) in α - und β -Anomer aufgetrennt.

1H -NMR (599 MHz, DMSO, ppm): $\delta = 8.44$ (s, 1 H, H4), 7.98 (bs, 2 H, NH₂), 6.07 (dd, $J = 18.0$ Hz, 3.6 Hz, 1 H, H1'), 5.85 (bs, 1 H, OH), 5.08 (bs, 1 H, OH), 5.00 (ddd, $J = 52.1$ Hz, 3.7 Hz, 2.2 Hz, 1 H, H2'), 4.18 (ddd, $J = 18.8$ Hz, 3.9 Hz, 2.0 Hz, 1 H, H3'), 3.84 (q, $J = 4.9$ Hz, 1 H, H4'), 3.56 (ddd, $J = 11.6$ Hz, 5.8 Hz, 4.4 Hz, 2 H, H5').

^{13}C -NMR (101 MHz, DMSO, ppm): $\delta = 166.7$ (COOH), 164.0 (C6), 153.5 (C2), 148.8 (C4), 96.1 (C5), 95.5 (d, $J = 190.5$ Hz, C2'), 85.0 (C4'), 84.9 (d, $J = 14.5$ Hz, C1'), 73.8 (d, $J = 24.6$ Hz, C3'), 60.6 (C5').

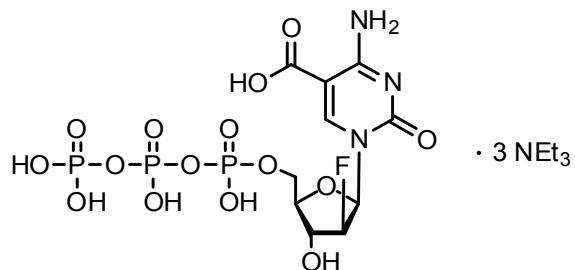
^{19}F NMR (282 MHz, CDCl₃, ppm): $\delta = -197.9$ (ddd, $J = 52.3$ Hz, 18.4 Hz, 18.2 Hz).

HRMS (ESI+): berechnet für C₁₀H₁₂FN₃NaO₆⁺ [M+Na]⁺: 312.0602, gefunden: 312.0603.

IR (ATR): $\bar{\nu}$ (cm⁻¹) = 3324 (s), 1728 (m), 1677 (s), 1644 (s), 1537 (w), 1509 (w), 1360 (m), 1278 (m), 1251 (m), 1107 (m), 1064 (s), 1040 (s), 859 (m), 782 (m).

Schmelzbereich: 107-109 °C.

5-Carboxy-1-(2'-desoxy-2'-fluoro- β -D-arabinofuranosyl)cytidin (53)



Unter Argonatmosphäre wurde Tributylammoniumpyrophosphat (75.8 mg, 138.4 μmol, 2.0 Äq.) in 0.8 mL tr. DMF gelöst und 1.2 mL Tributylamin zugegeben. Die resultierende Lösung wurde zur Lösung von 2-Chlor-1,3,2-benzodioxaphosphorin-4-on (111.0 mg, 549.5 μmol, 7.9 Äq.) in 0.88 mL tr. DMF zugefügt. Die entstandene Lösung wurde für 30 min bei Raumtemperatur gerührt und schließlich zur HPLC-gereinigten Verbindung **51** (20 mg, 69.2 μmol, 1.0 Äq.) zugegeben. Es wurde für weitere 2.5 h bei Raumtemperatur gerührt und zur Beendigung der Reaktion solange 3% Iod in Pyridin/H₂O (v/v = 9/1) zugetropft bis sich die Lösung nicht mehr sofort entfärbte. Nun wurde erneut für 1.5 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Produkt wurde durch Zugabe von 3 M NaCl (1.5 mL) und Ethanol (20 mL) bei -20 °C für 14 h gefällt. Mittels *Reversed Phase* HPLC wurde die Verbindung **53** als Triethylammonium-Salz (5.1 mg, 5.45 μmol, 8%) isoliert. Die Signale des HPLC-Puffers werden in der NMR Analytik nicht aufgeführt.

1H -NMR (400 MHz, D₂O ppm): $\delta = 8.45$ (s, 1 H, H4), 6.32 (dd, $J = 18.4$ Hz, 3.7 Hz, 1 H, H1'), 5.24 (ddd, $J = 51.2$ Hz, 3.6 Hz, 2.3 Hz, 1 H, H2'), 4.59 (d, $J = 20.8$ Hz, 1 H, H3'), 4.32-4.30 (m, 3 H, H4' + H5').

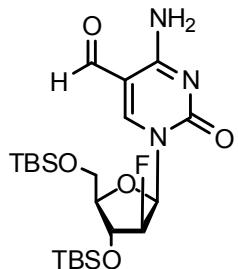
^{13}C -NMR (151 MHz, D₂O, ppm): $\delta = 170.1$ (COO⁻), 164.6 (C6), 155.7 (C2), 147.3 (C4), 102.6 (C5), 94.4 (d, $J = 191.1$ Hz, C2'), 84.9 (d, $J = 16.5$ Hz, C1'), 82.3 (C4'), 74.0 (d, $J = 26.7$ Hz, C3'), 64.8 (C5').

¹⁹F NMR (376 MHz, D₂O, ppm): $\delta = -199.5$ (ddd, $J = 51.1$ Hz, 18.8 Hz, 18.2 Hz).

³¹P NMR (162 MHz, D₂O, ppm): $\delta = -11.0$ (d, $J = 19.9$ Hz, P_y), -11.4 (d, $J = 20.1$ Hz, P_x), -23.4 (t, $J = 19.9$ Hz, P_z).

HRMS (ESI-): berechnet für C₁₀H₁₄FN₃O₁₅P₃⁻ [M-H]⁻: 527.9627, gefunden: 527.9628.

5-Formyl-1-(2'-desoxy-2'-fluoro-3',5'-di-O-tert-butyldimethylsilyl-β-D-arabinofuranosyl)cytidin (47)



Die gereinigte Verbindung **46** (2.00 g, 3.34 mmol, 1.0 Äq.) wurde mit Triphenylphosphin (524 mg, 2.00 Mmol, 0.6 Äq.) und Tris(dibenzylidenaceton)dipalladium(0) (306 mg, 0.33 mmol, 0.1 Äq.) in einem Hochdruckautoklaven in tr. Toluol (50 mL) gelöst. Anschließend wurde mit CO begast, nach einmaligem Belüften ein CO-Druck von 3.0 bar angelegt und auf 60 °C erwärmt. In der Folge wurde Tributylzinnhydrid (1.17 g, 1.08 mL, 4.00 mmol, 1.2 Äq.) mit einer Flussrate von 0.30 ml/h zugetropft und das Reaktionsgemisch für 14 h bei 60° C gerührt. Die Suspension wurde auf Raumtemperatur abgekühlt, belüftet und das Rohprodukt an Kieselgel adsorbiert. Nach Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* wurde das Produkt mittels Säulenchromatographie (Isohexan/EtOAc = 10/1 → EtOAc) isoliert. Man erhielt ein Anomerengemisch ($\alpha/\beta = 1/3$) als klares Öl (950 mg, 1.90 mmol, 57%).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, ppm): $\delta = 9.47$ (s, 1 H, HC=O), 8.22 (s, 1 H, H4), 8.21 (bs, 1 H, NH₂), 6.71 (bs, 1 H, NH₂), 6.26 (dd, $J = 19.2$ Hz, 3.1 Hz, 1 H, H1'), 5.06 (ddd, $J = 51.5$ Hz, 3.1 Hz, 1.2 Hz, 1 H, H2'), 4.43 (ddd, $J = 17.8$ Hz, 3.4 Hz, 1.3 Hz, 1 H, H3'), 4.00 (dd, $J = 4.8$ Hz, 1.5 Hz, 1 H, H4'), 3.83 (dd, $J = 4.1$ Hz, 1.0 Hz, 2 H, H5'), 0.92 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 0.90 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 0.13 (s, 3 H, CH₃), 0.12 (s, 3 H, CH₃), 0.11 (s, 3 H, CH₃), 0.10 (s, 3 H, CH₃).

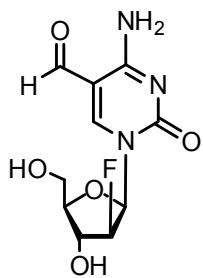
¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃, ppm): $\delta = 187.2$ (HC=O), 162.7 (C6), 154.2 (C4), 152.8 (C2), 105.2 (C5), 94.9 (d, $J = 192.7$ Hz, C2'), 86.0 (d, $J = 16.9$ Hz, C1'), 85.9 (C4'), 75.5 (d, $J = 26.8$ Hz, C3'), 61.7 (C5'), 25.8 (C(CH₃)₃), 25.6 (C(CH₃)₃), 18.3 (C(CH₃)₃), 17.9 (C(CH₃)₃), -4.8 (SiCH₃), -5.0 (SiCH₃), -5.4 (SiCH₃), -5.5 (SiCH₃).

¹⁹F NMR (282 MHz, CDCl₃, ppm): $\delta = -197.4$ (ddd, $J = 51.5$ Hz, 18.6 Hz, 18.2 Hz).

HRMS (ESI+): berechnet für C₂₂H₄₁FN₃O₅Si₂⁺ [M+H]⁺: 502.2563, gefunden: 502.2559.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 2953 (w), 2928 (w), 2884 (w), 2856 (w), 1659 (s), 1469 (m), 1471 (m), 1462 (m), 1322 (w), 1251 (m), 1232 (m), 1094 (s), 1051 (m), 825 (s), 802 (m), 776 (s), 721 (m).

5-Formyl-1-(2'-desoxy-2'-fluoro-β-D-arabinofuranosyl)cytidin (49)



Die silylierte Verbindung **47** wurde in 14 mL EtOAc vorgelegt und Pyridin (331 mg, 4.20 mmol, 5.0 Äq.) sowie 70% HF-Pyridin (360 mg, 12.6 mmol, 15.0 Äq.) zugegeben. Die Reaktion wurde für 16 h bei Raumtemperatur gerührt und durch Zugabe von Methoxytrimethylsilan im Überschuss beendet. Nach 30 min wurde der entstandene Feststoff abzentrifugiert und das Pellet mit 10 mL Isohexan gewaschen. Die Verbindung **49** wurde als weißer Feststoff im Gemisch mit dem α-Anomer erhalten (197 mg, 0.72 mmol, 86%). Das Verhältnis der Anomere betrug dabei nach HPLC-Analyse $\alpha/\beta = 19/81$. Für die nachfolgende Reaktion wurde eine Portion mittels *Reversed Phase* HPLC ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN } 0 \rightarrow 10\%$) in α- und β-Anomer aufgetrennt.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO, ppm): $\delta = 9.51$ (s, 1 H, HC=O), 8.63 (s, 1 H, H4), 8.23 (bs, 1 H, NH₂), 7.94 (bs, 1 H, NH₂), 6.09 (dd, $J = 16.7$ Hz, 3.7 Hz, 1 H, H1'), 5.89 (d, $J = 4.8$ Hz, 1 H, H4'), 5.05 (ddd, $J = 43.1$ Hz, 2.4 Hz, 1.4 Hz, 1 H, H2'), 4.21 (ddd, $J = 19.0$ Hz, 4.6 Hz, 2.4 Hz, 1 H, H3'), 3.89 (m, 1 H, H5'_α), 3.62 (m, 1 H, H5'_β).

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, DMSO, ppm): $\delta = 189.4$ (HC=O), 162.7 (C6), 155.3 (C4), 152.6 (C2), 105.2 (C5), 95.5 (d, $J = 191.1$ Hz, C2'), 85.4 (d, $J = 14.9$ Hz, C1'), 85.3 (C4'), 73.5 (d, $J = 24.5$ Hz, C3'), 60.6 (C5').

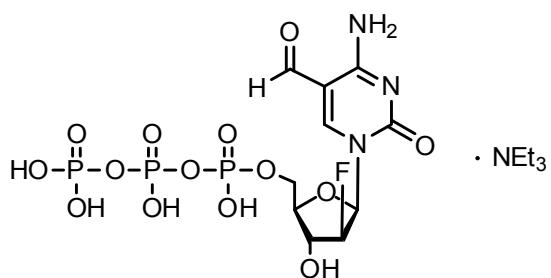
$^{19}\text{F NMR}$ (282 MHz, CDCl₃, ppm): $\delta = -197.9$ (ddd, $J = 51.9$ Hz, 17.8 Hz, 17.6 Hz).

HRMS (ESI+): berechnet für C₁₀H₁₂FN₃NaO₅⁺ [M+Na]⁺: 296.0653, gefunden: 296.0653.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3328 (s), 2938 (w), 1728 (m), 1677 (s), 1644 (s), 1537 (m), 1509 (m), 1360 (m), 1278 (m), 1107 (w), 1064 (m), 1040 (s), 859 (m), 782 (m).

Schmelzbereich: 202-204 °C.

5-Formyl-1-(2'-desoxy-2'-fluoro-β-D-arabinofuranosyl)cytidin (52)



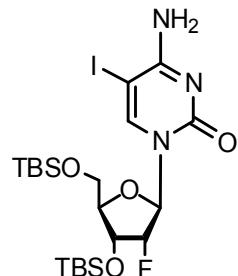
Zu einer Lösung von Tributylammoniumpyrophosphat (75.8 mg, 138.4 mmol, 2.0 Äq.) in 0.8 mL tr. DMF und 1.2 mL Tributylamin wurde eine Lösung von 2-Chlor-1,3,2-benzodioxaphosphorin-4-on (28.0 mg, 138.4 µmol, 2.0 Äq.) in 0.9 mL tr. DMF zugegeben. Die resultierende Lösung wurde für 30 min bei Raumtemperatur gerührt und schließlich zum HPLC-gereinigten Nukleosid **49** (18.9 mg,

69.2 µmol, 1 Äq.) hinzugefügt. Es wurde für 2.5 h gerührt und im Anschluss so lange 3% Iod in Pyridin/H₂O (v/v = 9/1) zugetropft bis sich die Lösung nicht mehr sofort entfärbte. Nun wurde erneut für 1.5 h gerührt und das entstandene Produkt durch Zugabe von 3 M NaCl-Lösung (1.5 mL) und Ethanol (20 mL) bei bei -20 °C für 14 h gefällt. Mittels *Reversed Phase* HPLC wurde die Verbindung **52** (1.8 mg, 2.21 µmol, 3%) als Triethylammonium-Salz isoliert. Die Signale des HPLC-Puffers werden in der NMR Analytik nicht aufgeführt.

