

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

**Synthese modifizierter Nukleoside, Oligonukleotide und Triphosphate  
zur Analyse der Stoffwechselwege von 5-Methyl-2'-desoxycytidin  
und  
Synthese neuartiger Proteinhybridverbindungen**

Arne Sebastian Schröder  
aus  
Göttingen (Deutschland)

2016

## Erklärung

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

## Eidesstattliche Versicherung

Diese Dissertation wurde eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 06.06.2016

Arne Schröder

.....

Dissertation eingereicht am 25.07.2016.

1. Gutachter: Professor Dr. Thomas Carell
2. Gutachter/in: Professor Dr. Anja Hoffmann-Röder

Mündliche Prüfung am 22.09.2016.

„Creativity is paradoxical. To create, a person must have knowledge but forget the knowledge, must see unexpected connections in things but not have a mental disorder, must work hard but spend time doing nothing as information incubates, must create many ideas yet most of them are useless, must look at the same thing as everyone else, yet see something different, must desire success but embrace failure, must be persistent but not stubborn, and must listen to experts but know how to disregard them.”

---

*Michael Michalko*

## Publikationsliste

Teile dieser Dissertation wurden bereits publiziert oder auf Konferenzen vorgestellt:

Publikationen:

- S. Schiesser, T. Pfaffeneder, K. Sadeghian, B. Hackner, B. Steigenberger, A.S. Schröder, J. Steinbacher, G. Kashiwazaki, G. Höfner, K.T. Wanner, C. Ochsenfeld, T. Carell, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 14593-9.
- A.S. Schröder, J. Steinbacher, B. Steigenberger, F.A. Gnerlich, S. Schiesser, T. Pfaffeneder, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2014**, *53*, 315-318.  
**(Selected as Hot Paper)**
- A.S. Schröder, J. Steinbacher, B. Steigenberger, F.A. Gnerlich, S. Schiesser, T. Pfaffeneder, T. Carell, *Collection Symposium Series* **2014**, *14*, 363-364.
- E. Parsa, A.S. Schröder, T. Carell, *Naturwissenschaftliche Rundschau* **2015**, *68*, 500-5
- M. Su, A. Kirchner, S. Stazzoni, M. Müller, M. Wagner, A.S. Schröder, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2016**, *55*, 11797-11800.  
**(Selected as Hot Paper)**
- A.S. Schröder, O. Kotljarova, E. Parsa, K. Iwan, N. Raddaoui, T. Carell, *Org. Lett.* **2016**, *18*, 4368-4371.

Konferenzbeiträge:

- **Vortrag:** Entwicklung eines fdC-Phosphoramidit-Bausteins für die DNA-Festphasensynthese, FCI-Stipendiaten-Meeting, München, Deutschland, **2013**
- **Posterbeitrag:** Finally: Synthetic DNA Promoter with all four epigenetic cytosine bases, Symposium on Chemistry of Nucleic Acid Components, Prag, Tschechien, **2014**,  
**(Posterpreis)**
- **Vortrag:** Development of a new fdC-building block for epigenetic investigations, BASF SummerCourse, Ludwigshafen, Deutschland, **2014**
- **Posterbeitrag:** Elucidating active demethylation with fluorinated cytidine derivatives, DNA Methylation and Demethylation Conference, Roscoff, France, **2015**

## Danksagung

*Professor Dr. Thomas Carell* danke ich für die herausfordernde Themenstellung, das großzügige Vertrauen in meine Arbeit und für die damit einhergehende Übertragung an Verantwortung. Dein Enthusiasmus bei den vielen wissenschaftlichen Diskussionen und Anregungen haben mich stets motiviert und mitgerissen.

*Professor Dr. Anja Hoffmann-Röder* danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Bei den Mitgliedern der Prüfungskommission, *Professor Dr. Hendrik Zipse*, *Professor Dr. Konstantin L. Karaghiosoff*, *Professor Dr. Herbert Mayr* und *Professor Dr. Rasmus Linser*, bedanke ich mich für die Mitwirkung an der mündlichen Prüfung.

*Dr. Markus Müller* danke ich für die zahlreichen erlösenden Ratschläge und die immerwährende Hilfe in allen Belangen.

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

Bei *Kristof Hufnagel*, *Kerstin Kurz* und *Frau Sabine Voss* bedanke ich mich für ihren unermüdlchen Einsatz im Arbeitskreis Carell und für die synthetische sowie massenspektrometrische Unterstützung.

Der Analytikabteilungen der Ludwig-Maximilians-Universität München danke ich für die zeitnahe Vermessung meiner zahlreichen Proben.

Dem Fonds der Chemischen Industrie danke ich für die finanzielle Unterstützung während meiner Promotion in Form eines *Kekulé*-Stipendiums.

Meinen 13 ehemaligen Praktikanten *Elina Fuks*, *Jessica Furtmeier*, *Julia Hansen*, *Nadine Hinkel*, *Korbinian Krieger*, *Stefan Marchner*, *Johannes Morstein*, *Felix Pultar*, *Robert Rampmaier*, *Bettina Rendenbach*, *Klaus-Peter Rühmann*, *Alexander Schön* und *Sebastian Siegl* danke ich für ihre große Einsatzbereitschaft während ihres Praktikums.

*Katharina Iwan, Dr. Markus Müller, Edris Parsa, René Rahimoff, Sebastian Thallmair, Charlotte Schröder, Sascha Serdjukow und Nina Simon* danke ich für das schnelle und gewissenhafte Korrekturlesen großer Teile meiner Arbeit.

Dem Labor F4.001b mit seinen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern *Korbinian Brunner, Dr. Felix Gnerlich, Dr. Johannes Harder, Edris Parsa, René Rahimoff* und *Martin Rossa* danke ich für die herzliche Aufnahme, das stetige Mut machen und einfach für eine besondere, unvergessliche Zeit mit euch!

Es war mir eine Freude mit nahezu allen Mitgliedern des Arbeitskreises Carell auf irgendeine Art und Weise kooperiert haben zu dürfen. Ich danke euch allen für die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre, dem offenen wissenschaftlichen Austausch, die stets große Hilfsbereitschaft, den vielen Kaffeeraumfeiern und vor allem für das Organisieren der vielen Aktionen außerhalb des Labors.

Ganz besonders bedanke ich mich bei meiner Familie für die große moralische und finanzielle Unterstützung. Im Speziellen danke ich meiner Frau *Charlotte Schröder* für den stetigen Rückhalt und das Teilen sämtlicher Freuden sowie Rückschlägen in den letzten Jahren.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>Abstraktum</b> .....	<b>I</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>II</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 <i>5-Methyl-2'-desoxycytidin und dessen Stoffwechsel</i> .....	1
1.1.1 DNA .....	1
1.1.2 Epigenetik .....	2
1.1.3 5-Methyl-2'-desoxycytidin .....	3
1.1.4 Aktive Demethylierung als Stoffwechselweg von mdC .....	4
1.1.5 5-Formyl-2'-desoxycytidin als Intermediat im mdC-Stoffwechsel.....	7
1.2 <i>Proteinmodifizierungen</i> .....	11
1.2.1 Chemische Strategien zur Modifizierung von natürlichen Aminosäuren in Proteinen .....	13
1.2.2 Sequenzspezifische Proteinmarkierungen .....	14
1.2.3 Reversible und sequenzspezifische Proteinmarkierungen .....	17
<b>2 Aufgabenstellung</b> .....	<b>19</b>
<b>3 Entwicklung eines neuartigen fdC-Phosphoramidit Bausteins</b> .....	<b>22</b>
3.1 <i>Synthese und Optimierung des fdC-Phosphoramidits</i> .....	24
3.2 <i>Optimierung der sauren Acetal-Entschützung an der DNA</i> .....	25
3.3 <i>Charakterisierung des neuen fdC-Phosphoramidit-Bausteins</i> .....	26
3.4 <i>Synthese eines Oct4-Promotersegments mit allen vier epigenetisch relevanten DNA-Basen</i> .....	27
<b>4 Entwicklung einer bisulfitfreien fdC-Sequenzierung-Methode</b> .....	<b>30</b>
<b>5 Isotopenmarkierte Desoxycytidin-Derivate für den Nachweis aktiver Demethylierung</b> .....	<b>34</b>
5.1 <i>Synthese isotopenmarkierter Phosphoramidite und Nucleoside</i> .....	35
5.1.1 $D_3\text{-}^{15}\text{N}_2\text{-mdC}$ und $^{15}\text{N}_2\text{-dC}$ .....	35
5.1.2 $^{15}\text{N}_2\text{-mdC-Phosphoramidit}$ .....	36
5.1.3 $^{15}\text{N}_2\text{-fdC-Phosphoramidit}$ .....	37
5.1.4 $^{15}\text{N}_2\text{-cadC-Phosphoramidit}$ .....	38

5.2	<i>D<sub>2</sub>, <sup>15</sup>N<sub>2</sub>-dC als ideales Molekül zum Nachweis aktiver Demethylierung</i>	39
5.2.1	<i>Entwicklung einer Isotope-Tracing-Methode</i>	39
5.2.2	<i>Synthese von D<sub>2</sub>, <sup>15</sup>N<sub>2</sub>-dC</i>	40
5.2.3	<i>Zellbiologische Untersuchungen mit D<sub>2</sub>, <sup>15</sup>N<sub>2</sub>-dC</i>	42
<b>6</b>	<b>Fluorierte Cytidin-Derivate zur Aufklärung des mdC-Stoffwechsels</b>	<b>46</b>
6.1	<i>Strategie zur Synthese 2'-fluorierter Nucleoside, Nucleosidtriphosphate und Phosphoramidit-Bausteine</i>	48
6.2	<i>Synthese von fluorierten Phosphoramidit-Bausteinen und deren Einbau in DNA</i>	49
6.2.1	<i>F-mdC-Phosphoramidit</i>	49
6.2.2	<i>F-hmdC-Phosphoramidit</i>	52
6.2.3	<i>F-fdC-Phosphoramidit</i>	53
6.2.4	<i>F-cadC-Phosphoramidit</i>	54
6.2.5	<i>Einbau der fluorierten Phosphoramidite in Oligodesoxynucleotide</i>	54
6.3	<i>F-dC-Derivate inhibieren die humane Thymin-DNA-Glykosylase</i>	56
6.4	<i>Synthese fluorierter Nucleoside</i>	57
6.5	<i>Charakterisierung fluorierter Nucleoside</i>	60
6.6	<i>Synthese isopenmarkierter, fluorierter Nucleoside</i>	62
6.7	<i>Synthese von F-Analoga der epigenetisch relevanten Nucleosid-Triphosphate und deren Einbau in Oligonucleotide mittels PCR</i>	67
6.8	<i>Biochemische und zellbiologische Untersuchungen mit fluorierten Cytidinderivaten</i>	70
6.8.1	<i>Methylierung mit Methyltransferase M.Sss1</i>	71
6.8.2	<i>TET1cd Oxidations-Assay</i>	71
6.8.3	<i>Inkubation mit mESC-Lysat</i>	73
6.8.4	<i>Verfütterungsexperimente</i>	74
<b>7</b>	<b>Entwicklung einer neuartigen, reversiblen Proteinmarkierung</b>	<b>78</b>
7.1	<i>Erste Versuche zur Identifikation einer geeigneten Peptidsequenz</i>	81
7.2	<i>Rationelles Peptiddesign zur Bindung von Pyridoxalphosphat</i>	82
7.2.1	<i>Theoretische Aspekte zur Bindung mit Pyridoxalphosphat</i>	82
7.2.2	<i>Modellierung einer Lead-Sequenz</i>	83
7.2.3	<i>Synthese einer rationell-designierten Peptid-Bibliothek</i>	87
7.3	<i>Studien zur Synthese neuer PLP-Derivate</i>	89
7.4	<i>Charakterisierung der Peptid-PLP-Derivat-Bindung</i>	94
7.4.1	<i>HPLC-Bindungsstudien</i>	94



7.4.2	NMR-Bindungsstudien .....	102
7.4.3	Massenspektrometrische-Bindungsstudien.....	106
7.4.4	Weitere Bindungsstudien.....	107
7.4.5	Erste Struktur-Aktivität-Beziehungen bezüglich des Azophenyl-Rests.....	109
7.5	Übertragung der Peptidsequenz in ein Protein.....	110
7.5.1	Mutagenese von BstPoll .....	111
7.5.2	Mutagenese von Thioredoxin .....	112
7.6	Erste biochemische und massenspektrometrische Nachweise der funktionierenden Proteinmarkierung .....	112
<b>8</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>115</b>
<b>9</b>	<b>Ausblick.....</b>	<b>122</b>
<b>10</b>	<b>Experimenteller Teil.....</b>	<b>123</b>
10.1	Material und Methoden .....	123
10.2	Vorschriften zur Synthese des fdC-Phosphoramidits.....	131
10.2.1	5-Iod-2'-desoxycytidin (123).....	131
10.2.2	$O^{3',5'}$ -Bis( <i>tert</i> butyldimethylsilyl)-5-iod-2'-desoxycytidin (124) .....	131
10.2.3	$O^{3',5'}$ -Bis( <i>tert</i> butyldimethylsilyl)-5-formyl-2'-desoxycytidin (5).....	132
10.2.4	$O^{3',5'}$ -Bis( <i>tert</i> butyldimethylsilyl)-5-(1,3-dioxan-2-yl)-2'-desoxycytidin (6) .....	134
10.2.5	$O^{3',5'}$ -Bis( <i>tert</i> butyldimethylsilyl)- $N^4$ -( <i>para</i> -methoxybenzoyl)-5-(1,3-dioxan-2-yl)-2'-desoxycytidin (125). .....	135
10.2.6	$N^4$ -( <i>Para</i> -methoxybenzoyl)-5-(1,3-dioxan-2-yl)-2'-desoxycytidin (7) .....	136
10.2.7	$O^{5'}$ -(Dimethoxytrityl)- $N^4$ -( <i>para</i> -methoxybenzoyl)-5-(1,3-dioxan-2-yl)-2'-desoxycytidin (126) .....	137
10.2.8	$O$ -( <i>Diisopropylcyanoethylphosphin</i> )- $O^{5'}$ -dimethoxytrityl- $N^4$ -( <i>para</i> -methoxybenzoyl)-5-(1,3-dioxan-2-yl)-2'-desoxycytidin (8) .....	139
10.3	Vorschriften zur Synthese isotoopenmarkierter, epigenetisch relevanter Nukleoside .....	141
10.3.1	5-Trideuteromethyl-2'-desoxy-( $N^1, N^3$ - $^{15}N_2$ )-cytidin (24) und 2'-desoxy- $[N^1, N^3$ - $^{15}N_2]$ -cytidin (25).....	141
10.3.2	$O^{3',5'}$ -Bis( <i>toluoyl</i> )-5-methyl-2'-desoxy- $[N^1, N^3$ - $^{15}N_2]$ -cytidin (127).....	142
10.3.3	$O^{5'}$ -Dimethoxytrityl- $N^4$ -benzoyl-5-methyl-2'-desoxy- $[N^1, N^3$ - $^{15}N_2]$ -cytidin (128) .....	143
10.3.4	$O^{3'}$ -( <i>Diisopropylcyanoethylphosphin</i> )- $O^{5'}$ -dimethoxytrityl- $N^4$ -benzoyl-5-methyl-2'-desoxy- $[N^1, N^3$ - $^{15}N_2]$ - cytidin (28) .....	145
10.3.5	$O^{3',5'}$ -Bis( <i>tert</i> butyldimethylsilyl)-5-(1,3-dioxan-2-yl)-2'-desoxy- $[N^1, N^3$ - $^{15}N_2]$ -cytidin (31) .....	145
10.3.6	$O^{3',5'}$ -Bis( <i>tert</i> butyldimethylsilyl)- $N^4$ -benzoyl-5-(1,3-dioxan-2-yl)-2'-desoxy- $[N^1, N^3$ - $^{15}N_2]$ -cytidin (130) .... .....	147
10.3.7	$N^4$ -Benzoyl-5-(1,3-dioxan-2-yl)-2'-desoxy- $[N^1, N^3$ - $^{15}N_2]$ -cytidin (32) .....	148
10.3.8	$O^{5'}$ -Dimethoxytrityl- $N^4$ -benzoyl-5-(1,3-dioxan-2-yl)-2'-desoxy- $[N^1, N^3$ - $^{15}N_2]$ -cytidin (132) .....	149

10.3.9	$O^3$ -(Diisopropylcyanoethylphosphin)- $O^5$ -dimethoxytrityl- $N^4$ -benzoyl-5-(1,3-dioxan-2-yl)-2'-desoxy- [ $N^1, N^3$ - $^{15}N_2$ ]-cytidin (30) .....	150
10.3.10	$O^3$ -(Diisopropylcyanoethylphosphin)- $O^5$ -dimethoxytrityl-( $N^4, N^4$ -dibenzoyl)-5-(methoxycarbonyl)-2'- desoxy-[ $N^1, N^3$ - $^{15}N_2$ ]-cytidin (34) .....	151
10.3.11	[3-D]-Propiolsäure (35) .....	151
10.3.12	[5,6- $D_2, N^1, N^3$ - $^{15}N_2$ ]-Uracil (36) .....	152
10.3.13	2'-Desoxy-[5,6- $D_2, N^1, N^3$ - $^{15}N_2$ ]-cytidin (38) .....	153
10.4	Vorschriften zur Synthese fluorierter Phosphoramidite .....	155
10.4.1	5-Iod-2'-desoxy-2'(R)-fluor-cytidin (129) .....	155
10.4.2	$O^{3,5'}$ -Bis( <i>tert</i> butyldimethylsilyl)-5-iod-2'-desoxy-2'(R)-fluor-cytidin (43) .....	156
10.4.3	$O^{3,5'}$ -Bis( <i>tert</i> butyldimethylsilyl)-5-methyl-2'-desoxy-2'(R)-fluor-cytidin (44) .....	157
10.4.4	$O^{3,5'}$ -Bis( <i>tert</i> butyldimethylsilyl)- $N^4$ -benzoyl-5-methyl-2'-desoxy-2'(R)-fluor-cytidin (131) .....	158
10.4.5	$N^4$ -Benzoyl-5-methyl-2'-desoxy-2'(R)-fluor-cytidin (45) .....	159
10.4.6	$O^5$ -Dimethoxytrityl- $N^4$ -benzoyl-5-methyl-2'-desoxy-2'(R)-fluor-cytidin (133) .....	160
10.4.7	$O^3$ -(Diisopropylcyanoethylphosphin)- $O^5$ -dimethoxytrityl- $N^4$ -benzoyl-5-methyl-2'-desoxy-2'(R)-fluor- cytidin (46) .....	161
10.4.8	$O^{3,5'}$ -Bis( <i>tert</i> butyldimethylsilyl)-5-formyl-2'-desoxy-2'(R)-fluor-cytidin (53) .....	162
10.4.9	$O^{3,5'}$ -Bis( <i>tert</i> butyldimethylsilyl)-5-hydroxymethyl-2'-desoxy-2'(R)-fluor-cytidin (49) .....	163
10.4.10	$O^{3,5'}$ -Bis( <i>tert</i> butyldimethylsilyl)-4,5-(1,3-[3 <i>H</i> ,6 <i>H</i> ]-oxazin-2-on)-2'-desoxy-2'(R)-fluor-cytidin (50) ....	164
10.4.11	4,5-(1,3-[3 <i>H</i> ,6 <i>H</i> ]-Oxazin-2-on)-2'-desoxy-2'(R)-fluor-cytidin (51) .....	165
10.4.12	$O^5$ -Dimethoxytrityl-4,5-(1,3-[3 <i>H</i> ,6 <i>H</i> ]-oxazin-2-on)-2'-desoxy-2'(R)-fluor-cytidin (134) .....	166
10.4.13	$O^3$ -(Diisopropylcyanoethylphosphin)- $O^5$ -dimethoxytrityl-4,5-(1,3-[3 <i>H</i> ,6 <i>H</i> ]-oxazin-2-on)-2'-desoxy- 2'(R)-fluor-cytidin (52) .....	168
10.4.14	$O^{3,5'}$ -Bis( <i>tert</i> butyldimethylsilyl)-5-(1,3-dioxan-2-yl)-2'-desoxy-2'(R)-fluor-cytidin (54) .....	169
10.4.15	$O^{3,5'}$ -Bis( <i>tert</i> butyldimethylsilyl)- $N^4$ -( <i>para</i> -methoxybenzoyl)-5-(1,3-dioxan-2-yl)-2'-desoxy-2'(R)-fluor- cytidin (135) .....	170
10.4.16	$N^4$ -( <i>Para</i> -methoxybenzoyl)-5-(1,3-dioxan-2-yl)-2'-desoxy-2'(R)-fluor-cytidin (55) .....	171
10.4.17	$O^5$ -Dimethoxytrityl- $N^4$ -( <i>para</i> -methoxybenzoyl)-5-(1,3-dioxan-2-yl)-2'-desoxy-2'(R)-fluor-cytidin (136). .....	172
10.4.18	$O^3$ -(Diisopropylcyanoethylphosphin)- $O^5$ -dimethoxytrityl- $N^4$ -( <i>para</i> -methoxybenzoyl)-5-(1,3-dioxan-2- yl)-2'-desoxy-2'(R)-fluor-cytidin (56) .....	174
10.4.19	$O^{3,5'}$ -Bis( <i>tert</i> butyldimethylsilyl)-5-(methoxycarbonyl)-2'-desoxy-2'(R)-fluor-cytidin (57) .....	175
10.4.20	$O^{3,5'}$ -Bis( <i>tert</i> butyldimethylsilyl)- $N^4$ -( <i>para</i> -methoxybenzoyl)-5-(methoxycarbonyl)-2'-desoxy-2'(R)- fluor-cytidin (58) .....	176
10.4.21	$N^4$ -( <i>Para</i> -methoxybenzoyl)-5-(methoxycarbonyl)-2'-desoxy-2'(R)-fluor-cytidin (59) .....	177
10.4.22	$O^5$ -Dimethoxytrityl- $N^4$ -( <i>para</i> -methoxybenzoyl)-5-(methoxycarbonyl)-2'-desoxy-2'(R)-fluor-cytidin (137) .....	178

10.4.23	$O^3$ -(Diisopropylcyanoethylphosphin)- $O^5$ -dimethoxytrityl- $N^4$ -( <i>para</i> -methoxybenzoyl)-5-(methoxycarbonyl)-2'-desoxy-2'(R)-fluor-cytidin (60).....	179
10.5	<i>Vorschriften zur Synthese fluorierter Nucleoside</i> .....	181
10.5.1	5-Methyl-2'-desoxy-2'(R)-fluor-cytidin (61).....	181
10.5.2	5-Formyl-2'-desoxy-2'(R)-fluor-cytidin (62).....	182
10.5.3	5-Hydroxymethyl-2'-desoxy-2'(R)-fluor-cytidin (63).....	183
10.5.4	5-Methoxycarbonyl-2'-desoxy-2'(R)-fluor-cytidin (138).....	184
10.5.5	5-Carboxy-2'-desoxy-2'(R)-fluor-cytidin (64).....	185
10.5.6	$O^{3,5'}$ -bis( <i>Tert</i> butyldimethylsilyl)-5-iod-2'-desoxy-2'(R)-fluor-uridin (66).....	186
10.5.7	2'-Desoxy-2'(R)-fluor-thymidin (67).....	187
10.5.8	$O^{3,5'}$ -bis( <i>Tert</i> butyldimethylsilyl)-5-formyl-2'-desoxy-2'(R)-fluor-uridin (139).....	188
10.5.9	$O^{3,5'}$ -bis( <i>Tert</i> butyldimethylsilyl)-5-hydroxymethyl-2'-desoxy-2'(R)-fluor-uridin (68).....	189
10.5.10	5-Hydroxymethyl-2'-desoxy-2'(R)-fluor-uridin (69).....	190
10.6	<i>Vorschriften zur Synthese fluorierter, isotoopenmarkierter Nucleoside</i> .....	192
10.6.1	$O^{3,5'}$ -Bis(acetyl)-2'-desoxy-2'(R)-fluor-uridin (140).....	192
10.6.2	$O^{3,5'}$ -Bis(acetyl)- $N^3$ -nitryl-2'-desoxy-2'(R)-fluor-uridin (83).....	193
10.6.3	2'-desoxy-2'(R)-fluor- [ $N^3$ - $^{15}N_2$ ]-uridin (84).....	194
10.6.4	2'-desoxy-2'(R)-fluor- [ $N^3, N^4$ - $^{15}N_2$ ]-cytidin (85).....	195
10.7	<i>Vorschriften zur Synthese fluorierter Triphosphate</i> .....	197
10.7.1	5-Methyl-2'-desoxy-2'(R)-fluor-cytidin-5'-triphosphat (als Tetrakis(triethylammonium-Salz) (86a)..	197
10.7.2	5-Hydroxymethyl-2'-desoxy-2'(R)-fluor-cytidin-5'-triphosphat (als Tetrakis(triethylammonium-Salz) (86b).....	198
10.7.3	5-Formyl-2'-desoxy-2'(R)-fluor-cytidin-5'-triphosphat (als Tetrakis(triethylammonium-Salz) (86c) ..	199
10.7.4	5-Carboxy-2'-desoxy-2'(R)-fluor-cytidin-5'-triphosphat (als Tetrakis(triethylammonium-Salz) (86d)	201
10.8	<i>Vorschriften zur Synthese von PLP-Derivaten zur Proteinmarkierung</i> .....	203
10.8.1	2-Methyl-3-hydroxy-4,5-dihydroxymethyl-6-iod-pyridin (141).....	203
10.8.2	2-Methyl-3,4-(1,3-(2,2-dimethyl)-[4H]-dioxen)-5-hydroxymethyl-6-iod-pyridin (103).....	203
10.8.3	2-Methyl-3,4-(1,3-(2,2-dimethyl)-[4H]-dioxen)-5-hydroxymethyl-6-(octa(1,7)dien-1-yl)-pyridin (142) ..	204
10.8.4	2-Methyl-3-hydroxyl-4-hydroxymethyl-5-((hydroxy-hydrophosphoryl-oxy)methyl)-6-(octa(1,7)dien-1-yl)-pyridin (143).....	206
10.8.5	2-Methyl-3-(pivaloyloxy)-4-(1,3-dioxolan-2-yl)-5-((pivaloyl-oxy)methyl)-pyridin-1-oxid (105).....	207
10.8.6	2-Methyl-3-(pivaloyloxy)-4-(1,3-dioxolan-2-yl)-5-((pivaloyl-oxy)methyl)-6-vinyl-pyridin (144).....	208
10.8.7	( <i>E</i> )-2-(2-(4-(1,3-dioxolan-2-yl)-6-methyl-5-(pivaloyloxy)-3-((pivaloyloxy)methyl)pyridin-2-yl)vinyl)benzene-1,4-disulfonsäure (106).....	209

<b>11</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>211</b>
<b>12</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>215</b>

## Abstraktum

Schwerpunkt dieser Promotionsarbeit war die Modifizierung von Biomolekülen im Rahmen von zwei unterschiedlichen Themengebieten: Epigenetik und Proteinchemie. Hierfür wurden jeweils chemische Reaktionen zur selektiven Markierung von Nukleosiden bzw. Proteinen entwickelt und somit deren Untersuchung im biologischen Kontext ermöglicht.

Im Bereich der Epigenetik sollte durch spezifische Modifizierungen der Stoffwechselweg des epigenetischen Markers 5-Methyl-2'-desoxycytidin (mdC), ein in verschiedenen biologischen Prozessen bedeutsames Nukleosid, aufgeklärt werden. Vor kurzem wurde die Oxidation von mdC zu 5-Hydroxymethyl- (hmdC) und weiter zu 5-Formyl- (fdC) sowie zu 5-Carboxy-2'-desoxycytidin (cadC) entdeckt. Im Zuge dieser Arbeit sollte die Hypothese, dass eine C-C-Bindungsbruchreaktion ausgehend von den Oxidationsprodukten fdC und cadC zu 2'-Desoxycytidin (dC) ein in Zellen vorhandener Mechanismus zur aktiven Demethylierung ist, intensiv überprüft werden. Zunächst wurde hierzu ein verbesserter fdC-Phosphoramidit-Baustein für die DNA-Festphasensynthese und nachfolgende proteomische fdC-Untersuchungen entwickelt. Dieser wird mittlerweile von *GlenResearch* kommerziell vermarktet. Darüber hinaus wurden verschiedene isotope markierte, sowie 2'-fluorierte DNA-Bausteine (Nukleoside, Phosphoramidite und Triphosphate) für die DNA-Synthese, zellbiologische Untersuchungen und für massenspektrometrische Quantifizierungen synthetisiert. Erstmals konnten mittels dieser Markierungen in *Tracing*-Experimenten eindeutige Hinweise auf das Vorliegen einer Deformylierungsreaktion von fdC zu dC erbracht werden.

Derzeit wird in der pharmazeutischen Industrie im Bereich der Proteinchemie intensiv nach effizienten Methoden zur Proteinmarkierung z.B. zur Herstellung homogener Antikörper-Wirkstoff-Konjugate geforscht. In dieser Promotionsarbeit wurde hierzu eine sequenzspezifische, reversible Proteinmarkierung in einem *Bottom-up-Approach* entwickelt. Zunächst wurde in theoretischen Studien eine rational entwickelte Peptidsequenz generiert, in der ein aufgrund der Sequenzumgebung besonders reaktives Lysin über eine *Schiff'sche* Base-Reaktion Pyridoxalphosphat (PLP) reversibel bindet. Die nachfolgende Optimierung mittels kombinatorischer Synthese einer Peptid-Bibliothek resultierte in einer 15 Aminosäuren langen Peptidsequenz mit  $\mu\text{M}$ -Affinität gegenüber verschiedenen PLP-Derivaten. Weitere Struktur-Aktivitäts-Untersuchungen (NMR, HPLC, MS) belegten die selektive Bindung. In ersten Studien konnten Proteine nach Einbau der Peptidsequenz erfolgreich mit PLP-Derivaten spezifisch modifiziert werden. Zukünftig wird diese innovative Markierungsmethode in verschiedenen Gebieten zur Herstellung homogen, aber reversibel modifizierter Proteinen Anwendung finden, z.B. für Antikörper-Wirkstoff-Konjugate.

## Abstract

This PhD-thesis covers two different topics: epigenetics and proteinchemistry. For both of them, chemical reactions for the selective labelling of nucleosides and proteins, respectively, were developed, which enabled extensive studies of nucleosides and proteins in a biological context.

In the field of epigenetics, the metabolism of the epigenetic marker 5-methyl-2'-deoxycytidine (mdC), an important nucleoside in various cellular processes, was investigated by selective labelling. Here, the studies focussed at the active demethylation pathway of mdC. Recently, the oxidation of mdC to 5-hydroxymethyl- (hmdC) and further on to 5-formyl- (fdC) and 5-carboxy-2'-deoxycytidine was discovered. In the course of this thesis the hypothesis, that a C-C-bond cleavage reaction based on fdC or cadC to 2'-deoxycytidine (dC) as part of cellular active demethylation mechanism was intensely investigated. First of all, an improved fdC-phosphoramidite building block for the DNA-solid phase synthesis and subsequently for proteomic studies was developed. In the meantime, this building block was introduced into the market by the U.S. company *GlenResearch*. Furthermore, various isotopically labelled as well as 2'-fluorinated DNA building blocks (nucleosides, phosphoramidites and triphosphates) were synthesized for DNA synthesis, cell biological studies and for mass spectrometric analysis. Using these labelled compounds, *Tracing*-experiments revealed the existence of a deformylation reaction for the first time.

Currently, the pharmaceutical industry is searching for efficient methods to label proteins, e.g. for the generation of homogenous antibody-drug conjugates. Within this PhD thesis, a sequence specific, reversible method for protein labelling was developed by using a bottom-up approach. First, using theoretical studies a rational peptide sequence was designed. Here, a certain lysine residue, which has an increased reactivity due to its sequence context, is able to react to a thermodynamically stable *Schiff* base with pyridoxal phosphate (PLP) derivatives. Subsequent optimisation by combinatorial syntheses of a peptide library led to a 15 amino acid containing peptide sequence having a  $\mu\text{M}$ -affinity to various PLP-derivatives. Further structure-activity studies (NMR, HPLC, MS) proved the site specific binding. In first studies, proteins were specifically modified after incorporation of the peptide sequence. In the future, this labelling method may pave the way for the generation of homogeneously but reversible modified proteins for various purposes, e.g. for the synthesis of antibody-drug conjugates.

# 1 Einleitung

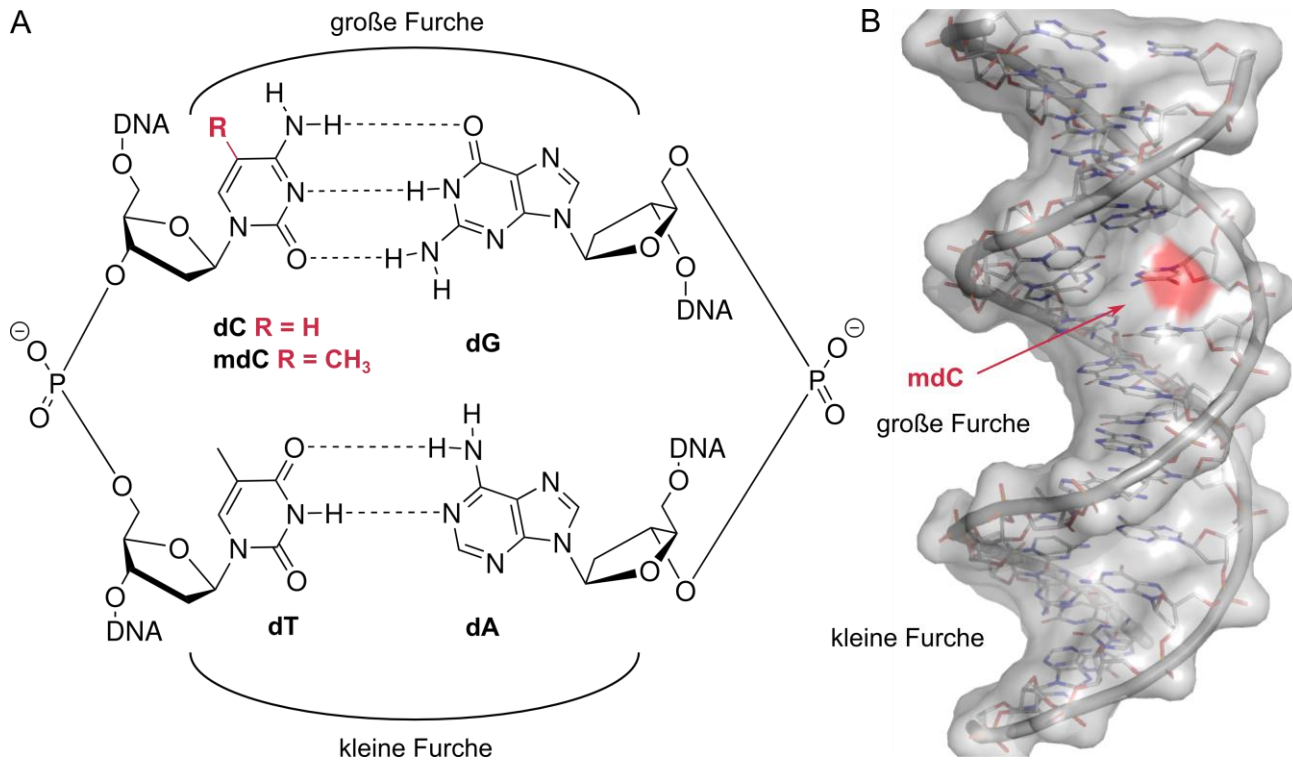
„Zum Dicksein verdammt: Fettleibigkeit ist vererbbar“! Mit diesen Worten betitelte der *Focus* im März 2016 plakativ einen Artikel über neue Forschungserkenntnisse aus dem Bereich der Epigenetik.<sup>[1]</sup> In dieser Studie konnte nachgewiesen werden, dass Stoffwechselstörungen, wie Fettleibigkeit und Diabetes, in Mäusen tatsächlich auf die nächste Generation epigenetisch vererbbar sein können.<sup>[2]</sup> Dabei erfolgte die Informationsübergabe unter anderem auch anhand des epigenetischen DNA-Markers 5-Methylcytosin. Hierzu stellen sich die zwei größten, bislang nur teilweise gelösten Fragen der Epigenetik: Wie kommt es zu einer selektiven Markierung in genomischer DNA? Und kann eine solche, eventuell krankmachende Markierung wieder entfernt werden und wenn ja, mit welchem Mechanismus? Mit der Beantwortung der letzten Frage beschäftigen sich Teile dieser Arbeit.

Schwerpunkt dieser Promotionsarbeit war die Modifizierung von Biomolekülen im Rahmen von zwei unterschiedlichen Themengebieten. Neben der bereits erwähnten Epigenetik, wo versucht wurde, den Stoffwechselweg des epigenetischen Markers 5-Methylcytosin aufzuklären, wurde im Bereich der Proteinchemie eine sequenzspezifische, reversible Proteinmarkierung in einem *Bottom-up-Approach* entwickelt. Beiden Themengebieten ist gemein, dass eine Verbindung mittels chemischer Modifizierung selektiv markiert wurde. In anschließenden *in vitro* und *in vivo* Experimenten ermöglichte diese Markierung erstmals detaillierte Einblicke in die biologischen Rolle dieser Verbindung.

## 1.1 5-Methyl-2'-desoxycytidin und dessen Stoffwechsel

### 1.1.1 DNA

Neuronen, Drüsenzellen und Erythrozyten sind nur drei Beispiele für ca. 210 verschiedene Zelltypen, die den menschlichen Organismus aufbauen.<sup>[3]</sup> Trotz stark unterschiedlicher Morphologie und Aufgaben besitzen sie alle eine identische Desoxynukleinsäure (DNA)-Sequenz. Die DNA ist ein eindimensionales Polymer und besteht im Wesentlichen aus den vier kanonischen Nukleosiden 2'-Desoxyadenosin (dA), 2'-Desoxythymidin (dT), 2'-Desoxycytidin (dC) und 2'-Desoxyguanosin (dG), die über Phosphorsäurediester miteinander verbunden sind (siehe **Abbildung 1A**).<sup>[4-6]</sup> Über spezifische Wasserstoffbrückenbindungen gehen die Nukleobasen komplementäre Paarungen mit einem DNA-Gegenstrang ein.<sup>[5,7-9]</sup> Diese Basenpaarung ist die Grundlage für eine erfolgreiche DNA-Replikation und Genexpression.<sup>[10,11]</sup> Letztere erfolgt entsprechend dem zentralen Dogma der Molekularbiologie zunächst durch Transkription der DNA zu *messenger RNA*, die in der anschlie-



**Abbildung 1:** (A) Basenpaarungen der doppelsträngigen DNA. dC und dG bilden drei Wasserstoffbrückenbindungen aus, dT und dA hingegen nur 2 (gestrichelte Linien). (B) Die Methylgruppe der epigenetischen DNA-Modifikation mdC zeigt in die große Furche der DNA-Doppelhelix und kann dadurch Protein-DNA-Wechselwirkungen modulieren.

enden Translation zur Synthese von Proteinen verwendet wird.<sup>[12]</sup> Hierbei kodiert ein Basentriplett für eine Aminosäure.<sup>[12-14]</sup>

Die Paarung zweier DNA-Stränge resultiert in der Ausbildung einer DNA-Doppelhelix, deren natürlich vorliegende B-Form eine kleine und eine große Furche aufweist. Diese ermöglichen den Kontakt der Nukleobasen zur flüssigen Phase des Zellkerns, wobei in der großen Furche sequenz-spezifische Interaktionen mit Proteinen wie z.B. den Transkriptionsfaktoren stattfinden, während in der kleinen Furche eher kleine Moleküle binden können.<sup>[13,15]</sup>

### 1.1.2 Epigenetik

Für die Entwicklung zu hoch spezialisierten Zelltypen müssen Zellen Mechanismen besitzen, die es ihnen ermöglichen, die Genexpression räumlich und zeitlich zu regulieren. Ferner müssen diese Aktivitätsmuster auch an die Zellen der nächsten Generation vererbt werden können. Daher muss es neben der DNA-Sequenz eine weitere Informationsebene geben, die die Genexpression regelt.

Mit diesem Thema befasst sich das Forschungsgebiet der Epigenetik.<sup>[16]</sup> Die heute allgemeingültige



und wissenschaftlich anerkannte Definition bezieht sich auf mitotisch oder meiotisch vererbare Merkmale und Veränderungen, die die Genexpression beeinflussen, aber nicht auf die zugrunde liegende DNA-Sequenz zurückzuführen sind.<sup>[17-19]</sup> Neben der Modifikation von Histon-Proteinen sind Modifikationen von DNA-Nukleobasen von besonderer Bedeutung. Diese beiden Formen der Regulation stehen möglicherweise in direkter Wechselwirkung. Aberrante Prozesse und Veränderungen innerhalb dieses Epigenoms können zur Entstehung von Krebs, Autoimmun-, neurodegenerativen sowie den bereits oben beschriebenen Stoffwechsel-Erkrankungen führen.<sup>[20-24]</sup>

### 1.1.3 5-Methyl-2'-desoxycytidin

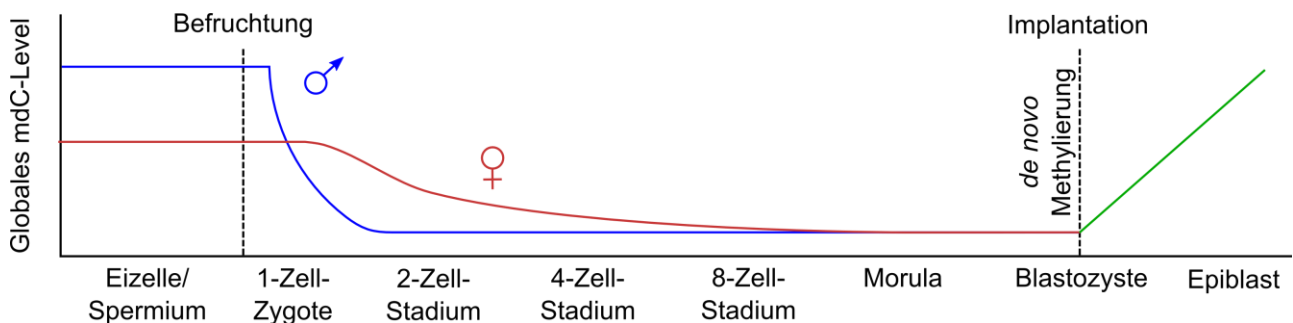
Die zeitlich am längsten bekannte DNA-Modifikation ist 5-Methyl-2'-desoxycytidin (mdC) (siehe **Abbildung 1**). Dessen Existenz wurde bereits 1925 postuliert, 1950 nachgewiesen und gilt heutzutage als die am meisten erforschte epigenetische Modifikation.<sup>[21,22,24-28]</sup> Die Modifizierung wird postreplikativ durch DNA-Methyltransferasen (DNMT) mit dem Cofaktor *S*-Adenosylmethionin (SAM) als Methylgruppendonor eingeführt. In Eukaryoten sind drei Enzyme dieser Klasse bekannt. DNMT1, eine *maintenance* Methyltransferase, sorgt während der DNA-Replikation dafür, dass im Genom bereits bestehende Methylierungen erhalten bleiben, wodurch mdC zu einer vererbaren Modifikation wird. Zusätzlich sind DNMT3a und DNMT3b bekannt, welche für die *de novo*-Methylierung verantwortlich sind.<sup>[29,30]</sup> Von entscheidender Bedeutung ist die Tatsache, dass die DNA-Methylierung für die Entwicklung von Säugetieren unentbehrlich ist. DNMT1-, DNMT3a- oder DNMT3b-Knockout-Mäuse sterben im Verlauf ihrer Entwicklung.<sup>[30-32]</sup>

In Eukaryoten sind 3-5% aller Cytosine methyliert, vorwiegend in einem CpG-Kontext, wobei zelltypspezifisch bis zu 70-80% der CpG-Dinukleotide methyliert sind.<sup>[33]</sup> Eine besonders hohe Dichte an CpG-Dinukleotiden kann in Promotorregionen gefunden werden. Hier befinden sich ca. 10% aller CpG-Dinukleotide.<sup>[24,34]</sup>

Bereits 1969 wurde für mdC eine regulatorische Funktion postuliert und 1975 durch zwei Gruppen bestätigt.<sup>[35-37]</sup> Die Anwesenheit einer Methylgruppe in der großen Furche verändert die Wechselwirkung von Proteinen mit DNA.<sup>[27]</sup> Hierdurch hat mdC direkten Einfluss auf die Bindung von Transkriptionsfaktoren sowie Chromatin remodulierenden Proteinen und kann z.B. eine Inhibierung der Transkription bewirken.<sup>[38,39]</sup> Die mdC-vermittelte Stilllegung von Genen hat entscheidenden Einfluss auf die X-Chromosom-Inaktivierung, die genomische Prägung sowie auf die dauerhafte Stilllegung der Pluripotenzgene (z.B. Oct3/4 und Nanog) bei der zellulären Entwicklung.<sup>[21,22]</sup>

### 1.1.4 Aktive Demethylierung als Stoffwechselweg von mdC

Alle Säugetierzellen stammen von einer befruchteten Eizelle ab. Während der Wanderung entlang des Eileiters zur Gebärmutter, differenziert sich die Eizelle schrittweise über die 2-Zell-, 4-Zell-, 8-Zell-Stadien, zur Morula und Blastozyste weiter (siehe **Abbildung 2**). Dabei erfolgt eine nahezu vollständige, globale Demethylierung des männlichen und weiblichen Genoms um den pluripotenten Status des frühen Embryos zu etablieren.<sup>[40]</sup> Die Demethylierung des Genoms des männlichen Elternteils verläuft im Vergleich zum weiblichen Genom hierbei deutlich schneller ab. Es zeigte sich, dass der Rückgang des mdC-Gehalts des paternalen Genoms in der Mausembryogenese vornehmlich nicht replikations-assoziiert ist, sondern die Methylgruppen aktiv, also Enzym-vermittelt, entfernt werden.<sup>[41-44]</sup>



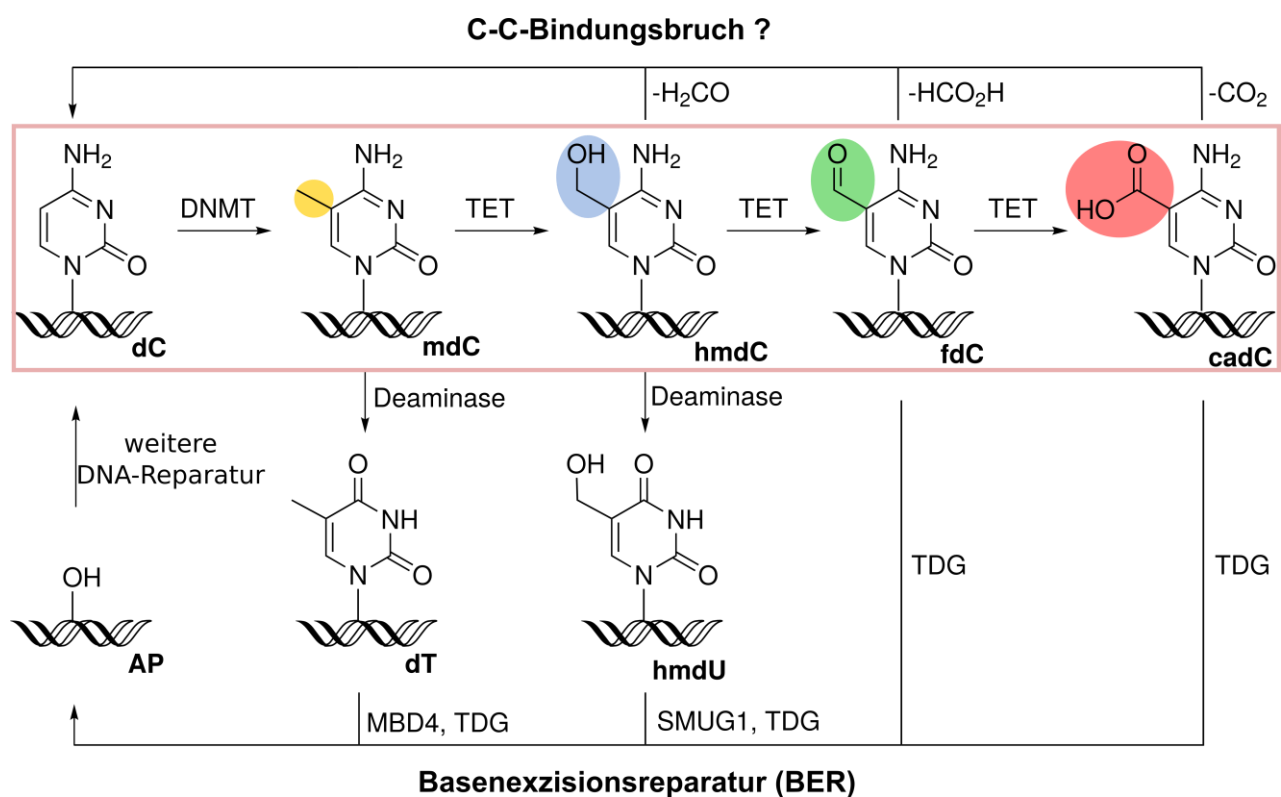
**Abbildung 2:** Veränderung der globalen mdC-Level während der Embryogenese. Kurz nach Befruchtung der Eizellen der Maus wird mdC im paternalen Genom weitgehend aktiv entfernt (blaue Linie). Im maternalen Genom hingegen wird das mdC-Level eher aufgrund der fehlenden *maintenance* Methylierung passiv gesenkt (rote Linie). Die Abbildung wurde von *Wu et al.* adaptiert.<sup>[44]</sup>

Bei der Demethylierung des weiblichen Genoms ging man in der Vergangenheit bisher von einem rein passiven Demethylierungsmechanismus aus, d.h. dem Verlust von mdC durch Verdünnung während der DNA-Replikation.<sup>[45-47]</sup> Neuerdings wird aber auch hier über eine aktive bzw. Enzym-vermittelte Demethylierung spekuliert.<sup>[48]</sup> Die epigenetische Reprogrammierung kurz nach der Befruchtung der Eizelle ist wichtig, um die elterlichen Methylierungsmuster zu entfernen und somit die Entwicklung des Nachkommens aus nur einer Zelle nicht zu gefährden. Nach Einnisten der Eizelle in die Gebärmutter Schleimhaut (Implantation) werden gezielte Sequenzbereiche beider Genome *de novo* methyliert (grüne Linie), wodurch die Ausdifferenzierung in die verschiedenen Keimblätter des Embryos (Ektoderm, Endoderm und Mesoderm) im Laufe der weiteren embryonalen Entwicklung beginnt.<sup>[49]</sup> Bisher konnte eine aktive Demethylierung in ausdifferenzierten Zellen lediglich in Neuronen und Immunzellen nachgewiesen werden.<sup>[50-52]</sup>

Bis heute ist ungeklärt, wie Zellen das Methylierungsmuster aktiv, also Enzym-vermittelt, entfernen

können. Die Aufklärung ist allerdings von bedeutendem Interesse, da dies ein detailliertes Verständnis der Steuerung der Zellentwicklung ermöglicht. So könnten beispielsweise Verbindungen zwischen fehlerhafter Genexpression und verschiedenen Krankheitsbildern zukünftig aufgeklärt werden. Ferner ist eine gezielte Reprogrammierung von ausdifferenzierten Zellen in der regenerativen Medizin von großem Interesse.<sup>[53]</sup>

Aus chemischer Sicht ist eine direkte Demethylierung von mdC aufgrund der sehr schwer zu brechenden C5-CH<sub>3</sub>-Bindung eher unwahrscheinlich. Es gibt Hinweise, dass die Desaminasen AID1 und APOBEC1 *in vitro* mdC zu dT desaminieren. Letzteres kann aufgrund der sich ergebenden Fehlpaarung (dG:dT) durch die Glykosylasen Thymin-DNA-Glykosylase (TDG) oder MDB4, aus-

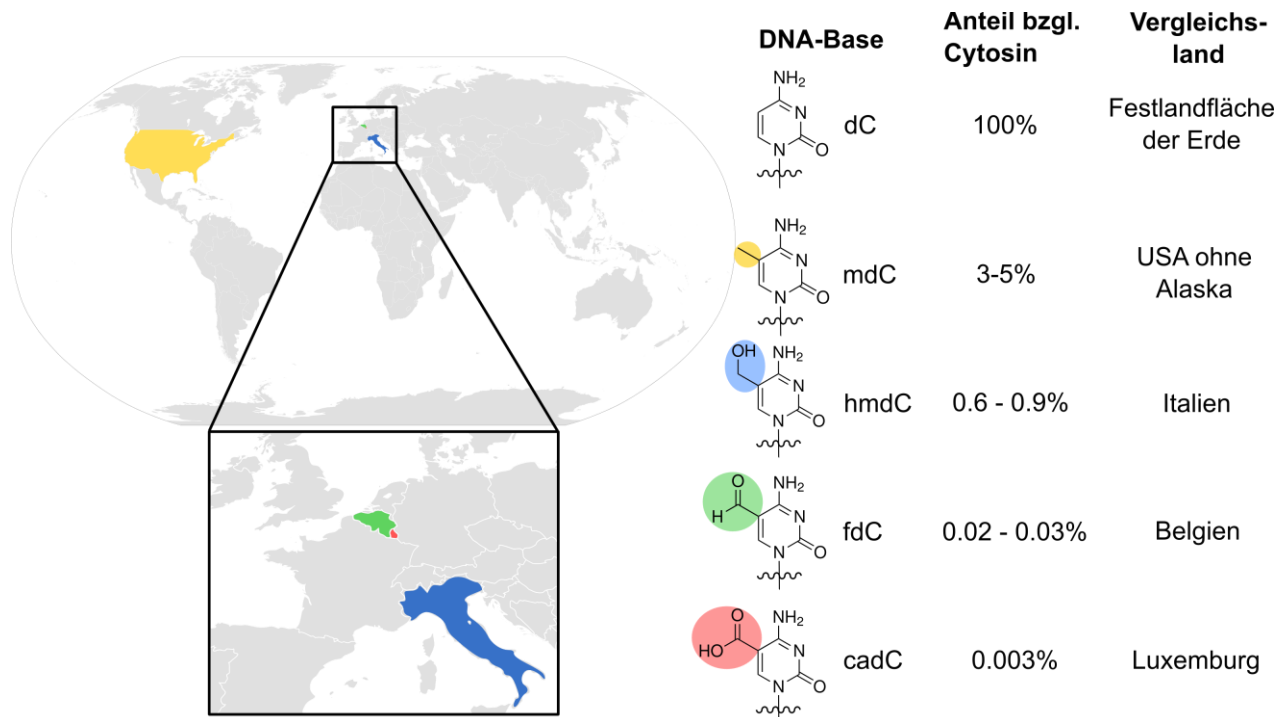


**Abbildung 3:** Schematische Darstellung des mdC-Metabolismus. Mittels der DNMT-Enzyme wird dC zu mdC methyliert. Eine Desaminierungs-Aktivität von mdC zu dT konnte für die Enzyme AID1 und APOBEC1 *in vitro* gezeigt werden. Die TET-Enzym vermittelte Oxidation von mdC resultiert in den Produkten hmdC, fdC und cadC. Im Rahmen einer komplexen Basenexzisionsreparatur können die Nucleobasen fdC, cadC sowie die Desaminierungsprodukte dT und hmdU mittels des Enzyms TDG entfernt werden. Die entstandene abasische Stelle (AP) wird im Laufe der weiteren DNA-Reparatur letztlich durch dC ersetzt. Aus entropischer und energetischer Sicht birgt ein C-C-Bindungsbruch bei den mdC-Oxidationsprodukten hmdC, fdC und cadC aufgrund der direkten Generierung von dC durchaus Vorteile. Das Vorhandensein eines solchen Mechanismus konnte jedoch bislang nicht gezeigt werden.

geschnitten werden (siehe **Abbildung 3**).<sup>[54-57]</sup>

2009 bzw. 2011 wurden mit 5-Hydroxymethyl- (hmdC) bzw. 5-Formyl- (fdC) und 5-Carboxy-2'-desoxycytidin (cadC) die Oxidationsprodukte von mdC entdeckt.<sup>[58-61]</sup> Mittlerweile ist bekannt, dass diese ausschließlich durch Ten-eleven translocation Proteine (TET1-3) gebildet werden.<sup>[62,63]</sup>

Quantifizierungsstudien an embryonalen Mäusestammzellen (mES-Zellen) zeigten, dass hmdC bzw. fdC hier etwa zehnmal bzw. hundertmal seltener als mdC vorkommt. cadC ist mit 0.003% bezüglich dC kaum vorhanden (siehe **Abbildung 4**).<sup>[62,64]</sup>



**Abbildung 4:** Veranschaulichung der Häufigkeit modifizierter epigenetisch relevanter Nucleoside in mES-Zellen bezogen auf dC. Wird die Menge an dC im Genom auf die Festlandfläche der Erde normiert, so entspräche die Anzahl aller mdC der Fläche von USA (ohne Alaska) und die aller hmdC der Fläche Italiens. Die Menge an fdC bzw. cadC käme der Fläche von Belgien bzw. Luxemburg gleich.

Nach der Entdeckung der TET-vermittelten Oxidation von mdC konnten Hinweise auf eine aktive Demethylierung mittels Desaminierung von hmdC durch die Proteinfamilie AID/APOBEC und anschließender Basenexzisionsreparatur (BER) u.a. mit den Glykosylasen SMUG1 und TDG gefunden werden.<sup>[65-68]</sup> Pfaffeneder *et al.* konnten jedoch zeigen, dass eine Desaminierung von hmdC in mES-Zellen vernachlässigbar gering ist.<sup>[69]</sup> Die höheren Oxidationsprodukte fdC und cadC können direkt durch TDG aus der DNA geschnitten werden.<sup>[58,70-74]</sup> Untersuchungen mit der katalytischen Domäne von TDG zeigten eine viermal höhere Affinität von TDG gegenüber der Basenpaarung G:fdC ( $K_D = 0.15$  nM) als zu G:dU.<sup>[75]</sup>

Die bislang beschriebenen Wege der Demethylierung beruhen auf der anspruchsvollen Basenexzisionsreparatur. Neben dem Vorhandensein bestimmter Enzyme zu einem definierten Zeitpunkt ist vor allem die Entstehung einer abasischen Stelle (AP) ein Nachteil für die Stabilität der DNA, besonders in den mdC-reichen Promotorregionen. Hier könnte eine massive aktive Demethylierung zu Doppelstrangbrüchen führen.<sup>[76]</sup> Aus diesem Grund wurde mit der Entdeckung der TET-vermittelten Oxidation der Mechanismus eines C-C-Bindungsbruchs der Oxidationsprodukte von mdC in Betracht gezogen. Die Abgangsgruppen wären im Falle von hmdC Formaldehyd, bei fdC Ameisensäure und Kohlenstoffdioxid bei cadC (siehe **Abbildung 3**).

Bei Inkubation von hmdC-haltiger DNA mit einer mutierten Cytosin-Methyltransferase konnte *in vitro* die Bildung von dC durch Dehydroxymethylierung nachgewiesen werden.<sup>[77]</sup> Eine entsprechende Decarboxylierung von cadC-haltiger DNA konnte *Schiesser et al.* 2012 mit Stammzell-extrakt nachweisen, jedoch nicht quantifizieren.<sup>[78]</sup> 2014 wurde zusätzlich eine Decarboxylierungsaktivität eines Komplexes aus DNMT3A/DNMT3L *in vitro* gezeigt.<sup>[79]</sup> Eine potentielle Deformylierung wurde bislang nur *in vitro* mit Mercaptoethanol beschrieben.<sup>[80]</sup>

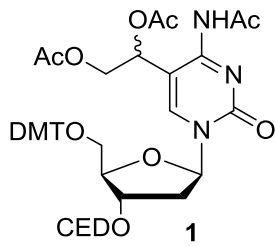
Zusammenfassend konnten in der Vergangenheit zwar erste Indizien für einen C-C-Bindungsbruch zur direkten Generierung von dC entdeckt werden, bislang fehlt jedoch der Nachweis dieser Transformation *in vivo* sowie das dafür verantwortliche Enzym sofern es überhaupt eines geben sollte. Es bleibt somit zu klären, ob eine C-C-Bindungsbruchreaktion tatsächlich ein möglicher Weg der aktiven Demethylierung neben BER ist.

### 1.1.5 5-Formyl-2'-desoxycytidin als Intermediat im mdC-Stoffwechsel

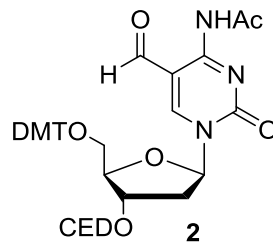
Das Nukleosid fdC ist das erste Nukleosid in der TET-vermittelten Oxidationskaskade, welches direkt ohne vorherige Desaminierung aus der DNA mittels TDG-Enzym entfernt werden kann. Da es zudem etwa zehnmal häufiger als cadC vorkommt, stellt sich die Frage, ob fdC neben der Funktion als Intermediat eines mdC-Stoffwechsels auch eine eigene, darüber hinausgehende biologische Funktion besitzt.

#### Synthese fdC-haltiger Oligodesoxynukleotide

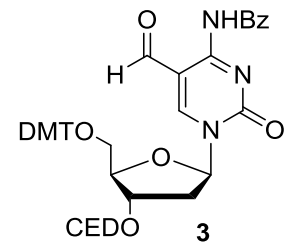
Für biochemische und proteomische Untersuchungen zur Funktion von fdC werden häufig Oligodesoxynukleotide (ODN) verwendet, die diese Modifikation enthalten. Die ODN werden mittels DNA-Festphasensynthese aus den entsprechenden Phosphoramidit-Bausteinen hergestellt. Zu Beginn dieser Arbeit waren drei verschiedene fdC-Phosphoramidit-Bausteine literaturbekannt und zum Teil kommerziell erhältlich (siehe **Schema 1**).<sup>[81-83]</sup>



*Matsuda, 2001*



*He, 2011*



*Carell, 2011*

**Schema 1:** Strukturformeln der zu Beginn dieser Arbeit beschriebenen fdC-Phosphoramidite für die Synthese fdC-haltiger ODN.

Die Gruppe um *Matsuda* beschrieb bereits 2001 das Phosphoramidit **1** zur Synthese fdC-haltiger ODN. **1** besitzt eine acetylgeschützte 1,2-Diol-Einheit, aus welcher nach Entschützung durch Diolsplaltung mit Natriumperodat die Formylgruppe generiert werden kann.<sup>[81]</sup> Jedoch unterliegt fdC bereits in Anwesenheit von Luftsauerstoff einer langsamen Oxidation zu cadC.<sup>[80]</sup> Die Behandlung mit Natriumperodat führt daher zu einem kleinen Teil von cadC im ODN. In nachfolgenden z.B. proteomischen Untersuchungen könnte dieser cadC-Gehalt zu falsch-positiven Resultaten und somit zu einer falschen biologischen Bedeutung von fdC führen. Zusätzlich ist die Diolsplaltung nicht mit einem zusätzlichen hmdC im ODN kompatibel. Dieses würde zu fdC oxidieren.<sup>[84]</sup>

Aus diesem Grund entwickelten die Gruppen um *He* und *Carell* zeitgleich die fdC-Phosphoramidite **2** und **3**.<sup>[82,83]</sup> Beide fdC-Bausteine besitzen bereits die Formylgruppe. Allerdings zeichnet sich der fdC-Baustein **3** durch eine effizientere Kupplung während der DNA-Festphasensynthese aus. Im Vergleich zur Acetylschutzgruppe bei **2** ist die Benzoylschutzgruppe am exozyklischen Amin bei **3** deutlich stabiler. Allerdings generiert die Synthese von ODN mit mehreren fdC auch bei Verwendung des fdC-Phosphoramiditbausteins **3** eine Vielzahl unbekannter Nebenprodukte und das gewünschte ODN kann in der nachfolgenden, sehr problematischen Aufreinigung nur in geringsten Mengen erhalten werden.

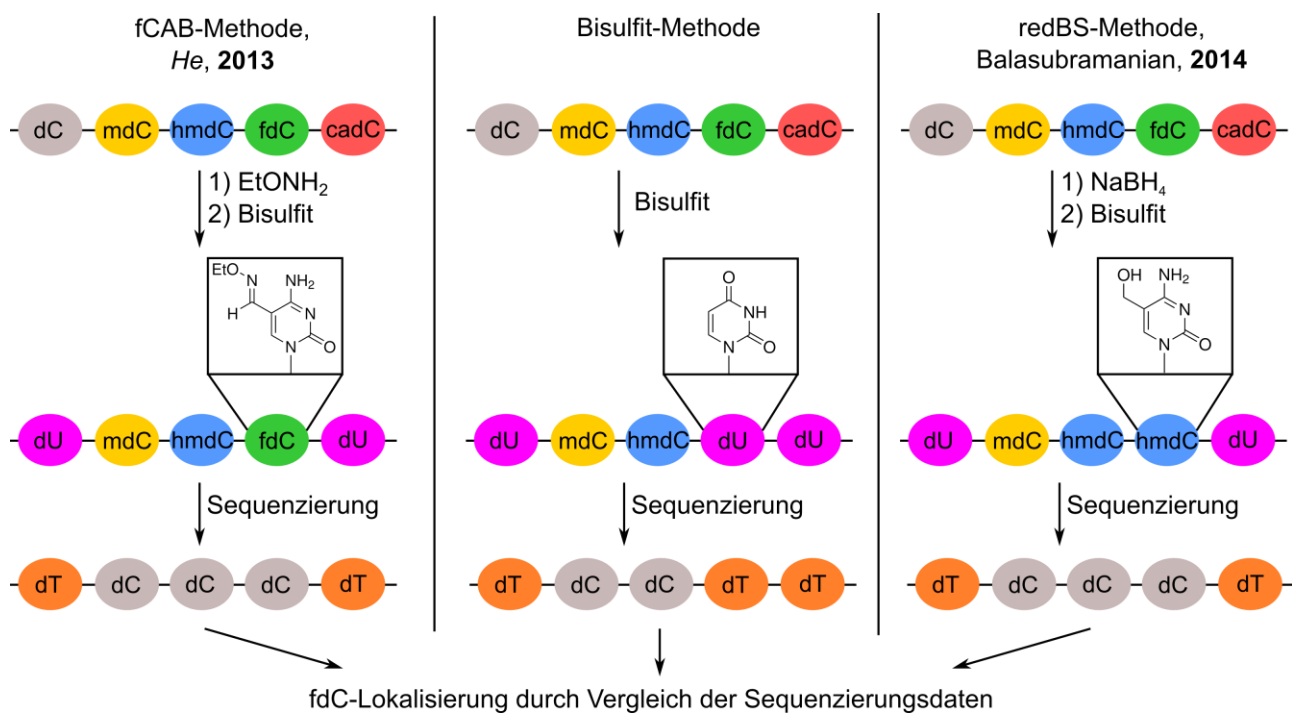
### Methoden zur genomischen Sequenzierung von fdC

Neben der Synthese fdC-haltiger ODN ist auch die exakte Lokalisierung in genomischer DNA zur Aufklärung einer möglichen biologischen Funktion von fdC von großer Bedeutung. Bis 2015 waren lediglich verschiedene, Bisulfit-abhängige Methoden zur genomischen fdC-Sequenzierung bekannt (siehe **Abbildung 5**).<sup>[85-89]</sup>

Die Bisulfit-Methode ist der sogenannte Gold-Standard zur genomische Sequenzierung von mdC in Basenauflösung.<sup>[90]</sup> Hierbei wird eine Natriumbisulfit-Lösung verwendet, welche dC zu dU desaminiert, mit mdC hingegen nicht reagiert. Da mdC wie dC kodiert, kann bei Vergleich der Sequenzie-

rungsdaten mit und ohne Bisulfit-Behandlung auf die exakten Positionen von mdC geschlossen werden. Im Falle von fdC führt die Umsetzung mit Natriumbisulfit mittels Deformylierung und Desaminierung ebenfalls zu dU.<sup>[91]</sup> Somit kann bei Verwendung der Bisulfit-Methode nicht zwischen fdC und dC unterschieden werden.

2013 beschrieb die Gruppe um *He* erstmalig eine genomweite Sequenzierungs-Methode (fCAB) von fdC, indem sie *O*-Ethylhydroxylamin zur Maskierung der Formylgruppe verwendeten.<sup>[88]</sup> Das so entstandene Oxim wird in der nachfolgenden Umsetzung mit Natriumbisulfit nicht zu dU desaminiert, sondern kodiert weiterhin wie dC. Durch Vergleich der Sequenzierungsdaten mit und ohne fCAB-behandelter DNA, kann auf die Positionen von fdC geschlossen werden. Diese Methode ermöglichte erstmals die basengenaue Sequenzierung von fdC in DNA aus mES-Zellen.



**Abbildung 5:** Vergleich der bis 2015 beschriebenen genomweiten fdC-Sequenzierungsmethoden. In der standardmäßigen Bisulfit-Methode (Mitte) wird fdC, genauso wie dC, zu dU umgewandelt. Eine Differenzierung zwischen dC und fdC ist daher nicht möglich. In der fCAB-Methode (Links) wird durch Oximbildung mit *O*-Ethylhydroxylamin die Formylgruppe maskiert. In der nachfolgenden Bisulfit-Behandlung wird das Oxim nicht zu dU desaminiert und kodiert daher weiterhin als dC. Durch Vergleich der Sequenzierungsdaten mit und ohne fCAB-behandelter DNA, kann auf die Positionen von fdC geschlossen werden. Im Gegensatz dazu wird in der redBS-Methode (Rechts) fdC zunächst mit Natriumborhydrid reduziert. Da hmdC wie dC kodiert, kann bei Vergleich der Sequenzierungsdaten mit und ohne redBS-Methode auf die Position von fdC geschlossen werden.

2014 beschrieb die Gruppe um *Balasubramanian* die fdC-Sequenzierungsmethode redBS, in der fdC zunächst mit einer 1M wässrigen Natriumborhydrid-Lösung zu hmdC reduziert wurde.<sup>[85]</sup> Da hmdC wie dC kodiert, kann bei Vergleich der Sequenzierungsdaten mit und ohne redBS-Methode auf die Position von fdC geschlossen werden.

Der Nachteil beider Methoden ist die Verwendung von Natriumbisulfit. Letzteres führt zu einer erheblichen Zerstörung genomischer DNA (> 95%), da Bisulfit mit dC zu einem Addukt reagiert, welches spontan depyrimidiert.<sup>[90,92,93]</sup> Die so entstandene abasische Stelle resultiert in der nachfolgenden, obligatorischen NaOH-Behandlung in DNA-Strangbrüchen.<sup>[94]</sup> Daher kann nur ein Bruchteil der eingesetzten Menge tatsächlich für die Sequenzierung verwendet werden, was aufgrund der geringen Abundanz von fdC problematisch ist.

### **Mögliche biologische Funktionen von fdC**

Zur Aufklärung einer möglichen biologischen Funktion von fdC existieren aufgrund der geringen Abundanz im Genom, sowie der problematischen Herstellung von fdC-haltiger ODN bislang kaum Daten.<sup>[95]</sup> In ersten Proteomik-Studien konnte gezeigt werden, dass fdC den Transkriptionscofaktor p300, sowie Reparaturproteine wie beispielsweise den "Wächter des Genoms", p53, und das TDG-Enzym rekrutiert.<sup>[96,97]</sup>

Weiterhin kann fdC indirekt Einfluss auf die zelluläre Synthese von Proteinen nehmen, indem es das Voranschreiten der RNA-Polymerase II auf dem DNA-Strang beeinflusst.<sup>[98]</sup> In der Replikation kodiert fdC wie dC und wirkt daher nicht mutagen.<sup>[83]</sup>

2015 konnte die Gruppe um *Balasubramanian* mittels Quantifizierung der Level aller epigenetisch relevanten Nukleoside in unterschiedlichen Mäuse-Geweben in verschiedenen Lebensabschnitten nachweisen, dass fdC besonders zahlreich im Gehirn, aber auch in Herz und Leber mit einer Häufigkeit von 0.2 bis 15 ppm bezogen auf dC vorkommt.<sup>[99]</sup> Interessanterweise konnte keine Korrelation zwischen den Level von hmdC und fdC gefunden werden. Bei Verfütterung von <sup>13</sup>CD<sub>3</sub>-SAM über einem Zeitraum von bis zu 117 Tagen an adulte Mäuse wurde mittels *Isotope-Tracing* kaum isotopenmarkiertes fdC im Gehirn gefunden. Da das Level von nicht markiertem fdC im Gehirn weiterhin hoch war, wurde daraus geschlossen, dass es in den 117 Tagen kaum fdC-Umsatz gab und daher fdC vermutlich ein stabiler epigenetischer Marker ist. Dies würde die Wahrscheinlichkeit erhöhen, dass fdC neben mdC und hmdC eine eigene, bislang unbekannte biologische Funktion besäße.<sup>[99,100]</sup>

Im Gegensatz dazu beschrieben *Wagner et al.* ebenfalls 2015 die Quantifizierung von mdC, hmdC, und fdC in Cerebrum- und Leber-Gewebe von Mäusen zu verschiedenen Lebensabschnitten (1. Tag

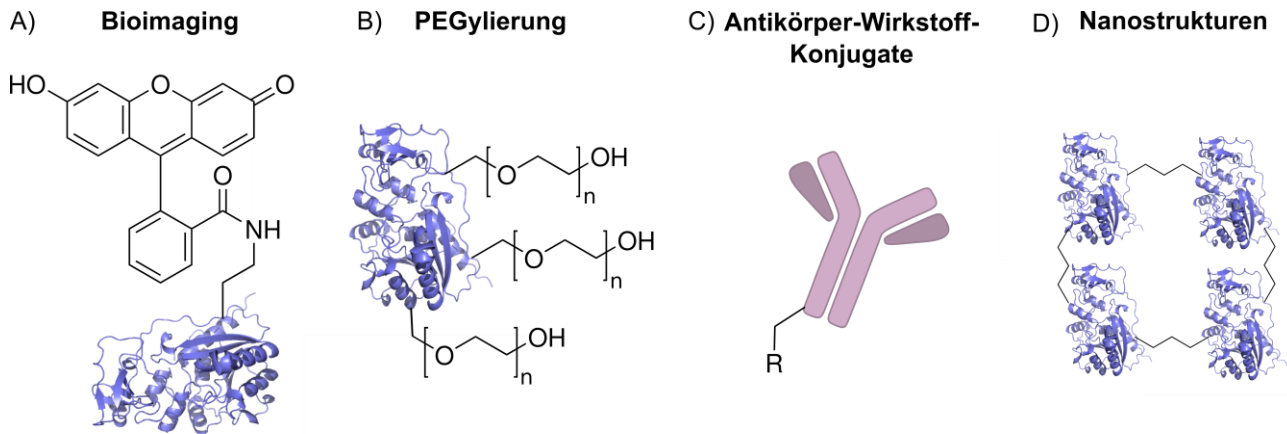


bis 18. Monat nach Geburt).<sup>[101]</sup> Die Autoren zeigten, dass die fdC-Level in der frühen Entwicklung stark fallen und somit einen invertierten, alters-abhängigen Effekt verglichen zu hmdC zeigen. Dieses Resultat deutet daraufhin, dass fdC vorrangig mit einer aktiven Demethylierung von hmdC im Zusammenhang steht und daher kein stabiler epigenetischer Marker sein sollte.

Zusammenfassend ist eine biologische Funktion von fdC, sei es als Intermediat einer aktiven Demethylierung oder als epigenetischer Marker, bislang vollkommen unklar. Dies beruht zum einen auf dem geringen Vorkommen in genomischer DNA, zum anderen aber vor allem an mangelnden Methoden zur Synthese fdC-haltiger ODN für umfangreiche Proteomik-Studien sowie an einer fehlenden Bisulfit-freien Sequenzierungsmethode von fdC im Genom.

### **1.2 Proteinmodifizierungen**

Die biologische Funktion epigenetischer Nukleoside in der DNA ist das Resultat einer gezielten und kontrollierten Wechselwirkung dieser Nukleoside mit Proteinen. Die DNA, die der Zelle als Informationsspeicher dient, interagiert z.B. bei Replikation, DNA-Reparatur u.v.m. mit Proteinen. Sie gelten als molekulare Maschinen, die für Erhalt und Funktionsausübung der Zelle verantwortlich sind.<sup>[102]</sup> Posttranslationale Modifikationen an Proteinen sind in der Natur weit verbreitet und beeinflussen entscheidend deren Aktivität.<sup>[103]</sup> Die Zellen sind hierdurch in der Lage, die Funktion eines Proteins zu bestimmten Zeiten exakt zu kontrollieren. Obwohl im Rahmen der Biokonjugation seit geraumer Zeit an der gezielten Modifizierung von Proteinen geforscht wird, konnte die Natur bislang nur im begrenzten Maßstab imitiert werden. Die Schwierigkeit liegt darin begründet, dass die chemische Modifizierungsreaktion bei max. 37 °C, in einem pH-Bereich von 6 bis 8 und im wässrigen Puffermedium erfolgen muss, um die 3D-Struktur und somit die Funktion des Proteins nicht zu gefährden.<sup>[104-107]</sup> Mögliche Anwendungen einer artifiziellen Proteinmarkierung sind vielfältig. Besonders in der medizinischen Forschung finden diese neuerdings immer häufiger Einsatz (siehe **Abbildung 6**). Sie ermöglichen z. B. die *in vivo*-Verfolgung mittels Fluorophor-Konjugat und die Stabilitätserhöhung des Wirkstoffs durch Anhängen von Polyethylenketten an die Proteinoberfläche (PEGylierung). Regioselektive Proteinmarkierungen werden in der Proteinaufreinigung, in der Herstellung von Antikörper-Wirkstoff-Konjugaten und im Gebiet der Nanotechnologie benötigt. Bei Letzterem wird vor allem am gezielten Aufbau von Proteinstrukturen und der Generierung von Proteinen mit neuer Funktion geforscht.<sup>[106-109]</sup>



**Abbildung 6:** Methoden zur Markierung von Proteinen finden in verschiedenen Bereichen Anwendung. A) Fluorophor-Konjugate ermöglichen das Verfolgen von Proteinen in Zellen. B) Die Umsetzung mit Polyethylenderivaten erhöht die Stabilität des Proteins. C) Selektive Proteinmarkierungen ermöglichen die Generierung von homogenen Antikörper-Wirkstoff-Konjugaten sowie D) Proteine mit neuer Funktion im Rahmen der Nanotechnologie.