¹H-NMR (400 MHz, D₂O, ppm): δ = 9.42 (s, 1 H, HC=O), 8.59 (s, 1 H, H4), 6.17 (dd, J = 16.7 Hz, 3.6 Hz, 1 H, H1'), 6.00 (s, 1 H, H4'), 5.08 (d, J = 49.5 Hz, 1 H, H2'), 4.31 (d, J = 18.0 Hz, 1 H, H3'), 3.84-3.70 (m, 2 H, H5')

¹⁹F NMR (376 MHz, D₂O, ppm): δ = -199.3 (ddd, J = 51.7 Hz, 17.7 Hz, 17.4 Hz)

5-Iodo-1-(2'-desoxy-2'-fluoro-3',5'-di-O-tert-butyldimethylsilyl-β-D-ribofuranosyl)cytidin (72)



Das iodierte Ribonukleosid (8.34 g, 22.50 mmol, 1.0 Äq.) wurde in 45 mL tr. DMF/Pyridin (v/v = 2/3) gelöst und in der Folge Imidazol (5.35 g, 78.70 mmol, 3.5 Äq.) sowie TBSCl (8.37 g, 56.20 mmol, 2.5 Äq.) zugegeben und für 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 50 mL H₂O zugegeben und das Gemisch mit EtOAc (2 × 100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit NH₄Cl gewaschen und schließlich über MgSO₄ getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (CH₂Cl₂/MeOH = 100/1 → 40/1). Es wurde die Verbindung **72** als klares Öl (11.79 g, 19.68 mmol, 87%) isoliert.

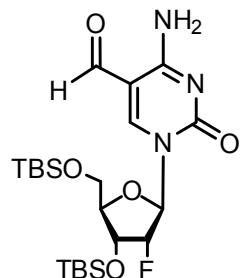
¹H-NMR (599 MHz, CDCl₃, ppm): δ = 8.85 (bs, 1 H, NH₂), 7.98 (s, 1 H, H4), 5.97 (dd, J = 16.5 Hz, 1.8 Hz, 1 H, H1'), 4.81 (ddd, J = 52.4 Hz, 4.4 Hz, 1.8 Hz, 1 H, H2'), 4.18 (ddd, J = 19.1 Hz, 7.6 Hz, 4.4 Hz, 1 H, H3'), 4.07-4.05 (m, 1 H, H4'), 4.05 (dd, J = 10.4 Hz, 1.4 Hz, 1 H, H5'_α), 3.77 (dd, J = 12.0 Hz, 2.4 Hz, 1 H, H5'_β), 0.95 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 0.88 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 0.15 (s, 6 H, 2 × CH₃), 0.09 (s, 3 H, CH₃), 0.07 (s, 3 H, CH₃).

¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃, ppm): δ = 164.0 (C6), 154.5 (C2), 146.1 (C4), 93.0 (d, J = 193.0 Hz, C2'), 89.0 (d, J = 34.0 Hz, C1'), 83.6 (C4'), 68.5 (d, J = 16.2 Hz, C3'), 60.9 (C5'), 56.9 (C5), 26.3 (C(CH₃)₃), 25.6 (C(CH₃)₃), 18.7 (C(CH₃)₃), 18.0 (C(CH₃)₃), -4.6 (SiCH₃), -4.9 (SiCH₃), -5.0 (SiCH₃), -5.1 (SiCH₃).

HRMS (ESI+): berechnet für C₂₁H₄₀FIN₃O₄Si₂⁺ [M+H]⁺: 600.1581, gefunden: 600.1575.

IR (ATR): $\bar{\nu}$ (cm⁻¹) = 2952 (w), 2927 (w), 2895 (w), 1855 (w), 1645 (s), 1488 (m), 1471 (m), 1360 (w), 1281 (m), 1252 (m), 1167 (w), 1122 (s), 1075 (m), 993 (w), 889 (m), 834 (s), 776 (s).

5-Formyl-1-(2'-desoxy-2'-fluoro-3',5'-di-O-*tert*-butyldimethylsilyl-β-D-ribofuranosyl)cytidin (73)



Die Verbindung **72** (3.61 g, 6.02 mmol, 1.0 Äq.) wurde in einem Hochdruckautoklaven in tr. Toluol (90 mL) vorgelegt und Triphenylphosphin (0.96 g, 3.61 mmol, 0.6 Äq.) sowie Pd₂(dba)₃·CHCl₃ (0.62 g, 0.60 mmol, 0.1 Äq.) zugegeben. Das Reaktionsgefäß mit CO-Gas geflutet und dann ein CO-Druck von 3.5 bar angelegt. Während die Reaktionsmischung bei 60 °C gerührt wurde, wurde Bu₃SnH (2.02 mL, 7.22 mmol, 1.2 Äq.) mit einer Flussrate von 0.3 mL/h zugetropft und weitere 16h bei 60 °C gerührt. Nach Belüften des Reaktionsgefäßes wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (Isohexan/EtOAc =4/1 → 1/1) gereinigt. Man erhielt die Zielverbindung **73** als klares Öl (2.00 g, 4.00 mmol, 66%).

¹H-NMR (599 MHz, CDCl₃, ppm): δ = 9.49 (s, 1 H, HC=O), 8.51 (s, 1 H, H4), 8.23 (bs, 1 H, NH₂), 6.01 (d, J = 16.3 Hz, 1 H, H1'), 4.91 (dd, J = 51.6 Hz, 3.8 Hz, 1 H, H2'), 4.22-4.16 (m, 1 H, H3'), 4.16-4.10 (m, 2 H, H4'+H5'_α), 3.82 (dd, J = 12.3 Hz, 2.2 Hz, 1 H, H5'_β), 0.93 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 0.88 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 0.13 (s, 3 H, CH₃), 0.10 (s, 3 H, CH₃), 0.09 (s, 3 H, CH₃), 0.07 (s, 3 H, CH₃).

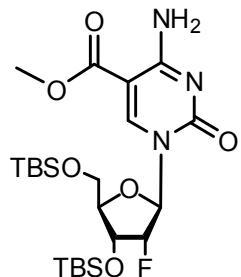
¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃, ppm): δ = 187.1 (HC=O), 162.8 (C6), 153.0 (C2), 105.5 (C5), 92.8 (d, J = 192.9, C2'), 89.6 (d, J = 34.4 Hz, C1'), 83.6 (C4'), 68.0 (d, J = 16.6 Hz, C3'), 60.5 (C5'), 26.1 (C(CH₃)₃), 25.5 (C(CH₃)₃), 18.6 (C(CH₃)₃), 18.0 (C(CH₃)₃), -4.5 (SiCH₃), -5.0 (SiCH₃), -5.1 (SiCH₃), -5.3 (SiCH₃).

¹⁹F NMR (282 MHz, CDCl₃, ppm): δ = -200.8 (ddd, J = 52.4 Hz, 19.4 Hz, 17.6 Hz).

HRMS (ESI+): berechnet für C₂₂H₄₁FN₃O₅Si₂⁺ [M+H]⁺: 502.2563, gefunden: 502.2558.

IR (ATR): $\bar{\nu}$ (cm⁻¹) = 2952 (w), 2927 (w), 2856 (w), 1664 (s), 1506 (m), 1471 (m), 1417 (w), 1251 (8m), 1240 (m), 1119 (m), 1070 (m), 993 (w), 834 (s), 788 (s).

5-Carboxymethyl-1-(2'-desoxy-2'-fluoro-3',5'-di-O-*tert*-butyldimethylsilyl-β-D-ribofuranosyl)cytidin (74)



Das silylierte Nukleosid **72** (3.61 g, 6.02 mmol, 1.0 Äq.) wurde in abs. Methanol (70 mL) zusammen mit $\text{Pd}(\text{MeCN})_2\text{Cl}_2$ (0.16 g, 0.60 mmol, 0.1 Äq.) und Hünig Base (2.10 mL, 12.04 mmol, 2.0 Äq.) in einem Hochdruckautoklaven vorgelegt. Das Reaktionsgefäß wurde mit CO-Gas geflutet und anschließend ein CO-Druck von 3.5 bar angelegt. Die Reaktionsmischung wurde auf 60 °C erhitzt und für 16 h in der Wärme gerührt.

Nach Belüften des Autoklaven wurde das Rohprodukt an Kieselgel adsorbiert, das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und die Zielverbindung **74** säulenchromatographisch ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NEt}_3 = 100/1/1$) als klares Öl isoliert (2.40 g, 4.50 mmol, 75%).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , ppm): $\delta = 8.47$ (s, 1 H, H4), 8.00 (bs, 1 H, NH₂), 7.17 (bs, 1 H, NH₂), 5.90 (dd, $J = 17.3$ Hz, 2.0 Hz, 1 H, H1'), 4.95 (ddd, $J = 52.4$ Hz, 4.7 Hz, 2.1 Hz, 1 H, H2'), 4.19 (ddd, $J = 18.0$ Hz, 7.2 Hz, 4.7 Hz, 1 H, H3'), 4.09 (dd, $J = 5.5$ Hz, 1.5 Hz, 1 H, H4'), 4.00 (dd, $J = 11.8$ Hz, 1.9 Hz, 1 H, H5'_α), 3.81 (s, 3 H, OCH₃), 3.78 (dd, $J = 11.8$ Hz, 3.6 Hz, 1 H, H5'_β), 0.89 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 0.88 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 0.09 (s, 6 H, 2 × CH₃), 0.08 (s, 3 H, CH₃), 0.07 (s, 3 H, CH₃).

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3 , ppm): $\delta = 164.9$ (COOME), 163.7 (C6), 153.7 (C2), 148.1 (C4), 96.0 (C5), 92.6 (d, $J = 192.8$ Hz, C2'), 90.5 (d, $J = 34.4$ Hz, C1'), 84.2 (C4'), 69.2 (d, $J = 16.2$ Hz, C3'), 61.5 (C5'), 52.0 (OCH₃), 27.9 (C(CH₃)₃), 25.6 (C(CH₃)₃), 18.4 (C(CH₃)₃), 18.0 (C(CH₃)₃), -4.6 (SiCH₃), -5.0 (SiCH₃), -5.4 (SiCH₃), -5.6 (SiCH₃).

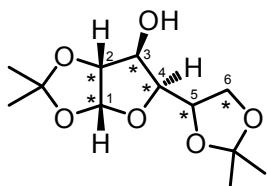
$^{19}\text{F-NMR}$ (282 MHz, CDCl_3 , ppm): $\delta = -200.9$ (ddd, $J = 52.5$ Hz, 17.6 Hz, 17.2 Hz).

HRMS (ESI+): berechnet für $\text{C}_{23}\text{H}_{43}\text{FN}_3\text{O}_6\text{Si}_2^+$ [M+H]⁺: 532.2669, gefunden: 523.2664.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3406 (w), 2952 (w), 2928 (w), 2856 (w), 1712 (m), 1676 (m), 1503 (m), 1440 8w), 1323 (m), 1250 (m), 1121 8m), 1088 (s), 1081 (s), 932 (s), 813 (w), 790 (m), 775 (s).

6.2.3. Synthese des Inosin Phosphoramidits

[¹³C₆]-1,2:5,6-Di-O-isopropyliden- α -D-glucofuranose (54)



¹³C-Glucose (1.76 g, 9.46 mmol, 1.0 Äq.) und Iod (300 mg, 1.19 mmol, 0.13 Äq.) wurden in 50 mL Aceton vorgelegt und die Suspension für 2 h am Rückfluss gekocht. Anschließend wurde weitere 36 h bei Raumtemperatur gerührt und danach die braune Lösung mit 20 mL ges. Na₂S₂O₃-Lösung versetzt, wobei die Färbung verschwand. Das organische Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und die verbleibende wässrige Phase mit CH₂Cl₂ (3 × 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 100 mL H₂O und anschließend mit 100 mL ges. NaCl-Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und der ölige Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (CH₂Cl₂/MeOH = 100/1 → 20/1). Man erhielt einen schmutzig-weißen Feststoff (2.00 g, 7.56 mmol, 80%).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, ppm): δ = 5.92 (ddd, J = 182.9 Hz, 9.1 Hz, 3.9 Hz, 1 H, H1), 4.52 (ddd, J = 190.1 Hz, 6.6 Hz, 3.5 Hz, 1 H, H2), 4.33 (m, J (¹³C-H) = 143.4 Hz, 1 H, H3), 4.30 (m, J (¹³C-H) = 151.6 Hz, 1 H, H5), 4.06 (m, 1 H, H4), 3.85 (m, 2 H, H6), 1.48 (s, 3 H, CH₃), 1.43 (s, 3 H, CH₃), 1.35 (s, 3 H, CH₃), 1.30 (s, 3 H, CH₃).

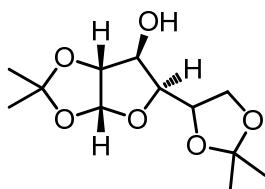
¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃, ppm): δ = 106.5 (**C(CH₃)₂**), 106.2 (**C(CH₃)₂**), 105.2 (dd, J = 33.6 Hz, 2.4 Hz, C1), 85.0 (dd, J = 44.2 Hz, 33.6 Hz, C2), 81.1 (dd, J = 47.7 Hz, 36.9 Hz, C4), 75.2 (dd, J = 44.1 Hz, 36.9 Hz, C3), 73.5 (ddd, 38.3 Hz, 34.1 Hz, 4.3 Hz, C5), 67.6 (dd, J = 34.1 Hz, 1.9 Hz, C6), 26.8 (CH₃), 26.7 (CH₃), 26.1 (CH₃), 25.1 (CH₃).

HRMS (ESI-): berechnet für C₇¹³C₆H₂₁O₈⁻ [M+(FA-H)]⁻: 311.1443, gefunden: 311.1449.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3430 (s), 3327 (w), 2968 (w), 2923 (w), 1456 (w), 1384 (m), 1373 (m), 1317 (w), 1263 (m), 1243 (m), 1224 (s), 1159 (m), 1063 (s), 1042 (s), 1017 (s), 981 (s), 945 (s), 923 (m), 852 (s), 776 (m).