In den letzten zwanzig Jahren wurde eine Vielzahl an Methoden zur Modifizierung von natürlichen sowie unnatürlichen Aminosäuren etabliert. Letztere werden durch Manipulation des genetischen Codes, vorwiegend durch Neuordnung eines Kodons, meist das Amber Kodon UAG, in ein Protein inkorporiert.<sup>[110,111]</sup> Hierzu wird heutzutage normalerweise ein zum verwendeten Organismus orthogonales *Suppressor*-Paar aus tRNA und tRNA-Synthetase verwendet. Zunächst wird die unnatürliche Aminosäure mittels tRNA-Synthetase an die tRNA gebunden, wodurch dann während der Translation die Aminosäure kodonspezifisch in das Protein eingebaut wird.<sup>[111,112]</sup> Vorteil dieser Methode ist der hoch regioselektive Einbau der unnatürlichen Aminosäure in das Ziel-Protein. Mittels bioorthogonaler Reaktionen, z.B. mittels *Click*-Reaktion, können die eingebauten, unnatürlichen Aminosäuren für verschiedenste Anwendungen weiter funktionalisiert werden.<sup>[112]</sup> Mittlerweile konnte diese Technologie erfolgreich in lebenden Tieren angewendet werden.<sup>[113,114]</sup> Nachteilig ist jedoch die zeitaufwendige Mutagenese der tRNA-Synthetase, die für eine ausreichende Bindungsaffinität zur unnatürlichen Aminosäure sowie für eine hohe Übertragungsrate zur tRNA nötig ist.<sup>[107]</sup> Des Weiteren müssen die meist synthetisch hergestellten, unnatürlichen Aminosäuren für den erfolgreichen Einbau in hohen Konzentrationen (meist mM-Bereich) dem Nährmedium zugegeben werden.<sup>[115]</sup> Die geringe Effizienz der Kodon-Suppression, bedingt durch die Konkurrenz der *Suppressor*-tRNA mit den *release* Faktoren trägt weiterhin zur Verringerung der Ausbeute bei. Die synthetische Modifizierung natürlicher Aminosäuren ist daher nach wie vor erstrebenswert.

### 1.2.1 Chemische Strategien zur Modifizierung von natürlichen Aminosäuren in Proteinen

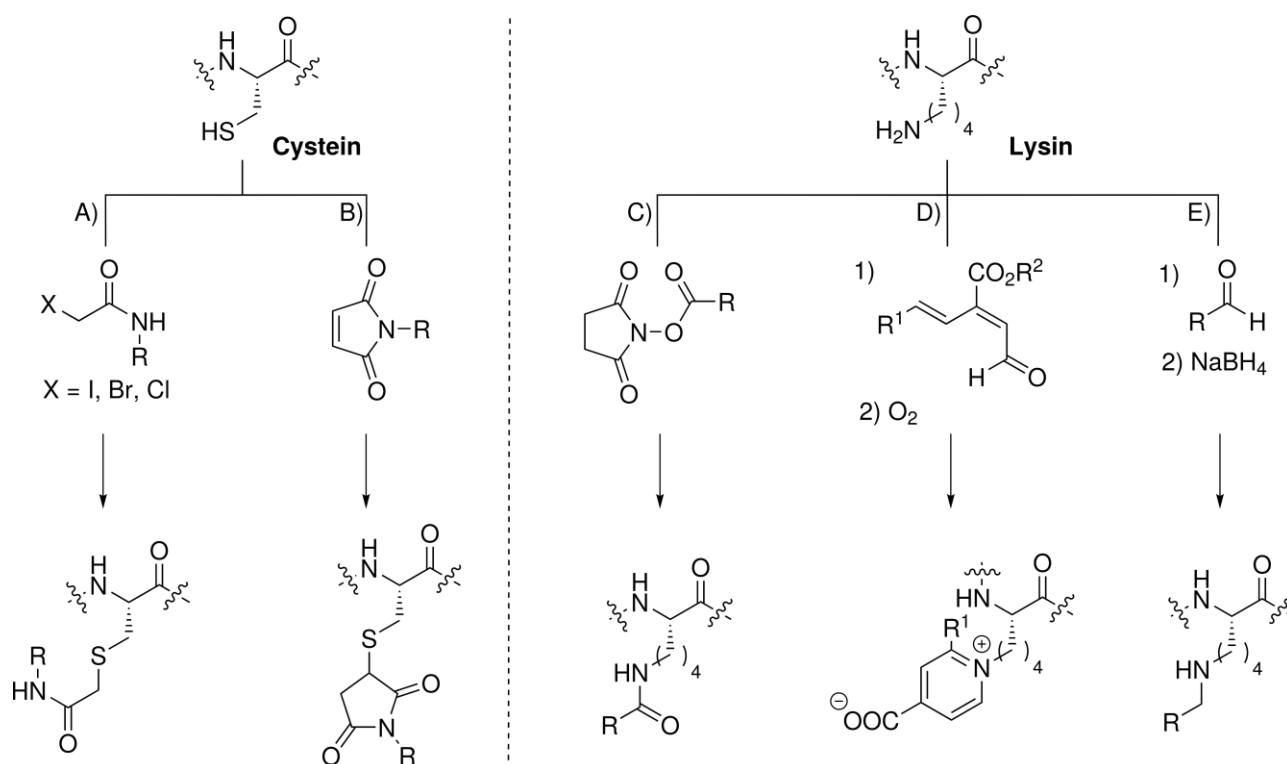
Viele der 20 natürlichen Aminosäuren besitzen aufgrund ihrer unterschiedlichen Seitenketten bereits eine intrinsische und selektive Reaktivität. Aufgrund der geringen Vielfalt an Aminosäuren und dem somit vermehrten Vorkommen im selben Protein ist die exakte Positionierung einer Proteinmarkierung jedoch problematisch. Die Umsetzung mit einem chemischen Reagenz führt meist zu einem statistisch verteilten Produktgemisch. Des Weiteren besitzen viele der natürlichen Aminosäuren ähnliche, nukleophile funktionelle Gruppen, was die chemoselektive Modifizierung zusätzlich erschwert. Die am besten untersuchtesten Aminosäuren für Biokonjugationen sind Cystein und Lysin aufgrund der besonderen Nukleophilie ihrer Seitenkette.<sup>[106]</sup>

#### Modifizierung von Cystein

Bei kontrolliertem pH kann das Thiol des Cysteins auch bei Anwesenheit anderer Nukleophile wie Lysin oder Histidin mit entsprechenden Elektrophilen chemoselektiv umgesetzt werden. Die geringe Häufigkeit von Cystein von < 2% in Proteinen erlaubt in Ausnahmefällen die Einfachmarkierung an einem Protein.<sup>[104]</sup> Heutzutage wird routinemäßig die chemoselektive Alkylierung von Cysteinen mit dem  $\alpha$ -Halogencarbonylderivat Iodacetamid als *Capping*-Reagenz zur Proteinsequenzierung verwendet (siehe **Abbildung 7**).<sup>[116]</sup> Seit bereits über 80 Jahren ist die chemoselektive Umsetzung von Cystein mit *Michael*-Akzeptoren wie Maleimiden bekannt.<sup>[117]</sup> Die einfache Derivatisierung von Maleimiden hat zu dessen weitreichender Verwendung, z.B. in Impfstoffen und modifizierten Enzymen geführt.<sup>[118-120]</sup> Nachteilig ist jedoch die mit der Zeit eintretende Hydrolyse der Cystein-Maleimid-Bindung und somit die Zersetzung des Biokonjugats zu Produktgemischen.<sup>[121,122]</sup> Weiterhin ist die Markierung von Cysteinen aufgrund des massiven Vorkommens redoxaktiver Thiole in der Zelle wie Glutathion weitgehend auf *in vitro*-Experimente begrenzt.<sup>[123]</sup>

#### Modifizierung von Lysin

Chemische Reaktionen mit primären Aminen sind seit Jahrhunderten bekannt, sodass es nicht verwunderlich ist, dass zahlreiche Lysin-markierende Reaktionen beschrieben sind.<sup>[105,124]</sup> Durch die Verwendung von Elektrophilen wie Aktivestern, Sulfonylchloriden oder Isothiocyanaten wird eine chemoselektive Lysin-Modifizierung ermöglicht (siehe **Abbildung 7**).<sup>[125-127]</sup> Ungesättigte Aldehydester finden in letzter Zeit besondere Aufmerksamkeit aufgrund der Möglichkeit eine selektive, irreversible  $6\pi$ -Aza-Elektrozyklisierungsreaktion mit Lysinen einzugehen.<sup>[128]</sup> So konnte diese Me-



**Abbildung 7:** Klassische Methoden zur Modifizierung von Cystein und Lysin: A) Alkylierung mit  $\alpha$ -Halogenacetyl-derivaten, B) Addition mit Maleimid als *Michael*-Akzeptor, C) Amidbildung, D)  $6\pi$ -Aza-Elektrozyclisierungsreaktion mit ungesättigten Aldehydestern und E) Reduktive Aminierung.

thode bereits zur Bindung eines Positron-emittierenden Metalls verwendet werden. Eine der populärsten Lysin-Markierungsmethoden ist jedoch die reduktive Aminierung.<sup>[129,130]</sup> Die Umsetzung von Lysin mit Aldehyden zum entsprechenden Imin sowie die nachfolgende Reduktion mit Natriumborhydrid oder mit dem milderen Reagenz Natriumcyanoborhydrid erlaubt die chemoselektive Modifizierung bei neutralem pH. Das Gleichgewicht dieser *Schiff*'schen Base-Reaktion ist im wässrigen Medium stark pH-Wert-abhängig. Im Neutralen liegt es meist auf Seiten der Edukte, sodass nur eine unzureichende Proteinmarkierung erfolgt. Die in diesem Absatz beschriebenen Reaktionen dienen aufgrund fehlender Regioselektivität zur multiplen Lysin-Markierung und finden beispielsweise in der PEGylierung zur Erhöhung der Stabilität und für biochemische Protein-Untersuchungen Anwendung.<sup>[131,132]</sup>

### 1.2.2 Sequenzspezifische Proteinmarkierungen

Methoden zur sequenzspezifischen Modifizierung von Proteinen sind aufgrund der kontrollierten Umsetzung besonders für die biochemischen Untersuchungen von posttranslationalen Modifikationen, die Herstellung von Protein-basierten Sensoren und die Generierung von therapeutischen Pro-

teinen wie Antikörper-Wirkstoff-Konjugaten wichtig.<sup>[133,134]</sup> Zur Sequenzspezifität wird zusätzlich zur Chemo- auch eine Regioselektivität benötigt. Basierend auf dem Vorbild der Natur ist dies durch Verwendung von kurzen Peptidsequenzen möglich, die durch Feinabstimmung des lokalen Sequenzkontexts die Reaktivität der Ziel-Aminosäure positiv beeinflussen.<sup>[135,136]</sup> Durch den oben erwähnten Einbau unnatürlicher Aminosäuren ist zwar eine sequenzspezifische Proteinmarkierungen möglich, jedoch wird sich im Weiteren aufgrund der bereits erwähnten Nachteile auf Methoden mit natürliche Aminosäuren fokussiert.

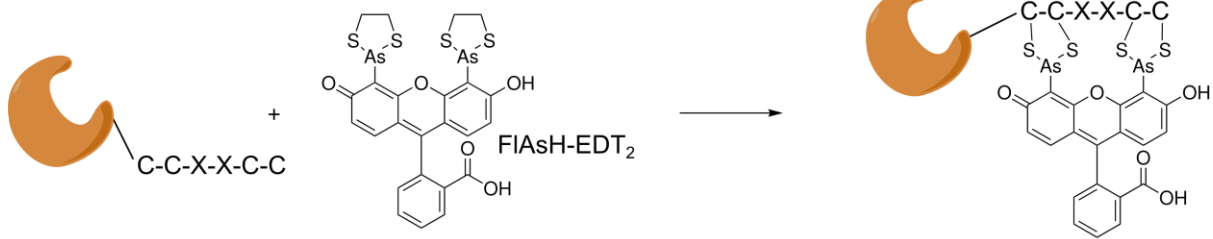
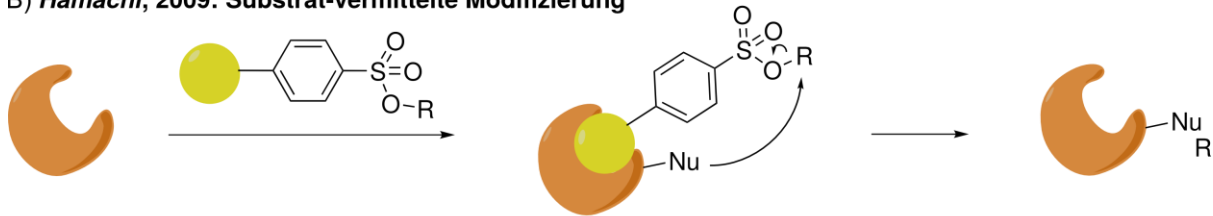
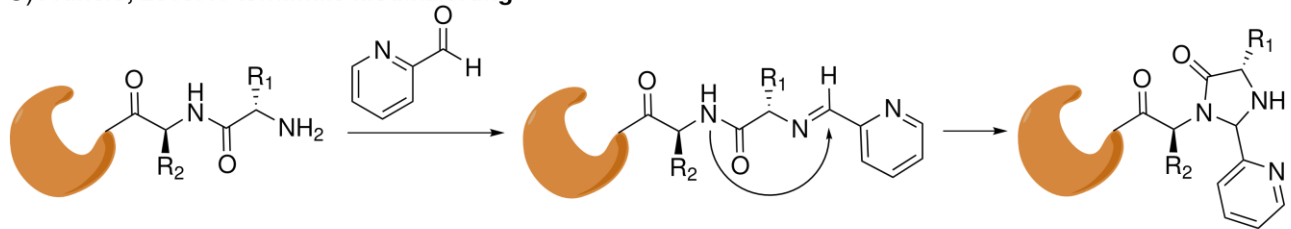
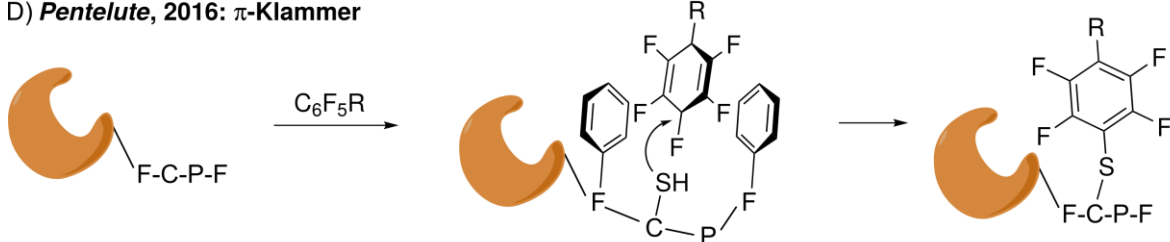
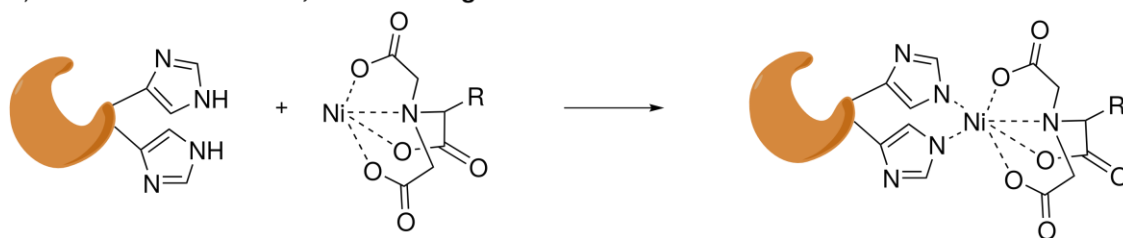
Mittels Mutation gelang es 2007 der Gruppe um *Bertozzi* die Aktivität einer Liponsäure-Ligase derart zu verändern, dass diese ein Liponsäure-Alkin-Derivat auf ein Lysin eines artifiziellen, 22 Aminosäure-haltigen Peptids übertrug.<sup>[137]</sup> Dieses Peptid unterschied sich deutlich von dem natürlichen Protein-Substrat der Liponsäure-Ligase, sodass nach Einbau der Peptidsequenz in ein Protein der Wahl eine hoch selektive Proteinmarkierung erfolgte. Der Nachteil dieser Methode ist allerdings der zeitliche und materielle Aufwand für die entsprechenden Enzymmutationen.

Eine der ersten chemischen Methoden für eine sequenzspezifische Proteinmarkierung, die heute als Pionierarbeit auf diesem Gebiet gilt, wurde 1998 von der Gruppe um *Tsien* beschrieben (siehe **Abbildung 8A**).<sup>[138,139]</sup> Sie zeigten, dass das helikale Tetracysteins-Motiv CCXXCC eine extrem hohe Affinität von  $K_D < 100$  pM zu einem biarsenischen-Metallkomplex (FLAsH) besitzt. Die Bindung induzierte eine deutliche Fluoreszenzverstärkung von FLAsH. Durch Verlängerung des C-Terminus' um das Tetracystein-Motiv war die Verfolgung eines Ziel-Proteins im Rahmen von *Bioimaging*-Studien in Zellen möglich. Ein Nachteil dieser Methode ist vor allem die Zytotoxizität von Arsen.<sup>[139-141]</sup>

Eine ähnliche Methode beschrieb 2009 die Gruppe um *Schepartz*, die die Fluoreszenzverstärkung bei der Veresterung mancher Mono- und Bisboronsäuren ausnutzten.<sup>[142]</sup> Sie zeigten, dass das Tetra-serin-Motiv SSPGSS mit Boronsäuren kondensiert. Bei Verwendung von Rhodaminderivaten der Boronsäuren (RhoBo) konnten Affinitäten im nM-Bereich erreicht werden.

2009 beschrieb die Gruppe um *Hamachi* die Möglichkeit einer Substrat-dirigierenden Biokonjugation zur *in vivo* sequenzspezifischen Proteinmarkierung (siehe **Abbildung 8B**).<sup>[143]</sup> Hierfür wurde das Substrat des zu untersuchenden Enzyms mit der zu übertragenden Sonde über einen Tosylester miteinander verbunden. Bei Enzym-Substrat-Bindung reagierte eine in der Nachbarschaft des aktiven Zentrums stehende nukleophile Aminosäure mit dem Tosylester, wodurch die Sonde auf das Protein übertragen wurde.

Eine der kleinsten bisher beschriebenen Peptidsequenzen, die eine regioselektive Proteinmodifizierung steuern, wurde 2016 von der Gruppe um *Pentelute* beschrieben (siehe **Abbildung 8D**).<sup>[144]</sup> Sie

A) **Tsien, 1998: FIAsH-System**B) **Hamachi, 2009: Substrat-vermittelte Modifizierung**C) **Francis, 2015: N-terminale Modifizierung**D) **Pentelute, 2016: π-Klammer**E) **F. Hoffmann-La Roche, 1987: His-Tag**

**Abbildung 8:** Übersicht verschiedener Methoden zur sequenzspezifischen Modifizierung von Proteinen (orange). A) Das FIAsH-System, welches eine hohe Affinität zu einem Tetracystein-Motiv besitzt. B) Die Substrat-vermittelte Modifizierung der Gruppe um *Hamachi*. C) Eine *N*-terminale Modifizierung ist mittels 2-Pyridincarboxyaldehyd möglich. D) Die Gruppe um Pentelute beschrieb 2016 die Verwendung einer vier Aminosäuren-haltigen Sequenz, die durch Ausbildung einer -Klammer, eine sequenzspezifische Proteinmarkierung ermöglicht. E) Derivate des ursprünglich von *F. Hoffmann-La Roche* entwickelten *His*-Tags eignen sich neben der Aufreinigung auch zur Modifizierung von Proteinen.

zeigten, dass die vier Aminosäure-haltige Sequenz FCPF eine Art  $\pi$ -Klammer ausbildet und somit eine sequenzspezifische Biokonjugation von Cystein mit perfluorierten, aromatischen Reagenzien unter physiologischen Bedingungen ermöglicht. Dies gelingt durch einen günstigen Übergangszustand, in dem die elektronenreichen Phenylreste von Phenylalanin positive  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen mit einem Pentafluorphenyl-Derivat ausbilden. So wird die Aktivierungsenergie der nukleophilen aromatischen Substitution um 3 kcal gesenkt und ermöglicht den Angriff von Cystein unter den gegebenen Bedingungen. Der Austausch von Phenylalanin durch andere Aminosäuren resultierte in einem kompletten Verlust der Umsetzung. Ein Vorteil der Reaktion ist die einfache Funktionalisierung des Pentafluorphenyl-Derivats, sodass eine Vielzahl von Anwendungen denkbar ist. Des Weiteren konnte auch bei Vorhandensein anderer Cysteine ein homogenes Antikörper-Konjugat generiert werden.

Die kleinste Peptidsequenz für eine regioselektive Proteinmarkierung ist sicherlich die Verwendung des *N*-Terminus. 2015 beschrieb die Gruppe um Francis die Umsetzung von Proteinen mit 2-Pyridincarboxyaldehyden (siehe **Abbildung 8C**).<sup>[145]</sup> Das Amin des *N*-Terminus reagiert zunächst reversibel mit dem Aldehyd zu einem Imin. Der nachfolgende nukleophile Angriff des ersten amidischen Stickstoffs der Proteinsequenz auf das Imin resultiert in der Bildung zweier diastereomerer Imidazolidinon-Derivate. Abhängig von der ersten Aminosäure der Proteinsequenz erfolgt die Umsetzung mit einer Ausbeute > 60%. Zwar ist keine gentechnische Modifizierung des Proteins von Nöten, allerdings lassen sich Proteinen mit einer *N*-terminalen posttranslationalen Modifikation nicht markieren. Des Weiteren ist auch eine Anwendung *in vivo* aufgrund der fehlenden Proteinselektivität nicht möglich.

### 1.2.3 Reversible und sequenzspezifische Proteinmarkierungen

Eine zusätzliche Reversibilität der Proteinmarkierung bietet den Vorteil, dass die Markierung zu einem bestimmten Zeitpunkt wieder entfernt werden kann. Anwendung findet dies bislang vor allem im Bereich der Proteinaufreinigung.

Das *Strep-Tag*-System ist eine populäre Methode zur Aufreinigung sowie zur Detektion von Proteinen.<sup>[146,147]</sup> Der *Strep-Tag* ist eine acht Aminosäure-haltige Peptidsequenz (WSHPQFEK), welche mit hoher Affinität *Strep-Tactin*, eine Mutante von Streptavidin, bindet und rekombinant *N*- oder *C*-terminal in das Zielprotein eingebaut werden kann. Proteine, die den *Strep-Tag* enthalten, können mittels *Strep-Tactin*-Säulen unter physiologischen Bedingungen aufgereinigt werden.

Eine weitere populäre Aufreinigungsmethode ist das ursprünglich von *F. Hoffmann-La Roche* ent-

wickelte *His-Tag*-System, welches in den letzten Jahren auch als chemische Methode zur Proteinmodifikation verwendet wurde (siehe **Abbildung 8E**).<sup>[148,149]</sup> Der *His-Tag* ist eine meist sechs Histidin-haltige Sequenz. Dessen Imidazolgruppen können mit einer Affinität im  $\mu\text{M}$ -Bereich einen Chelatkomplex mit Nickel-nitrilotriacetat (Ni-NTA) ausbilden.<sup>[150]</sup> Zur Modifikation von Proteinen wurden bislang Ni-NTA-Derivate mit Rhodamin- und Cyaninfarbstoffen sowie Fluorescein verwendet.<sup>[151-153]</sup> Der Nachteil des *His-Tag*-System ist der Paramagnetismus von Nickel(II), der zum *Quenching* des Fluoreszenzsignals führen kann.<sup>[154]</sup> Des Weiteren ist Nickel zytotoxisch und somit ist eine *in vivo* Anwendung des *His-Tag*-System problematisch.<sup>[155]</sup>

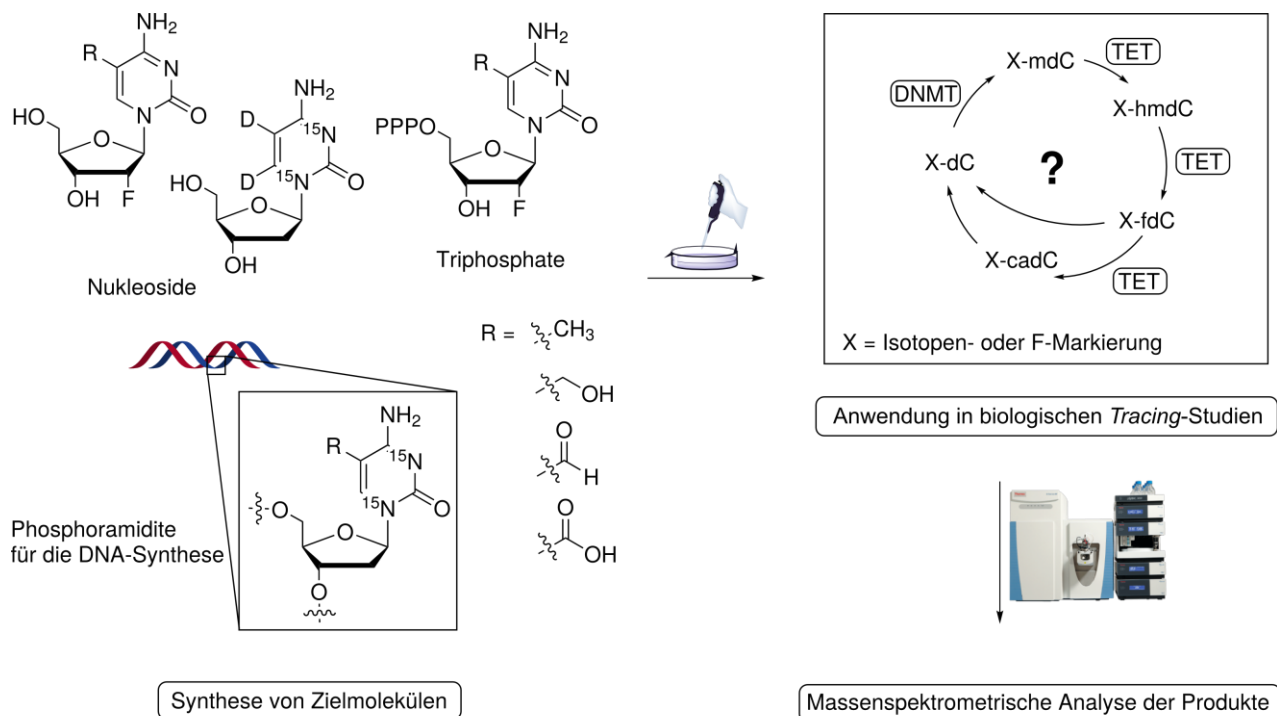
Zusammenfassend wurden in den letzten Jahren zahlreiche, teilweise hochselektive Methoden zur Proteinmarkierung entwickelt. Die Verwendung unnatürlicher Aminosäuren ermöglicht zwar eine hochselektive Markierung, deren Inkorporation in Proteine ist jedoch zeit- und materialaufwendig. Im Gegensatz dazu resultiert die Modifikation einer natürlichen Aminosäure aufgrund deren großer Abundanz häufig in inhomogene Produktgemische. Der Einbau einer spezifischen Sequenz aus kanonischen Aminosäuren in ein Protein ist aufgrund effektiver Mutationsprotokolle heutzutage Routine. Dies ermöglicht zwar die selektive Proteinmarkierung, ist jedoch häufig aufgrund der Verwendung von Metallen oder organischen Lösungsmitteln nicht biokompatibel. In Anbetracht der bislang problematischen Generierung homogener Antikörper-Wirkstoff-Konjugate ist die Entwicklung neuer Methoden zur sequenzspezifischen Proteinmarkierung daher von höchster Priorität.<sup>[156-159]</sup> Eine zusätzliche Reversibilität der Modifizierung könnte zu einer lokalen Wirkstofffreisetzung genutzt werden und somit möglicherweise zu einer erhöhten Effizienz führen.



## 2 Aufgabenstellung

Schwerpunkt dieser Promotionsarbeit war die Modifizierung von Biomolekülen im Rahmen von zwei unterschiedlichen Themengebieten. Zum einen wurden natürliche Modifikationen von DNA-Nukleosiden untersucht und zum anderen eine neuartige Markierungsmethode für Proteine entwickelt.

Im ersten Teilbereich wurde mit unterschiedlichen Ansätzen versucht, den Metabolismus der epigenetisch relevanten DNA-Modifikation Methylcytosin aufzuklären. Eine der Expertisen des Arbeitskreises Carell ist die Synthese speziell markierter Nukleoside und Oligodesoxynukleotide sowie deren massenspektrometrische Quantifizierung nach Metabolisierung im biologischen Kontext (siehe **Abbildung 9**). Diese *Tracing*-Methode birgt ein vielversprechendes Potential zur endgültigen Aufklärung des Methylcytosin-Metabolismus.



**Abbildung 9:** Schematischer Ablauf einer *Tracing*-Methode.

Im Fokus dieser Arbeit stand besonders das Nukleosid fdC sowie die Synthese speziell markierter, epigenetisch relevanter DNA-Nukleoside für verschiedene *Tracing*-Methoden. Dabei sollten die folgenden Problemstellungen bearbeitet werden:

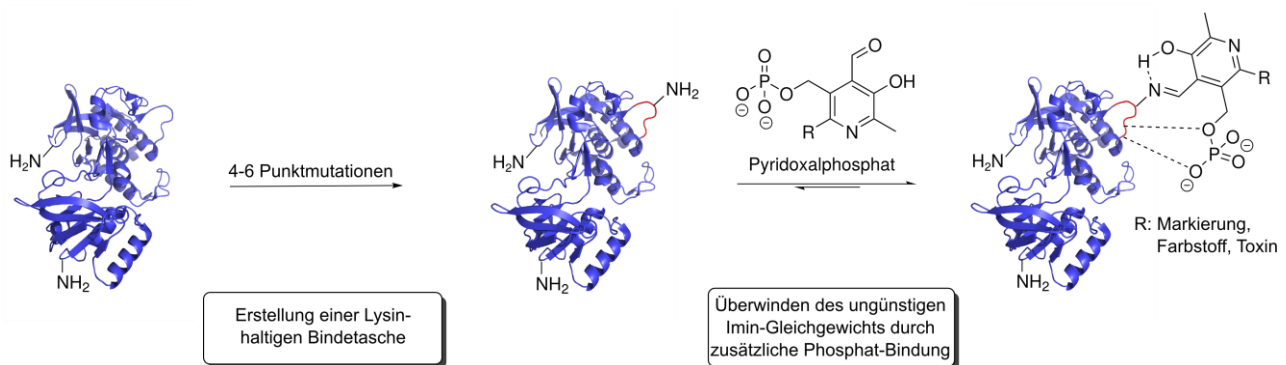
- **Entwicklung eines verbesserten fdC-Phosphoramidit-Bausteins:** Der bis dato verwendete fdC-Phosphoramidit-Baustein verursachte eine Reihe von unbekanntenen Nebenreaktionen während der DNA-Synthese. Die anschließende sehr aufwändige Reinigung resultierte in

minimaler Ausbeute fdC-haltiger DNA. Die Aufgabe war es, die Nebenreaktionen zu analysieren und mit Hilfe der so erhaltenen Informationen einen verbesserten fdC-Phosphoramidit-Baustein zu synthetisieren. Dies würde die Herstellung fdC-haltiger DNA in hoher Qualität und Ausbeute ermöglichen.

- **Sequenzierung von fdC-Nukleosiden in der DNA:** Zu Beginn dieser Arbeit gab es lediglich auf Bisulfit basierende fdC-Sequenzierungsmethoden, die eine Basen-Auflösung ermöglichten. Da die Bisulfit-Umsetzung sehr ineffizient ist, sollte eine neue, bisulfitfreie Sequenzierungstechnik entwickelt werden.
- **Isotopenmarkierte, epigenetisch relevante DNA-Nukleoside:** Isotopenmarkierte Nukleoside der epigenetisch relevanten Nukleoside wurden für die massenspektrometrische Quantifizierung benötigt. Zusätzlich wurden für biochemische und zellbiologische Untersuchungen isotopenmarkierte Phosphoramidit-Bausteine zur anschließenden DNA-Festphasensynthese sowie speziell isotopenmarkierte Nukleoside für Verfütterungsexperimente benötigt. Diese sollten im Rahmen von *Tracing*-Studien als Markierung zur Aufklärung der aktiven Demethylierung beitragen. Die Synthesen dieser Verbindungen sollten im Rahmen dieser Arbeit angefertigt werden.
- **Fluorierte Analoga der epigenetisch relevante DNA-Nukleoside:** Eine 2'-Fluor-Substitution würde möglicherweise die chemischen Eigenschaften der epigenetisch relevanten Nukleoside bei minimaler sterischer Modifizierung derart verändern, dass eine Basenexzisionsreparatur von F-fdC und F-cadC unmöglich ist. Bei Vorhandensein einer Deformylierungs- / Decarboxylierungs-Aktivität sollte daher unnatürliches F-dC entstehen. Die Aufgabe bestand darin, sämtliche fluorierte Analoga der epigenetisch relevanten Nukleoside sowie deren Triphosphate und Phosphoramidit-Bausteine zur Überprüfung dieser Hypothese zu synthetisieren, sowie erste biochemische und zellbiologische Experimente zur Aufklärung der aktiven Demethylierung durchzuführen.

Im zweiten Themenbereich sollte eine neuartige Proteinmarkierung entwickelt werden (siehe **Abbildung 10**). Ziel war es hier, die Reaktivität eines Lysins an der Oberfläche des Proteins durch rationale Punktmutation des Sequenzkontexts derart zu beeinflussen, dass es mit einem Aldehyd eine thermodynamisch stabile *Schiffsche* Base eingeht. Vorteil zu bisherigen Methoden wäre vor allem die Reversibilität der Markierung sowie die zu erwartende relativ geringe Sequenzmodifizie-

zung des Proteins. Als Aldehyd wurde Pyridoxalphosphat (PLP) aufgrund der sehr gut erforschten Bindungsaffinität zu Lysininen in Proteinen verwendet.



**Abbildung 10:** Prinzip der reversiblen, sequenzspezifischen Proteinmarkierung. Durch Punktmutationen soll eine Lysin-haltige Bindetasche konstruiert werden, die PLP derart bindet, dass das so entstehende Imin thermodynamisch stabil ist.

Zur erfolgreichen Entwicklung einer solchen Proteinmarkierung sollten die folgenden Problemstellungen bearbeitet werden:

- **Identifizierung einer minimalen Peptidsequenz:** Mittels kombinatorischer Peptid-Bibliothek-Synthese sollte eine minimale Peptidsequenz gefunden werden, die hoch-affin ein PLP-Derivat bindet.
- **Charakterisierung der Bindung zwischen Peptid und PLP:** Die im vorherigen Schritt gefundene Peptidsequenz sollte anschließend mit PLP-Derivaten umgesetzt und die erhaltene Bindung ausführlich charakterisiert werden. Dabei sollte die Bindungskonstante ermittelt, die Reversibilität überprüft und weitere stabilisierende Faktoren der Bindung analysiert werden. Letzteres sollte vor allem durch die Synthese von unterschiedlichen PLP-Derivaten realisiert werden.
- **Implementierung der Sequenz in Proteinen:** Die umfangreich charakterisierte Peptidsequenz sollte daraufhin in ein Protein implementiert und die erfolgreiche Markierung anschließend mittels biochemischen und massenspektrometrischen Methoden nachgewiesen werden. Weiterhin sollte in ersten Anwendungsbeispielen, z.B. durch Anbringen eines Farbstoffes oder Toxins an PLP, die Vorteile dieser reversiblen Proteinmarkierung gezeigt werden.

### 3 Entwicklung eines neuartigen fdC-Phosphoramidit Bausteins

Für die genaue Untersuchung der neuen, epigenetisch relevanten Nucleoside ist es von besonderem Interesse, Methoden zur Synthese von hmdC, fdC und cadC-haltiger DNA zu entwickeln.

Zu Beginn dieser Arbeit war die Verwendung des kommerziell erhältlichen fdC-Phosphoramidit-Bausteins **4** in der DNA-Synthese sehr problematisch (siehe **Abbildung 11**). Vermutlich führten zahlreiche Nebenreaktionen während der DNA-Synthese und der Entschützung zu einem Produktgemisch, sodass das benötigte Oligodesoxynucleotid (ODN) nur mit großem Zeitaufwand und in geringen Mengen isoliert werden konnte.

Ziel der folgenden Experimente war es zunächst, die unbekannteten Nebenreaktionen während der DNA-Festphasensynthese zu identifizieren. Mit den so gewonnenen Informationen sollten durch den Einsatz einer entsprechenden Schutzgruppenstrategie etwaige Nebenreaktionen unterdrückt werden. Weiterhin war die Entwicklung eines marktfähigen Phosphoramidit-Bausteins angedacht, welcher nach DNA-Einbau unter industrieller Standard-Bedingung (konz.  $\text{NH}_3$ ) entschützt werden kann.

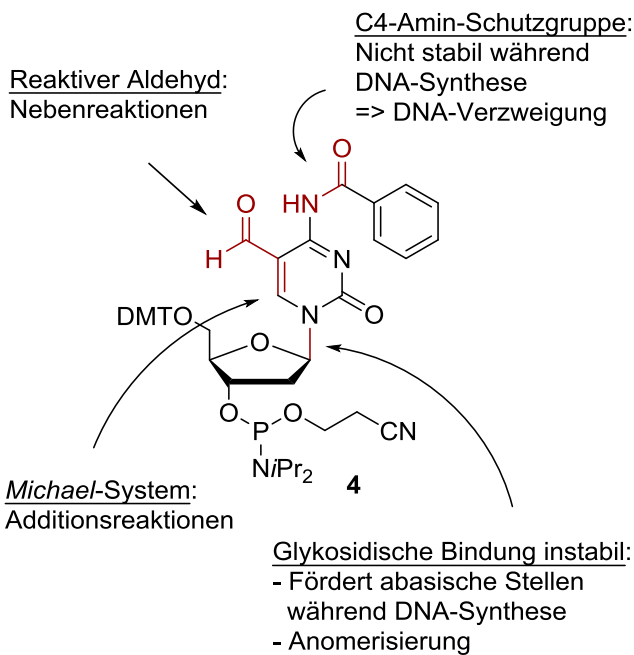
Zunächst wurde ein musterhafter fdC-haltiger DNA-Strang synthetisiert. Nach präziser HPLC-Auftrennung der Nebenprodukte sowie deren massenspektrometrischer Charakterisierung mittels MALDI-TOF konnten verschiedene Nebenreaktionen festgestellt werden. Diese werden im Folgenden mit der wahrscheinlich zugrunde liegenden Ursache erläutert (siehe **Abbildung 11**):

- **DNA-Verzweigung:** Die Benzoyl-Schutzgruppe des C4-Amins von fdC wird teilweise während der Festphasensynthese abgespalten. So entsteht ein freies Amin, welches mit einem in der DNA-Synthese folgenden Phosphoramidit reagiert und somit zu verzweigten ODN-Nebenprodukten führen kann.
- **Acrylnitril-Addukte:** Während der basischen DNA-Entschützung wird die Cyanoethoxy-Schutzgruppe des Phosphordiesters als Acrylnitril eliminiert. Die Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Formyl-Gruppe und dem C4-Amin erhöht leicht die Basizität des C4-Amins, welches dann mit Acrylnitril zu den beobachteten Addukten reagieren kann.<sup>[83]</sup>
- **Weitere nicht identifizierbare Addukte:** Wahrscheinlich reagieren nukleophile Reagenzien während der Festphasensynthese mit dem *Michael*-System und ergeben dadurch verschiedene Additionsprodukte.<sup>[80]</sup>
- **$\beta$ - zu  $\alpha$ -fdC Anomerisierung:** Nach vollständigem DNA-Verdau konnte per UHPLC eine Anomerisierung von bis zu 10%  $\alpha$ -fdC beobachtet werden. Dies kann nur auf eine kurzzeiti-

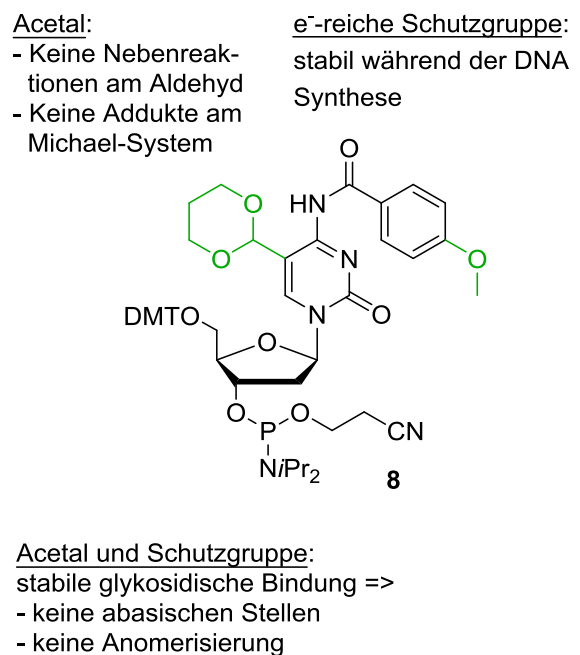
ge Öffnung des Zuckerrings oder auf einen vorübergehenden Bruch der glykosidischen Bindung während der Festphasensynthese zurückzuführen sein.

- **Strangbrüche:** Es konnten verkürzte ODNs als Produkte einer Deglykosylierung mit nachfolgendem Strangbruch detektiert werden. Es ist sehr wahrscheinlich, dass die Deglykosylierung während der Festphasensynthese, möglicherweise im Detritylierungs-Schritt, stattfindet und durch die stark elektronenziehende Eigenschaft der Formylgruppe begünstigt ist.<sup>[160]</sup>

**A Bisheriger fdC-Phosphoramidit-Baustein**



**B Neuer fdC-Phosphoramidit-Baustein**

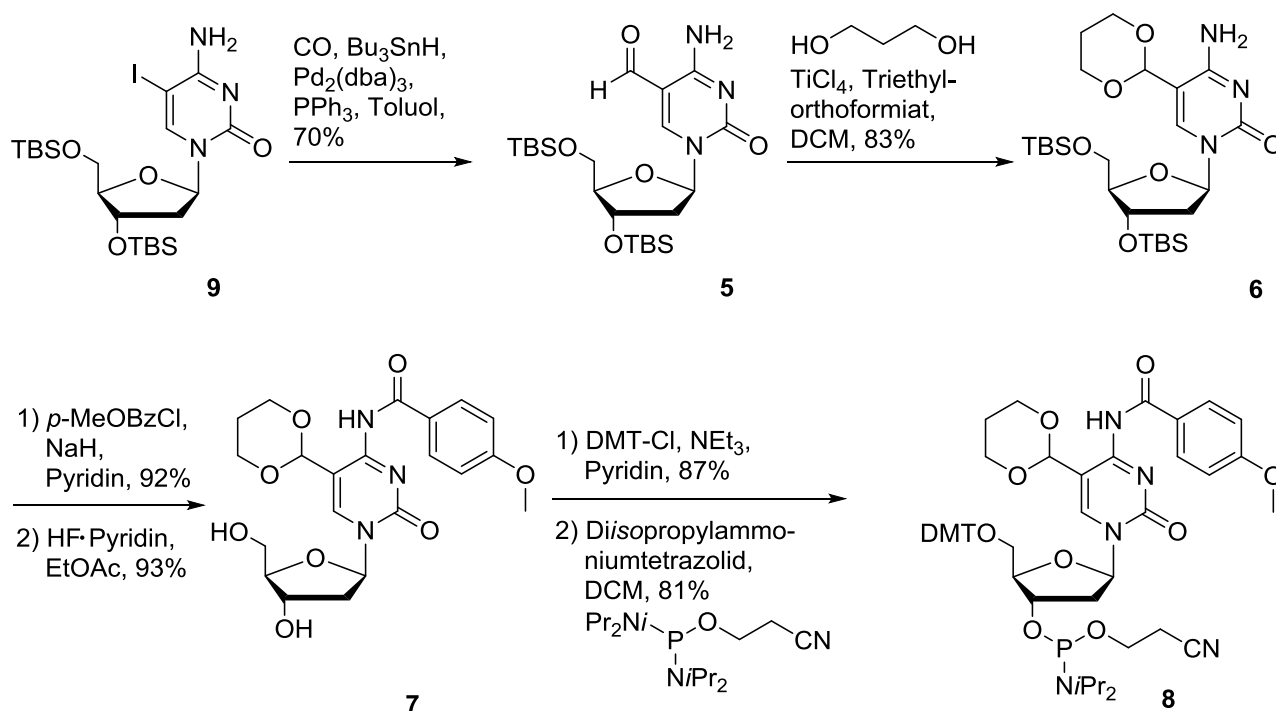


**Abbildung 11:** A) Identifikation der Schwachpunkte des bisherigen fdC-Phosphoramidit-Bausteins **4** sowie B) die Optimierung des Bausteins für die effiziente DNA-Festphasensynthese.

Bei genauer Analyse der Nebenreaktionen konnten zwei funktionelle Gruppen im fdC-Phosphoramidit als "Auslöser" für Nebenreaktionen identifiziert werden. Zunächst fiel das reaktive C4-Amin auf. Durch Verwendung einer deutlich stabileren Amid-Schutzgruppe sollte dieses keine Nebenreaktion mehr eingehen können. Des Weiteren destabilisiert das reaktive *Michael*-System das fdC-Phosphoramidit. Dieses könnte durch Verwendung einer Acetal-Schutzgruppe maskiert werden. Zusätzlich wird so die elektronenziehende Eigenschaft der Formylgruppe reduziert.

### 3.1 Synthese und Optimierung des fdC-Phosphoramidits

Basierend auf der Analyse der Schwachpunkte des alten fdC-Bausteins wurde ein modifiziertes fdC-Phosphoramidit synthetisiert (siehe **Schema 2**). Hierbei diente 2'-Desoxycytidin (dC) als Edukt, welches nach literaturbekannten Vorschriften zum fdC-Derivat **5** umgesetzt wurde.<sup>[161]</sup> Für die Maskierung der Formylgruppe wurden unterschiedliche Schutzgruppen untersucht, wobei sich die Verwendung der 1,3-Dioxanyl-Gruppe als am effektivsten herausstellte. Allerdings reagierte die Formylgruppe nur nach Aktivierung mit der starken *Lewis*-Säure  $\text{TiCl}_4$  mit Propan-1,3-diol in akzeptablen Ausbeuten von 83% zum erwarteten 1,3-Dioxan **6**. Die üblichen Bedingungen zur Einführung der Acetal-Schutzgruppe wie z.B. Protonen-katalysierte Reaktionen und der Einsatz weniger starker *Lewis*-Säuren wie beispielsweise  $\text{CeCl}_3$  schlugen fehl. Das C4-Amin wurde nachfolgend mit *p*-Methoxybenzoylchlorid geschützt, da sich die herkömmliche Benzoyl-Schutzgruppe als zu labil während der Festphasensynthese herausstellte. Der zusätzliche elektronenschiebende Effekt dieser Schutzgruppe stabilisierte das Amid und zusammen mit der Acetalschutzgruppe den elektronenarmen Heteroaromaten. Die  $\beta$ - zu  $\alpha$ -Anomerisierung konnte somit unterdrückt werden. Elektronenziehende Benzoyl-Schutzgruppen, wie *p*-Chlor- bzw. *p*-Nitro-benzoylgruppen destabilisierten das Amid weiter und führten daher zu keiner Verbesserung. Die nachfolgende Silyl-Entschützung lieferte das fdC-Derivat **7**, welches mithilfe von Standardprozeduren in das fdC-Phosphoramidit **8** umgewandelt wurde.<sup>[162,163]</sup>

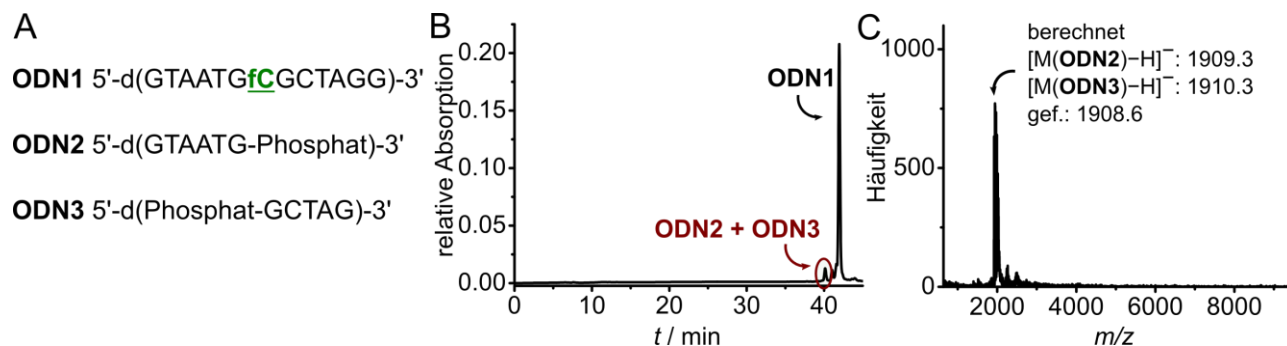


**Schema 2:** Synthese des acetalgeschützten fdC-Phosphoramidit-Bausteins **8**.

Im Zuge dieser Arbeit wurde diese Syntheseroute erfolgreich im Multigramm-Maßstab (9 g) durchgeführt.

### 3.2 Optimierung der sauren Acetal-Entschützung an der DNA

Zur Überprüfung der Stabilität der Acetal-Schutzgruppe sowie zur Optimierung der Entschützung wurde eine Beispiel-Festphasensynthese durchgeführt (siehe **Abbildung 12**). Dabei stellte sich heraus, dass das Acetal während der Synthese nicht gespalten und somit der Aldehyd stabil maskiert wird. Für die nachfolgende saure Entschützung wurde die relativ milde 80%-ige Essigsäure verwendet. Bereits nach drei Stunden bei 25 °C wurde eine vollständige Entschützung festgestellt. Jedoch konnte bei genauerer Analyse des HPL-Chromatogramms und des MALDI-TOF-Spektrums eine säurekatalysierte Spaltung der fdC-glykosidischen Bindung mit nachfolgendem Strangbruch detektiert werden. Dies ist nicht verwunderlich, da dies bei niedrigem pH-Wert sogar für das weniger elektronenarme dC literaturbekannt ist.<sup>[164]</sup> Bei einer Entschützungstemperatur von nur 15 °C konnte zwar keine Deglykosylierung, aber nur eine sehr langsame Acetalspaltung festgestellt werden. Bei 20 °C konnte nach sechs Stunden ausschließlich das Produkt ohne jegliche Verunreinigung detektiert werden. Die Entschützung muss daher strikt bei etwa 20 °C erfolgen.



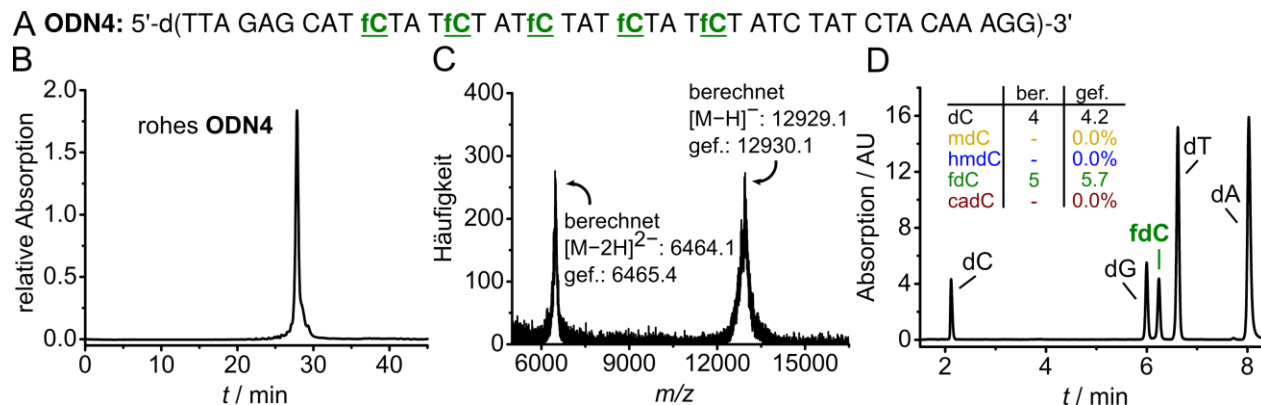
**Abbildung 12:** A) Erfolgte die saure Acetalentschützung (80%-ige wässrige Essigsäure) des **ODN1** bei 25 °C, so kam es in geringen Mengen zur Spaltung der fdC-glykosidischen Bindung. Der nachfolgende Strangbruch ergab die Produkte **ODN2** und **ODN3**. B) Reversed-phase HPL-Chromatogramm der sauren Entschützung bei 25 °C von **ODN1** (0-20% Puffer B in 45 min). C) MALDI-TOF-Spektrum von **ODN2** und **ODN3**.

### 3.3 Charakterisierung des neuen fdC-Phosphoramidit-Bausteins

Zur Überprüfung der Qualität des neuen fdC-Bausteins wurde das Oligonukleotid **ODN4** mit fünf fdC hergestellt (siehe **Abbildung 13A**). Für die Festphasensynthese wurden industrielle Standard-Phosphoramidit-Bedingungen verwendet.<sup>[165,166]</sup> Lediglich die Kupplungszeit von fdC wurde von 30 auf 60 Sekunden erhöht. Die Entschützung der Nukleotide sowie die Abspaltung vom Trägermaterial erfolgten mit konzentrierter NH<sub>3</sub>-Lösung (24 h, 25 °C). In einem zweiten Schritt wurde **ODN4** mit 80%-iger wässriger Essigsäure für 6 h bei 20 °C entschützt, was zur Hydrolyse der Acetal-Schutzgruppe führte. Das Roh-HPL-Chromatogramm für **ODN4** ist in **Abbildung 13B** dargestellt. Das einzelne Signal deutet auf eine hohe Qualität des hergestellten DNA-Stranges hin.

Der Nachweis des fünffachen fdC-Einbau erfolgte per Massenspektrometrie. Die Aufnahme eines MALDI-TOF-Spektrums von **ODN4** lieferte die korrekte Masse (**Abbildung 13C**). Weiterhin wurde durch *J. Steinbacher* (AK Carell) die Roh-DNA mittels enzymatischem Verdau in die einzelnen Nukleoside zerlegt. Hierfür wurde die Roh-DNA zunächst mit der *Nuklease S1* sowie der *Antarctic Phosphatase* inkubiert. Bei der *Nuklease S1* handelte es sich um eine vom *Aspergillus oryzae* stammende Endonuklease, die einzelsträngige DNA oder RNA durch Hydrolyse des Phosphodiester in Oligo- bzw. Mononukleotide umwandelt.<sup>[167]</sup> Die *Antarctic Phosphatase* hingegen katalysierte die 5'-Dephosphorylierung von Oligo- bzw. Mononukleotiden.<sup>[168]</sup> Zur vollständigen Umsetzung zu den einzelnen Nukleosiden erfolgte im zweiten Schritt die Inkubation mit der *Snake venom Phosphodiesterase I*, einer Exonuklease, die vorwiegend 5'-Phosphatester von Oligonukleotiden hydrolysiert.<sup>[169]</sup> Die nachfolgende UHPLC-MS/MS (QQQ)-Analyse (**Abbildung 13D**) zeigte im UV-Chromatogramm nur die Signale der zu erwarteten Nukleoside. Das fdC-Nukleosid wurde anhand der Retentionszeit und der charakteristischen MS/MS Fragmentierung ( $m/z = 256.1 \rightarrow 140.1$ ) identifiziert. Gleichzeitig wurden die Mengen der Basen dC, fdC und dT (Einschub, **Abbildung 13D**) mithilfe synthetischer isotopologer Nukleoside als interner Standard bestimmt.<sup>[80]</sup> Das erhaltene Verhältnis von 4:5 für dC:fdC stimmt mit der Sequenz **ODN4** überein. Hervorzuheben ist die Tatsache, dass dieser Wert bereits mit dem Roh-DNA-Strang vor der HPLC-Reinigung erhalten wurde, was die besondere Qualität des neuen fdC-Bausteins demonstriert. Weiterhin wurde weder das  $\alpha$ -fdC Nukleosid, noch das Reduktions- (hmdC), oder das Oxidationsprodukt (cadC), ausgelöst durch die obligatorische Iod-Oxidation während der DNA-Synthese, detektiert.



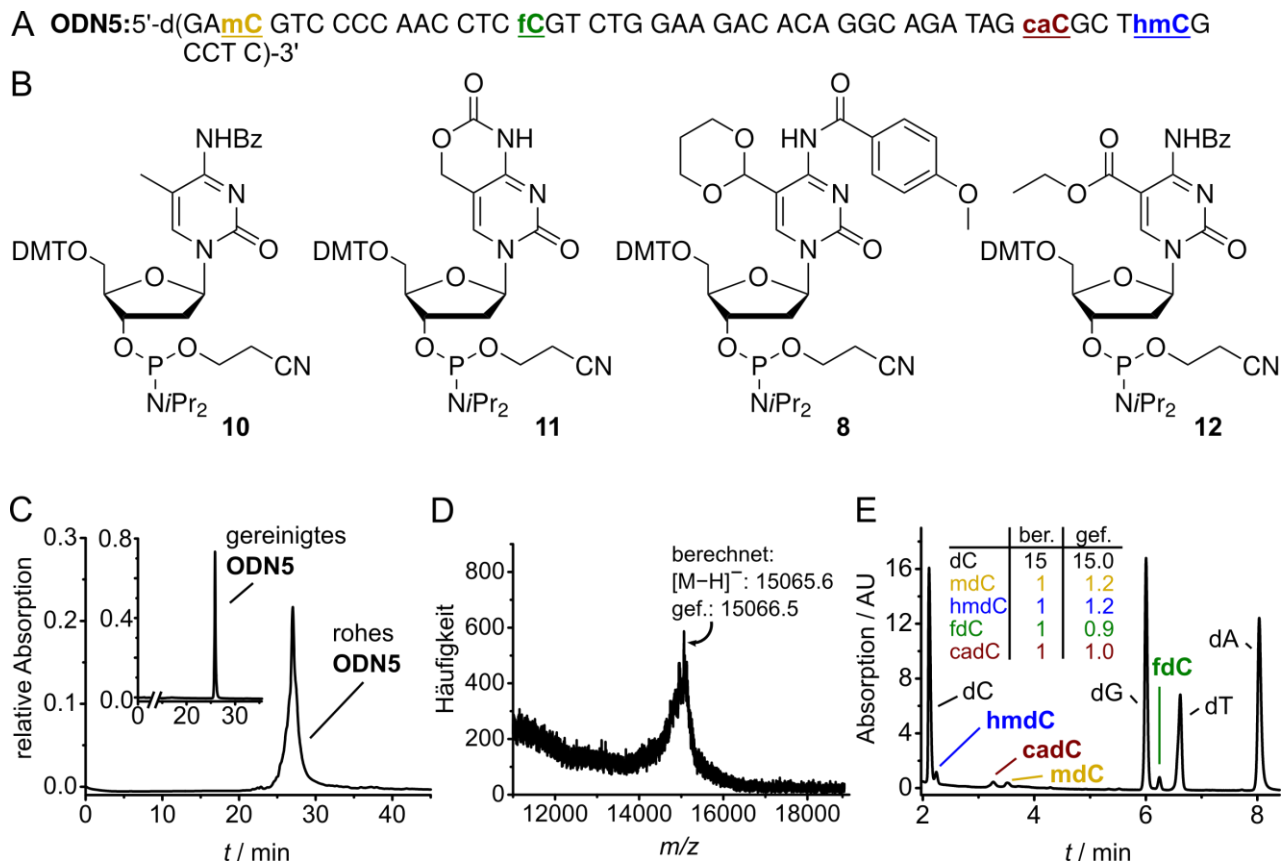


**Abbildung 13:** A) Sequenz des synthetisierten **ODN4** mit fünffachem Einbau von fdC durch den Phosphoramidit-Baustein **8**. B) Reversed-phase HPL Chromatogramm des **ODN4**-Rohprodukts direkt nach basischer und saurer Entschützung (0-40% Puffer B in 45 min). C) MALDI-TOF-Spektrum des vollständig entschützten rohen **ODN4**. E) UHPL-Chromatogramm und Quantifizierungsdaten des verdauten **ODN4** zeigen das richtige Verhältnis des fdC-Einbaus sowie keinerlei Oxidations- und Reduktionsprodukte.

### 3.4 Synthese eines Oct4-Promotersegments mit allen vier epigenetisch relevanten DNA-Basen

Mit dem neu verfügbaren fdC-Phosphoramidit-Baustein **8** sollte nun ein Oct4-Promotersegment mit allen vier epigenetisch relevanten DNA-Basen synthetisiert werden. Dies sollte zum einen demonstrieren, dass der neue fdC-Baustein in der DNA-Synthese kompatibel mit anderen modifizierten Phosphoramidit-Bausteinen ist, zum anderen sollte die effiziente Kupplung anhand einer langen, biologisch relevanten DNA-Sequenz bewiesen werden.

Als Ziel wurde das Oligonukleotid **ODN5** mit der Sequenz des Oct4-Promoters (*mus musculus*, chromosome 17, 35505895-35505943, **Abbildung 14A**) gewählt. Die Cytidine in den vier CpG-Einheiten wurden durch die epigenetisch relevanten Nucleoside mdC, hmdC, fdC und cadC ersetzt. Hierfür wurden die entsprechenden Phosphoramidite verwendet (siehe **Abbildung 14B**).<sup>[83,161]</sup> Aufgrund der Carbamatgruppe im hmdC-Baustein sowie der Estergruppe im cadC-Baustein wurde im ersten Entschützungsschritt eine NaOH- (0.4 M in Methanol/Wasser 4:1) anstatt einer konzentrierten NH<sub>3</sub>-Lösung verwendet. Hierdurch kann die Bildung von Aminomethyl- und Amidgruppen vermieden werden.<sup>[83,161]</sup> Nach Präzipitation in Ethanol und saurer Entschützung konnte das **ODN5**-Rohprodukt als deutlich sichtbares Hauptprodukt erhalten werden (**Abbildung 14C**). Die HPLC-Aufreinigung lieferte reines **ODN5** in 31% Ausbeute. Für ein 49mer mit vier modifizierten Nucleosiden ist dies eine exzellente Ausbeute. Nach vollständigem Verdau und UHPLC-MS/MS-Analyse durch *J. Steinbacher* konnte die Anwesenheit aller vier epigenetisch relevanten DNA-Basen gezeigt



**Abbildung 14:** A) Sequenz eines Oct4-Promotersegments, in welchem Desoxycytidine in einem CpG-Kontext mit den epigenetisch relevanten Nucleosiden mdC, hmdC, fdC, cadC substituiert wurden. B) Strukturformeln der verwendeten Phosphoramidite. C) Reversed-phase HPL Chromatogramm des rohen und gereinigten (Einschub) **ODN5** nach vollständiger Entschützung (0-40% Puffer B in 45 min). D) MALDI-TOF-Spektrum des gereinigten **ODN5**. (E) UHPL Chromatogramm und Quantifizierungsdaten des zu Nucleosiden verdauten **ODN5**.

werden. Isotopenbasierte Quantifizierung bestätigte die richtige Zusammensetzung. In völliger Übereinstimmung mit der Sequenz wurden relativ zu dC die Werte 1.2:1.2:0.9:1.0:15.0 erhalten (**Abbildung 14B/E**).

Aufgrund der optimalen Kupplungseigenschaften ist dieser fdC-Phosphoramidit-Baustein mittlerweile kommerziell erhältlich und wird durch die auf Phosphoramidite spezialisierte Firma *GlenResearch* weltweit vermarktet.

Im Verlaufe dieser Arbeit wurde das fdC-Phosphoramidit in über 50 verschiedene ODN eingebaut. Dabei fiel auf, dass die Syntheseeffizienz von fdC-haltigen ODN stark abhängig davon ist, ob von diesen Sequenzen eine biologische, fdC-abhängige Funktion zu erwarten ist. In solchen Fällen war häufig eine sehr niedrige Syntheseeffizienz zu beobachten. Die Gründe hierfür sind nach wie vor

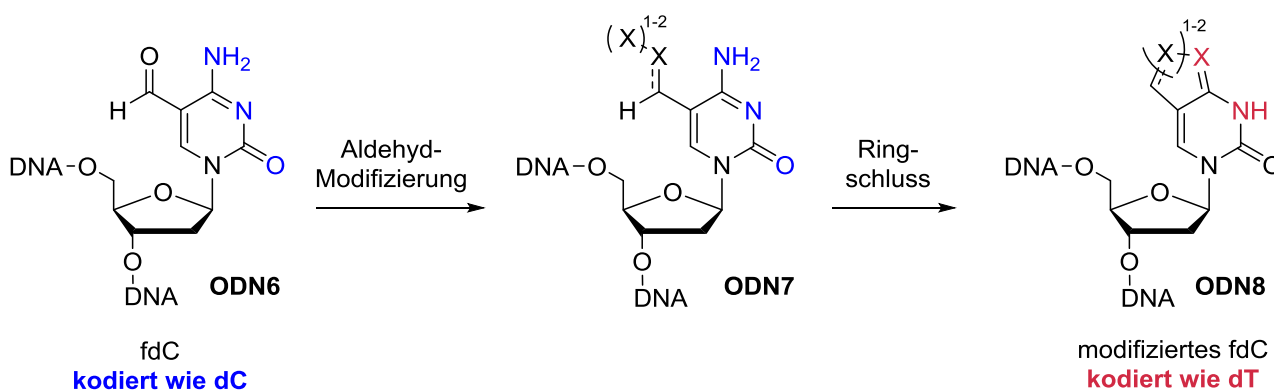
unbekannt. Möglicherweise wird die Effizienz durch die sich bildende Sekundärstruktur der DNA bereits während der Synthese oder durch sequenzabhängige, elektronische Effekte beeinflusst. Bislang wurde hierzu lediglich eine mögliche Bildung einer fdC-spezifischen DNA-Sekundärstruktur bei hohem (fdCpG)-Gehalt von *Raiber et al.* beschrieben.<sup>[170]</sup>

## 4 Entwicklung einer bisulfitfreien fdC-Sequenzierung-Methode

Die exakte Lokalisierung von fdC in genomischer DNA ist zur Aufklärung der biologischen Funktion von fdC von größter Bedeutung. Zu Beginn dieser Arbeit waren lediglich verschiedene Bisulfit-abhängige Methoden zur genomischen fdC-Sequenzierung bekannt.<sup>[85-89]</sup> Diese Methoden führten allerdings zu einer erheblichen Zerstörung genomischer DNA (> 95%), da Bisulfit mit dC zu einem Addukt reagiert, welches spontan depyrimidiert.<sup>[90,92,93]</sup> Die so entstandenen abasischen Stellen resultieren in der nachfolgenden, obligatorischen NaOH-Behandlung in DNA-Strangbrüchen.<sup>[94]</sup> Daher kann nur ein Bruchteil der eingesetzten Menge tatsächlich für die Sequenzierung verwendet werden, was aufgrund der geringen Abundanz von fdC sehr problematisch ist. Bisulfit-abhängige Methoden sind in Anbetracht der geringen Anzahl an fdC im Genom daher sehr ineffizient.

Ziel der folgenden Experimente war eine chemische Modifizierung von fdC in der Art, dass das resultierende fdC-Derivat in Standard-Sequenzierungsmethoden als dT gelesen wird. Da fdC normalerweise wie dC kodiert, könnte bei Vergleich der Sequenzierungsdaten mit und ohne chemischer fdC-Modifizierung die fdC-Positionen im Genom bestimmt werden.

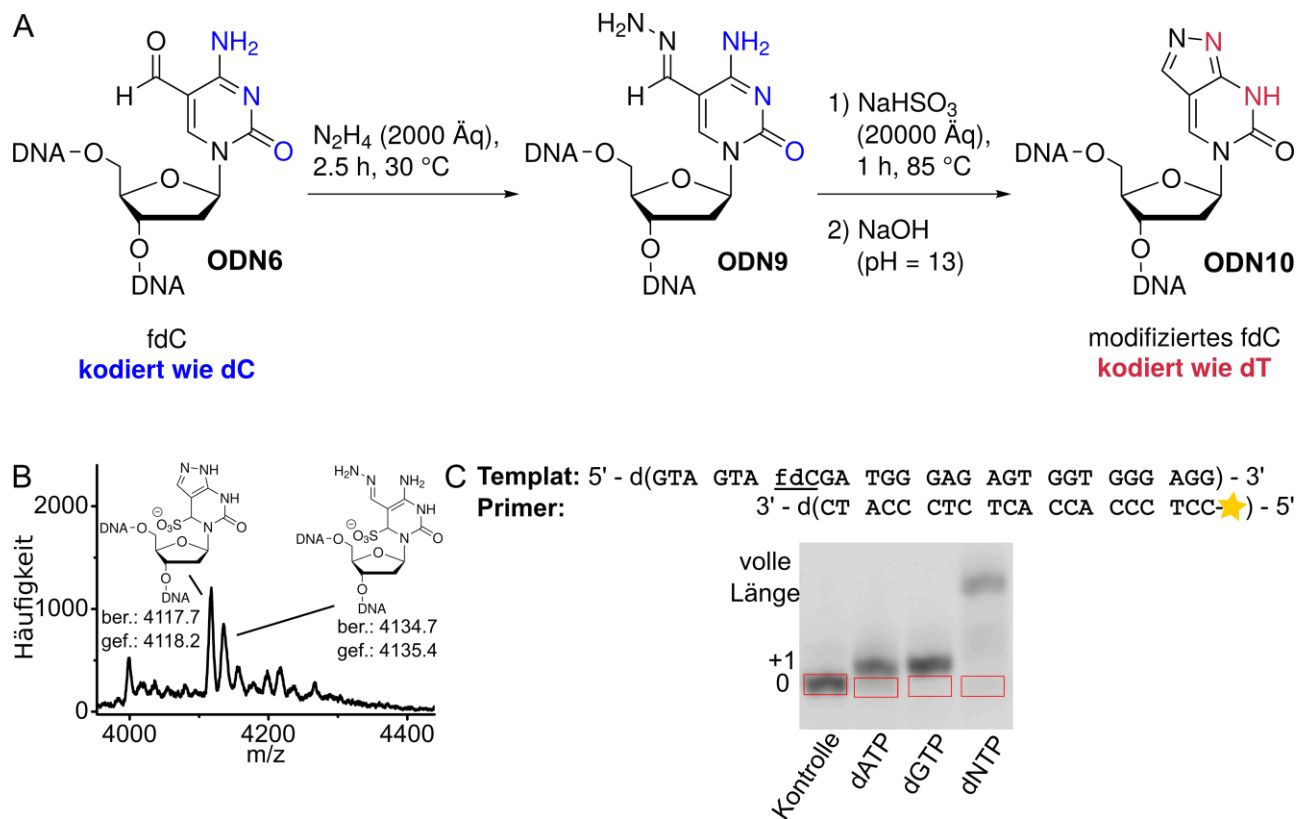
Die Herausforderung lag in der Entwicklung einer quantitativen Reaktion in wässrigem Medium. Da die Aldehyd-Funktionalität ein Alleinstellungsmerkmal von fdC im Vergleich zu anderen DNA-Basen ist, sollte diese für die chemische Modifizierung von fdC verwendet werden. Die Idee war, dass der Aldehyd derartig funktionalisiert werden könnte, dass eine nachfolgende intramolekulare Ringschlussreaktion in einem bityklischen fdC-Derivat resultieren würde. Dieses würde in Standard-Sequenzierungsmethoden vermutlich wie dT kodieren (siehe **Schema 3**).<sup>[171-174]</sup>



**Schema 3:** Konzept zur Entwicklung einer Sequenzierungsmethode von fdC-haltiger DNA **ODN6**. Die gezielte Aldehydmodifizierung mit nachfolgender Ringschlussreaktion würde im bityklischen fdC-Derivat **ODN8** resultieren. Aufgrund elektronischer Aspekte sollte **ODN8** in Standard-Sequenzierungsmethoden als dT kodieren.

In ersten Experimenten wurden zunächst zahlreiche Reaktionen zur Aldehyd-Modifizierung in Wasser erprobt. Hierbei konnte zwar festgestellt werden, dass eine Indium-basierte *Grignard*-Allylierung, eine *Horner-Wadsworth-Emmons*-Olefinierung und eine *Schiff*'sche Base Reaktion mit Lysin und der *Lewis*-Säure  $\text{Sc}(\text{OTf})_3$  prinzipiell möglich sind. Allerdings waren die Ausbeuten derart gering (<5%), dass diese Modifizierungen für die Sequenzierung nicht geeignet waren. Eine *Mukaiyama*-Aldoladdition fand unter den verwendeten Bedingungen nicht statt. Einzig die *Schiff*'sche Base Reaktion mit auf dem  $\alpha$ -Effekt basierenden, sehr nukleophilen Hydrazin zeigte nahezu quantitative Umsetzung zum entsprechenden Hydrazon. Wie bereits im vorherigen Kapitel (3.1, S. 24), konnte auch hier die besonders geringe Reaktivität der Aldehyd-Funktionalität in fdC beobachtet werden.

Die *Schiff*'sche Base Reaktion mit Hydrazin verlief auch auf einem 13 bp lange, fdC-haltigen ODN quantitativ, was massenspektrometrisch mittels MALDI-TOF verfolgt werden konnte (siehe **Abbildung 15A**).



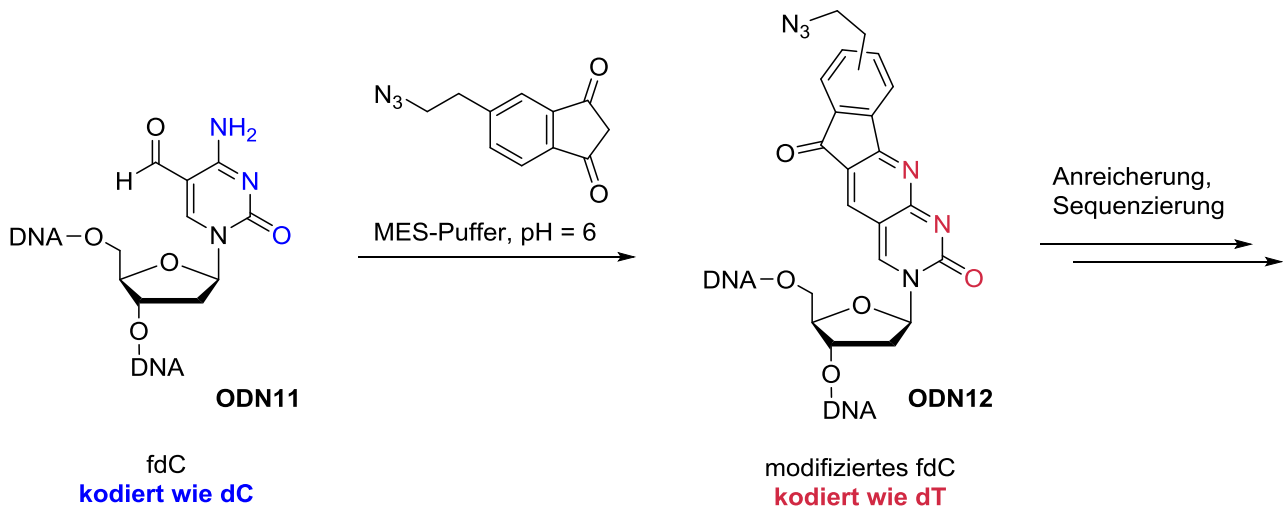
**Abbildung 15:** A) Nach Umsetzung von fdC-haltiger DNA **ODN6** mit Hydrazin und nachfolgender intramolekularer Ringschlussreaktion mit Natriumbisulfit wird Pyrazolo[3,4-*d*]cytidin-haltige DNA erhalten. B) MALDI-TOF-Spektrum nach Umsetzung mit Bisulfit, aber vor der Desulfonierung. C) Die Primer-Extension-Studie mit der DNA-Polymerase BstPolII zeigt, dass Pyrazolo[3,4-*d*]-dC zumindest teilweise als dT kodiert.

Der Ringschluss zum Pyrazolo[3,4-*d*]-dC in einem DNA-Fragment konnte in ersten Versuchen nur durch Verwendung von Natriumbisulfit ermöglicht werden. Hierbei wird zunächst durch C6-Sulfonierung die C5-C6-Bindung gesättigt, sodass im nachfolgenden Schritt die ringschließende Desaminierung eintritt. Die abschließende Desulfonierung wurde durch pH-Wert-Erhöhung auf pH = 13 erreicht. Die Ringschlussreaktion mit den nukleophilen Reagenzien  $\beta$ -Mercaptoethanol und einem 1:1-Gemisch aus Cystein/Imidazol ergab keinen Umsatz. Es scheint, dass ausschließlich Bisulfit nukleophil genug ist, um an der C6-Position quantitativ zu binden. Die geplante Modifizierungsreaktion sollte zwar ohne Natriumbisulfit auskommen, allerdings konnte so vorab in *Proof-of-principle*-Studien getestet werden, ob Pyrazolo[3,4-*d*]-dC wie dT kodiert. HPLC- und massenspektrometrische Analysen deuteten auf einen Reaktionsumsatz von ca. 60-70% hin (siehe **Abbildung 15B**).

Im weiteren Verlauf wurden erste Primer-Extension-Studien zur Untersuchung des Kodierungsverhaltens von Pyrazolo[3,4-*d*]-dC mit einem 27 bp lange, fdC-haltigen DNA-Fragment durchgeführt. Dieses wurde mit Hydrazin und Natriumbisulfit umgesetzt, mit einem Fluoreszein-markierten Primer hybridisiert und anschließend mit dATP, dGTP oder einem Triphosphatgemisch aller kanonischer Nucleoside sowie mit verschiedenen Polymerasen inkubiert. Bemerkenswerterweise konnte für verschiedene Polymerasen, wie z.B. BstPollI, ein +1-Einbau von dA festgestellt werden (siehe **Abbildung 15C**). Zusätzlich konnte auch eine Inkorporation von dG beobachtet werden. Dies ist sicherlich durch den nur 60-70%igen Reaktionsumsatz der Ringschlussreaktion bedingt. Zudem besteht die Möglichkeit das Pyrazolo[3,4-*d*]-dC aufgrund eines tautomeren Gleichgewichts teilweise wie dC kodieren kann. Dies wurde allerdings nicht weiter untersucht.