Schmelzbereich: 106-108 °C.

1,2:5,6-Di-O-isopropyliden- α -D-glucofuranose (75)



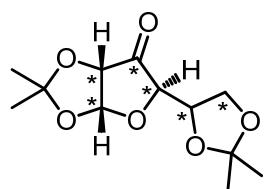
Glucose (5.00 g, 27.78 mmol, 1.0 Äq.) wird in einem trockenen Kolben in 50 mL Aceton vorgelegt und dann ZnCl₂ (4.00 g, 29.40 mmol, 1.05 Äq.) und *ortho*-Phosphorsäure (140 µL, 2.67 µmol, kat.) zugegeben. Die milchige Suspension wurde für 40 h bei Raumtemperatur gerührt, das Ausgangsmaterial abfiltriert und mit Aceton gewaschen. Das Filtrat wurde mit 2 M NaOH alkalisch gestellt und nach Entfernen des anorganischen Niederschlags mittels Filtration *in vacuo* eingeengt. Das Rohprodukt wurde aus Isohexan/CH₂Cl₂ umkristallisiert und als weißer Feststoff erhalten (3.62 g, 13.92 mmol, 50%).

Die Synthese wurde nach Saito *et al.* durchgeführt. Die Analytik stimmt mit den Literaturwerten überein.

¹H-NMR (599 MHz, CDCl₃, ppm): δ = 5.92 (d, J = 3.6 Hz, 1 H, H1), 4.51 (d, J = 3.7 Hz, 1 H, H2), 4.33 (dd, 4.33 (dd, J = 5.5 Hz, 1.6 Hz, 1 H, H3), 4.30 (dd, J = 4.2 Hz, 2.6 Hz, 1 H, H5), 4.15 (dd, J = 8.6 Hz, 6.2 Hz, 1 H, H6_α), 4.05 (dd, J = 7.7 Hz, 2.8 Hz, 1 H, H5), 3.97 (dd, J = 8.7 Hz, 5.4 Hz, 1 H, H6_β), 1.48 (s, 3 H, CH₃), 1.42 (s, 3 H, CH₃), 1.34 (s, 3 H, CH₃), 1.30 (s, 3 H, CH₃).

HRMS (ESI-): berechnet für C₁₂H₂₀O₆Cl⁻ [M+Cl]⁻: 295.0954, gefunden: 295.0974.

[¹³C₆]-1,2:5,6-di-O-isopropyliden- α -D-glucofuranos-3-ulose (55)



Die Verbindung **54** (100 mg, 0.38 mmol, 1.0 Äq.) wurde in 2 mL trockenem CH₂Cl₂ vorgelegt und im Anschluss Pyridinium-Dichromat (85 mg, 0.22 mmol, 0.6 Äq.) zugegeben. Nach Zugabe von Acetanhydrid (126 mg, 117 µL, 1.24 mmol, 3.3 Äq.) wurde für 1.5 h am Rückfluss gekocht und danach für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand in EtOAc aufgenommen. Aus der entstandenen Suspension wurde mittels einer mit Kieselgel gefüllten Glasfilternutsche der Feststoff abgetrennt. Der Filterkuchen wurde mit EtOAc (2 × 50 mL) nachgewaschen und das Rohprodukt nach Entfernen des Lösungsmittel noch mal mit Toluol koevaporiert. Das gewünschte Produkt wurde als klares Öl (93 mg, 0.35 mmol, 94%) isoliert.

¹H-NMR (599 MHz, CDCl₃, ppm): δ = 6.12 (dtt, J = 187.0 Hz, 5.0 Hz, 2.7 Hz, 1 H, H1), 4.38 (dd, J = 150.8 Hz, 1.3 Hz, 1 H, H2), 4.37 (m, H4+H5), 4.01 (ddd, J = 149.2 Hz, 6.4 Hz, 2.8 Hz, 2 H, H6), 1.45 (s, CH₃), 1.42 (s, CH₃), 1.33 (s, CH₃), 1.32 (s, CH₃).

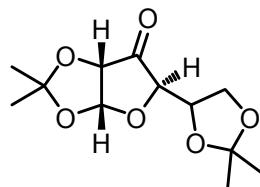
¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃, ppm): δ = 208.8 (dd, J = 42.6 Hz, 42.3 Hz, C3), 114.3 (C(CH₃)₂), 110.3 (C(CH₃)₂), 103.1 (d, J = 37.1 Hz, C1), 78.9 (ddd, J = 41.7 Hz, 14.4 Hz, 13.9 Hz, C4/5), 77.2 (ddd, 45.2 Hz, 37.2 Hz, 14.3 Hz, C2), 76.3 (dd, J = 42.9 Hz, 33.4 Hz, C5/4), 64.3 (d, J = 33.3 Hz, C6), 27.5 (CH₃), 27.1 (CH₃), 25.9 (CH₃), 25.3 (CH₃).

LRMS (EI+): 249 (17%) [M-(CH₃)⁺], 103(100%), [M-(C₃¹³C₄H₁₁O₄)]⁺

HRMS (ESI+): berechnet für C₆¹³C₆H₁₉O₆⁺ [M+H]⁺: 265.1377, gefunden: 265.1381.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3471 (w), 2938 (w), 1737 (s), 1430 (w), 1368 (m), 1216 (s), 1126 (w), 1041 (s), 1011 (m), 935 (m) 901 (m), 821 (w), 777 (m).

1,2:5,6-di-O-isopropyliden- α -D-glucofuranos-3-ulose (76)



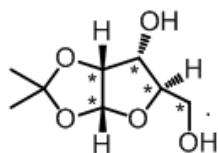
Die Verbindung **75** (3.03 g, 11.40 mmol, 1.0 Äq.) wurde in tr. CH₂Cl₂ (20 mL) aufgenommen und Pyridinium-Chlorochromat (1.47 g, 6.83 mmol, 0.6 Äq.) sowie Ac₂O (3,56 mL, 3.84 g, 37.60 mmol, 3.3 Äq.) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 1 h am Rückfluss gekocht und eine weitere Stunde auf Raumtemperatur abgekühlt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt, der Rückstand in EtOAc aufgenommen und der Feststoff über eine Kieselgel-Filtersäule (EtOAc) abgetrennt. Das erhaltene klare Öl (2.77 g, 10.75 mmol, 94%) wurde ohne weitere Aufreinigung teilweise zu **77** umgesetzt.

Die Synthese wurde nach Saito *et al.* durchgeführt. Die Analytik stimmt mit den Literaturwerten überein.

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, ppm): δ = 6.14 (d, J = 4.5 Hz, 1 H, H1), 4.40-4.33 (m, 3 H, H2+H4+H5), 4.05 (d, J = 1.1 Hz, 1 H, H6_α), 4.01 (m, 1 H, H6_β), 1.46 (s, 3 H, CH₃), 1.43 (s, 3 H, CH₃), 1.34 (s, 6 H, 2 × CH₃).

HRMS (EI+): berechnet für C₁₁H₁₅O₆⁺ [M-(CH₃)⁺]: 243.0863, gefunden: 243.0863.

[¹³C₅]-1,2-O-Isopropyliden- α -D-ribofuranose (56)



Verbindung **55** (2.87 g, 10.80 mmol, 1.0 Äq) wurde in 50 mL EtOAc gelöst und nach Zugabe von H₅IO₆ (2.95 g, 12.96 mmol, 1.2 Äq.) für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Filtration der Suspension und anschließender Entfernung des Lösungsmittels *in vacuo* wurde der Rückstand in 150 mL abs. EtOH aufgenommen. Zur Lösung wurde NaBH₄ (1.48 g, 54.80 mmol, 5.0 Äq.) in kleinen Portionen zugegeben und das Reaktionsgemisch auf einem Wasserbad gekühlt. Nach 30 min wurde die Reaktion durch Zugabe von Eisessig beendet und die Lösung neutralisiert. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand mit Kieselgel und EtOAc aufgeschlämmt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde das an Kieselgel adsorbierte Rohprodukt mittels einer Chromatographiesäule gereinigt (CH₂Cl₂/MeOH = 20/1) und Verbindung **56** (1.42 g, 7.29 mmol, 67%) als schwach rotes Öl erhalten.

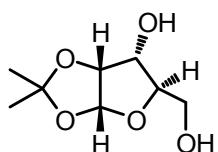
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, ppm): δ = 5.82 (d, *J* = 182.2 Hz, 1 H, H1), 4.59 (dd, *J* = 161.2 Hz, 4.2 Hz, 1 H, H2), 4.10 (d, *J* = 130.0 Hz, H3), 4.13-3.53 (m, 3 H, H4+H5), 1.59 (CH₃), 1.39 (CH₃).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃, ppm): δ = 106.1 (C(CH₃)₂), 104.1 (dd, *J* = 34.2 Hz, 2.0 Hz, C1), 80.6 (m, C2), 79.1 (m, C4), 71.2 (dd, *J* = 39.6 Hz, 38.7 Hz, C3), 62.0 (m, C5), 26.6 (CH₃), 26.5 (CH₃).

HRMS (ESI-): berechnet für C₅¹³C₅H₁₇O₇⁻ [M+AcO]⁻: 254.1148, gefunden: 254.1153.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3426 (w), 2984 (w), 2937 (w), 1470 (m), 1399 (m), 1383 (m), 1375 (m), 1348 (w), 1261 (w), 1214 (m), 1160 (m), 1134 (m), 1051 (s), 992 (s), 952 (m), 865 (m), 815 (m), 733 (m).

1,2-O-Isopropyliden- α -D-ribofuranose (77)



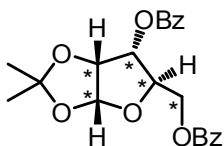
Die Synthese wurde nach Saito *et al.* durchgeführt.¹⁴²

Eingesetzt wurden **76** (300 mg, 1.16 mmol, 1.0 Äq.), H₅IO₆ (316 mg, 1.39 mmol, 1.2 Äq.) in 3 mL EtOAc, sowie NaBH₄ (112 mg, 3.02 mmol, 2.6 Äq.) in 3 mL EtOH. Die Zielverbindung wurde als klares Öl isoliert (95 mg, 0.50 mmol, 43%).

Die Analytik stimmt mit den Literaturwerten überein.

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, ppm): δ = 5.78 (d, *J* = 3.6 Hz, 1 H, H1), 4.55 (t, *J* = 4.1 Hz, 1 H, H2), 4.14-3.69 (m, 4 H, H3+H4+H5), 1.54 (s, 3 H, CH₃), 1.33 (s, 3 H, CH₃).

[¹³C₅]-3,5-Di-O-benzoyl-1,2-O-isopropyliden- α -D-ribofuranose (**57**)



Verbindung **56** (1.40 g, 7.18 mmol, 1.0 Äq.) wurde in 20 mL tr. Pyridin vorgelegt und bei 0 °C Benzoylchlorid (4.02 g, 3.30 mL, 28.70 mmol, 4.0 Äq.) zugetropft. Die Lösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und dann auf 50 mL Eiswasser gegossen. Die wässrige Phase wurde mit CH₂Cl₂ (3 × 50 mL) extrahiert, mit 100 mL ges. NaHCO₃-Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (Isohexan/EtOAc = 10/1) gereinigt und Verbindung **57** (1.00 g, 2.48 mmol, 35%) als klares Öl erhalten.

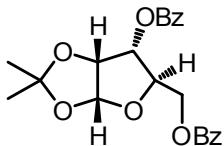
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, ppm): δ = 8.13-8.00 (m, 4 H, Ar), 7.61-7.47 (m, 2 H, Ar), 7.45-7.35 (m, 4 H, Ar), 5.94 (dd, J = 183.3 Hz, 5.1 Hz, 1 H, H1), 5.05 (m, 2 H, H2+H3), 4.66 (m, 2 H, H5), 4.46 (m, 1 H, H4), 1.58 (s, CH₃), 1.35 (s, CH₃).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃, ppm): δ = 166.2 (C=O), 165.7 (C=O), 133.7 (CH-Ar), 133.4 (CH-Ar), 133.1 (CH-Ar), 130.2 (CH-Ar), 129.9 (CH-Ar), 129.7 (CH-Ar), 129.6 (C-Ar), 129.1 (C-Ar), 128.4 (2 × CH-Ar), 128.3 (2 × CH-Ar), 113.3 (C(CH₃)₂), 104.5 (dd, J = 33.2 Hz, 3.3 Hz, C1), 77.2 (ddd, J = 34.8 Hz, 4.8 Hz, 2.1 Hz, C2), 75.7 (dd, J = 41.7 Hz, 1.9 Hz, C4), 73.3 (dd, J = 42.2 Hz, 2.4 Hz, C3), 63.2 (dd, J = 44.8 Hz, 3.0 Hz, C5), 26.6 (2 × CH₃).

HRMS (ESI+): berechnet für C₁₇¹³C₅H₂₄O₇Na⁺ [M+2H+Na]⁺: 428.1582 eine C-O Bindung im Acetal geöffnet, gefunden: 428.1581.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3070 (w), 2988 (w), 2936 (w), 2848 (w), 2665 (w), 2553 (w), 1720 (s), 1687 (m), 1601 (w), 1583 (w), 1451 (m), 1422 (w), 1373 (m), 1324 (w), 1268 (s), 1232 (s), 1162 (m), 1114 (m), 1091 (m), 1068 (s), 1024 (m), 993 (s), 865 (m), 804 (w), 706 (s).

3,5-Di-O-benzoyl-1,2-O-isopropyliden- α -D-ribofuranose (**78**)



Die Synthese wurde nach Saito *et al.* durchgeführt.¹⁴²

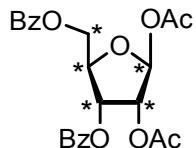
Eingesetzt wurden **77** (95 mg, 0.50 mmol, 1.0 Äq.) und Benzoylchlorid (245 mg, 1.75 mmol, 3.5 Äq.) in 1 mL tr. Pyridin. Die Zielverbindung wurde als klares Öl isoliert (63 mg, 0.16 mmol, 32%).

Die Analytik stimmt mit den Literaturwerten überein.

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, ppm): δ = 8.09-7.99 (m, 4 H, Ar), 7.62-7.34 (m, 6 H, Ar), 5.94 (d, J = 3.8 Hz, 1 H, H1), 5.03 (d, J = 2.3 Hz, 1 H, H4), 5.01 (d, J = 2.3 Hz, 1 H, H3), 4.69-4.43 (m, 3 H, H2+H5), 1.58 (s, 3 H, CH₃), 1.35 (s, 3 H, CH₃).

HRMS (ESI+): berechnet für C₁₈¹³C₅H₂₂NaO₉⁺ [M+Na]⁺: 470.1324, gefunden: 470.1328

[¹³C₅]-1,2-Di-O-acetyl-3,5-di-O-benzoyl- β -D-ribofuranose (**58**)



Das Acetal **57** (0.70 g, 1.74 mmol, 1.0 Äq.) wurde in AcOH (8 mL) mit Ac₂O (3 mL) versetzt und langsam 0.3 mL konz. H₂SO₄ zugetropft. Die Lösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und anschließend auf 50 mL Eiswasser gegossen. Die wässrige Phase wurde mit CH₂Cl₂ extrahiert (5 × 80 mL) und nach Entfernen des Lösungsmittel am Rotationsverdampfer wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch (Isohexan/EtOAc = 1/1) gereinigt. Man erhielt das Produkt **58** als klaren, sirupartigen Rückstand (0.65 g, 1.45 mmol, 84%).

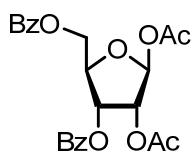
¹H-NMR (599 MHz, CDCl₃, ppm): δ = 8.10-7.99 (m, 4 H, Ar), 7.63-7.53 (m, 2 H, Ar), 7.50-7.38 (m, 4 H, Ar), 6.26 (dd, J = 182.4 Hz, 4.0 Hz, 1 H, H1), 5.72 (dd, J = 152.9 Hz, 5.3 Hz, 1 H, H3), 5.55 (dt, J = 162.3 Hz, 4.7 Hz, 1 H, H2), 4.87-4.61 (m, 1 H, H4), 4.77-4.55 (m, 1 H, H5 _{α}), 4.55-4.35 (m, 1 H, H5 _{β}), 2.09 (s, 3 H, CH₃), 1.97 (s, 3 H, CH₃).

¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃, ppm): δ = 169.3 (C=O), 169.1 (C=O), 165.9 (C=O), 165.3 (C=O), 133.7 (CH-Ar), 133.6 (CH-Ar), 133.3 (CH-Ar), 133.2 (CH-Ar), 129.7 (2 × CH-Ar), 128.6 (2 × CH-Ar), 129.6 (C-Ar), 129.4 (C-Ar), 128.4 (2 × CH-Ar), 98.3 (d, J = 47.6 Hz, C1), 79.8 (t, J = 42.2 Hz, C4), 74.4 (dd, J = 47.5 Hz, 38.5 Hz, C2), 71.2 (d, J = 39.6 Hz, C3), 63.8 (d, J = 42.3 Hz, C5), 20.9 (CH₃), 20.5 (CH₃).

HRMS (ESI+): berechnet für C₁₈¹³C₅H₂₂NaO₉⁺ [M+Na]⁺: 470.1324, gefunden: 470.1328.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 2923 (w), 1740 (s), 1721 (s), 1600 (w), 1452 (m), 1372 (m), 1314 (m), 1266 (s), 1252 (s), 1237 (s) 1206 (s), 1175 (m), 1113 (m), 1095 (s), 1070 (m), 1026 (m), 1011 (m), 956 (m), 925 (m), 865 (m), 805 (w), 710 (s).

1,2-Di-O-acetyl-3,5-di-O-benzoyl- β -D-ribofuranose (79)



Die Synthese wurde nach Saito *et al.* durchgeführt.¹⁴²

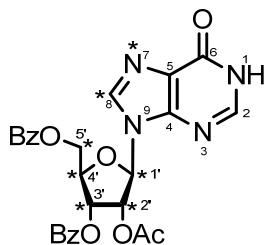
Eingesetzt wurden **78** (77 mg, 0.19 mmol, 1.0 Äq.), 0.20 mL H₂SO₄ in 2.00 mL HOAc, 0.20 mL Ac₂O (185 mg, 1.81 mmol, 9.5 Äq.). Die Zielverbindung wurde als klares Öl isoliert (30 mg, 0.07 mmol, 37%).

Die Analytik (¹H-NMR) stimmt mit den Literaturwerten überein.

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, ppm): δ = 8.07-7.96 (m, 4 H, Ar), 7.59-7.35 (m, 6 H, Ar), 6.25 (s, 1 H, H1), 5.76 (dd, *J* = 6.8 Hz, 4.9 Hz, 1 H, H3), 5.46 (dd, *J* = 6.3 Hz, 4.5 Hz, 1 H, H2), 4.76-4.43 (m, 3 H, H4+H5), 2.10 (s, 3 H, CH₃), 1.96 (s, 3 H, CH₃).

HRMS (ESI+): berechnet für C₁₈¹³C₅H₂₂NaO₉⁺ [M+Na]⁺: 470.1324, gefunden: 470.1328.

[¹³C₆¹⁵N]-1-(2-O-Acetyl-3,5-di-O-benzoyl- β -D-ribofuranosyl)hypoxanthin (59)



In einem Rundkolben wurde [⁷-¹⁵N, 8-¹³C]-Hypoxanthin **61** (440 mg, 3.19 mmol, 1.0 Äq.) zusammen mit (NH₄)₂SO₄ (115 mg, 0.87 mmol, 0.6 Äq.) vorgelegt. Nach Zugabe von 10 mL HMDS wurde die Suspension für 3 h am Rückfluss gekocht bis eine klare, rote Lösung erhalten wurde. Das Lösungsmittel wurde destillativ entfernt (75 °C, 200 mbar) und der Rückstand zweimal mit tr. Toluol koevaporiert. Anschließend wurde die silylierte Base zusammen mit sorgfältig getrockneter [¹³C₅]-1,2-Di-O-acetyl-3,5-di-O-benzoyl- β -D-ribofuranose **58** (646 mg, 1.45 mmol, 0.45 Äq.) in 45 mL Dichlorethan gelöst. Zur Reaktionslösung wurde über 1 h bei 0 °C TMSOTf (805 mg, 654 µL, 3.63 mmol, 1.14 Äq.) zugetropft und in der Folge für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Durch Zugabe von 30 mL ges. NaHCO₃-Lösung wurde die Reaktion beendet und die wässrige Phase mit CH₂Cl₂ (3 × 80 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. NaHCO₃- und NaCl-Lösung (je 50 mL) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* wurde das Rohprodukt an Kieselgel adsorbiert und säulenchromatographisch gereinigt (CH₂Cl₂/MeOH = 50/1 → 20/1). Das Produkt wurde als klares Öl isoliert (700 mg, 1.33 mmol, 92%).

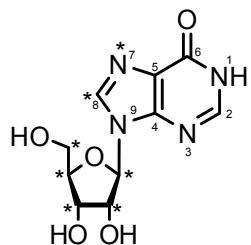
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, ppm): δ = 12.90 (bs, 1 H, NH), 8.25 (d, J = 11.5 Hz, 1 H, H8), (8.09-8.06 (m, 4 H, Ar), 8.00 (s, 1 H, H2), 7.65-7.55 (m, 2 H, Ar), 7.52-7.42 (m, 4 H, Ar), 6.25 (d, J = 169.1 Hz, 1 H, H1'), 6.17 (d, J = 153.8 Hz, 1 H, H2'), 6.04 (d, J = 160.3 Hz, 1 H, H3'), 4.84 (dd, J = 147.9 Hz, 10.1 Hz, 1 H, H4'), 4.73, (d, J = 150.3, 1 H, H5'_a), 4.65 (dd, J = 148.7 Hz, 9.4 Hz, 1 H, H5'_b), 2.03 (s, 3 H, CH₃).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃, ppm): δ = 169.4 (CO^{Ac}), 166.1 (CO^{Bz}), 165.3 (CO^{Bz}), 158.7 (C6), 148.7 (C2), 145.4 (C4), 143.2 (CH-Ar), 143.1 (CH-Ar), 139.1 (C8), 133.8 (C-Ar), 133.5 (C-Ar), 129.7 – 128.5 (CH-Ar), 129.2 (dd, J = 111.6 Hz, 8.0 Hz, C5), 86.6 (d, J = 43.9, C1'), 80.9 (dd, J = 42.6 Hz, 38.4 Hz, C4'), 73.1 (t, J = 39.6 Hz, C2'), 71.2 (td, J = 39.4 Hz, 39.5 Hz, 3.1 Hz, C3'), 63.4 (dd, J = 43.6 Hz, 24.9 Hz, C5').

HRMS (ESI-): berechnet für C₂₀¹³C₆H₂₁N₃¹⁵NO₈⁻ [M-H]⁻: 524.1537, gefunden: 524.1538.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3064 (w), 2916 (w), 1739 (m), 1926 (s), 1704 (s), 1585 (w), 1451 (w), 1371 (w), 1272 (s), 1225 (m), 1110 (m), 1048 (m), 1025 (m), 789 (m).

[¹³C₆¹⁵N]-Inosin (9)



Das geschützte Nukleosid **59** (461 mg, 1.30 mmol) wurde in 7 N Ammoniak in Methanol gerührt. Nach 48 h zeigte die DC-Kontrolle vollständigen Umsatz. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und das Produkt als schmutzig-weißer Feststoff erhalten (330 mg, 1.20 mmol, 92%).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO, ppm): δ = 8.29 (dd, J = 214.7 Hz, 12.0 Hz, 1 H, H8), 8.03 (s, 1 H, H2), 5.83 (dd, J = 165.4 Hz, 3.5 Hz, 1 H, H1'), 5.43 – 5.38 (bm, 2 H, 2'-OH, 3'-OH), 5.14 (bs, 1 H, 5'-OH), 4.44 (d, J = 143.9 Hz, 1 H, H2'), 4.08 (d, J = 145.3 Hz, 1 H, H3'), 3.89 (d, J = 151.4 Hz, 1 H, H4'), 3.57 (bm, 2 H, H5').

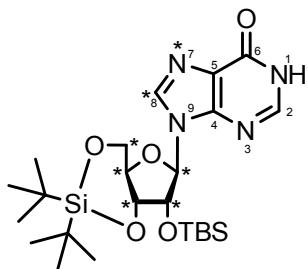
¹³C-NMR (101 MHz, DMSO, ppm): δ = 157.0 (C6), 146.3 (C2), 142.9 (d, J = 9.5 Hz, C4), 139.1 (C8), 124.8 (C5), 87.8 (d, J = 42.4 Hz, C1'), 86.0 (dd, J = 41.5 Hz, 38.7 Hz, C4'), 74.5 (dd, J = 42.3 Hz, 37.7 Hz, C2'), 70.7 (td, J = 38.0 Hz, 3.6 Hz, C3'), 61.7 (d, 41.9 Hz, C5').

HRMS (ESI-): berechnet für C₄¹³C₆H₁₁N₃¹⁵NO₅⁻ [M-H]⁻: 274.0907, gefunden: 274.0908.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3541 (w), 3304 (m), 3098 (m), 2892 (m), 2722 (m), 1684 (s), 1592 (m), 1411 (w), 1370 (w), 1214 (m), 1108 (m), 1048 (s), 1022 (s), 882 (m), 820 (m), 785 (m).

Schmelzbereich: 220–224°C.

2'-(*O*-*tert*-Butyldimethylsilyl)-3',5'-(*O*-di-*tert*-butylsilyl)-[$^{13}\text{C}_5\text{ }^{15}\text{N}$]-inosin (66)



Das Nukleosid **9** (244 mg, 887 µmol, 1.0 Äq.) wurde in einem trockenen Kolben in 9 mL tr. DMF gelöst und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurde Di-*tert*-butylsilyl-ditriflat (430 mg, 310 µL, 976 µmol, 1.1 Äq.) über 20 min zugetropft und nach 30 min bei 0 °C weiter 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von Imidazol (302 mg, 4.44 mmol, 5.0 Äq.) wurde für 30 min gerührt und in der Folge TBS-Cl (222 mg, 1.47 mmol, 1.7 Äq.) zugefügt. Die Lösung wurde dann für 3.5 h bei 60 °C gerührt und die Reaktion anschließend durch Zugabe von 10 mL H₂O beendet. Die wässrige Phase wurde mit EtOAc (2 × 50 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit ges. NaCl-Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel entfernt und der gelbe Rückstand mittels Säulenchromatographie gereinigt (CH₂Cl₂/MeOH = 20/1 → 5/1). Verbindung **66** (415 mg, 784 µmol, 88%) wurde als farbloses Harz isoliert.

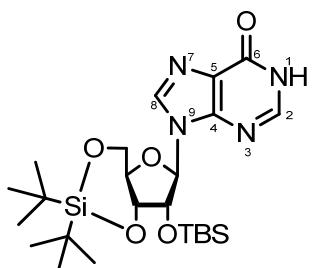
¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃, ppm): δ = 8.20 (s, 1 H, H2), 8.17 (dd, J = 214.7 Hz, 11.6 Hz, 1 H, H8), 6.02 (dd, J = 167.1 Hz, 3.0 Hz, 1 H, H1'), 4.52 (d, J = 150.9 Hz, 1 H, H3'), 4.45 (d, J = 154.1 Hz, 1 H, H2'), 4.11 (d, J = 148.9 Hz, 1 H, H4'), 3.93-3.64 (m, 2 H, H5'), 1.04 (s, 18 H, 2 × C(CH₃)₃), 0.91 (d, J = 23.3 Hz, 9 H, C(CH₃)₃), 0.90 (s, 6 H, 2 × CH₃), 0.16 (d, J = 2.4 Hz, 3 H, CH₃), 0.08 (d, J = 6.1 Hz, 3 H, CH₃).

¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃, ppm): δ = 158.8 (C6), 142.9 (C4), 142.6 (dd, J = 379.4 Hz, 10.3 Hz, C2), 138.7 (C8), 124.7 (C5), 89.0 (d, J = 41.2 Hz, C1'), 85.2 (dd, J = 46.0 Hz, 43.9 Hz, C4'), 75.5 (dd, J = 41.1 Hz, 38.1 Hz, C2'), 71.2 (dd, J = 38.4, 38.1 Hz, C3'), 62.1 (d, J = 43.8 Hz, C5'), 27.4 (6 C, 2 × (C(CH₃)₃), 25.9 (3 C, 1 × (C(CH₃)₃), 19.9 (2 C, 2 × (C(CH₃)₃), 18.1 (1 × (C(CH₃)₃), -4.7 (CH₃), -5.4 (CH₃).

HRMS (ESI+): berechnet für C₁₈¹³C₆H₄₃N₃¹⁵NO₅Si₂⁺ [M+H]⁺: 530.2938, gefunden: 530.2933.

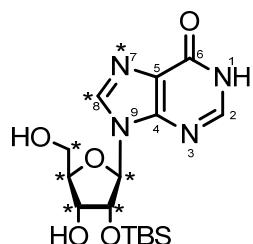
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3379 (w), 2948 (w), 2856 (w), 1663 (s), 1470 (m), 1251 (m), 1232 (m), 1091 (m), 1049 (m), 824 (s), 803 (m), 777 (s).

2'-(*O*-*tert*-Butyldimethylsilyl)-3',5'-(*O*-di-*tert*-butylsilyl)-inosin (80)



Inosin (304 mg, 1.13 mmol, 1.0 Äq.) wurden in 10 mL tr. DMF unter Eiskühlung vorgelegt und mit Di-*tert*-butylsilylditriflat (549 mg, 0.40 mL, 1.25 mmol, 1.1 Äq.) versetzt. Die Reaktionslösung wurde für 0.5 h bei 0 °C gerührt und anschließend Imidazol (348 mg, 5.65 mmol, 5.0 Äq.) zugesetzt. Die Reaktionslösung wurde für 0.5 h bei Raumtemperatur gerührt. Schließlich wurden TBSCl (302 mg, 1.36 mmol, 1.7 Äq.) zugegeben und die Reaktionslösung für 3 h auf 60 °C erwärmt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von gesättigter NaHCO₃-Lösung gestoppt, das Produkt mit 2 × 100 mL EtOAc extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit 2 × 120 mL ges. NaHCO₃-Lösung gewaschen. Nach Entfernung des Lösungsmittels *in vacuo* wurde das erhaltene klare Öl ohne weitere Aufreinigung in der Desilylierung eingesetzt.

2'-(*O*-*tert*-Butyldimethylsilyl)-[¹³C₅¹⁵N]-inosin (64)



Die Verbindung **66** (750 mg, 1.44 mmol, 1.0 Äq.) wurde in 30 mL tr. CH₂Cl₂ vorgelegt. Zunächst wurde 70% HF-Pyridin (205 mg, 180 µL, 1.44 mmol, 1.0 Äq.) mit 1 mL tr. Pyridin unter Stickstoffatmosphäre verdünnt und die erhaltene Lösung bei -8 °C über 30 min zur Lösung von **66** zugetropft. Es wurde für 2 h bei -8 °C und anschließend für 15 min bei Raumtemperatur gerührt und die Reaktion durch Zugabe vom TMSOMe im Überschuss (3 mL) beendet. Nach Entfernen des Lösungsmittel *in vacuo* wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (CH₂Cl₂/MeOH = 20/1 → 5/1). Die Verbindung **64** (420 mg, 1.08 mmol, 75%) wurde als weißer Schaum isoliert.

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD, ppm): δ = 8.38 (dd, *J* = 215.6 Hz, 11.5 Hz, 1 H, H8), 8.08 (s, 1 H, H2), 6.01 (dd, *J* = 166.8 Hz, 3.6 Hz, 1 H, H1'), 4.74 (dd, *J* = 146.6 Hz, 3.5 H, H2'), 4.31 (dd, *J* = 194.2 Hz, 3.3 Hz, 1 H, H3'), 4.15 (d, *J* = 155.9 Hz, 1 H, H4'), 3.99-3.57 (m, 2 H, H5'), 0.82 (s, 9 H, C(CH₃)₃), -0.02 (s, 3 H, CH₃), -0.13 (s, 3 H, CH₃).

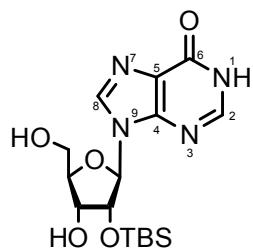
¹³C-NMR (101 MHz, CD₃OD, ppm): δ = 157.7 (C6), 145.5 (C4), 143.4 (d, *J* = 10.4 Hz, C2), 139.6 (s, C8), 124.7 (C5), 89.2 (d, *J* = 45.7 Hz, C1'), 86.5 (dd, *J* = 46.0 Hz, 39.7 Hz, 39.9 Hz, C4'), 76.4 (dd, *J* = 43.6 Hz,

38.2 Hz, C2'), 71.0 (dd, J = 38.3, 38.1 Hz, C3'), 61.6 (d, J = 41.3 Hz, C5'), 24.7 (3 C, (C(CH₃)₃), 17.5 (C(CH₃)₃), -6.3 (CH₃), -6.6 (CH₃).

HRMS (ESI-): berechnet für C₁₀¹³C₆H₂₅N₃¹⁵NO₅Si⁻ [M-H]⁻: 388.1771, gefunden: 388.1767.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3852 (w), 3743 (w), 2928 (m), 2361 (w), 1707 (s), 1684 (s), 1506 (m), 1471 (w), 1206 (w), 1126 (w), 1062 (w), 838 (m), 786 (m).

2'-(O-*tert*-Butyldimethylsilyl)-inosin (81)



Das Rohprodukt **80** (920 mg, theoretisch: 1.13 mmol, 1.0 Äq.) wurde in 10 mL tr. CH₂Cl₂ gelöst und unter Eiskühlung mit einer Mischung, aus 70% HF-Pyridin (0.14 mL, 161 mg, 1.13 mmol, 1.0 Äq.) gelöst in tr. Pyridin (0.73 mL, 723 mg, 9.00 mmol, 8.0 Äq.) versetzt und für 16 h bei 0 °C gerührt. Die Reaktion wurde mit einem Überschuss an Methoxytrimethylsilan gestoppt und das organische Lösungsmittel im Vakuum verdampft. Das Produkt wurde mittels Säulenchromatographie (CH₂Cl₂/MeOH = 30:1) gereinigt. Man erhielt Verbindung **81** (312 mg, 0.82 mmol, 72% über zwei Stufen) als klares Öl.

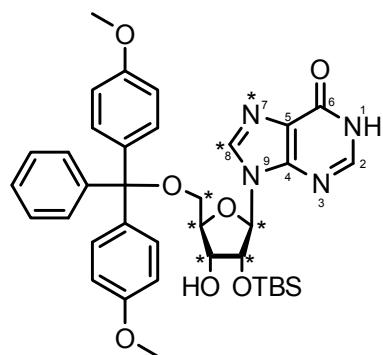
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d6, ppm): δ = 8.30 (s, 1 H, H8), 8.03 (s, 1 H, H2), 5.82 (d, J = 6.9 Hz, 1H, 1 H, H1'), 5.41 (d, J = 6.5 Hz, 1 H, H2'), 5.15 (m, 1 H, H3'), 4.55 (m, 1 H, H4'), 3.60-3.45 (m, 2 H, H5'), 0.88 (s, 9 H, C(CH₃)₃), -0.09 (s, 3 H, CH₃), -0.19 (s, 3 H, CH₃).

¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-d6) δ = 156.9 (C6), 148.8 (C4), 146.3 (C2), 139.3 (C8), 124.8 (C5), 87.3 (C1'), 86.9 (C4'), 73.7 (C2'), 73.1 (C3'), 61.6 (C5'), 26.3 (3 C, (C(CH₃)₃), 18.5 (C(CH₃)₃), -4.04 (CH₃), -4.53 (CH₃).

HRMS (ESI-): berechnet für C₁₆H₂₆N₄O₅SiCl⁻ [M+Cl]⁻: 417.1366, gefunden: 417.1364.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 2926 (w), 2845 (w), 2501 (w), 1694 (s), 1658 (m), 1549 (m), 1357 (m), 1341 (m), 1247 (m), 1230 (m), 1157 (m), 1137 (s), 1097 (m), 1079 (m), 1055 (m), 1033 (s), 864 (w), 825 (s), 786 (s).

5'-O-Dimethoxytrityl-2'-(*O*-*tert*-butyldimethylsilyl)-[$^{13}\text{C}_5\text{ }^{15}\text{N}$]-inosin (82)



Die Verbindung **64** (410 mg, 1.05 mmol, 1.0 Äq.) wurde in 10 mL tr. Pyridin gelöst und Dimethoxytritylchlorid (390 mg, 1.16 mmol, 1.1 Äq.) bei 0 °C zugegeben. Die Reaktionslösung wurde für 16 h bei 0 °C gerührt und im Anschluss das Lösungsmittel bei Raumtemperatur *in vacuo* entfernt. Der resultierende Feststoff wurde in CH₂Cl₂ aufgenommen und säulenchromatographisch gereinigt (Isohexan/Aceton/CH₂Cl₂ = 35/40/25) und das Produkt wurde als gelber Schaum isoliert (470 mg, 0.68 mmol, 65%).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, ppm): δ = 8.00 (d, J = 20.3 Hz, 1 H, H8), 7.94 (ddd, J = 213.3 Hz, 12.1 Hz, 11.8 Hz, 1 H, H2), 7.40-7.14 (m, 9 H, Ar), 6.78-6.73 (m, 4 H, Ar), 5.93 (d, J = 166.4 Hz, 1 H, H1'), 4.82 (d, J = 122.3 Hz, 1 H, H2'), 4.60 (d, J = 125.9 Hz, 1 H, H3'), 4.49 (d, J = 85.7 Hz, H4'), 3.73 (s, 6 H, 2 × OCH₃), 3.57 (dd, J = 7.3 Hz, 2.5 Hz, 1 H, H5'_α), 3.33 (d, J = 2.4 Hz, 1 H, H5'_β), 0.80 (d, J = 13.1 Hz, 9 H, C(CH₃)₃), -0.02 (s, 3 H, CH₃), -0.18 (s, 3 H, CH₃).

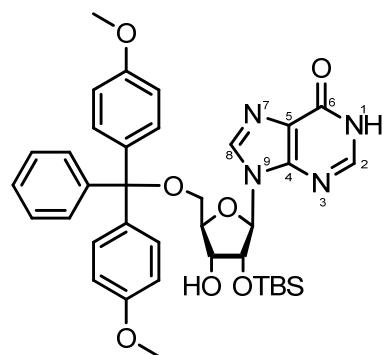
¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃, ppm): δ = 158.5 (2 × COCH₃), 157.7 (C6), 145.5 (C4), 141.0 (dd, J = 68.6 Hz, 10.1 Hz, C2), 139.9 (C-Ar), 138.1 (d, J = 21.4 Hz, C8), 135.5 (2 × C-Ar), 130.0 (2 × CH-Ar), 129.9 (2 × CH-Ar), 128.0 (CH-Ar), 127.8 (2 × CH-Ar), 126.9 (2 × CH-Ar), 126.8 (C5), 113.1 (4 × CH-Ar), 88.5 (ddd, J = 94.1 Hz, 42.8 Hz, 2.9 Hz, C1'), 86.8 (OC(C-Ar)₃), 84.2 (ddd, J = 43.3 Hz, 39.0 Hz, 4.7 Hz, C4'), 75.4 (ddd, J = 42.0 Hz, 36.7 Hz, 4.7 Hz, C2'), 74.7 (ddd, J = 38.7 Hz, 37.3 Hz, 3.1 Hz, C3'), 63.07 (dd, J = 43.5 Hz, 11.7 Hz, C5'), 55.2 (2 × OCH₃), 29.3 (C(CH₃)₃), 25.6 (C(CH₃)₃), -4.8 (d, J = 12.7 Hz, SiCH₃), -5.2 (d, J = 19.7 Hz, SiCH₃).

HRMS (ESI+): berechnet für C₃₁¹³C₆H₄₅N₃¹⁵NO₇Si⁺ [M+H]⁺: 692.3224, gefunden: 692.3228.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3114 (w), 3071 (w), 2929 (w), 2853 (w), 1699 (s), 1605 (w), 1686 (w), 1509 (s), 1249 (m), 1178 (m), 1132 (w), 1058 (m), 1028 (m), 975 (w), 871 (w), 832 (s).

Schmelzbereich: 163-164 °C.

5'-*O*-Dimethoxytrityl-2'-(*O*-*tert*-butyldimethylsilyl)-inosin (83)



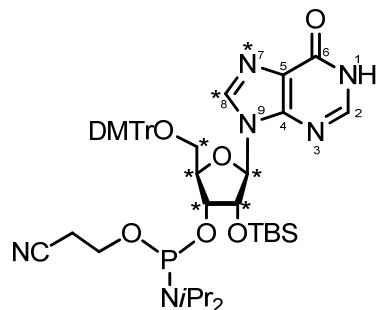
In einem ausgeheiztem Rundkolben wurden **81** (3.50 g, 9.26 mmol, 1.0 Äq.) vorgelegt und mit einer Lösung, von Dimethoxytritylchlorid (3.45 g, 10.2 mmol, 1.1 Äq.) in 10 mL tr. Pyridin, versetzt und bei 0 °C für 16 h gerührt. Die Reaktionslösung wurde *in vacuo* eingeengt und über Silicagel aufgereinigt (Isohexan/Aceton/CH₂Cl₂ = 35/40/25). Man erhielt die Verbindung **83** (4.30 g, 6.28 mmol, 68%) als gelben Schaum.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 8.07 (s, 1 H, H8), 8.03 (s, 1 H, H2), 7.44 (dd, J = 8.3 Hz, 1.0 Hz, 2 H, Ar), 7.33 (dd, J = 8.9 Hz, 0.8 Hz, 4 H, Ar), 7.28 (dd, J = 10.4 Hz, 4.8 Hz, 2 H, Ar), 7.21 (m, 1 H, Ar), 6.82 (m, 4 H, Ar), 6.01 (d, J = 5.6 Hz, 1 H, H1'), 4.89 (d, J = 5.3 Hz, 1 H, H2'), 4.33 (dd, J = 8.4 Hz, 3.6 Hz, 1 H, H3'), 4.27 (dd, J = 3.4 Hz, 3.3 Hz, 1 H, H4'), 3.78 (s, 3 H, OCH₃), 3.77 (s, 3 H, OCH₃), 3.51 (dd, J = 10.6 Hz, 3.1 Hz, 1 H, H5'_α), 3.40 (dd, J = 10.7 Hz, 3.9 Hz, 1 H, H5'_β), 0.85 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 0.01 (s, 3 H, CH₃), -0.12 (s, 3 H, CH₃).

¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): δ = 159.2 (2 × COCH₃), 158.5 (C6), 148.9 (C4), 144.9 (C-Ar), 144.5 (C2), 138.9 (C8), 135.5 (2 × C-Ar), 130.6 (4 × CH-Ar), 128.1 (CH-Ar), 127.9 (2 × CH-Ar), 127.0 (2 × CH-Ar), 125.0 (C5), 113.2 (4 × CH-Ar), 88.2 (C2'), 86.7(O(C(CH₃)₃), 84.3 (C4'), 76.0 (C2'), 71.6 (C3'), 63.4 (C5'), 55.3 (2 × OCH₃), 25.5 (C(CH₃)₃), 17.9 (C(CH₃)₃), -4.99 (SiCH₃), -5.20 (SiCH₃).

HRMS (ESI+): berechnet für C₃₇H₄₅N₄O₇Si⁺ [M+H]⁺: 685.3052, gefunden: 685.3049.

3'-(Diisopropylamino-cyanoethoxyphosphino)-5'-O-dimethoxytrityl-2'-(*O*-*tert*-butyldimethylsilyl)-[$^{13}\text{C}_5\ ^{15}\text{N}$]-inosin (67)

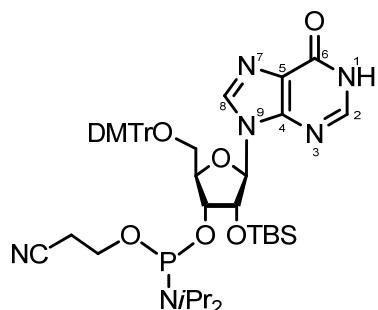


Verbindung **82** (120 mg, 174 μmol , 1.0 Äq.) wurde in 2 mL sorgfältig entgastem, tr. CH_2Cl_2 vorgelegt und unter Argonatmosphäre Diisopropylethylamin (85 mg, 120 μL , 690 μmol , 4.0 Äq.) zugegeben. Zur Lösung wurde 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit (164 mg, 155 μL , 690 μmol , 4.0 Äq.) zugefügt und unter Argonatmosphäre für 16 h gerührt. Die Reaktionslösung wurde direkt auf eine mit passiviertem Silicagel gepackte Chromatographiesäule aufgetragen ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow \text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} = 10/1$). Das Produkt wurde im Gemisch mit Diisopropylethylamin erhalten (232 mg) und ohne weitere Aufreinigung mittels Festphasensynthese in RNA eingebaut.

$^{31}\text{P-NMR}$ (81 MHz, CDCl_3): $\delta = 152.2, 151.3$.

HRMS (ESI $^-$): berechnet für $\text{C}_{40}\ ^{13}\text{C}_6\text{H}_{61}\text{ClN}_5\ ^{15}\text{NO}_8\text{PSi}^- [\text{M}+\text{Cl}]^-$: 926.3923, gefunden: 926.3930.

3'-(Diisopropylamino-cyanoethoxyphosphino)-5'-O-dimethoxytrityl-2'-(*O*-*tert*-butyldimethylsilyl)-inosin (84)



Unter Schutzgas wurde Verbindung **83** (250 mg, 0.36 mmol, 1.0 Äq.) in entgastem CH₂Cl₂ vorgelegt und mit *N,N*-Diisopropylethylamin (0.31 mL, 1.80 mmol, 5.0 Äq.) versetzt. Anschließend wurde die Reaktionslösung erneut entgast und 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit (212 mg, 0.20 mL, 0.87 mmol, 2.5 Äq.) zugegeben. Die Lösung wurde für 3 h bei Raumtemperatur gerührt und das Lösungsmittel daraufhin *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde über passiviertes Silicagel mit entgasten Lösungsmitteln gereinigt (DCM/MeOH = 10:1). Man erhielt die Zielverbindung **84** (300 mg, 0.33 mmol, 92%) in Form eines weißen Schaumes.

³¹P-NMR (CDCl₃, 81 MHz): δ = 151.4, 150.1.

HRMS (ESI+): berechnet für C₄₆H₆₂N₆O₈PSi⁻ [M+H]⁺: 885.4131, gefunden: 885.4149.

7 Abkürzungsverzeichnis

abs.	absolutiert (bei Lösungsmitteln)
Ac	Acetyl-
Ac ₂ O	Essigsäureanhydrid
AcOH	Essigsäure
Äq.	Äquivalente
BTT	Benzylthiotetrazol
BzCl	Benzoylchlorid
CAN	Cerammoniumnitrat
CED	(2-Cyanoethyl- <i>N,N</i> -diisopropyl)phosphoramidit
CEDCI	2-Cyanoethyl- <i>N,N</i> -diisopropylchlorophosphordiamidit
d	Dublett
DAST	Diethylaminoschweifeltrifluorid
dba	Dibenzylidenaceton
DC	Dünnschichtchromatographie
dC	Desoxycytidin
DCA	Dichloressigsäure
DCE	Dichloethan
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMT(r)	Dimethoxytrityl-
DS	Doppelstrang
EI	Elektrische Ionisation
ESI	Elektronenspray Ionisation
EtOAc	Ethylacetat
EtOH	Ethanol
FA	Ameisensäure (formic acid)
fC	5-Formyldesoxycytidin
ges.	gesättigt
h	Stunden
HMDS	1,1,1,3,3-Hexamethydisilazan

HRMS	Hochauflöste Massenspektrometrie
IR	Infrarotspektroskopie
IRD	<i>inosine-edited RNA duplex</i>
J	Kopplung
kat.	katalytisch
konz.	konzentriert
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
mESC	<i>mouse embryonic stem cell</i>
min	Minuten
MS	Massenspektrometrie, massenspektratisch
NBS	N-Bromsuccinimid
NMR	Nuklarmagnetische Resonanz Spektroskopie
PDC	Pyridiniumchlorochromat
ppm	part per million
s	Singulett
t	Triplet
TBSCl	<i>tert</i> -Butyldimethylsilylchlorid
TCA	Trichloressigsäure
TMSOTf	Trimethylsilyltrifluoromethanesulfonat
tr.	trocken

8 Literaturverzeichnis

- ¹ P. A. Jones, D. Takai, *Science* **2001**, *293*, 5532, 1068-1070. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics.
- ² B. L. Bass, H. Weintraub, *Cell* **1988**, 1089-1098. An unwinding activity that covalently modifies its double-stranded RNA substrate.
- ³ S. Feng, H. Li, J. Zhao, K. Pervushin, K. Lowenhaupt, T. U. Schwartz, P. Droege, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2011**, *18*, 169-176. Alternate rRNA secondary structures as regulators of translation.
- ⁴ A. Fire, S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, C. C. Mello, *Nature* **1998**, *391*, 806–811. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*.
- ⁵ A. D. Scadden, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2005**, *12*, 489-496. The RISC subunit Tudor-SN binds to hyper-edited double-stranded RNA and promotes its cleavage.
- ⁶ J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature* **1953**, *171*, 737-738. Molecular Structure of Nucleic Acids - a Structure for Deoxyribose Nucleic Acid.
- ⁷ A. D. Hershey, M. Chase, *J. Gen. Physiol.* **1952**, *36*, 39 – 56. Independent functions of viral protein and nucleic acids in growth of bacteriophage.
- ⁸ T. R. Cech, J. A. Steitz, *Cell* **2014**, *157*, 77-94. The Noncoding RNA Revolution—Trashing Old Rules to Forge New Ones.
- ⁹ M. C. Frith, M. Pheasant, J. S. Mattick, *Eur. J. Hum. Genet.* **2005**, *13*, 894–897. Genomics: The amazing complexity of the human transcriptome.
- ¹⁰ A. D. Riggs, *Cytogenet. Cell Genet.* **1975**, *14*, 9–25. X inactivation, differentiation, and DNA methylation.
- ¹¹ R. Holliday, J. E. Pugh, *Science* **1975**, *187*, 226–232. DNA modification mechanisms and gene activity during development.
- ¹² A. Bird, *Genes Dev.* **2002**, *16*, 6–21. DNA methylation patterns and epigenetic memory.
- ¹³ K. D. Robertson, *Nat. Rev. Genet.* **2005**, *6*, 597-610: DNA methylation and human disease.
- ¹⁴ W. Mayer, A. Niveleau, J. Walter, R. Fundele, T. Haaf, *Nature* **2000**, *403*, 501–502. Demethylation of the zygotic paternal genome.
- ¹⁵ M. Bostick, J. K. Kim, P.-O. Estève, A. Clark, S. Pradhan, S. E. Jacobsen, *Science* **2007**, *317*, 1760-1764. UHRF1 Plays a Role in Maintaining DNA Methylation in Mammalian Cells.
- ¹⁶ S. K. Bhattacharya, S. Ramchandani, N. Cervoni, M. Szyf, *Nature* **1999**, *397*, 579–583. A mammalian protein with specific demethylase activity for mCpG DNA.

¹⁷ B. Zhu, Y. Zheng, D. Hess, H. Angliker, S. Schwarz, M. Siegmann, S. Thiry, J. P. Jost, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2000**, 972, 5135–5139. 5-methylcytosine-DNA glycosylase activity is present in a cloned G/T mismatch DNA glycosylase associated with the chicken embryo DNA demethylation complex.

¹⁸ G. Barreto, A. Schäfer, J. Marhold, D. Stach, S.K. Swaminathan, V. Handa, G. Döderlein, N. Maltby, W. Wu, F. Lyko, C. Niehrs, *Nature* **2007**, 445, 671–675. Gadd45a promotes epigenetic gene activation by repair-mediated DNA demethylation.

¹⁹ H. D. Morgan, W. Dean, H. A. Coker, W. Reik, S. K. Petersen-Mahrt, *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 52353–52360. Activation-induced cytidine deaminase deaminates 5-methylcytosine in DNA and is expressed in pluripotent tissues: implications for epigenetic reprogramming.

²⁰ R. Bransteitter, P. Pham, M. D. Scharff, M. F. Goodman, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, 100, 4102–4107. Activation-induced cytidine deaminase deaminates deoxycytidine on single-stranded DNA but requires the action of RNase.

²¹ C. S. Nabel, H. Jia, Y. Ye, L. Shen, H. L. Goldschmidt, J. T. Stivers, Y. Zhang, R. M. Kohli, *Nat. Chem. Biol.* **2012**, 8, 751–758. AID/APOBEC deaminases disfavor modified cytosines implicated in DNA demethylation

²² R. Métivier, R. Gallais, C. Tiffache, C. Le Péron, R.Z. Jurkowska, R. P. Carmouche, D. Ibberson, P. Barath, F. Demay, G. Reid, V. Benes, A. Jeltsch, F. Gannon, G. Salbert, *Nature* **2008**, 452, 45–50. Cyclical DNA methylation of a transcriptionally active promoter.

²³ S. Kriaucionis, N. Heintz, *Science* **2009**, 324, 929–930. The Nuclear DNA Base 5-Hydroxymethylcytosine Is Present in Purkinje Neurons and the Brain.

²⁴ T. Pfaffeneder, B. Hackner, M. Truss, M. Münzel, M. Müller, C. A. Deiml, C. Hagemeier, T. Carell, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, 50, 7008–7012. The discovery of 5-formylcytosine in embryonic stem cell DNA.

²⁵ S. Ito, A. C. D'Alessio, O. V. Taranova, K. Hong, L. C. Sowers, Y. Zhang, *Nature* **2010**, 466, 1129–1133. Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification.

²⁶ S. Ito, L. Shen, Q. Dai, S. C. Wu, L. B. Collins, J. A. Swenberg, C. He, Y. Zhang, *Science* **2011**, 333, 1300–1303. Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine.

²⁷ V. Valinluck, H. H. Tsai, D.K. Rogstad, A. Burdzy, A. Bird, L.C. Sowers, *Nucleic Acids Res.* **2004**, 32, 4100–4108. Oxidative damage to methyl-CpG sequences inhibits the binding of the methyl-CpG binding domain (MBD) of methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2)

²⁸ H. Wu, Y. Zhang, *Cell* **2014**, 156, 45–68. Reversing DNA Methylation: Mechanisms, Genomics, and Biological Functions.

²⁹ S. Seisenberger, S. Andrews, F. Krueger, J. Arand, J. Walter, F. Santos, C. Popp, B. Thienpont, W. Dean, W. Reik, *Mol. Cell* **2012**, 48, 849–862. The dynamics of genome-wide DNA methylation reprogramming in mouse primordial germ cells

³⁰ S. Guibert, T. Forné, M. Weber, *Genome Res.* **2012**, 22, 633–641. Global profiling of DNA methylation erasure in mouse primordial germ cells.

³¹ C.C. Chen, K.Y. Wang, C.K. Shen, *J. Biol. Chem.* **2012**, 287, 33116–33121. The mammalian de novo DNA methyltransferases DNMT3A and DNMT3B are also DNA 5-hydroxymethylcytosine dehydroxymethylases.

³² J. A. Smiley, M. Kundracik, D. A. Landfried, V. R. Barnes Sr., A. A. Axhemi, *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, 1723, 256–264. Genes of the thymidine salvage pathway: thymine-7-hydroxylase from a Rhodotorula glutinis cDNA library and iso-orotate decarboxylase from Neurospora crassa.

³³ S. C. Wu, Y. Zhang, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2010**, 11, 607–620. Active DNA demethylation: many roads lead to Rome.

³⁴ J .A. Smiley, M. Kundracik, D.A. Landfried, V.R. Barnes Sr., A.A. Axhemi, *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, 1723, 256–264. Genes of the thymidine salvage pathway: thymine-7-hydroxylase from a Rhodotorula glutinis cDNA library and iso-orotate decarboxylase from Neurospora crassa.