Zusammenfassend konnte in einer vielversprechenden *Proof-of-principle*-Studie fdC derart modifiziert werden, dass es zumindest teilweise als dT kodiert.

Kurze Zeit später publizierte die Gruppe um He die erste bisulfitfreie, genomische fdC-Sequenzierung mit Basenauflösung in *Nature Methods*.<sup>[175]</sup> Die erfolgreiche dC-zu-dT-Kodierung von fdC wurde auch hier durch eine intramolekulare Ringschlussreaktion verwirklicht. Ähnlich der *Friedländer-Chinolin-Synthese*, setzten die Autoren 1,3-Indandion mit fdC-haltiger DNA um und erhielten einen nahezu quantitativen Reaktionsumsatz. Das so erhaltene fdC-Derivat kodierte zwar sehr langsam, dafür ausschließlich wie dT (siehe **Schema 4**). Zusätzlich funktionalisierten die Autoren 1,3-Indandion mit einem Azid, was die nachträgliche Anreicherung von fdC mittels *Click-Chemie* und somit die hohe Empfindlichkeit ermöglichte.



**Schema 4:** Prinzip der bisulfitfreien fdC-Sequenzierung von *He*. Die erfolgreiche dC-zu-dT-Kodierung von fdC wurde mit 1,3-Indandion in einer *Friedländer*-Chinolin-artigen intramolekulare Ringschlussreaktion verwirklicht. Die zusätzliche Azid-Funktionalisierung ermöglicht die nachträgliche Anreicherung von fdC mittels *Click*-Chemie und somit eine hohe Sequenzierungsauflösung.<sup>[174]</sup>

Aufgrund dieser beeindruckend simplen Methode der *He*-Gruppe wurden keine weiteren Experimente zur eigenen bisulfitfreien fdC-Sequenzierung durchgeführt.

## 5 Isotopenmarkierte Desoxycytidin-Derivate für den Nachweis aktiver Demethylierung

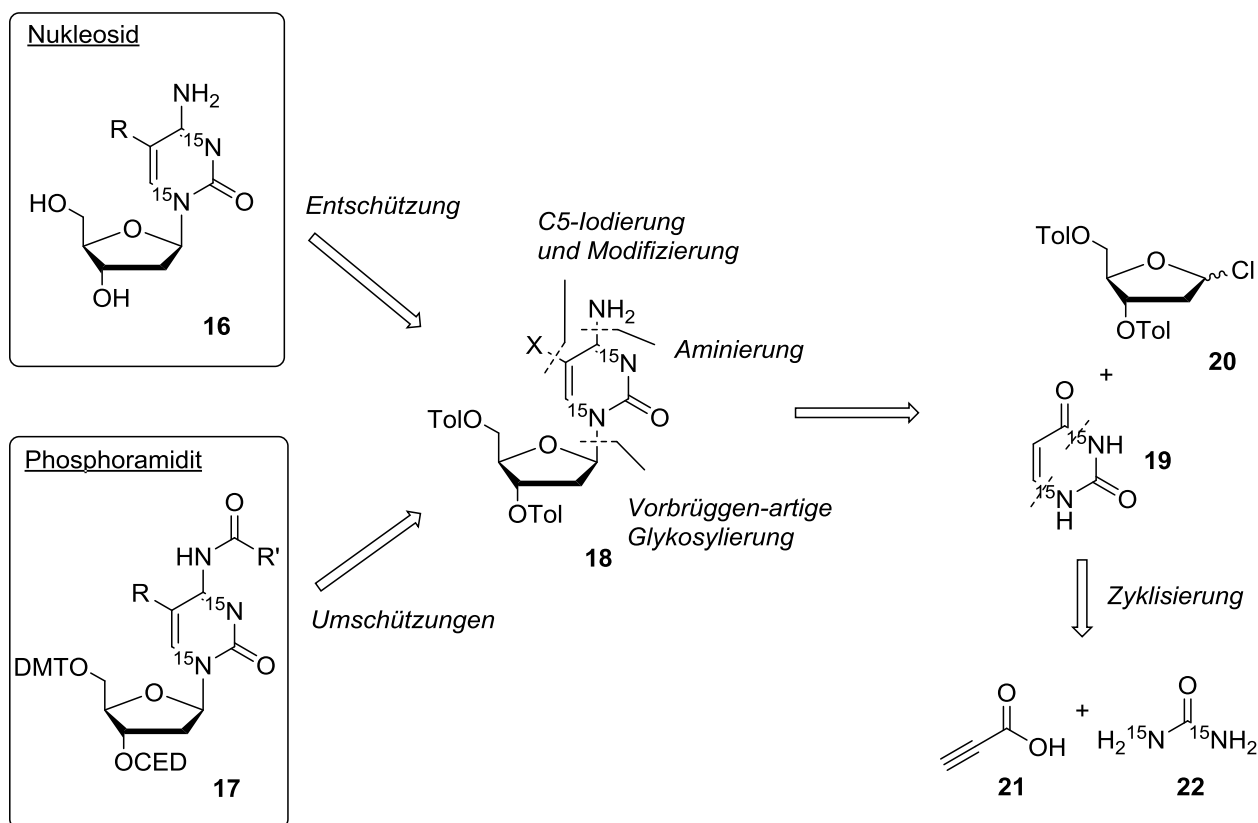
Die massenspektrometrische Quantifizierung von Nucleosiden erfolgt durch Verwendung der entsprechenden isotopenmarkierten Derivate (Isotopologe). Diese unterscheiden sich lediglich in der Molekülmasse. Um eine Überlappung mit den Signalen der natürlichen Nucleoside unter der gegebenen Auflösung zu vermeiden, muss die Differenz zwischen dem Isotopolog und des zu quantifizierenden Nucleosids mindestens 2 amu betragen.

Ferner werden isotopenmarkierte Nucleoside für sogenannte *Isotope-Tracing*-Studien verwendet. Die *Isotope-Tracing*-Methode erlaubt die gezielte Untersuchung des Stoffwechsels einer Verbindung. Üblicherweise wird hierzu zunächst die Verbindung mit einer zusätzlichen Isotopenmarkierung an Zellen verfüttert, welche im Idealfall aufgenommen und verstoffwechselt wird. Da die Metaboliten dieser Verbindung auch isotopenmarkiert sind, erlaubt dies eine Verfolgung des Stoffwechsels der Verbindung in der Zelle.

Im Zuge dieser Arbeit sollten die isotopenmarkierten Nucleoside  $D_3\text{-}^{15}\text{N}_2\text{-mdC}$  und  $^{15}\text{N}_2\text{-dC}$  für die massenspektrometrische Quantifizierung synthetisiert werden. Zusätzlich wurden die isotopenmarkierten Phosphoramidit-Bausteine von  $^{15}\text{N}_2\text{-mdC}$ ,  $^{15}\text{N}_2\text{-fdC}$  und  $^{15}\text{N}_2\text{-cadC}$  zur Synthese isotopenmarkierter ODN benötigt. Die Nucleoside und ODN sollten anschließend in *Isotope-Tracing*-Studien zur Aufklärung des mdC-Stoffwechsels eingesetzt werden. Weiterhin wurde das  $D_2\text{-}^{15}\text{N}_2\text{-dC}$ , das jeweils ein Deuterium-Isotop an C5- und C6-Position trägt, synthetisiert. Auf die Vorteile der zusätzlichen C5-, C6-Markierung sowie auf die Synthese des Nucleosids  $D_2\text{-}^{15}\text{N}_2\text{-dC}$  wird in einem gesonderten Kapitel eingegangen (Kapitel 5.2, S. 39).

**Schema 5** stellt den generellen retrosynthetischen Ansatz zur Synthese isotopenmarkierter Nucleoside **16** und Phosphoramidite **17** dar. Beide Verbindungsklassen basieren auf einem gemeinsamen Vorläufer, dem C5-modifizierten dC-Derivat **18**. Eine Toluoyl-Entschützung würde in Nucleosid **16**, das Anbringen von Phosphoramidit spezifischen Schutzgruppen würde in Phosphoramidit **17** resultieren. Das C5-modifizierte dC-Derivat **18** kann retrosynthetisch auf die isotopenmarkierte Nucleobase  $^{15}\text{N}_2\text{-Uracil}$  **19** und *Hoffer's* Chlorzucker **20** zurückgeführt werden. In einer *Vorbrüggen*-artigen Glykosylierung können  $^{15}\text{N}_2\text{-Uracil}$  **19** und *Hoffer's* Chlorzucker **20** zu  $^{15}\text{N}_2\text{-dU}$  umgesetzt werden. Die anschließende C5-Iodierung und C4-Aminierung, gefolgt von einer C5-Modifizierungsreaktion, liefert das C5-modifizierte dC-Derivat **18**.<sup>[78]</sup> Spezifische C5-Modifizierungsreaktionen zu unterschiedlichen Nucleosiden werden in der Synthesestrategie zu F-Nucleosiden erläutert (siehe **Schema 11**, S. 48). Das  $^{15}\text{N}_2\text{-Uracil}$  **19** kann hierzu in einer literatur-





**Schema 5:** Retrosynthetischer Ansatz zur Synthese  $^{15}\text{N}_2$ -isotopenmarkierter dC-Derivate.

bekanntem Zyklisierungsreaktion aus isotopenmarkierten  $^{15}\text{N}_2$ -Harnstoff und Propiolsäure hergestellt werden.<sup>[176]</sup>

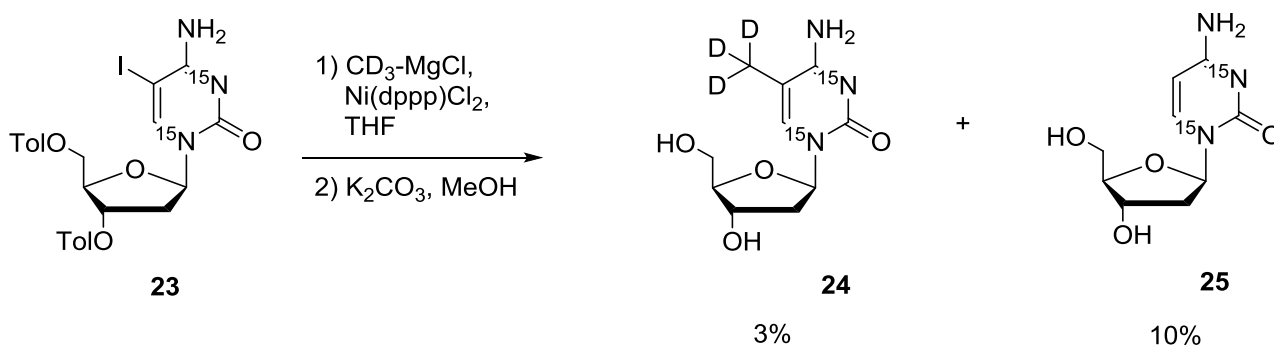
## 5.1 Synthese isotopenmarkierter Phosphoramidite und Nucleoside

Im Folgenden wird die Synthese der isotopenmarkierten Nucleoside und Phosphoramidite sowie deren Einbau in die DNA beschrieben.

### 5.1.1 $\text{D}_3$ - $^{15}\text{N}_2$ -mdC und $^{15}\text{N}_2$ -dC

Im Rahmen von Untersuchungen zum Mechanismus der TET-Enzym-vermittelten Oxidation von mdC-haltiger DNA sollte in *in vitro* Experimenten ein  $^{15}\text{N}_2$ -mdC-haltiges ODN mit TET-Enzym umgesetzt werden. Für die massenspektrometrische Quantifizierung des  $^{15}\text{N}_2$ -mdC wurde ein Isotopolog mit einer Massendifferenz von mindestens 2 u zu  $^{15}\text{N}_2$ -mdC benötigt. Als Quelle für die Einführung der zusätzlichen Isotopenmarkierung diente das  $\text{CD}_3$ -Grignard-Reagenz, welches mit  $^{15}\text{N}_2$ -IdC **23** umgesetzt wurde. Mittels NMR-spektrometrischer Analyse konnte das Verhältnis von dC-Derivat zu mdC-Derivat im Rohprodukt zu 3:2 bestimmt werden. Da eine säulenchromatografische

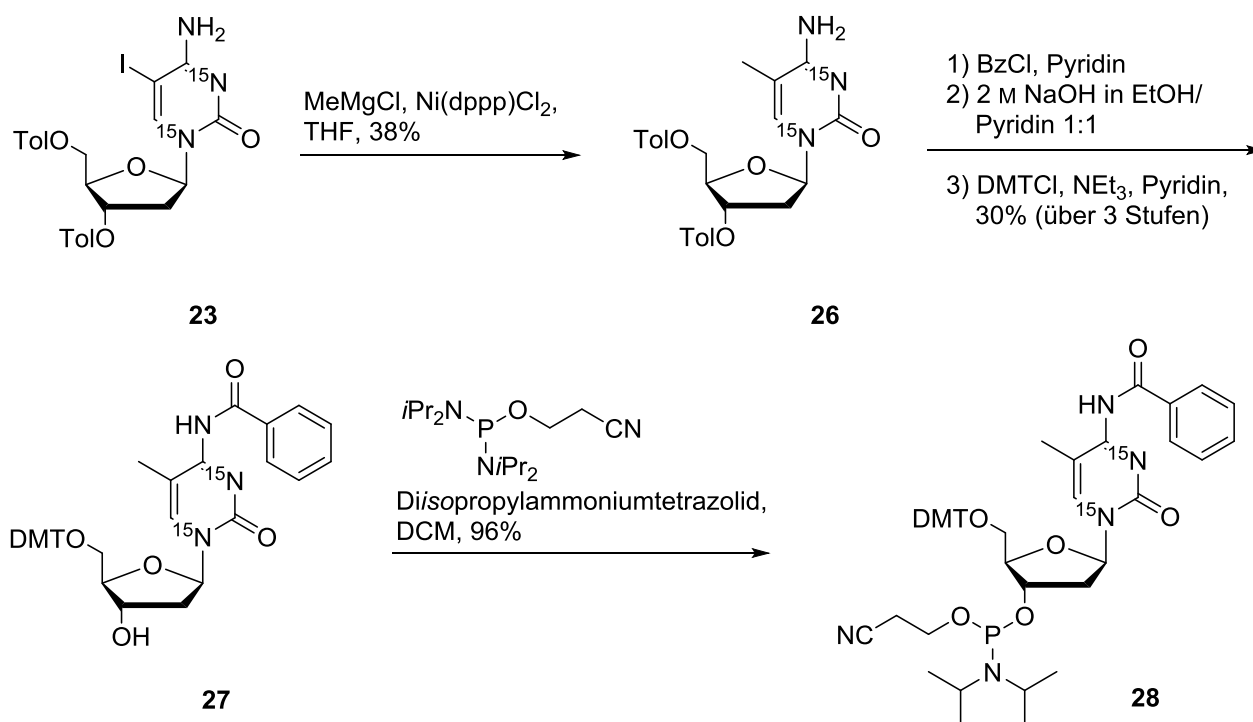
Auftrennung beider Produkte aufgrund der gleichen Retention nicht möglich war, wurde das Rohprodukt direkt verseift. Nach HPLC-Aufreinigung konnte das  $D_3$ - $^{15}N_2$ -mdC (**24**) mit einer Ausbeute von 3% isoliert werden (siehe **Schema 6**).  $^{15}N_2$ -dC (**25**) wurde zu 10% erhalten und wurde für massenspektrometrische Quantifizierungen von dC verwendet.



**Schema 6:** Synthese des isotopenmarkierten  $D_3$ - $^{15}N_2$ -mdC (**24**) und  $^{15}N_2$ -dC (**25**).

### 5.1.2 $^{15}N_2$ -mdC-Phosphoramidit

Ausgangsmaterial für die erstmalige, literaturunbekannte Synthese von  $^{15}N_2$ -mdC-Phosphoramidit war  $^{15}N_2$ -IdC **23** (siehe **Schema 7**). Die Methylierung mit dem Methylgrignard-Reagenz verlief mit einer Ausbeute von 38%. Dabei konnten 42% an dehalogeniertem dC reisoliert werden. Die beiden



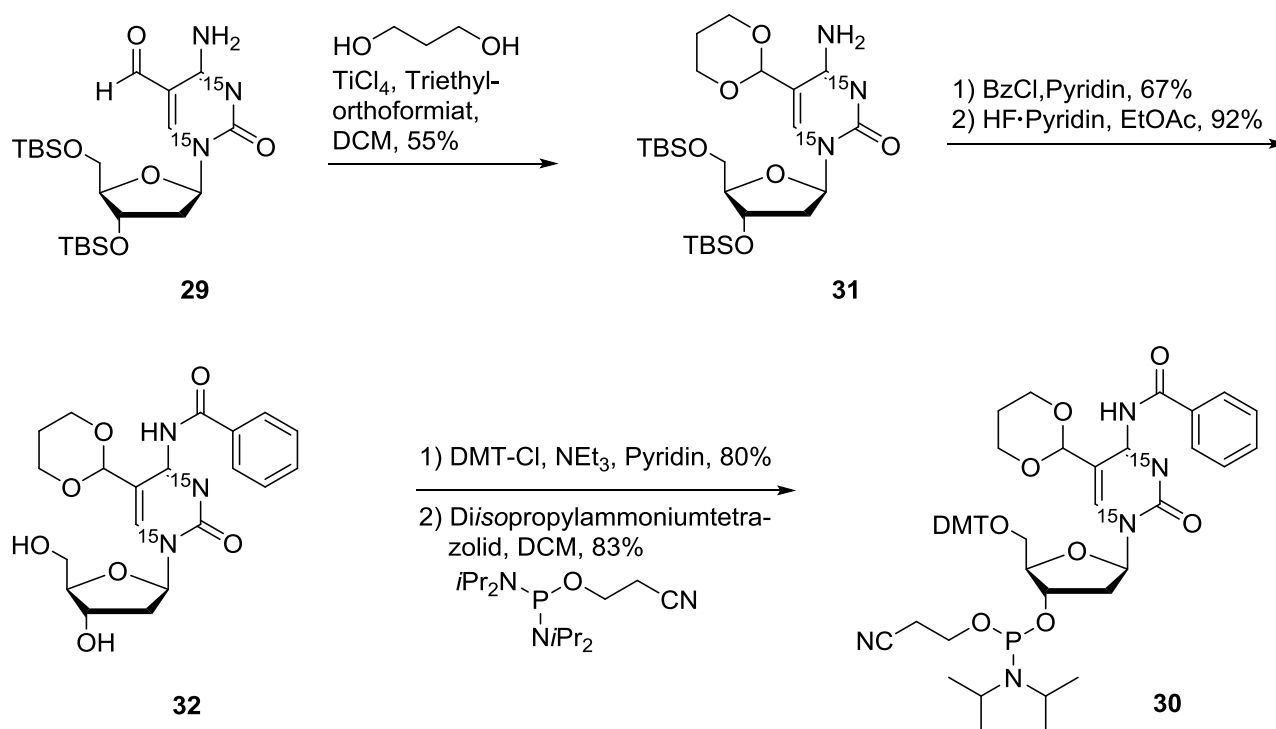
**Schema 7:** Synthese des isotopenmarkierten  $^{15}N_2$ -mdC-Phosphoramidit-Bausteins **28**.

Produkte konnten aufgrund des gleichen Retentionsfaktors erst in der nachfolgenden Stufe säulenchromatografisch getrennt werden. Auf eine vorherige Umschützung von Toluoyl- auf Silyl-Schutzgruppen wurde aufgrund des zu erwarteten Ausbeuteverlusts verzichtet. Die nachfolgende C4-Amin-Schützung gelang mit akzeptabler Ausbeute von 66%. Die selektive Toluoyl-Entschützung in Gegenwart der Amid-Schutzgruppe wurde mit NaOH in EtOH/Pyridin erreicht. Die folgende Umsetzung mit DMT-Cl und *Bannwarth*-Reagenz verlief mit einer Ausbeuten von 96%.

Der Einbau von Phosphoramidit **28** in unterschiedliche ODN verlief mit sehr guten Ausbeuten. Unter anderem verwendeten *T. Pfaffeneder* und *E. Parsa* (AK Carell) die  $^{15}\text{N}_2$ -mdC-haltige ODN im Rahmen von Untersuchungen zum TET-Enzym.<sup>[177]</sup>

### 5.1.3 $^{15}\text{N}_2$ -fdC-Phosphoramidit

Aufgrund der gelungenen Entwicklung eines neuen fdC-Phosphoramidits mit sehr guten Kupplungseffizienzen (siehe Kapitel 3.1, S. 24) sollte basierend auf dessen Synthese das  $^{15}\text{N}_2$ -isotopenmarkierte fdC-Phosphoramidit synthetisiert werden. Ausgangsmaterial war das von *B. Steigenberger* (AK Carell) zur Verfügung gestellte fdC-Derivat **29** (siehe **Schema 8**). Die Acetal- und Benzoylschützung verlief mit 55% bzw. 67% Ausbeute akzeptabel. Die Benzoylgruppe wurde verwendet, da zum Zeitpunkt der Synthese kein *p*-Methoxybenzoylchlorid vorrätig war, aber das



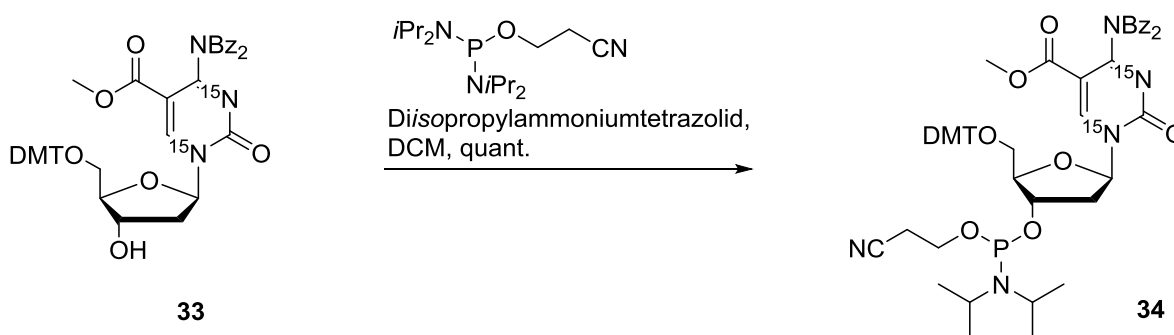
**Schema 8:** Synthese des isotopenmarkierten  $^{15}\text{N}_2$ -fdC-Phosphoramidit-Bausteins **30**.

Phosphoramidit dringend benötigt wurde. Die nachfolgende Silyl-Entschützung, DMT-Schützung und Umsetzung zum Phosphoramidit **30** verlief mit guten Ausbeuten (61% über drei Stufen).

Der nachfolgende Einbau des Phosphoramidits **30** in unterschiedliche ODN verlief mit sehr guten Ausbeuten. Die  $^{15}\text{N}_2$ -fdC-haltigen ODN wurde von *C. Brandmayr* (AK Carell) für verschiedene *in vitro* Demethylierungsstudien und von *T. Pfaffeneder* und *E. Parsa* (AK Carell) im Rahmen von Untersuchungen zum TET-Enzym verwendet.

### 5.1.4 $^{15}\text{N}_2$ -cadC-Phosphoramidit

Weiterhin wurde für Untersuchungen des TET-Enzyms das isotopenmarkierte  $^{15}\text{N}_2$ -cadC-Phosphoramidit benötigt. Die Umsetzung des DMT-geschützten Vorläufers **33** mit dem Phosphoramidit-Reagenz nach der Vorschrift von *Schiesser et al.* verlief quantitativ (siehe **Schema 9**).<sup>[78]</sup> Der nachfolgende Einbau von **34** in verschiedene ODN erfolgte mit guten Ausbeuten.



**Schema 9:** Synthese des isotopenmarkierten  $^{15}\text{N}_2$ -cadC-Phosphoramidit-Bausteins **34** ausgehend der DMT-Vorstufe **33**.

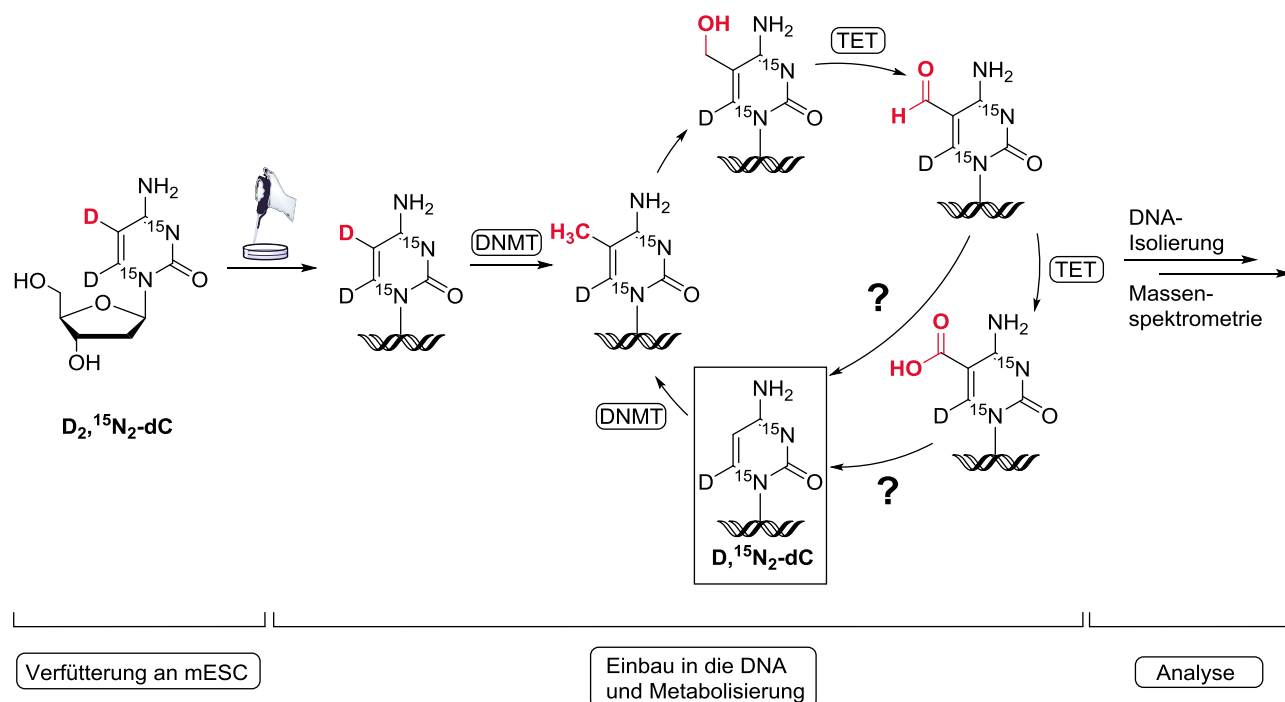
## 5.2 $D_2, ^{15}N_2$ -dC als ideales Molekül zum Nachweis aktiver Demethylierung

### 5.2.1 Entwicklung einer Isotope-Tracing-Methode

Der Nachweis eines C-C-Bindungsbruchs an C5-Position im Rahmen einer aktiven Demethylierung birgt zwei große Herausforderungen. Zum einen stellt das Produkt (dC) gleichzeitig das Edukt des mdC-Stoffwechsels dar, sodass die Detektion von neugebildetem dC mittels C-C-Bindungsbruch unmöglich ist. Zusätzlich ist dC eines der vier kanonischen Nukleoside und die zu erwartenden geringen Veränderungen im dC-Gehalt aufgrund der aktiven Demethylierung sind daher auf konventionelle Art und Weise kaum detektierbar. Zum anderen waren *in vitro*-Experimente mit fdC- und cadC-haltigen ODN nicht erfolgsversprechend. Zahlreiche Versuche mit Zellkernextrakten oder Enzymen konnten aufgrund der künstlichen Umgebung lediglich Indizien, jedoch nie einen Nachweis für eine aktive Demethylierung zeigen.<sup>[77-80]</sup>

Im Zuge dieser Herausforderungen wurde ein neuartiges *Isotope-Tracing*-Experiment entwickelt (siehe **Abbildung 16**). Durch Verfütterung von synthetisch hergestelltem, isotopenreinem  $D_2, ^{15}N_2$ -dC ([M+4]), welches neben zweifacher  $^{15}N$ -Markierung auch eine Deuterierung an C5- und C6-Position aufweist, kann dieses zellulär aufgenommen, in die genomische DNA eingebaut und im epigenetischen mdC-Stoffwechsel metabolisiert werden. Die [M+4]-Isotopenmarkierung wird zur Vermeidung einer Überlappung der Signale mit natürlich vorkommenden dC-Isotopologen benötigt. Sofern in Kontrollexperimenten ein unspezifischer Verlust der Deuterierung ausgeschlossen werden kann, wäre ein potentieller C5-D/H-Austausch in genomischer DNA nur über Methylierung von  $D_2, ^{15}N_2$ -dC ([M+4]), dessen Oxidation und nachfolgender C-C-Bindungsbruchreaktion zu  $D, ^{15}N_2$ -dC ([M+3]) möglich.<sup>[178-180]</sup> Mittels massenspektrometrischer Quantifizierung der [M+3] und [M+4]-Isotopologen könnte eine potentielle C-C-Bindungsbruchreaktion in genomischer DNA im Spurenbereich verfolgt werden.

Mit diesem Ansatz könnten verschiedene Zellarten in verschiedenen Differenzierungszuständen auf das Vorkommen eines potentiellen D/H-Austausch untersucht werden. Entscheidend für dieses *Isotope-Tracing*-Experiment ist jedoch eine hohe synthetische Isotopenanreicherung der Ausgangsverbindung  $D_2, ^{15}N_2$ -dC ([M+4]).



**Abbildung 16:** Entwicklung eines neuartigen *Isotope-Tracing*-Experiments. Findet nach Verfüterung, Einbau und DNA-Metabolisierung des dC-Isotopologen  $D_2,^{15}N_2$ -dC ein D/H-Austausch an C5-Position statt, kann auf eine C-C-Bindungsbruchreaktion im Rahmen einer aktiven Demethylierung geschlossen werden.

### 5.2.2 Synthese von $D_2,^{15}N_2$ -dC

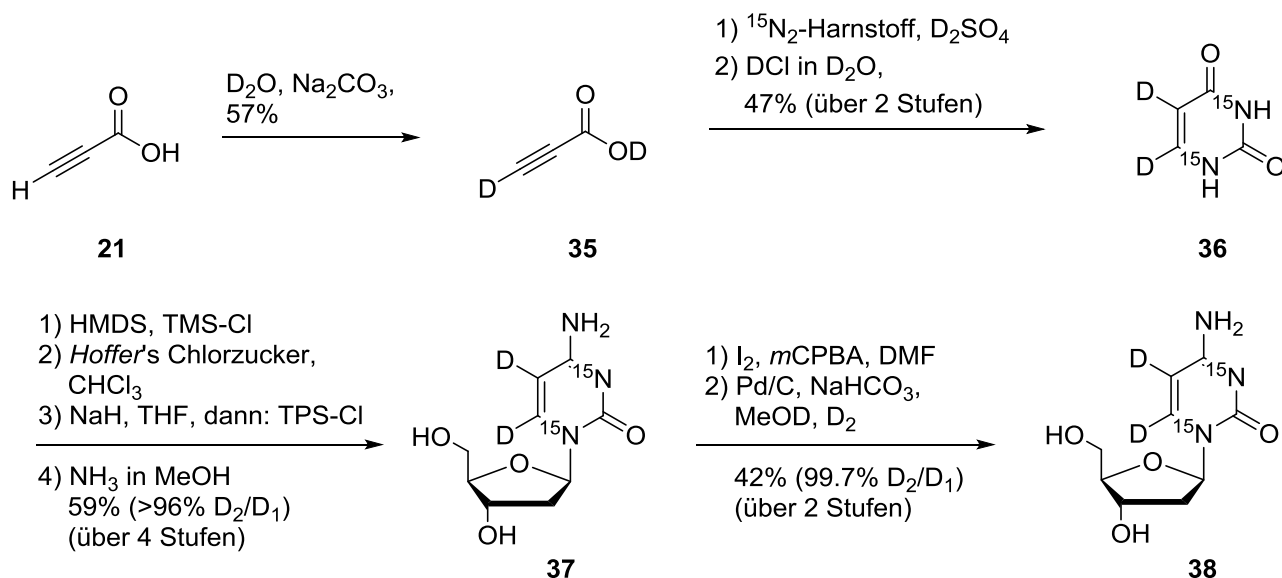
Für das zuvor erläuterte *Isotope-Tracing*-Experiment wurde zur Verfüterung isotopenreines  $D_2,^{15}N_2$ -dC benötigt. Der Gehalt des  $D_1$ -Isotopologs in  $D_2,^{15}N_2$ -dC muss minimal sein, da eine Kontamination mit Wasserstoff  $^1H$  zu einem vergrößerten Hintergrundsignal und somit zu einer erschwerten Quantifizierung führt. Basierend auf erfolgsversprechenden Literaturvorschriften wurde zunächst ein H/D-Austausch direkt an  $^{15}N$ -markiertem Desoxycytidin ( $^{15}N_2$ -dC) erprobt.<sup>[181-183]</sup> Allerdings konnte weder unter Verwendung des Katalysators  $PtO_2$  und  $D_2$  noch mit  $Pd/C$  und  $D_2$  eine vollständige Deuterierung der C5- und C6-Position erreicht werden. In der massenspektrometrischen Analyse konnte bei fortdauernder Reaktionszeit neben einer Erhöhung der Deuterierung (max. 90% [M+4], mind. 8% [M+3]) auch die Desaminierung sowie eine Hydrolyse der glykosidischen Bindung und somit die Zersetzung des Edukts detektiert werden. Ein nahezu quantitativer H/D-Austausch direkt an  $^{15}N_2$ -dC war durch die Verwendung dieser Vorschrift daher nicht erfolgreich.

Eine quantitative Einführung der Isotopenmarkierung ist daher nur durch einen synthetischen Auf-

bau des Nukleosids möglich. Dazu wurde der retrosynthetische Ansatz zur Synthese  $^{15}\text{N}_2$ -markierter Nucleoside aus **Schema 5** übernommen und entsprechend modifiziert. C5- und C6-Position von dC stammen retrosynthetisch aus der Propiolsäure. Eine Deuterierung der C3-Position der Propiolsäure sowie eine nachfolgende Zyklisierung mit Harnstoff unter  $\text{D}^+$ -Bedingungen sollte in einer nahezu isotopenreinen Verbindung resultieren.

Die Synthese von  $\text{D}_2, ^{15}\text{N}_2$ -dC (**38**) ist in **Schema 10** dargestellt. Propiolsäure (**21**) wurde zur C3-Deuterierung mit  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  als Base in  $\text{D}_2\text{O}$  gelöst.<sup>[184]</sup> Anschließend wurde das Lösungsmittel entfernt, was das H/D-Verhältnis aufgrund der höheren Siedetemperatur von  $\text{D}_2\text{O}$  (101.4 °C) im Vergleich zu  $\text{H}_2\text{O}$  (100 °C) positiv beeinflusst. Mittels NMR-Analyse konnte eine C3-Deuterierung von bereits 96% festgestellt werden. Nach zweimaliger Wiederholung dieser Prozedur sowie nachfolgender Destillation des Rohprodukts konnte die laut NMR- und EI-Analyse vollständig deuterierte Propiolsäure **35** erhalten werden. Die anschließende Zyklisierungsreaktion mit  $^{15}\text{N}_2$ -markiertem Harnstoff in  $\text{D}_2\text{SO}_4$  ergab ein Gemisch aus  $\text{D}_1, ^{15}\text{N}_2$ - und  $\text{D}_2, ^{15}\text{N}_2$ -Uracil.<sup>[176]</sup> Hierbei war die C5-Position noch nicht vollständig deuteriert. Das Gemisch wurde im weiteren Verlauf mit konz. DCI in  $\text{D}_2\text{O}$  umgesetzt, sodass  $\text{D}_2, ^{15}\text{N}_2$ -Uracil (**36**) in 47% Ausbeute über zwei Stufen erhalten wurde. Die NMR-Analyse zeigte ein kaum zu detektierendes Signal im Bereich des *H*-C5 und kein Signal im Bereich des *H*-C6.

Die *Vorbrüggen*-artige Glykosylierung erfolgte mit *Hoffer's* Chlorzucker. Die nachfolgende Aminierungs- und gleichzeitige Entschützungsreaktion ergab  $\text{D}_2, ^{15}\text{N}_2$ -dC **37** in 59% Ausbeute über vier

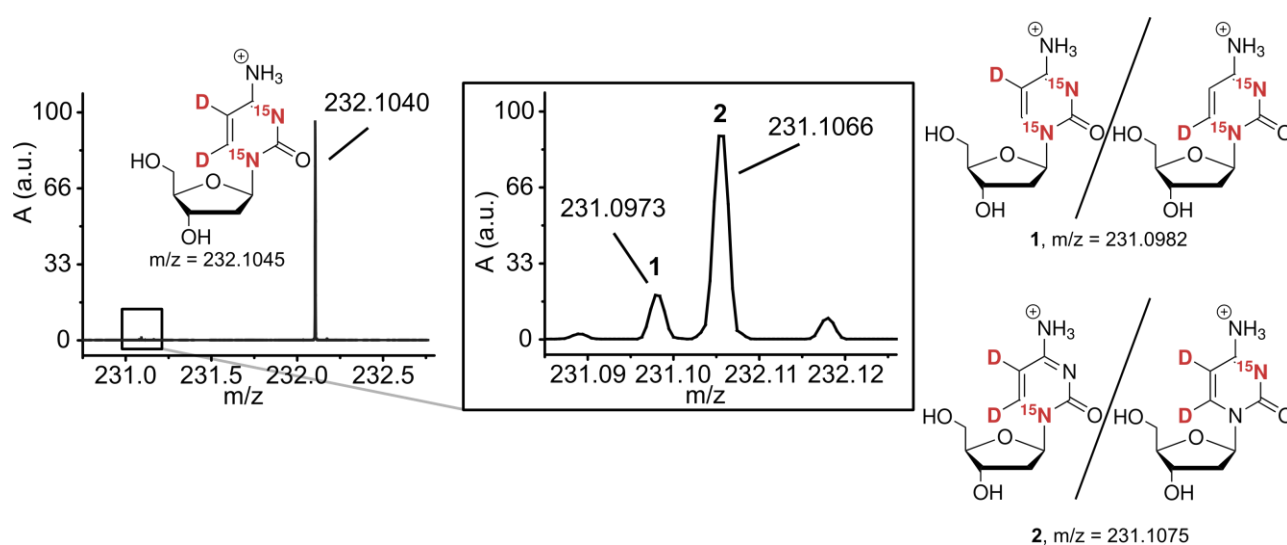


**Schema 10:** Synthese von  $\text{D}_2, ^{15}\text{N}_2$ -dC (**38**).

Stufen. Die NMR- sowie massenspektrometrische Analyse durch *J. Steinbacher* ergab, dass das Isotopologen-Verhältnis von D<sub>2</sub>- zu D<sub>1</sub>-Isotoplog > 96% betrug und dass der D-Einbau lediglich an der C5-Position noch nicht vollständig war.

Die nahezu quantitative Deuterierung an Position C5 wurde in Zusammenarbeit mit *R. Rahimoff* mittels C5-Iodierung und nachfolgender reduktiver Deuterierung mit Pd/C und D<sub>2</sub> erreicht.<sup>[185,186]</sup>

D<sub>2</sub>,<sup>15</sup>N<sub>2</sub>-dC (**38**) wurde dabei in 42% Ausbeute über zwei Stufen erhalten. Das D<sub>2</sub>/D<sub>1</sub>-Verhältnis in **38** konnte massenspektrometrisch zu 99.7% bestimmt werden. Das Verhältnis der Isotopologen [M+4]/[M+3] betrug 96.6% und war durch die nicht perfekte Isotopenreinheit des <sup>15</sup>N<sub>2</sub>-Harnstoffs hervorgerufen (siehe **Abbildung 17**).



**Abbildung 17:** LC-HRMS-Analyse der Isotopenzusammensetzung von D<sub>2</sub>,<sup>15</sup>N<sub>2</sub>-dC (**38**). Der Hauptbestandteil ist klar erkennbar D<sub>2</sub>,<sup>15</sup>N<sub>2</sub>-dC [M+4]. In der Vergrößerung sind die kaum detektierbaren Signale der [M+3]-Isotopologe gezeigt.

Zusammenfassend wurde die Synthese des isotopenmarkierten D<sub>2</sub>,<sup>15</sup>N<sub>2</sub>-dC (**38**) in neun Stufen in guten Ausbeuten realisiert und konnte im weiteren Verlauf für zellbiologische Untersuchungen eingesetzt werden.

### 5.2.3 Zellbiologische Untersuchungen mit D<sub>2</sub>,<sup>15</sup>N<sub>2</sub>-dC

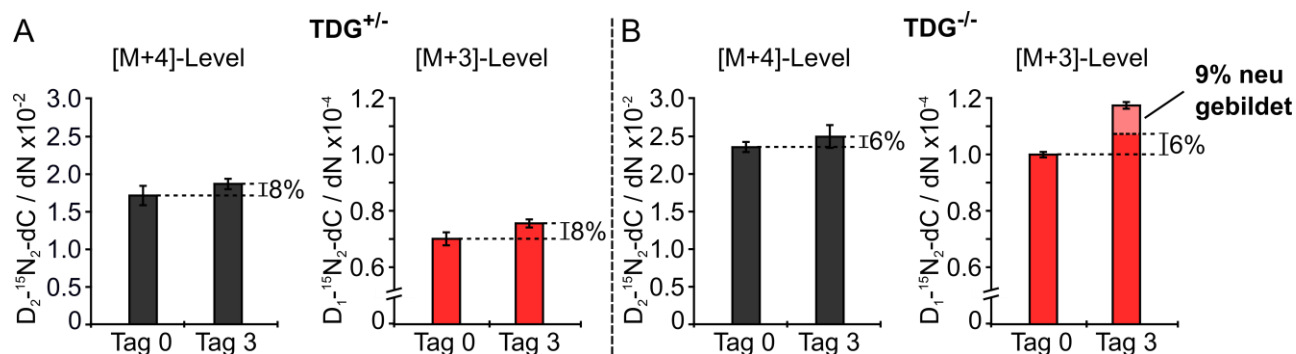
Im Rahmen von *Isotope-Tracing*-Experimenten werden u. a. isotopenmarkierte Nucleoside verfüttert, sodass diese nach zellulärer Aufnahme und DNA-Einbau metabolisiert werden. Können nach Isolation der genomischen DNA sowie massenspektrometrischer Analyse unterschiedliche isotopenmarkierte Nucleoside detektiert werden, so ist ein Rückschluss auf den Stoffwechselweg des verfütterten Nucleosids möglich. Wird das dC-Isotopolog D<sub>2</sub>,<sup>15</sup>N<sub>2</sub>-dC ([M+4]-dC, **38**) verfüttert, so



wäre die Detektion von  $D_1,^{15}N_2$ -dC ein Nachweis einer C-C-Bindungsbruchreaktion zur aktiven Demethylierung von mdC (siehe **Abbildung 16**). Das Auflösungslimit der Quantifizierung mittels UHPLC-MS/MS (QQQ) liegt bei  $\sim 1$  amu. Aus diesem Grund konnte in den Verfütterungsexperimenten nicht zwischen den einzelnen [M+3]-Isotopologen  $D_1,^{15}N_2$ -dC und  $D_2,^{15}N_1$ -dC unterschieden werden und wurden daher als [M+3]-dC-Signal zusammengefasst. Mittels der in **Abbildung 17** dargestellten Analyse der Isotopenzusammensetzung von  $D_2,^{15}N_2$ -dC (**38**) konnte eine [M+3]-dC-Verunreinigung von  $\sim 3.4\%$  detektiert werden. Dies führte in den Verfütterungsexperimenten zu einem erhöhten [M+3]-dC-Hintergrundsignal.

Das synthetisierte Nukleosid **38** wurde in unterschiedlichen Experimenten von *F. Spada* verfüttert und durch *J. Steinbacher* enzymatisch verdaut. Die anschließende massenspektrometrische Analyse wurde von *J. Steinbacher* und *R. Rahimoff* (AK Carell) durchgeführt.

So wurde unter anderem  $D_2,^{15}N_2$ -dC (**38**) an mES-Zellen mit bzw. ohne TDG-Enzym ( $TDG^{+/-}$  bzw.  $TDG^{-/-}$ ) verfüttert. Um eine möglichst hohe Rate an Metaboliten des mdC-Stoffwechselkreislaufrs inklusive aktiver Demethylierung zu erlangen, wurden die mES-Zellen mehrere Tage mit **38** gefüttert, an Tag 0 differenziert und deren genomische DNA an Tag 3 isoliert (siehe **Abbildung 18**).



**Abbildung 18:** Ergebnisse der Verfütterung von  $D_2,^{15}N_2$ -dC (**38**) an mES-Zellen mit (A) bzw. ohne TDG-Enzym (B). Erstmals konnte *in vivo* aufgrund der Detektion von 9% neu gebildeten  $D_1,^{15}N_2$ -dC (rechts) eine vermutliche C-C-Bindungsbruchreaktion als aktive Demethylierung gezeigt werden.

Bei Vergleich der [M+4]-Level von  $TDG^{+/-}$ -mES-Zellen vor Differenzierung (Tag 0) mit  $TDG^{+/-}$ -Zellen an Tag 3 konnte der erfolgreiche Einbau des Nukleosids  $D_2,^{15}N_2$ -dC festgestellt werden (siehe **Abbildung 18A**). Weiterhin konnte ein leichter Anstieg der Einbaumenge (ca. 8%) in ausdifferenzierten Zellen detektiert werden. Die weiteren Intermediate im mdC-Stoffwechsel konnten ebenfalls detektiert werden. Die Verhältnisse der Level der [M+3]-Isotopologe von mdC, hmdC, fdC und cadC zu [M+4]-dC stimmten mit denen der literaturbekannten Level überein.<sup>[62,64]</sup> Zusätzlich konnte zu beiden Zeitpunkten auch [M+3]-dC detektiert werden. Allerdings konnten die quanti-

fizierten [M+3]-dC-Level vollständig auf die [M+3]-dC-Verunreinigung im verfütterten  $D_2,^{15}N_2$ -dC zurückgeführt werden. Infolgedessen wurde auch hier ein Anstieg der Einbaumenge von ca. 8% in ausdifferenzierten Zellen beobachtet.

Zusammenfassend konnte nach Verfütterung von  $D_2,^{15}N_2$ -dC der erfolgreiche Einbau in genomische DNA, sowie dessen epigenetische Metabolisierung in TDG<sup>+/-</sup>-mES-Zellen beobachtet werden. Da kein neugebildetes  $D_1$ -Nukleosid detektiert werden konnte, ist eine C-C-Bindungsbruchreaktion unter den gegebenen Umständen in TDG<sup>+/-</sup>-mES-Zellen unwahrscheinlich. Vermutlich erfolgte die aktive Demethylierung vollständig mittels TDG und nachfolgender DNA-Reparatur.<sup>[76]</sup>

Aus diesem Grund wurde das gleiche Experiment in mES-Zellen ohne TDG-Enzym (TDG<sup>-/-</sup>) durchgeführt, sodass die Entfernung von fdC und cadC mittels Basenexzisionsreparatur nicht mehr möglich ist (siehe **Abbildung 18B**). Auch in diesem Versuch konnte der erfolgreiche Einbau von  $D_2,^{15}N_2$ -dC beobachtet werden, wobei die Einbaumenge bzgl. TDG<sup>+/-</sup>-Zellen um 38% höher war. Ebenso konnten die weiteren Intermediate des mdC-Metabolismus detektiert werden. Das [M+3]-Isotopolog von fdC war, wie aus vorherigen Experimenten aus dem AK Carell bekannt, aufgrund des fehlenden TDG-Enzyms zehnfach abundanter. Des Weiteren wurde auch [M+3]-dC detektiert. Erstmals konnte ein [M+3]-dC-Level quantifiziert werden, welches nicht vollständig auf die [M+3]-dC-Verunreinigung zurückgeführt werden konnte. Da eine Neubildung von  $D_1,^{15}N_1$ -dC unter den gegebenen Bedingungen nicht möglich ist, entsprachen die restlichen 9.4% des [M+3]-dC-Levels (~600000 Nukleoside/DNA) den während des mdC-Stoffwechsels neu gebildeten  $D_1,^{15}N_2$ -dC. Dies stammt vermutlich aus einem C-C-Bindungsbruch von fdC oder cadC. Interessanterweise ist der Gehalt an neu gebildetem  $D_1,^{15}N_2$ -dC in der gleichen Größenordnung wie der Gehalt von fdC in genomischer DNA von TDG<sup>+/-</sup>-Zellen.<sup>[62,64]</sup>

Können diese Ergebnisse in Zukunft durch weitere biologische Replikate verifiziert werden, so wäre dies der erste *in vivo*-Nachweis einer C-C-Bindungsbruchreaktion zur aktiven Demethylierung. Die Tatsache, dass  $D_1,^{15}N_2$ -dC nur in mES-Zellen ohne TDG-Enzym detektiert werden konnte, deutet daraufhin, dass die Basenexzisionsreparatur zumindest unter den gegebenen Umständen der vorherrschende Mechanismus zur aktiven Demethylierung ist. Nichtsdestotrotz konnte gezeigt werden, dass bei Blockierung von BER, die Zelle einen zweiten potentiellen Mechanismus besitzt. Ob dieser Mechanismus möglicherweise nur zu bestimmten Zeitpunkten in der Zellentwicklung zum Tragen kommt, müssen zukünftige Untersuchungen zeigen.

Aufgrund des hohen Hintergrundsignals durch die [M+3]-dC Verunreinigung sowie der Detektion nur sehr kleiner Produktmengen ist diesem *Isotope-Tracing*-Experiment ein gewisser Unsicherheitsfaktor enthalten. Weiterhin kann der *Knockout* des TDG-Enzyms potentiell mit einer Vielzahl an

sekundären Effekten verknüpft sein, die möglicherweise eine C-C-Bindungsbruchreaktion unnatürlicher Weise begünstigen. Zur weiteren Aufklärung des epigenetischen Metabolismus wurde daher ein neues Testsystem unter Verwendung von fluorierten Cytidin-Derivaten entwickelt.

## 6 Fluorierte Cytidin-Derivate zur Aufklärung des mdC-Stoffwechsels

Zur Stabilitätserhöhung einer RNA-Duplex vor dem Abbau durch Nukleasen werden häufig RNA-Nukleoside mit einem 2'-Fluor-Substituenten modifiziert.<sup>[187]</sup> Wird hingegen die 2'-Fluor-Substitution bei epigenetisch relevanten DNA-Nukleosiden verwendet, so könnten aufgrund der im Folgenden beschriebenen Eigenschaften und Auswirkungen dieser Modifizierung entscheidende Hinweise zur Aufklärung des mdC-Stoffwechsels erhalten werden:

- **Elektronik:** Die 2'-Fluor-Substitution an Desoxynukleosiden destabilisiert den Oxocarbeniumion-Übergangszustand einer möglichen Deglykosylierung aufgrund der stark elektronenziehenden Eigenschaft von Fluor<sup>1</sup> derart, dass die Öffnung der *N*-glykosidischen Bindung verlangsamt stattfindet.<sup>[74,188-191]</sup> Enthält fdC bzw. cadC eine 2'-Fluor-Substitution, so sollte diese den Bruch der glykosidischen Bindung verhindern, was eine Inhibierung der für fdC bzw. cadC bekannten Basenexzisionsreparatur zur Folge hätte.<sup>[70,192]</sup> Falls eine C-C-Bindungsbruchreaktion als zusätzlicher Mechanismus der aktiven Demethylierung möglich ist, so müsste theoretisch 2'-Fluor-dC als Produkt detektiert werden können.
- **Sterik:** Ein weiterer Vorteil von Fluor im Gegensatz zu anderen Markierungen ist der geringe sterische Anspruch<sup>2</sup>, weshalb Fluor ein geeigneter bioisosterer Ersatz für Wasserstoff ist.<sup>[193]</sup> Der Einbau von 2'-Fluor-Nukleosiden in die DNA sollte daher vermutlich geringe Auswirkungen auf deren Struktur haben.

Generell liegen die Nukleotid-Zucker in der natürlich vorkommenden B-DNA bevorzugt in einer C2'-*endo*-Konformation vor. Allerdings ist die energetische Barriere zur ungünstigeren C3'-*endo*-Konformation relativ gering, was in einer hohen Flexibilität der DNA resultiert.<sup>[194]</sup> Der 2'-Fluor-Substituent eines Nukleosids kann sich in einer 2'-(*S*)- bzw. 2'-(*R*)-Konfiguration befinden, was zu 2'-Fluor-*arabino*-dC (FANA) bzw. 2'-Fluor-*ribo*-dC (F-dC) führt. Es wird zwar vermutet, dass eine *arabino*-Fluor-Substitution des Zuckers eher die für die DNA günstigere C2'-*endo*- und eine *ribo*-Fluor-Substitution die C3'-*endo*-Konformation stabilisiert, die energetischen Unterschiede sind jedoch eher gering.<sup>[191,195-197]</sup>

- **Toxizität:** Für FANA konnte eine Inhibierung verschiedener Polymerasen nachgewiesen werden.<sup>[198,199]</sup> Ein zu FANA stereochemisches Analog ist Fialuridin (2'-*arabino*-Fluor-

---

<sup>1</sup> Elektronegativität = 4.0 nach *L. Pauling*.

<sup>2</sup> Van-der-Waals-Radien: Fluor 147 pm, Wasserstoff 110 pm, Sauerstoff 152 pm.

<sup>5</sup>IdU). Im Rahmen einer klinischen Studie wurde Fialuridin zur Therapie gegen Hepatitis B eingesetzt, wobei fünf der 15 Patienten an Leberversagen starben. Die Toxizität wurde auf den irreversiblen Einbau des Nukleosids in die mitochondriale DNA zurückgeführt.<sup>[200]</sup> Im Gegensatz dazu, wurde F-dC als potentieller Wirkstoff gegen Hepatitis C gehandelt, da dessen Triphosphat die virale RNA Polymerase (NS5B) inhibiert.<sup>[201]</sup> Allerdings wurden zur ausreichenden Inhibierung sehr große Mengen an Nukleosid benötigt und eine Wirkung konnte erst nach 6-7 Tagen beobachtet werden. Interessanterweise konnte bei Verfütterung von F-dC bzw. F-dU von bis zu 500 mg/kg/Tag an Ratten und Murmeltieren keinerlei Beeinträchtigung festgestellt werden.<sup>[202]</sup> Des Weiteren zeigten *Kierdaszuk et al.*, dass die Phosphorylierungs-Aktivität der humanen Cytidinkinase sowie der Thymidinkinase für F-dC deutlich höher ist als für FANA.<sup>[203]</sup> Es ist daher zu vermuten, dass eine *ribo*-Konfiguration des 2'-Fluor-Substituenten im Vergleich zum *arabino*-Analogon eine geringere Zytotoxizität aufweist.

- **Charakterisierung:** Weiterhin bietet die Verwendung fluorierte Nukleoside den Vorteil, dass nach enzymatischem Verdau die exakte Masse des Nukleosids um 18 u höher ist. Eine Überlappung der Signale im Massenspektrum wie es z.B. bei Verwendung von isotope markiertem dC mit einer Massendifferenz von 2 u zu gleichzeitig natürlich vorhandenem dC vorkommen kann, ist damit ausgeschlossen.

Auf Basis dieser Überlegungen ist es mittels der 2'-Fluor-Substitution prinzipiell möglich, den mdC-Stoffwechsel aufzuklären. Hierzu werden zunächst die F-dC-Derivate der epigenetisch relevanten Nukleoside fdC und cadC oder die entsprechenden ODN synthetisiert. Diese werden anschließend in zellbiologischen oder biochemischen *Tracing*-Studien eingesetzt. Kann nach Isolierung und Verdau das Vorhandensein von F-dC massenspektrometrisch detektiert werden, so kann direkt auf eine aktive Demethylierung von F-fdC oder F-cadC in Form eines C-C-Bindungsbruchs geschlossen und dieser in weiteren Experimenten genauer spezifiziert werden.

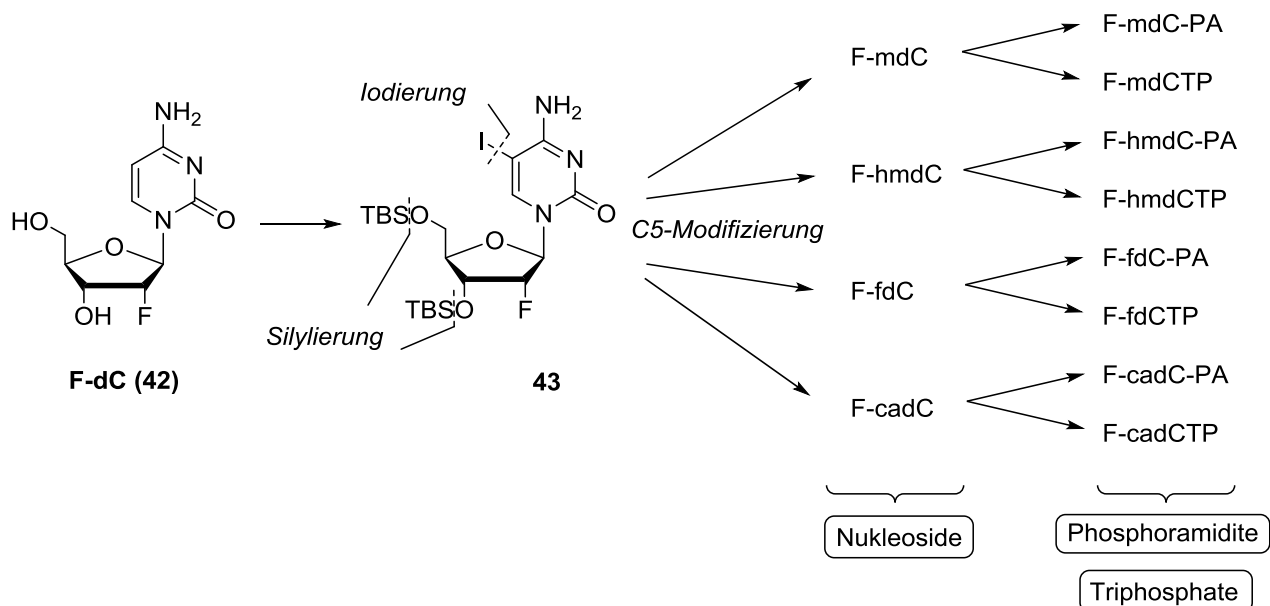
Ziel der folgenden Experimenten war zunächst die Synthese der F-dC-Derivate der epigenetisch relevanten DNA-Nukleoside. Aufgrund der geringeren Toxizität wurde sich für die Synthese der *ribo*-Konfiguration der 2'-Fluor-dC-Derivate entschieden. Die kommerzielle Verfügbarkeit von F-dC war bei der Syntheseplanung ein besonderer Vorteil.

## 6.1 Strategie zur Synthese 2'-fluorierter Nucleoside, Nucleosidtriphosphate und Phosphoramidit-Bausteine

Da für biochemische und zellbiologische Untersuchungen zur aktiven Demethylierung sämtliche 2'-fluorierte Nucleosid-, Nucleosidtriphosphat- und Phosphoramidit-Derivate der epigenetisch relevanten DNA-Basen benötigt werden, wurde zunächst eine hoch divergente Synthesestrategie entwickelt (siehe **Schema 11**).

Startmaterial ist das kommerziell erhältliche F-dC (**42**), welches mittels C5-Iodierung und anschließender Silylierung mit TBS-Cl in das wichtige Intermediat **43** umgewandelt werden kann. **43** ist die Ausgangsverbindung für die weitere C5-Modifizierung zu den verschiedenen Nucleosiden, welche in zellbiologischen Verfütterungsexperimenten eingesetzt werden sollen.

Aus den Nucleosiden können durch Anbringen der entsprechenden Schutzgruppen die korrespondierenden Phosphoramidit-Bausteine erhalten werden, welche anschließend mittels DNA-Festphasensynthese in kürzere ODN eingebaut werden können. Die Triphosphate der fluorierten Nucleoside können direkt nach Umsetzung mit einem Triphosphat-Reagenz erhalten und für die Synthese längerer ODN mittels PCR eingesetzt werden. Die durch DNA-Festphasen-Synthese und PCR erhaltenen ODN sollten anschließend für biochemische Studien, z.B. Umsetzung mit spezifischen Proteinen oder Zelllysate, verwendet werden.



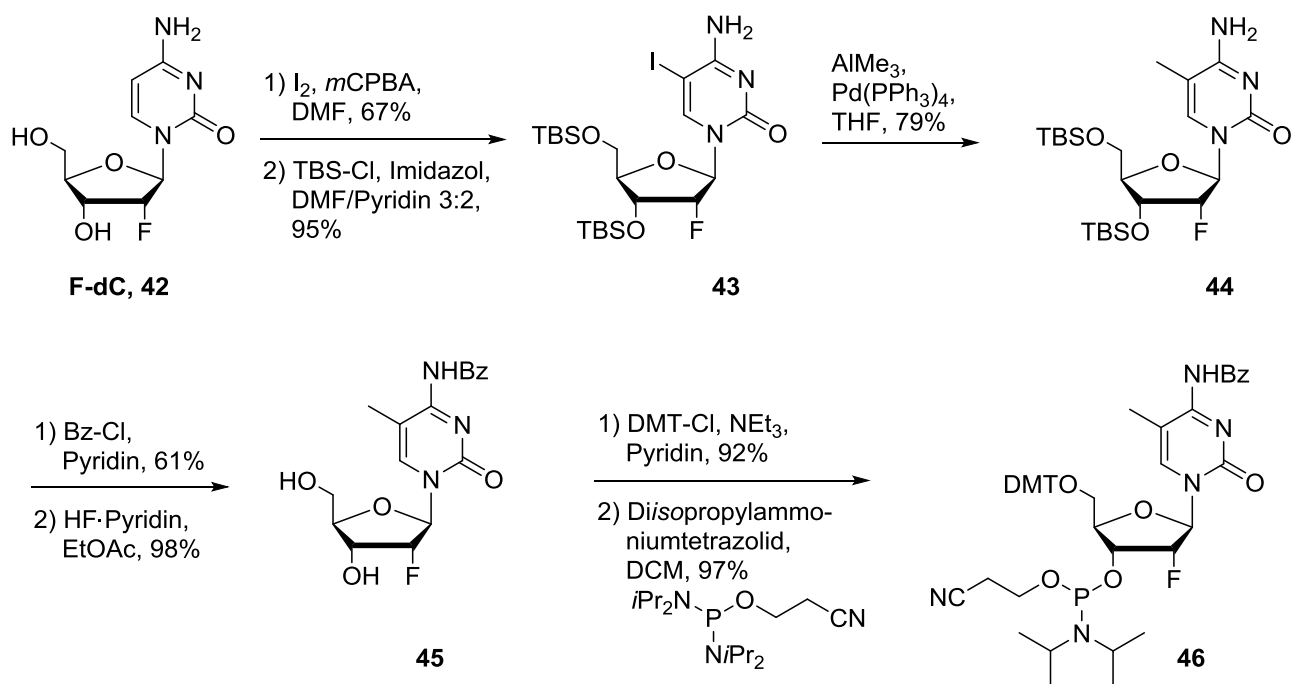
**Schema 11:** Divergente Synthesestrategie zur Generierung sämtlicher 2'-fluorierter Nucleosid-, Nucleosidtriphosphat (TP)- und Phosphoramidit (PA)-Derivate der epigenetisch relevanten DNA-Basen.

## 6.2 Synthese von fluorierten Phosphoramidit-Bausteinen und deren Einbau in DNA

Zunächst sollte in einer *Proof-of-Principle*-Studie die Hypothese einer verminderten Hydrolyse der glykosidischen Bindung aufgrund der 2'-Fluor-Substitution überprüft werden. Hierzu sollte die humane Thymin-DNA-Glykosylase (hTDG) mit ODN, die 2'-F-Analoga der epigenetisch relevanten dC-Nukleoside enthält, umgesetzt werden (siehe Seite 56). Für dieses wie auch für weitere biochemische Experimente zur aktiven Demethylierung werden kurze (20-40 bp), definierte ODN benötigt. Unter Verwendung der entsprechenden fluorierten Phosphoramidit-Bausteine können diese mittels DNA-Festphasensynthese hergestellt werden. Die Synthesen der Phosphoramidit-Bausteine aller fluorierten, epigenetisch relevanten dC-Derivate sind nicht literaturbekannt (Scifinder-Recherche 02.12.2015). Die im Folgenden beschriebenen Synthesen wurden mindestens im 100 mg-, meist aber im Gramm-Maßstab durchgeführt.

### 6.2.1 F-mdC-Phosphoramidit

Entsprechend der Synthesestrategie in **Schema 11** diente das kommerziell erhältliche F-dC als Ausgangsmaterial für die Synthese aller F-dC-Derivate (siehe **Schema 12**). In Anlehnung an die Synthese von Münzel *et al.* erfolgte die Iodierung der C5-Position mit elementarem Iod und *m*CPBA in 67% Ausbeute.<sup>[161]</sup> Die nachfolgende TBS-Schützung<sup>[161]</sup> resultierte in dem wichtigen Intermediat **43**.

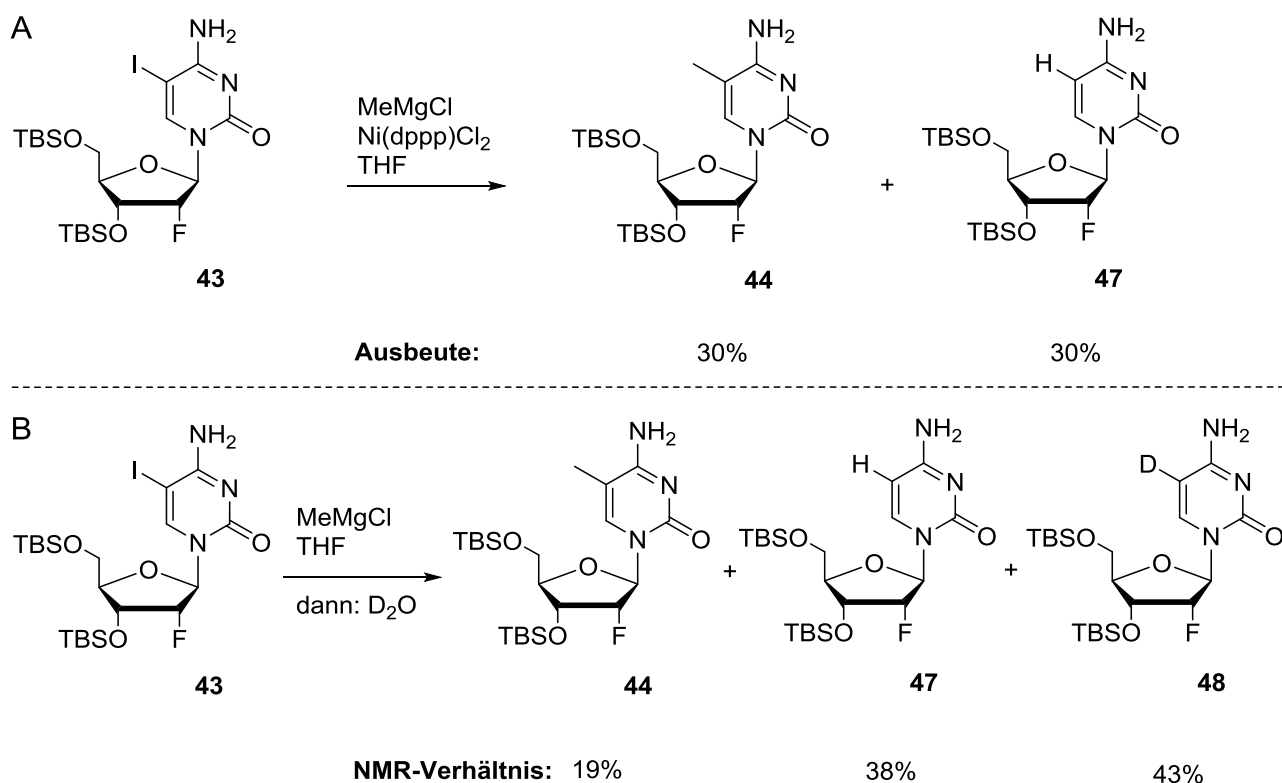


**Schema 12:** Synthese des F-mdC-Phosphoramidit-Bausteins **46**.

Der Tausch der Reaktionsreihenfolge zur vereinfachten Aufreinigung, also die C5-Iodierung erst nach erfolgter TBS-Schützung, war unter den verwendeten Reaktionsbedingungen ( $I_2$ , *m*CPBA und LiI, CAN) nicht möglich. In beiden Fällen konnte neben der Silyl-Entschützung eine Zersetzung des Nucleosids beobachtet werden.

Schlüsselschritt der Synthese zu F-mdC-Phosphoramidit **46** war die Methylierung der C5-Position. Hierfür sollte in Anlehnung an die Vorschrift von *M. Münzel* (ehemals AK Carell) die *Kumada*-Kupplung verwendet werden.<sup>[185]</sup> Diese resultierte jedoch auch nach Optimierung der Reaktionsparameter bestenfalls in einem 1:1 Produktgemisch aus F-mdC und dehalogeniertem F-dC (siehe **Schema 13A**). Eine säulenchromatografische Auftrennung beider Produkte ist aufgrund des gleichen Retentionsfaktors nicht möglich. Der Grund der Dehalogenierungs-Reaktion war zunächst unbekannt, jedoch wurde eine 1,3-Protonen-Wanderung ausgehend vom exozyklischen Amin vermutet.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde die Methylierungsreaktion ohne Nickel-Katalysator



**Schema 13:** Problematische *Kumada*-Kupplung F-dC-Derivat **43**. A) Die Umsetzung von **43** resultierte unter Standard-*Kumada*-Bedingungen in einem 1:1-Gemisch aus F-mdC **44** und F-dC **47**. B) Nach Umsetzung ohne Nickel-Katalysator und Abbruch der Reaktion mit D<sub>2</sub>O wurde ein Produktgemisch aus F-mdC **44**, F-dC **47** und F-DdC **48** erhalten.



durchgeführt und bereits nach fünf Minuten durch Zugabe von D<sub>2</sub>O abgebrochen (siehe **Schema 13B**). Hierbei konnte ein Produktgemisch von F-mdC:F-dC:F-DdC zu 19%:38%:43% isoliert werden.

Die Isolierung des C5-deutierten F-DdC ist ein Indiz für einen Iod/Magnesium-Austausch an C5-Position. Dies kann wie folgt erklärt werden: Das zugesetzte Methylgrignard-Reagenz dient zum einen als Methylanion-Quelle, zum anderen als Base, die das exozyklische Amin deprotoniert. Jedoch ist die C5-Position in **43** derart reaktiv, dass neben einer Deprotonierung auch vermehrt ein Iod/Magnesium-Austausch stattfindet. Ein solcher Austausch ist literaturbekannt und wurde unter anderem bereits von *Brückl et al.* für die Synthese von PreQ-Derivaten beschrieben.<sup>[204,205]</sup> Die nachfolgende 1,3-Protonen-Wanderung von noch nicht deprotoniertem C4-Amin ist aufgrund der Bildung des energetisch günstigen, dehalogenierten F-dC bevorzugt.

Zur Vermeidung dieser Dehalogenierungsreaktion wurde zunächst die Schützung des exozyklischen Amins als Imin in Betracht gezogen. Aufgrund der fehlenden Wasserstoffatome wäre eine 1,3-Protonen-Wanderung von C4-Amin zur C5-Position während der *Kumada*-Kupplung nicht möglich. Im weiteren Verlauf der Synthese zum Phosphoramidit und während des Einbaus in die DNA sollte diese Schutzgruppe stabil, in der globalen basischen DNA-Entschützung jedoch abspaltbar sein. Als Reagenzien zur iminischen Schützung wurde DMF und Benzophenonimin untersucht. Allerdings stellten sich beide Reagenzien als ungeeignet heraus. Benzophenonimin reagiert unter verschiedensten Bedingungen nicht mit TBS-geschütztem F-IdC **43** und DMF ist als Schutzgruppe unter Grignard-Bedingungen nicht stabil.

Die Lösung zur Unterdrückung der Dehalogenierung ist somit die Verwendung eines Reagenzes, welches zunächst ausschließlich das exozyklische Amin deprotoniert. Im zweiten Schritt soll dann erst im Rahmen der *Kumada*-Kupplung der selektive Transfer des Methylanions auf den Katalysator folgen.

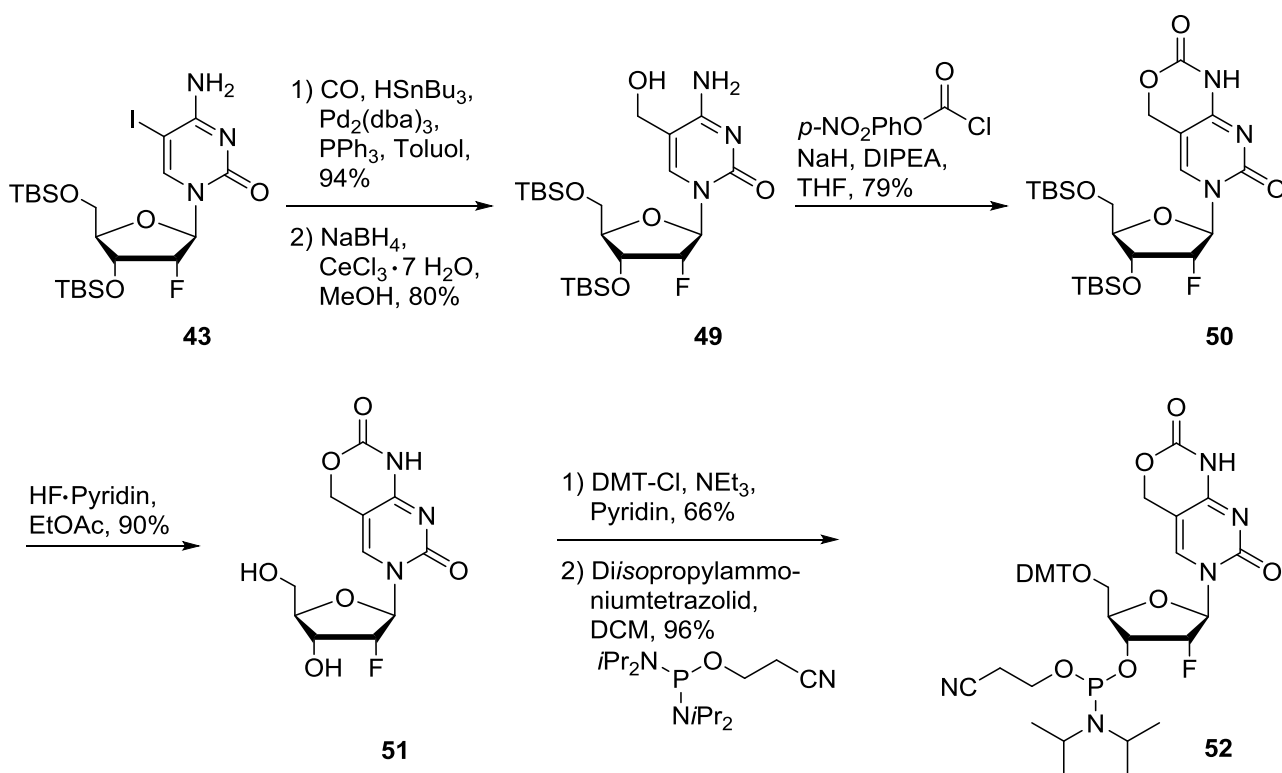
In der Tat konnte bei Verwendung von Trimethylaluminium (2.6 Äq.) unter *Kumada*-Bedingungen eine deutliche Verbesserung erzielt werden.<sup>[206]</sup> Zum einen wurden lediglich 5% dehalogeniertes F-dC und 79% gewünschtes F-mdC **44** erhalten, zum anderen konnte auch eine Erhöhung der Gesamtausbeute im Vergleich zum *Grignard*-Reagenz festgestellt werden. Es ist davon auszugehen, dass die stark negativ geladene Methylgruppe des Trimethylaluminiums sehr schnell das exozyklische Amin deprotoniert und sich anschließend ein relativ stabiles Aluminium/Stickstoff-Addukt bildet.

Die folgende Benzoyl-Schützung des Rohprodukts gelang mit guten Ausbeuten (61%) und das verbleibende dehalogenierte Derivat konnte säulenchromatografisch vollständig entfernt werden. Nach

Silyl-Entschützung, DMT-Schützung und Umsetzung mit dem *Bannwarth*-Reagenz konnte das F-mdC-Phosphoramidit **46** in sehr guten Ausbeuten (87% über drei Stufen) erhalten werden. Der Einbau von **46** per DNA-Festphasensynthese ist in Kapitel 6.2.5 auf Seite 54 beschrieben.

## 6.2.2 F-hmdC-Phosphoramidit

Ausgehend von TBS-geschützten F-IdC **43** wurde in sechs Stufen das F-hmdC-Phosphoramidit **52** synthetisiert (siehe **Schema 14**). Zur Einführung einer Hydroxymethylgruppe in C5-Position wurde in Anlehnung an die Vorschrift von *Münzel et al.* zunächst eine carbonylierende *Stille*-Kupplung durchgeführt.<sup>[161]</sup> Die nachfolgende Aldehydreduktion zum F-hmdC-Derivat **49** wurde unter *Luche*-Bedingungen durchgeführt. Dies war notwendig, da es bei NaBH<sub>4</sub>-Reduktion ohne CeCl<sub>3</sub> zur Zersetzung des Startmaterials, wahrscheinlich durch Angriff auf die sehr elektrophile C6-Position, kommt.<sup>[161,207]</sup> Die Amino- und Hydroxymethylgruppe wurde als zyklisches Carbamat mit einer Ausbeute von 79% gleichzeitig geschützt. Allerdings erfolgte die Umsetzung mit *p*-Nitrophenylchloroformiat erst nach vorheriger Deprotonierung beider funktioneller Gruppen mit Natriumhydrid.<sup>[208]</sup> Sehr wahrscheinlich ist aufgrund der 2'-F-Substitution der Pyrimidinzyklus derart elektronenarm, dass das freie Elektronenpaar des C4-Amins stark delokalisiert ist. Ein nukleophiler Angriff des C4-Amins ist daher erst nach vorheriger Deprotonierung möglich. Die nachfolgende Silyl-

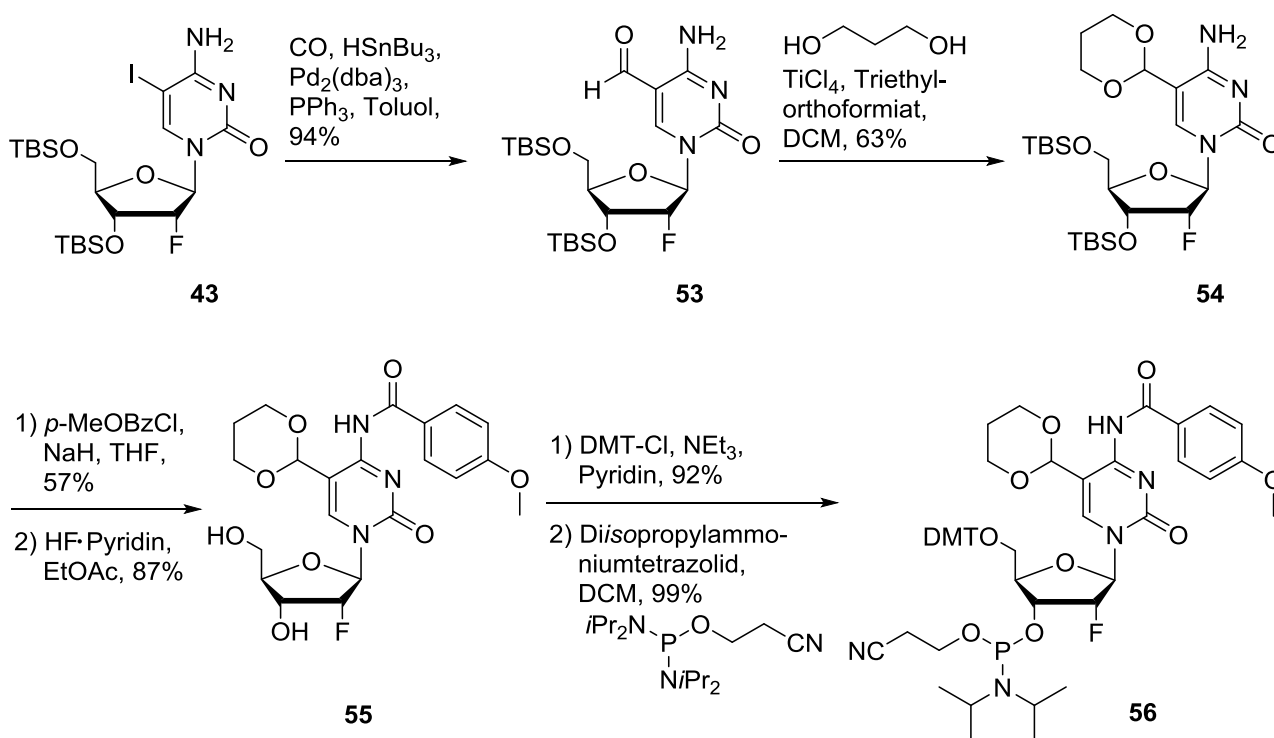


**Schema 14:** Synthese des F-hmdC-Phosphoramidit-Bausteins **52** ausgehend von TBS-geschützten F-IdC **43**.

Entschützung mit *Olah's* Reagenz resultierte mit einer Ausbeute von 90% in Nukleosid **51**. Nach DMT-Schützung und Umsetzung mit dem *Bannwarth*-Reagenz konnte das F-hmdC-Phosphoramidit **52** in guten Ausbeuten von 63% über zwei Stufen erhalten werden.

### 6.2.3 F-fdC-Phosphoramidit

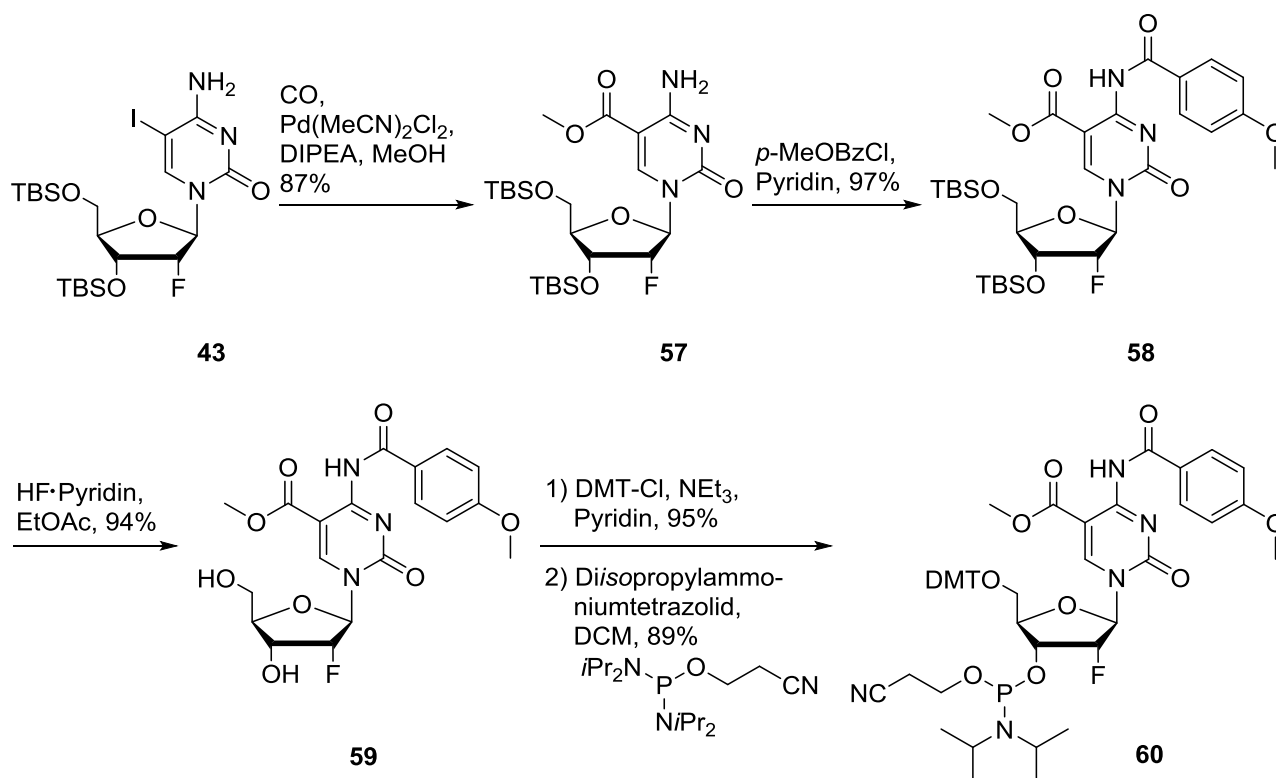
F-fdC-Phosphoramidit wurde in Anlehnung an die Vorschriften zur Synthese des fdC-Phosphoramidits von *Schröder et al.* synthetisiert.<sup>[209]</sup> Ausgehend von iodiertem F-dC-Derivat **43** wurde in sechs Stufen das F-fdC-Phosphoramidit **56** synthetisiert (siehe **Schema 15**). Nach der carbonylierenden *Stille*-Kupplung wurde der wenig reaktive Aldehyd **53** nach  $\text{TiCl}_4$ -Aktivierung mit Propan-1,3-diol als 1,3-Dioxan geschützt. Wie auch bei der Synthese zum F-hmdC-Phosphoramidit **52**, erfolgte die Schützung des C4-Amins nur nach vorheriger Deprotonierung mit Natriumhydrid. Nach Spaltung der Silyl-Ether mit HF in Pyridin, DMT-Schützung und Umsetzung mit dem *Bannwarth*-Reagenz konnte F-fdC-Phosphoramidit **56** in sehr guten Ausbeuten (79% über drei Stufen) erhalten werden.



**Schema 15:** Synthese des F-fdC-Phosphoramidit-Bausteins **56** ausgehend von TBS-geschützten F-IdC **43**.

### 6.2.4 F-cadC-Phosphoramidit

Ausgehend von iodiertem F-dC-Derivat **43** wurde in fünf Stufen das F-cadC-Phosphoramidit **60** synthetisiert (siehe **Schema 16**). Die Einführung des Methylesters in C5-Position wurde in Anlehnung an die Vorschrift von *Münzel et al.* in einer Pd<sup>0</sup>-vermittelten CO-Insertion in MeOH in sehr guten Ausbeuten (87%) erreicht.<sup>[83,210]</sup> Die nachfolgende C4-Amin-Schützung von **57** erfolgte mit *p*-Methoxybenzoylchlorid. Interessanterweise bedurfte es hier keiner vorherigen Deprotonierung mit Natriumhydrid. Es scheint, dass das C4-Amin in **57** nukleophil genug ist, um mit dem Säurechlorid zu reagieren. Die anschließende Silyl-Entschützung mit *Olah's* Reagenz zu **59** verlief mit 94% Ausbeute. Nach DMT-Schützung der 5'-Hydroxygruppe sowie Umsetzung mit *Bannwarth*-Reagenz wurde das F-cadC-Phosphoramidit **60** erfolgreich isoliert (85% über zwei Stufen).



**Schema 16:** Synthese des F-cadC-Phosphoramidit-Bausteins **60** ausgehend von TBS-geschützten F-IdC **43**.

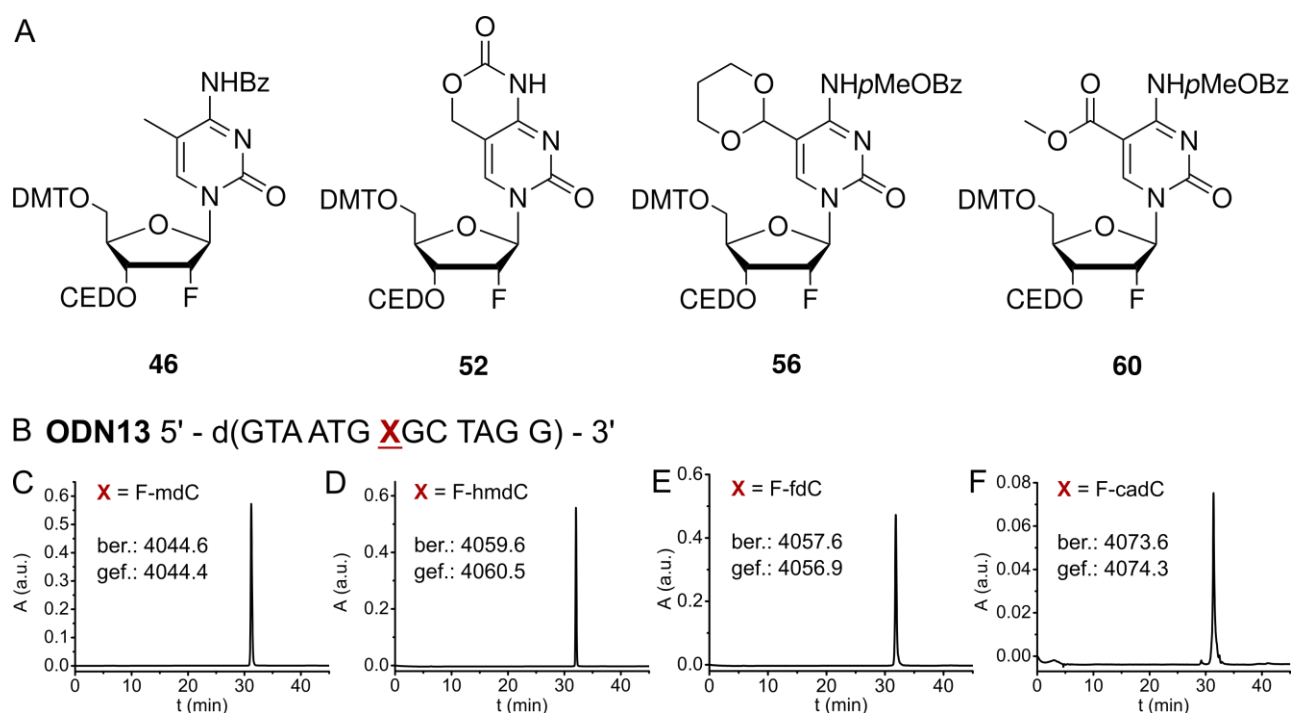
### 6.2.5 Einbau der fluorierten Phosphoramidite in Oligodesoxynukleotide

Zur Überprüfung der Qualität der synthetisierten Phosphoramidite (F-mdC-PA, F-hmdC-PA, F-fdC-PA, F-cadC-PA) in der DNA-Festphasensynthese wurde jeweils ein Muster-ODN (**ODN13**) mit dem entsprechenden Nucleosid synthetisiert (**Abbildung 19A/B**). Hierbei wurde absichtlich eine epigenetisch relevante Sequenz gewählt, sodass sich das modifizierte Nucleosid in einem CpG-

Kontext befand. Während der fdC-Untersuchungen konnte beobachtet werden, dass die Kupplungseffizienzen der modifizierten Nucleoside in einem solchen Sequenzkontext am niedrigsten sind. Nur falls hier eine ausreichend gute Kupplung sowie keine Nebenprodukte beobachtet werden können, besitzt das Phosphoramidit eine ausgezeichnete Qualität.

Der Einbau der fluorierten Phosphoramidite per DNA-Festphasensynthese erfolgte mit industriellen Standard-Phosphoramidit-Bedingungen.<sup>[165,166]</sup> Lediglich die Kupplungszeiten für die modifizierten Phosphoramidite wurden von 30 auf 180 Sekunden erhöht. Zur Entschützung der Nucleotide und zur Abspaltung vom Harz wurden die F-mdC- und F-fdC-haltige ODN mit konzentrierter NH<sub>3</sub>-Lösung (18 h, 25-28 °C) behandelt. Das F-fdC haltige ODN wurde anschließend in einem zweiten Entschützungsschritt mit 80%-iger wässriger Essigsäure solange bei 20 °C behandelt, bis die MALDI-TOF-Analyse die vollständige Hydrolyse der Acetal-Schutzgruppe zeigte (meist ca. 6 h). Im Falle von F-hmdC und F-cadC wurde das ODN aufgrund der Carbamat- und Ester-Schutzgruppe mit NaOH (18 h, 0.4 M in Methanol/Wasser 4:1) behandelt. Hierdurch wird die Bildung von Aminomethylgruppen und Amidgruppen vermieden.<sup>[83,161]</sup>

Analytische RP-HPL-Chromatografie direkt nach der DNA-Entschützung zeigte deutlich nur ein Hauptprodukt. Nach Aufreinigung mittels präparativer RP-HPL Chromatografie konnten die ODN



**Abbildung 19:** A) Strukturformeln der verwendeten Phosphoramidite. B) Sequenz des synthetisierten Test-ODN13. C) Reversed-phase HPL-Chromatogramm der aufgereinigten ODN nach basischer und im Falle von F-fdC zusätzlich saurer Entschützung (0-40% Puffer B in 45 min).

in sehr guter Ausbeute (20-52%) und hoher Reinheit (>95%) erhalten werden. MALDI-TOF-MS-Analyse verifizierte die Produkte als die gewünschten ODN (siehe **Abbildung 19C**).

Erstmalig ist nun die Synthese verschiedener ODN möglich, die die fluorierten Analoga der epigenetisch relevanten DNA-Nukleoside beinhalten. Diese wurden nun in der folgenden *Proof-of-Principle*-Studie mit hTDG sowie in weiteren biochemische Experimenten zur Aufklärung der aktiven Demethylierung verwendet (für letzteres siehe Kapitel 6.8, Seite 70).

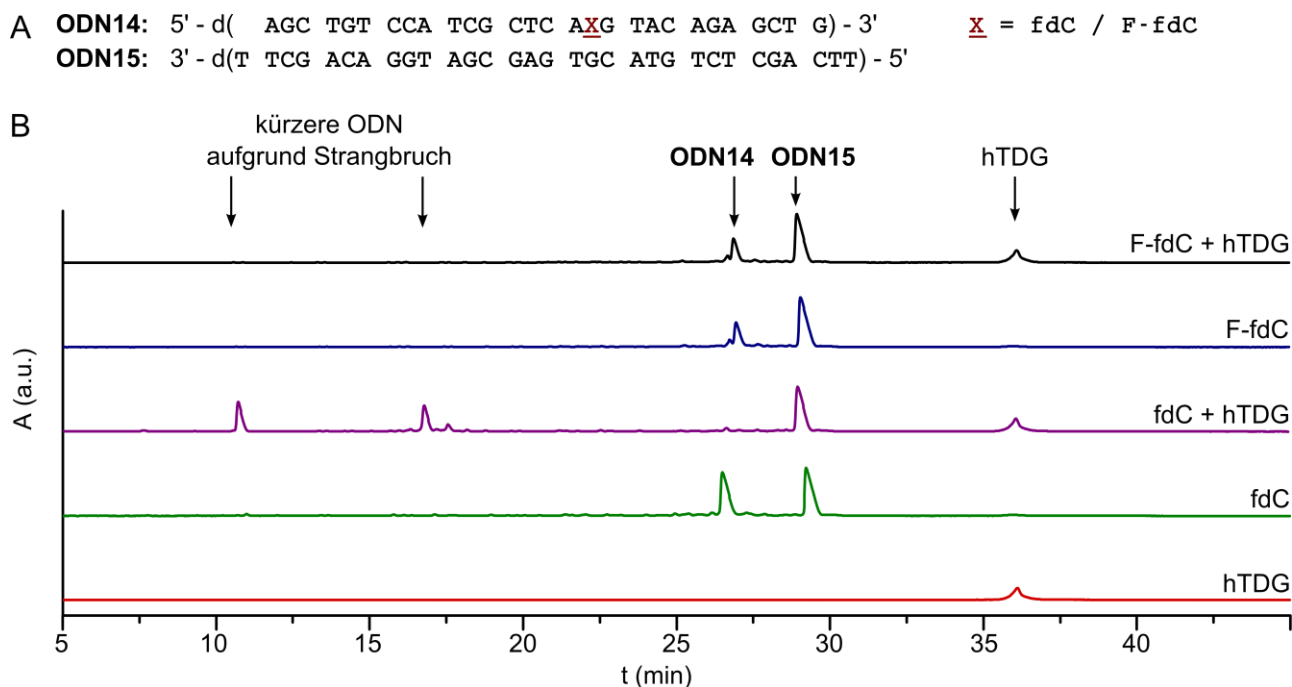
### **6.3 F-dC-Derivate inhibieren die humane Thymin-DNA-Glykosylase**

Die Gruppen um *Drohat* und *Chen* zeigten 2011 bzw. 2012, dass Formyl- und Carboxycytosin von humaner Thymin-DNA-Glykosylase (hTDG) in einer Deglykosylierungsreaktion, die über einen Oxocarbeniumion-Übergangszustand verläuft, aus ODN herausgeschnitten werden können.<sup>[70,73,75,211,212]</sup> Die Autoren inkubierten hierzu fdC- und cadC-haltige ODN mit hTDG, was in einer abasischen Stelle in den ODN resultierte. Die nachfolgende NaOH-Behandlung führte an diesen Positionen über  $\beta$ - und  $\delta$ -Eliminierungsreaktionen zu einem Strangbruch und somit zu zwei verkürzten ODN.

Zur Überprüfung der Hypothese einer verminderten Hydrolyse der glykosidischen Bindung aufgrund die 2'-Fluor-Substitution wurde ein fdC- sowie ein F-fdC-haltiges ODN (**ODN14**) zusammen mit dem entsprechenden Gegenstrang **ODN15** mit hTDG-Enzym für 1 h bei 37 °C inkubiert und mittels HPLC analysiert (siehe **Abbildung 20**). Das Experiment führte *O. Kotljaro* (AK Carell) durch.

In Übereinstimmung mit der Literatur stellte sich hierbei heraus, dass bei Umsetzung von hTDG-Enzym mit fdC-haltiger ODN Strangbrüche anhand des Auftretens kürzerer ODN detektiert werden konnten. Dahingegen konnten für das fluorierte Analogon keine Strangbrüche beobachtet werden.

Somit kann davon ausgegangen werden, dass eine 2'-Fluor-Substitution die glykosidische Bindung derart stabilisiert, dass eine Glykosylase-Aktivität von hTDG nicht möglich ist. Die fluorierten Analoga der epigenetisch relevanten Nukleoside bieten somit ein ideales Werkzeug für die Untersuchung der aktiven Demethylierung jenseits der Basenexzisionsreparatur.



**Abbildung 20:** A) Sequenz des verwendeten fdC- bzw. F-fdC-haltigen ODN (**ODN14**) und des Gegenstrangs **ODN2** für das TDG-Enzym-Experiment. B) Reversed-phase HPL-Chromatogramm der Umsetzung von fdC- und F-fdC-haltiger ODN mit hTDG-Enzym. In Übereinstimmung mit der Literatur konnte das Entfernen von Formylcytosin aufgrund der Detektion der Strangbrüche beobachtet werden. Eine 2'-Fluor-Substitution an fdC inhibierte hingegen die Aktivität des hTDG-Enzyms.

## 6.4 Synthese fluoriertes Nukleoside

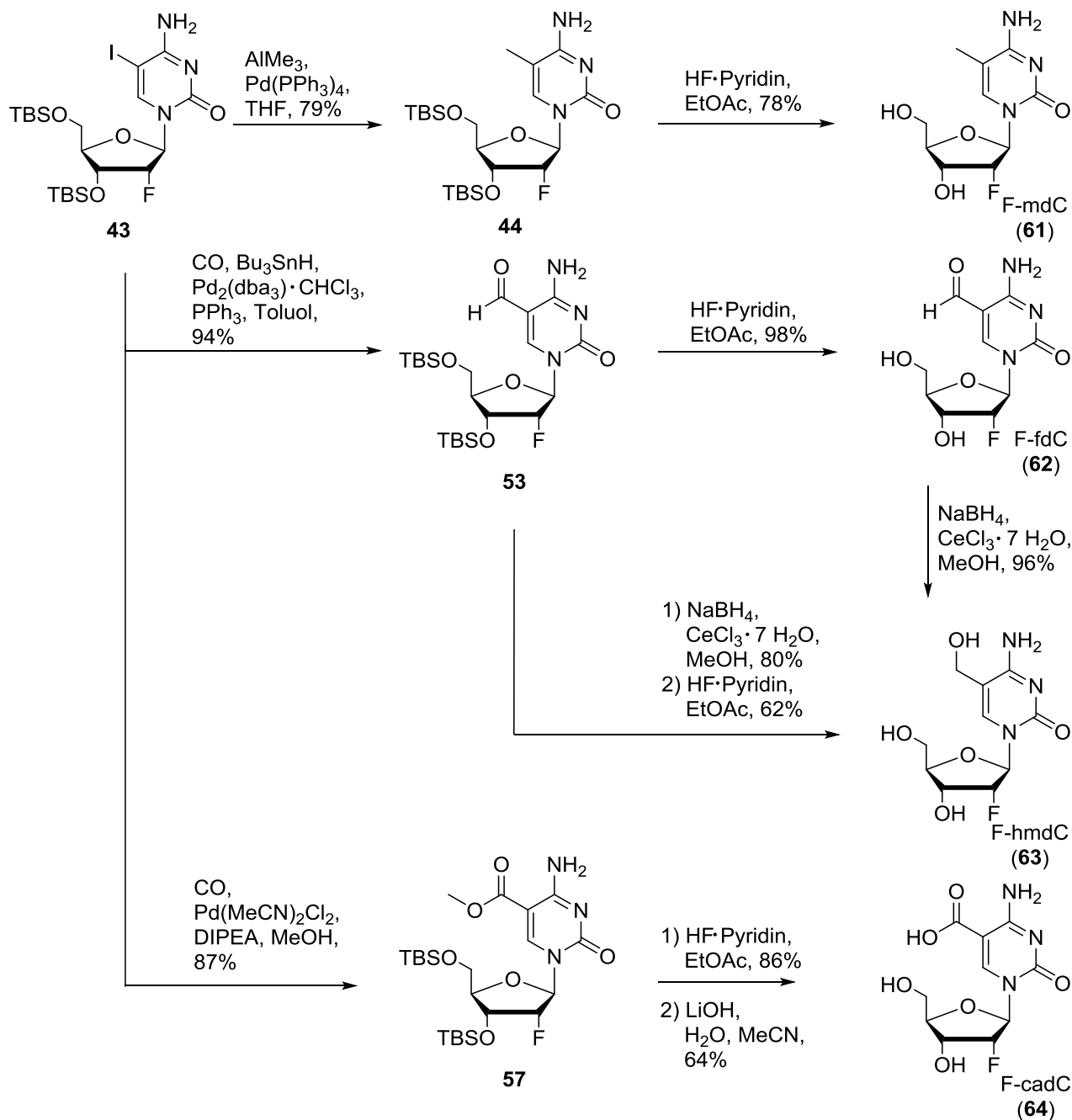
Die fluorierten Analoga der epigenetisch relevanten DNA-Nukleoside werden neben zellbiologischen Verfütterungsstudien auch für die massenspektrometrische Quantifizierung benötigt.

Hierzu wurden basierend auf der Synthesestrategie in **Schema 11** die 2'-F-Analoga der epigenetisch relevanten Nukleoside synthetisiert (siehe **Schema 17**).

F-mdC (**61**) wurde durch C5-Methylierung von TBS-geschützten F-IdC **43** mit Trimethylaluminium unter *Kumada*-Bedingungen sowie anschließender Silyl-Entschützung mit *Olah's* Reagenz in 62% Ausbeute über zwei Stufen erhalten.

Wurde **43** in einer carbonylierenden *Stille*-Kupplung mit Kohlenstoffmonooxid und Tributylzinnhydrid umgesetzt, so konnte der Aldehyd **53** mit exzellenten Ausbeuten von 94% erhalten werden. Die folgende Silyl-Entschützung mit HF in Pyridin resultierte in F-fdC (**62**).

Für die Synthese von F-hmdC (**63**) wurde der Aldehyd **53** zunächst unter *Luche*-



**Schema 17:** Ausgehend von TBS-geschützten F-IdC **43** konnten alle vier fluorierten Derivate der epigenetisch relevanten DNA-Nucleosiden synthetisiert werden.

Bedingungen reduziert. Die nachfolgende Silyl-Entschützung mit *Olah's* Reagenz resultierte in F-hmdC (**63**) (47% Ausbeute über drei Stufen). Die säulenchromatografische Aufreinigung nach jeder Synthesestufe ergab NMR-reine Verbindungen. Jedoch konnte für F-hmdC (**63**) auch nach der obligatorischen, präparativen HPLC-Aufreinigung massenspektrometrisch eine sub-prozentuale Menge an F-dC **42** detektiert werden. Der Grund hierfür ist die nahezu gleiche Retentionszeit von



F-dC und F-hmdC, die eine optimale Auftrennung sehr erschwert (siehe **Abbildung 21A**).

Hochreines F-hmdC (**63**) konnte jedoch über F-fdC (**62**) erhalten werden. Aufgrund der sehr unterschiedlichen Retentionszeit von F-fdC (**62**) im Vergleich zu den anderen F-Nukleosiden, konnte nach zweimaliger Aufreinigung massenspektrometrisch ausschließlich F-fdC detektiert werden. Die anschließende *Luche*-Reduktion zu F-hmdC (**63**) sowie zweimalige HPLC-Aufreinigung resultierte in F-dC-freiem F-hmdC, was massenspektrometrisch verifiziert werden konnte.

Für die Synthese des Nukleosids F-cadC (**64**) wurde **43** in einer Pd<sup>0</sup>-vermittelten CO-Insertion mit Methanol umgesetzt. Der resultierende Methylester **57** wurde mit *Olah's* Reagenz Silyl-entschützt und anschließend verseift, sodass das Nukleosid F-cadC (**64**) mit 48% über drei Stufen erhalten wurde.

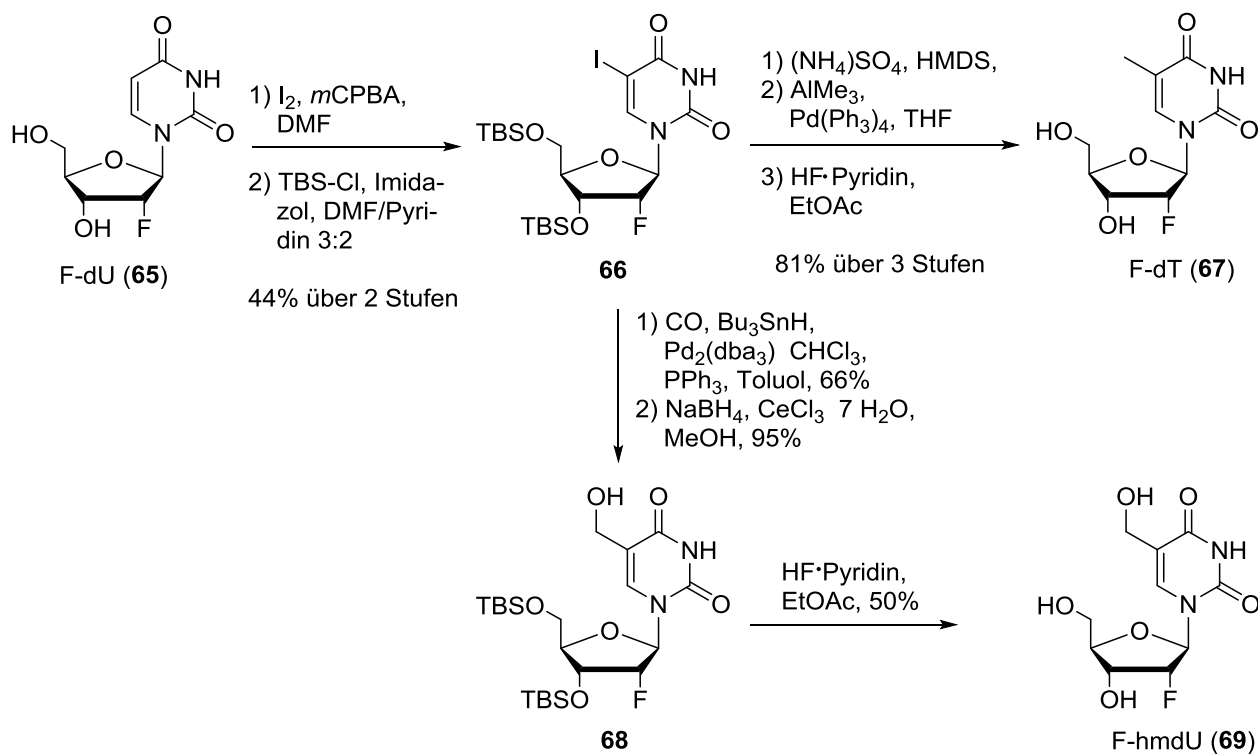
Da die finale Verseifung aufgrund des alkalischen Milieus zu F-dC als Produkt einer Decarboxylierung führt (bis zu 10%), wurde die Verwendung von TBS-OH in Toluol in der Pd<sup>0</sup>-vermittelten CO-Insertion in Erwägung gezogen. Der so entstehende TBS-Ester wäre in der obligatorischen Silyl-Entschätzung danach gespalten worden. Allerdings konnte bei Durchführung der Reaktion ausschließlich Edukt isoliert werden. Sehr wahrscheinlich ist TBS-OH sterisch zu anspruchsvoll und besitzt eine zu geringe Nukleophilie um mit dem Pallado-Intermediat zu reagieren. Die Verwendung von 2-(Trimethylsilyl)ethanol könnte zukünftig eine vielversprechende Alternative darstellen.<sup>[213]</sup>

Für massenspektrometrische Quantifizierungsstudien wurden zusätzlich die Nukleoside F-dT (**67**) und F-hmdU (**69**) benötigt. Dabei wurde analog der Synthesestrategie in **Schema 11** vorgegangen, wobei F-dU (**65**) als kommerziell erhältliches Startmaterial verwendet wurde.

Zunächst wurde F-dU (**65**) an C5-Position iodiert und anschließend die freien Hydroxygruppen mit TBS-Cl als Silylether geschützt. Dies resultierte in 44% Ausbeute über zwei Stufen in TBS-geschütztem F-IdU **66**.

Für die Synthese von F-dT (**67**) wurde **66** zunächst mit HMDS umgesetzt und danach mit Trimethylaluminium an C5-Position methyliert. Die anschließende Silyl-Entschätzung mit *Olah's* Reagenz lieferte F-dT (**67**) in sehr guten Ausbeuten von 81% über drei Stufen.

Wurde hingegen das iodierte F-dU-Derivat **66** einer carbonylierenden *Stille*-Kupplung unterzogen und die so entstandene Formylgruppe unter *Luche*-Bedingungen reduziert, so wurde das F-hmdU-Derivat **68** erhalten. Die nachfolgende Silyl-Entschätzung resultierte in F-hmdU (**69**).



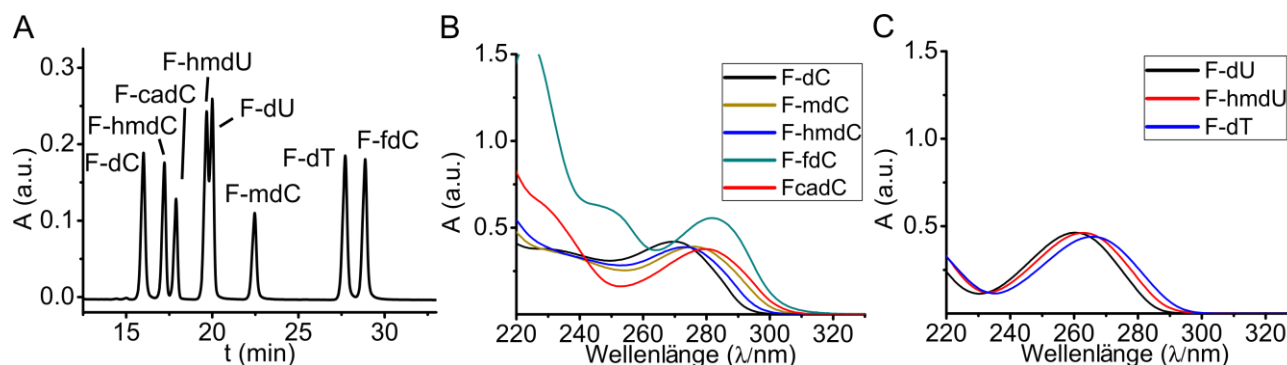
**Schema 18:** Ausgehend von F-dU (**65**) konnten unter Anwendung verschiedener Synthesewege die Nucleoside F-dT (**67**) und F-hmdU (**69**) erhalten werden.

Zusammenfassend konnten auf der Basis einer hoch divergenten Synthesestrategie sechs verschiedene 2'-fluorierte Nucleoside in jeweils maximal fünf Stufen ausgehend von nur zwei unterschiedlichen, kommerziell erworbenen Startverbindungen (F-dC und F-dU) erhalten werden. Diese wurden im weiteren Verlauf für biochemische Experimente, zellbiologische Verfütterungsstudien sowie für die massenspektrometrische Quantifizierung verwendet. Zunächst wurden die synthetisierten Nucleoside jedoch eingehend per HPLC und UV/VIS charakterisiert.

## 6.5 Charakterisierung fluorierte Nucleoside

Für eine vergleichende Analyse des HPLC-Retentionsverhalten wurden die fluorierten Nucleoside zu einem "Mastermix" von je  $90 \mu M$  vermischt. Das HPL-Chromatogramm ist in **Abbildung 21A** gezeigt. Dabei ist ersichtlich, dass die Uracil-Derivate aufgrund der nicht vorhandenen, hydrophilen C4-Aminogruppe deutlich langsamer eluieren als die entsprechenden Cytosin-Derivate. Bemerkenswert ist auch, dass F-fdC im Vergleich zu den anderen F-dC-Derivaten deutlich stärker mit der stationären Phase wechselwirkt. Eventuell ist hierfür eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem exozyklischen Amin und dem Aldehyd verantwortlich, welche bereits von Münzel *et al.* anhand einer Kristallstruktur beobachtet wurde.<sup>[83]</sup> Dadurch wäre die Hydrophilie des Amins herabge-

setzt und das Nukleosid würde langsamer eluieren. Die Informationen aus dem HPLC-Retentionsverhalten konnten für die Entwicklung einer massenspektrometrischen Quantifizierungsmethode durch *J. Steinbacher* und *K. Iwan* verwendet werden.



**Abbildung 21:** Charakterisierung fluorierte Nucleoside. A) Umkehrphasen-HPL-Chromatogramm eines Gemisches aller vorhandener 2'-fluorierte Nucleoside (90  $\mu\text{M}$ , 0-16% Puffer B in 45 min). B) UV/VIS-Spektren aller F-dC basierender Nucleoside (50  $\mu\text{M}$ ). C) UV/VIS Spektren aller F-dU basierender Nucleoside (50  $\mu\text{M}$ ).

Zur Konzentrationsbestimmung von ODN in Lösung wird deren Extinktionskoeffizient  $\epsilon$  bei 260 nm benötigt. Dieser berechnet sich annähernd als die Summe der Extinktionskoeffizienten der in der ODN-Sequenz enthaltenen Nucleoside.

Aus diesem Grund wurde von allen synthetisierten F-Nucleosiden das UV/VIS-Spektrum in Wasser aufgenommen und deren Extinktionskoeffizient  $\epsilon$  bestimmt.

**Abbildung 21B** und **C** zeigen die UV/VIS-Spektren der jeweiligen F-Nucleoside. Für die auf F-dC basierenden Nucleoside (**Abbildung 21B**) ist mit Ausnahme von F-fdC eine nur kleine bathochrome Verschiebung aufgrund der C5-Modifikation erkennbar. Die Formylgruppe in F-fdC bewirkt jedoch eine mit 12 nm bezüglich F-dC große bathochrome Verschiebung. Dies deutet auf eine stark veränderte elektronische Eigenschaft hin, was zu einem andersartigen Reaktionsverhalten dieses Nucleosids beitragen könnte, z.B. im Rahmen einer aktiven Demethylierung.

Im Falle der auf F-dU basierenden Nucleoside (**Abbildung 21C**) sind nur kleine bathochrome Verschiebung aufgrund der C5-Modifikation detektierbar.

Die molaren dekadischen Extinktionskoeffizienten  $\epsilon$  bei 260 nm sowie die Absorptionsmaxima im Bereich 260-300 nm der verschiedenen Nucleoside sind in **Tabelle 1** gelistet. Zusätzlich wurden die Extinktionskoeffizienten mit den nicht fluorierten Nucleosiden (2'-H-Nucleoside) verglichen.<sup>[177]</sup>

**Tabelle 1:** Extinktionskoeffizienten  $\epsilon_{260\text{ nm}}$  und Absorptionsmaxima  $\lambda_{\text{max}}$  der vorhandenen 2'-F-Nukleoside in Wasser (n.b. = nicht bekannt).

Nr.	Nukleosid	$\epsilon_{260\text{ nm}} / \text{L}\cdot\text{mmol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$	$\epsilon_{260\text{ nm}} / \text{L}\cdot\text{mmol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (2'-H)	$\lambda_{\text{max}} / \text{nm}$
1	F-dC (42)	7.2	7.1	270
2	F-mdC (61)	5.5	7.8	276
3	F-hmdC (63)	6.1	8.7	273
4	F-fdC (62)	8.1	11.3	282
5	F-cadC (64)	3.9	7.1	280
6	F-dU (65)	9.3	9.4	260
7	F-hmdU (69)	9.1	n.b.	263
8	F-dT (67)	8.4	8.4	266

Die Extinktionskoeffizienten  $\epsilon_{260\text{ nm}}$  zwischen F-dC, F-dU sowie F-dT und deren nicht fluorierten Analoga unterscheiden sich nur minimal. Diese Tatsache trifft für C5-modifizierte Nukleoside interessanterweise nicht zu. Aufgrund der 2'-F-Substitution wird eine bathochrome Verschiebung der Absorptionsmaxima jenseits von 260 nm beobachtet. Daraus folgt, dass die Bestimmung des Extinktionskoeffizienten  $\epsilon_{260\text{ nm}}$  nicht im Maximum, sondern in der Steigung zum Maximum oder im Extremfall im Minimum des Absorptionsspektrums erfolgt. Hierdurch resultieren die im Vergleich zu den 2'-H substituierten Nukleosiden niedrigeren Extinktionskoeffizienten  $\epsilon_{260\text{ nm}}$ .

## 6.6 Synthese isotopenmarkierter, fluoriertes Nukleoside

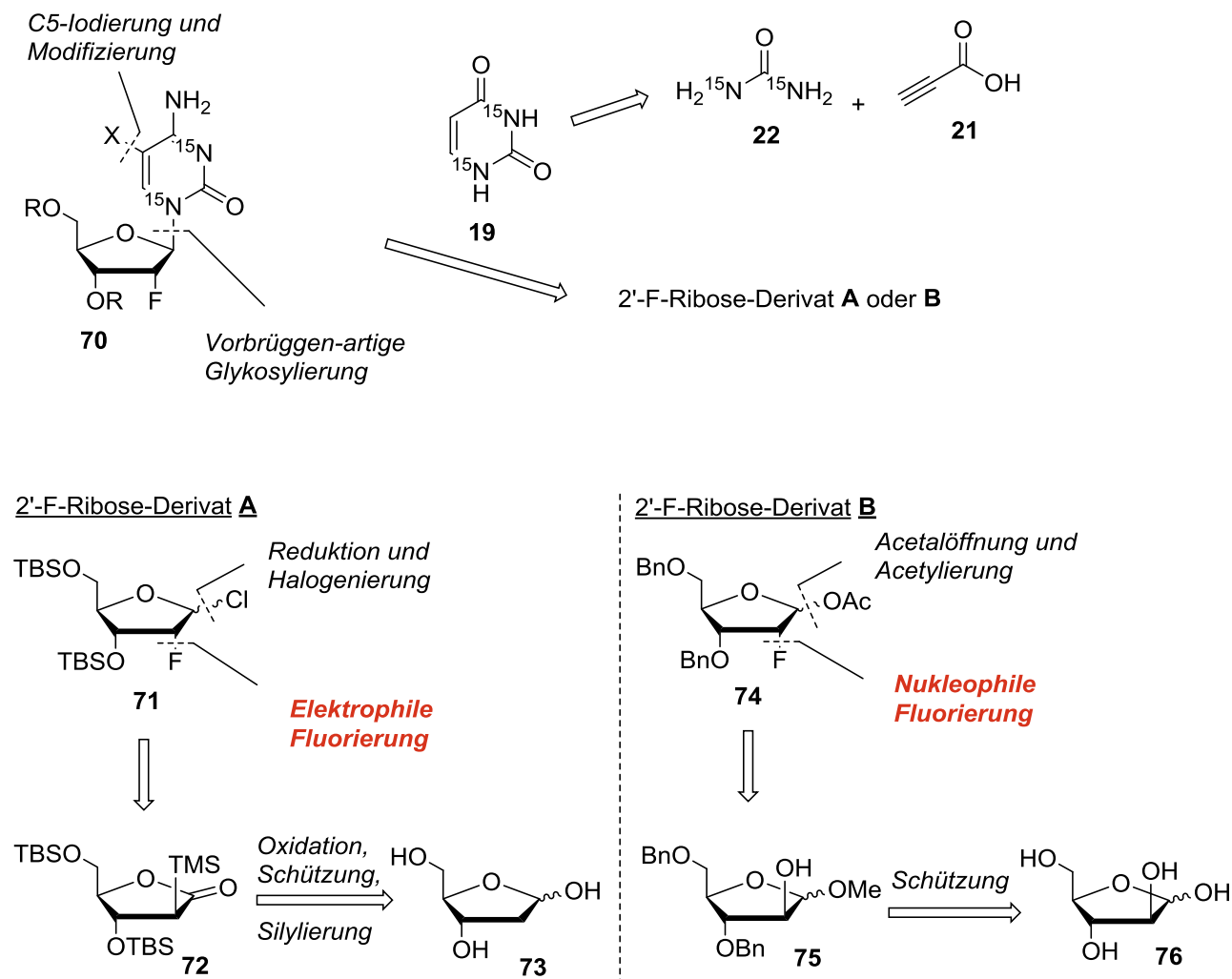
Da die massenspektrometrische Quantifizierung von Nukleosiden mit Hilfe isotopenmarkierter Referenzverbindungen diverse Vorteile hat, sollten die entsprechenden Isotopologen der F-Nukleoside synthetisiert werden.

Die retrosynthetische Analyse für die isotopenmarkierten F-dC-Derivate **70** ist in **Schema 19** dargestellt.

Zum Erhalt von C5-modifizierten F-dC-Derivaten **70** kann nach der oben beschriebenen Synthesestrategie (**Schema 11**, Iodierung und nachfolgende C5-Modifizierung) vorgegangen werden. Die  $^{15}\text{N}_2$ -Isotopenmarkierung in F-dC-Derivate kann durch eine Glykosylierungsreaktion unter *Vorbrücken*-Bedingungen mit  $^{15}\text{N}_2$ -Uracil **19** und einem 2'-F-Ribofuranose-Derivat erhalten werden. Das  $^{15}\text{N}_2$ -Uracil **19** kann hierzu in einer literaturbekannten Zyklisierungsreaktion aus isotopenmarkierten  $^{15}\text{N}_2$ -Harnstoff und Propiolsäure hergestellt werden.<sup>[176]</sup> Eine erfolgreiche Glykosylierung-

sreaktion von 2'-F-Ribofuranose-Derivat **74** mit Uracil wurde in einem Patent beschrieben.<sup>[214]</sup>

Für die Synthese eines 2'-F-Ribofuranose-Derivats sind zwei Alternativen (A **71** und B **74**) literaturbekannt, die sich in der 3'- und 5'-Hydroxyl-Schutzgruppe sowie in der Abgangsgruppe an 1'-Position unterscheiden (siehe **Schema 19**).

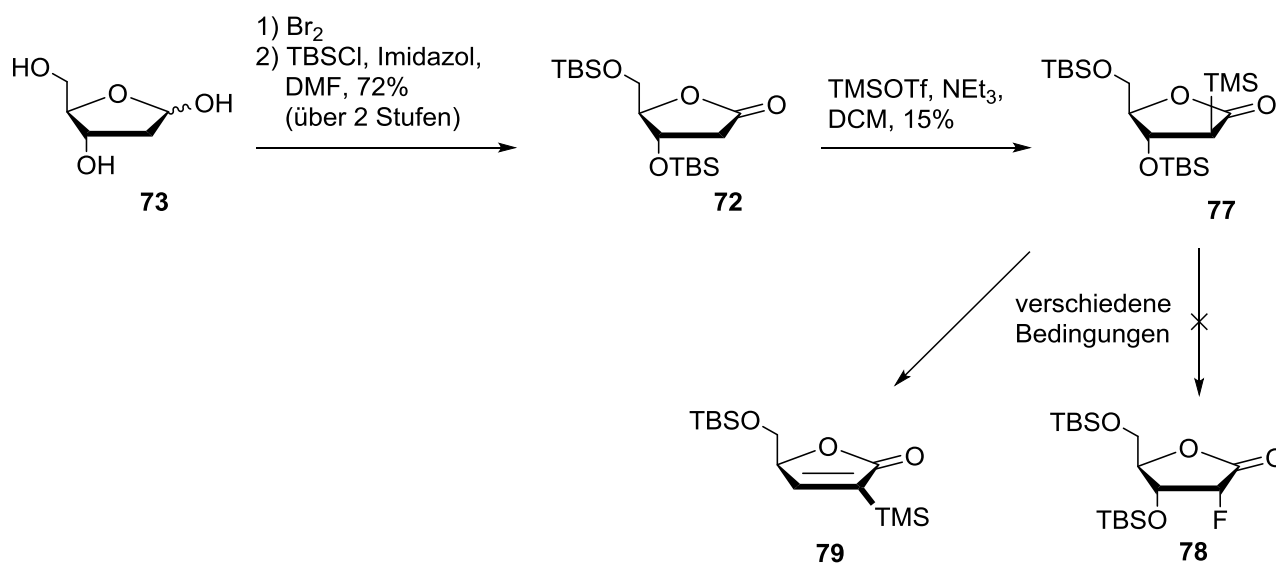


**Schema 19:** Retrosynthetische Analyse zur Darstellung isotopenmarkierter 2'-F-Nucleoside **70**.

*Cen et al.* beschrieben 2009 hierzu die Synthese von 2'-F-Ribofuranose-Derivat A **71** ausgehend von 2'-Desoxyribose (**73**) in sechs Stufen.<sup>[215]</sup> Die Brom-Oxidation von 2'-Desoxyribose (**73**), TBS-Schützung der 3'- und 5'-Hydroxygruppen sowie 2'-Silylierung mit TMSOTf und Triethylamin resultierte aufgrund sterischer Aspekte diastereoselektiv in Lacton **72**. Zur elektrophilen Fluorierung wurde zunächst das Lacton **72** an C2-Position mit LHMDS deprotoniert und anschließend mit *Selectfluor*® fluoriert. Die Autoren konnten 2'-F-Ribofuranose-Derivat A **71** nach 1'-Reduktion mit DIBAL-H und Chlorierung mittels Methansulfonylchlorid erhalten.

Des Weiteren präsentierten *Larsen et al.* die Synthese von 2'-F-Ribofuranose-Derivat **74** ausgehend von D-Arabinose (**76**) in acht Stufen.<sup>[216]</sup> In einer Umschüttungskaskade konnte D-Arabinose (**76**) in vier Stufen in das Glykosid **75** umgewandelt werden. Nach Triflatschätzung der freien 2'-Hydroxygruppe erfolgte die nukleophile S<sub>N</sub>2-Fluorierung unter *Walden*-Umkehr mit TBAF als Fluoridquelle. Die Öffnung des Acetals und die nachfolgende Acetylierung der 1'-Hydroxygruppe resultierten in 2'-F-Ribofuranose-Derivat **74**.

Aufgrund der kürzeren Syntheseroute wurde zunächst die elektrophile Fluorierung in Anlehnung an die Vorschrift von *Cen et al.* erprobt (siehe **Schema 20**).

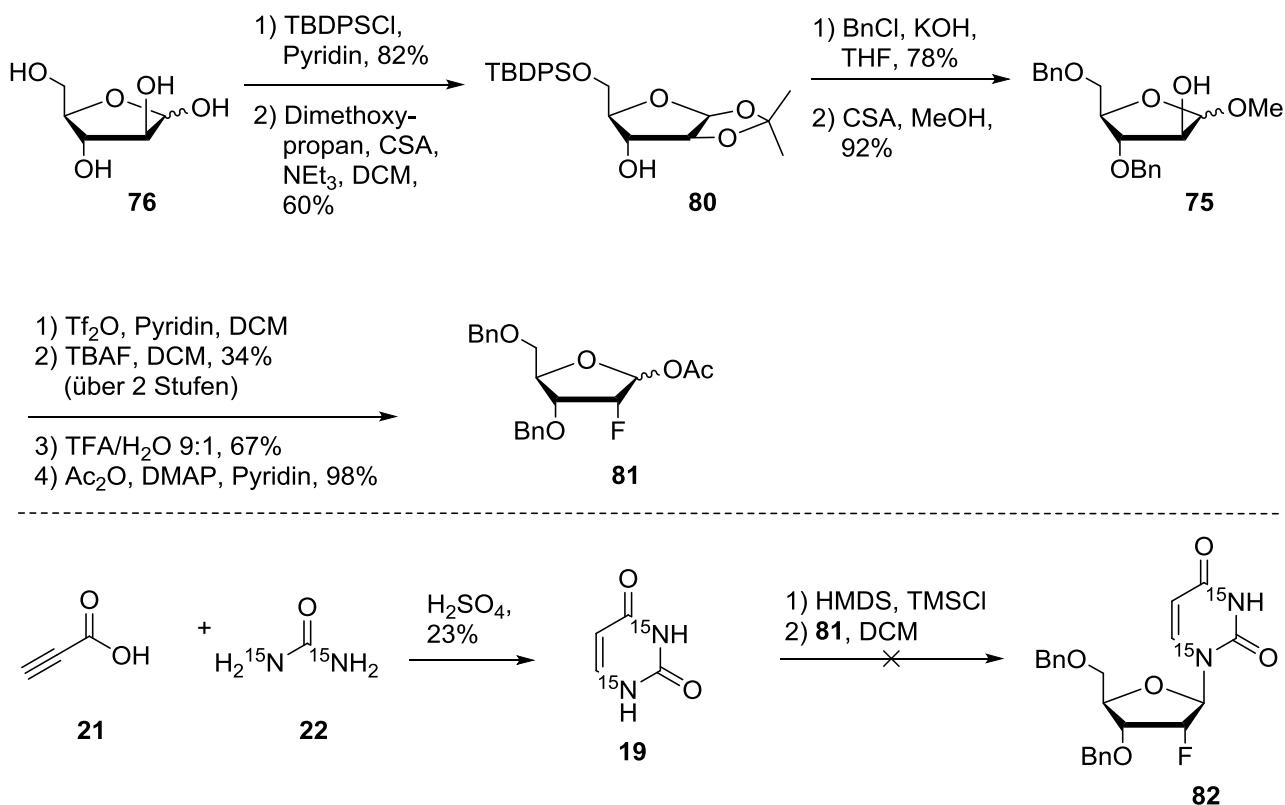


**Schema 20:** Versuch der Darstellung des 2'-fluorierten Laktons **78** via elektrophiler Fluorierung nach *Cen et al.* Die Fluorierung konnte allerdings trotz verschiedener Versuche nicht reproduziert werden.

Die Synthese des Laktons **72** erfolgte mittels Brom-Oxidation und TBS-Schätzung mit guten Ausbeuten (72% über zwei Stufen). Die folgende Umsetzung mit TMSOTf unter basischen Bedingungen lieferte das Lakton **77**, welches entgegen der Literaturangabe während der säulenchromatografischen Aufreinigung nicht stabil war. Es konnten maximal 15% des Produktes **77** und 75% des Eduktes **72** isoliert werden. Aus diesem Grund wurde das Rohprodukt nach kurzer, wässriger Aufarbeitung direkt mit LHMDs und *Selectfluor*® umgesetzt. Hierbei sollte zunächst in  $\beta$ -Position zum Lakton deprotoniert und anschließend stereoselektiv mit *Selectfluor*® elektrophil zu Lakton **78** fluoriert werden. Jedoch konnte auch nach Verwendung einer stärkeren Base (LDA) sowie *N*-Fluorbenzolsulfonimid als elektrophiles Fluorierungsreagenz keinerlei Produktbildung detektiert werden. Vielmehr konnte neben dem Zwischenprodukt **77** auch das Edukt **72** und das Eliminierungsprodukt **79** isoliert werden. Die von *Cen et al.* beschriebene Reaktion der elektrophilen Fluor-

rierung konnte somit weder unter den beschriebenen noch unter modifizierten Bedingungen reproduziert werden.

Da die Synthese von 2'-F-Ribofuranose-Derivat **A 71** nicht möglich war, wurde sich auf die Darstellung von 2'-F-Ribofuranose-Derivat **B 74** nach *Larsen et al.* fokussiert (siehe **Schema 21**). Hierzu wurde in vier Stufen ausgehend von D-Arabinose (**76**) in einer Umschützungskaskade das Glykosid **75** in 35% Ausbeute über vier Stufen erhalten. Die Reaktionskaskade ist notwendig um die 2'-Hydroxygruppe ungeschützt zu erhalten. Nach dessen Umwandlung in eine Abgangsgruppe mit Triflatanhydrid, erfolgte die nukleophile Fluorierung mit TBAF in 34% über zwei Stufen. Die Verwendung von Diethylaminschwefeltrifluorid (DAST) als Fluorierungsreagenz erbrachte keine Ausbeutensteigerung. Zudem wurde eine 2'-Racemisierung, wahrscheinlich hervorgerufen durch ionische Intermediate, beobachtet.<sup>[217]</sup> Die nachfolgende saure Acetalspaltung und Veresterung der 1'-Position unter *Steglich*-Bedingungen resultierte im 2'-F-Glykosid **81**. Parallel konnte das <sup>15</sup>N<sub>2</sub>-Uracil **19** in Anlehnung an die Vorschriften von *Hill et al.* in 23% Ausbeute erhalten werden.<sup>[176]</sup>



**Schema 21:** Versuch der Darstellung von isotopenmarkiertem F-dU **82** via nukleophiler Fluorierung. In der finalen Glykosylierungsreaktion unter *Vorbrüggen*-Bedingungen konnte jedoch keine Produktbildung beobachtet werden.

Die *Vorbrüggen*-artige Glykosylierungsreaktion des acetylierten Zuckers **81** mit Uracil **19** ergab entgegen der Patentvorschrift keine Umsetzung.<sup>[78,218]</sup> Auch die Zugabe von Zinntetrachlorid zur Aktivierung des anomeren Kohlenstoffs führte nicht zu einer Reaktion.<sup>[219]</sup> Möglicherweise ist der acetylierte Zucker **81** ein zu schwaches Elektrophil. Eine Alternative ist die Verwendung des reaktiveren Chlorzuckers, welcher anstelle des Acetyl-Substituenten ein Chlorid besitzt. Hierzu müsste in der letzten Stufe zu **81** lediglich Methansulfonylchlorid anstatt Acetanhydrid als Reagenz verwendet werden.

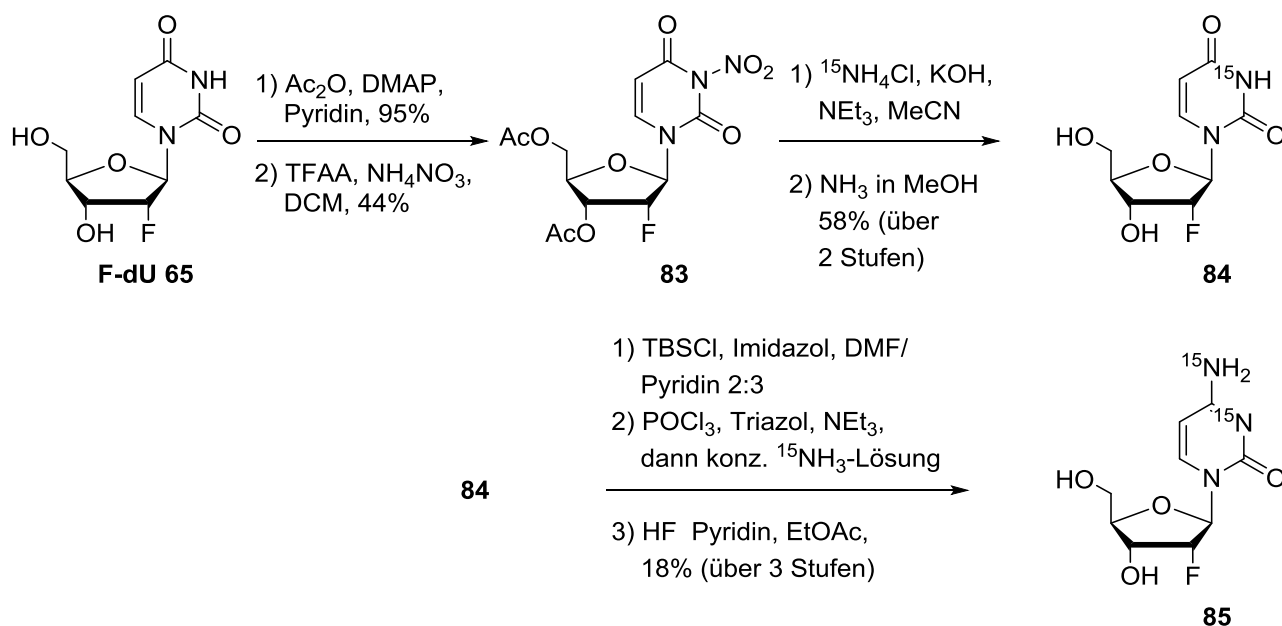
Ein weiteres Problem waren die Benzyl-Schutzgruppen an 3'- und 5'-Position. Diese konnten in einer Testreaktion mit der Lewis-Säure BCl<sub>3</sub> entgegen der Literaturangabe nicht vollständig entfernt werden.<sup>[214]</sup> Vielmehr wurde eine Einfach-Entschützung und die Zersetzung des Nucleosids beobachtet. Möglicherweise kann in Zukunft die Benzylschützung durch 5'-Silylentschützung von **80** mit HF in Pyridin und nachfolgender Umsetzung der 3'- und 5'-Hydroxygruppen mit Toluoylchlorid umgangen werden.

Aufgrund der beschriebenen Probleme in der Fluorierung und Glykosylierung wurde eine komplett andere Syntheseroute in Betracht gezogen. 1995 beschrieben *Ariza et. al* eine direkte Methode zur Einführung einer Isotopenmarkierung in N3-Position des Pyrimidin-Rings (siehe **Schema 22**). Unter Verwendung von Trifluoressigsäureanhydrid und Ammoniumnitrat erfolgte zunächst eine N3-Nitrierung von Uracil.<sup>[220,221]</sup> Die nachfolgende Umsetzung mit isotopenmarkierten Ammoniumchlorid führt in einer Ringöffnungs-Ringschluss-Reaktion aufgrund der stark elektronenziehenden Nitro-Gruppe zum gewünschten <sup>15</sup>N-Uracil und Nitramid (HNNO<sub>2</sub><sup>-</sup>), welches spontan in Distickstoffmonoxid (N<sub>2</sub>O) zerfällt.<sup>[222]</sup>

Vorteil dieser Reaktion ist der sehr kurze Syntheseweg zu <sup>15</sup>N<sub>2</sub>-F-dC in lediglich sieben Stufen ausgehend von kommerziell erhältlichen F-dU. Nachteilig ist allerdings, dass lediglich N3 und das exozyklische Amin des Pyrimidins isotopenmarkiert werden können. Im Falle von F-dT und F-dU-Derivaten kann daher nur einfach isotopenmarkiert werden, was für die massenspektrometrische Quantifizierung zu wenig ist. Jedoch war zunächst die Entwicklung einer geeigneten Syntheseroute zu <sup>15</sup>N<sub>2</sub>-F-dC-Derivaten von Bedeutung.

Die 3'- und 5'-Hydroxygruppen von F-dU **65** wurde unter *Steglich*-Bedingungen mit Acetanhydrid verestert (siehe **Schema 22**). Basierend auf der Vorschrift von *Ariza et. al* erfolgte die N-Nitrierung mit akzeptablen Ausbeuten von 44%. Die folgende Umsetzung mit <sup>15</sup>N-Ammoniumchlorid sowie Verseifung resultierte in <sup>15</sup>N-F-dU **84**.





**Schema 22:** Darstellung von isotopenmarkiertem <sup>15</sup>N-F-dU **84** und <sup>15</sup>N<sub>2</sub>-F-dC **85**. Schlüsselschritt ist die Austauschreaktion des Stickstoffs N3 durch dessen Nitrierung und die folgende Ringöffnungs-Ringschluss-Reaktion mit isotopenmarkiertem Ammoniumchlorid (<sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl).

Für die Darstellung von <sup>15</sup>N<sub>2</sub>-F-dC **85** wurde das einfach markierte <sup>15</sup>N-F-dU **84** zunächst mit TBS-Cl Silyl-geschützt, danach die Position C4 unter Verwendung einer konzentrierten <sup>15</sup>NH<sub>3</sub>-Lösung aminiert und schließlich das freie Nucleosid durch Umsetzung mit *Olah's* Reagenz erhalten. Eine Silyl-Schätzung bereits zu Beginn der Synthese war aufgrund der Instabilität gegenüber den sauren Nitrierungsbedingungen nicht möglich.

Zusammenfassend konnten erstmals die isotopenmarkierten Nucleoside <sup>15</sup>N<sub>2</sub>-F-dC **85** und <sup>15</sup>N-F-dU **84** isoliert werden. Die Isotopenreinheit konnte massenspektrometrisch auf über 95% bestimmt werden. Basierend auf dieser Syntheseroute können in Zukunft die weiteren Synthesen der epigenetisch relevanten <sup>15</sup>N<sub>2</sub>-F-dC-Derivate analog der Synthesestrategie in **Schema 11** (siehe S. 48) entwickelt werden.

## 6.7 Synthese von F-Analoga der epigenetisch relevanten Nucleosid-Triphosphate und deren Einbau in Oligonucleotide mittels PCR

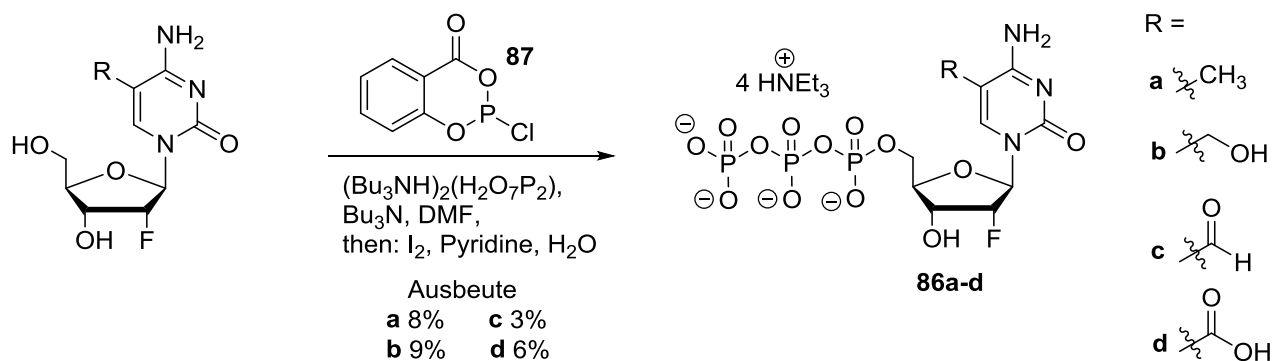
In Kapitel 6.2 wurde die Synthese der Phosphoramidit-Bausteine von F-mdC, F-hmdC, F-fdC und F-cadC (F-xdC) beschrieben, welche deren sequenzspezifischen Einbau mittels Festphasensynthese in ein Oligonucleotid ermöglichen. Zur Aufklärung möglicher biologischer Funktionen der epigenetisch relevanten Nucleoside (xdC) wird nach Proteinen gesucht, die mit diesen Nucleosiden intera-

gieren. Hierfür werden allerdings deutlich längere ODN (> 70mer), die mehrere xdc-Nukleoside enthalten, benötigt. Die Synthese solcher ODN ist nur mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) sowie der Verwendung der entsprechenden xdc-Triphosphate (xdcCTP) anstelle des dCTP möglich.<sup>[223]</sup>

Für umfangreichere Untersuchungen zur aktiven Demethylierung mit 2'-F-Nukleosiden wurden daher zusätzlich längere, F-haltige ODN benötigt. Für dessen Synthese sollten die entsprechenden F-xdcCTP synthetisiert werden. Zu Beginn dieser Arbeit war bis auf das kommerziell erhältliche F-dCTP die Synthese der F-Triphosphate der epigenetisch relevanten Nukleoside unbekannt. Ferner waren Polymerasen literaturbekannt, die F-dCTP effizient in ODN einbauten.<sup>[224]</sup>

Die Synthese der F-xdcCTP **86a-d** erfolgte ausgehend von den entsprechenden Nukleosiden unter modifizierten *Eckstein*-Bedingungen in einer Stufe in guten Ausbeuten (siehe **Schema 23**).<sup>[223,225,226]</sup>

Das Reagenz Salicylchlorophosphit **87** wurde von *S. Serdjukow* (AK Carell) zur Verfügung gestellt.



**Schema 23:** Herstellung der Triphosphate **86a-d** der fluorierten Analoga der epigenetisch relevanten Nukleoside unter modifizierten *Eckstein*-Bedingungen.

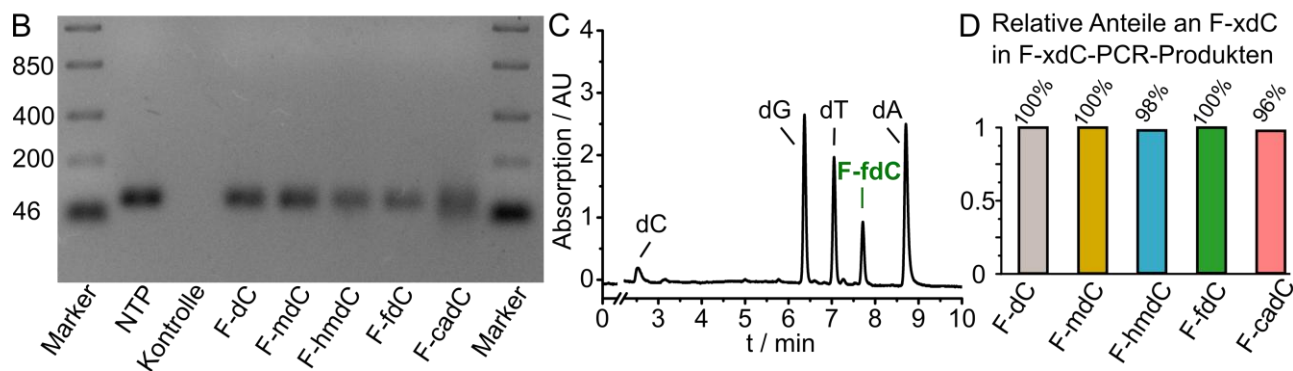
Zur Überprüfung, ob die synthetisierten fluorierten Triphosphate sowie das kommerziell erhältliche F-dC tatsächlich mittels PCR in ein DNA-Fragment eingebaut werden können, wurde zunächst eine *Primer-Extension*-Studie durchgeführt. Es zeigte sich, dass die DNA-Polymerase *Phusion* bis auf F-cadC alle Triphosphate einbaut. Dies ist sehr beachtlich, da diese DNA-Polymerase eine *proof-reading*-Einheit enthält und somit die nicht-kanonischen fluorierten Nukleoside als Schaden hätte erkennen und wieder entfernen können. Der Einbau von F-hmdC und F-fdC konnte durch die Verwendung der Polymerase *KOD-XL* weiter verbessert, der Einbau von F-cadC durch die *Thermi-nator*-Polymerase ermöglicht werden.

Mit den synthetisierten Triphosphaten und dem Wissen, welche Polymerasen geeignet sind, konnten nun Bedingungen für eine PCR gesucht werden. Als DNA-Templat wurde ein Ausschnitt der Sequenz des Oct4-Promoters gewählt (siehe **Abbildung 22A**). Diese Sequenz ist bekannt für eine ho-

he Dichte an epigenetisch relevanten Nukleosiden und gilt aufgrund des hohen CpG-Gehalts als besonders schwieriges Templat für eine PCR. Die Primer wurden so gewählt, dass das finale PCR-Produkt 81 Basenpaare (je nach Primer 15-16 F-xdCs) besaß.

Bemerkenswerterweise konnte bereits unter Standard-PCR-Bedingungen für alle F-xdC-Triphosphate das Vollängen-PCR-Produkt erhalten werden (siehe **Abbildung 22B**). Im Falle des F-cadC-haltigen Produkts ist ein leichtes "Schmierern" erkennbar, dass auf die zusätzlichen Carboxygruppen und die dadurch veränderte Elektromobilität zurückzuführen ist.

**A Templat:** 5' - d(GTG GTT AGT GTC TAA TCT ACC AAC CTG GAC AAC ACA AGA TGG AAT ACT GTG CTC TGA AAA CGC AGA GCC AGC ACT TCT CTG) - 3'  
**Primer FW:** 5' - d(GTG GTT AGT GTC TAA TCT ACC AAC) - 3'  
**Primer RV:** 5' - d(CAG AGA AGT GCT GGC TC) - 3'



**Abbildung 22:** Synthese von F-xdC-haltigen ODN mittels PCR. A) Sequenzen des Templats und der Primer für die PCR-Studie. B) Ergebnis der PCR mit F-xdC-Triphosphaten analysiert mittels Gelelektrophorese. Die Retention der Banden entspricht den erwarteten PCR-Produkten. (Kontrolle = PCR mit allen dNTPs, aber ohne Polymerase. F-dC, F-mdC, F-hmdC, F-fdC, F-cadC = PCR mit allen dNTPs außer dCTP, aber mit entsprechendem F-xdCTP). C) UHPL-Chromatogramm nach Verdau des F-fdC-PCR-Produkts. D) Relative Quantifizierungsdaten nach Verdau der PCR-Produkte der entsprechenden Nucleoside.

Die weitere Überprüfung der richtigen Inkorporation erfolgte per LC-MS. Hierzu wurden die PCR-Produkte zunächst durch *E. Parsa* (AK Carell) mittels enzymatischem Verdau in die einzelnen Nucleoside zerlegt. Die PCR-Proben wurden hierfür mit der *Nuklease S1* sowie der *Antarctic Phosphatase* inkubiert. Bei der *Nuklease S1* handelte es sich um eine vom *Aspergillus oryzae* stammende Endonuklease, die einzelsträngige DNA oder RNA durch Hydrolyse des Phosphodiester in Oligo- bzw. Mononucleotide umwandelt.<sup>[167]</sup> Die *Antarctic Phosphatase* hingegen katalysierte die 5'-Dephosphorylierung von Oligo- bzw. Mononucleotide.<sup>[168]</sup> Zur vollständige Umsetzung zu den einzelnen Nucleosiden erfolgte im zweiten Schritt die Inkubation mit der *Snake venom Phosphodiesterase I*, einer Exonuklease, die vorwiegend 5'-Phosphatester von Oligonucleotiden hydrolysiert.<sup>[169]</sup> Die nachfolgende UHPLC-MS/MS (QQQ)-Analyse durch *K. Iwan* (AK Carell) zeigte im UV-

Chromatogramm nur die Signale der zu erwartenden Nucleoside (siehe **Abbildung 22C**). Des Weiteren wurden die relativen Mengen der fluorierten Basen zueinander bestimmt (siehe **Abbildung 22D**). Auch hier konnte der richtige Einbau der Nucleoside nachgewiesen werden. Für die F-dC-, F-mdC- und F-fdC-PCR-Produkte konnten ausschließlich die erwarteten Nucleoside detektiert werden. Für die PCR-Produkte ausgehend von hmdCTP und F-cadCTP konnten die jeweiligen Nucleoside zu 98% und 96% quantifiziert werden. Bei beiden konnten minimale Mengen an F-dC aufgrund von Edukt-Verunreinigung in der Synthese zum Triphosphat detektiert werden.

Die Synthese längerer Oligonucleotide, die F-xdC enthalten, ist somit durch PCR ohne weiteres möglich. Besonders wichtig ist die Tatsache, dass die 2'-Fluor-Substitution die Aktivität der Polymerase nicht auffallend beeinträchtigt. Dies ist ein erstes Indiz, dass die 2'-Fluor-Substitution weitreichende biochemische Untersuchungen im Rahmen der aktiven Demethylierung ermöglichen könnte ohne dabei das biologische System zu stören. In weiteren epigenetisch relevanten Experimenten, nämlich die Untersuchungen der C5-Methylierung und der TET-Enzym abhängigen Oxidation, sollte diese Hypothese manifestiert werden.

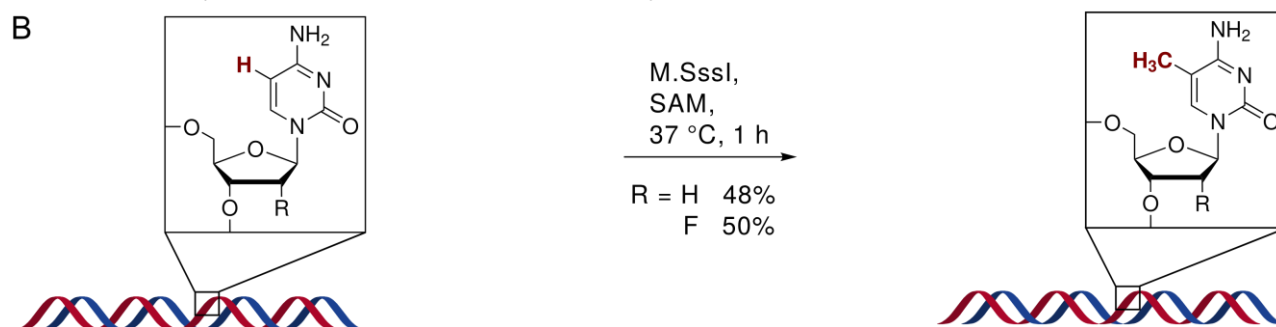
### **6.8 Biochemische und zellbiologische Untersuchungen mit fluorierten Cytidinderivaten**

In der PCR-basierten Synthese längerer, F-xdC-haltiger Oligonucleotide konnte keine Beeinträchtigung der Aktivität der Polymerase aufgrund der 2'-Fluor-Substitution beobachtet werden. Im weiteren Verlauf dieses Projektes sollte nun gezeigt werden, dass auch im Rahmen epigenetisch relevanter Studien in biologischen Systemen die 2'-Fluor-Substitution kaum einen negativen Einfluss ausübt. Aus diesem Grund wurden zwei weitere Experimente, die C5-Methylierung von F-dC mit der Methyltransferase M.SssI sowie die TET-Enzym vermittelte Oxidation von F-mdC durchgeführt. Diese wurden gewählt, da beide Reaktionen wesentlicher Bestandteil der epigenetischen Methylierungs-/Demethylierungskaskade sind.<sup>[33]</sup> Wird in beiden Experimenten keine bzw. kaum eine Beeinträchtigung der Enzymaktivität durch die 2'-Fluor-Substitution beobachtet, kann davon ausgegangen werden, dass die F-xdC-Nucleoside geeignete Werkzeuge zur Aufklärung der aktiven Demethylierung sind.

### 6.8.1 Methylierung mit Methyltransferase M.SssI

Im ersten Experiment wurden zwei unterschiedliche DNA-Fragmente mit der Methyltransferase M.SssI und dem Cosubstrat SAM umgesetzt (siehe **Abbildung 23**). M.SssI methyliert sequenzspezifisch Cytosine, welche im epigenetischen CpG-Kontext vorliegen und gilt daher für dieses Experiment als adäquater Ersatz für das Enzym DNMT. Letzteres wurde aufgrund der schwierigen Isolierung und Aufreinigung nicht verwendet.

A **ODN16**: 5' - d(CCT ATG TTX GTA XGT TTG TCT C) - 3'      X = dC / F-dC  
3' - d(GGA TAC AAG CAT GCA AAC AGA G) - 5'



**Abbildung 23:** Durchführung des Methylierungs-Assays. A) Sequenz von **ODN16**. B) Schematischer Überblick des Experiments.

Die DNA-Sequenz wurde so gewählt, dass sie zwei CpG-Einheiten beinhalten. Es wurden zwei doppelsträngige ODNs verwendet. Das erste ODN besaß an der Position X jeweils Cytidin, das zweite ODN hingegen das fluorierte Analogon F-dC (siehe **Abbildung 23A**).