³⁵ S. Schiesser, B. Hackner, T. Pfaffeneder, M. Müller, C. Hagemeier, M. Truss, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 6516–6520. Mechanism and stem-cell activity of 5-carboxycytosine decarboxylation determined by isotope tracing.

³⁶ S. Seisenberger, J. R. Peat, W. Reik, *Curr Opin Cell Biol* **2013**, 25, 281–288. Conceptual links between DNA methylation reprogramming in the early embryo and primordial germ cells.

³⁷ Y.-W. Jung, E. Hysolli, K.-Y. Kim, Y. Tanaka, I.-H. Park, *Curr Opin Neurol.* **2012**; 25, 125–130. Human induced pluripotent stem cells and neurodegenerative disease: prospects for novel therapies.

³⁸ A. Colman, O. Dreesen, *Cell Stem Cell* **2009**, 5, 244–247. Pluripotent stem cells and disease modeling.

³⁹ Y. He, B. Z. Li, Z. Li, P. Liu, Y. Wang, Q. Tang, J. Ding, Y. Jia, Z. Chen, L. Li, Y. Sun, X. Li, Q. Dai, C.-X. Song, K. Zhang, C. He, G.-L. Xu, *Science*, **2011**, 333, 1303–1307. Tet-Mediated Formation of 5-Carboxylcytosine and Its Excision by TDG in Mammalian DNA.

⁴⁰ B. Pan, S. N. Mitra, L. Sun, D. Hart, M. Sundaralingam, *Nucleic Acids Res.* **1998**, 26, 5699–5706. Crystal structure of an RNA octamer duplex r(CCCIUGGG)2 incorporating tandem I.U wobbles.

⁴¹ T. J. Knott, R. J. Pease, L. M. Powell, S. C. Wallis, S. C. Rall, T. L. Innerarity, B. Blackhart, W. H. Taylor, Y. Marcel, R. Milne, D. Johnson, M. Fuller, A. J. Lusis, B. J. McCarthy, R. W. Mahley, B. Levy-Wilson, J. Scott, *Nature* **1986**, 323, 734–738. Complete protein sequence and identification of structural domains of human apolipoprotein B.

⁴² L. M. Powell, S. C. Wallis, R. J. Pease, Y. H. Edwards, T. J. Knott, J. Scott, *Cell* **1987**, 50, 831–840. A novel form of tissue-specific RNA processing produces apolipoprotein-B48 in intestine.

⁴³ P.P. Lau, W. J. Xiong, H. J. Zhu, S. H. Chen, L. Chan, *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 20550–20554. Apolipoprotein B mRNA editing is an intranuclear event that occurs posttranscriptionally coincident with splicing and polyadenylation.

⁴⁴ B. L. Bass, H. Weintraub, *Cell* **1988**, 55, 1089–1098. An unwinding activity that covalently modifies its double-stranded RNA substrate.

⁴⁵ B. L. Bass, , K. Nishikura, W. Keller, P. H. Seburg, R. B. Emeson, M. A. O'Connell, C. E. Samuel, A. A. Herbert, *RNA* **1997**, *3*, 947–949. A standardized nomenclature for adenosine deaminases that act on RNA.

⁴⁶ M. Higuchi, F. N. Single, M. Köhler, B. Sommer, R. Sprengel, P. H. Seburg, *Cell* **1993**, *75*, 1361–1370. RNA editing of AMPA receptor subunit GluR-B: a base-paired intron–exon structure determines position and efficiency.

⁴⁷ J. M. Ryter, S. C. Schultz, *EMBO J.* **1998**, *17*, 7505–7513. Molecular basis of doublestranded RNA–protein interactions: structure of a dsRNAbinding domain complexed with dsRNA.

⁴⁸ A. Ramos, S. Grünert, J. Adams, D. R. Micklem, M. R. Proctor, S. Freund, M. Bycroft, D. St Johnston, G. Varani, *EMBO J.* **2000**, *19*, 997–1009. RNA recognition by a Staufen doublestranded RNA-binding domain.

⁴⁹ O. M. Stephens, H. Y. Yi-Brunozzi, P. A. Beal, *Biochemistry* **2000**, *39*, 12243–12251. Analysis of the RNA-editing reaction of ADAR2 with structural and fluorescent analogues of the GluR-B R/G editing site.

⁵⁰ D. S. Cho, W. Yang, J. T. Lee, R. Shiekhattar, J. M. Murray, K. Nishikura, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 17093–17102. Requirement of dimerization for RNA editing activity of adenosine deaminases acting on RNA.

⁵¹ K. A. Chilibек, T. Wu, C. Liang, M. J. Schellenberg, E. M. Gesner, J. M. Lynch, A. M. MacMillan, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 16530–16535. FRET analysis of in vivo dimerization by RNA-editing enzymes.

⁵² H. Poulsen, R. Jorgensen, A. Heding, F. C. Nielsen, B. Bonven, J. Egebjerg, *RNA* **2006**, *12*, 1350–1360. Dimerization of ADAR2 is mediated by the double-stranded RNA binding domain.

⁵³ W. Zhou, D. Karcher, R. Bock, *Nucl. Acids Res.* **2013**, *41*, 3362-3372. Importance of adenosine-to-inosine editing adjacent to the anticodon in an *Arabidopsis* alanine tRNA under environmental stress.

⁵⁴ J. Wolf, A. P. Gerber, W. Keller, *EMBO J.* **2002**, *21*, 3841–3851. tadA, an essential tRNA-specific adenosine deaminase from *Escherichia coli*.

⁵⁵ L. P. Keegan, A. Gallo, M. A. O'Connell, *Nat. Rev. Genet.* **2001**, *2*, 869–878. The many roles of an RNA editor.

⁵⁶ E. Y. Levanon, E. Eisenberg, R. Yelin, S. Nemzer, M. Hallegot, *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 1001–1005. Systematic identification of abundant A-to-I editing sites in the human transcriptome.

⁵⁷ S. M. Rueter, T. R. Dawson, R. B. Emeson, *Nature* **1999**, *399*, 75–80. Regulation of alternative splicing by RNA editing.

⁵⁸ G. Lev-Maor, R. Sorek, E. Y. Levanon, N. Paz, E. Eisenberg, G. Ast *Genome Biol.* **2007**, *8*, R29. RNA-editing-mediated exon evolution.

⁵⁹ G. Meister, T. Tuschl, *Nature* **2004**, *431*, 343–349. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA.

⁶⁰ G. J. Hannon, *Nature* **2002**, *418*, 244–251. RNA interference.

- ⁶¹ K. Nishikura, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2006**, *7*, 919–931. Editor meets silencer: crosstalk between RNA editing and RNA interference.
- ⁶² B. L. Bass, *Cell* **2000**, *101*, 235–238. Double-stranded RNA as a template for gene silencing.
- ⁶³ A. D. Scadden, C. W. Smith, *EMBO Rep.* **2001**, *2*, 1107–1111. RNAi is antagonized by A→I hyper-editing.
- ⁶⁴ A. D. Scadden, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2005**, *12*, 489–496. The RISC subunit Tudor-SN binds to hyper-edited double-stranded RNA and promotes its cleavage.
- ⁶⁵ R. L. Letsinger, K. K. Ogilvie, *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 3350-3355. Synthesis of oligothymidylates via phosphotriester intermediates.
- ⁶⁶ M. D. Matteucci, M. H. Caruthers, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 3185-3191. Synthesis of deoxyoligonucleotides on a polymer support.
- ⁶⁷ R. I. Hogrefe, B. Midthune, A. Lebedev, *Isr. J. Chem.* **2013**, *53*, 326–349. Current Challenges in Nucleic Acid Synthesis.
- ⁶⁸ D. A. Lashkari, S. P. Hunicke-Smith, R. M. Norgren, R. W. Davis, T. Brennan, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1995**, *92*, 7912–7915. An automated multiplex oligonucleotide synthesizer: development of high-throughput, low-cost DNA synthesis.
- ⁶⁹ S. G. Gregory, K. F. Barlow, K. E. McLay u. a., *Nature* **2006**, *441*, 315-321. The DNA sequence and biological annotation of human chromosome 1.
- ⁷⁰ M. C. Pirrung, L. Fallon, G. McGall, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 241-246. Proofing of Photolithographic DNA Synthesis with 3',5'-Dimethoxybenzoinyloxycarbonyl-Protected Deoxynucleoside Phosphoramidites.
- ⁷¹ S. P. A. Fodor, J. L. Read, M. C. Pirrung, L. Stryer, A. T. Lu, D. Solas, *Science* **1991**, *251*, 767-773. Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis.
- ⁷² S. Berner, K. Mühlegger, H. Seliger, *Nucleic Acids Res.* **1989**, *17*, 853-864. Studies on the role of tetrazole in the activation of phosphoramidites.
- ⁷³ B. H. Dahl, J. Nielsen, O. Dahl, *Nucleic Acids Res.* **1987**, *15*, 1729-1743. Mechanistic studies on the phosphoramidite coupling reaction in oligonucleotide synthesis. I. Evidence for nucleophilic catalysis by tetrazole and rate variations with the phosphorus substituents.
- ⁷⁴ X. Wei, *Tetrahedron* **2013**, *69*, 3615-3637. Coupling activators for the oligonucleotide synthesis via phosphoramidite approach.
- ⁷⁵ M. Smith, H. G. Khorana, D. H. Rammier, I. H. Goldberg, *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, *84*, 430-440. Specific Synthesis of the C₃-C_{5'} Interribonucleotide Linkage. Syntheses of Uridylyl-(3'→5')-Uridine and Uridylyl-(3'→5')-Adenosine.
- ⁷⁶ M. Müntzel, D. Globisch, C. Trindler, T. Carell, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 5671-5673. Efficient Synthesis of 5-Hydroxymethylcytosine Containing DNA.

⁷⁷ M. Müntzel, U. Lischke, D. Stathis, T. Pfaffeneder, F. A. Gnerlich, C. A. Deiml, S. C. Koch, K. Karaghiosoff, T. Carell, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 13782-13788. Improved Synthesis and Mutagenicity of Oligonucleotides Containing 5-Hydroxymethylcytosine, 5-Formylcytosine and 5-Carboxylcytosine.

⁷⁸ Q. Dai, C. He, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 3446-3449. Syntheses of 5-formyl- and 5-carboxyl-dC containing DNA oligos as potential oxidation products of 5-hydroxymethylcytosine in DNA.

⁷⁹ D. Globisch, M. Müntzel, M. Müller, S. Michalakis, M. Wagner, S. Koch, T. Brückl, M. Biel, T. Carell, *PLoS ONE* **2010**, *5*, e15367. Tissue Distribution of 5-Hydroxymethylcytosine and Search for Active Demethylation Intermediates.

⁸⁰ Y. Nomura, N. Haginoya, Y. Ueno, A. Matsuda, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 2811-2816. Incorporation of 5-(N-aminoalkyl)carbamoyl-2'-deoxycytidines into oligodeoxyribonucleotides by a convenient post-synthetic modification method.

⁸¹ N. Karino, Y. Ueno, A. Matsuda, *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 2456-2463. Synthesis and properties of oligonucleotides containing 5-formyl-2'-deoxycytidine: in vitro DNA polymerase reactions on DNA templates containing 5-formyl-2'-deoxycytidine.

⁸² S. Schiesser, T. Pfaffeneder, K. Sadeghian, B. Hackner, B. Steigenberger, A. S. Schroeder, J. Steinbacher, G. Kashiwazaki, G. Höfner, K.T. Wanner, C. Ochsenfeld, T. Carell, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 14593-14539. Deamination, Oxidation and C-C bond Cleavage Reactivity of 5-Hydroxymethylcytosine, 5-Formylcytosine and 5-Carboxycytosine.

⁸³ S. Schiesser, B. Hackner, T. Pfaffeneder, M. Müller, C. Hagemeier, M. Truss, T. Carell, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2012**, *51*, 6516-6520. Mechanism and Stem-Cell Activity of 5-Carboxycytosine Decarboxylation Determined by Isotope Tracing.

⁸⁴ S. Schießer, Dissertation **2014**, LMU München, Fakultät für Chemie und Pharmazie. Synthese neuer Cisplatin-N-Lost-Konjugate und epigenetisch relevanter C5-modifizierter Cytosin Derivate.

⁸⁵ M. Müntzel, U. Lischke, D. Stathis, T. Pfaffeneder, F. A. Gnerlich, C. A. Deiml, S. C. Koch, K. Karaghiosoff, T. Carell, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 13782-13788. Improved Synthesis and Mutagenicity of Oligonucleotides Containing 5-Hydroxymethylcytosine, 5-Formylcytosine and 5-Carboxylcytosine.

⁸⁶ S. L. Beaucage R. P. Iyer, *Tetrahedron*, **1992**, *48*, 2223-2311. Advances in the synthesis of oligonucleotides by the phosphoramidite approach.

⁸⁷ M. P. Reddy, N. B. Hanna, F. Farooqui, *Nucleosides and Nucleotides*, **1997**, *16*, 1589-1598. Ultrafast Cleavage and Deprotection of Oligonucleotides Synthesis and Use of C^{Ac} Derivatives.

⁸⁸ B. Mullah, A. Andrus, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 5751-5754. Automated Synthesis of Double Dye-Labeled Oligonucleotides using Tetramethylrhodamine (TAMRA) Solid Supports.

⁸⁹ L. C. J. Gillet, J. Alzeer, O. D. Schärer, *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 1961-1969. Site-specific incorporation of N-(deoxyguanosin-8-yl)-2-acetylaminofluorene (dG-AAF) into oligonucleotides using modified 'ultra-mild' DNA synthesis.

⁹⁰ W. H. A. Kuijpers, E. Kuyleheskiely, J. H. Vanboom, C. A. A. Vanboeckel, *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 3493-3500. The application of the AMB protective group in the solid-phase synthesis of methylphosphonate DNA analogues.

⁹¹ M. H. Caruthers, S. L. Beaucage, C. Becker, J. W. Efcavitch, E. F. Fisher, G. Galluppi, R. Goldman, P. deHaseth, M. Matteucci, L. McBride, *Gene Amplif. Anal.*, **1983**, *3*, 1-26. Deoxyoligonucleotide synthesis via the phosphoramidite method.