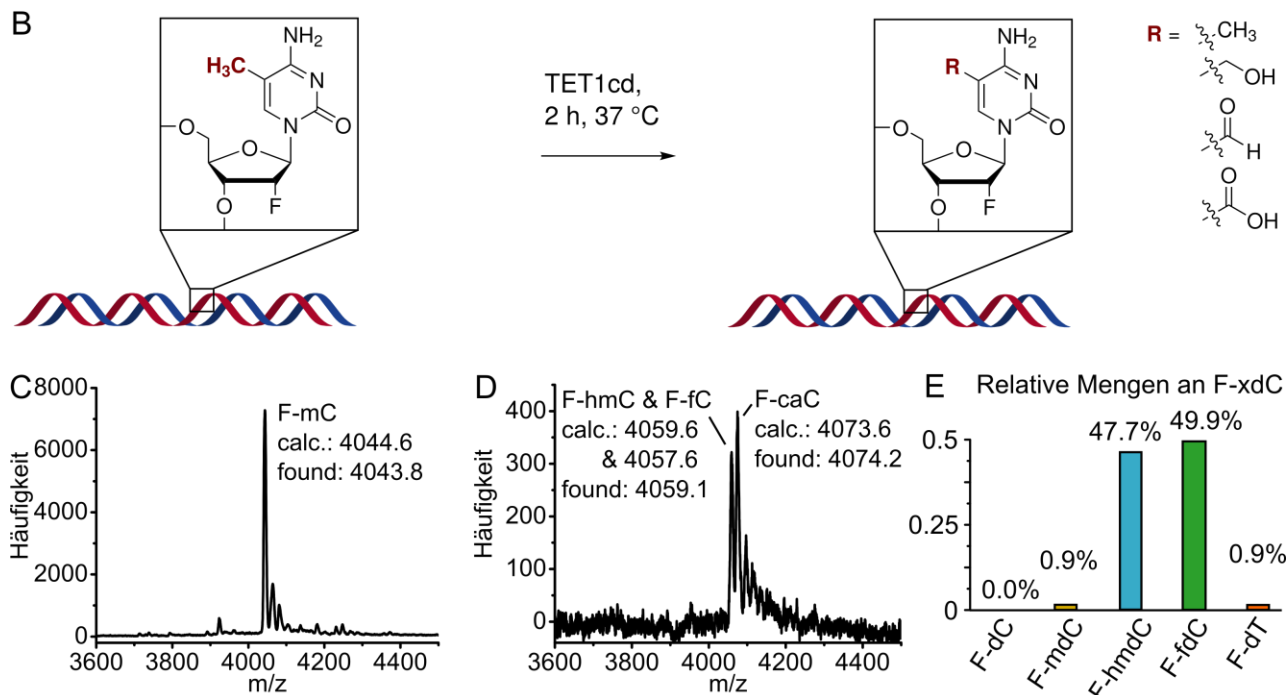
Beide ODN wurden drei Stunden mit M.SssI und dem Cosubstrat SAM inkubiert. Als Kontrolle wurde das gleiche Experiment, allerdings ohne M.SssI durchgeführt. Danach wurde die DNA isoliert, per Chloroform-Phenol-Extraktion gereinigt, vollständig zu den entsprechenden Nucleosiden verdaut (durchgeführt von *E. Parsa*, AK Carell) und per UHPLC-MS/MS (QQQ) massenspektrometrisch analysiert (durchgeführt von *K. Iwan*, AK Carell). Dabei wurde festgestellt, dass 48% aller Cytidine im CpG-Kontext methyliert wurden. Im Falle von F-dC wurden 50% methyliert. Aufgrund der sehr ähnlichen Methylierungseffizienz kann davon ausgegangen werden, dass die 2'-Fluor-Substitution die Aktivität der Methyltransferase M.SssI nicht beeinträchtigt.

### 6.8.2 TET1cd Oxidations-Assay

Im zweiten Experiment wurde ein F-mdC haltiges ODN mit der katalytischen Domäne des Enzyms TET1 (TET1cd) umgesetzt. In verschiedenen Experimenten mit mdC-haltigen Oligonucleotiden zeigte *E. Parsa* (AK Carell), dass TET1cd mdC effektiv zu dessen Oxidationsprodukten hmdC, fdC

und cadC umgesetzt. Bei Verwendung eines F-mdC haltigen ODN, wurde per MALDI-TOF die erfolgreiche Oxidation von F-mdC beobachtet (siehe **Abbildung 24A-D**). Neben F-hmdC- und F-fdC- wurde sogar das F-cadC-haltige ODN detektiert. Das Kontrolllexperiment ohne TET1cd zeigte lediglich das Edukt.

**A ODN17:** 5' - d(GTAATG F-mCGC TAG G) - 3'



**Abbildung 24:** Durchführung des Tet1cd-Oxidations-Assays. A) Sequenz von **ODN17**. B) Schematischer Überblick des Experiments. C) MALDI-TOF-Spektrum des Kontrolllexperiments, in dem kein TET1cd verwendet wurde und nur das Edukt zu beobachten ist. D) MALDI-TOF-Spektrum nach Umsetzung des F-mdC-haltigen ODNs mit TET1cd. Es sind die Oxidationsprodukte F-hmdC, F-fdC und F-cadC zu detektieren. E) Massenspektrometrische Quantifizierung der Produkte bestätigte die Oxidation von F-mdC durch TET1cd.

Der nachfolgende enzymatische Verdau zu den entsprechenden Nucleosiden sowie die massenspektrometrische Quantifizierung per UHPLC-MS/MS (QQQ) zeigten, dass das Edukt F-mdC bis auf 0.9% nahezu komplett umgesetzt wurde (siehe **Abbildung 24E**). Die relativen Anteile von F-hmdC und F-fdC betragen jeweils knapp unter 50%. F-caC-Nucleotide werden unter den verwendeten Verdau-Bedingungen nur zu 12.8% zum Nucleosid umgesetzt und wurden daher nicht quantifiziert. Aus den MALDI-TOF-Spektren ist jedoch zu erkennen, dass auch F-cadC ein wesentlicher Bestandteil der Produkte einer TET1cd-Oxidation von F-mdC ist. Eine Desaminierung von F-mdC zu F-dT war hingegen nur minimal zu detektieren (0.9%).

Zusammenfassend konnte in beiden *in vitro* Experimenten, Methylierung mit dem Enzym M.SssI und TET1cd vermittelte Oxidation, keine offensichtliche Beeinträchtigung der Aktivität epigenetisch relevanter Enzyme aufgrund der 2'-Fluor-Substitution beobachtet werden. Somit sind F-xdCs geeignete Werkzeuge für die Aufklärung der aktiven Demethylierung in biologischen Systemen.

### 6.8.3 Inkubation mit mESC-Lysat

Mit dem Hintergrundwissen, dass eine 2'-Fluor-Substitution an epigenetisch relevanten Nucleosiden mdC, hmdC, fdC und cadC eine Basenexzisionsreparatur unterbindet aber die Aktivität anderer Enzyme nicht messbar beeinflusst, konnten nun erstmalig zellbiologische Experimente zur Aufklärung der aktiven Demethylierung unternommen werden.

2012 konnten *Schiesser et al.* eine minimale Decarboxylierungsaktivität in mES-Zellkernextrakt gegenüber caC-haltiger ODN zeigen.<sup>[78]</sup> Hierzu wurde <sup>15</sup>N<sub>2</sub>-cadC-haltige ODN mit mES-Zellkernextrakt inkubiert, diese mittels einer zusätzlichen Biotin-Markierung danach isoliert, vollständig zu den entsprechenden Nucleosiden verdaut und letztere massenspektrometrisch quantifiziert. Erstmals war es möglich, kleinste Mengen des Decarboxylierungsprodukts <sup>15</sup>N<sub>2</sub>-dC zu detektieren, eine Quantifizierung war jedoch nicht möglich. In analoger Weise sollten diese Experimente mit fluorierten ODN wiederholt werden. Aufgrund der 2'-Fluor-Substitution und der damit einhergehenden Unterdrückung einer aktiven Demethylierung mittels BER, könnte eine Quantifizierung des Decarboxylierungsprodukts nun möglich sein. Für dieses Experiment wurde zusammen mit *E. Parsa* (AK Carell) F-fdC- und F-cadC-haltige ODN synthetisiert, mit mESC-Lysat inkubiert und diese nachfolgend massenspektrometrisch analysiert. Unter anderem wurde die Inkubationszeit zwischen einer und 19 Stunden, die ODN-Konzentration sowie Temperatur zwischen 35 und 40 °C variiert. Zusätzlich wurden verschiedene Konzentrationen an Vitamin C zur Erhöhung der TET-Aktivität erprobt. Jedoch konnte in insgesamt 42 unterschiedlichen Experimenten für F-fdC-haltige ODN keinerlei F-dC als Deformylierungsprodukt detektiert werden. Für F-cadC-haltige ODN konnten zwar 1-4% an F-dC als potentielles Produkt einer Decarboxylierung beobachtet werden, jedoch waren diese auch in den Kontrollansätzen vorhanden. Es stellte sich heraus, dass das kurzfristige Aufheizen von ODN auf 95 °C zur Biotinfreisetzung für die Decarboxylierung verantwortlich war. Somit konnte auch im Falle F-haltiger ODN keine Decarboxylierungsaktivität in mES-Zellkernextrakt nachgewiesen werden.

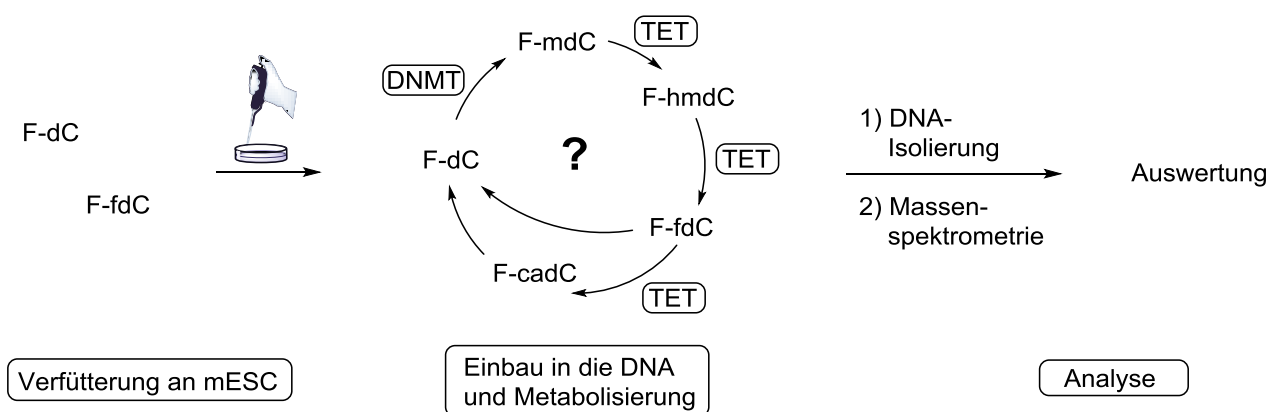
Zur Generierung von mES-Zellkernextrakt werden hypertonische Puffer und ein *Homogenizer* verwendet. Es ist jedoch bekannt, dass einige Proteine möglicherweise in dem so hergestellten Lysat nicht mehr voll funktionsfähig sind.<sup>[227]</sup> Daher liegt die Vermutung nahe, dass auch Enzyme, die für

die aktive Demethylierung verantwortlich sind, in mES-Zellkernextrakt nicht funktionsfähig sind. Zudem ist es möglich, dass die verwendeten ODN nicht als Substrat für die potentiell Chromatin-gebundenen Proteine eignen.

Um diese Problematik zu umgehen, wurden fluorierten Nucleoside im Folgenden direkt an Stammzellen verfüttert.

### 6.8.4 Verfütterungsexperimente

Mittels Verfütterung von Nucleosiden an mES-Zellen können nach Isolation der genomischen DNA und massenspektrometrischer Analyse die im Genom enthaltenen Nucleotide identifiziert und quantifiziert werden (siehe **Abbildung 25**). Werden fluorierte Nucleoside verfüttert, so kann bei Detektion von bestimmten Intermediaten auf den Stoffwechselweg der aktiven Demethylierung geschlossen werden (siehe **Abbildung 25**). Die Verfütterung wurde von *F. Spada*, der enzymatische Verdau durch *E. Parsa* und die massenspektrometrische Analyse von *K. Iwan* (alle AK Carell) durchgeführt. Zur Verfütterung sowie zur massenspektrometrischen Quantifizierung wurden die synthetisierten F-Nucleoside aus Kapitel 6.4 sowie das isotoopenmarkierte  $^{15}\text{N}_2$ -F-dC aus Kapitel 6.6 verwendet.



**Abbildung 25:** Schematischer Ablauf des Verfütterungsexperiments. Das Nucleosid (F-dC oder F-fdC) wird den Zellen über mehrere Tage zugegeben. Nach Aufnahme und Phosphorylierung kann die Zelle das Nucleosid in das Genom inkorporieren und metabolisieren. Zur Untersuchung der Nucleosid-Intermediate des mdC-Stoffwechsels, wird die genomische DNA der Zellen isoliert und massenspektrometrisch analysiert.

In ersten Untersuchungen wurde F-dC in verschiedenen Konzentrationen an *XPC*-Zellen verfüttert. Unter anderem exprimierten diese Zellen vermehrt eine Thymidin-Kinase mit hoher Substratbreite. Aufgrund des 2'-Fluor-Substituenten wurde eine verminderte Phosphorylierungs-Aktivität der Cytidin-Kinase gegenüber F-dC vermutet. Durch Verwendung von *XPC*-Zellen sollte daher die Phosphorylierung sowie die nachfolgende Inkorporation in genomische DNA gewährleistet werden. Die

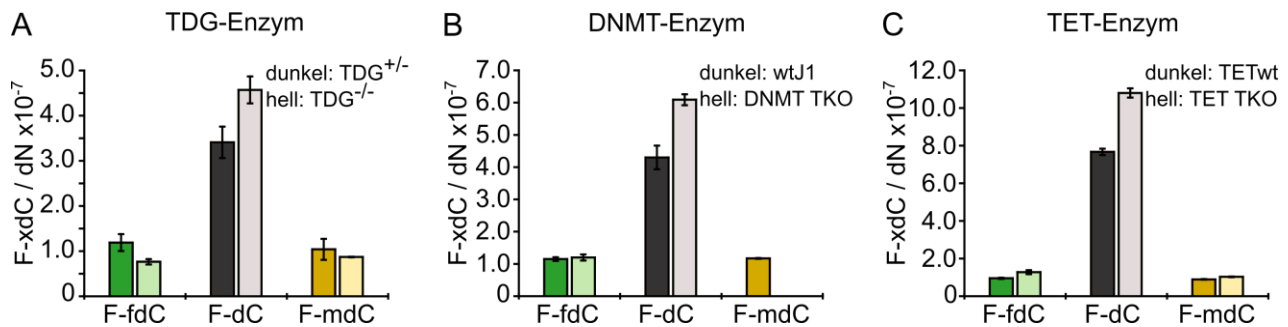


Experimente zeigten, dass F-dC zu 0.0076% bzgl. dN eingebaut wurde (bei Verfütterung einer 500 nM F-dC-Lösung) und dies keine phänomenologischen Auswirkungen auf die Zellen hatte. Neben F-dC konnten auch die Nukleoside F-mdC und F-dT im Genom detektiert und quantifiziert werden. F-mdC ist hierbei sicherlich das Produkt einer *in vivo* Methylierung, vermutlich durch DNMT-Enzyme. F-dT entstand sehr wahrscheinlich bereits im Zytosol durch Methylierung von F-dU, welches das Desaminierungsprodukt von F-dC ist, und wurde anschließend in die genomische DNA inkorporiert. Dies ist für dC literaturbekannt und sollte auch für das fluorierte Analogon gelten.<sup>[228]</sup> Weiterhin ist die Menge an inkorporierten F-dC abhängig von der F-dC-Verfütterungskonzentration. Interessant ist hierbei, dass der Gehalt an F-dT in etwa doppelt so groß ist wie der von F-dC. Mit diesen ersten Untersuchungen konnte zum einen nachgewiesen werden, dass F-dC in geringen Mengen die Zellentwicklung nicht negativ beeinflusst. Zum anderen konnte gezeigt werden, dass F-dC im Genom zumindest zu F-mdC metabolisiert werden kann. Wie bereits die *in vitro*-Experimente deutet auch dieses Resultat darauf hin, dass F-dC die Aktivität epigenetisch relevanter Enzyme trotz der 2'-Fluor-Substitution kaum beeinträchtigt.

Aufgrund der guten Verträglichkeit sowie des funktionierenden Einbaus von F-dC in die genomische DNA wurden die weiteren Experimente mit mES-Zellen durchgeführt. Zur Überprüfung der Hypothese eines C-C-Bindungsbruchs in Form einer Deformylierung von fdC oder Decarboxylierung von cadC ohne den Umweg über Methylierung sowie anschließende Oxidation wurde das Nukleosid F-fdC verfüttert. Kann hierbei F-dC als Intermediat im mdC-Stoffwechsel detektiert werden, so kann auf das Vorkommen einer C-C-Bindungsbruch-Reaktion in mES-Zellen geschlossen werden.

Zunächst wurde F-fdC an mES-Zellen mit bzw. ohne TDG-Enzym (TDG<sup>+/-</sup> bzw. TDG<sup>-/-</sup>) verfüttert, um zu überprüfen, ob das TDG-Enzym F-fdC auch *in vivo* nicht herausschneiden kann (siehe **Abbildung 26A**). In diesem Experiment konnte in den Zellen mit sowie ohne dem TDG-Enzym neben F-fdC bemerkenswerterweise auch F-dC und F-mdC quantifiziert werden. Allerdings unterschieden sich die Zelltypen im Gehalt gleicher Nukleoside. So war zwar der F-dC-Gehalt in beiden Zelltypen um einen Faktor von 3-6 höher als der F-fdC-Gehalt, in mES-Zellen mit TDG-Enzym wurde aber insgesamt mehr F-fdC und weniger F-dC erhalten als in Zellen ohne TDG-Enzym. Die F-mdC-Level waren nahezu gleich. Aus diesen Daten konnte erstmalig aufgrund der Detektion von F-dC auf das Vorhandensein einer C-C-Bindungsbruch-Reaktion geschlossen werden. Eine F-dC-Verunreinigung konnte ausgeschlossen werden, da kein F-dT als Desaminierungsprodukt von F-dC zu detektieren war. Weiterhin konnte in einem Kontrollexperiment keine spontane Deformylierung von F-fdC in Wasser bei 60 °C nach 72 h detektiert werden. Bemerkenswert ist die Tatsache, dass

der relative Gehalt an neu generiertem F-dC bzgl. F-fdC etwa dem beim *Isotope-Tracing*-Experiment erhaltenem  $D_1$ - $^{15}N_2$ -dC-Gehalt bzgl. fdC in TDG $^{-/-}$ -Zellen entspricht. Das niedrigere F-fdC-Level und das höhere F-dC-Level bei mES-Zellen ohne TDG gegenüber TDG $^{+/-}$ -Zellen könnte durch die erfolgreiche Inhibierung des TDG-Enzyms durch F-fdC erklärt werden. Hierdurch würde das Enzym für einen längeren Zeitraum am Nucleosid verbleiben, wodurch die Interaktion von anderen Enzymen mit F-fdC verhindert würde.



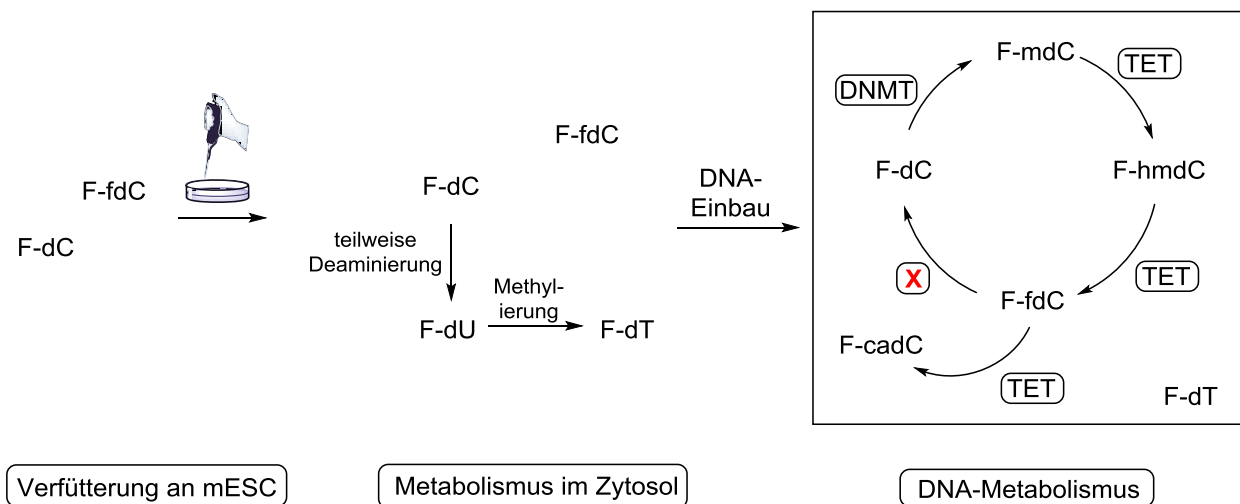
**Abbildung 26:** Quantifizierungsdaten zur Verfüterung von F-fdC an mES-Zellen. A) Aufgrund der Detektierbarkeit von F-dC konnte erstmalig auf das Vorkommen einer C-C-Bindungsbruch-Reaktion geschlossen werden. Weiterhin konnte, wie erwartet, F-fdC nicht durch das TDG-Enzym entfernt werden. B) Die DNMT-Enzyme waren ausschließlich für die Methylierung von F-dC zu F-mdC, aber nicht für einen C-C-Bindungsbruch verantwortlich (DNMT TKO = DNMT *triple knock out*). C) Da trotz fehlender TET-Enzyme F-dC zu detektieren ist, konnte auf eine Deformylierung als C-C-Bindungsbruchreaktion geschlossen werden.

In einem weiteren Experiment sollte überprüft werden, ob DNMT-Enzyme aufgrund des Cysteins in der aktiven Tasche für den C-C-Bindungsbruch verantwortlich sind (siehe **Abbildung 26B**). Zusätzlich sollte nachgewiesen werden, dass die DNMT-Enzyme tatsächlich F-dC zu F-mdC methylieren. Hierzu wurde F-fdC an mES-Zellen mit (wtJ1) und ohne DNMT-Enzyme (DNMT TKO) verfüttert. Auch in diesem Experiment konnte neben F-fdC auch F-dC und F-mdC quantifiziert werden, wobei deren Level vergleichbar mit dem der TDG-Untersuchungen waren. Lediglich für mES-Zellen ohne DNMT-Enzyme konnte, wie erwartet, kein F-mdC detektiert werden. Weiterhin betrug das Gehalt von F-dC in diesen Zellen etwa so viel, wie die Summe der F-dC- und F-mdC-Level in mES-Zellen mit DNMT-Enzymen. Somit konnte nachgewiesen werden, dass die DNMT-Enzyme ausschließlich für die Methylierung zu F-mdC verantwortlich sind. Diese Enzyme tragen nicht weiter zu einem C-C-Bindungsbruch bei.

Zusätzlich wurde F-fdC an mES-Zellen mit (TETwt) und ohne TET-Enzyme (TET TKO) verfüttert (siehe **Abbildung 26C**). Hierbei sollte überprüft werden, ob eine Deformylierung oder eine Decar-

boxylierung als C-C-Bindungsbruchreaktion vorliegt. Könnte bei mES-Zellen ohne TET-Enzyme kein F-dC mehr detektiert werden, so ist eine Decarboxylierung wahrscheinlich. Die massenspektrometrische Analyse zeigte im TET TKO sogar einen kleinen Anstieg an F-dC im Vergleich zu mES-Zellen mit TET-Enzymen. Dies ist ein Indiz für eine Deformylierung als C-C-Bindungsbruchreaktion.

Werden zusammenfassend die *in vivo*-Ergebnisse mit denen der *in vitro*-Experimente kombiniert, so kann auf das Folgende geschlossen werden: Die Verfütterung von F-xdC-Nucleosiden resultiert in deren Einbau in genomische DNA (siehe **Abbildung 27**). Hier werden sie ähnlich zu den natürlichen, nicht-fluorierten Analoga metabolisiert. F-dC konnte mittels der Methyltransferase M.SssI zu F-mdC umgesetzt werden. Eine Methylierung von F-dC mittels dem epigenetisch relevanten Enzym DNMT ist daher sehr wahrscheinlich. Die anschließende TET-Enzym-vermittelte Oxidation generiert F-hmdC und F-fdC. Letzteres kann in einer bislang unbekannten Art und Weise deformylieren und somit F-dC als das Ausgangsprodukt des Stoffwechselwegs generieren. Eine Oxidation ausgehend von F-fdC zu F-cadC ist zwar möglich, jedoch konnte in den *in vivo*-Experimenten nie F-cadC detektiert werden. Es ist anzunehmen, dass F-cadC nur ein Nebenprodukt der TET-Enzym-vermittelten Oxidation ist.



**Abbildung 27:** Schematische Darstellung der kombinierten Ergebnisse der *in vitro*- und *in vivo*-Experimenten mit fluorierten Nucleosiden. Die Verfütterung von F-xdC-Nucleosiden resultiert in deren Einbau in genomische DNA. Hier werden sie ähnlich zu den natürlichen, nicht-fluorierten Analoga metabolisiert. Es konnte erstmals gezeigt werden, dass F-fdC in einer bislang unbekannten Art und Weise deformylieren und somit F-dC aus Ausgangsverbindung eines epigenetischen Stoffwechsels generieren kann.

## 7 Entwicklung einer neuartigen, reversiblen Proteinmarkierung

Proteinmarkierungen gewinnen derzeit immer mehr an Bedeutung. Ziel folgender Experimente war die Entwicklung einer neuartigen, sequenzspezifischen Methode zur Proteinmarkierung. Diese sollte auf einer reversiblen Bindung zwischen einem speziellen Lysin eines Proteins und einem Aldehyd basieren.

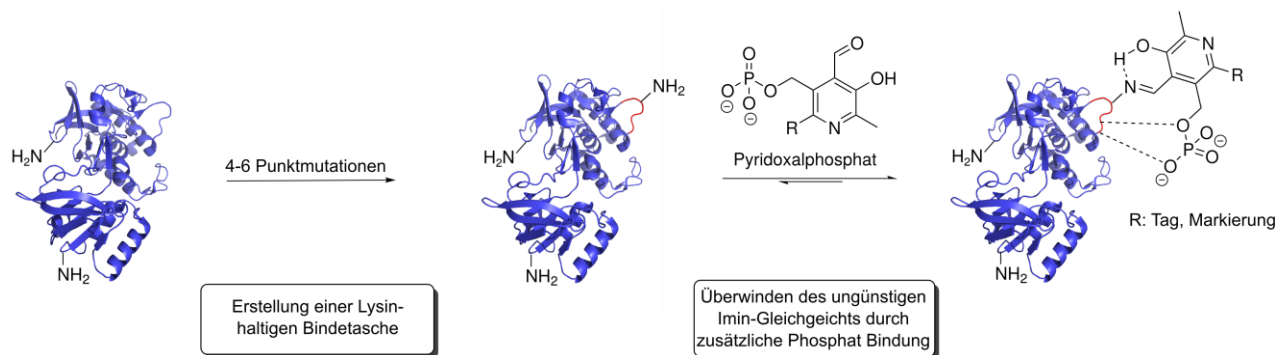
Durch Modifikationen am Aldehyd-tragenden Molekül ergeben sich zahlreiche Einsatzmöglichkeiten dieser Methode. Zum Beispiel ermöglicht das Anbringen eines Farbstoffs den Einsatz im Bereich des *Imaging*. Mit einem *Click*-baren Rest könnten Nanostrukturen erstellt werden. Die Modifizierung eines Aldehyds mit einem Toxophor könnte die selektive Generierung eines Antikörper-Wirkstoff-Konjugats (*Antibody-drug conjugate*) ermöglichen.

Vorteil zu bisherigen, in der Einleitung beschriebenen Methoden, wie beispielsweise kovalente Cystein-Addukte, wäre vor allem die Reversibilität der Bindung sowie die zu erwartende relativ kurze und daher einfache Sequenzmodifizierung des Proteins.

Lysin ist mit 5.9% eine eher häufig vorkommende Aminosäure in Proteinen und kann mit Aldehyden reversibel zu Iminen reagieren.<sup>[124]</sup> Das Gleichgewicht dieser Reaktion ist im wässrigen Medium stark abhängig vom pH-Wert und meist auf Seiten der Edukte. Dennoch unterscheiden sich Edukt und Produkt in der freien Enthalpie meist nur um wenige kcal/mol.<sup>[229]</sup>

Als Aldehyd für die Markierung sollte das gut erforschte Pyridoxalphosphat (PLP) verwendet werden. Dieses geht in verschiedenen Biotransformationen eine stabile *Schiff*'sche Base mit einem Lysin eines Enzyms ein. Eine stabile Bindung ist jedoch nur möglich, wenn Seitenketten verschiedener Aminosäuren in der aktiven Tasche eine zusätzliche, positive Wechselwirkung zum PLP aufbauen können.

Angelehnt an diese Enzyme, sollte eine möglichst kurze Lysin-haltige Peptidsequenz identifiziert werden, die mit PLP eine stabile *Schiff*'sche Base eingeht. Die relativ geringe Energie, die benötigt wird, um die Produktbildung in dieser Gleichgewichtsreaktion zu begünstigen, sollte durch stabilisierende Wechselwirkungen zwischen PLP und der Sequenzumgebung des Lysins erreicht werden. Die so identifizierte Sequenz könnte im weiteren Verlauf der Experimente durch rationelle Punktmutation in ein Protein der Wahl integriert werden. Durch Modifizierungen von PLP würden sich die oben erwähnten Anwendungen ergeben (siehe **Abbildung 28**).

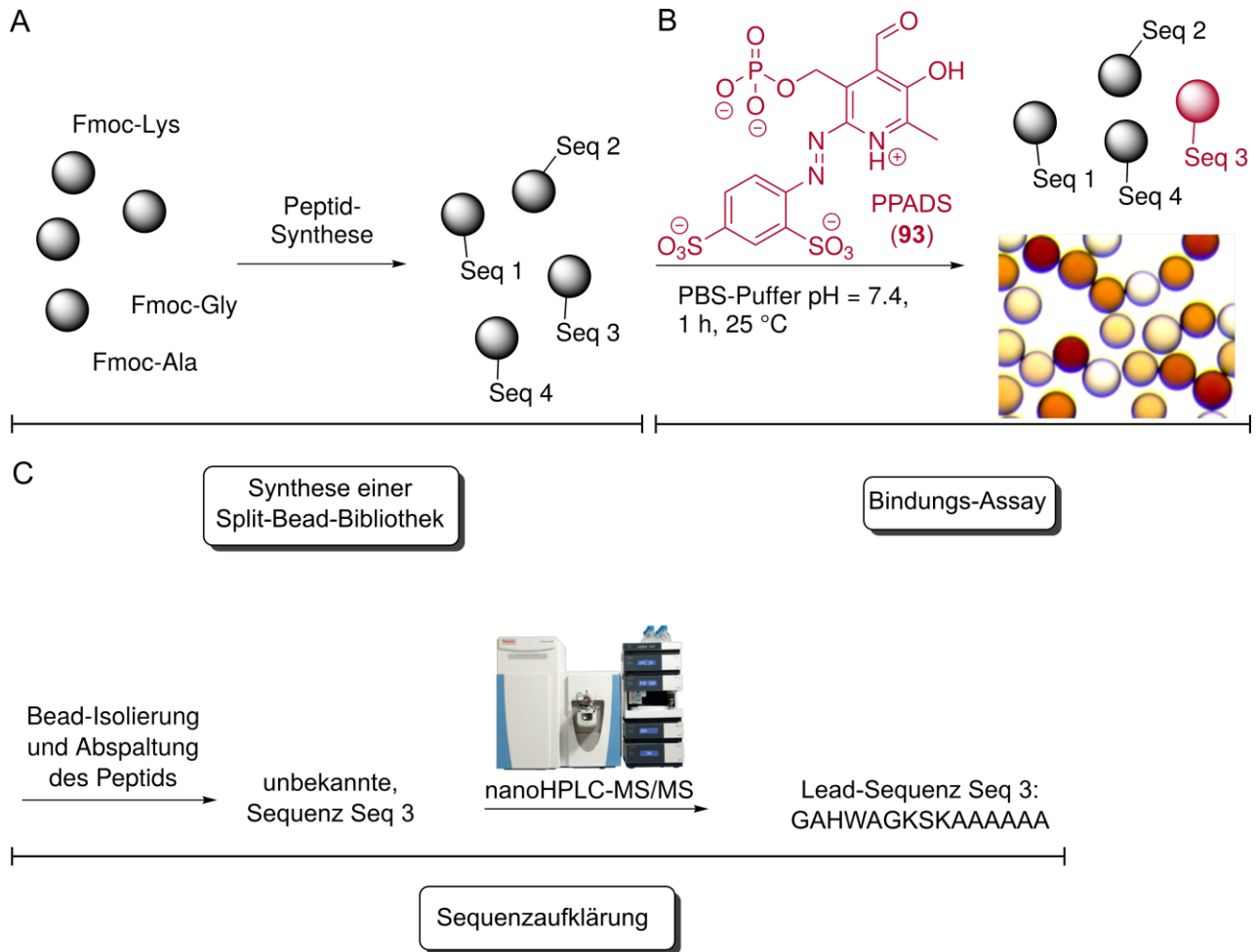


**Abbildung 28:** Prinzip einer neuen reversiblen, sequenzspezifischen Proteinmarkierung. Durch Punktmutationen soll eine Lysin-haltige Bindetasche konstruiert werden (rot), die PLP derart bindet, dass das so entstehende Imin thermodynamisch stabil ist.

Auf der Suche nach diesem stabilisierenden Sequenzkontexts wurde die kombinatorische Methode der Synthese einer *Split-Bead-Peptid-Bibliothek* verwendet (siehe **Schema 24**).<sup>[230,231]</sup> Hierzu erfolgte die Synthese nach der Standardprozedur der Festphasen-Peptid-Synthese. Zunächst wurden in mehreren Ansätzen unterschiedliche Aminosäuren an die Festphase (*Bead*) gekuppelt. Nach jedem Kupplungsschritt wurden die *Beads* aller Ansätze vereinigt, gemischt und wieder auf mehrere Ansätze für den nächsten Kupplungsschritt verteilt. Je nach Länge der Sequenz und Zahl der variierenden Aminosäuren konnte somit in kurzer Zeit eine beträchtliche Zahl verschiedener Peptidsequenzen generiert werden. Nach der Festphasensynthese ist zwar keine Aussage über die exakte Sequenz auf einem *Bead* machbar, jedoch war es für den weiteren Verlauf entscheidend, dass sich auf jedem *Bead* nur eine Peptid-Sequenz befand.

Im nachfolgenden Bindungs-Assay wurden nun die positiv reagierenden *Beads* isoliert. Hierfür wurde aufgrund der roten Farbe das PLP-Derivat PPADS (**93**) verwendet. Sämtliche *Beads* wurden mit PPADS (**93**) in PBS-Puffer bei pH = 7.4 bei 25 °C für eine Stunde inkubiert und danach mit PBS-Puffer gewaschen. Wurde PPADS **93** durch die Peptidsequenz auf einem *Bead* stabil gebunden, erschien das *Bead* rot. Es wurde anschließend isoliert und das Peptid wurde von der Festphase gespalten.

Im letzten Schritt wurde die erhaltene Peptidsequenz massenspektrometrisch aufgeklärt. Zunächst wurde nach einem möglichen Massenpeak gesucht und dieser dann mehrmals fragmentiert. Aus den erhaltenen Fragmenten konnte dann auf die gesuchte Peptidsequenz geschlossen werden.



**Schema 24:** Schematisches Ablaufdiagramm der kombinatorischen Methode zur Entdeckung einer PPADS-bindenden Sequenz. A) Zur Generierung einer möglichst großen Peptid-Bibliothek wurde die Methode der *Split-Bead-Synthese* gewählt. Zwar ist keine Aussage über die exakte Sequenz auf einem bestimmten Bead machbar, entscheidend ist jedoch, dass sich auf jedem Bead nur eine bestimmte Peptid-Sequenz befindet. B) Im nachfolgenden Bindungs-Assay werden die Beads mit dem rötlichen Markierungsreagenz PPADS (**93**) umgesetzt. Bindet die Sequenz PPADS so erscheint der Bead rot und kann im Folgenden isoliert werden. C) Nach Abspaltung des Peptids vom Bead kann dessen Sequenz massenspektrometrisch aufgeklärt werden.

## 7.1 Erste Versuche zur Identifikation einer geeigneten Peptidsequenz

Zusammen mit *M. Vrabel* (ehemals AK Carell) wurde die erste *Split-Bead-Peptid-Bibliothek* synthetisiert. Zunächst wurde eine Sequenzlänge von sechs Aminosäuren erprobt (siehe **Tabelle 2**). Dabei sollte das reaktive Lysin zentral im Peptid positioniert sein.

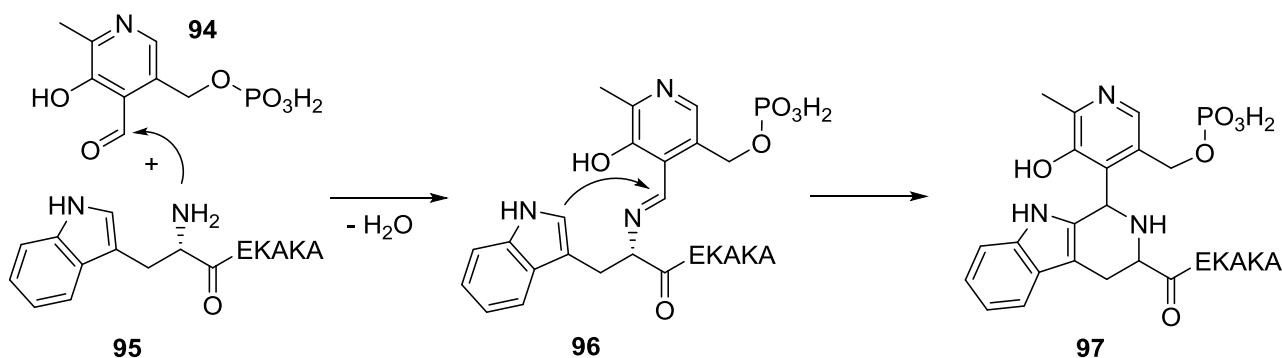
**Tabelle 2:** Sequenzdesign für die Synthese der ersten *Split-Bead-Peptid-Bibliothek* sowie die gefundene *Lead-Sequenz*.

Rationelles Sequenzdesign	Lead-Sequenz
XXKXXA	WEKAKA
X: A, L, G, F, W, K, R, E	

Im Bindungs-Assay wurden nur wenige, dafür sehr dunkelrote *Beads* erhalten. In der nachfolgenden massenspektrometrischen Sequenzaufklärung konnte zusammen mit *Dr. D. Eisen* (ehemals AK Carell) gezeigt werden, dass vorwiegend *Beads* mit der Sequenz *WEKAKA* isoliert wurden.

Die nachfolgenden NMR-Untersuchungen, in denen PLP mit dem synthetisch hergestellten Peptid der Sequenz *WEKAKA* umgesetzt wurde, deuteten jedoch nicht auf eine *Schiff'sche-Base-Reaktion* mit Lysin hin, sondern eher auf eine Iminbildung am *N-Terminus* des Peptids mit nachfolgender, zunächst unbekannter Bindungsknüpfung.

Eine Literatur-Recherche ergab, dass exakt dieses Phänomen bereits 2008 von der Gruppe um *Francis* beschrieben wurde und für andere Aldehyde seit 2000 bekannt ist.<sup>[232-234]</sup> Dabei reagieren Aldehyde wie PLP reversibel mit dem *N-Terminus* zu einem Imin (siehe **Schema 25**). Im Falle eines *N-terminalen* Tryptophans kann dieses in einer irreversiblen *Pictet-Spengler-Reaktion* mit dem Imin zum Peptid-Derivat **97** reagieren.



**Schema 25:** *Pictet-Spengler-Reaktion* als unerwünschte Nebenreaktion am *N-Terminus* eines Peptids.

Zur Vermeidung einer solchen unerwünschten Reaktion wurde in einer zweiten Synthese der *Split-Bead*-Peptid-Bibliothek bei ansonsten identischer Durchführung zur ersten Synthese der *N*-Terminus acetyliert. Im darauffolgenden Bindungs-Assay konnten jedoch keine farbigen *Beads* erhalten werden. Ein zentrales Lysin in einer sechs Aminosäure langen Sequenz geht somit in wässrigem PBS-Puffer bei pH = 7.4 keine stabile Imin-Bildung mit PLP ein.

## 7.2 Rationelles Peptiddesign zur Bindung von Pyridoxalphosphat

### 7.2.1 Theoretische Aspekte zur Bindung mit Pyridoxalphosphat

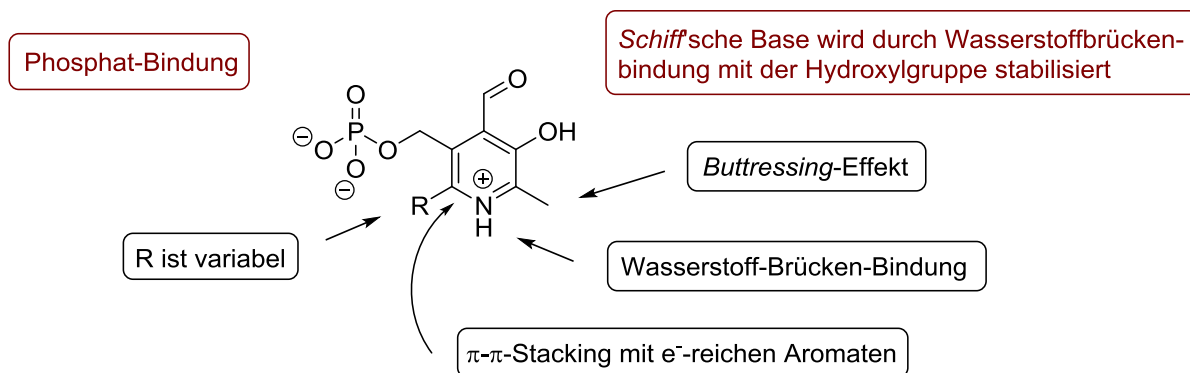
Die ersten Versuche zur Identifikation einer PLP-bindenden Peptidsequenz stellten klar, dass eine stabile Iminbildung zwischen Lysin und PLP unter den verwendeten Bedingungen nicht möglich ist. Dies ist eine wichtige Erkenntnis, da somit davon ausgegangen werden kann, dass Lysine an Proteinoberflächen mit PLP kein stabiles Imin bilden.

Für eine stabile Bindung müssen neben der Iminbildung weitere Wechselwirkungen mit dem Peptid ausgebildet werden. Bei einer genauen Analyse von PLP konnten eine Reihe von funktionellen Gruppen identifiziert werden, die bei richtiger Adressierung, einen positiven Beitrag zur Bindungsstabilisierung leisten könnten. (siehe **Abbildung 29**):

- **Aldehyd:** Dieser bildet mit dem  $\epsilon$ -Amin des Lysins das kovalent gebundene Imin. Allgemein gilt meist: je elektronenschiebender der Substituent am Aldehyd, desto stabiler die resultierende *Schiff'sche Base*.<sup>[235]</sup>
- **Hydroxy-Substituent:** Die Hydroxygruppe stabilisiert das entstandene Imin durch die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung mit bis zu 3.0 kcal/mol.<sup>[236]</sup>
- **Methyl-Substituent:** Der *Buttressing*-Effekt der Methylgruppe bewirkt eine sterische Annäherung der Hydroxygruppe an das Imin. Dies stärkt die Wasserstoffbrückenbildung, wodurch letztlich das Imin weiter stabilisiert wird.<sup>[237]</sup>
- **Heteroaromat:** Aufgrund des elektronenarmen Heteroaromaten wirkt eine  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkung mit einem elektronenreichen Aromaten stabilisierend. In Transaminasen erfolgt dies häufig durch Tryptophan und Phenylalanin.
- **Stickstoff im Heteroaromat:** Unter physiologischen Bedingungen liegt der Stickstoff protoniert vor und kann eine Wasserstoffbrückenbindung eingehen. In Transaminasen wird der Stickstoff meist durch Glutamat stabilisiert.



- **C6-Position:** PLP weist an dieser Position keinen Substituenten auf. Wird an dieser Stelle jedoch ein Rest eingefügt, so birgt dies zwei Vorteile. Zum einen kann das PLP-Derivat aufgrund sterischer Aspekte nicht an das aktive Zentrum von Enzymen binden. Dadurch wird die Wahrscheinlichkeit einer toxischen Wirkung der neuen Markierung verringert. Zum anderen können durch weitere Reste neue Wechselwirkungen mit dem Peptid gebildet werden.
- **Phosphat-Gruppe:** Der Phosphat-Rest ist zusammen mit der Hydroxygruppe der Substituent, der am meisten zur stabilen Iminbindung im aktiven Zentrum von Enzymen beiträgt. Dieser interagiert zwar nicht direkt mit der *Schiff'schen* Base, trägt aber aufgrund einer Reihe von positiven Wechselwirkungen mit Seitenketten im Protein zur hohen PLP-Bindungsaffinität bei.<sup>[236]</sup>



**Abbildung 29:** Die Analyse von PLP zeigt eine Vielzahl möglicher Ziele zur Verbesserung der Stabilität der Iminbindung an ein Peptid. Die beiden wichtigsten Substituenten für eine stabile Bindung, der Aldehyd und das Phosphat, sind rot markiert.

Die Stabilisierung der Iminbildung von PLP kann somit über eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst werden. Im weiteren Verlauf wurde diese Analyse für das Modellieren einer *Lead*-Sequenz verwendet.

## 7.2.2 Modellierung einer *Lead*-Sequenz

*Modelling*, also das Berechnen von Aufenthaltswahrscheinlichkeiten, birgt den großen Vorteil, eine anschauliche Idee der Wechselwirkung zwischen Molekülen zu bekommen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Programm AutoDockVina verwendet.<sup>[238]</sup> Dies ist ein *Docking*-Programm, das, basierend auf einem mathematischen Algorithmus, versucht, die energieärmste Position eines flexib-

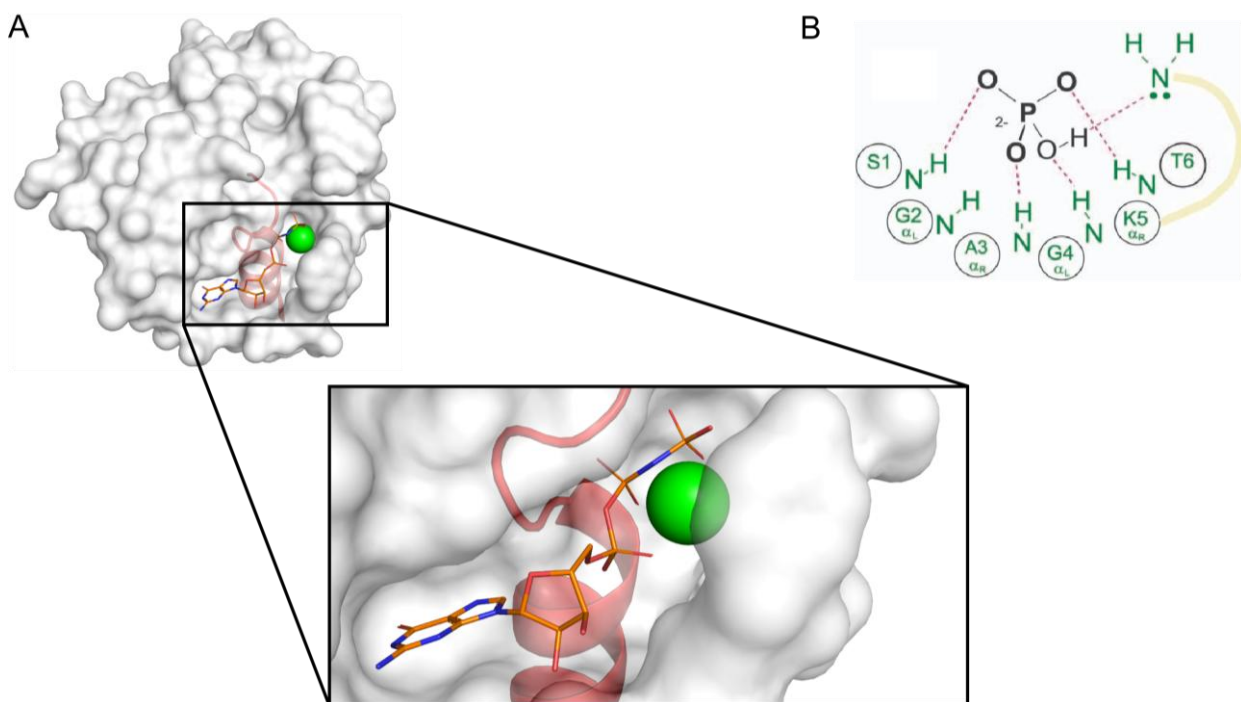
len Moleküls in einem starren Protein zu finden.

Die PLP-Analyse zeigte, dass eine zusätzliche positive Wechselwirkung von Peptid mit Phosphat zu einer Stabilisierung der Iminbindung führen kann. Aus diesem Grund wurde sich im weiteren Verlauf auf eine Stabilisierung des Phosphatrestes durch das Peptid fokussiert.

In der Literatur sind zahlreiche Phosphat-bindende Peptidsequenzen beschrieben, allerdings ist das Walker A-Motiv die Bedeutendste.<sup>[239-250]</sup> Letzteres, benannt nach seinem Entdecker *J. E. Walker*, ist eine acht Aminosäure lange Sequenz und besitzt eine hoch konservierte 3D-Struktur.<sup>[251]</sup> Die Sequenz ist wie folgt:

**SEQ1:** G X X X X G K [T/S]

In ATP und GTP bindenden Enzymen stabilisiert die Sequenz **SEQ1** vor allem das  $\beta$ -Phosphat des Triphosphats. Für die GTPase H-ras p21 konnten *Pai et al.* per Kristallstruktur zeigen, dass das Peptidrückgrat der Sequenz sowie das  $\epsilon$ -ständige Amin von Lysin essentiell für die Bindung von Phosphat sind (siehe **Abbildung 30A**).<sup>[252]</sup> Häufig folgt dem Motiv C-terminal eine  $\alpha$ -Helix, dessen Makrodipolmoment die negative Ladung des Phosphats zusätzlich stabilisieren kann.<sup>[253-255]</sup> Weiterhin kann durch das im Walker A-Motiv enthaltene Threonin oder Serin ein Magnesiumkation am



**Abbildung 30:** A) Kristallstruktur der GTPase H-ras p21 mit einem Nukleotid-Inhibitor (pdb-Code: 5p21). Das Walker A-Motiv sowie die C-terminale Helix sind rot gekennzeichnet und stabilisieren das  $\beta$ -Phosphat. B) Das synthetische Hexapeptid SGAGKT bildet mit dem Peptidrückgrat eine Art Wölbung aus, wodurch es Phosphationen binden kann. **Abbildung 30B** wurde übernommen von *Morrow et al.*<sup>[258]</sup>

Phosphat koordiniert werden.

Die Gruppe um *E. J. Milner-White* zeigte, dass das synthetische Hexapeptid mit der Sequenz **SEQ2**

**SEQ2:** S G A G K T

aufgrund der NH-Gruppen des Peptidrückgrats eine Art Wölbung ausbildet und damit Phosphationen binden kann (**Abbildung 30B**).<sup>[256]</sup> Die Änderung der freien Enthalpie  $\Delta G$  der Bindung von Phosphat an das Hexapeptid beträgt ca.  $-4$  kcal/mol, hauptsächlich verursacht durch entropische Effekte.<sup>[257]</sup> In Enzymen kann durch Stabilisierung von Phosphatgruppen eine Änderung der freien Enthalpie  $\Delta G$  von bis zu  $-12$  kcal/mol erhalten werden.<sup>[258]</sup>

Basierend auf den Sequenzen **SEQ1** und **SEQ2** wurde nun eine PLP-bindende Sequenz entworfen. Hierzu wurde C-terminal ein weiteres Lysin zur Ausbildung der *Schiff*'schen Base eingefügt. Weiterhin wurden sechs konsekutive Alanine zur Ausbildung einer  $\alpha$ -helikalen Struktur zur weiteren Phosphat-Stabilisierung eingefügt. Die somit rationell designte Sequenz **SEQ3** lautet wie folgt:

**SEQ3:** G<sup>1</sup> X<sup>2</sup> X<sup>3</sup> G<sup>4</sup> A<sup>5</sup> G<sup>6</sup> K<sup>7</sup> S<sup>8</sup> K<sup>9</sup> A<sup>10</sup> A<sup>11</sup> A<sup>12</sup> A<sup>13</sup> A<sup>14</sup> A<sup>15</sup>

Für *Docking*-Studien wird generell eine 3D-Struktur des starren Proteins benötigt. Meist wird hierzu auf Kristallstrukturen des jeweiligen Proteins zurückgegriffen.

Zur Generierung einer 3D-Struktur der rationell designten Sequenz **SEQ3** wurde die Kristallstruktur von GTPase H-ras p21 von *Pai et al.* (siehe **Abbildung 30A**) verwendet und entsprechend angepasst.<sup>[252]</sup> Das Peptidrückgrat sowie die Position des Magnesiumkations wurden übernommen und Seitenketten nichtübereinstimmender Aminosäuren entsprechend angeglichen. Das Magnesiumkation wurde aus dem Grund übernommen, da es in der Kristallstruktur von GTPase H-ras p21 das  $\gamma$ -Phosphat durch ionische Wechselwirkungen zusätzlich stabilisiert. Diese Stabilisierung sollte nach Möglichkeit auch für die Bindung zu PLP ausgenutzt werden. Die Positionen X<sup>2-3</sup> wurden in den Rechnungen mit verschiedenen Aminosäuren erprobt. Ferner wurden während der Rechnung sämtliche Seitenketten als flexibel gesetzt, d.h. sie konnten ihre Positionen jederzeit anpassen. Lediglich das Peptidrückgrat sowie das Magnesiumkation blieben starr. Das PLP-Molekül agierte als Inhibitor und konnte sämtliche Positionen einnehmen.

Die ersten *Modelling*-Studien wurden ohne kovalente Bindung zwischen K<sup>7</sup> und PLP durchgeführt. In allen energetisch günstigsten Resultaten positionierte sich die Phosphatgruppe in das Walker A-Motiv. Die Abstände zu Wechselwirkungspartnern, z.B. zwischen K<sup>7</sup> und den NH-Gruppen des Peptidrückgrats, entsprachen Wasserstoffbrückenbindungen. Zusätzlich waren die PLP-Formylgruppe und das  $\epsilon$ -Amin von K<sup>9</sup> häufig in räumlicher Nähe. Dies würde die Reaktion und somit die Bildung der *Schiff*'schen Base begünstigen.

In weiteren Studien wurde untersucht, ob nach Bildung der *Schiff*'schen Base sich der Phosphat-

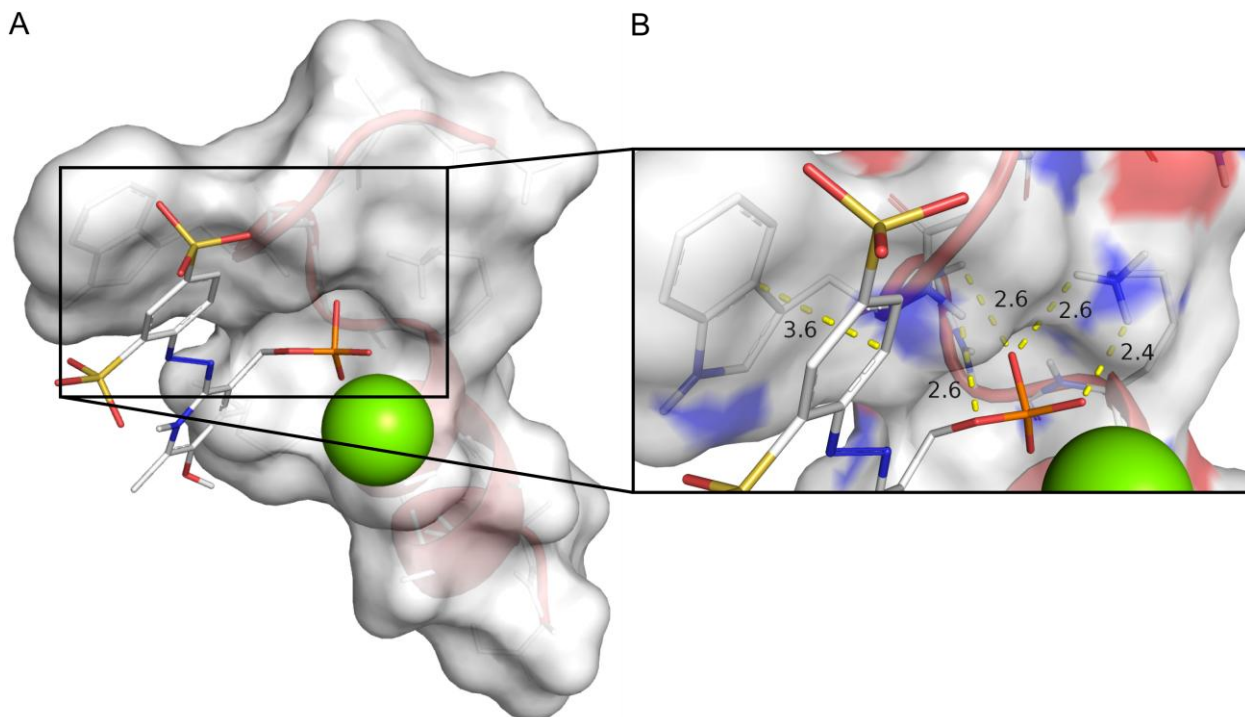
Rest weiterhin in die Peptid-Wölbung ausrichten und somit stabilisiert werden kann. Denkbar wäre eine ungünstige geometrische Konformation des PLP-Lysin-Addukts, der diese Ausrichtung des Phosphats verhindert. Für diese Studie wurde eine kovalente Iminbindung zwischen K<sup>9</sup> und PLP installiert. PLP agierte als modifizierter, aber flexibler Lysinrest. Ein Wassermolekül wurde in dieser Studie als *Dummy*-Inhibitor verwendet und hatte keinen Einfluss auf die Resultate. In den energetisch besten Ergebnissen positionierte sich die Phosphatgruppe exakt wie in den vorherigen Studien in das Walker A-Motiv. Der Phosphat-Rest kann sich somit auch nach erfolgter Iminbildung in die Peptid-Wölbung ausrichten.

Zusätzlich wurde in den *Docking*-Studien anstelle von PLP dessen Derivat PPADS verwendet. Dies lag nahe, da PPADS auch im Bindungsassay zur Identifikation einer *Lead*-Sequenz benutzt wurde. Hierbei stellte sich heraus, dass die Sequenz

**SEQ4:**                                    G<sup>1</sup> A<sup>2</sup> G<sup>3</sup> W<sup>4</sup> A<sup>5</sup> G<sup>6</sup> K<sup>7</sup> S<sup>8</sup> K<sup>9</sup> A<sup>10</sup> A<sup>11</sup> A<sup>12</sup> A<sup>13</sup> A<sup>14</sup> A<sup>15</sup>

besonders gute Resultate bezüglich der Position von PPADS im Peptid zeigte (siehe **Abbildung 31**). Lediglich die Aminosäuren der Positionen 2-4 sind gegenüber der designten Sequenz **SEQ3** angepasst. Die Phosphatgruppe liegt zentral im Walker A-Motiv umgeben von Magnesiumkation,  $\epsilon$ -Amin von K<sup>7</sup> und den NH-Gruppen des Peptidrückgrats. Zwischen Phosphat- und Walker A-Motiv-Gruppen können sich elf Wasserstoffbrückenbindungen mit Abständen zwischen 2.4 Å und 3.1 Å ausbilden. Dies sind ideale Abstände für Wasserstoffbrückenbindungen.<sup>[259]</sup> Das Magnesiumkation wird neben der Phosphatgruppe auch durch das Serin S<sup>8</sup> stabilisiert. Zusätzlich erfolgt eine  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkung zwischen dem elektronenarmen Phenyl-Substituenten von PPADS und Tryptophan. Der Abstand zwischen beiden beträgt 3.6 Å und liegt exakt in der Definition einer *face-to-face*- $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkung (3.3 Å - 3.8 Å).<sup>[260]</sup> Weiterhin ist die Anordnung des *ortho*-Sulfonat-Substituenten von PPADS in Richtung des Lösungsmittels entropisch ideal. Der unsubstituierte und daher hydrophobe Teil des Phenyl-Rest schirmt einen Teil des hydrophoben Peptids ab. Die beiden hydrophilen Sulfonat-Substituenten könnten im realen Experiment über Wasserstoffbrückenbindungen mit Wassermolekülen wechselwirken und somit entropisch zu einer hohen Bindungsaffinität von PPADS zum Peptid beitragen.

Somit konnte durch rationale Design eines Bindungsmotivs sowie dessen weitere Optimierung durch *Modelling*-Studien die *Lead*-Sequenz **SEQ4** für ein PLP-bindendes Peptid identifiziert werden.



**Abbildung 31:** *Modelling*-Resultat für PPADS mit kovalenter Iminbindung an K<sup>9</sup>. Das Peptidrückgrat ist rot gekennzeichnet. A) Das Phosphat bindet sehr gut in die durch das Walker A-Motiv gebildete Wölbung. Zusätzlich weisen die hydrophilen Sulfonat-Substituenten zum Lösungsmittel hin und begünstigen somit entropisch die Bindung von PPADS. B) Die angezeigten Abstände deuten auf stabilisierende Wechselwirkungen mit dem Peptid hin.

### 7.2.3 Synthese einer rationell-designten Peptid-Bibliothek

Im Folgenden wurde zusammen mit *S. Thallmair* (AK Carell) ein Sequenzdesign für die Synthese der *Split-Bead-Bibliothek* basierend auf den Ergebnissen der *Docking*-Studien bestimmt (siehe **Tabelle 2**), die Bibliothek anschließend synthetisiert, evaluiert und die Sequenzen positiver Treffer massenspektrometrisch aufgeklärt.

Für die Synthese der *Split-Bead-Bibliothek* wurde die *Lead-Sequenz SEQ4* verwendet. Allerdings wurden an mehreren Positionen verschiedene Aminosäuren erprobt, sodass eine Vielzahl leicht unterschiedlicher Sequenzen *in situ* untersucht werden konnte. An Position 3 und 4 wurden neben Glycin und den aromatischen Aminosäuren Histidin und Tryptophan auch Aspartat eingebaut. Möglicherweise kann letzteres an diesen Positionen mit dem Stickstoff des PLP in Form von ionischen Wechselwirkungen interagieren. An Position 7 wurde zur Phosphat-Bindung auch die basische Aminosäure Arginin verwendet. Serin und Threonin wurden an Position 8 eingebaut. An Position 10 und 15 wurde durch die zusätzliche Verwendung von Glutamat und Arginin neben Alanin die Stabilisierung der  $\alpha$ -Helix durch ionische Wechselwirkungen erprobt.

**Tabelle 3:** Sequenzdesign der Split-Bead-Bibliothek sowie die besten Resultate des Bindungs-Assays.

Sequenzdesign für Split-Bead-Bibliothek	Häufigste Ergebnisse
$\text{Ac-G}^1 \text{A}^2 (\text{X}_1)^3 (\text{X}_1)^4 \text{A}^5 \text{G}^6 (\text{X}_2)^7 (\text{X}_3)^8 \text{K}^9 -$ $(\text{X}_4)^{10} \text{A}^{11} \text{A}^{12} \text{A}^{13} \text{A}^{14} (\text{X}_4)^{15}$ <ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>\text{X}_1</math>: G, W, H, D</li> <li>• <math>\text{X}_2</math>: K, R</li> <li>• <math>\text{X}_3</math>: S, T</li> <li>• <math>\text{X}_4</math>: A, R, E</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ac-GAGWAGKSKAAAAAA</li> <li>• Ac-GAHWAGKSKAAAAAA</li> <li>• Ac-GAGDAGKSKAAAAAA</li> </ul>

Die Synthese dieser *Split-Bead*-Bibliothek mit *N*-terminaler Acetylierung, die Bindungs-Assays sowie die Sequenzaufklärung wurden von *S. Thallmair* (AK Carell) durchgeführt.

Bemerkenswerterweise konnten in einem *N*-terminal-acetylierten Bindungs-Assay erstmals, neben farblosen und gelblichen *Beads*, auch stark dunkelrote *Beads* beobachtet werden (siehe **Schema 24**). Dies war ein erstes Indiz für eine starke Bindungsaffinität zwischen PPADS und Peptid. In der nachfolgenden massenspektrometrischen Sequenzaufklärung konnte festgestellt werden, dass die modellierte *Lead*-Sequenz tatsächlich eine der am häufigsten isolierten Peptidsequenzen war. Neben dieser wurde die sehr ähnliche Sequenz mit der Aminosäuren Histidin an Position 3 und seltener auch die Peptidsequenz mit Aspartat an Position 4 erhalten.

Aus den erhaltenen Sequenzen wird deutlich, dass Lysin an Position 7 bzw. Serin an Position 8 gegenüber Arginin bzw. Threonin deutlich zu bevorzugen sind. Weiterhin tragen Glutamat und Arginin nicht zu einer Stabilisierung der  $\alpha$ -Helix bei bzw. wechselwirken in einer ungünstigen Weise mit anderen Teilen des Peptids.

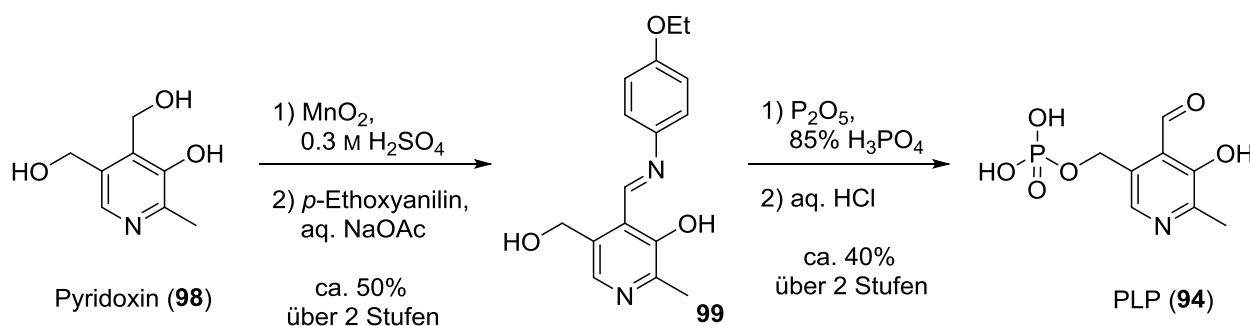
Somit konnten auf Basis der rationell-designten *Lead*-Sequenz **SEQ4** erstmals erfolgreich drei PPADS-bindende Peptidsequenzen identifiziert werden.

Im Folgenden werden die durchgeführten Synthesestudien zu neuartigen PLP-Derivaten beschrieben. Danach werden die umfangreichen Untersuchungen bezüglich der Charakterisierung und Analyse der Reaktion zwischen PLP-Derivaten und verschiedenen Peptiden erläutert.

### 7.3 Studien zur Synthese neuer PLP-Derivate

Ziel dieser Proteinmarkierungsmethode war die reversible Markierung mit modifizierbaren Aldehyden. Da als Aldehyd das PLP verwendet wurde, galt es, mögliche Strategien zu dessen Modifizierung zu entwickeln. Von besonderem Interesse war zum einen die Einführung eines Alkin-Restes als Edukt einer bioorthogonalen *Click*-Reaktion. Zum anderen sollte die Stabilität des lichtempfindlichen PPADS durch Variation der Phenyl-Substituenten und durch Austausch der Stickstoffe der Azo-Funktionalität durch Kohlenstoffe erhöht werden.

PLP wird synthetisch meist aus Pyridoxin hergestellt. Für letzteres sind mehrere industrielle Syntheseverfahren bekannt.<sup>[261-263]</sup> Die selektive Oxidation der C4-Hydroxygruppe zum Aldehyd wird durch  $\text{MnO}_2$  in wässriger Schwefelsäure ermöglicht (siehe **Schema 26**). Dies ist zugleich die einzige in der Literatur beschriebene Oxidationsvariante.<sup>[264-266]</sup> Der Aldehyd wird danach mit einem Amin, meist einem Anilin-Derivat, als *Schiff*'sche Base **99** geschützt. Zur Einführung der Phosphatgruppe in C5-Position wird häufig Phosphorpentoxid in Phosphorsäure oder die Phosphoramidit-Chemie verwendet. Die anschließende Umsetzung mit Salzsäure resultiert in freiem PLP.



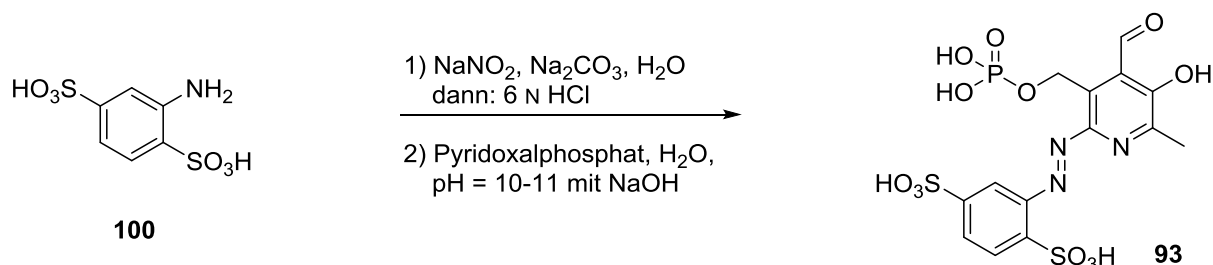
**Schema 26:** Literaturbekannte Synthesen von PLP (**94**) ausgehend von Pyridoxin (**98**).<sup>[264-266]</sup>

Der Wechsel in der Syntheseabfolge, also die Phosphorylierung gefolgt von der  $\text{MnO}_2$ -Oxidation, ist kaum beschrieben.<sup>[267,268]</sup>

Die PLP-Analyse in Kapitel 7.2.1 auf Seite 82 zeigte, dass lediglich die Position C6 im PLP für weitere Modifikationen zur Verfügung steht. Im Rahmen dieser Arbeit wurde sich daher ausschließlich auf Synthesestudien zur Modifikation dieser Position fokussiert. Trotz zeitlich langer Bekanntheit von PLP konnten in einer Literatur-Recherche lediglich fünf unterschiedliche funktionelle Gruppen als C6-Modifikation gefunden werden (SciFinder-Recherche 07.03.2016). Der Azo-Substituent wird mit über 300 Referenzen am häufigsten beschrieben. So finden sich 95 Synthesen zu verschiedenen Azo-modifizierten PLP-Derivaten, die als vielversprechende P2X-Rezeptor-Antagonisten galten.<sup>[269-271]</sup> Aufgrund nicht ausreichender Selektivität hat die Suche nach neuen

Azo-PLP-Derivaten ab Mitte der 2000er stark nachgelassen.

In **Schema 27** ist eine beispielhafte Synthese zum Azo-PLP-Derivat PPADS (**93**) dargestellt.<sup>[271]</sup> Startmaterial ist das Anilin-2,4-disulfonat, welches zunächst mit  $\text{NaNO}_2$  zum entsprechenden Diazoniumsalz umgesetzt wird und anschließend mit PLP zu PPADS reagiert.



**Schema 27:** Literaturbekannte Synthese von PPADS (**93**) per Azokupplung.<sup>[271]</sup>

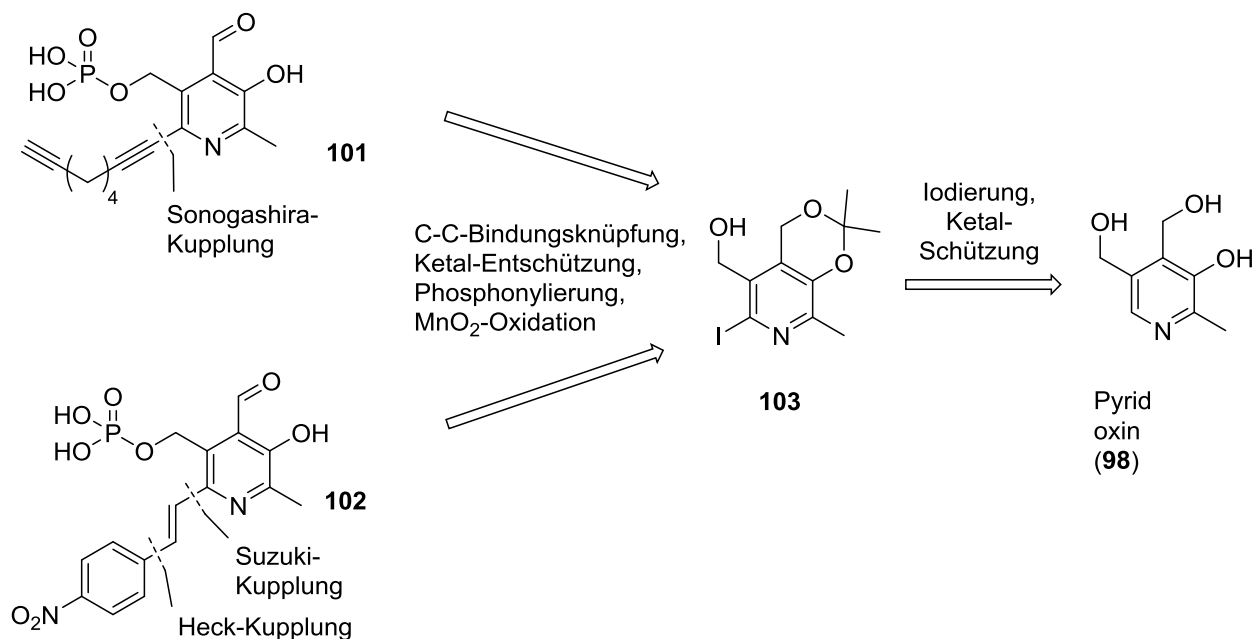
Für Untersuchungen zum Einfluss der Phenyl-Substitutionen auf die Iminbindung stellte *S. Becker* (AK Carell) in Anlehnung an die beschriebenen Synthesen einige Azo-PLP-Derivate her. Auf diese wird im Folgenden Kapitel zur Evaluation der Bindungsaffinität näher eingegangen.

Zu den anderen vier C6-Modifikationen konnten zwar insgesamt 33 Referenzen gefunden werden, Synthesewege wurden allerdings nicht beschrieben. Sie stammen zumeist aus den Jahren 1950-70. Falls überhaupt erwähnt, so wurde die Verbindung durch andere Arbeitskreise zur Verfügung gestellt. So betreffen 19 Referenzen einen Methyl-Rest, zwölf Referenzen ein Halogenid (F, Cl, Br), eine Referenz einen PEG-Substituenten und eine weitere einen Benzylrest.

Im Falle des PLP-Derivats Pyridoxal ergab die Literatur-Recherche nach C6-Modifikationen zwei Synthesen zu den entsprechenden Azo-Derivaten und fünf von *Kim et al.* beschriebene Synthesen zu Benzyl-, Phenyl- und Vinyl-Derivaten.<sup>[272]</sup> Im Falle des PLP-Derivats Pyridoxin wurden zahlreiche z.T. sehr unterschiedliche C6-Modifikationen und deren Synthesen gefunden.

In Anlehnung an literaturbekannte Synthesen zu Pyridoxal und Pyridoxin sollte eine Syntheseroute zu C6-Alkin und -Vinylbenzol modifizierter PLP-Derivate entwickelt werden. Das retrosynthetische Schema hierzu ist in **Schema 28** dargestellt. Das Intermediat **103** stellte einen wichtigen Baustein dieser Synthese dar. Dieses sollte durch eine *Sonogashira*-Kupplung mit nachfolgender saurer Entschützung des Ketals, Phosphylierung und  $\text{MnO}_2$ -Oxidation im Alkin-Derivat **101** resultieren. Das Vinylbenzol-Derivat **102** sollte ausgehend von Intermediat **103** in einer *Suzuki*- mit nachfolgender *Heck*-Kupplung, sauren Entschützung, Phosphylierung und  $\text{MnO}_2$ -Oxidation hergestellt werden. Das Intermediat **103** sollte nach literaturbekannter Vorschrift aus Pyridoxin (**98**) hergestellt werden.

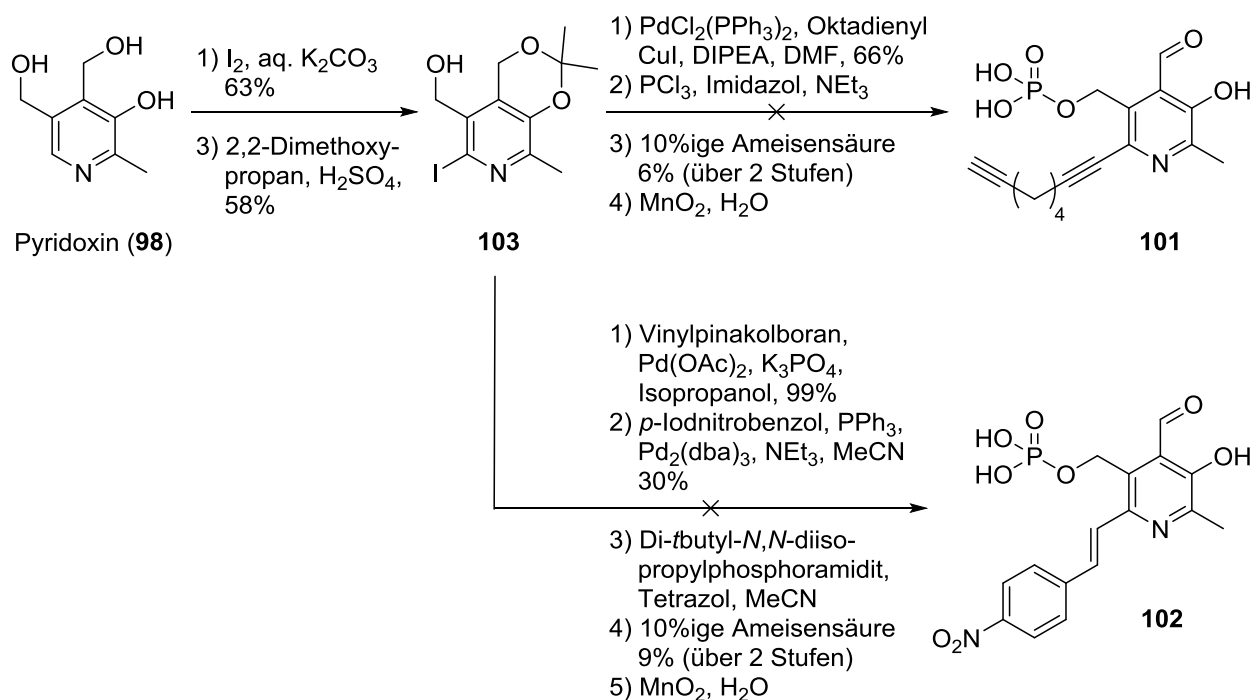




**Schema 28:** Retrosynthetisches Schema zur Synthese von C6-Alkin und -Vinylbenzyl modifizierter PLP-Derivaten.

Die Studien zur Synthese der PLP-Derivate **101** und **102** sind in **Schema 29** dargestellt. In Anlehnung an die Vorschriften von *Yu et al.* und *Korytnyk et al.* wurde Pyridoxin mit elementarem Iod umgesetzt und nachfolgend die Hydroxygruppen an Position 3 und 4 mit 2,2-Dimethoxypropan als Ketal geschützt. Das Pyridoxin-Derivat **103** konnte so im 20 g Maßstab erhalten werden.<sup>[273-275]</sup> Mittels Palladium-katalysierter *Sonogashira*-Kupplung konnte Oktadiin in das Molekül mit guten Ausbeuten von 63% eingeführt werden.<sup>[276,277]</sup> Nach Phosphonylierung mit  $\text{PCl}_3$  und saurer Ketalentschützung mit 10%iger Ameisensäure konnten nach präparativer HPLC-Aufreinigung 6% des Pyridoxin-Derivats erhalten werden. Die finale  $\text{MnO}_2$ -Oxidation zum PLP-Alkin-Derivat **101** resultierte auch unter Verwendung verschiedener Vorgehensweisen immer in einer Oxidation zur Carbonsäure sowie langsamer Zersetzung des Pyridoxin-Derivats.<sup>[266]</sup> Das PLP-Alkin-Derivat **101** konnte daher nicht erhalten werden.

Für die Darstellung des Vinylbenzyl-Derivats **102** wurde das Pyridoxin-Derivat **103** in einer *Suzuki*-Kupplung zum Vinyl-Derivat und in der anschließenden *Heck*-Kupplung mit *p*-Iodnitrobenzol zum Vinylbenzyl-Derivat mit akzeptablen Ausbeuten (99% bzw. 30%) umgesetzt. Die Einführung des Phosphonats wurde zur einfacheren Reaktionsdurchführung mit Di-*tert*-butyl-*N,N*-diisopropylphosphoramidit mit nachfolgender sauren Entschützung durchgeführt und das Produkt per präparativer HPLC aufgereinigt. Die finale  $\text{MnO}_2$ -Oxidation resultierte wieder in der Oxidation zur Carbonsäure und einer Zersetzung des Edukts. Auch hier wurden neben kommerziell erhältli-



**Schema 29:** Studien zur Synthese der C6-Alkin- (**101**) und C6-Vinylbenzol- (**102**) modifizierten PLP-Derivaten.

chem MnO<sub>2</sub> auch aus KMnO<sub>4</sub> frisch hergestelltes MnO<sub>2</sub> sowie verschiedene Reaktionsbedingungen erprobt. Das Vinylbenzol-Derivat **102** konnte letztlich nicht erhalten werden.

Zusammenfassend zeigte sich in den Studien zur Synthese der PLP-Derivate **101** und **102**, dass die C6-Modifizierung kein Problem darstellt, jedoch die finale MnO<sub>2</sub>-Oxidation zum Aldehyd nicht möglich scheint. Vielmehr konnte neben der Zersetzung des Edukts die Oxidation zur Carbonsäure beobachtet werden.

Die Oxidation eines C6-modifizierten Pyridoxins zum entsprechenden Aldehyd ist trotz zahlreicher Synthesen zu Pyridoxin-Derivaten komplett literaturunbekannt. Die Vermutung liegt nahe, dass die C6-Modifikation die elektronischen Eigenschaften der C4-Hydroxygruppe derart beeinflusst, dass eine selektive Oxidation zum Aldehyd nicht stattfindet. Ferner ist auch ein negativer Einfluss des Phosphat-Rests denkbar.

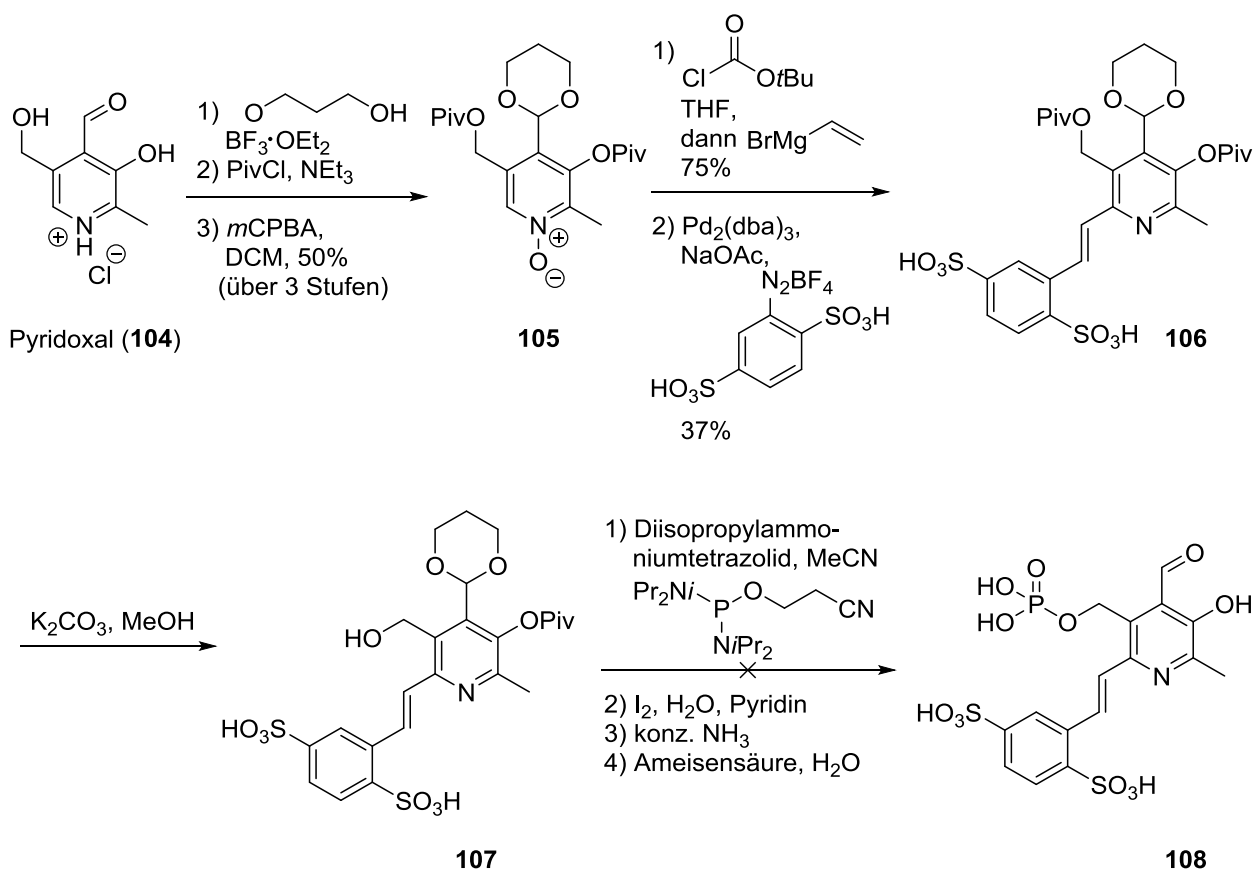
Da keine detaillierten Reaktionsuntersuchungen unternommen wurden, ist die Machbarkeit der Oxidation jedoch nicht ausgeschlossen.

Im weiteren Verlauf der Synthesestudien wurde sich darauf fokussiert die problematische Oxidation gänzlich zu vermeiden und durch Verwendung von Pyridoxal (**104**) als Startmaterial die Aldehyd-

Funktionalität bereits von Beginn an im Molekül zu haben.

*Kim et al.* beschrieben 2000 die Möglichkeit einer C6-Modifikation durch Vinylierung eines aktivierten Pyridoxal-Derivats.<sup>[272]</sup> Die weitere Substitution des Vinyl-Derivats ist durch eine Heck-Kupplung möglich.

Diese Modifizierungsreaktion diente für die in **Schema 30** dargestellte Synthesestudie als Schlüsselschritt zur Funktionalisierung der Position C6. Aufgrund literaturbekannter Probleme der C5-Phosphorylierung bei gleichzeitig vorliegendem Aldehyd wurden letzterer und die freien Alkoholgruppen des Pyridoxals zunächst orthogonal als Acetal bzw. Pivalylester geschützt. Die nachfolgende Oxidation mit *m*CPBA resultierte in hohen Ausbeuten (10 g Maßstab) in Pyridoxal-Derivat **105**. In Anlehnung an die Vorschrift von *Kim et al.* wurde **105** zunächst mit *Isobutylchlorformiat* zum aktivierten *N-isobutoxycarbonyloxypyridoxal*-Derivat und anschließend mit dem Vinyl-Grignard-Reagenz zum Vinylpyridoxal-Derivat umgesetzt. Die nachfolgende Heck-Kupplung nach *Schmidt et al.* mit Diazoniumphenyl-2,5-disulfonat-Salz (bereitgestellt von *S. Becker*, AK Carell)



**Schema 30:** Synthesestudien zum Vinylbenzol-PLP-Derivate **108**. Die Einführung der C6-Modifikation mittels Aktivierung des Pyridoxals mit *m*CPBA und Isobutylchlorformiat und nachfolgender Umsetzung mit dem Vinyl-Grignard-Reagenz erfolgten in Anlehnung an eine Vorschrift von *Kim et al.*<sup>[272]</sup>

resultierte im Vinylbenzol-Derivat **106** mit akzeptablen Ausbeuten.<sup>[278]</sup> Die selektive Entschützung der primären Hydroxygruppe gelang mit  $K_2CO_3$  in Methanol. Die nachfolgende Phosphorylierung unter Verwendung eines Phosphoramidits scheiterte in ersten Versuchen. Auch in weiteren Versuchen durch *S. Becker* (AK Carell) gelang keine erfolgreiche Phosphorylierung. Es konnte lediglich eine langsame Zersetzung des Startmaterials beobachtet werden. Möglicherweise ist die Hydroxygruppe aufgrund der C6-Modifikation sterisch schlecht zugänglich. Aufgrund der begrenzten Anzahl an Versuchen und Variationen bedeutet dies jedoch nicht, dass die Phosphorylierung unmöglich ist. Weitere Alternativen sind z.B. die oben erwähnte Verwendung von Phosphorpentoxid in Phosphorsäure.

Nach einer erfolgreichen Phosphorylierung müsste zum Erhalt des PLP-Derivats **108** lediglich der Pivalylester mit konz. Ammoniak sowie das Acetal mit Ameisensäure gespalten werden.

Zusammenfassend konnte in diesem Kapitel gezeigt werden, dass eine C6-Modifikation von PLP synthetisch sehr anspruchsvoll und deswegen größtenteils literaturunbekannt ist. Einzig die Modifizierung von PLP als Startmaterial mit Diazoniumsalzen zu den entsprechenden Azo-PLP-Derivaten ist schnell und mit zahlreichen Diazonium-Derivaten durchführbar. Der sukzessive Aufbau der PLP-Funktionalitäten (Aldehyd, Phosphat) nach Einführung der C6-Modifikation ist dagegen langwierig und kompliziert. Im Rahmen dieser ersten Synthesestudien war der Erhalt einer C6-Alkin- bzw. C6-Vinylbenzol-Modifikation nicht möglich. Aus diesem Grund wurden die im Folgenden beschriebenen Bindungsstudien ausschließlich mit Azo-PLP-Derivaten durchgeführt.

### **7.4 Charakterisierung der Peptid-PLP-Derivat-Bindung**

Anhand der *Split-Bead*-Bibliothek konnten drei Peptid-Sequenzen identifiziert werden, die mit PPADS ein stabiles Imin bilden. Für den Nachweis und die umfangreiche Charakterisierung der Bindung wurden zahlreichen Studien mittels HPL-Chromatografie, NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie unternommen.

#### **7.4.1 HPLC-Bindungsstudien**

Mithilfe der HPL-Chromatografie kann der Reaktionsfortschritt der Iminbildung aufgrund unterschiedlicher Retentionszeiten von Edukt und Produkt beobachtet werden. Die für diese Versuche verwendeten Peptide wurden von *S. Thallmair* (AK Carell) bereitgestellt. PLP und dessen Derivate Pyridoxal und PPADS wurden kommerziell erworben. Weitere Azo-PLP-Derivate wurden von *S.*

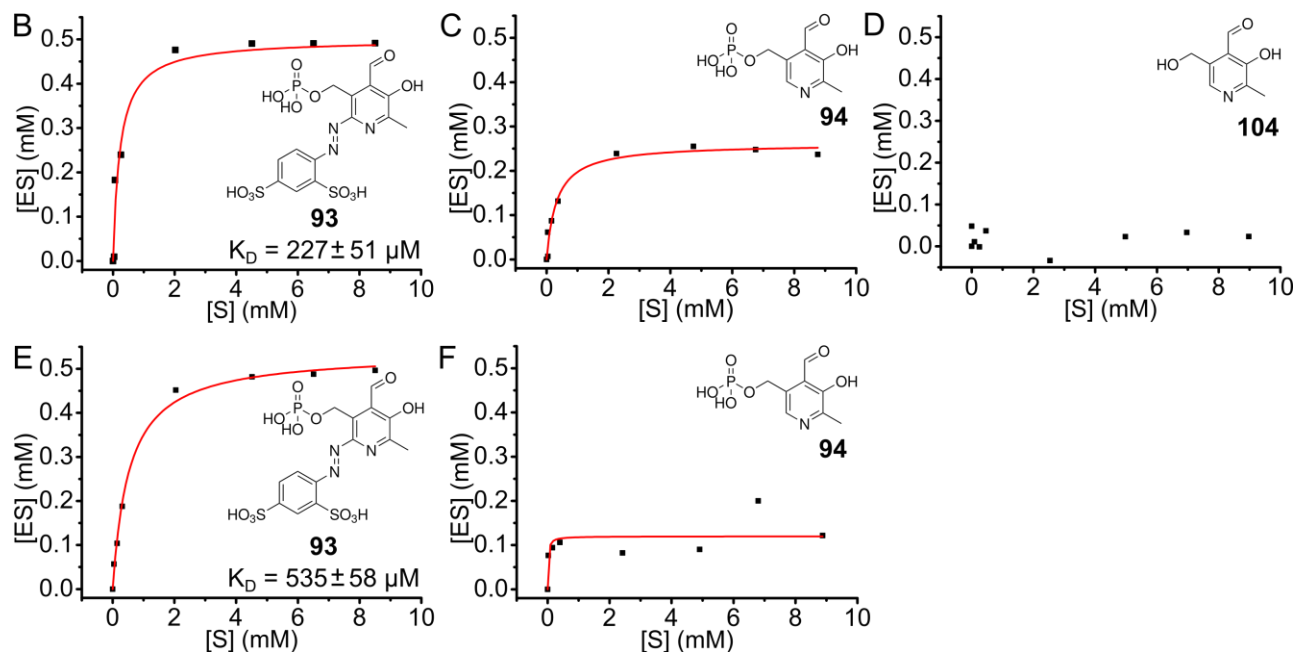
Becker und Dr. M. Dejmek (AK Carell) bereitgestellt.

### Untersuchung zur Bindungsaffinität:

In ersten Studien zur Charakterisierung der Iminbildung wurden verschiedene Konzentrationen an PLP-Derivat ([S]) und 500  $\mu\text{M}$  Peptid in PBS-Puffer mit 10 mM MgCl (pH = 7.4) für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die entstandene Iminbindung mit 100 Äq. NaBH<sub>4</sub> bzgl. Peptid zum stabilen sekundären Amin reduziert (zwei Stunden, 37 °C) und die erhaltene Reaktionsmischung per HPL-Chromatografie analysiert (siehe **Abbildung 32**).

**Abbildung 32A** stellt zwei der verwendeten Peptide **PEP1** und **PEP2** dar, welche sich lediglich im sechs Alanin-haltigen C-Terminus unterscheiden. Theoretischen Überlegungen zufolge sollte das Makrodipolmoment der sich aufgrund der Alanine ausbildende  $\alpha$ -helikale Struktur den Phosphat-

A **PEP1** (B-D): Ac-GAGWAGKSKAAAAAA-NH<sub>2</sub>  
**PEP2** (E-F): Ac-GAGWAGKSK-NH<sub>2</sub>



**Abbildung 32:** Daten zur HPLC-Bindungsstudie. A) Die verwendeten Peptide **PEP1** und das um sechs Alanine verkürzte **PEP2**. B-D) *Michaelis-Menten*-artige Kinetik sowie die errechnete Ausgleichskurve (rot) für verschiedene PLP-Derivate bzgl. **PEP1**. Nur PPADS (**93**, B) zeigte einen vollständigen Reaktionsumsatz und besitzt einen  $K_D$ -Wert von 227  $\mu\text{M}$ . Bei PLP (**94**, C)) stellte sich bei ca. 65% Reaktionsumsatz ein Gleichgewicht ein. Im Falle von Pyridoxal (**104**, D) konnte keine Bindung beobachtet werden. E-F) *Michaelis-Menten*-artige Kinetik sowie die errechnete Ausgleichskurve (rot) für verschiedene PLP-Derivate bzgl. **PEP2**. PPADS (**93**, E) zeigte einen bzgl. **PEP1** höheren  $K_D$ -Wert von 535  $\mu\text{M}$ . Bei PLP (**94**, F)) stellt sich das Gleichgewicht ca. 50% früher ein.

Rest des PLP stabilisieren und somit die Iminbildung begünstigen. Die Daten der HPLC-Bindungsstudien sind in **Abbildung 32B-F** dargestellt.

Mittels HPLC konnte der Umsatz der *Schiff'schen* Base Reaktion bei variierender PLP-Derivat-Konzentration analysiert werden. Die erhaltenen Datenpunkte wurden in Form der *Michaelis-Menten*-artigen Kinetik dargestellt, d.h. Konzentration an ungebundenem PLP-Derivat (Substrat, [S]) in der Lösung als x-Achse und Konzentration an Peptid-PLP-Derivat-Verbindung (Enzym-Substrat-Komplex [ES]) als y-Achse. Die hierfür benötigten mathematischen Umformungen der gemessenen HPLC-Daten sind im Experimententeil beschrieben.

Die mittels *Michaelis-Menten*-Gleichung entlang der enthaltenen Datenpunkte errechnete Ausgleichskurve (rot) erhielt in den meisten Fällen nur sehr kleine Residuen und unterstützt die Annahme, dass eine *Michaelis-Menten*-artige Kinetik vorliegt. Bei vollständigem Umsatz ( $[ES] = 0.5 \text{ mM}$ ) ermöglicht dies zusätzlich die Berechnung der Dissoziationskonstanten  $K_D$ .

Bei Verwendung der *Michaelis-Menten*-artigen Kinetik werden allerdings drei Annahmen gemacht.

- Die Reaktion befindet sich nach einer Stunde vollständig im Gleichgewicht. Dies konnte in weiteren Experimenten (s.u.) bestätigt werden.
- Die Imin-Reduktion durch  $\text{NaBH}_4$  hat keinen Einfluss auf das Reaktionsgleichgewicht. Dies ist in der Literatur akzeptiert.<sup>[279,280]</sup>
- Es bildet sich nur ein Produkt. Denkbar wäre auch, dass beide im Peptid enthaltenen Lysine mit dem PLP-Derivat reagieren. Der Erhalt einer Sättigungskurve unterstützt allerdings die Annahme, dass nur ein Produkt entsteht. Dies konnte in weiteren Experimenten (s.u.) auch nachgewiesen werden.

**Abbildung 32B** stellt die Umsetzung von PPADS (**93**) mit **PEP1** dar. Bemerkenswerterweise konnte bei fünf Äquivalenten PPADS bereits ein vollständiger Umsatz zum Imin-Produkt beobachtet werden. PLP hingegen zeigte zwar einen ähnlichen Kurvenverlauf, allerdings erfolgte eine Sättigung bereits bei etwa 50% des Umsatzes (**Abbildung 32C**). Wurde PLP ohne Phosphat-Rest verwendet (Pyridoxal), so konnte kein Reaktionsumsatz detektiert werden (**Abbildung 32D**).

Bei Umsetzung des kürzeren Peptids **PEP2** mit PPADS wurde ein zweimal höherer  $K_D$ -Wert als bei **PEP1** erhalten. Bei Verwendung von **PEP2** und PLP trat eine Sättigung bereits bei einem Reaktionsumsatz von ca. 25% ein (**Abbildung 32E-F**).

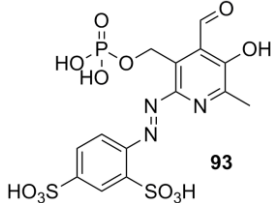
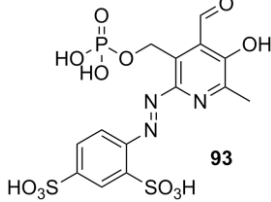
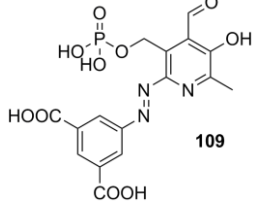
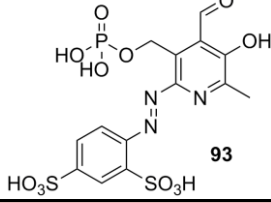
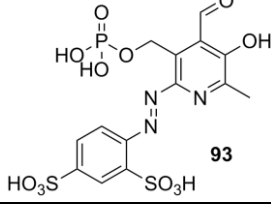
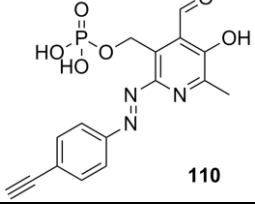
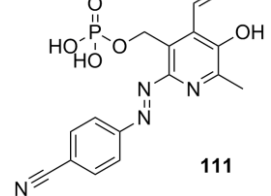
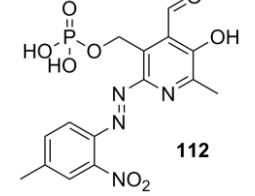
Basierend auf den vorliegenden Daten (**Abbildung 32**) kann auf das Folgende geschlossen werden:

1. Wird Pyridoxal, also PLP ohne Phosphat, verwendet, so ist die Gleichgewichtskonstante  $K$  der *Schiff'schen* Basen-Reaktion von Lysin und Aldehyd unter den verwendeten Bedingun-

- gen sehr klein ( $K \ll 1$ ). Das chemische Gleichgewicht liegt auf Seiten der Edukte. Die Iminbindung ist ohne weitere Wechselwirkungsmöglichkeiten nicht stabil. (**Abbildung 32D**).
2. Die zusätzliche Phosphat-Wechselwirkung von PLP mit **PEP1** führt zu einer Stabilisierung des entstandenen Imins. Die Änderung der freien Enthalpie des Produktes  $\Delta G$  und somit das chemische Gleichgewicht der Reaktion wird durch diese Wechselwirkung zu Gunsten des Produkts beeinflusst. Allerdings tritt bei ca. 50% des Umsatzes eine Sättigung der Iminbildung ein (**Abbildung 32C**).
  3. Die C6-Modifizierung bewirkt aufgrund von elektronischen und sterischen Effekten eine solche Stabilisierung des Imins, dass ein vollständiger Reaktionsumsatz beobachtet werden kann (**Abbildung 32B**).
  4. Die C-terminalen Alanine begünstigen die Iminbildung wahrscheinlich aufgrund der Stabilisierung des negativ-geladenen Phosphatrestes durch Ausbildung eines  $\alpha$ -helikalen Strukturelements (**Abbildung 32E-F**).

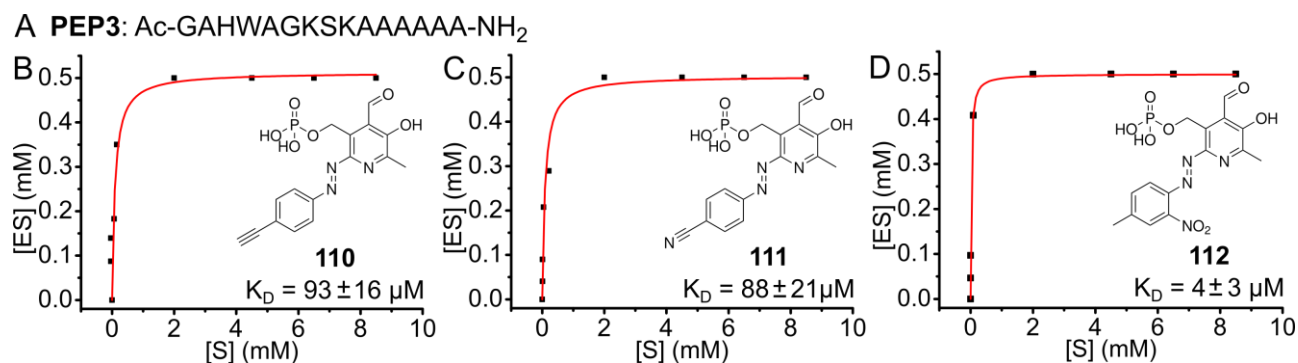
Im weiteren Verlauf des Projekts wurden die Dissoziationskonstanten  $K_D$  sämtlicher synthetisierte Azo-PLP-Derivate gegenüber verschiedenen Peptiden ermittelt. Eine Übersicht der PLP-Derivate, die einen messbaren  $K_D$ -Wert besitzen, ist in **Tabelle 4** dargestellt.

**Tabelle 4:** Auflistung von Peptiden und PLP-Derivaten, deren  $K_D$ -Wert bestimmt werden konnte.

PLP-Derivat	$K_D$	PLP-Derivat	$K_D$
<b>Ac-GADWAGKSKAAAAAA-NH<sub>2</sub> (PEP4)</b>			
 93	$2560 \pm 590 \mu\text{M}$		
<b>Ac-GAGWAGKSKAAAAAA-NH<sub>2</sub> (PEP1)</b>			
 93	$227 \pm 51 \mu\text{M}$	 109	$70 \pm 13 \mu\text{M}$
<b>Ac-GAGWAGKSK-NH<sub>2</sub> (PEP2)</b>			
 93	$535 \pm 58 \mu\text{M}$		
<b>Ac-GAHWAGKSKAAAAAA-NH<sub>2</sub> (PEP3)</b>			
 93	$45 \pm 10 \mu\text{M}$	 110	$93 \pm 16 \mu\text{M}$
 111	$88 \pm 21 \mu\text{M}$	 112	$4 \pm 3 \mu\text{M}$

Bei Analyse der **Tabelle 4** ist auffällig, dass speziell **PEP3** eine besonders hohe Affinität gegenüber den PLP-Derivaten zeigt. Für die PLP-Derivate **93**, **110**, **111** konnten zweistellige mikromolare  $K_D$ -Werte bestimmt werden. **112** wurde bislang mit einer Dissoziationskonstante  $K_D$  von  $4 \pm 3 \mu\text{M}$  als bester Binder ermittelt (siehe **Abbildung 33**).





**Abbildung 33:** Anhand der Daten der HPLC-Bindungsstudien konnte mittels *Michaelis-Menten*-artiger Kinetik die Ausgleichskurve (rot) und somit die Dissoziationskonstante  $K_D$  verschiedener PLP-Derivate gegenüber **PEP3** bestimmt werden. Die dargestellten PLP-Derivate zeigen bemerkenswert niedrige mikromolare  $K_D$ -Werte.

Die Dissoziationskonstanten für PLP und dessen bindende Enzyme sind je nach Art der Biotransformation stark unterschiedlich. So werden in der Literatur  $K_D$ -Werte im Bereich von 1 nM (4-Aminobutyrat-Amintransferase) bis 1.42  $\mu\text{M}$  (Cystathionase) beschrieben.<sup>[281-284]</sup> In diesen Enzymen wird PLP in einer dreidimensionalen Tasche mit zahlreichen Seitenketten stabilisiert.

Insofern ist es bemerkenswert, dass bereits das 15 Aminosäure-haltige Peptid **PEP3** das PLP-Derivat **112** mit einem  $K_D$ -Wert von ca.  $4 \pm 3 \mu\text{M}$  bindet und somit dessen Bindungsaffinität mit wenig affinen PLP-Enzymen nahezu vergleichbar ist.

Während der HPLC-Bindungsstudien wurde festgestellt, dass eine  $\text{NaBH}_4$ -Reduktion für die elektronenreicheren PLP-Derivate **110**, **111**, **112** zu **PEP3** nicht nötig ist. Die *Schiff'sche* Base dieser PLP-Derivate ist derart stabil, dass sie in der HPL-Chromatografie detektiert werden kann. Zukünftig kann somit auf die  $\text{NaBH}_4$ -Behandlung während der Affinitätsuntersuchung verzichtet werden. Darüber hinaus wurde beobachtet, dass auch die Azogruppe der elektronenreicheren PLP-Derivate wie **110**, **111**, **112** durch die  $\text{NaBH}_4$ -Behandlung nicht reduziert wird. Die Peptid-Markierung blieb somit vollständig intakt. Dies war für PPADS nicht der Fall.

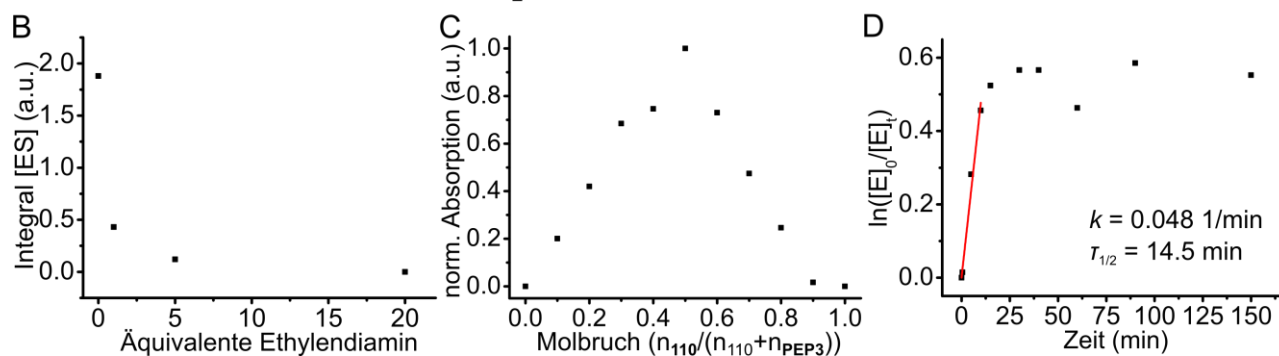
#### Untersuchungen zum Ablauf der Reaktion:

Im weiteren Verlauf der HPLC-Bindungsstudien wurde der Ablauf der Reaktion eingehend charakterisiert. Aufgrund der Stabilität während der HPL-Chromatografie wurde für diese Untersuchungen das Peptid **PEP3** und das PLP-Derivat **110** verwendet (siehe **Abbildung 34**).

Zunächst sollte nachgewiesen werden, dass der erhaltene Reaktionsumsatz tatsächlich auf einer reversiblen Iminbildung beruht und eine unbekannte C-C-Bindungsknüpfung ausgeschlossen ist.

Hierzu wurde **PEP3** mit fünf Äquivalenten **110** für eine Stunde bei 37 °C inkubiert, sodass ein vollständiger Umsatz zum entsprechenden Imin stattfand. Daraufhin wurden verschiedenen Ansätzen je eine unterschiedliche Menge an Ethylendiamin zugefügt, die Reaktionsmischung für eine Stunde bei 37 °C inkubiert und anschließend per HPL-Chromatografie analysiert (siehe **Abbildung 34B**). Es zeigte sich, dass ab ca. 20 Äquivalenten Ethylendiamin vollständig freies Peptid vorliegt. Ob Ethylendiamin mit PLP-Derivat **110** zu einem zyklischen Aminoal oder einem Hemiaminal reagiert, müssen zukünftige Experimente zeigen. Entscheidend ist jedoch, dass die Peptid-Markierung reversibel ist und eine C-C-Bindungsknüpfung ausgeschlossen werden kann.

A **PEP3**: Ac-GAHWAGKSKAAAAAA-NH<sub>2</sub>



**Abbildung 34:** Experimente zur Charakterisierung der Peptid-Markierung. A) Verwendetes Peptid **PEP3**. B) Die Peptid-Markierung ist reversibel, da durch Zugabe von Ethylendiamin zu PLP-Derivat-markiertem Peptid freies Peptid erhalten wird. C) *Job*-Plot-Untersuchungen ergaben eine Bindungsstöchiometrie von Peptid **PEP3** und PLP-Derivat **110** von 1:1. D) Die Messung der Reaktionsgeschwindigkeit deutet auf eine Reaktion 1. Ordnung hin. Des Weiteren konnte die Gleichgewichtseinstellung der Reaktion bereits nach 21 Minuten beobachtet werden.

Des Weiteren wurde im Rahmen einer *Job*-Plot-Untersuchung die Stöchiometrie der Peptid-Markierung bestimmt (siehe **Abbildung 34B**). Hierbei werden in verschiedenen Ansätzen die Molfraktionen der Bindungspartner **PEP3** und **110** bei konstanter Gesamt-Konzentration variiert. Die Produktbildung wurde durch HPL-Chromatografie analysiert und gegen den Molbruch von **110** aufgetragen. Der Molbruch am Maximum korrespondiert dabei mit der Stöchiometrie des Liganden im Komplex.<sup>[285-289]</sup>

Für die Bindungspartner **PEP3** und **110** konnte ein Maximum bei einem Molbruch von 0.5 beobachtet werden, woraus auf eine 1:1-Bindungsstöchiometrie geschlossen werden kann. Die obige Annahme, dass nur eines der beiden Lysine im Peptid reagiert, konnte somit erfolgreich nachgewiesen werden.

In einem weiteren Experiment wurde die Reaktionsgeschwindigkeit der Proteinmarkierung unter-

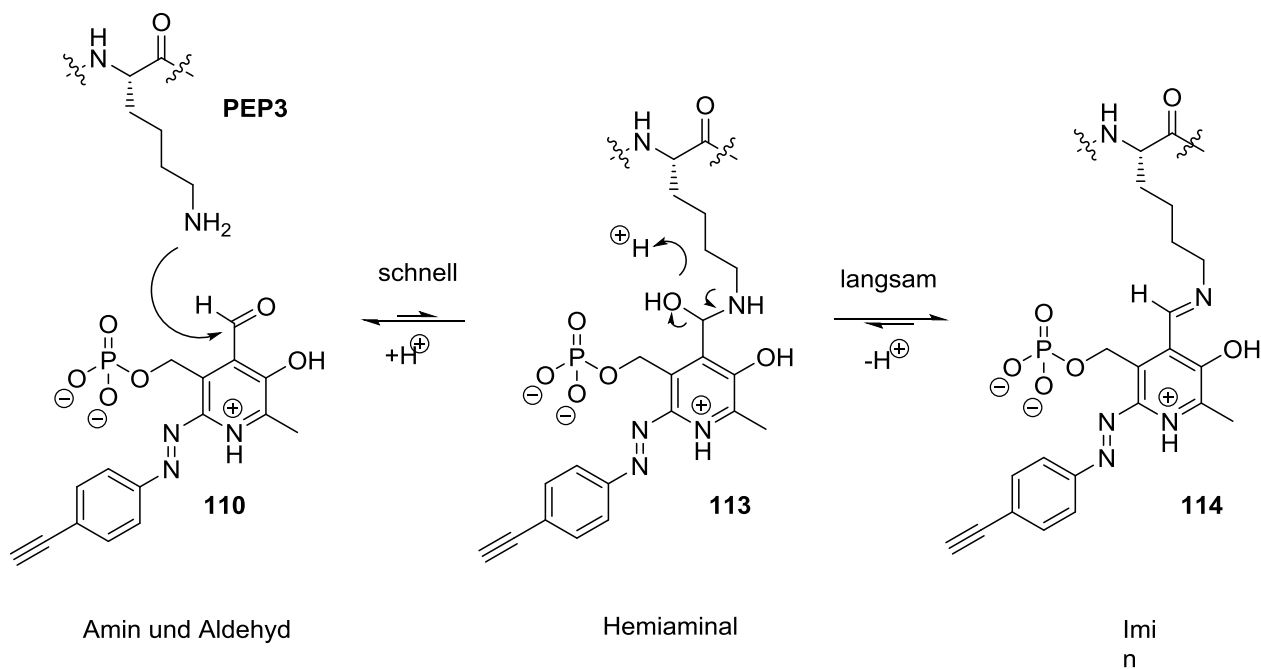
sucht. Zum einen sollte damit die Reaktionsordnung bestimmt werden. Zum anderen sollte die Annahme, dass sich die Reaktion nach einer Stunde im Gleichgewicht befindet, durch die Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeitskonstante verifiziert werden. Im Rahmen einer diskontinuierlichen Messung wurde der Fortschritt der Reaktion zu definierten Zeitpunkten anhand der sinkenden Konzentration des freien Peptids [E] per HPL-Chromatografie analysiert. Die Anfangskonzentrationen von Peptid **PEP3** und PLP-Derivat **110** waren gleich.

Durch Einsetzen der erhaltenen Datenwerte in das umgeformte Zeitgesetz der Reaktion 1. Ordnung und anschließendem Auftrag gegen die Zeit konnte ein linearer Zusammenhang beobachtet werden. Für die Reaktionen 0. und 2. Ordnung war dies nicht möglich.

Das Ergebnis, dass eine bimolekulare Reaktion eine Reaktionskinetik 1. Ordnung besitzt, mag zunächst widersprüchlich erscheinen. Jedoch konnten in verschiedenen Studien für PLP-bindende Proteine dieses Phänomen beschrieben und z.T. aufgeklärt werden.<sup>[290-293]</sup> Zunächst reagiert das  $\epsilon$ -Amin des Lysins mit der Carbonylgruppe des PLP reversibel zu einem Hemiaminal. In einer darauffolgenden Reaktion 1. Ordnung erfolgt unter Wasserabspaltung die Bildung des Imins. Letzterer Schritt ist unter leicht basischen Reaktionsbedingungen geschwindigkeitsbestimmend. Die Gleichgewichtsreaktion des ersten Schritts zum Hemiaminal findet sehr schnell und in sehr geringer Konzentration statt. Daher wird diese häufig für die Berechnung der Gleichgewichtskonstanten der Gesamtreaktion vernachlässigt.<sup>[290]</sup> Dieser Zwei-Schritt Mechanismus ist eine starke Vereinfachung des komplizierten Bindungsmechanismus von PLP. Tatsächlich treten in allen Schritten weitere Gleichgewichtsreaktionen zu tautomeren Strukturen und Protein-abhängige Wechselwirkungen zu verschiedenen Seitenketten auf.

Auf Basis der literaturbekannten Untersuchungen sowie der Messung der Reaktionsgeschwindigkeit kann die folgende Hypothese zur Bindung von PLP-Derivat **110** zu **PEP3** aufgestellt werden (siehe **Schema 31**):

Bei einem pH-Wert von 7.4 liegt unter Berücksichtigung der *Henderson-Hasselbalch*-Gleichung nur eines von 795 Lysinen deprotoniert vor ( $pK_s$  (Lysin) = 10.28).<sup>[294]</sup> Dieses reagiert relativ schnell mit der Carbonylgruppe des PLP-Derivats zum Hemiaminal **113**. Hierbei liegt das chemische Gleichgewicht aus energetischen und entropischen Gründen jedoch weit auf der Seite der Edukte. Das Hemiaminal **113** kann durch Wasserabspaltung in einer Reaktion 1. Ordnung zum Imin **114** weiterreagieren. Da hierfür zunächst die Hydroxygruppe protoniert werden muss, ist diese Reaktion aufgrund des leicht basischen Milieus unwahrscheinlich und daher langsam. Somit ist der zweite Schritt der Reaktion der geschwindigkeitsbestimmend.



**Schema 31:** Vermutlicher Ablauf der Iminbildung von Lysin und PLP.

Da auch der zweite Schritt reversibel ist, entscheidet nur das Verhältnis der freien Enthalpie  $\Delta G^\circ$  von Edukt und Produkt über die Lage des Gleichgewichts.

Unter den verwendeten Bedingungen konnte bei äquimolaren Konzentrationen von **PEP3** und PLP-Derivat **110** das Einstellen eines Gleichgewichts bei ca. 65% des Reaktionsumsatzes beobachtet werden. Die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante  $k$  betrug  $0.048 \text{ min}^{-1}$ , die Halbwertszeit  $\tau_{1/2} = 14.5 \text{ min}$ . Das Gleichgewicht stellte sich nach etwa 21 min ein.

Mittels der Messung der Reaktionsgeschwindigkeit konnte somit neben der Zuordnung der Reaktion (Reaktion 1. Ordnung) auch die Annahme, dass die Reaktion innerhalb einer Stunde im Gleichgewicht vorliegt, bestätigt werden.

## 7.4.2 NMR-Bindungsstudien

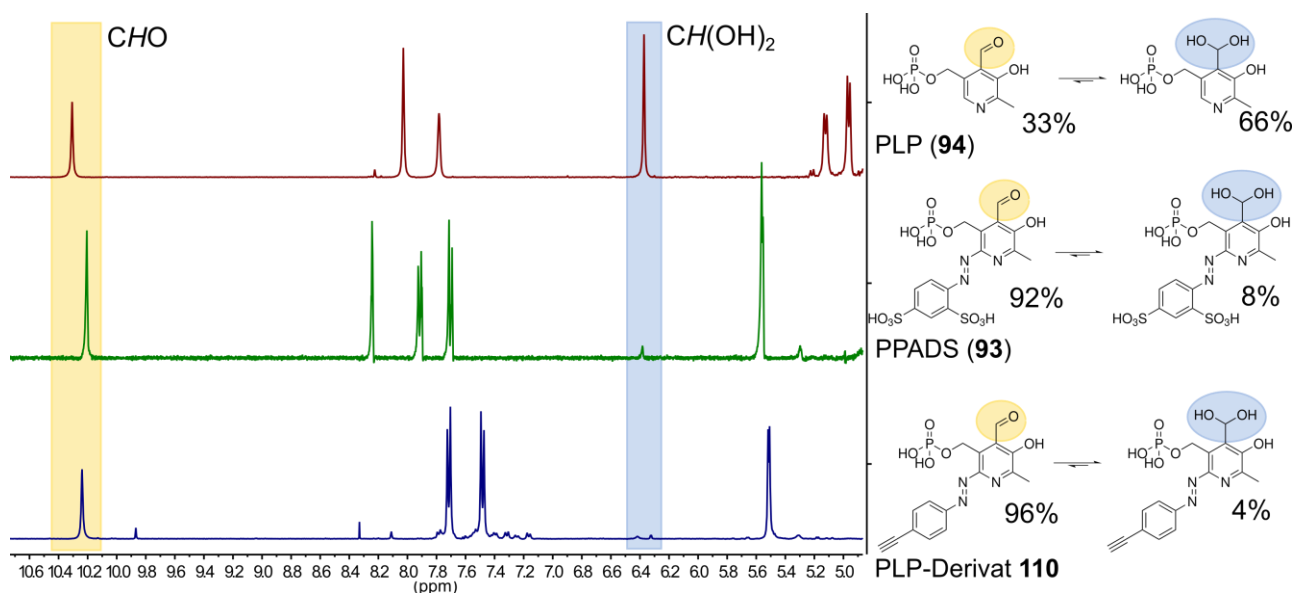
Zusätzlich zu den HPLC-Studien wurde die Iminbindung auch in NMR-Studien charakterisiert. Dies ermöglichte neben einem weiteren Nachweis der Iminbildung auch Einflüsse der C6-Modifizierung auf die Bindungsaffinität zumindest teilweise aufzuklären.

Als Lösungsmittel wurde für die NMR-Studien stets ein Gemisch aus PBS-Puffer mit 10 mM  $\text{MgCl}_2$  (pH = 7.4) und  $\text{D}_2\text{O}$  im Verhältnis 9:1 verwendet, die Konzentration des Analyten betrug meist 3.5 mM und die Protonenresonanz wurde mittels Wasserunterdrückung gemessen.

### Aldehyd-Hydrat-Gleichgewicht von PLP-Derivaten

Zunächst wurde das Aldehyd-Hydrat-Gleichgewicht der entsprechenden PLP-Derivate analysiert (siehe **Abbildung 35**). Dabei stellte sich heraus, dass PLP unter den gegebenen Bedingungen zu 66% als Hydrat vorlag. Bei PLP-Derivaten mit Azophenyl-Substituent lag das Gleichgewicht hingegen deutlich auf Seiten des Aldehyds. So liegt PPADS lediglich zu 8%, das PLP-Derivat **110** sogar nur zu 4% als Hydrat vor.

Mit dem Wissen, dass PPADS eine im Vergleich zu PLP höhere Bindungsaffinität zu Lysin besitzt, kann anhand des Hydratisierungs-Gleichgewichts geschlossen werden, dass die elektronischen Eigenschaften des Aldehyds ein entscheidender Faktor für die Stabilität der Bindung sind. Je elektronenreicher die Carbonyl-Gruppe, desto stabiler ist der Aldehyd bzw. das Imin.



**Abbildung 35:** Analyse des Hydratisierungs-Gleichgewichts der Carbonylgruppe in PLP (**94**), PPADS (**93**) und PLP-Derivat **110**. Je elektronenreicher die Carbonyl-Gruppe, desto stabiler ist der Aldehyd gegenüber einer Hydratisierung.

### Nachweis der erfolgreichen Iminbildung

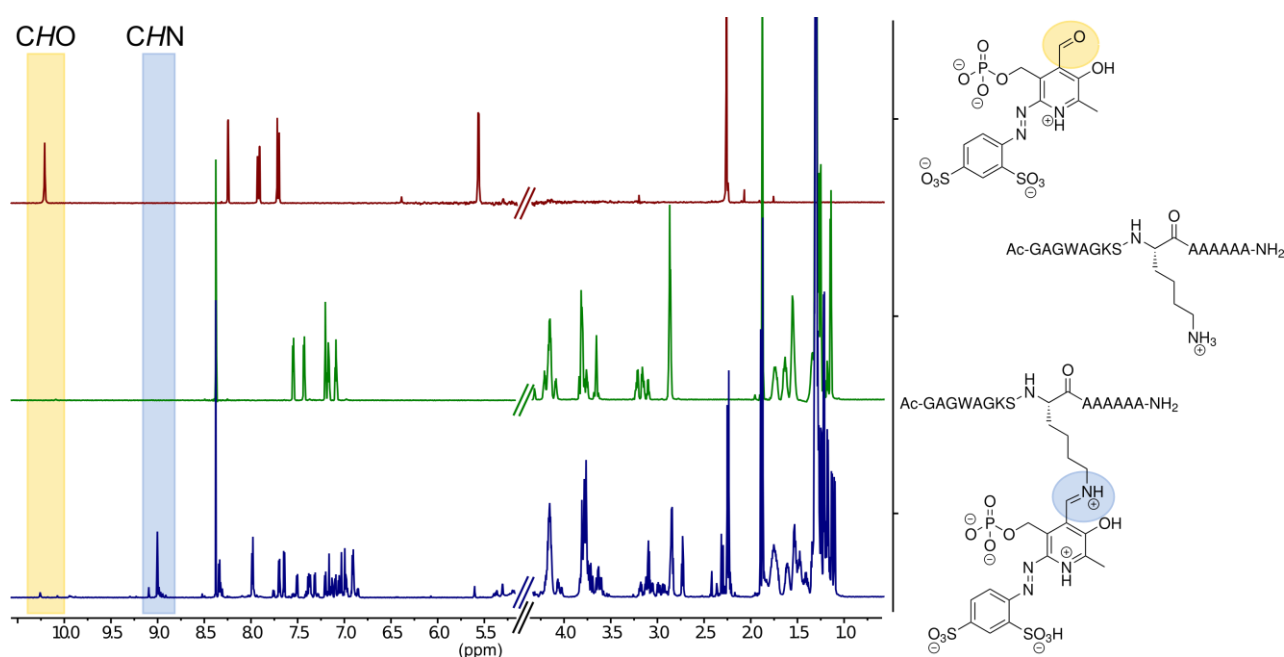
Im weiteren Verlauf wurde zum Nachweis der Iminbindung je ein <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von PPADS, dem Peptid **PEP3** und von beiden in äquimolaren Mengen nach einer Reaktionszeit von einer Stunde aufgenommen (siehe **Abbildung 36**).

Bei einem Vergleich der Spektren ist festzustellen, dass das Signal des Aldehyd-Protons von PPADS (ca. 10.5 ppm) im Produkt nahezu verschwunden und stattdessen im Bereich von 9.0 ppm ein neues Signal zu detektieren ist. Dieses ist das α-ständige Proton zur Imin-Funktionalität, was durch ein

NOESY-Experiment (s.u.) nachgewiesen werden konnte. Dadurch konnte die erfolgreiche Iminbildung erneut bewiesen werden.

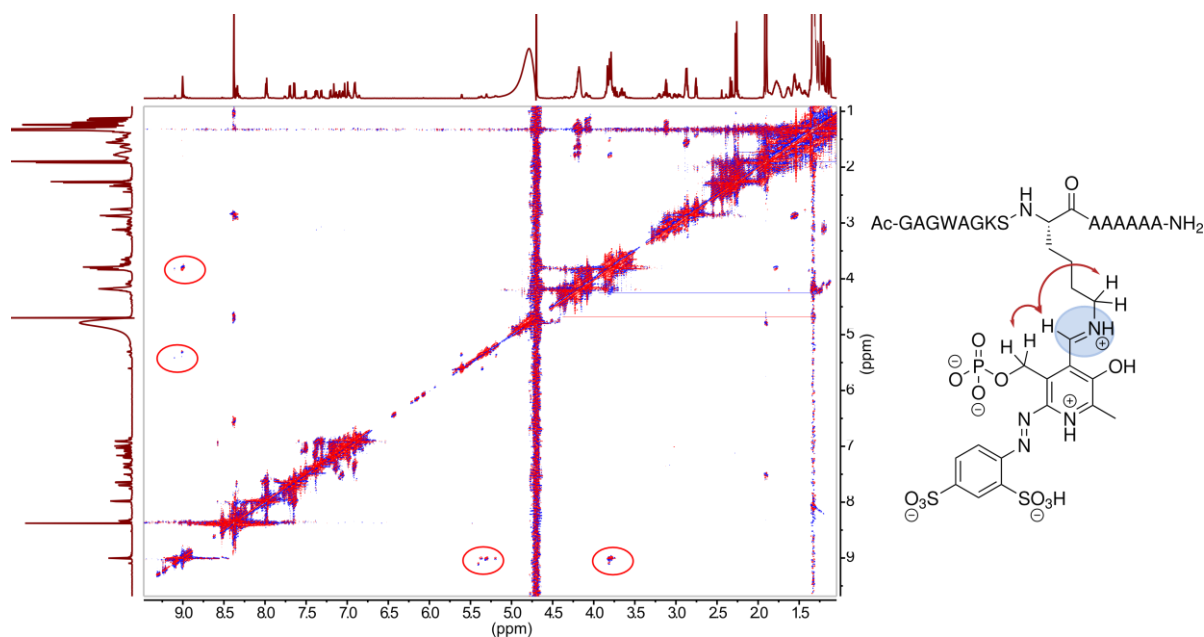
Nach Integration der Signale konnte auf ca. 90% Iminbildung und 10% Aldehyd geschlossen werden, was sehr gut mit den HPLC-Daten übereinstimmt.

Im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Produktes sind mehrere Signalsätze zu beobachten. Ausgehend von deren Intensität kann auf die Bildung von zwei Hauptprodukten und mindestens zwei weiteren Nebenprodukten geschlossen werden. Der Grund für die verschiedenen Signalsätze konnte nicht aufgeklärt werden. Möglicherweise sind Konformationsänderungen der Sekundärstruktur des Peptids hierfür verantwortlich.



**Abbildung 36:**  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von PPADS (**93**, oben), Peptid **PEP3** (Mitte) und dem Reaktionsprodukt nach einer Stunde bei  $37\text{ }^\circ\text{C}$  in äquimolaren Mengen.

Die Aufnahme eines NOESY des Reaktionsproduktes konnte letztendlich die erfolgreiche Iminbildung nachweisen (siehe **Abbildung 37**). Die vollständige Zuordnung aller  $^1\text{H-NMR}$ -Signale war auch mithilfe weiterer 2D-NMR-Experimenten aufgrund der vier Signalsätze nicht möglich. Zusätzlich konnten die typischen ( $i, i+1$ )-NOEs des Peptidrückgrats nicht beobachtet werden. Dies liegt vermutlich an der Messung in leicht basischem Puffer-Medium, was einen schnellen H-D-Austausch bewirkt, sowie einer eher flexiblen Sekundärstruktur des Peptids. Dennoch konnten die meisten der erhaltenen NOE-Signale eindeutig zugeordnet werden.



**Abbildung 37:** NOESY-Spektrum des Produktes. Die in Rot eingekreisten NOE-Signale (links) weisen die erfolgreiche Bildung des Imins nach (rechts).

Die Iminbildung konnte aufgrund zweier NOE-Signale zweifelsfrei nachgewiesen werden. So konnte ein NOE zwischen den charakteristischen Protonen der Methylengruppe des PLP-Derivates (ca. 5.3 ppm) und dem  $\alpha$ -ständige Proton zum Imin (ca. 9.0 ppm) sowie ein NOE zwischen letzterem und den  $\varepsilon$ -Protonen eines Lysins detektiert werden. Bei deutlicher Vergrößerung sind überdies die NOEs zwischen  $\varepsilon$ -,  $\delta$ - und  $\gamma$ -Protonen sichtbar. Welches der beiden Lysine im Peptid die *Schiff'sche* Base eingeht, konnte aufgrund der fehlenden Zuordnung nicht geklärt werden.

Bemerkenswert ist die Tatsache, dass die Intensität der NOEs der Iminbindung relativ hoch ist. Dies deutet auf ein starres Molekülgerüst im Bereich der *Schiff'schen* Base hin, was wahrscheinlich auf der zusätzlichen Wasserstoffbrückenbindung zwischen der *ortho*-ständigen Hydroxygruppe und dem Imin basiert.

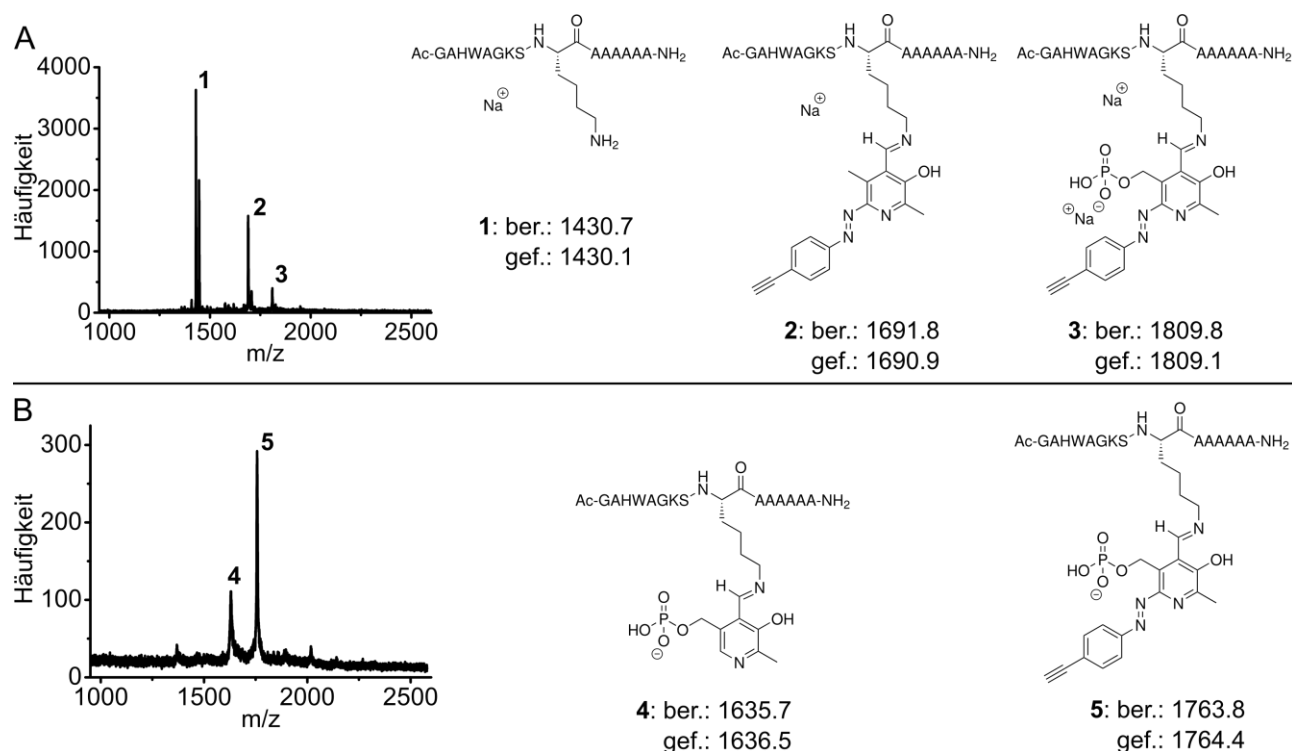
Zusammenfassend ermöglichten die NMR-Studien zum einen den Nachweis der Bildung der *Schiff'schen* Base. Zum anderen konnte festgestellt werden, dass eine elektronenschiebende C6-Modifizierung am PLP den Aldehyd im Aldehyd-Hydrat-Gleichgewicht stabilisiert. Es ist davon auszugehen, dass diese Stabilisierung auch für das Imin und somit für die Peptid-Markierung gilt.

### 7.4.3 Massenspektrometrische-Bindungsstudien

Des Weiteren wurde die Bindung zwischen PLP-Derivat **110** und Peptid **PEP3** massenspektrometrisch per MALDI-TOF untersucht. Beide Verbindungen wurden hierfür äquimolar (500  $\mu\text{M}$ ) in PBS-Puffer mit 10 mM  $\text{MgCl}_2$  (pH = 7.4) gelöst und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Da die Bindung wahrscheinlich durch Kationen wie  $\text{Mg}^{2+}$  stabilisiert wird, wurde auf das obligatorische Entsalzen der Reaktionslösung verzichtet und direkt gemessen.

Im Positiv-Modus sind dabei drei Signale zu beobachten (siehe **Abbildung 38A**). Diese konnten dem freien Peptid **PEP3** (**1**), dem Produkt ohne Phosphat-Substituenten (**2**) und dem vollständigen Produkt (**3**) zugeordnet werden. Der *neutral-loss* von Phosphat ist ein häufig zu beobachtendes Phänomen im Positiv-Modus. Aufgrund unterschiedlicher Ionisationspotentiale ist anhand der Signal-Intensität keine quantitative Aussage möglich.

Im Negativ-Modus sind sogar lediglich Produkt-Signale, mit (**5**) und ohne Azophenyl-Rests (**4**), detektierbar (siehe **Abbildung 38B**). Dies liegt sehr wahrscheinlich daran, dass das Produkt aufgrund des Phosphat-Substituenten im Vergleich zum Edukt ein deutlich schlechteres Ionisierungs-



**Abbildung 38:** MALDI-TOF-Untersuchungen zur Bindung des PLP-Derivat **110** und Peptid **PEP3**. A) Im Positiv-Modus können neben dem Signal für das Edukt **PEP3** (**1**) auch eindeutig die Signale des Produkts, ohne Phosphat (*neutral-loss*, **2**) und mit Phosphat (**3**), detektiert werden. B) Im Negativ-Modus können ausschließlich die Signale des Produkts mit (**5**) und ohne Azophenyl-Rests (**4**) beobachtet werden.



verhalten zeigt.

Eindrucksvoll ist die Tatsache, dass die Iminbindung derart stabil ist, dass sie massenspektrometrisch detektiert werden kann. Eine vorherige Imin-Reduktion ist daher nicht notwendig. Somit konnte die Iminbildung auch massenspektrometrisch nachgewiesen werden.

Interessanterweise wurde bei einem Experiment, bei dem die Probe für drei Stunden entsalzt wurde, neben einem nur kleinen Produktsignal auch ein kleines, kaum messbares Signal für eine doppelte Peptid-Markierung detektiert. Es ist davon auszugehen, dass der Salzzug die Sekundärstruktur des Peptids auflöst, wodurch beide Lysine zu einem relativ instabilen Imin reagieren können.

### 7.4.4 Weitere Bindungsstudien

Zur weiteren Bindungsevaluation wurden UV/VIS- und CD-Spektroskopie verwendet sowie eine lichtinduzierte Reversibilität der Bindung erprobt.

#### UV/VIS-Spektroskopie

In der Literatur wird die Bindung von PLP an Lysinen aufgrund der einfachen Durchführung meist mittels UV/VIS-Spektroskopie untersucht. Ungebundenes PLP besitzt in wässrigen Puffermedien ein Absorptionsmaximum um 385 nm. Nach Ausbildung der *Schiff*'schen Base mit Lysin erfolgt eine bathochrome Verschiebung des Maximums zu ca. 405 nm. Nach Reduktion des Imins mit NaBH<sub>4</sub> wird ein Maximum um 325 nm erhalten.<sup>[295-301]</sup>

Interessanterweise ist in der Literatur keine UV/VIS-spektroskopische Bindungsuntersuchung von Lysin mit PPADS (**93**) oder anderen Azo-PLP-Derivaten beschrieben.

Zeitabhängige UV/VIS-spektroskopische Untersuchungen einer Mischung aus PLP-Derivat **110** und Peptid **PEP3** in äquimolaren Mengen analog zu den HPLC-Experimenten zeigten im Verlauf von zwei Tagen keine messbare Veränderung im Absorptionsspektrum (siehe **Abbildung 39A**). Die erwartete bathochrome Verschiebung ausgehend vom Absorptionsmaximum bei ca. 410 nm konnte damit nicht beobachtet werden. Jedoch konnte für diese Probe die Umsetzung zur *Schiff*'schen Base per HPLC nachgewiesen werden.

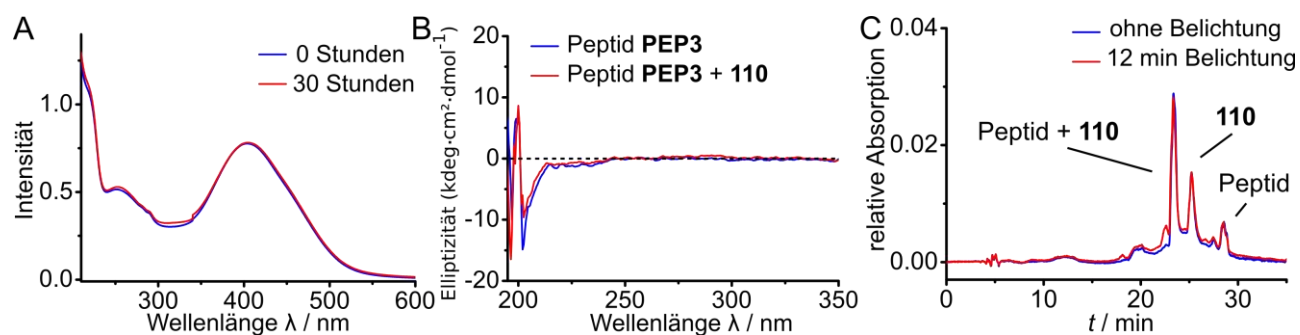
Aufgrund des Azorests am PLP und dem damit einhergehenden großen Extinktionskoeffizienten wird möglicherweise eine bathochrome Verschiebung des Maximums verdeckt bzw. findet nicht statt. Die UV/VIS-Spektroskopie war somit zur Bindungscharakterisierung nicht geeignet.

#### CD-Spektroskopie

Mithilfe von CD-spektroskopischen Untersuchungen wurde versucht, Informationen über die sekundäre Peptidstruktur von **PEP3** vor und nach Umsetzung mit PLP-Derivat **110** in PBS-Puffer mit

10 mM MgCl<sub>2</sub> zu erhalten. In **Abbildung 39B** sind die entsprechenden CD-Spektren von **PEP3** zu den Zeitpunkten vor und nach Umsetzung mit PLP-Derivat **110** dargestellt. **PEP3** besitzt anfänglich eine eher ungeordnete Struktur (*random coil*, Minimum bei 202 nm).<sup>[302,303]</sup> Jedoch können auch lokale Minima bei 221 nm und 235 nm detektiert werden, die auf das Vorhandensein einer  $\alpha$ -helikalen Struktur deuten. Diese Beobachtung würden mit dem verwendeten Peptid-Modell übereinstimmen, welches einen  $\alpha$ -helikalen C-Terminus sowie eine N-terminale Schleife besitzt, wobei letztere im CD-Spektrum als *random coil*-Struktur zu sehen sollte.

Nach Zugabe von PLP-Derivat **110** fand keine messbare Veränderung statt. Somit konnten mittels CD-Spektroskopie keine neuen Informationen zur Iminbildung erhalten werden.



**Abbildung 39:** A) Die UV/VIS-Spektren einer 1:1 Mischung aus PLP-Derivat **110** und Peptid **PEP3** direkt nach Mischung und nach 30 Stunden zeigen trotz nachgewiesener Bindung keinen Unterschied. B) Die CD-Spektren von Peptid **PEP3** vor und nach Zugabe von PLP-Derivat **110** deuten nicht auf eine Veränderung der sekundären Struktur während der Imin-Bildung. C) Umkehrphasen-HPL-Chromatogramme vor und nach Belichtung (12 min) einer 1:1 Mischung aus **PEP3** und **110** im Gleichgewichtszustand (60% *Schiff'sche* Base-Produkt, 0-60% Puffer B in 30 min).

### Lichtinduzierte Bindungsreversibilität

Aufgrund der Azo-Funktionalität in PLP-Derivat **110** ist dessen lichtinduzierte *trans-cis*-Isomerisierung theoretisch möglich.<sup>[304]</sup> Die dadurch erfolgende Konformationsänderung des Azophenyl-Restes könnte zu negativen Wechselwirkungen zwischen Peptid und PLP-Derivat **110** führen. Denkbar wäre zum einen, dass die stabilisierende  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkung zu Tryptophan nicht mehr möglich ist, zum anderen, dass es zu sterischen Wechselwirkungen zwischen dem Azophenyl-Rest des PLP-Derivat **110** und dem Peptid kommt. Dies würde das Gleichgewicht der *Schiff'schen* Base-Reaktion in Richtung der Edukte beeinflussen. Eine lichtinduzierte *trans-cis*-Isomerisation könnte somit im Idealfall zur Abspaltung der PLP-Markierung verwendet werden.

In einem ersten Versuch wurde hierzu ein äquimolares Gemisch aus **PEP3** und **110** im Gleichgewichtszustand (1 h Inkubationszeit, ca. 60% *Schiff'sche* Base-Produkt) in PBS-Puffer mit 10 mM MgCl<sub>2</sub> mit einer 380 nm Photodiode bestrahlt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde ein HPL-Chromatogramm zur Beobachtung einer eventuellen Abspaltung der PLP-Markierung aufgenommen (siehe **Abbildung 39C**). Jedoch konnte keine Produkt-Abnahme beobachtet werden. Eine längere Belichtung resultierte lediglich in der Zersetzung von **110**.

Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass gebundenes PLP-Derivat **110** nach Belichtung sehr schnell zur *trans*-Konformation zurück isomerisiert, sodass eine zweistufige bimolekulare Hydrolyse der Iminbindung nicht stattfinden kann. Die schnelle Isomerisierung ist sicherlich auf die elektronenschiebende Eigenschaft der *para*-ständigen Hydroxygruppe in **110** zurückzuführen. In der Literatur konnten bereits bei ähnlichen Azobenzol-Derivaten in leicht basischem PBS-Puffer Isomerisierungszeiten im Nanosekunden-Bereich gemessen werden.<sup>[305]</sup>

Denkbar wäre auch, dass eine Isomerisierung keinerlei Einfluss auf die Iminbindung hat.

### 7.4.5 Erste Struktur-Aktivität-Beziehungen bezüglich des Azophenyl-Rests

Auf Grundlage der HPLC-Bindungsstudien (siehe **Tabelle 4**) und NMR-Untersuchungen können erste Struktur-Aktivitäts-Beziehungen zwischen Substitutionsmustern des Azophenyl-PLP-Rests und der Stabilität der Iminbindung hergeleitet werden.

- Der Azophenyl-Rest ist entscheidend für einen vollständigen Reaktionsumsatz zum Imin. Dies hat zwei Gründe: Zum einen stabilisiert dieser wahrscheinlich mittels  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen zum Histidin bzw. Tryptophan die Bindung. Sind diese Aminosäuren im Peptid nicht vorhanden, so werden niedrigere Affinitäten erhalten. Zum anderen bewirken die elektronenschiebenden Eigenschaften des Azophenyl-Rests eine Stabilisierung des Imins.
- Trotz des relativ elektronenarmen Azophenyl-Rests besitzt PPADS im Vergleich zu den elektronenreicheren PLP-Derivaten **110** und **111** eine ähnliche Affinität. Dies ist mit hoher Wahrscheinlichkeit entropisch begründet. So besitzt der PPADS-Azophenylrest eine eher hydrophobe sowie eine mit zwei Sulfonat-Substituenten hydrophilere Seite. In den *Modeling*-Ergebnissen befindet sich die unsubstituierte Azophenyl-Seite in der hydrophoben Peptid-Tasche. Die zwei Sulfonat-Substituenten befinden sich auf der gegenüberliegenden Seite und somit an der Oberfläche des Peptid-Komplexes, was eine Interaktion mit Wasser ermöglicht. Diese entropisch günstige Wechselwirkung ist für die PLP-Derivate **110** und **111** nicht

möglich. Daher ist trotz des elektronenreicheren Rests keine Affinitätsteigerung beobachtbar. Im PLP-Derivat **112** werden beide Aspekte kombiniert, sodass erstmals ein einstellig mikromolarer "Binder" erhalten wurde.

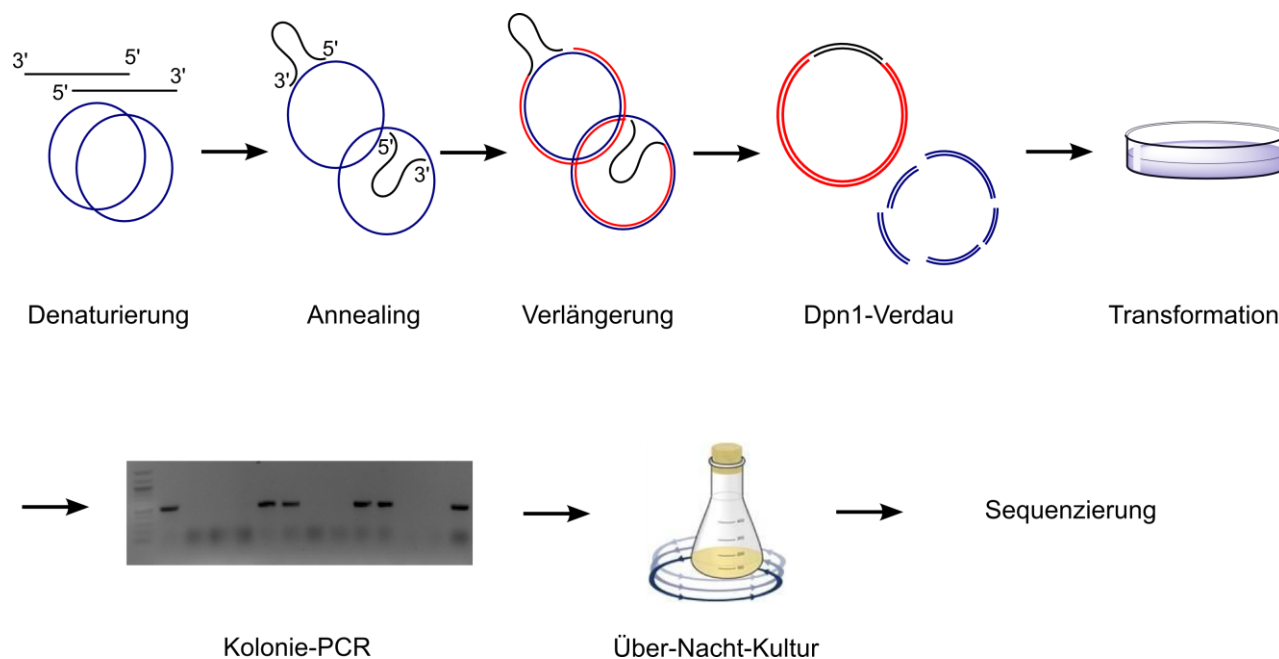
Zusammenfassend sind die elektronischen und strukturellen Eigenschaften des PLP-Derivats von entscheidender Bedeutung für den Erhalt einer hohen Affinität. Sie bedürfen einer exakten Feinabstimmung zwischen Elektronik, Struktur und Löslichkeit.

## 7.5 Übertragung der Peptidsequenz in ein Protein

In den vorherigen Kapiteln wurde die Entwicklung und Charakterisierung der Methode zur reversiblen Markierung von kurzen, Lysin-haltigen Peptiden mit PLP-Derivaten beschrieben. Mit dem Kenntnis einer Peptidsequenz, die mikromolar ein PLP-Derivat bindet, sollte nun das eigentliche Ziel, nämlich die Markierung von Proteinen, verwirklicht werden. Hierzu wurde zunächst die Peptidsequenz in ein Protein inkorporiert und anschließend Untersuchungen zur Affinität der Proteinmarkierung durchgeführt.

Zur Inkorporation der Peptidsequenz wurde meist nach einer Kombination des Protokolls von *Bryksin et al.* und der Anleitung des QuikChange®-Kits von *Agilent-Technologies* vorgegangen.<sup>[306]</sup>

**Schema 32** zeigt die hierfür notwendigen Arbeitsschritte. Zunächst wurden Primer so gewählt, dass sie an der entsprechenden Schnittstelle komplementär binden und zusätzlich die zu insertierende



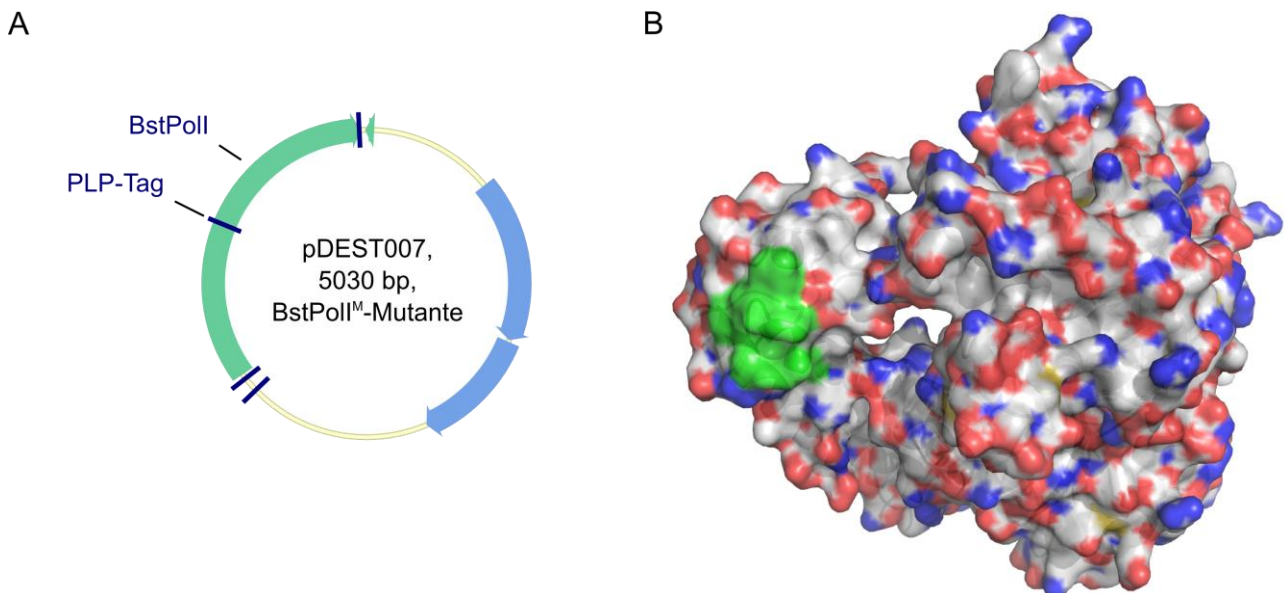
**Schema 32:** Übersicht der Arbeitsschritte zur Inkorporation der *Lead*-Sequenz in ein Protein.

Sequenz beinhalten. Das nachfolgende Annealing sowie die Verlängerung durch die Polymerase *Phusion* resultierte in einem modifizierten, offenkettigen Plasmid. Die Fragmentierung des teilweise methylierten Originalplasmids erfolgte durch das Restriktionsenzym *DpnI*, welches selektiv zwischen methyliertem Desoxyadenosin und Desoxythymidin schneidet. Dies garantierte in der anschließenden Transformation mit 10-beta-kompetenten *E. coli*-Zellen (High Efficiency, NEB®) den Erhalt von *E. coli*-Kolonien mit modifiziertem Plasmid. Per Kolonie-PCR konnten Kolonien, die kein oder Plasmid falscher Länge produzierten, aussortiert werden. In der nachfolgenden Über-Nacht-Kultur mit anschließender Plasmid-Isolierung wurde eine ausreichende Menge an Plasmid für weitere Experimente erhalten. Die erfolgreiche Mutagenese konnte durch Sequenzierung des Plasmids bestätigt werden.

So gelang die Mutation zwei verschiedener Proteine, auf die im Folgenden näher eingegangen wird.

### 7.5.1 Mutagenese von BstPoli

Im AK Carell wurde die Polymerase BstPoli mit einer Größe von ca. 66 kDa bereits für verschiedene Untersuchungen kristallisiert.<sup>[307]</sup> Neben einem massenspektrometrischen und biochemischen Nachweis der erfolgreichen Proteinmarkierung wäre eine zusätzliche Kristallstruktur ideal, um die Markierung ausführlicher zu charakterisieren. Daher wurde BstPoli als erstes Protein für die Mutagenesestudie gewählt.