⁹² M. A. Reynolds, M. A. Reynolds, R. I. Hogrefe, J. A. Jaeger, D. A. Schwartz, T. A. Riley, W. B. Marvin, W. J. Daily, M. M. Vaghefi, T. A. Beck, S. K. Knowles, R. E. Klem, L. J. Arnold, *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 4584-4591. Synthesis and Thermodynamics of Oligonucleotides Containing Chirally Pure RP Methylphosphonate Linkages.

⁹³ I. Ugi, P. Jacob, B. Landgraf, C. Rupp, P. Lemmen, U. Verfürth, *Nucleosides & Nucleotides* **1988**, *7*, 605 - 608. Phosphite Oxidation and the Preparation of Five-Membered Cyclic Phosphorylating Reagents Via the Phosphites.

⁹⁴ S. L. Beaucage, M. H. Caruthers, *Curr Protoc Nucleic Acid Chem.* **2000**, *1*, Kapitel 3.3: Synthetic Strategies and Parameters Involved in the Synthesis of Oligodeoxynucleotides According to the Phosphoramidite Method.

⁹⁵ Y. Hayakawa, M. Uchiyama, R. Noyori, *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 4191-4194. Nonaqueous oxidation of nucleoside phosphites to the phosphates.

⁹⁶ X. Wei, *Tetrahedron* **2013**, *69*, 3615-3637. Coupling activators for the oligonucleotide synthesis via phosphoramidite approach.

⁹⁷ T. Lindahl, *Nature* **1993**, *362*, 6422, 709-715. Instability and decay of the primary structure of DNA.

⁹⁸ M. Septak, *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 3053-3058. Kinetic studies on depurination and detritylation of CPG-bound intermediates during oligonucleotide synthesis.

⁹⁹ H. Köster, N. D. Sinha, U.S. Patent 4725677 **1988**. Process for the preparation of oligonucleotides.

¹⁰⁰ P. J. McHugh, J. Knowland, *Nucleic Acids Res.* **1995**, *23*, 1664-1670. Novel reagents for chemical cleavage at abasic sites and UV photoproducts in DNA.

¹⁰¹ D.-H. Fan, H. Wang, X.-X. Mao, Y.-M. Shen, *Molecules* **2010**, *15*, 6493-6501. An Efficient and Chemoselective Procedure for Acylal Synthesis.

¹⁰² G. H. Clever, Dissertation **2005**, LMU München: Fakultät für Chemie und Pharmazie. Synthese und Charakterisierung eines Metall-Salen Basenpaares für den Aufbau von programmierten Metallanordnungen im Inneren von DNA-Doppelhelices.

¹⁰³ A. Okamoto, K. Tainaka, I. Saito, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 4581-4583. A facile incorporation of the aldehyde function into DNA: 3-formylindole nucleoside as an aldehyde-containing universal nucleoside.

¹⁰⁴ T. Mitsui, A. Kitamura, M. Kimoto, T. To, A. Sato, I. Hirao, Ichiro; S. Yokoyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 5298-5307. An unnatural hydrophobic base pair with shape complementarity between pyrrole-2-carbaldehyde and 9-methylimidazo[(4,5)-b]pyridine.

¹⁰⁵ A. S. Schröder, J. Steinbacher, B. Steigenberger, F. A. Gnerlich, S. Schiesser, T. Pfaffeneder, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53, 321–324. Synthesis of a DNA Promoter Segment Containing All Four Epigenetic Nucleosides: 5-Methyl-, 5-Hydroxymethyl-, 5-Formyl-, and 5-Carboxy-2'-Deoxycytidine.

¹⁰⁶ C. G. Spruijt, F. Gnerlich, A. H. Smits, T. Pfaffeneder, P. W. T. C. Jansen, C. Bauer, M. Münzel, M. Wagner, M. Müller, F. Khan, H. C. Eberl, A. Mensinga, A. B. Brinkman, K. Lephikov, U. Müller, J. Walter, R. Boelens, H. van Ingen, H. Leonhardt, T. Carell, M. Vermeulen, *Cell.* **2013**, 152, 1146-59. Dynamic readers for 5-(hydroxy)methylcytosine and its oxidized derivatives.

¹⁰⁷ P. A. Defossez, I. Stancheva, *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **2011**, 101, 377–398. Biological functions of methyl-CpGbinding proteins.

¹⁰⁸ S. E. Ong, B. Blagoev, I. Kratchmarova, D. B. Kristensen, H. Steen, A. Pandey, M. Mann, *Mol Cell Proteomics* **2002**, 376-386. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics.

¹⁰⁹ S. E. Ong, M. Mann, *Nat. Chem. Biol.* **2005**, 1, 252-262. Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative.

¹¹⁰ M. Münzel, D. Globisch, T. Brückl, M. Wagner, V. Welzmiller, S. Michalakis, M. Müller, M. Biel, T. Carell, *Angew Chem Int Ed* **2010**, 49, 5375-5377. Quantification of the Sixth DNA Base Hydroxymethylcytosine in the Brain.

¹¹¹ D. Globisch, D. Pearson, A. Hienzsch, T. Brückl, M. Wagner, I. Thoma, P. Thumbs, V. Reiter, A. Kneuttinger, M. Müller, S. Sieber, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 9739-9742. Systems-Based Analysis of Modified tRNA Bases.

¹¹² D. Globisch, M. Münzel, M. Müller, S. Michalakis, M. Wagner, S. Koch, T. Brückl, M. Biel, T. Carell, *PLoS One* **2010**, 5, e15367. Tissue Distribution of 5-Hydroxymethylcytosine and Search for Active Demethylation Intermediates.

¹¹³ D. Pearson, A. Hienzsch, M. Wagner, D. Globisch, V. Reiter, D. Özden, T. Carell, *Chem. Commun.* **2011**, 47, 5196-5198. LC-MS based quantification of 2'-ribosylated nucleosides Ar(p) and Gr(p) in tRNA.

¹¹⁴ M. Münzel, D. Globisch, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 6460-6468. 5-Hydroxymethylcytosine, the sixth base of the genome.

¹¹⁵ T. Pfaffeneder, B. Hackner, M. Truss, M. Münzel, M. Müller, C. A. Deiml, C. Hagemeier, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 7008-7012. The discovery of 5-formylcytosine in embryonic stem cell DNA.

¹¹⁶ C. G. Spruijt, H. I. Baymaz, M. Vermeulen *Methods Mol. Biol.* **2013**, 977, 137-157. Identifying Specific Protein-DNA Interactions Using SILAC-Based Quantitative Proteomics.

¹¹⁷ S. Yamanaka, H. M. Blau, *Nature* **2010**, 465, 704-712. Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches.

¹¹⁸ K. Okita, S. Yamanaka, *Exp. Cell Res.* **2010**, 316, 2565-2570. Induction of pluripotency by defined factors.

¹¹⁹ M. B. Stadler, R. Murr, L. Burger, R. Ivanek, F. Lienert, A. Scholer, E. van Nimwegen, C. Wirbelauer, E. J. Oakeley, D. Gaidatzis, V. K. Tiwari, D. Schübeler, *Nature* **2012**, *480*, 490–495. DNA-binding factors shape the mouse methylome at distal regulatory regions.

¹²⁰ P. Hajkova, S. J. Jeffries, C. Lee, N. Miller, S. P. Jackson, M. A. Surani, *Science* **2010**, *329*, 78–82. Genome-wide reprogramming in the mouse germ line entails the base excision repair pathway.

¹²¹ M. Wossidlo, J. Arand, V. Sebastian, K. Lepikhov, M. Boiani, R. Reinhardt, H. Schöler, J. Walter, *EMBO J.* **2010**, *29*, 1877-1888. Dynamic link of DNA demethylation, DNA strand breaks and repair in mouse zygotes.

¹²² T. Bartke, M. Vermeulen, B. Xhemalce, S. C. Robson, M. Mann, T. Kouzarides, *Cell* **2010**, *143*, 470–484. Nucleosome-interacting proteins regulated by DNA and histone methylation.

¹²³ A. Maiti, A. C. Drohat, *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 35334–35338. Thymine DNA glycosylase can rapidly excise 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine: potential implications for active demethylation of CpG sites.

¹²⁴ O. Bogdanović, A. H. Smits, E. de la Calle Mustienes, C. Hidalgo, N. Lopez, T. Rayon, L. Sanchez-Arrones, M. D. Schultz, F. Gnerlich, T. Carell, P. Bovolenta, M. Manzanares, J. R. Ecker, R. Lister, M. Vermeulen, J. L. Gómez-Skarmeta, *PlosOne* **2014**, *in press*. Enhancer demethylation and dynamic 5-methylcytosine readers delineate the 2 phyletic stage of embryonic development.

¹²⁵ (a) V. E. Marquez, C. K.-H. Tseng, H. Mitsuya, S. Aoki, J. A. Kelley, H. Ford, J. S. Roth, S. Broder, D. G. Johns, J. S. J. Driscoll, *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 978-985. Acid-stable 2'-fluoro purine dideoxynucleosides as active agents against HIV.

(b) J. L. York, *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 2171-2173. Effect of the structure of the glycon on the acid-catalyzed hydrolysis of adenine nucleosides.

(c) H. Ikeda, R. Fernandez, A. Eilk Jr., V. E. Marquez, *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 2237-2244. The effect of two antipodal fluorine-induced sugar pucks on the conformation and stability of the Dickerson-Drew dodecamer duplex [d(CGCGAATTCGCG)]₂.

(d) M. L. Sinnott, *Chem. Rev.* **1990**, *90*, 1171. Catalytic mechanism of enzymic glycosyl transfer.

¹²⁶ W. Saenger, *Principles of Nucleic Acid Structure*. Springer-Verlag, New York, **1984**.

¹²⁷ I. Berger, V. Tereshko, H. Ikeda, V. E. Marquez, M. Egli, *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 2473–2480. Crystal structures of B-DNA with incorporated 2'-deoxy-2'-fluoro-arabino-furanosyl thymines: implications of conformational preorganization for duplex stability.

¹²⁸ S. Lee, B. R. Bowman, Y. Ueno, S. Wang, G. L. Verdine, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 11570-11571. Synthesis and structure of duplex DNA containing the genotoxic nucleobase lesion N7-methylguanine.

¹²⁹ A. H. Al-Huseini, H. W. Moore, *J. Org. Chem.* **1985**, 2597-2598. A Stereocontrolled Synthesis of 1,3,5-Tri-O-benzoyl-a-D-ribofuranose.

¹³⁰ P. Liu, A. Sharon, C. K. Chu, *J. Fluor. Chem.* **2008**, *129*, 743-766. Fluorinated nucleosides: Synthesis and biological implication.

¹³¹ J. Asakura, M. J. Robins, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 4928-4933. Cerium (IV)-mediated halogenation at C-5 of uracil derivatives.

¹³² (a) J. Ludwig, F. Eckstein, *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 631-535. Rapid and efficient synthesis of 5'-O-(1-thiotriphosphates), 5'-triphosphate and 2',3'-cyclophosphorothioates using 2-chloro-4H-1,3,2-benzodioxaphosphorin-4-one.

(b) J. Caton-Williams, M. Smith, N. Carrasco, Z. Huang, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 4156-4159. Protection-free One-pot Synthesis of 2'-Deoxynucleoside 5'-Triphosphates and DNA Polymerization.

¹³³ T. Schwartz, M. A. Rould, K. Lowenhaupt, A. Herbert, A. Rich, *Science* **1999**, *284*, 1841-1845. Crystal Structure of the Z α Domain of the Human Editing Enzyme ADAR1 Bound to Left-Handed Z-DNA.

¹³⁴ B. Z. Tan, H. Huang, R. Lam, T. W. Soong, *Mol. Brain* **2009**, *2*:13. Dynamic regulation of RNA editing of ion channels and receptors in the mammalian nervous system.

¹³⁵ C. E. Samuel, *Virology* **2011**, *411*, 180–193. Adenosine deaminases acting on RNA (ADARs) are both antiviral and proviral.

¹³⁶ B. Pan, S. N. Mitra, L. Sun, D. Hart, M. Sundaralingam, *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 5699-5706. Crystal structure of an RNA octamer duplex r(CCCIUGGG)2 incorporating tandem I.U wobbles.

¹³⁷ M. J. Serra, P. E. Smolter, E. Westhof, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 1824-1828. Pronounced instability of tandem IU base pairs in RNA.

¹³⁸ R. T. Batey, M. Inada, E. Kujawinski, J. D. Puglisi, J. R. Williamson, *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20*, 4515–4523. Preparation of isotopically labeled ribonucleotides for multidimensional NMR spectroscopy of RNA.

¹³⁹ E. P. Nikonowicz, A. Sirr, P. Legault, F. M. Jucker, L. M. Baer, A. Pardi, *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20*, 4507–4513. Preparation of ¹³C and ¹⁵N labelled RNAs for heteronuclear multi-dimensional NMR studies.

¹⁴⁰ A. D. Scadden, C. W. Smith, *EMBO J.* **2001**, *20*, 4243-4252. Specific cleavage of hyper-edited dsRNAs.

¹⁴¹ A. D. Scadden, C. W. Smith, *EMBO J.* **1997**, *16*, 2140-2149. A ribonuclease specific for inosine-containing RNA: a potential role in antiviral defence?

¹⁴² Y. Saito, T. A. Zevaco, L. A. Agrofoglio, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 9593-9603. Chemical synthesis of ¹³C labeled anti-HIV nucleosides as mass-internal standards.

¹⁴³ R. Green, J. W. Szostak, S. A. Benner, A. Rich, N. Usman, *Nucleic Acids Res.* **1991**, *19*, 4161-4166. Synthesis of RNA containing inosine: analysis of the sequence requirements for the 5' splice site of the Tetrahymena group I intron.

¹⁴⁴ J. Matulic-Adamic, L. Beigelman, *Synth. Commun.* **2000**, *30*, 3963-3969. An Improved Synthesis of Inosine 3'-Phosphoramidite.

¹⁴⁵ C. L. Li, W. Z. Yang, Y. P. Chen, H. S. Yuan, *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, 3579-3589. Structural and functional insights into human Tudor-SN, a key component linking RNA interference and editing.