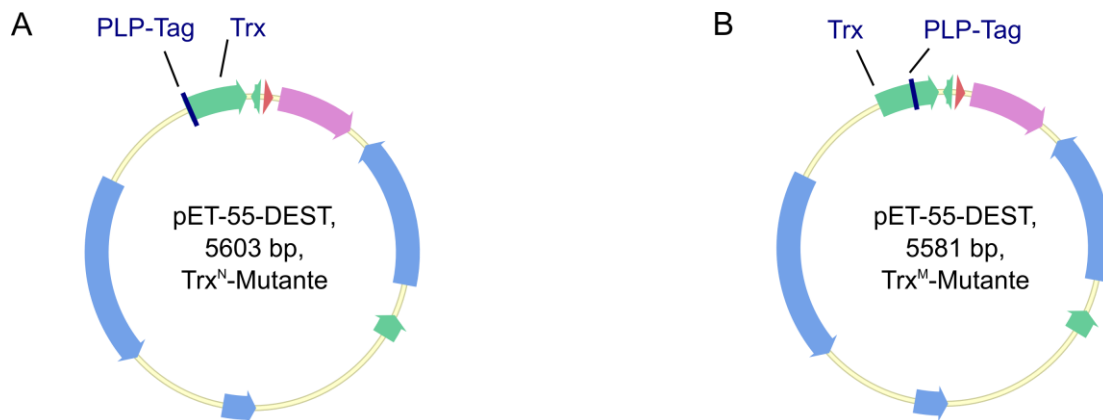
**Abbildung 40:** Mutagenese von BstPoli. A) Plasmid-Karte des mutierten BstPoli zeigt die exakte Stelle der Mutation (PLP-Tag). B) Kristallstruktur von BstPoli mit Grün eingezeichneter Position der Mutation (pdb-Code: 1LVE).

Dabei wurde ein auf der Proteinoberfläche vorkommendes, direkt vor einem  $\alpha$ -helikalen Strukturelement liegendes Sequenzmotiv entsprechend verändert (siehe **Abbildung 40**). Aufgrund einiger Ähnlichkeiten des Sequenzmotivs bzgl. der Leadsequenz **SEQ4**, wurden lediglich der vier Aminosäure-langer Sequenzabschnitt mit der ursprünglichen Sequenz *IVEN* zu *GKSK* mutiert. Die Mutation wurde mit dem QuikChange®-Kit von *Agilent-Technologies* durchgeführt und die nachfolgende Sequenzierung zeigte die erfolgreiche Mutation zur BstPolI-Mutante BstPolI<sup>M</sup>.

### 7.5.2 Mutagenese von Thioredoxin

Als zweites Protein wurde Thioredoxin (Trx) gewählt. Die geringen Größe von 17 kDa sollte die massenspektrometrische Intakt-Messung des Proteins zum Nachweis der Proteinmarkierung ermöglichen. Ziel war die *N*- und *C*-terminale Implementierung der Sequenz *GAHWAGKSK* in das Protein durch Insertion. Darüber hinaus sollte diese Sequenz durch Mutation an einer geeigneten Stelle mittig in der Aminosäuresequenz des Proteins eingebaut werden.

Dazu wurde nach **Schema 32** vorgegangen, wodurch die Plasmide der *N*-terminalen- (Trx<sup>N</sup>) sowie der Mitte-Mutante (Trx<sup>M</sup>) erhalten werden konnten (siehe **Abbildung 41**). Versuche zur Generierung des Plasmids einer *C*-terminalen-Mutante scheiterten zweimal aus unbekanntem Gründen.



**Abbildung 41:** Mutagenese von Thioredoxin. A) Plasmidkarte der *N*-terminalen Mutante Trx<sup>N</sup> sowie (B) der Mitte-Mutante Trx<sup>M</sup> von Thioredoxin mit der Mutationsstelle (PLP-Tag).

## 7.6 Erste biochemische und massenspektrometrische Nachweise der funktionierenden Proteinmarkierung

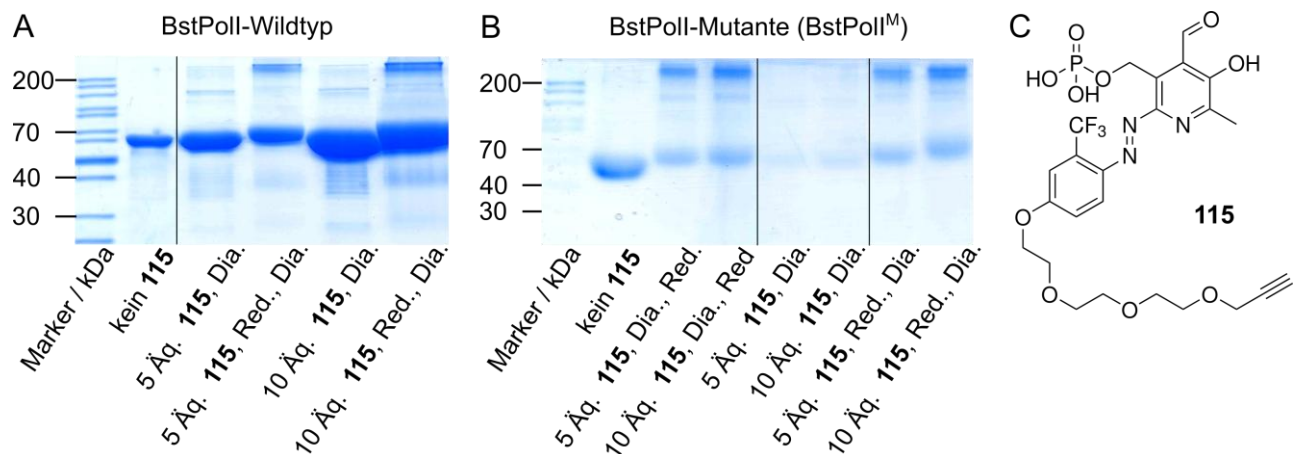
Die weiteren biochemischen und massenspektrometrischen Studien zur Proteinmarkierung wurden von *S. Thallmair* und *N. Simon* (AK Carell) durchgeführt. Zunächst wurden die Plasmide BstPolI<sup>M</sup>,

Trx<sup>N</sup> und Trx<sup>M</sup> exprimiert und die erhaltenen Proteine anschließend aufgereinigt.

In ersten Experimenten zum Nachweis der funktionierenden Markierung an Proteinen wurde die Polymerase BstPolI sowie deren Mutante BstPolI<sup>M</sup> mit dem PLP-Derivat **115** umgesetzt und die entstandenen Produkte durch Gelelektrophorese (SDS-PAGE) analysiert (siehe **Abbildung 42**). Hierbei werden Proteine im elektrischen Feld nach der Molekülmasse aufgetrennt.

Zunächst wurde als Kontrollexperiment BstPolI-Wildtyp, welche aufgrund fehlender Sequenzmodifizierung nicht markiert werden sollte, unter verschiedenen Bedingungen mit PLP-Derivat **115** versetzt (hergestellt von *S. Stazzoni* (AK Carell), siehe **Abbildung 42A/C**).

Bei Umsetzung mit 5 bzw. 10 Äquivalenten **115** für 1 h bei 37 °C in PBS-Puffer mit 10 mM MgCl<sub>2</sub> und anschließender Dialyse für 2 h zur Entfernung nicht gebundenem **115** kam es zu keiner Verschiebung der Proteinbande im SDS-PAGE-Gel. Findet allerdings nach Umsetzung von BstPolI-Wildtyp mit **115**, jedoch vor Dialyse, eine Reduktion der *Schiff'schen* Base mit NaBH<sub>4</sub> für 1 h bei 37 °C statt, so kann eine Verschiebung der Proteinbande in Richtung größerer Proteinmassen beobachtet werden. Aus diesen Resultaten kann geschlossen werden, dass **115** mit Lysinen von BstPolI-Wildtyp eine *Schiff'sche* Base bildet, welche durch Reduktion nachgewiesen werden konnte. Allerdings ist die *Schiff'sche* Base nicht stabil, sodass mittels Dialyse das Gleichgewicht der Reaktion sich auf der Seite der Edukte befindet.



**Abbildung 42:** Analyse der Umsetzung der Proteine BstPolI-Wildtyp und BstPolI<sup>M</sup> mit dem PLP-Derivat **115** mittels Gelelektrophorese (SDS-PAGE).

Im weiteren Verlauf wurde die Umsetzung der BstPolI-Mutante BstPolI<sup>M</sup> mit PLP-Derivats **115** untersucht. Nach Umsetzung von BstPolI<sup>M</sup> mit 5 bzw. 10 Äquivalenten **115**, Dialyse für 2 h und Reduktion mit NaBH<sub>4</sub> konnte in beiden Fällen im Vergleich zur Probe ohne **115** eine eindeutige Verschiebung der Proteinbande in Richtung größerer Proteinmassen beobachtet werden (siehe **Abbildung 42B**). Ohne Reduktion konnte zwar eine ähnliche Verschiebung jedoch aus bislang unbe-

kannten Gründen nur mit sehr schwacher Intensität detektiert werden. Falls nach Umsetzung zunächst reduziert und anschließend dialysiert wurde, war die Proteinbande bei 5 Äquivalenten **115** ähnlich, bei 10 Äquivalenten etwas mehr im Vergleich zu den vorherigen Proben in Richtung größerer Proteinmassen verschoben. Da im Gegensatz zum Wildtyp bei BstPoll<sup>M</sup> trotz Dialyse für 2 h eine klare Verschiebung der Proteinbande zu beobachten war, kann davon ausgegangen werden, dass bei BstPoll<sup>M</sup> eine thermodynamisch sehr stabile *Schiff'sche* Base mit **115** gebildet wurde. Dies kann nur auf die Sequenzmodifizierung in BstPoll<sup>M</sup> zurückgeführt werden und ist somit der erstmalige Nachweis, dass diese Markierungsmethode auch nach Implementierung in ein Protein funktioniert.

Zukünftig sollte zur einfacheren Detektion zwischen Edukt und Produkt ein PLP-Derivat mit größerer Masse verwendet werden. Weiterhin ist für den weiteren Nachweis der korrekten Proteinmarkierung auch die massenspektrometrische Analyse der Proteinbande erforderlich. Darüber hinaus kann in Zukunft durch Wiederholung dieser Untersuchungen mit anderen Proteinen wie z.B. mit Trx<sup>N</sup> und Trx<sup>M</sup> das breite Anwendungsspektrum dieser Markierungsmethode aufgezeigt werden.

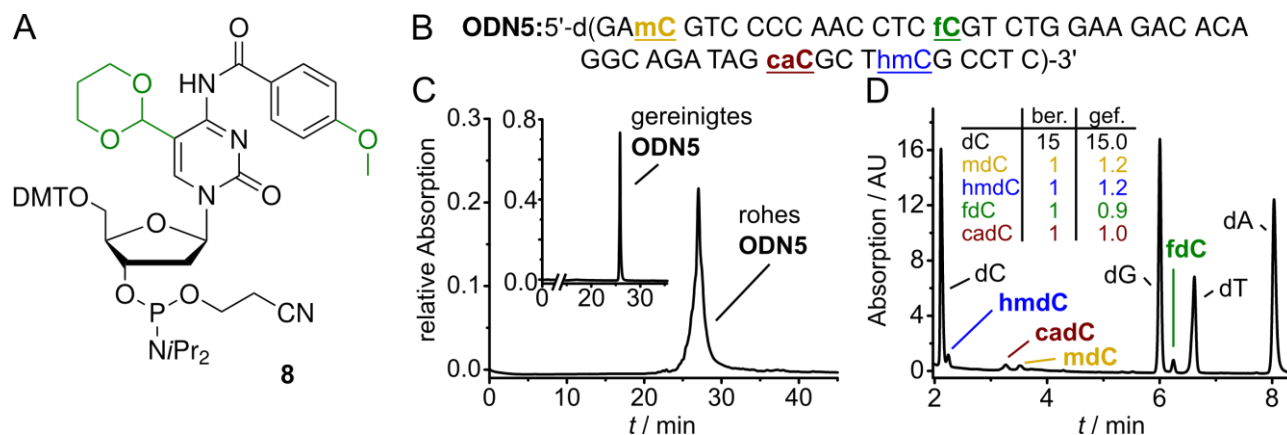


## 8 Zusammenfassung

Schwerpunkt dieser Promotionsarbeit war die Modifizierung von Biomolekülen im Rahmen von zwei unterschiedlichen Themengebieten: Epigenetik und Proteinchemie. In beiden Bereichen wurden jeweils chemische Reaktionen zur spezifischen Markierung von Nucleosiden bzw. Proteinen entwickelt, was deren umfassende Untersuchung im biologischen Kontext ermöglichte.

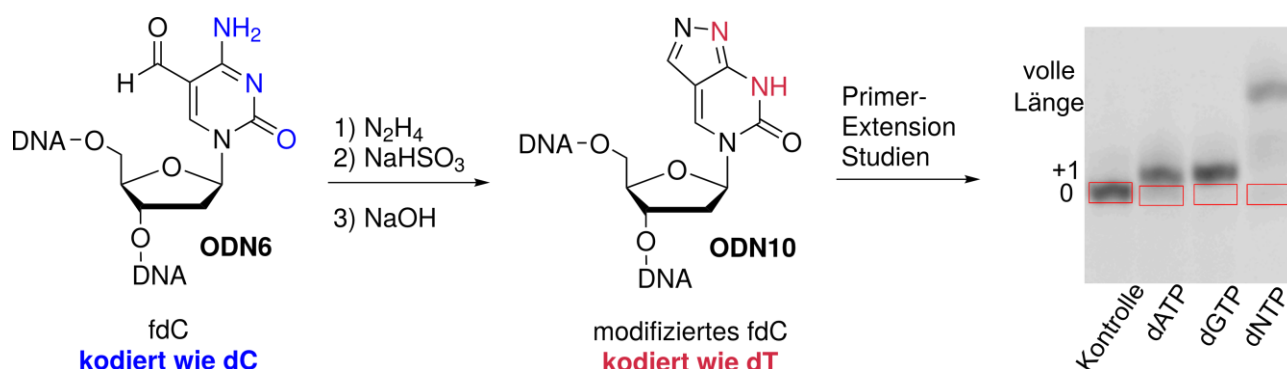
Obwohl alle Zellen eines multizellulären Organismus ein identisches Erbgut besitzen, unterscheiden sie sich stark in Morphologie und Funktion (z.B. Neuronen und Drüsenzellen). Dies ist möglich, indem Zellen während ihrer Entwicklung zu definierten Zeitpunkten bestimmte Gene aktivieren oder stilllegen. Letzteres kann u. a. im epigenetischen Metabolismus durch Methylierung von 2'-Desoxycytidin (dC) zu 5-Methyl-2'-desoxycytidin (mdC) erfolgen. 2009 bzw. 2011 wurden 5-Hydroxymethyl- (hmdC) bzw. 5-Formyl- (fdC) und 5-Carboxy-2'-desoxycytidin (cadC) als Produkte einer *Ten-eleven Translocation* (TET)-Enzym vermittelten Oxidation von mdC in Stammzellen entdeckt. Diese neuen Nucleoside gelten seitdem als Intermediate einer aktiven DNA-Demethylierung, die eine direkte Reaktivierung von Genen ermöglichen. Allerdings ist nach wie vor der exakte Mechanismus unbekannt. In verschiedenen Studien wurde die Basenexzisionsreparatur (BER), in der fdC und cadC zunächst mittels *Thymin-DNA-Glykosylase* (TDG) aus der DNA entfernt und in der nachfolgenden DNA-Reparatur durch dC ersetzt werden, als möglicher Mechanismus der aktiven Demethylierung gezeigt. Die damit verbundene Generierung von abasischen Stellen ist für die genomische Integrität allerdings problematisch. Als mögliche Alternative wurde im Arbeitskreis Carell eine aktive Demethylierung mittels C-C-Bindungsbruch in Form einer Deformylierung bzw. Decarboxylierung ausgehend von fdC bzw. cadC postuliert. Diese Hypothese wurde im ersten Teil dieser Arbeit umfangreich überprüft. Darüber hinaus wurden neue Methoden zur Untersuchung der biologischen Funktion des fdC-Nucleosids entwickelt.

Der zu Beginn dieser Promotionsarbeit kommerziell erhältliche fdC-Phosphoramidit-Baustein war aufgrund verschiedener Probleme zur Synthese fdC-haltiger Oligodesoxynucleotide (ODN) kaum geeignet. Im Zuge dieser Arbeit wurden die Nebenreaktionen des fdC-Phosphoramidits während der DNA-Festphasensynthese umfangreich analysiert. Die Entwicklung einer neuen Schutzgruppenstrategie resultierte im effizienteren fdC-Phosphoramidit-Baustein **8** (siehe **Abbildung 43**). Dieser garantiert die Herstellung fdC-haltiger ODN in hoher Qualität sowie Quantität und ermöglicht darüber hinaus zukünftig *in vitro* Studien von ODN, die alle vier epigenetisch relevanten DNA-Nucleoside besitzen. Aufgrund der optimalen Kupplungseigenschaften ist **8** mittlerweile vom U.S.-Unternehmen *Glen Research* kommerziell erhältlich.



**Abbildung 43:** A) Strukturformel des neuen fdC-Phosphoramidit-Bausteins **8**. B-D) Die neuartige Schutzgruppenstrategie erlaubte erstmalig die hoch effiziente Synthese eines ODN mit allen vier epigenetisch relevanten DNA-Basen.

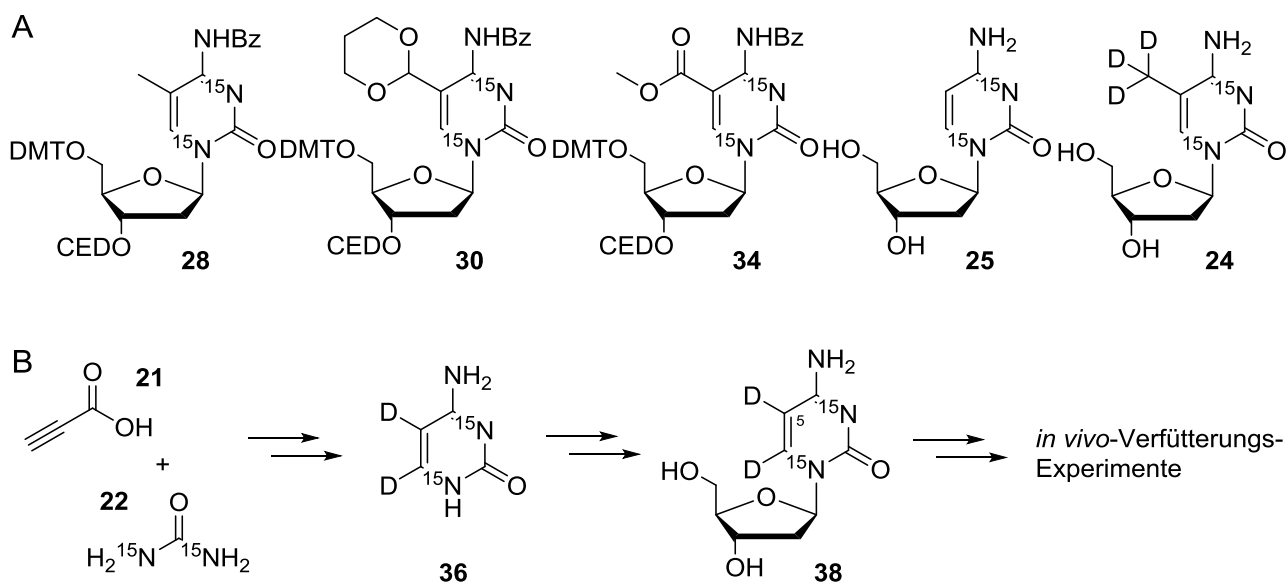
Die exakte Lokalisierung von fdC in genomischer DNA ist zur Aufklärung von dessen biologischer Funktion von größter Bedeutung. Bisherige fdC-Sequenzierungsmethoden mit basengenaue Auflösung basierten allerdings auf einer ineffizienten Bisulfit-abhängigen Umsetzung. In dem Versuch, die Kodierungseigenschaft von fdC auch ohne Bisulfit-Behandlung zu verändern, wurde in dieser Promotionsarbeit die Formyl-Gruppe von fdC mit Hydrazin zum Hydrazon-Derivat funktionalisiert und anschließend zum Bizyklus Pyrazolo[3,4-*d*]-dC zyklisiert (siehe **Abbildung 44**). Erste Primer-Extension-Studien zeigten, dass diese Umsetzung zumindest teilweise zu einer dC-zu-dT-Kodierung von fdC führte, wodurch die problematische Bisulfit-Behandlung zukünftig hätte vermieden werden können. Fortführende Experimente zur bisulfitfreien fdC-Sequenzierung wurden aufgrund des Erscheinens einer Publikation mit sehr ähnlicher Methode nicht unternommen.



**Abbildung 44:** Erste, vielversprechende Studie zur Entwicklung einer bisulfitfreien fdC-Sequenzierungsmethode.

Der Mechanismus der aktiven Demethylierung sollte zunächst im Rahmen von *Isotope-Tracing*-Studien in verschiedenen *in vitro*-Experimenten mit isotope-markierten ODN untersucht werden.

Hierfür wurden die  $^{15}\text{N}_2$ -markierten Phosphoramidite von mdC **28**, fdC **30** und cadC **34** synthetisiert und anschließend mittels DNA-Festphasensynthese in ODN eingebaut (siehe **Abbildung 45A**). Darüber hinaus wurden die isoto­penmarkierten Nukleoside  $^{15}\text{N}_2$ -dC **25** und  $\text{D}_3$ ,  $^{15}\text{N}_2$ -mdC **24** für die anschließende, massenspektrometrische Analyse der *in vitro*-Experimente hergestellt. Für den erstmaligen Nachweis eines C-C-Bindungsbruchs *in vivo* wurde das speziell isoto­penmarkierte Nukleosid  $\text{D}_2$ ,  $^{15}\text{N}_2$ -dC **38** als geeignetes Werkzeug entwickelt (siehe **Abbildung 45B**). Die Verfütterung von  $\text{D}_2$ ,  $^{15}\text{N}_2$ -dC an Zellen sowie die nachfolgende Metabolisierung würde zunächst in isoto­penmarkiertem mdC und somit im Verlust des Deuteriums an C5-Position resultieren. Fände die postulierte C-C-Bindungsbruchreaktion ausgehend von fdC oder cadC statt, müsste dessen Produkt,  $\text{D}_1$ ,  $^{15}\text{N}_2$ -dC, in der DNA detektiert werden können.  $\text{D}_2$ ,  $^{15}\text{N}_2$ -dC **38** wurde daraufhin ausgehend von Propiol­säure und  $^{15}\text{N}_2$ -Harnstoff mit hoher Isoto­penreinheit hergestellt.

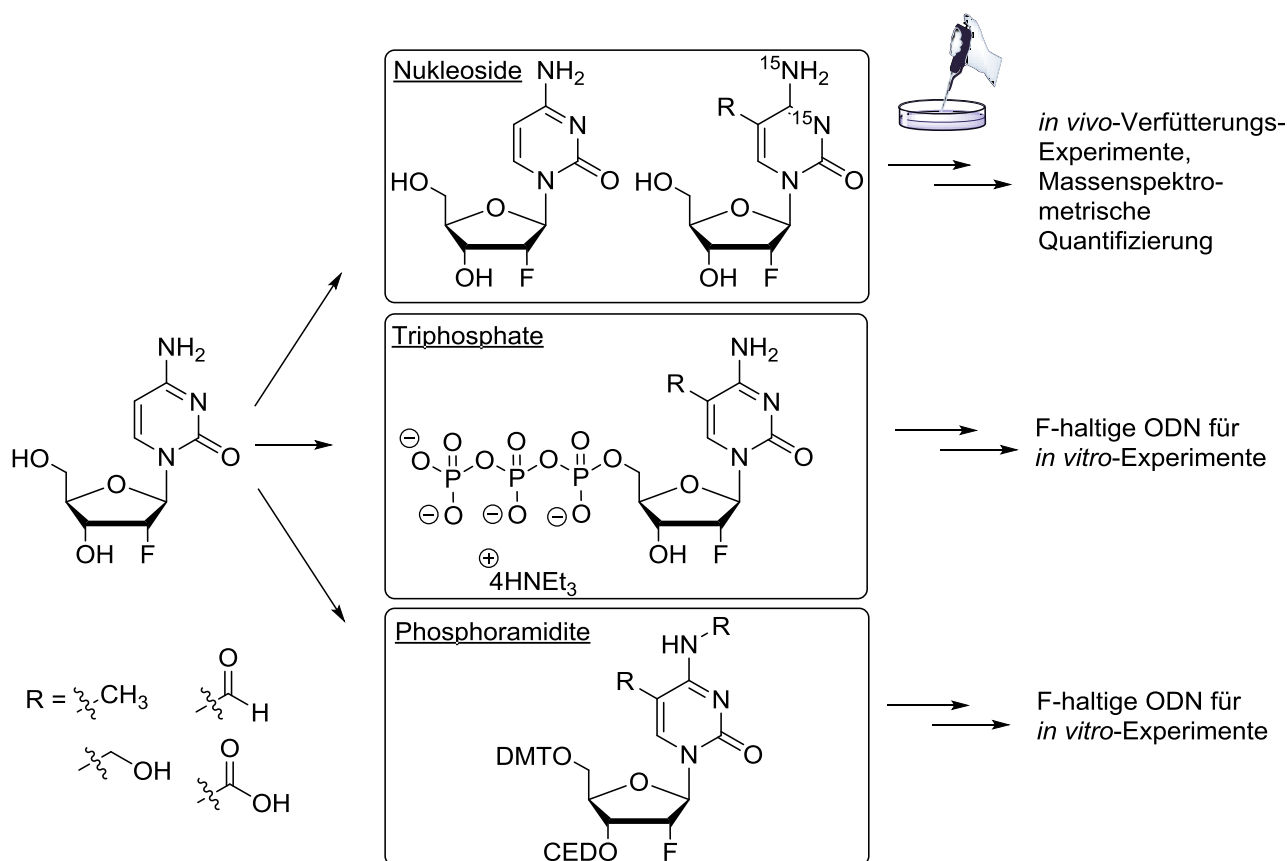


**Abbildung 45:** A) Strukturformeln der hergestellten isoto­penmarkierten Phosphoramidit-Bausteine und Nukleoside für *in vitro*-Experimente und die massenspektrometrische Quantifizierung. B) Syntheseroute zur Herstellung von  $\text{D}_2$ ,  $^{15}\text{N}_2$ -dC **38** als ideales Werkzeug zur Aufklärung der aktiven Demethylierung.

In ersten zellbiologischen Experimenten erfolgte die Verfütterung von synthetisiertem  $\text{D}_2$ ,  $^{15}\text{N}_2$ -dC u. A. an embryonale Stammzellen der Maus ohne TDG-Enzym (mES-Zellen  $\text{TDG}^{-/-}$ ), in denen die BER von fdC und cadC nicht möglich ist. Durch Detektion von ungefähr 600000 neugebildeten  $\text{D}_1$ ,  $^{15}\text{N}_2$ -dC-Molekülen innerhalb von 3 Tagen war erstmalig der Nachweis einer C-C-Bindungsbruchreaktion zur aktiven Demethylierung *in vivo* gelungen.

Parallel zu diesen *Isotope-Tracing*-Studien wurde die aktive Demethylierung durch Verwendung von 2'-Fluor-(R)-substituierten Analoga (F-Analoga) der epigenetisch relevanten Nukleoside unter-

sucht. Hierbei war die Hypothese, dass eine bioisostere F-Substitution zwei entscheidende Vorteile zur Aufklärung der aktiven Demethylierung bietet. Zum einen wird die Aktivierungsenergie zum Oxocarbenium-Übergangszustand während der TDG-vermittelte Deglykosylierungsreaktion erhöht, was in der Hemmung der TDG-Aktivität und somit der BER resultieren sollte. Zum anderen wären aufgrund der um 18 amu höheren Masse Signalüberlappungen mit natürlich vorhandenem dC ausgeschlossen, was zur vereinfachten massenspektrometrischen Quantifizierung betragen würde.



**Abbildung 46:** Strukturformeln der in dieser Arbeit hergestellten 2'-fluorierten Nucleosid-Derivate.

Zur Überprüfung der Hypothese wurden mittels einer hoch divergenten Synthesestrategie erstmals sämtliche 2'-F-Analoga der epigenetisch relevanten Nucleoside sowie deren Triphosphate und Phosphoramidit-Bausteine hergestellt. Der Schlüssel zum Erfolg war hierbei die Anwendung spezifischer, metallkatalysierter C5-Modifizierungsreaktionen. Die in maximal fünf Stufen hergestellten F-Nucleoside wurden anschließend für *in vivo*-Verfütterungsexperimente sowie für deren nachfolgende massenspektrometrische Analyse verwendet. Darüber hinaus wurden verschiedene Strategien zur Synthese isotope markierter F-Nucleoside untersucht, die in der Herstellung von  $^{15}\text{N}$ -F-dU und  $^{15}\text{N}_2$ -F-dC resultierten. Die Synthese der F-Triphosphate erfolgte unter modifizierten *Eckstein*-Bedingungen in einer Stufe ausgehend von den entsprechenden Nucleosiden mit guten Ausbeuten.

In den nachfolgenden PCR-Studien konnte festgestellt werden, dass die F-Substitution der Triphosphate die Aktivität der Polymerasen nicht negativ beeinflusst, sodass bereits unter Standardbedingungen die entsprechenden PCR-Produkte erhalten wurden. Dies ermöglichte die Generierung langer, F-haltiger DNA-Fragmente für zukünftige Proteomik-Untersuchungen. Des Weiteren wurden in maximal acht Stufen die Phosphoramidit-Bausteine von F-mdC, F-hmdC, F-fdC und F-cadC hergestellt und erfolgreich in der DNA-Festphasen-Synthese zur Herstellung Fluor-haltiger ODN verwendet. Diese wurden anschließend für erste *in vitro*-Experimente verwendet. Hierbei konnte zum einen die anfängliche Hypothese, dass eine zusätzliche F-Substitution bei fdC und cadC zu einer Hemmung der TDG-Aktivität führt, bestätigt werden. Zum Anderen wurde in C5-Methylierungs- und TET1cd-vermittelten Oxidations-Experimenten keine Beeinträchtigung der Aktivität epigenetisch relevanter Enzyme aufgrund der F-Substitution beobachtet. Im anschließenden *in vivo*-Verfütterungsexperiment mit F-fdC konnte aufgrund der Detektion von F-dC erneut der Nachweis der aktiven Demethylierung mittels C-C-Bindungsbruch erbracht werden.

In dieser Promotionsarbeit wurden somit im Bereich der Epigenetik Moleküle entwickelt und hergestellt, die eine biokompatible, innovative Reportersonde in Form einer speziellen Isotopen- bzw. 2'-Fluor-Markierung besaßen. Deren *in vivo* Verstoffwechslung im Rahmen des epigenetischen Metabolismus ermöglichte erstmalig den zweifelsfreien Nachweis einer C-C-Bindungsbruch-Reaktion zur aktiven Demethylierung von mdC.

Die selektive Markierung von Molekülen ist derzeit auch im Bereich der Proteinchemie von großer Bedeutung. Zahlreiche, in den letzten Jahren vorgestellte Methoden zur Proteinmodifizierung verwenden unnatürliche Aminosäuren. Diese ermöglichen zwar eine hochselektive Markierung, deren Inkorporation in Proteine ist jedoch zeit- und materialaufwendig. Im Gegensatz dazu resultiert die Modifizierung einer natürlichen Aminosäure aufgrund deren großer Abundanz häufig in inhomogenen Produktgemischen. Der Einbau einer spezifischen Sequenz aus kanonischen Aminosäuren in ein Protein ist aufgrund hochentwickelter Molekularbiologie und Gensynthese heutzutage Routine. Dies erlaubt die selektive Proteinmarkierung, ist jedoch häufig aufgrund der notwendigen Verwendung von Metallen oder organischen Lösungsmitteln nicht biokompatibel. In Anbetracht der bislang problematischen Generierung homogener Antikörper-Wirkstoff-Konjugate ist die Entwicklung neuer Methoden zur sequenzspezifischen Proteinmarkierung daher von höchster Relevanz.<sup>[156-159]</sup>

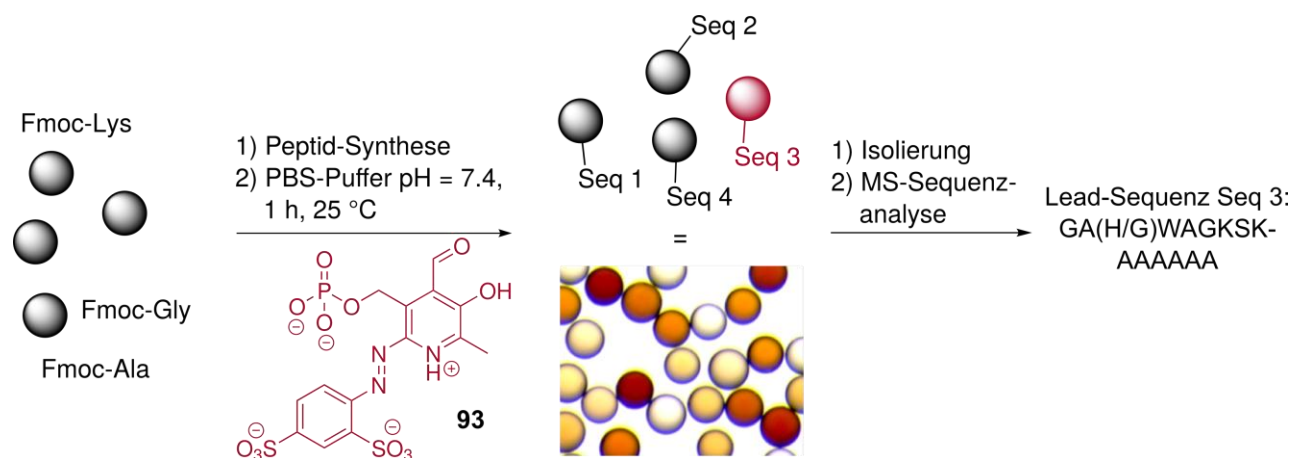
Infolgedessen wurde in dieser Promotionsarbeit eine sequenzspezifische, reversible Proteinmarkierung entwickelt. Ziel war es, die Reaktivität eines Lysins an der Oberfläche des Proteins durch rationale Punktmutation der Sequenzumgebung derart zu beeinflussen, dass es mit einem Aldehyd

eine thermodynamisch stabile *Schiff'sche* Base eingeht. Vorteil zu bisherigen Methoden wäre vor allem die Reversibilität der Markierung sowie die zu erwartende relativ geringe Sequenzmodifizierung des Proteins. Als Aldehyd wurde Pyridoxalphosphat (PLP) aufgrund der sehr gut erforschten Bindungsaffinität zu Lysinen verwendet.

Zur Identifizierung einer minimalen PLP-bindenden Peptidsequenz wurde zunächst eine rationale *Lead*-Sequenz modelliert. Da sich das Gleichgewicht der Reaktion von Lysin und PLP zum entsprechenden Imin in Wasser bei  $\text{pH} = 7$  auf Seiten der Edukte befindet, wurde sich auf weitere, stabilisierende Wechselwirkungen zwischen PLP und Peptid fokussiert. Diese sollten zur Bildung einer thermodynamisch stabilen *Schiff'schen* Base beitragen. In *Docking*-Studien wurde festgestellt, dass durch geschickte Verwendung eines *Walker A*-Motivs in der Peptidsequenz der Phosphat-Rest des PLP am Peptid gebunden werden kann. Darüber hinaus sollte die Verwendung aromatischer Aminosäuren zu  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen mit PLP und somit zu einer weiteren Stabilisierung der *Schiff'schen* Base führen. Basierend auf diesen Überlegungen wurde eine 15 Aminosäure-haltige Peptidsequenz entworfen.

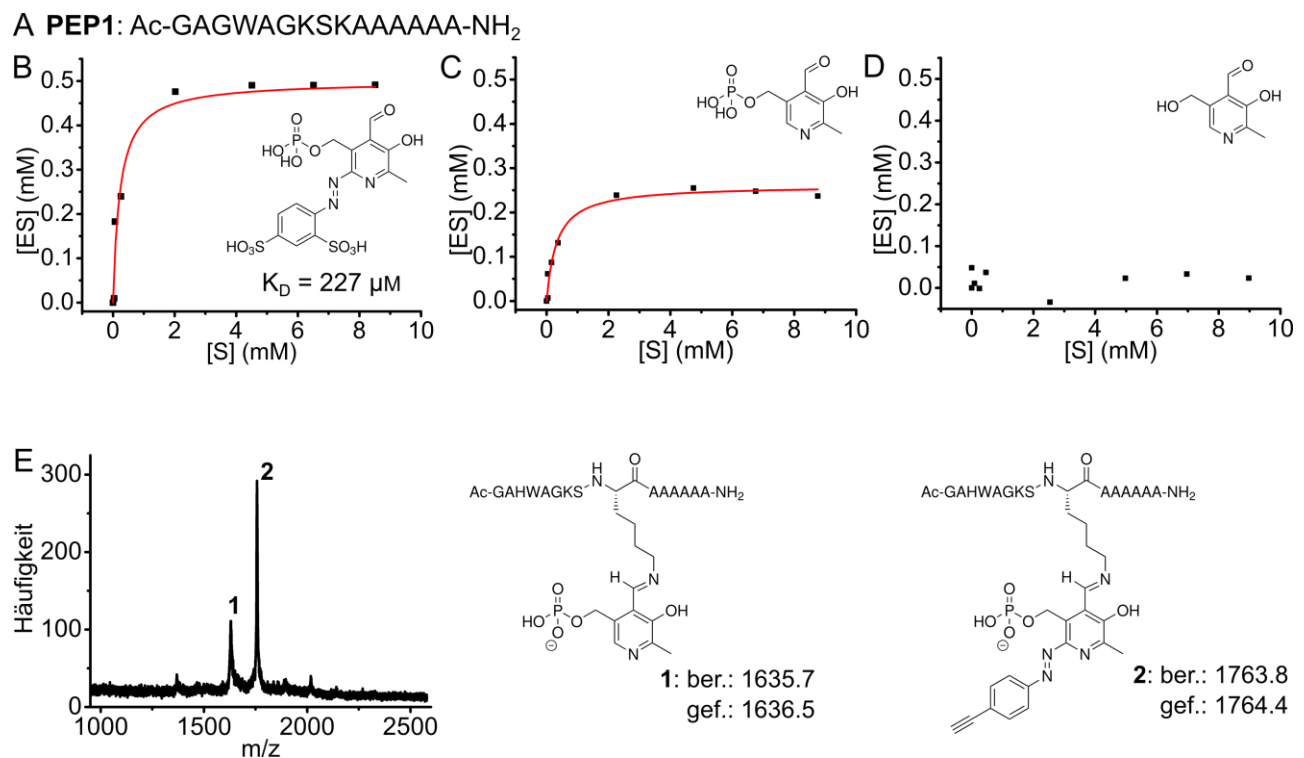
Als geeigneter *High-Throughput*-Ansatz wurde zur weiteren Optimierung der Peptidsequenz mittels *Split-Bead-Synthese* eine Peptid-Bibliothek hergestellt, die anschließend mit dem PLP-Derivat PPADS (**93**) umgesetzt wurde (siehe **Schema 33**). Besonders gut PPADS-bindende Peptidsequenzen wurden isoliert und deren Sequenz massenspektrometrisch aufgeklärt. Hierbei konnte der Sequenztyp Ac-GA(H/G)WAGKSKAAAAAA als affiner PPADS-Binder festgestellt werden.

Die anschließenden HPLC-Bindungsstudien mit dem Peptid Ac-GAGWAGKSKAAAAAA-NH<sub>2</sub> wiesen einen vollständigen Reaktionsumsatz bei bereits fünf Äquivalenten PPADS nach (siehe **Abbildung 47**). Mittels *Michaelis-Menten*-artiger Kinetik wurde ein  $K_D$ -Wert von 227  $\mu\text{M}$  berechnet. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass, wie in den theoretischen Überlegungen postuliert, der



**Schema 33:** Schematisches Ablaufdiagramm zur Entdeckung einer PPADS-bindenden Peptidsequenz.

Phosphat-Rest sowie die  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen mit dem Azophenyl-Rest von PPADS entscheidend für die Bildung einer thermodynamisch stabilen *Schiff*'schen Base sind. In weiteren HPLC-, NMR- und MS-Bindungsstudien konnte u. A. die Reversibilität der Bindung durch Zugabe von Ethylen-diamin, die 1:1-Bindungsstöchiometrie sowie die Gleichgewichtseinstellung der Reaktion innerhalb von 21 min nachgewiesen werden. Anschließende Struktur-Aktivitäts-Untersuchungen resultierten in der Identifikation eines PLP-Derivats mit einem einstelligen  $K_D$ -Wert von ca. 4  $\mu$ M gegenüber der Peptidsequenz **PEP1**. Dies ist insofern bemerkenswert, da literaturbekannte PLP-Enzyme trotz dreidimensionaler Bindetasche teilweise eine ähnliche Bindungsaffinität aufweisen.



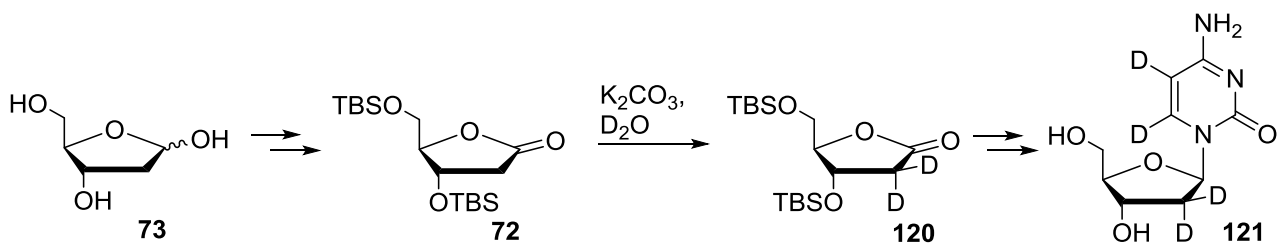
**Abbildung 47:** A) Verwendete Peptid-Sequenz für die HPLC-Bindungsstudien. B-D) *Michaelis-Menten*-artige Kinetik sowie die errechneten Ausgleichskurven für verschiedene PLP-Derivate. E) MALDI-TOF-Untersuchen zum Nachweis der Bildung der *Schiff*'schen Basen.

Im weiteren Verlauf erfolgte die Implementierung der Peptidsequenz mittels Mutagenese in die Polymerase BstPolII und das Protein Thioredoxin. Vorläufige Bindungsstudien mit diesen Proteinen deuteten auf eine gelungene Markierung mit PLP-Derivaten hin.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde somit mittels rationellem Design eine sequenzspezifische, reversible Proteinmarkierung entwickelt, welche zukünftig z.B. zur Generierung homogener Antikörper-Wirkstoff-Konjugate zur Anwendung kommen kann.

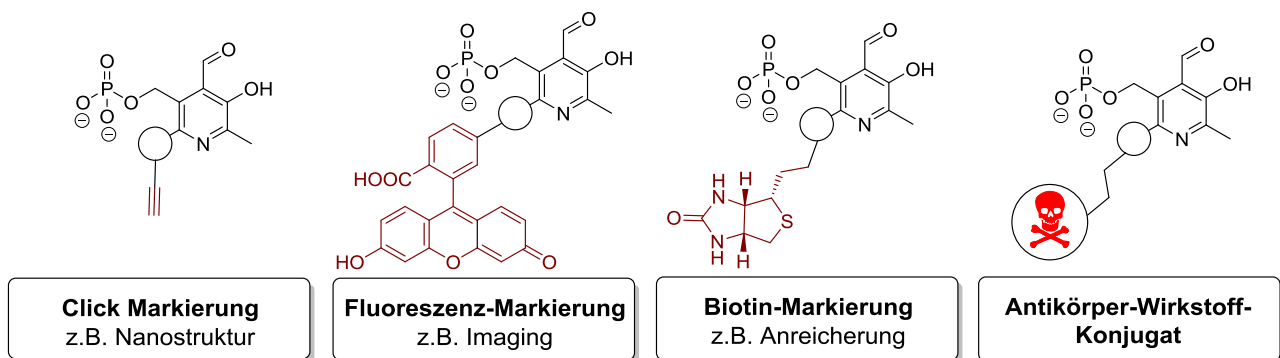
## 9 Ausblick

Im Bereich der Epigenetik wurden Nucleosid-Analoga hergestellt, die eine biokompatible Reporter-sonde in Form einer speziellen Isotopen- bzw. 2'-Fluor-Markierung besaßen und erstmalig die C-C-Bindungsbruchreaktion zweifelsfrei nachwiesen. In Zukunft könnte das problematische Hintergrundsignal von  $D_2,^{15}N_2$ -dC aufgrund der limitierenden Isotopenreinheit von  $^{15}N_2$ -Harnstoff durch Verwendung von  $D_4$ -dC (**121**) umgangen werden (siehe **Schema 34**). Ein iterativer H/D-Austausch in 2'-Position des Laktos **72** durch  $D_2O$  (99.98 atom% D) im Basischen sollte die Herstellung hoch isotopenreinem **121** ermöglichen.



**Schema 34:** Mögliche Syntheseroute zu einem hoch isotopenreinem  $D_4$ -dC für zukünftige *Isotope-Tracing*-Studien.

Im Bereich der Proteinmarkierung wurde mittels innovativem, rationellem Design eine sequenzspezifische, reversible Proteinmarkierung entwickelt. Zwar deuteten vorläufige Untersuchungen mit sequenzmodifizierten Proteinen auf eine gelungene Markierung mit PLP-Derivate hin. Jedoch müssen für den vollständigen Nachweis neben eindeutigeren Verschiebungen auf SDS-Gelen auch massenspektrometrische Analysen dieser Proteinmarkierung erbracht werden. Zukünftige Anwendungen dieser Proteinmarkierung sind aufgrund der variablen C6-Position von PLP in unterschiedlichsten Gebieten, beispielsweise im *Imaging*, der Aufreinigung oder sogar als Antikörper-Wirkstoff-Konjugat, möglich (siehe **Abbildung 48**).



**Abbildung 48:** Potentielle Anwendungsgebiete der in dieser Arbeit entwickelten Proteinmarkierung.



## 10 Experimenteller Teil

### 10.1 Material und Methoden

**Agarose-Gelelektrophorese:** Zur Kontrolle der Polymerase-Kettenreaktion wurden jeweils 16  $\mu\text{L}$  des PCR-Produktes (18.75  $\text{ng}/\mu\text{L}$ ) mit 4  $\mu\text{L}$  eines  $5 \times$  Ladepuffers (New England BioLabs) versetzt und mit Hilfe eines 2%igen Agarose-Gels (1 g Agarose, 50 mL  $1 \times$  TBE-Puffer (10.8 g Tris-(hydroxymethyl)aminomethan, 0.7 g  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 5.5 g Borsäure, 7  $\mu\text{L}$  Peqgreen (Peqlab)) in einer Gelapparatur von Peqlab mit einer Power Pak basic Spannungsquelle von BioRad (60 V) mit  $0.5 \times$  TBE Laufpuffer 30 min entwickelt. Als Marker wurde entweder der FastRuler Low Range DNA ladder (*ThermoScientific*) mit Zugabe eines synthetisierten 46 bp ODN (10  $\mu\text{M}$ ) oder 1 kb DNA ladder (*New England BioLabs*). Zur Visualisierung wurde ein Raytest Image Documentation Analysis Imager verwendet.

**CD-Spektroskopie:** Die CD-Spektren wurde an einem JASCO J810 mit eingebautem Peltier-Element unter Verwendung einer Quartzglasküvette mit einer Schichtdicke von 10 mm und einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  gemessen. Die Bandweite betrug 1nm, die Ansprechzeit 2 s, die Verzögerung 0 s, die Sensibilität 100mdeg und die Scangeschwindigkeit 50 nm/min. Die Spektren wurden fünfmal gemessen, gemittelt und anschließend einer 15fachen Glättung mit dem *Savitzky-Golay*-Filter unterzogen und nach der Vorschrift von *Greenfield* normiert.<sup>[302]</sup>

**Chemikalien:** Die verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen *Sigma-Aldrich*, *Bachem*, *ABCR*, *Acros Organics*, *Fluka*, *Carbosynth* und *TCI Europe* bezogen und falls nicht anders vermerkt, direkt verwendet. Wasser wurde, falls nicht anders angegeben in destillierter Form aus der Hausleitung bezogen. Die Lösungen zum Waschen der synthetisierten Verbindungen waren wässrig und mit dem jeweils angegebenen Salz gesättigt. Die Lösemittel zur Extraktion und Säulenchromatographie waren von technischer Qualität und wurden vor ihrer Verwendung mittels Destillation aufgereinigt. 3 Å Molsieb zum Trocknen von Lösungsmittel wurde von VWR bezogen.

**Druckautoklav:** Zur Generierung der Kohlenmonoxidatmosphäre von 3.5 bar wurde der Miniclave-Glas-Druckreaktor mit einem Borosilikat-Glas 3.3 Einsatz der Firma *Büchi Glas Uster AG* verwendet.

**DNA-Festphasensynthese:** DNA-Oligonukleotide wurden mittels CE-Phosphoramidit-Chemie an

einem LV200-Polystyrol-Trägermaterial (Beladung 21  $\mu\text{mol/g}$ ) von *Glen Research* oder *Link Technologies* mit einem ABI 394 DNA Synthesizer (*Applied Biosystems*) hergestellt. Die Phosphoramidite von dA (Bz-dA), dC (Bz-dC oder Ac-dC), dG (*i*Bu-dG oder dmF-dG) und dT wurden von *Link Technologies*, trockenes Acetonitril (Rotidry,  $\geq 99.9\%$ ,  $< 10$  ppm Wasser) wurde von *Roth* bezogen. Die DNA-Oligonukleotide wurden mittels Standard-Phosphoramidit-Chemie (zwischen 200 nmol und 1 mol Maßstab) unter Verwendung verschiedener in der Literatur beschriebener Aktivatoren, meist jedoch mit Activator 42 (Sigma Aldrich) hergestellt.<sup>[308]</sup> Folgende Konzentrationen wurden hierbei verwendet: Phosphoramidite: 0.1 M Phosphoramidit in MeCN (Rotidry,  $\geq 99.9\%$ ,  $< 10$  ppm Wasser, *Roth*), Aktivator: Activator 42 (Sigma Aldrich), Capping A: Ac<sub>2</sub>O (20%), 2,6-Lutidin (30%) in MeCN (Rotidry,  $\geq 99.9\%$ ,  $< 10$  ppm Wasser), Capping B: *N*-methylimidazol (20%) in MeCN (Rotidry,  $\geq 99.9\%$ ,  $< 10$  ppm Wasser), Detritylierung: 3% Dichloressigsäure in DCM, Oxidation: 25 mM Iod in 2,6-Lutidin/MeCN/H<sub>2</sub>O (6/65/30). Die natürlichen Phosphoramidite wurden 30 s gekuppelt, während bei selbst dargestellten Phosphoramiditen die Kupplungszeit auf 180-300 s verlängert wurde, um optimale Ausbeuten zu erzielen. Zur verbesserten Aufreinigung der Oligo-2'-desoxynukleotide wurde die 5'-DMT-Gruppe gelegentlich nicht abgespalten (DMT on Synthese). Die Abspaltung vom Trägermaterial und das Entfernen der Schutzgruppen der DNA-Basen erfolgte je nach Schutzgruppen der Phosphoramidite mit 0.8 mL einer konz. Ammoniaklösung, einer Lösung aus konz. Ammoniak und konz. Methylamin (1:1) oder einer 0.4 M NaOH-Lösung in Wasser/Methanol 1:4 (1 mL) bei 25-32 °C. Nach Zugabe von 0.6 mL einer 1 M Triethylammoniumacetat-Lösung (pH 7.0) und Filtration des Trägermaterials, wurden die DNA-Oligonukleotide per HPLC aufgereinigt (siehe unten). Das Lösungsmittel der vereinigten Fraktionen wurden entfernt und die Abspaltung der terminalen DMT-Gruppe oder der Acetal-Gruppe bei Verwendung von fdC-Phosphoramidit erfolgte mittels Inkubation in einer wässrigen 80%igen HOAc-Lösung (100  $\mu\text{L}$ ) bei 20 °C, gefolgt von einer EtOH-Fällung (Zugabe von 100  $\mu\text{L}$  H<sub>2</sub>O, 60  $\mu\text{L}$  3 M NaOAc und 1.6 mL EtOH, -20 °C, 60 min) und einer zweiten HPLC-Aufreinigung. Die Konzentration der synthetisierten ODN wurde mittels UV/VIS-Spektroskopie bei 260 nm (Nanodrop ND-1000 von *Peqlab*) bestimmt und mittels der Extinktionsfaktoren der jeweiligen Basen korrigiert (dA: 15.0 L/(mmol·cm), dC: 7.1 L/(mmol·cm), dG: 12.0 L/(mmol·cm) und dT: 8.4 L/(mmol·cm), mdC: 7.8 L/(mmol·cm), hmdC: 8.7 L/(mmol·cm), fdC: 11.3 L/(mmol·cm), cadC: 7.1 L/(mmol·cm)).<sup>[80,209]</sup> Die Charakterisierung der Oligo-2'-desoxynukleotide erfolgte mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie.

**Doppelt destilliertes Wasser (ddH<sub>2</sub>O):** Für biochemische Untersuchungen und zur Herstellung flüssiger Phasen für die HPLC wurde doppelt destilliertes Wasser (Bidestwasser) mit Hilfe einer

Milli-Q Plus-Anlage mit einer QPAK® 2 Kartusche erzeugt.

**Dünnschichtchromatographie (DC):** Es wurden die Fertigplatten Kieselgel F 254 von Merck verwendet. Aromatische Verbindungen wurden mittels einer UV-Lampe (254 nm und 366 nm), Aminverbindungen mit einer Ninhydrin-Lösung (0.3 g Ninhydrin, 3 mL Eisessig in 100 mL *n*-Butanol) und Alkohole mit einer Lösung, die 10% Schwefelsäure, 120 g  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 24\text{H}_2\text{O}$  und 5 g  $(\text{NH}_4)_2\text{Ce}(\text{NO}_3)_6$  (in 800 mL Wasser) enthält, detektiert werden. Alle Lösungen wurden unter Lichtausschluss aufbewahrt.

**Enzymatische Inkorporation der fluorierten Triphosphate:** Zur Ermittlung der optimalen Bedingungen für die Inkorporation der Triphosphate in ODN mittels PCR, wurde dessen Einbau in ein 81 bp langes DNA-Fragment untersucht. Die Sequenzen des Templats sowie der Primer sind in **Abbildung 22** dargestellt und wurden von Sigma-Aldrich bezogen.

Hierzu wurden 50 µL einer Lösung, die 5 ng Templat, 0.2 mM der natürlichen Nukleosidtriphosphate ohne dC (dA-, dG- und dT-Triphosphate wurden von *New England BioLabs* bezogen), 0.4 mM des jeweiligen fluorierten Nukleosidtriphosphates, 0.25 µM beider Primer und 2 U der entsprechenden Polymerase (KOD XL von *Novagen*, Terminator- und Phusion-Polymerase von *New England BioLabs*) im vom jeweiligen Anbieter der Polymerasen empfohlenen Puffer nach folgendem Schema mit Hilfe eines Mastercycler Personal (*Eppendorf*) inkubiert:

Schritt		Dauer / s	T / °C
Denaturierung		120	98
30 Zyklen	Denaturierung	20	98
	Annealing	20	55
	Verlängerung	25	72
Finale Verlängerung		300	72

Das erhaltene PCR-Fragment wurde mit Hilfe eines Nucleo Spin® Kits (*Macherey-Nagel*) aufgereinigt und mittels Agarosegelelektrophorese analysiert (siehe oben).

**Gefriertrocknung:** Zur Entfernung von Wasser und Acetonitril wurde eine Alpha 2-4 LD plus-Lyophille von *Christ* verwendet.

**Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC):** Analytische Umkehrphasen-HPLC-Chromatogramme von DNA, Triphosphaten und Nukleosiden wurden an einer *Waters*-Anlage (alliance 2695 mit Photodiode Array Detector 2996) mit einer VP 250/10 Nucleodur 100-5 C18 eC-Säule beziehungsweise einer CC 250/4 Nucleosil N 120-3 C18-Säule von *Macherey-Nagel* aufge-

nommen. Als flüssige Phase wurde eine 0.1 M, wässrige Triethylammoniumacetat-Lösung (Puffer A), der zur Elution eine 0.1 M wässrige Triethylammoniumacetat-Lösung mit 80% Acetonitril (Puffer B) schrittweise zugesetzt wurde, verwendet. Der Fluss betrug 0.5 mL/min. Zur präparativen Umkehrphasen-HPLC von DNA und Triphosphaten wurde eine *Waters*-Anlage (1525EF mit einem 2487 UV-Detektor), eine CC 250/4 Nucleosil 120-3 C18-Säule, beziehungsweise eine VP 250/10 Nucleodur 100-5 C18eC-Säule von *Machery-Nagel* und das oben beschriebene Puffersystem als flüssige Phase verwendet (Fluss 5 mL/min).

**Infrarotspektroskopie (IR):** IR-Spektren wurden an einem Spectrum BX FT-IR System von *Perkin Elmer* mit einem DuraSamplIR II Messkopf von *Smiths* und einer Diamant-ATR (Attenuated Total Reflection) Einheit ohne weitere Präparation der Proben aufgenommen. Zur Messung wurden die Proben in geringen Mengen Aceton oder DCM gelöst, die Lösung auf den Messkopf aufgetragen. Nach Verdampfen des Lösungsmittels konnte der entstandene Probenfilm vermessen werden. Die Wellenzahlen wurden in  $\text{cm}^{-1}$  angegeben. Die Intensität der Signale wurden mit s (stark), m (medium), w (schwach) konkretisiert. Die Bezeichnung br steht für sehr breite Signale.

### **Kernresonanzspektroskopie (NMR):**

Einige  $^1\text{H}$ -NMR- und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren wurden im Automationsbetrieb an einem *Bruker* ARX 400 (400 MHz für  $^1\text{H}$ ) aufgenommen. Weitere  $^1\text{H}$ -NMR-,  $^{13}\text{C}$ -NMR- sowie  $^{15}\text{N}$ -NMR- und sämtliche 2D-Spektren (300, 400, 600 und 800 MHz jeweils für  $^1\text{H}$ ) wurden von der NMR-Abteilung der Ludwig-Maximilians-Universität München, Department Chemie (Haus F), an einem *Bruker* ARX 300, Varian Inova 400, an einem *Bruker* ARX 600 und an einem *Bruker* ARX 800 gemessen.  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektren wurden  $^1\text{H}$ -entkoppelt aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen  $\delta$  sind in parts per million (ppm) angegeben und bezieht sich auf die Mitte des Kopplungsmusters oder bei Multipletts auf deren Ausdehnung. Die Kalibration der Spektren erfolgte über das Lösungsmittel-Restsignal ( $\text{CDCl}_3$ :  $\delta^1_{\text{H}} = 7.26$  ppm,  $\delta^{13}_{\text{C}} = 77.16$  ppm,  $\text{DMSO-d}_6$ :  $\delta^1_{\text{H}} = 2.50$  ppm,  $\delta^{13}_{\text{C}} = 39.52$  ppm,  $\text{D}_2\text{O}$ :  $\delta^1_{\text{H}} = 4.65$  ppm,  $\text{CD}_3\text{OD}$ :  $\delta^1_{\text{H}} = 3.31$  ppm,  $\delta^{13}_{\text{C}} = 49.00$  ppm).<sup>[309]</sup> Die Multiplizitäten der Signale wurden als s (Singulett), d (Dublett), t (Triplet), q (Quartett), br (breites Singulett), m (Multiplett) und deren Kombinationen angegeben. Die angegebenen Daten sind phänomenologisch, d.h. sie entsprechen der Erscheinung des Signals und nicht der theoretisch zu erwartenden Multiplizität. Die Kopplungskonstanten sind in Hertz (Hz) sowie jeweils als ihr Betrag angegeben. Sie wurden aus *Lorentz-zu-Gauss* transformierten  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren abgelesen und beziehen sich, wenn nicht anders angegeben auf H-H-Kopplungen. Die Zuordnung der Signale in  $^1\text{H}$ -NMR-

und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren erfolgte mit der Hilfe von 2D-Experimenten (COSY, TOCSY, HSQC, HMBC, ROESY, NOESY).

Zur Aufnahme der NMR-Spektren von DMT-geschützten Verbindungen wurde  $\text{CDCl}_3$  zuvor über basischem Aluminiumoxid filtriert.

**Kinetikmessungen PLP:** Hierzu wurde 1.0  $\mu\text{L}$  des Peptids (5 mM in PBS-Puffer + 10 mM  $\text{MgCl}_2$  (pH = 7.4), 5 nmol, 1.0 Äq.) mit dem entsprechenden PLP-Derivat in unterschiedlichen Äquivalenten (meist 0, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, 14, 18) versetzt. Die Lösung wurde anschließend für 1 h in den Inkubator bei 37 °C gestellt. Falls die Iminbindung reduziert werden sollte, wurden 10  $\mu\text{L}$  einer frischen 50 mM  $\text{NaBH}_4$ -Lösung (0.5  $\mu\text{mol}$ , 100 Äq.) der Lösung zugefügt und für 2 h in den Inkubator bei 37 °C gestellt. Nachfolgend wurden 80  $\mu\text{L}$  des HPLC-Puffers zugefügt, kurz zentrifugiert, 95  $\mu\text{L}$  in ein HPLC-Probenglas überführt und 90  $\mu\text{L}$  auf die HPLC-Säule injiziert. Zur Auswertung wurde das Signal des freien Peptids integriert, welches mittels folgender mathematischer Gleichungen zu einen Datenpunkt umgeformt wurde:<sup>[310,311]</sup>

$[E]_{frei} = \text{Integral des freien Peptids, auf die Konzentration normiert}$

$$[ES] = [E]_{t=0} - [E]_{frei}$$

$$[S]_{frei} = (n_{S,total} - n_{ES})/V$$

mit: [E]: Konzentration Peptid, [ES]: Konzentration Imin, [S]: Konzentration PLP-Derivat, V: Gesamtvolumen, n: Stoffmenge.

Nach Wiederholung dieser Prozedur für verschiedene Äquivalente werden Datenpunkte entlang der folgenden hyperbolischen Kurvenfunktion erhalten ( $y \equiv [ES]$ ,  $x \equiv [S]_{frei}$ ):

$$y = B_{max} \times \frac{x}{K_D + x}$$

**Lösungsmittel:** Synthesen von Phosphoramiditen und Umsetzungen unter Beteiligung von Metallverbindungen wurden unter Argon-Atmosphäre durchgeführt, während für alle anderen Synthesen Stickstoff als Schutzgas verwendet wurde. Die jeweiligen Lösungsmittel (< 50 ppm Wasser) wurden von *Sigma-Aldrich* und *Acros Organics* bezogen. Zur Extraktion und Säulenchromatographie wurden Lösungsmittel von technischer Qualität verwendet, die vorher destillativ aufgereinigt wurden.

**Massenspektrometrie (MS):** ESI- und EI-Massenspektren wurden von der Analytik-Abteilung der Ludwig-Maximilians-Universität München, Department Chemie (Haus F), angefertigt, wobei für

ESI-Massenspektren ein *Finnigan* LTQ FTICR verwendet wurde, während die EI-Spektren an einem MATCH 7a von *Varian* gemessen wurden. Die Zuordnung bezieht sich, falls nicht anders angegeben, auf das natürlich am häufigsten vorkommende Isotop. Für MALDI-Spektren wurde ein Bruker Autoflex II Spektrometer mit time-of-flight-Detektor verwendet. Als Matrix diente eine 3-Hydroxypicolinsäure-Matrix (HPA) (25 mg 3-Hydroxypicolinsäure, 5 mg Ammoniumcitrat in 0.5 mL ddH<sub>2</sub>O, für DNA), eine  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymethylsäure-Matrix (HCCA) (20 mg  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymethylsäure in 1.0 mL ddH<sub>2</sub>O/MeCN (1:1, 0.1% TFA), für Peptide) oder eine Sinapinsäure-Matrix (SA) (20 mg Sinapinsäure 1.0 mL ddH<sub>2</sub>O/MeCN (2:1, 0.1% TFA), für Peptide und Proteine) wobei die Proben vorher mit einem 0.025  $\mu$ m VSWP Membranfilter von Millipore 20 min lang gegen bidestilliertes Wasser entsalzt wurden.

**Molare Massen:** Die molaren Massen der Moleküle [M] sind im Folgenden in g/mol angegeben.

### Peptid-Festphasensynthese:

Zur Peptidsynthese wurde nach dem folgenden Protokoll vorgegangen

1. Harzbeladung mit Alanin:

TentaGel™ (S-OH, 100-200  $\mu$ m, ca. 214970 beads/g, Vorbeladung: 0.28 mmol/g, *Fluka*) wurde mit Fmoc-Ala nach folgendem Protokoll beladen:

- a. 10 min Quellen des Harzes in DMF (10 mL/1 g Harz)
- b. 30 min Beladen mit 1.0 Äq. 6-Aminohexansäure, 6.0 Äq. DIPEA in DMF (10 mL/1 g Harz)
- c. Sechsmal Waschen mit DMF
- d. Dreimal Waschen mit DCM
- e. 15 min Capping mit Acetanhydrid/Pyridin (1:1)
- f. Zweimal Waschen mit DMF (1:1)
- g. 15 min Capping mit Acetanhydrid/Pyridin (1:1)
- h. Dreimal Waschen mit DMF
- i. Zweimal Waschen mit DCM

Die Harzbeladung wurde über eine Fmoc-Probeabspaltung UV-spektroskopisch bestimmt. Hierzu wurde eine exakt bestimmte Harzmenge (ca. 2 mg) mit 1.00 mL 25% Piperidin in DMF behandelt. Nach 30 min wurde mit 5.00 mL MeOH verdünnt und die Absorption bei den Wellenlängen 289 nm und 300 nm bestimmt. Mit Hilfe der unten angegebenen Gleichung ließ sich die Beladung b in mmol/g Harz durch Bildung des Mittelwerts der Werte

beider Wellenlängen berechnen:

$$b = \frac{V \times A \times 10}{\varepsilon \times V \times m}$$

mit: V: Gesamtvolumen (mL), A: Absorption,  $\varepsilon$  : Extinktionskoeffizient (289 nm  $\equiv$  5800 mL/(mmol·cm), 300 nm  $\equiv$  7800 mL/(mmol· cm)), d: Schichtdicke der Küvette (cm), m: Menge an Harz (mg)

Typische Beladungswerte waren ca. 0.15 mmol/g Harz.

## 2. Aminosäurekupplung:

- a. 15 min Quellen in 2.5 mL DMF
- b. 5 min Entschützung mit 2.0 mL 20% Piperidin in DMF
- c. 10 min Entschützung mit 2.0 mL 20% Piperidin in DMF
- d. Dreimal Waschen mit 2.0 mL DMF
- e. Zweimal Waschen mit 2.0 mL DCM
- f. Zweimal Waschen mit 2.0 mL DMF
- g. 5 min Quellen in 2.5 mL DMF
- h. 60 min Kuppeln mit 3.0 äq HBTU/HOBt/Fmoc-Xaa-OH, 6.0 Äq. DIPEA
- i. Zweimal Waschen mit 1.5 mL DMF
- j. 60 min Kuppeln mit 1.0 Äq. HBTU/HOBt/Fmoc-Xaa-OH, 3.0 Äq. DIPEA
- k. Zweimal Waschen mit 1.5 mL DMF
- l. 15 min Quellen in 2.5 mL DMF
- m. 5 min Entschützung mit 2.0 mL 20% Piperidin in DMF
- n. 10 min Entschützung mit 2.0 mL 20% Piperidin in DMF
- o. Dreimal Waschen mit 2.0 mL DMF
- p. Zweimal Waschen mit 2.0 mL DCM
- q. Zweimal Waschen mit 2.0 mL DMF

Die Schritte g–q wurden mit den entsprechenden Aminosäuren wiederholt, sodass das N-terminal entschützte, Seitenketten geschützte, harzgebundene Peptid erhalten wurde.

## 3. Abspaltung vom Harz:

Das Harz wurde mit der Abspalllösung (TFA/H<sub>2</sub>O/TIPS 94:2.5:2.5, 4 mL/0.1 mmol Harz) für 30 min versetzt. Die Lösung wurde filtriert, das Harz jeweils zweimal mit 4 mL DCM, DMF und PBS-Puffer gewaschen. Die Beads wurden anschließend im Hochvakuum getrocknet.

**pH-Meter:** Zum Einstellen von pH-Werten wurde das Gerät *MP 220* von *Mettler Toledo* verwendet, das vor jeder Messreihe durch Lösungen von pH 7.0 und 4.0 geeicht wurde.

**Rotationsverdampfer:** Zum Entfernen der Lösemittel in *vacuo* wurde der Rotationsverdampfer Laborta 4000 von *Heidolph* verwendet, wobei die Temperatur des Wasserbades 40 °C betrug. Bei Umsetzung zum Phosphoramidit wurde lediglich eine Temperatur von 25 °C verwendet.

**Säulenchromatographie:** Hierfür wurde die Flash-Methode verwendet. Als stationäre Phase diente Kieselgel 60 (Korngröße 0.063–0.200 mm) von *Merck*. Bei säureempfindlichen Produkte wurde das Kieselgel vor Benutzung mit Pyridin oder  $\text{NEt}_3$  desaktiviert.

**Schmelzpunkt:** Schmelzpunkte wurde an dem Gerät *Melting Point B-540* von *Büchi* ohne weitere Korrektur bestimmt.

**Spritzenpumpe:** Zur kontinuierlichen Zugabe von Lösungen zu Reaktionsgemischen wurde eine Spritzenpumpe von *KD Scientific* verwendet.

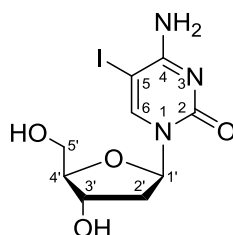
**UV/VIS-Spektroskopie:** Zur Messung von UV/VIS-Spektren wurde ein *JASCO V650*-Spektrophotometer mit eingebautem Peltier-Element verwendet. Die Scan-Geschwindigkeit betrug meist 100 nm/min, das Wellenlängenintervall 0.5 nm. Als Blindprobe wurde das jeweilige Lösungsmittel in der jeweiligen Küvette verwendet.

**Zentrifuge:** Zum Sedimentieren diente eine MiniSpin-Zentrifuge (Eppendorf).



## 10.2 Vorschriften zur Synthese des fdC-Phosphoramidits

### 10.2.1 5-Iod-2'-desoxycytidin (123)



In Anlehnung an die Vorschrift von *Münzel* wurden in einem ausgeheizten Rundkolben 10.0 g 2'-Desoxycytidin (44.0 mmol, 1.0 Äq.), 7.70 g Iod (26.4 mmol, 0.6 Äq.) und 11.4 g *m*CPBA (70%, 46.2 mmol, 1.05 Äq.) in 120 mL DMF (0.37 M) gelöst und für 3 h bei Raumtemperatur gerührt.<sup>[185]</sup> Anschließend wurde das Lösungsmittel entfernt und nach säulenchromatographischer Aufreinigung (*dryload*, DCM/MeOH 9:1 → 6:1 (+ jeweils 0.5% NEt<sub>3</sub>)) wurden 8.75 g der Verbindung **123** (24.9 mmol, 57%) in Form eines leicht gelblichen Feststoffs erhalten.

**DC:**  $R_f = 0.52$  (DCM/MeOH 5:1 + 0.5% NEt<sub>3</sub>).

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, ppm):**  $\delta = 8.29$  (s, 1H, 6-H), 6.07 (t,  $^3J = 6.4$  Hz, 1H, 1'-H), 4.20 (dt,  $^3J = 6.1$  Hz,  $^3J = 3.7$  Hz, 1H, 3'-H), 3.77 (dd,  $^3J = 3.4$  Hz,  $^3J = 3.4$  Hz, 1H, 4'-H), 3.63-3.50 (m, 2H, 5'-H), 2.12 (ddd,  $^2J = 13.2$  Hz,  $^3J = 6.1$  Hz,  $^3J = 3.8$  Hz, 1H, 2'-H), 2.02-1.95 (m, 1H, 2'-H).

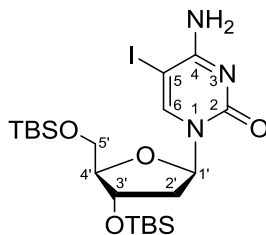
**<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, ppm):** 163.1 (C4), 154.2 (C2), 148.4 (C6), 89.4 (C4'), 88.7 (C1'), 71.4 (C3'), 62.1 (C5'), 56.4 (C5), 42.5 (C2').

**HRMS (ESI+):** ber. für C<sub>9</sub>H<sub>13</sub>IN<sub>3</sub>O<sub>4</sub><sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup>: 353.9945, gef.: 353.9951.

**IR (ATR):**  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 3191 (w), 1718 (m), 1642 (s), 1286 (m), 1087 (s), 957 (s), 750 (m).

**Schmelzpunkt:** 136 °C (Zersetzung).

### 10.2.2 O<sup>3',5'</sup>-Bis(*tert*butyldimethylsilyl)-5-iod-2'-desoxycytidin (124)



In Anlehnung an die Vorschrift von *Münzel* wurden 8.76 g der Verbindung **123** (24.6 mmol,

1.0 Äq.) zusammen mit 11.14 g TBS-Cl (73.9 mmol, 3.0 Äq.) und 5.03 g Imidazol (73.9 mmol, 3.0 Äq.) in 50 mL eines Gemisches aus Pyridin/DMF (3:2, 0.49 M) bei 0 °C gelöst.<sup>[185]</sup> Die klare Lösung wurde langsam auf Raumtemperatur erwärmt und anschließend für 16 h gerührt. Nach vollständigem Umsatz erfolgte die Zugabe von Eis sowie von 125 mL einer ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung. Das Rohprodukt wurde mit 3x 150 mL DCM extrahiert, die organischen Phasen mit 200 mL einer ges. NH<sub>4</sub>Cl-Lösung gewaschen und über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* und säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH 100:1 → 20:1 (+ jeweils 0.5% NEt<sub>3</sub>)) wurden 7.02 g **124** (12.2 mmol, 50%) in Form eines farblosen Feststoffs erhalten.

**DC:**  $R_f = 0.33$  (DCM/MeOH 30:1 + 0.5% NEt<sub>3</sub>).

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm):**  $\delta = 8.06$  (s, 1H, 6-H), 6.25-6.19 (m, 1H, 1'-H), 4.34 (dt, <sup>3</sup> $J = 5.9$  Hz, <sup>3</sup> $J = 2.9$  Hz, 1H, 3'-H), 3.97 (dt, <sup>3</sup> $J = 2.6$  Hz, <sup>3</sup> $J = 2.6$  Hz, 1H, 4'-H), 3.87 (dd, <sup>2</sup> $J = 11.4$  Hz, <sup>3</sup> $J = 2.6$  Hz, 1H, 5'-H), 3.74 (dd, <sup>2</sup> $J = 11.4$  Hz, <sup>3</sup> $J = 2.6$  Hz, 1H, 5'-H), 2.44 (ddd, <sup>2</sup> $J = 13.3$  Hz, <sup>3</sup> $J = 5.9$  Hz, <sup>3</sup> $J = 3.0$  Hz, 1H, 2'-H), 2.00-1.90 (m, 1H, 2'-H), 0.92 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.87 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.13 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.12 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.06 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.05 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

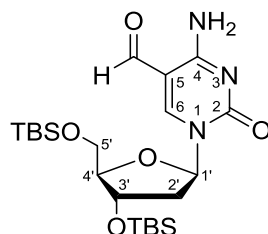
**<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm):** 163.2 (C4), 154.3 (2), 146.7 (6), 88.3 (C4'), 86.8 (C1'), 72.2 (C3'), 62.8 (C5'), 56.2 (C5), 42.6 (C2'), 26.1 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 25.7 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 18.5 (Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 17.9 (Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), -4.6 (Si-CH<sub>3</sub>), -4.9 (Si-CH<sub>3</sub>), -5.2 (Si-CH<sub>3</sub>), -5.3 (Si-CH<sub>3</sub>).

**HRMS (ESI+):** ber. für C<sub>21</sub>H<sub>41</sub>IN<sub>3</sub>O<sub>4</sub>Si<sub>2</sub><sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup>: 582.1675, gef.: 582.1683.

**IR (ATR):**  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 2929 (w), 2857 (w), 1649 (m), 1470 (m), 1256 (m), 1086 (m), 829 (s), 776 (s).

**Schmelzbereich:** 196-198 °C.

### 10.2.3 O<sup>3',5'</sup>-Bis(*tert*butyldimethylsilyl)-5-formyl-2'-desoxycytidin (**5**)



In Anlehnung an die Vorschrift von *Münzel* wurden in einem Hochdruckautoklaven 3.50 g der Verbindung **124** (6.02 mmol, 1.0 Äq.) zusammen mit 947 mg Triphenylphosphin (3.61 mmol, 0.6 Äq.)

und 623 mg Pd<sub>2</sub>(dba)·CHCl<sub>3</sub> (600 μmol, 0.1 Äq.) vorgelegt.<sup>[185]</sup> Das Reaktionsgefäß wurde zur Dichtigkeitsprüfung einmalig mit Kohlenstoffmonoxid mit einem Gasdruck von 3.5 bar für 15 min befüllt. Nach bestandem Drucktest wurde der Hochdruckautoklav belüftet, 90 mL Toluol (0.067 M) zugefügt, der Hochdruckautoklav zweimal mit Kohlenstoffmonoxid gespült und schließlich mit Kohlenstoffmonoxid auf einen Gasdruck von 3.5 bar befüllt. Nachfolgend wurde die Suspension auf 60 °C erhitzt und mit 2.02 mL Bu<sub>3</sub>SnH (7.22 mmol, 1.2 Äq.) mit einer Flussrate von 0.15 mL/h versetzt. Nach Abschluss der Bu<sub>3</sub>SnH-Zugabe wurde für weitere 4 h gerührt. Nach Belüften des Reaktionsgefäßes, Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* und säulenchromatographischer Aufreinigung (*dryload*, *i*Hex/EtOAc 4:1 → 1:1) wurden 2.01 g der Verbindung **5** (4.14 mmol, 70%) in Form eines leicht gelblichen Feststoffs erhalten.

**DC:**  $R_f = 0.29$  (*i*Hex/EtOAc 1:1).

**<sup>1</sup>H-NMR (599 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm):** δ = 9.46 (s, 1H, HC=O), 8.51 (s, 1H, 6-H), 8.16 (s, 1H, NH<sub>2</sub>), 6.89 (s, 1H, NH<sub>2</sub>), 6.19 (t, <sup>3</sup>*J* = 6.2 Hz, 1H, 1'-H), 4.33 (dt, <sup>3</sup>*J* = 6.2 Hz, <sup>3</sup>*J* = 3.7 Hz, 1H, 3'-H), 4.03 (dd, <sup>3</sup>*J* = 6.0 Hz, <sup>3</sup>*J* = 2.6 Hz, 1H, 4'-H), 3.93 (dd, <sup>2</sup>*J* = 11.6 Hz, <sup>3</sup>*J* = 2.6 Hz, 1H, 1x 5'-H), 3.76 (dd, <sup>2</sup>*J* = 11.6 Hz, <sup>3</sup>*J* = 2.5 Hz, 1H, 1x 5'-H), 2.59 (ddd, <sup>2</sup>*J* = 13.5 Hz, <sup>3</sup>*J* = 6.2 Hz, <sup>3</sup>*J* = 3.9 Hz, 1H, 2'-H), 2.12-1.99 (m, 1H, 2'-H), 0.89 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.88 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.09 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.08 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.07 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.06 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

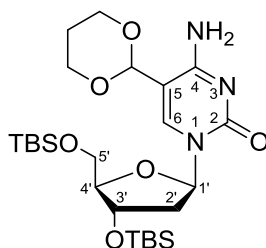
**<sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm):** δ = 187.1 (HC=O), 162.7 (C4), 153.2 (C2), 152.9 (C6), 104.8 (C5), 88.7 (C4'), 87.7 (C1'), 71.6 (C3'), 62.5 (C5'), 42.8 (C2'), 25.9 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 25.7 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 18.4 (Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 17.9 (Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), -4.6 (Si-CH<sub>3</sub>), -4.9 (Si-CH<sub>3</sub>), -5.3 (Si-CH<sub>3</sub>), -5.4 (Si-CH<sub>3</sub>).

**HRMS (ESI+):** ber. für C<sub>22</sub>H<sub>42</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>Si<sub>2</sub><sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup>: 484.2658, gef.: 484.2656.

**IR (ATR):** ν (cm<sup>-1</sup>) = 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:** 155-156 °C (Zersetzung).

### 10.2.4 *O*<sup>3',5'</sup>-Bis(*tert*butyldimethylsilyl)-5-(1,3-dioxan-2-yl)-2'-desoxycytidin (**6**)



In einem ausgeheizten Rundkolben wurden 1.00 g der Verbindung **5** (2.07 mmol, 1.0 Äq.) in 20 mL DCM (0.10 M) gelöst und mit 600  $\mu$ L Propandiol (8.27 mmol, 4.0 Äq.) sowie 409  $\mu$ L Orthoameisensäuretriethylester (2.48 mmol, 1.2 Äq.) bei 0 °C versetzt. Anschließend wurden 830  $\mu$ L einer TiCl<sub>4</sub>-Lösung (0.83 mmol, 0.4 Äq., 1 M in DCM) tropfenweise zugefügt und die Reaktionslösung langsam auf Raumtemperatur erwärmen lassen. Nach 6 h wurde die Reaktion durch Zugabe von Eis und 20 mL einer ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung beendet. Das Rohprodukt wurde mit 75 mL DCM extrahiert, die organische Phase mit 20 mL einer ges. NaCl-Lösung gewaschen und über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittel *in vacuo* und säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH 30:1 → 20:1) wurden 925 mg der Verbindung **6** (1.71 mmol, 83%) in Form eines farblosen Feststoffs erhalten.

**DC:**  $R_f = 0.43$  (DCM/MeOH 20:1).

**<sup>1</sup>H-NMR (599 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm):**  $\delta = 7.79$  (s, 1H, 6-H), 7.15 (s, 1H, NH<sub>2</sub>), 6.36 (s, 1H, NH<sub>2</sub>), 6.24 (dd, <sup>3</sup> $J = 6.5$  Hz, <sup>3</sup> $J = 6.5$  Hz, 1H, 1'-H), 5.26 (s, 1H, O-CH-O), 4.34-4.31 (m, 1H, 3'-H), 4.24-4.19 (m, 2H, 2x O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 3.93 (dd, <sup>3</sup> $J = 3.2$  Hz, <sup>3</sup> $J = 3.2$  Hz, 1H, 4'-H), 3.92-3.85 (m, 2H, 2x O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 3.83 (dd, <sup>2</sup> $J = 11.3$  Hz, <sup>3</sup> $J = 3.3$  Hz, 1H, 5'-H), 3.74 (dd, <sup>2</sup> $J = 11.3$  Hz, <sup>3</sup> $J = 3.1$ , 1H, 5'-H), 2.43 (ddd, <sup>2</sup> $J = 13.4$  Hz, <sup>3</sup> $J = 6.0$  Hz, <sup>3</sup> $J = 3.3$  Hz, 1H, 2'-H), 2.21-2.11 (m, 1H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 1.95 (ddd, <sup>2</sup> $J = 13.4$  Hz, <sup>3</sup> $J = 6.8$  Hz, <sup>3</sup> $J = 6.4$  Hz, 1H, 2'-H), 1.47-1.42 (m, 1H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 0.91 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.87 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.10 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.09 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.05 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.05 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

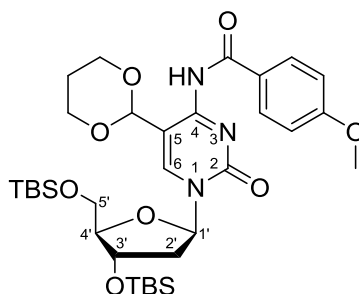
**<sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm):**  $\delta = 163.1$  (C4), 154.9 (C2), 140.1 (C6), 103.6 (C5), 99.4 (O-CH-O), 87.8 (C4'), 86.4 (C1'), 71.9 (C3'), 67.3 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 62.8 (C5'), 42.2 (C2'), 26.0 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 25.7 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 25.5 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 18.4 (Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 18.0 (Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), -4.6 (Si-CH<sub>3</sub>), -4.9 (Si-CH<sub>3</sub>), -5.4 (Si-CH<sub>3</sub>), -5.5 (Si-CH<sub>3</sub>).

**HRMS (ESI+):** ber. für C<sub>25</sub>H<sub>48</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>Si<sub>2</sub><sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup>: 542.3076, gef.: 542.3085.

**IR (ATR):**  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 3444 (w), 2954 (m), 2928 (m), 2856 (m), 1672 (s), 1514 (m), 1471 (m), 1253 (m), 1098 (s), 835 (s), 777 (s).

**Schmelzbereich:** 80-82 °C.

### 10.2.5 *O*<sup>3',5'</sup>-Bis(*tert*butyldimethylsilyl)-*N*<sup>4</sup>-(*para*-methoxybenzoyl)-5-(1,3-dioxan-2-yl)-2'-desoxycytidin (**125**)



In einem ausgeheizten Rundkolben wurden 275 mg der Verbindung **6** (0.51 mmol, 1.0 Äq.) in 6.4 mL Pyridin (0.08 M) bei 0 °C gelöst. Anschließend wurden 76 µL *para*-Methoxybenzoylchlorid (0.56 mmol, 1.1 Äq.) tropfenweise zugefügt und die Reaktionslösung langsam auf Raumtemperatur erwärmen lassen. Nach 6 h wurde die Reaktion durch Zugabe von Eis und 5 mL einer ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung beendet. Das Rohprodukt wurde mit 2x 20 mL EtOAc extrahiert und mit 5 mL einer ges. NH<sub>4</sub>Cl-Lösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurde über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH 100:1 → 75:1 → 50:1) wurden 315 mg der Verbindung **125** (466 µmol, 92%) in Form eines farblosen Feststoffs erhalten.

**DC:**  $R_f = 0.81$  (DCM/MeOH 20:1).

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm):**  $\delta = 13.37$  (s, 1H, NH), 8.22 (d, <sup>3</sup> $J = 8.8$  Hz, 2H, 2x O=C=C=CH), 7.96 (s, 1H, 6-H), 6.92 (d, <sup>3</sup> $J = 8.8$  Hz, 2H, 2x CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 6.24 (dd, <sup>3</sup> $J = 8.2$  Hz, <sup>3</sup> $J = 5.6$  Hz, 1H, 1'-H), 5.81 (s, 1H, O-CH-O), 4.41 (dt, <sup>3</sup> $J = 5.9$  Hz, <sup>3</sup> $J = 2.3$  Hz, 1H, 3'-H), 4.29-4.27 (m, 2H, 2x O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 4.08-3.99 (m, 2H, 2x O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 4.00-3.96 (m, 1H, 4'-H), 3.87 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.83-3.74 (m, 2H, 5'-H), 2.35 (ddd, <sup>2</sup> $J = 13.3$  Hz, <sup>3</sup> $J = 5.3$  Hz, <sup>3</sup> $J = 1.7$  Hz, 1H, 2'-H), 2.24-2.10 (m, 1H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 2.02 (ddd, <sup>2</sup> $J = 13.4$  Hz, <sup>3</sup> $J = 8.1$  Hz, <sup>3</sup> $J = 5.9$  Hz, 1H, 2'-H), 1.48-1.42 (m, 1H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 0.92 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.89 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.12 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.11 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.08 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.07 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm):**  $\delta = 163.1$  (C4-N-C=O, C-O-CH<sub>3</sub>), 157.5 (C4), 147.8 (C2),

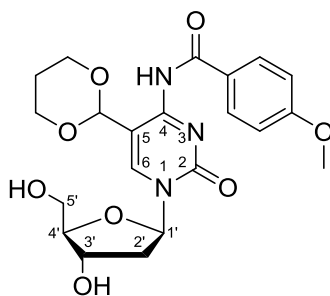
139.3 (C6), 131.9 (C4-N-(C=O)-C=CH), 129.8 (C4-N-(C=O)-C=CH), 113.3 (CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 96.1 (C5), 96.0 (O-CH-O), 88.2 (C4'), 86.2 (C1'), 72.4 (C3'), 67.6 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 67.5 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 63.0 (C5'), 55.4 (O-CH<sub>3</sub>), 41.4 (C2'), 26.0 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 25.7 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 25.6 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 18.4 (Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 18.0 (Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), -4.6 (Si-CH<sub>3</sub>), -4.9 (Si-CH<sub>3</sub>), -5.4 (Si-CH<sub>3</sub>), -5.5 (Si-CH<sub>3</sub>).

**HRMS (ESI+):** ber. für C<sub>33</sub>H<sub>53</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>Si<sub>2</sub><sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup>: 676.3444, gef.: 676.3440.

**IR (ATR):**  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 2953 (m), 2928 (m), 2855 (m), 1706 (s), 1651 (m), 1563 (s), 1249 (s), 1160 (s), 1100 (s), 830 (s), 776 (s).

**Schmelzbereich:** 64-65 °C.

### 10.2.6 N<sup>4</sup>-(*Para*-methoxybenzoyl)-5-(1,3-dioxan-2-yl)-2'-desoxycytidin (7)



In einem Polypropylengefäß wurden 284 mg der Verbindung **125** (420 µmol, 1.0 Äq.) in 6.0 mL EtOAc (0.07 M) gelöst sowie mit 169 µL Pyridin (2.10 mmol, 5.0 Äq.) und 109 µL HF·Pyridin (70% HF, 4.20 mmol, 10.0 Äq.) versetzt. Nach 2 h bei Raumtemperatur wurde ein vollständiger Reaktionsumsatz beobachtet und 420 µL TMSOMe (1 mL/mmol) der entstandenen Suspension zugefügt. Nach 30 min wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und mittels säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH 15:1 → 10:1) konnten 175 mg der Verbindung **7** (391 µmol, 93%) in Form eines farblosen Feststoffs erhalten werden.

**DC:**  $R_f$  = 0.24 (DCM/MeOH 10:1).

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, ppm):**  $\delta$  = 12.98 (s, 1H, NH), 8.28 (s, 1H, 6-H), 8.02 (d, <sup>3</sup>J = 8.5 Hz, 2H, 2x O=C-C=CH), 7.02 (d, <sup>3</sup>J = 8.8 Hz, 2H, 2x CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 6.10 (dd, <sup>3</sup>J = 6.4 Hz, <sup>3</sup>J = 6.4 Hz, 1H, 1'-H), 5.63 (s, 1H, O-CH-O), 5.25 (d, <sup>3</sup>J = 4.3 Hz, 1H, 3'-OH), 4.99 (dd, <sup>3</sup>J = 4.8 Hz, <sup>3</sup>J = 4.8 Hz, 1H, 5'-OH), 4.24-4.17 (m, 1H, 3'-H), 4.08 (dd, <sup>2</sup>J = 11.3 Hz, <sup>3</sup>J = 4.7 Hz, 2H, 2x O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 3.88 (dd, <sup>2</sup>J = 11.3 Hz, <sup>3</sup>J = 4.6 Hz, 2H, 2x O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 3.84-3.82

(m, 1H, 4'-H), 3.81 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.63-3.49 (m, 2H, 5'-H), 2.27-2.15 (m, 1H, 2'-H), 2.13-2.01 (m, 1H, 2'-H), 2.00-1.84 (m, 1H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 1.42-1.38 (m, 1H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O).

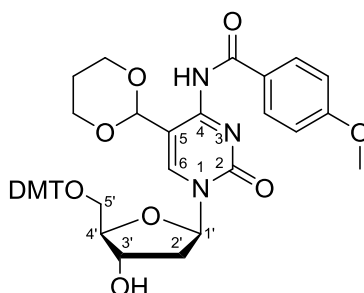
**<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, ppm):** δ = 162.8 (C4-N-C=O, C-O-CH<sub>3</sub>), 156.6 (C4), 147.1 (C2), 140.4 (C6), 131.1 (C4-N-(C=O)-C=CH), 130.3 (C4-N-(C=O)-C=CH), 113.8 (CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 95.5 (C5), 95.2 (O-CH-O), 87.8 (C4'), 85.8 (C1'), 70.0 (C3'), 66.8 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 60.9 (C5'), 55.5 (O-CH<sub>3</sub>), 40.4 (C2'), 25.2 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O).

**HRMS (ESI<sup>-</sup>):** ber. für C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub><sup>-</sup> [M-H]<sup>-</sup>: 446.1569, gef.: 446.1562.

**IR (ATR):** ν (cm<sup>-1</sup>) = 3333 (w), 3052 (m), 2933 (m), 2837 (m), 1711 (m), 1665 (m), 1577 (s), 1251 (s), 1098 (s), 1086 (s), 855 (m), 792 (m).

**Schmelzbereich:** 147-148 °C.

### 10.2.7 O<sup>5'</sup>-(Dimethoxytrityl)-N<sup>4</sup>-(*para*-methoxybenzoyl)-5-(1,3-dioxan-2-yl)-2'-desoxycytidin (126)



In einem ausgeheiztem Rundkolben wurden 140 mg der Verbindung **7** (0.31 mmol, 1.0 Äq.) in 2.1 mL Pyridin (0.15 M) gelöst, mit 3 Å Molsieb, 61 µL Triethylamin (0.44 mmol, 1.4 Äq.) und 148 mg DMT-Cl (0.44 mmol, 1.4 Äq.) versetzt und für 17 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden mittels Zugabe von 5 mL MeOH unreaktierte DMT-Spezies verethert. Nachfolgend wurden 10 mL einer ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung zugegeben, die wässrige Phase mit 20 mL EtOAc extrahiert und die organische Phase über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* und säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH/Pyridin 100:1:1) wurden 205 mg der Verbindung **126** (273 µmol, 87%) in Form eines farblosen Feststoffs erhalten.

**DC:** R<sub>f</sub> = 0.60 (DCM/MeOH 10:1).

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm):** δ = 12.62 (s, 1H, NH), 8.24 (s, 1H, 6-H), 8.18 (d, <sup>3</sup>J = 8.3 Hz, 2H, 2x O=C-C=CH-CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 7.46 (dd, <sup>3</sup>J = 8.3 Hz, <sup>4</sup>J = 1.2 Hz, 2H, 2x CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH-

CH=CH), 7.37-7.33 (m, 4H, 4x CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH-CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 7.32-7.28 (m, 2H, 2x CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH-CH=CH), 7.22 (dddd, <sup>3</sup>J = 7.4 Hz, <sup>3</sup>J = 7.4 Hz, <sup>4</sup>J = 1.1 Hz, <sup>4</sup>J = 1.1 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH-CH=CH), 6.94-6.91 (m, 2H, O=C-C=CH-CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 6.87-6.82 (m, 4H, 4x CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH-CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 6.34 (dd, <sup>3</sup>J = 7.8 Hz, <sup>3</sup>J = 5.8 Hz, 1H, 1'-H), 5.59 (s, 1H, O-CH-O), 4.45-4.42 (m, 1H, 3'-H), 4.07-4.04 (m, 1H, 4'-H), 3.87 (s, 3H, O=C-C=CH-CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 3.85-3.79 (m, 2H, 2x O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 3.78 (s, 3H, CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH-CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 3.78 (s, 3H, CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH-CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 3.74-3.70 (m, 2H, 2x O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 3.55 (dd, <sup>2</sup>J = 10.6 Hz, <sup>3</sup>J = 3.4 Hz, 1H, 1x 5'-H), 3.25 (dd, <sup>2</sup>J = 10.6 Hz, <sup>3</sup>J = 3.5 Hz, 1H, 1x 5'-H), 2.51-2.43 (m, 1H, 1x 2'-H), 2.28-2.21 (m, 1H, 1x 2'-H), 1.66-1.53 (m, 1H, 1x O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 1.12-1.08 (m, 1H, 1x O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O).

<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm): δ = 163.3 (C4-N-C(=O)-C=CH-CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 158.7 (2x CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH-CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 157.6 (C4), 148.6 (C2), 144.7 (CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH-CH=CH), 140.0 (C6), 136.1 (CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH-CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 135.7 (CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH-CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 131.8 (C4-N-(C=O)-C=CH), 130.3 (2x CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH-CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 130.2 (2x CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH-CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 129.6 (C4-N-(C=O)-C=CH), 128.3 (2x CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH-CH=CH), 128.1 (2x CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH-CH=CH), 126.9 (CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH-CH=CH), 113.6 (2x C4-N-C(=O)-C=CH-CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 113.3 (4x CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH-CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 96.2 (C5), 96.0 (O-CH-O), 86.8 (CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH-CH=CH), 86.3 (C4'), 85.8 (C1'), 72.2 (C3'), 67.4 (2x O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 63.4 (C5'), 55.6 (C4-N-C(=O)-C=CH-CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 55.4 (2x CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH-CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 41.6 (C2'), 25.2 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O).

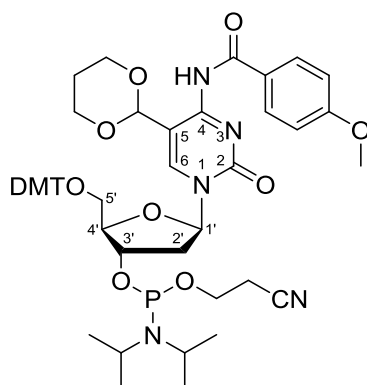
**HRMS (ESI+):** ber. für C<sub>42</sub>H<sub>44</sub>N<sub>3</sub>O<sub>10</sub><sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup>: 750.3021, gef.: 750.3019.

**IR (ATR):** ν (cm<sup>-1</sup>) = 3326 (w), 3052 (m), 2933 (m), 2837 (m), 1707 (m), 1604 (m), 1564 (s), 1245 (s), 1099 (s), 1029 (m), 827 (m), 733 (m).

**Schmelzbereich:** 108-109 °C.



### 10.2.8 *O*-(Diisopropylcyanoethylphosphin)-*O*<sup>5'</sup>-dimethoxytrityl-*N*<sup>4</sup>-(*para*-methoxybenzoyl)-5-(1,3-dioxan-2-yl)-2'-desoxycytidin (**8**)



In einem ausgeheizten *Schlenk*-Rohr wurden 168 mg der Verbindung **126** (0.22 mmol, 1.0 Äq.) in 2.8 mL sorgfältig entgastem DCM (0.08 M) gelöst, mit 23 mg Diisopropylammoniumtetrazolid (0.13 mmol, 0.6 Äq.) und 93  $\mu$ L 2-Cyanoethoxy-*N,N,N',N'*-tetraisopropylphosphordiamidit (0.29 mmol, 1.3 Äq.) versetzt und für 17 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittel im Argongas-Gegenstrom und säulenchromatographischer Aufreinigung (passiviertes Silica, entgastes Laufmittel, *i*Hex/EtOAc 1:2) wurden 172 mg der Verbindung **8** (181  $\mu$ mol, 81%) als Gemisch zweier Diastereomeren in Form eines farblosen Feststoffs erhalten.

**DC:**  $R_f = 0.51$  (DCM/MeOH 20:1 + 0.05% NEt<sub>3</sub>).

**<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm):**  $\delta = 13.14$  (s, 1H, NH), 8.36-8.13 (m, 3H, 6-H, 2x O=C-C=CH-CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 7.50-7.45 (m, 2H, 2x CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH-CH=CH), 7.40-7.33 (m, 4H, 4x CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH-CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 7.33-7.28 (m, 2H, 2x CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH-CH=CH), 7.22 (dddd, <sup>3</sup>*J* = 7.4 Hz, <sup>3</sup>*J* = 7.4 Hz, <sup>4</sup>*J* = 1.1 Hz, <sup>4</sup>*J* = 1.1 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH-CH=CH), 6.95-6.91 (m, 2H, O=C-C=CH-CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 6.88-6.82 (m, 4H, 4x CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH-CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 6.38-6.33 (m, 1H, 1'-H), 5.73 (s, 1H, O-CH-O), 4.53-4.47 (m, 1H, 3'-H), 4.17-4.11 (m, 1H, 4'-H), 3.87 (s, 3H, O=C-C=CH-CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 3.81-3.69 (m, 10H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O, 2x CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH-CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 3.67-3.46 (m, 5H, 1x 5'-H, 2x P-N-CH, P-O-CH<sub>2</sub>), 3.19 (dd, <sup>2</sup>*J* = 10.6 Hz, <sup>3</sup>*J* = 3.2 Hz, 1H, 1x 5'-H), 2.66-2.30 (m, 3H, 1x 2'-H, P-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 2.29-2.19 (m, 1H, 2'-H), 1.77-1.60 (m, 1H, 1x O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 1.16-0.97 (m, 13H, 1x O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O, 12x P-N-CH-CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm):**  $\delta = 163.3$  (C4-N-C(=O)-C=CH-CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 158.7 (2x CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH-CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 157.4 (C4), 147.7 (C2), 144.7 (CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH-CH=CH), 139.5 (C6), 136.1 (CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH-CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 135.7 (CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH-CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 132.0 (C4-N-(C=O)-C=CH), 130.4 (2x CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH-CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 130.3 (2x CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH-

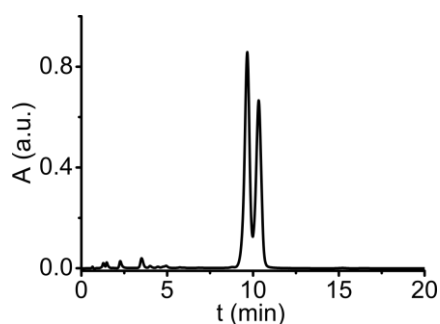
CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 129.9 (C4-N-(C=O)-C=CH), 128.4 (CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH-CH=CH), 128.4 (CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH-CH=CH), 128.0 (2x CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH-CH=CH), 126.9 (CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH-CH=CH), 117.6 (0.5x P-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CN), 117.4 (0.5x P-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CN), 113.5 (2x C4-N-C(=O)-C=CH-CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 113.3 (4x CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH-CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 95.7 (C5), 95.2 (O-CH-O), 86.8 (CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH-CH=CH), 86.0 (C4'), 85.7 (C1'), 73.9 (0.5x C3'), 73.7 (0.5x C3'), 67.4 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 63.0 (0.5x C5'), 62.8 (0.5x C5'), 58.8-58.1 (P-O-CH<sub>2</sub>), 55.5 (C4-N-C(=O)-C=CH-CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 55.4 (2x CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH-CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 43.6-43.0 (2x P-N-CH), 40.7 (C2'), 25.1 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 24.9-24.5 (4x P-N-CH-CH<sub>3</sub>), 20.5-20.2 (P-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>).

**<sup>31</sup>P-NMR (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm):** δ = 149.2, 148.3.

**HRMS (ESI+):** ber. für C<sub>51</sub>H<sub>61</sub>N<sub>5</sub>O<sub>11</sub>P<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup>: 950.4100, gef.: 950.4100.

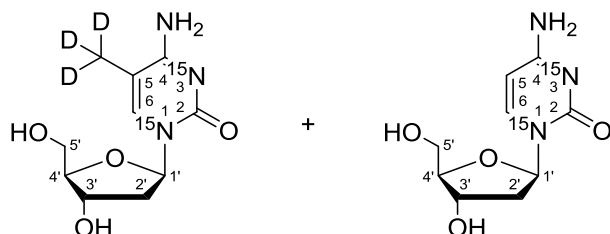
**(ESI-):** ber. für C<sub>51</sub>H<sub>59</sub>N<sub>5</sub>O<sub>11</sub>P<sup>-</sup> [M-H]<sup>-</sup>: 948.3954, gef.: 948.3953.

**HPLC (EC 125/2 Nucleosil 120-3 C8 Macherey-Nagel, 30% Puffer B, 20 min):** t<sub>R</sub> (min) = 9.7, 10.3.



### 10.3 Vorschriften zur Synthese isotopenmarkierter, epigenetisch relevanter Nukleoside

#### 10.3.1 5-Trideuteromethyl-2'-desoxy-( $N^1, N^3$ - $^{15}N_2$ )-cytidin (**24**) und 2'-desoxy-[ $N^1, N^3$ - $^{15}N_2$ ]-cytidin (**25**)



In einem ausgeheizten Rundkolben wurden 50 mg der Verbindung **23** (84.5  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äq., hergestellt von S. Voss (AK Carell)) sowie 23 mg  $\text{Ni}(\text{dppp})\text{Cl}_2$  (42.3  $\mu\text{mol}$ , 0.5 Äq.) für 60 min im Hochvakuum getrocknet, anschließend mit 1.7 mL THF (0.05 M) versetzt, auf 0 °C gekühlt, der roten Reaktionslösung langsam 186  $\mu\text{L}$  einer  $\text{D}_3\text{C-MgI}$ -Lösung (1.0 M in Diethylether, 186  $\mu\text{mol}$ , 2.2 Äq.) zugegeben und für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden weitere 93  $\mu\text{L}$   $\text{D}_3\text{C-MgI}$ -Lösung (1 M in Diethylether, 93  $\mu\text{mol}$ , 1.1 Äq.) zugegeben und für 1 h gerührt. Nach vollständigem Umsatz erfolgte die Zugabe von 4.0 mL einer ges.  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Lösung. Das Rohprodukt wurde mit 3x 20 mL EtOAc extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* und säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH 100:1  $\rightarrow$  70:1  $\rightarrow$  50:1  $\rightarrow$  30:1) wurden 41 mg eines 1:2.3-Gemisch aus  $O^{3',5'}$ -Bis(toluoyl)-5-trideuteromethyl-2'-desoxy-( $N^1, N^3$ - $^{15}N_2$ )-cytidin (Ausbeute ca. 20%) und  $O^{3',5'}$ -Bis(toluoyl)-2'-desoxy-[ $N^1, N^3$ - $^{15}N_2$ ]-cytidin (Ausbeute ca. 45%) mit gleichen Retentionsfaktor erhalten, welches direkt in der nächsten Reaktion umgesetzt wurde.

Das Gemisch wurde in 3.6 mL MeOH gelöst, mit 37 mg  $\text{K}_2\text{CO}_3$  versetzt und für 21 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Aufreinigung mittels präparativer *reversed phase* HPLC (0-15% in 45 min MeCN) wurden 0.57 mg 5-Trideuteromethyl-2'-desoxy-( $N^1, N^3$ - $^{15}N_2$ )-cytidin (**24**, 2.33  $\mu\text{mol}$ , 3%) und 1.78 mg 2'-desoxy-[ $N^1, N^3$ - $^{15}N_2$ ]-cytidin (**25**, 7.77  $\mu\text{mol}$ , 10%) in Form eines farblosen Feststoffs erhalten.

#### 5-Trideuteromethyl-2'-desoxy-( $N^1, N^3$ - $^{15}N_2$ )-cytidin (**24**):

HPLC (EC 125/2 Nucleosil 120-3 C8 Macherey-Nagel, 0-15% in 45 min MeCN):  $t_R$  (min) = 17.4.

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , ppm):  $\delta$  = 7.62 (d,  $^2J_{\text{H-N}} = 1.7$  Hz, 1H, 6-H), 6.25 (dt,  $^3J = 6.6$  Hz, 1H, 1'-H), 4.41 (dt,  $^3J = 6.6$  Hz,  $^3J = 4.1$  Hz, 1H, 3'-H), 4.00 (dt,  $^3J = 5.0$  Hz,  $^3J = 3.7$  Hz, 1H, 4'-H), 3.82

(dd,  $^2J = 12.5$  Hz,  $^3J = 3.6$  Hz, 1H, 5'-H), 3.73 (dd,  $^2J = 12.5$  Hz,  $^3J = 5.1$  Hz, 1H, 5'-H), 2.37 (dddd,  $^2J = 14.1$  Hz,  $^3J = 6.2$  Hz,  $^3J = 4.2$  Hz,  $^4J = 1.6$  Hz, 1H, 2'-H), 2.27 (dtd,  $^2J = 13.9$  Hz,  $^3J = 6.8$  Hz,  $^4J = 2.4$  Hz, 1H, 2'-H).

### 2'-Desoxy-( $N^1, N^3$ - $^{15}\text{N}_2$ )-cytidin (**25**):

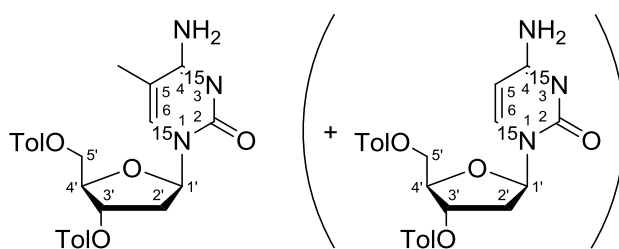
**HPLC** (EC 125/2 Nucleosil 120-3 C8 *Macherey-Nagel*, 0-15% in 45 min MeCN):  $t_R$  (min) = 13.5.

**$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , ppm):**  $\delta = 7.82$  (dd,  $^3J = 7.5$  Hz,  $^2J_{\text{H-N}} = 1.5$  Hz, 1H, 6-H), 6.26 (td,  $^3J = 6.7$  Hz,  $^4J = 1.1$  Hz, 1H, 1'-H), 6.03 (ddt,  $^3J = 7.6$  Hz,  $^4J = 3.7$  Hz,  $^3J_{\text{H-N}} = 0.6$  Hz, 1H, 5-H), 4.44 (dtd,  $^3J = 6.6$  Hz,  $^3J = 4.0$  Hz,  $^4J = 0.6$  Hz, 1H, 3'-H), 4.07 (dt,  $^3J = 5.2$  Hz,  $^3J = 3.7$  Hz, 1H, 4'-H), 3.85 (dd,  $^2J = 12.5$  Hz,  $^3J = 3.6$  Hz, 1H, 5'-H), 3.77 (dd,  $^2J = 12.5$  Hz,  $^3J = 5.2$  Hz, 1H, 5'-H), 2.44 (dddd,  $^2J = 14.1$  Hz,  $^3J = 6.4$  Hz,  $^3J = 4.0$  Hz,  $^4J = 1.6$  Hz, 1H, 2'-H), 2.28 (dtd,  $^2J = 14.1$  Hz,  $^3J = 6.7$  Hz,  $^4J = 2.4$  Hz, 1H, 2'-H).

**$^{13}\text{C-NMR}$  (101 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , ppm):**  $\delta = 166.0$  (dd,  $^1J_{\text{C-N}} = 6.2$  Hz,  $^3J_{\text{C-N}} = 2.1$  Hz, C4), 157.3 (dd,  $^1J_{\text{C-N}} = 13.6$  Hz,  $^1J_{\text{C-N}} = 8.5$  Hz, C2), 141.4 (d,  $^1J_{\text{C-N}} = 13.0$  Hz, C6), 96.1 (C5), 86.5 (d,  $^3J_{\text{C-N}} = 0.7$  Hz, C4'), 86.1 (d,  $^1J_{\text{C-N}} = 11.4$  Hz, C1'), 70.5 (d,  $^3J_{\text{C-N}} = 0.9$  Hz, C3'), 61.2 (C5'), 39.3 (C2').

**$^{15}\text{N-NMR}$  (41 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , ppm):**  $\delta = -178.5, -223.6$ .

### 10.3.2 $O^{3',5'}$ -Bis(toluoyl)-5-methyl-2'-desoxy-[ $N^1, N^3$ - $^{15}\text{N}_2$ ]-cytidin (**127**)



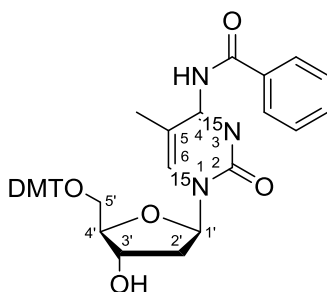
In einem ausgeheizten Rundkolben wurden 1.40 g der Verbindung **23** (2.37 mmol, 1.0 Äq., hergestellt von *S. Voss* (AK Carell)) sowie 642 mg  $\text{Ni}(\text{dppp})\text{Cl}_2$  (1.18 mmol, 0.5 Äq.) für 15 h im Hochvakuum getrocknet, anschließend mit 47.0 mL THF (0.05 M) versetzt, auf  $-78$  °C gekühlt und der roten Reaktionslösung über 30 min 2.64 mL einer  $\text{MeMgCl}$ -Lösung (1.8 M in THF, 4.74 mmol, 2.0 Äq.) zugegeben. Die Suspension wurde für 4 h bei  $-78$  °C und nachfolgend für 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach vollständigem Umsatz erfolgte die Zugabe von 50 mL einer ges.  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Lösung. Das Rohprodukt wurde mit 3x 100 mL EtOAc extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* und säulenchroma-

tographischer Aufreinigung (DCM/MeOH 70:1 → 40:1 → 20:1) wurde 926 mg eines 1:1.2-Gemisches aus  $O^{3',5'}$ -Bis(toluoyl)-5-methyl-2'-desoxy- $(N^1, N^3-^{15}N_2)$ -cytidin (**127**, Ausbeute: 38%) und  $O^{3',5'}$ -Bis(toluoyl)-2'-desoxy- $[N^1, N^3-^{15}N_2]$ -cytidin (Ausbeute: 45%) mit gleichen Retentionsfaktor erhalten, welches direkt in der nächsten Reaktion umgesetzt wurde.

**DC:**  $R_f = 0.44$  (DCM/MeOH 10:1).

**HRMS (ESI+):** ber. für  $C_{26}H_{28}N^{15}N_2O_6^+ [M+H]^+$ : 480.1913, gef.: 480.1914.

### 10.3.3 $O^{5'}$ -Dimethoxytrityl- $N^4$ -benzoyl-5-methyl-2'-desoxy- $[N^1, N^3-^{15}N_2]$ -cytidin (**128**)



In einem ausgeheizten Rundkolben wurden 900 mg des Gemisches aus der vorherigen Stufe (1.92 mmol Cytidin-Derivate, 1.0 Äq. (beinhaltete 872  $\mu\text{mol}$   $O^{3',5'}$ -Bis(toluoyl)-5-methyl-2'-desoxy- $(N^1, N^3-^{15}N_2)$ -cytidin), **127**) in 24.0 mL Pyridin (0.08 M) bei 0 °C gelöst. Anschließend wurden 267  $\mu\text{L}$  Benzoylchlorid (2.30 mmol, 1.2 Äq.) tropfenweise zugefügt und die Reaktionslösung langsam auf Raumtemperatur erwärmen lassen. Nach 18 h wurde die Reaktion durch Zugabe von Eis und 100 mL einer ges.  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung beendet. Das Rohprodukt wurde mit 2x 100 mL EtOAc extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit 50 mL einer ges.  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Lösung gewaschen und über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* und säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH 70:1 → 50:1 → 30:1) wurden 328 mg der Verbindung  $O^{3',5'}$ -Bis(toluoyl)- $N^4$ -benzoyl-5-methyl-2'-desoxy- $[N^1, N^3-^{15}N_2]$ -cytidin (576  $\mu\text{mol}$ , 66%) in Form eines farblosen Feststoffs erhalten, welches ohne Charakterisierung direkt umgesetzt wurde.

Im Folgenden wurden 328 mg dieser Verbindung (576  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äq.) in 3.2 mL eines Gemisches aus Pyridin/EtOH (1:1) gelöst und mit 4.2 mL einer Lösung aus wässriger NaOH (2 N) und EtOH (1:1) versetzt. Die entstandene Suspension wurde für 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach vollständigem Umsatz erfolgte die Zugabe des Kationenaustauschers Dowex® 50W X8 bis pH = 7 erreicht wurde. Die Suspension wurde filtriert, der Rückstand mit 50 mL EtOH gewaschen, das Filtrat *in vacuo* eingengt und das erhaltene Rohprodukt ohne Charakterisierung direkt in der nächsten

Reaktion umgesetzt.

In einem ausgeheiztem Rundkolben wurden das Rohprodukt in 2.0 mL Pyridin gelöst, mit 3 Å Molsieb, 56 µL Triethylamin und 204 mg DMT-Cl versetzt und für 3 d bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden mittels Zugabe von 5 mL MeOH unreaktierte DMT-Spezies verethert. Nachfolgend wurden 20 mL einer ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung zugegeben, die wässrige Phase mit 50 mL EtOAc extrahiert und die organische Phase über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo*, Coevaporieren mit 50 mL Toluol und säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH 1:0 → 100:1 → 20:1 (+ jeweils 0.5% Pyridin)) wurden 170 mg der Verbindung **128** (261 µmol, 30% über 3 Stufen) in Form eines farblosen Feststoffs erhalten.

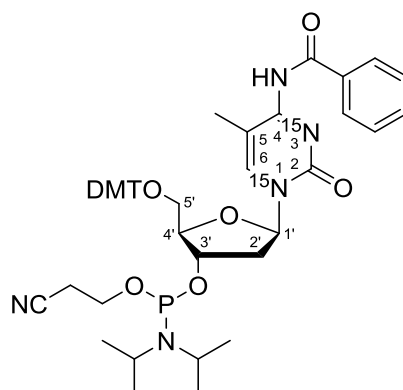
**DC:**  $R_f = 0.22$  (DCM/MeOH 20:1).

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm):**  $\delta = 13.28$  (d,  $^3J_{\text{H-N}} = 83.0$  Hz, 1H, NH), 8.29 (d,  $^3J = 7.6$  Hz, 2H, 2x O=C-C=CH=CH=CH), 7.81 (s, 1H, 6-H), 7.51 (t,  $^3J = 7.1$  Hz, 1H, O=C-C=CH=CH=CH), 7.46-7.38 (m, 4H, 4x CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH=CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 7.34-7.21 (m, 7H, 2x CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH=CH=CH, 2x CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH=CH=CH, CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH=CH=CH, 2x O=C-C=CH=CH=CH), 6.85 (d,  $^3J = 8.8$  Hz, 4H, 4x CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH=CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 6.42 (t,  $^3J = 7.1$  Hz, 1H, 1'-H), 4.60 (dt,  $^3J = 6.2$  Hz,  $^3J = 3.1$  Hz, 1H, 3'-H), 4.10 (q,  $^3J = 3.0$  Hz, 1H, 4'-H), 3.79 (s, 6H, 2x O=C-C=CH=CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 3.51 (dd,  $^2J = 10.6$  Hz,  $^3J = 3.1$  Hz, 1H, 5'-H), 3.38 (dd,  $^2J = 10.6$  Hz,  $^3J = 3.0$  Hz, 1H, 5'-H), 2.50 (dddd,  $^2J = 13.5$  Hz,  $^3J = 6.1$  Hz,  $^3J = 3.1$  Hz,  $^4J = 1.2$  Hz, 1H, 1x 2'-H), 2.35 (dddd,  $^2J = 13.5$  Hz,  $^3J = 8.2$  Hz,  $^3J = 6.2$  Hz,  $^4J = 2.5$  Hz, 1H, 1x 2'-H), 1.64 (s, 3H, C5-CH<sub>3</sub>).

**<sup>15</sup>N-NMR (41 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm):**  $\delta = -230.3$  (d,  $^2J_{\text{N-N}} = 2.1$  Hz),  $-233.6$  (br).

**HRMS (ESI+):** ber. für C<sub>38</sub>H<sub>38</sub>N<sup>15</sup>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub><sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup>: 650.2644, gef.: 650.2648.

### 10.3.4 *O*<sup>3'</sup>-(Diisopropylcyanoethylphosphin)-*O*<sup>5'</sup>-dimethoxytrityl-*N*<sup>4</sup>-benzoyl-5-methyl-2'-desoxy-[*N*<sup>1</sup>,*N*<sup>3</sup>-<sup>15</sup>N<sub>2</sub>]-cytidin (**28**)

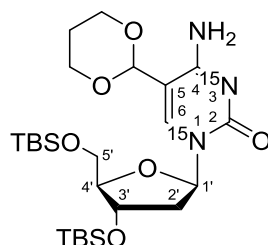


In einem ausgeheizten *Schlenk*-Rohr wurden 70 mg der Verbindung **128** (110  $\mu$ mol, 1.0 Äq.) in 1.4 mL sorgfältig entgastem DCM (0.08 M) gelöst, mit 11 mg Diisopropylammoniumtetrazolid (66  $\mu$ mol, 0.6 Äq.) und 45  $\mu$ L 2-Cyanoethoxy-*N,N,N',N'*-tetraisopropylphosphordiamidit (140  $\mu$ mol, 1.3 Äq.) versetzt und für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittel im Argongas-Gegenstrom und säulenchromatographischer Aufreinigung (passiviertes Silica, entgastes Laufmittel, *i*Hex/EtOAc 1:2) wurden 90 mg der Verbindung **28** (106  $\mu$ mol, 96%) als Gemisch zweier Diastereomeren in Form eines farblosen Feststoffs erhalten.

Die Verbindung wurde direkt für die DNA-Festphasensynthese verwendet. Der gelungene Einbau in DNA wies die erfolgreiche Umsetzung zum Phosphoramidit nach.

**DC:**  $R_f = 0.36$  (DCM/MeOH 40:1).

### 10.3.5 *O*<sup>3',5'</sup>-Bis(*tert*butyldimethylsilyl)-5-(1,3-dioxan-2-yl)-2'-desoxy-[*N*<sup>1</sup>,*N*<sup>3</sup>-<sup>15</sup>N<sub>2</sub>]-cytidin (**31**)



In einem ausgeheizten Rundkolben wurden 588 mg der Verbindung *O*<sup>3',5'</sup>-Bis(*tert*butyldimethylsilyl)-5-formyl-2'-desoxy-[*N*<sup>1</sup>,*N*<sup>3</sup>-<sup>15</sup>N<sub>2</sub>]-cytidin (**29**) (1.21 mmol, 1.0 Äq.) in

12.1 mL DCM (0.10 M) mit 351  $\mu\text{L}$  Propandiol (4.84 mmol, 4.0 Äq.) und 239  $\mu\text{L}$  Orthoameisensäuretriethylester (1.45 mmol, 1.2 Äq.) bei 0 °C gelöst. Anschließend wurden 424  $\mu\text{L}$  einer  $\text{TiCl}_4$ -Lösung (0.42 mmol, 0.35 Äq., 1 M in DCM) tropfenweise zugefügt und die Reaktionslösung langsam auf Raumtemperatur erwärmen lassen. Nach 4 h wurde der vollständige Umsatz beobachtet und der Reaktionslösung 15 mL einer ges.  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung zugegeben. Das Rohprodukt wurde mit 75 mL DCM extrahiert, die organische Phase mit 20 mL einer ges.  $\text{NaCl}$ -Lösung gewaschen und über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittel *in vacuo* und säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH 40:1  $\rightarrow$  20:1) wurden 359 mg der Verbindung **31** (0.66 mmol, 55%) in Form eines farblosen Feststoffs erhalten.

**DC:**  $R_f = 0.43$  (DCM/MeOH 20:1).

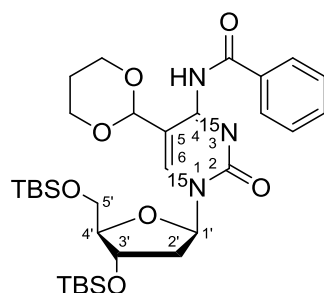
**$^1\text{H-NMR}$  (599 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm):**  $\delta = 7.80$  (s, 1H, 6-H), 6.25 (td,  $^3J = 6.4$  Hz,  $^3J = 1.2$  Hz, 1H, 1'-H), 5.25 (s, 1H, O-CH-O), 4.36-4.31 (m, 1H, 3'-H), 4.22 (dddd,  $^2J = 10.6$  Hz,  $^3J = 5.6$  Hz,  $^3J = 2.1$  Hz,  $^4J = 1.0$  Hz, 2H, 2x O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 3.94 (q,  $^3J = 3.2$  Hz, 1H, 4'-H), 3.88 (dtd,  $^2J = 12.2$  Hz,  $^3J = 3.6$  Hz,  $^3J = 2.5$  Hz, 2H, 2x O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 3.84 (dd,  $^2J = 11.3$  Hz,  $^3J = 3.2$  Hz, 1H, 5'-H), 3.75 (dd,  $^2J = 11.3$  Hz,  $^3J = 3.1$  Hz, 1H, 5'-H), 2.45 (dddd,  $^2J = 13.4$  Hz,  $^3J = 6.0$  Hz,  $^3J = 3.4$  Hz,  $^4J = 1.4$  Hz, 1H, 2'-H), 2.25-2.11 (m, 1H, 1x O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 1.95 (dddd,  $^2J = 13.3$  Hz,  $^3J = 7.0$  Hz,  $^3J = 6.3$  Hz,  $^4J = 2.6$  Hz, 1H, 2'-H), 1.46 (ddt,  $^2J = 13.7$  Hz,  $^3J = 2.5$  Hz,  $^3J = 1.2$  Hz, 1H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 0.92 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.87 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.10 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.10 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.06 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.05 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

**$^{13}\text{C-NMR}$  (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm):**  $\delta = 163.5$  (d,  $^1J_{\text{C-N}} = 4.5$  Hz, C4), 155.9 (t,  $^1J_{\text{C-N}} = 9.6$  Hz, C2), 140.3 (d,  $^1J_{\text{C-N}} = 13.9$  Hz, C6), 103.5 (C5), 99.9 (O-CH-O), 88.0 (C4'), 86.5 (d,  $^1J_{\text{C-N}} = 10.8$  Hz, C1'), 72.0 (C3'), 67.5 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 63.0 (C5'), 42.4 (C2'), 26.2 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 25.9 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 25.7 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 18.6 (Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 18.2 (Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), -4.4 (Si-CH<sub>3</sub>), -4.7 (Si-CH<sub>3</sub>), -5.2 (Si-CH<sub>3</sub>), -5.3 (Si-CH<sub>3</sub>).

**HRMS (ESI+):** ber. für  $\text{C}_{25}\text{H}_{48}\text{N}^{15}\text{N}_2\text{O}_6\text{Si}_2^+$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 544.3017, gef.: 544.3010.



### 10.3.6 *O*<sup>3',5'</sup>-Bis(*tert*butyldimethylsilyl)-*N*<sup>4</sup>-benzoyl-5-(1,3-dioxan-2-yl)-2'-desoxy-[*N*<sup>1</sup>,*N*<sup>3</sup>-<sup>15</sup>N<sub>2</sub>]-cytidin (**130**)



In einem ausgeheizten Rundkolben wurden 339 mg der Verbindung **31** (0.62 mmol, 1.0 Äq.) in 8.9 mL Pyridin (0.07 M) bei 0 °C gelöst. Anschließend wurden 90 µL Benzoylchlorid (0.65 mmol, 1.25 Äq.) tropfenweise zugefügt und die Reaktionslösung langsam auf Raumtemperatur erwärmen lassen. Nach 4 h wurde die Reaktion durch Zugabe von Eis und 50 mL einer ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung beendet. Das Rohprodukt wurde mit 2x 50 mL EtOAc extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit 50 mL einer ges. NH<sub>4</sub>Cl-Lösung gewaschen und über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH 100:1 → 30:1 → 10:1) wurden 269 mg der Verbindung **130** (415 µmol, 67%) in Form eines farblosen Feststoffs erhalten.

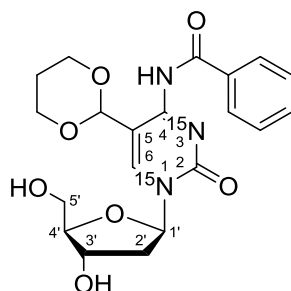
**DC:**  $R_f = 0.80$  (DCM/MeOH 20:1).

**<sup>1</sup>H-NMR (599 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm):**  $\delta = 13.40$  (d,  $^3J_{\text{H-N}} = 92.1$  Hz, 1H, NH), 8.27 (br, 2H, 2x O=C-C=CH-CH=CH), 8.00 (s, 1H, 6-H), 7.56-7.40 (m, 1H, O=C-C=CH-CH=CH), 7.44 (t,  $^3J = 7.5$  Hz, 2H, O=C-C=CH-CH=CH), 6.25 (ddd,  $^3J = 7.4$  Hz,  $^3J = 5.6$  Hz,  $^3J = 1.4$  Hz, 1H, 1'-H), 5.86 (s, 1H, O-CH-O), 4.42 (d,  $^3J = 5.7$  Hz, 1H, 3'-H), 4.28-4.20 (m, 2H, 2x O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 4.04 (br, 2H, 2x O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 3.99 (td,  $^3J = 3.4$  Hz,  $^3J = 2.4$  Hz, 1H, 4'-H), 3.83-3.76 (m, 2H, 5'-H), 2.35 (br, 1H, 2'-H), 2.24-2.12 (m, 1H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 2.03 (dddd,  $^2J = 13.2$  Hz,  $^3J = 8.4$  Hz,  $^3J = 5.9$  Hz,  $^4J = 2.6$  Hz, 1H, 2'-H), 1.50-1.42 (m, 1H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 0.93 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.90 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.12 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.12 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.09 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.08 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm):**  $\delta = 179.7$  (C4-N-C=O), 158.0 (d,  $^1J_{\text{C-N}} = 8.3$  Hz, C4), 149.0 (t,  $^1J_{\text{C-N}} = 7.6$  Hz, C2), 139.7 (d,  $^1J_{\text{C-N}} = 8.5$  Hz, C6), 137.4 (C4-N-(C=O)-C=CH), 132.5 (C4-N-(C=O)-C=CH-CH=CH), 130.1 (2x C4-N-(C=O)-C=CH-CH=CH), 128.3 (2x C4-N-(C=O)-C=CH-CH=CH), 96.1 (C5, O-CH-O), 88.2 (C4'), 86.5 (d,  $^1J_{\text{C-N}} = 7.2$  Hz, C1'), 72.6 (C3'), 67.8 (2x O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 63.2 (C5'), 41.6 (C2'), 26.2 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 25.9 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 25.7 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 18.6 (Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 18.2 (Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), -4.5 (Si-CH<sub>3</sub>), -4.7 (Si-CH<sub>3</sub>), -5.2 (Si-CH<sub>3</sub>), -5.5 (Si-CH<sub>3</sub>).

**HRMS (ESI+):** ber. für  $C_{31}H_{51}N^{15}N_2O_7Si_2^+$   $[M+H]^+$ : 648.3262, gef.: 648.3270.

### 10.3.7 *N*<sup>4</sup>-Benzoyl-5-(1,3-dioxan-2-yl)-2'-desoxy-[*N*<sup>1</sup>,*N*<sup>3</sup>-<sup>15</sup>N<sub>2</sub>]-cytidin (**32**)



In einem Polypropylengefäß wurden 260 mg der Verbindung **130** (0.40 mmol, 1.0 Äq.) in 5.7 mL EtOAc (0.07 M) gelöst, mit 162 µL Pyridin (2.01 mmol, 5.0 Äq.) und 150 µL HF·Pyridin (70% HF, 6.02 mmol, 15.0 Äq.) versetzt sowie für 19 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach vollständigem Umsatz wurden 400 µL TMSOMe (1 mL/mmol) der entstandenen Suspension zugefügt und für 30 min gerührt. Anschließend wurde die Suspension bei 6000 rpm für 15 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und der Rückstand mit 10 mL *i*Hex gewaschen. Nach Trocknung im Hochvakuum für 4 h wurden 155 mg der Verbindung **32** (370 µmol, 92%) in Form eines farblosen Feststoffs erhalten.

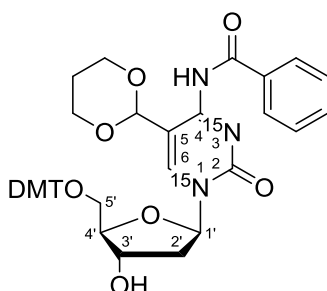
**DC:**  $R_f = 0.30$  (DCM/MeOH 10:1).

**<sup>1</sup>H-NMR (599 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm):**  $\delta = 12.96$  (d,  $^3J_{H-N} = 93.8$  Hz, 1H, NH), 8.36 (br, 2H, 2x O=C-C=CH-CH=CH), 8.15 (s, 1H, 6-H), 7.66-7.46 (m, 3H, O=C-C=CH-CH=CH, 2x O=C-C=CH-CH=CH), 6.13 (t,  $^3J = 6.4$  Hz, 1H, 1'-H), 5.72 (s, 1H, O-CH-O), 5.29 (br, 1H, 3'-OH), 5.04 (br, 1H, 5'-OH), 4.24 (dd,  $^3J = 5.9$  Hz,  $^3J = 3.5$  Hz, 1H, 3'-H), 4.17-4.25 (m, 2H, 2x O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 3.96-3.88 (m, 2H, 2x O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 3.86 (q,  $^3J = 3.7$  Hz, 1H, 4'-H), 3.63 (dd,  $^2J = 11.7$  Hz,  $^3J = 3.8$  Hz, 1H, 5'-H), 3.58 (dd,  $^2J = 11.7$  Hz,  $^3J = 3.8$  Hz, 1H, 5'-H), 2.25 (br, 1H, 2'-H), 2.12 (br, 1H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 1.96 (b, 1H, 2'-H), 1.43 (d, 1H, (d,  $^2J = 13.4$  Hz, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O).

**<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, ppm):**  $\delta = 176.0$  (C4-N-C=O), 154.4 (C4), 149.2 (C2), 140.8 (C6), 136.6 (C4-N-(C=O)-C=CH), 132.6 (C4-N-(C=O)-C=CH-CH=CH), 128.5.1 (2x C4-N-(C=O)-C=CH-CH=CH), 124.6 (2x C4-N-(C=O)-C=CH-CH=CH), 95.5 (C5), 95.2 (O-CH-O), 87.9 (C4'), 85.8 (C1'), 70.0 (C3'), 66.8 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 60.9 (C5'), 40.4 (C2'), 25.2 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O).

**HRMS (ESI-):** ber. für  $C_{20}H_{22}N^{15}N_2O_7^-$   $[M-H]^-$ : 418.1404, gef.: 418.1401.

### 10.3.8 *O*<sup>5'</sup>-Dimethoxytrityl-*N*<sup>4</sup>-benzoyl-5-(1,3-dioxan-2-yl)-2'-desoxy-[*N*<sup>1</sup>,*N*<sup>3</sup>-<sup>15</sup>N<sub>2</sub>]-cytidin (**132**)



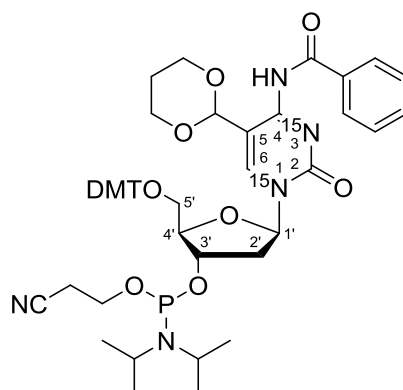
In einem ausgeheiztem Rundkolben wurden 126 mg der Verbindung **32** (0.30 mmol, 1.0 Äq.) in 2.0 mL Pyridin (0.15 M) gelöst, mit 3 Å Molsieb, 62 µL Triethylamin (0.45 mmol, 1.3 Äq.) und 168 mg DMT-Cl (0.49 mmol, 1.65 Äq.) versetzt und für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden mittels Zugabe von 5 mL MeOH unreaktierte DMT-Spezies verethert. Nachfolgend wurden 20 mL einer ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung zugegeben, die wässrige Phase mit 2x 50 mL EtOAc extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* und säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH 100:1 → 40:1 → 20:1 (+ jeweils 0.5% Pyridin)) wurden 173 mg der Verbindung **132** (240 µmol, 80%) in Form eines farblosen Feststoffs erhalten.

**DC:**  $R_f = 0.28$  (DCM/MeOH 40:1).

**<sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm):**  $\delta = 13.03$  (s, 1H, NH), 8.30-8.15 (m, 3H, 6-H, 2x O=C-C=CH=CH=CH), 7.51-7.23 (m, 12H, 2x CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH=CH=CH, 4x CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH=CH=C-O-CH<sub>3</sub>, 2x CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH=CH=CH, CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH=CH=CH, 2x O=C-C=CH=CH=CH, O=C-C=CH=CH=CH), 6.90-6.78 (m, 4H, 4x CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH=CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 6.34 (dd, <sup>3</sup>*J* = 7.8 Hz, <sup>3</sup>*J* = 5.9 Hz, 1H, 1'-H), 5.60 (s, 1H, O-CH-O), 4.48-4.49 (m, 1H, 3'-H), 4.09-4.02 (m, 1H, 4'-H), 3.90-3.60 (m, 10H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O, 2x CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH=CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 3.55 (dd, <sup>2</sup>*J* = 10.9 Hz, <sup>3</sup>*J* = 3.5 Hz, 1H, 5'-H), 3.25 (dd, <sup>2</sup>*J* = 10.9 Hz, <sup>3</sup>*J* = 3.6 Hz, 1H, 5'-H), 2.56-2.42 (m, 1H, 2'-H), 2.36-2.16 (m, 1H, 2'-H), 1.71-1.44 (m, 1H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 1.16-1.03 (m, 1H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O).

**HRMS (ESI<sup>-</sup>):** ber. für C<sub>41</sub>H<sub>40</sub>N<sup>15</sup>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub><sup>-</sup> [M-H]<sup>-</sup>: 720.2711, gef.: 720.2707.

### 10.3.9 *O*<sup>3'</sup>-(Diisopropylcyanoethylphosphin)-*O*<sup>5'</sup>-dimethoxytrityl-*N*<sup>4</sup>-benzoyl-5-(1,3-dioxan-2-yl)-2'-desoxy-[*N*<sup>1</sup>,*N*<sup>3</sup>-<sup>15</sup>N<sub>2</sub>]-cytidin (**30**)



In einem ausgeheizten *Schlenk*-Rohr wurden 80 mg der Verbindung **132** (110  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äq.) in 2.2 mL sorgfältig entgastem DCM (0.05 M) gelöst, mit 11 mg Diisopropylammoniumtetrazolid (70  $\mu\text{mol}$ , 0.6 Äq.) und 46  $\mu\text{L}$  2-Cyanoethoxy-*N,N,N',N'*-tetraisopropylphosphordiamidit (150  $\mu\text{mol}$ , 1.3 Äq.) versetzt und für 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittel im Argongas-Gegenstrom und säulenchromatographischer Aufreinigung (passiviertes Silica, entgastes Laufmittel, *i*Hex/EtOAc 1:2) wurden 84 mg der Verbindung **30** (91  $\mu\text{mol}$ , 83%) als Gemisch zweier Diastereomeren in Form eines farblosen Feststoffs erhalten.

Die Verbindung wurde direkt für die DNA-Festphasensynthese verwendet. Der gelungene Einbau in DNA wies die erfolgreiche Umsetzung zum Phosphoramidit nach.

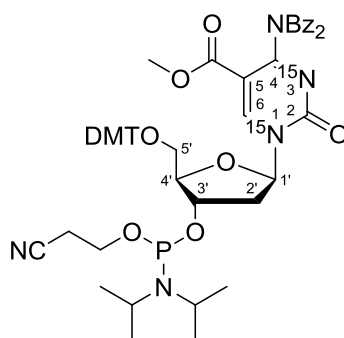
**DC:**  $R_f = 0.34$  (DCM/MeOH 40:1).

**<sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm):**  $\delta = 13.18$  (s, 1H, NH), 8.39-8.13 (m, 3H, 6-H, 2x O=C-C=CH=CH=CH), 7.61-7.09 (m, 12H, 2x CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH=CH=CH, 4x CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH=CH=C-O-CH<sub>3</sub>, 2x CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH=CH=CH, CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH=CH=CH, 2x O=C-C=CH=CH=CH, O=C-C=CH=CH=CH), 6.94-6.79 (m, 4H, 4x CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH=CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 6.43-6.29 (m, 1H, 1'-H), 5.78 (s, 1H, O-CH-O), 4.58-4.43 (m, 1H, 3'-H), 4.18-4.10 (m, 1H, 4'-H), 3.84-3.70 (m, 10H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O, 2x CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH=CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 3.64-3.41 (m, 5H, 1x 5'-H, 2x P-N-CH, P-O-CH<sub>2</sub>), 3.19 (dd, <sup>2</sup>*J* = 10.3 Hz, <sup>3</sup>*J* = 2.9 Hz, 1H, 1x 5'-H), 2.81-2.30 (m, 3H, 1x 2'-H, P-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 2.29-2.19 (m, 1H, 1x 2'-H), 1.75-1.67 (m, 1H, 1x O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 1.33-0.93 (m, 13H, 1x O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O, 12x P-N-CH-CH<sub>3</sub>).

**<sup>31</sup>P-NMR (81 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm):**  $\delta = 149.3, 148.4$ .

**HRMS (ESI+):** ber. für C<sub>50</sub>H<sub>59</sub>N<sub>3</sub><sup>15</sup>N<sub>2</sub>O<sub>10</sub>P<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup>: 922.3935, gef.: 922.3940.

### 10.3.10 *O*<sup>3'</sup>-(Diisopropylcyanoethylphosphin)-*O*<sup>5'</sup>-dimethoxytrityl-(*N*<sup>4</sup>,*N*<sup>4</sup>-dibenzoyl)-5-(methoxycarbonyl)-2'-desoxy-[*N*<sup>1</sup>,*N*<sup>3</sup>-<sup>15</sup>N<sub>2</sub>]-cytidin (**34**)

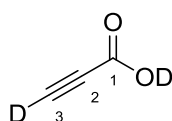


In einem ausgeheizten *Schlenk*-Rohr wurden 15 mg der Verbindung **33** (19  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äq.) in 230  $\mu\text{L}$  sorgfältig entgastem DCM (0.08 M) gelöst, mit 2 mg Diisopropylammoniumtetrazolid (11  $\mu\text{mol}$ , 0.6 Äq.) und 8  $\mu\text{L}$  2-Cyanoethoxy-*N,N,N',N'*-tetraisopropylphosphordiamidit (24  $\mu\text{mol}$ , 1.3 Äq.) versetzt und für 21 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittel im Argongas-Gegenstrom und säulenchromatographischer Aufreinigung (passiviertes Silica, entgastes Laufmittel, *i*Hex/EtOAc 1:2) wurden 18 mg der Verbindung **34** (18  $\mu\text{mol}$ , 95%) als Gemisch zweier Diastereomeren in Form eines farblosen Feststoffs erhalten.

Die Verbindung wurde direkt für die DNA-Festphasensynthese verwendet. Der gelungene Einbau in DNA wies die erfolgreiche Umsetzung zum Phosphoramidit nach.

**DC:**  $R_f = 0.28$  (DCM/MeOH 40:1).

### 10.3.11 [3-D]-Propiolsäure (**35**)



In Anlehnung an die Vorschrift von *Thiem et al.* wurden 1.40 mL Propiolsäure (95%, 21.6 mmol, 1.0 Äq.) vorsichtig in eine Lösung aus 2.98 mg Natriumcarbonat (28.1 mmol, 1.3 Äq.) in 9.60 mL D<sub>2</sub>O (2.34 M) getropft.<sup>[184]</sup> Nach 17 h wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt (*SpeedVac*, Deuterierungsgrad 90% (bestimmt durch <sup>13</sup>C-NMR)) und der Rückstand erneut in 9 mL D<sub>2</sub>O gelöst. Nach 23 h wurde die Reaktionslösung mit konz. D<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> bei 0 °C auf pH = 1 angesäuert, das Rohprodukt mit 5x 40 mL DCM extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer bis 400 mbar bei 40 °C entfernt. Nach Destillation wurden 1.49 g [3-D]-Propiolsäure (**35**, 20.7 mmol, 96%, Deuterierungsgrad > 95% (<sup>13</sup>C-NMR)) als farblose

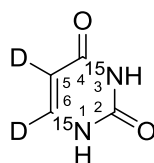
Flüssigkeit erhalten.

**DC:**  $R_f = 0.69$  (DCM/MeOH 10:1 + 0.5% HOAc).

**$^{13}\text{C}$ -NMR (101 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , ppm):**  $\delta = 156.0$  (C1), 76.8 (t,  $^2J_{\text{C-D}} = 39.9$  Hz, C3), 73.9 (C2)

**HRMS (EI):**  $m/z = 71.0093$  ( $\text{M}^+$ , 46%), 53.9957 (100%).

### 10.3.12 [5,6- $\text{D}_2$ , $\text{N}^1$ , $\text{N}^3$ - $^{15}\text{N}_2$ ]-Uracil (**36**)



In Anlehnung an die Vorschrift von *Hill et al.* wurden 500 mg  $^{15}\text{N}_2$ -Harnstoff (8.05 mmol, 1.0 Äq.) in 10 mL konz.  $\text{D}_2\text{SO}_4$  (0.81 M) bei 0 °C vollständig gelöst.<sup>[176]</sup> Anschließend wurde die klare Reaktionslösung mit 581 mg [3-D]-Propiolsäure (**35**, 8.05 mmol, 1.0 Äq.) versetzt und unter Rückfluss auf 105 °C für 5 h erhitzt. Nach vollständiger Umsetzung wurde die Reaktionslösung auf Raumtemperatur gekühlt, in 40 mL Eiswasser gegossen und für 5 d bei -20 °C aufbewahrt. Das entstandene Präzipitat wurde filtriert und der Rückstand mit 19 mL ddH<sub>2</sub>O umkristallisiert. Das so erhaltene Uracil-Derivat war zu > 95% an C6- und zu 40% an C5-Position deuteriert ( $^1\text{H}$ -NMR). Zur vollständigen Deuterierung wurde das Rohprodukt in 8.75 mL DCl in  $\text{D}_2\text{O}$  (20% wt) suspendiert und für 4 h unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde die Reaktionslösung für 18 h bei 4 °C aufbewahrt und nachfolgend die entstandene Suspension filtriert, der Rückstand mit 10 mL Eiswasser gewaschen und im Hochvakuum für 4 h bei 40 °C getrocknet. Hierbei wurden 440 mg [5,6- $\text{D}_2$ , $\text{N}^1$ , $\text{N}^3$ - $^{15}\text{N}_2$ ]-Uracil (**36**, 3.79 mmol, 47% über 2 Stufen, Deuterierungsgrad > 95% ( $^1\text{H}$ -NMR)) als farbloser Feststoff erhalten.

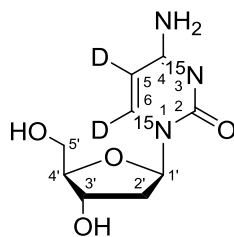
**DC:**  $R_f = 0.37$  (DCM/MeOH 10:1 + 0.5% HOAc).

**$^1\text{H}$ -NMR (400 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ , ppm):**  $\delta = 11.06$  (dd,  $^1J_{\text{H-N}} = 76.6$  Hz,  $^3J = 2.2$  Hz, 1H, 3-H), 11.06 (dd,  $^1J_{\text{H-N}} = 81.9$  Hz,  $^3J = 2.2$  Hz, 1H, 1-H),

**$^{13}\text{C}$ -NMR (101 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ , ppm):**  $\delta = 164.6$  (d,  $^1J_{\text{C-N}} = 9.2$  Hz, C4), 151.7 (dd,  $^1J_{\text{C-N}} = 18.7$  Hz,  $^1J_{\text{C-N}} = 16.5$  Hz, C2), 142.6-141.6 (m, C6), 100.1 (dt,  $^1J_{\text{C-D}} = 26.5$  Hz,  $^2J_{\text{C-N}} = 6.4$  Hz, C5).

**$^{15}\text{N}$ -NMR (41 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ , ppm):**  $\delta = -221.0$  (d,  $^2J_{\text{N-N}} = 2.8$  Hz), -248.6 (d,  $^2J_{\text{N-N}} = 2.6$  Hz).

**HRMS (EI):**  $m/z = 116.0328$  ( $\text{M}^+$ , 100%), 72.0310 (36%).

**10.3.13 2'-Desoxy-[5,6-D<sub>2</sub>,N<sup>1</sup>,N<sup>3</sup>-<sup>15</sup>N<sub>2</sub>]-cytidin (38)**

In einem ausgeheizten Rundkolben wurden 400 mg [5,6-D<sub>2</sub>,N<sup>1</sup>,N<sup>3</sup>-<sup>15</sup>N<sub>2</sub>]-Uracil (**36**, 3.45 mmol, 1.0 Äq.) in 25.2 mL HMDS und 2.70 mL TMS-Cl suspendiert und für 1 h bis zum Eintreten einer klaren Lösung unter Rückfluss bei 120 °C erhitzt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und mit 3x 20 mL Chloroform coevaporiert. Nachfolgend wurde der Rückstand in 10.6 mL Chloroform (0.33 M) gelöst, mit 1.46 g *Hoffer's* Chlorzucker<sup>[312]</sup> (3.80 mmol, 1.1 Äq.) versetzt und für 15 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach vollständigem Umsatz wurde der Reaktionslösung 75 mL DCM zugefügt und die organische Phase mit 50 mL einer ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung sowie mit 50 mL einer ges. NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknung über MgSO<sub>4</sub> wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und das erhaltene Rohprodukt, ein Gemisch aus  $\beta$ - und  $\alpha$ -Anomer (10:1) wurde direkt umgesetzt.

In einem ausgeheiztem Rundkolben wurden 1.50 g des Rohprodukts (3.20 mmol, 1.0 Äq.) in 32 mL THF (0.1 M) gelöst, auf 0 °C gekühlt, mit 640 mg NaH (60% in Mineralöl, 16.0 mmol, 5.0 Äq.) versetzt und für 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 1.94 g *Triisopropylbenzolsulfonylchlorid* (TPS-Cl, 6.40 mmol, 2.0 Äq.) zugegeben und für 16 h gerührt. Nach vollständigem Umsatz wurde der Reaktionslösung 50 mL einer ges. NH<sub>4</sub>Cl-Lösung zugefügt und das Rohprodukt mit 2x 50 mL EtOAc extrahiert. Nach Trocknung über MgSO<sub>4</sub> wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt, woraufhin ein leicht gelblicher Feststoff erhalten wurde. Dieser wurde anschließend in 107 mL Dioxan gelöst, mit 32.0 mL ammoniakalischem MeOH (7 N) versetzt und für 17 h bei Raumtemperatur gerührt. Dies resultierte in einer vollständigen Aminierung der C4-Position, allerdings in einer nur partiellen Entschützung der 3'- und 5'-Hydroxylgruppen. Das Lösungsmittel wurde daher *in vacuo* entfernt, der Rückstand in 32.0 mL ammoniakalischem MeOH (7 N) gelöst und für 2 d bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* und säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH 5:1 → 3:1) wurden 472 mg 2'-Desoxy-[5,6-D<sub>2</sub>,N<sup>1</sup>,N<sup>3</sup>-<sup>15</sup>N<sub>2</sub>]-cytidin (2.04 mmol, 59%) in Form eines farblosen Feststoffs erhalten. Allerdings konnte massenspektrometrisch festgestellt werden, dass das D<sub>2</sub>/D<sub>1</sub>-Verhältnis der Verbindung lediglich > 96% betrug.

Die vollständige Deuterierung wurde durch *R. Rahimoff* (AK Carell) in einer Sequenz aus C5-

Iodierung und nachfolgender reduktiver Deuterierung in Anlehnung an die Vorschriften von Münzel und Ramanathan *et al.* erreicht.<sup>[185,186]</sup> Nach Aufreinigung mittels präoperativer *reversed phase* HPLC wurde 2'-Desoxy-[5,6-D<sub>2</sub>,N<sup>1</sup>,N<sup>3</sup>-<sup>15</sup>N<sub>2</sub>]-cytidin (**38**) in einer Ausbeute von 42% (Deuterierungsgrad D<sub>2</sub>/D<sub>1</sub> = 99.7%, [M+4]/[M+3] = 96.6%) in Form eines farblosen Feststoffs erhalten.

**DC:**  $R_f = 0.12$  (DCM/MeOH 5:1).

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O, ppm):**  $\delta = 6.22$  (t, <sup>3</sup> $J = 6.6$  Hz, 1H, 1'-H), 4.38 (dt, <sup>3</sup> $J = 7.4$  Hz, <sup>3</sup> $J = 4.1$  Hz, 1H, 3'-H), 4.00 (q, <sup>3</sup> $J = 4.2$  Hz, 1H, 4'-H), 3.79 (dd, <sup>2</sup> $J = 12.5$  Hz, <sup>3</sup> $J = 3.6$  Hz, 1H, 5'-H), 3.70 (dd, <sup>2</sup> $J = 12.5$  Hz, <sup>3</sup> $J = 5.2$  Hz, 1H, 5'-H), 2.38 (dddd, <sup>2</sup> $J = 14.0$  Hz, <sup>3</sup> $J = 6.2$  Hz, <sup>3</sup> $J = 4.2$  Hz, <sup>4</sup> $J = 1.4$  Hz, 1H, 2'-H), 2.25 (dtd, <sup>2</sup> $J = 14.0$  Hz, <sup>3</sup> $J = 6.7$  Hz, <sup>4</sup> $J = 2.4$  Hz, 1H, 2'-H).

**<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, D<sub>2</sub>O, ppm):**  $\delta = 166.2$  (d, <sup>1</sup> $J_{C-N} = 6.2$  Hz, C4), 157.5 (dd, <sup>1</sup> $J_{C-N} = 13.7$  Hz, <sup>1</sup> $J_{C-N} = 8.5$  Hz, C2), 141.2 (dt, <sup>1</sup> $J_{C-D} = 28.0$  Hz, <sup>1</sup> $J_{C-N} = 13.8$  Hz, C6), 95.8 (t, <sup>1</sup> $J_{C-D} = 25.6$  Hz, C5), 86.6 (C4'), 86.1 (d, <sup>1</sup> $J_{C-N} = 11.4$  Hz, C1'), 70.5 (C3'), 61.2 (C5'), 39.2 (C2').

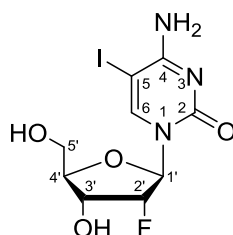
**<sup>15</sup>N-NMR (41 MHz, D<sub>2</sub>O, ppm):**  $\delta = -176.0, -221.3$ .

**HRMS (ESI+):** ber. für C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>D<sub>2</sub>N<sup>15</sup>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub><sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup>: 232.1045, gef.: 232.1044.



## 10.4 Vorschriften zur Synthese fluorierter Phosphoramidite

### 10.4.1 5-Iod-2'-desoxy-2'(R)-fluor-cytidin (**129**)



In Abwandlung einer Vorschrift von *Münzel* wurden in einem ausgeheizten Rundkolben 10.0 g (40.8 mmol, 1.0 Äq.) 2'-Desoxy-2'(R)-fluor-cytidin, 6.22 g Iod (24.5 mmol, 0.6 Äq.) und 10.6 g *m*CPBA (70%, 42.8 mmol, 1.05 Äq.) in 112 mL DMF (0.37 M) gelöst und für 7 h bei Raumtemperatur gerührt.<sup>[185]</sup> Anschließend wurde das Lösungsmittel entfernt und nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH 10:1 → 5:1 + 1% NEt<sub>3</sub>) wurden 10.2 g der Verbindung **129** (27.4 mmol, 67%) in Form eines gelblichen Feststoffs erhalten werden.

**DC:**  $R_f = 0.58$  (DCM/MeOH 5:1).

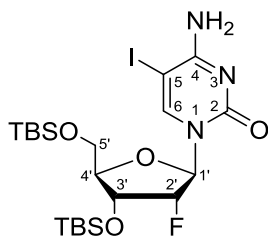
**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, ppm):**  $\delta = 8.46$  (s, 1H, 6-H), 7.85 (s, 1H, NH<sub>2</sub>), 6.65 (s, 1H, NH<sub>2</sub>), 5.84 (dd, <sup>3</sup> $J_{\text{H-F}} = 17.3$  Hz, <sup>3</sup> $J = 1.2$  Hz, 1H, 1'-H), 5.00-4.76 (m, 1H, 2'-H), 4.16 (ddd, <sup>3</sup> $J_{\text{H-F}} = 24.5$  Hz, <sup>3</sup> $J = 8.5$  Hz, <sup>3</sup> $J = 4.1$  Hz, 1H, 3'-H), 3.91-3.85 (m, 1H, 4'-H), 3.81 (dd, <sup>2</sup> $J = 12.4$  Hz, <sup>3</sup> $J = 2.3$  Hz, 1H, 5'-H), 3.61 (dd, <sup>2</sup> $J = 12.4$  Hz, <sup>3</sup> $J = 2.5$  Hz, 1H, 5'-H).

**<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, ppm):**  $\delta = 164.0$  (C4), 153.7 (C2), 147.2 (C6), 104.4 (C5), 94.2 (d, <sup>1</sup> $J_{\text{C-F}} = 185.4$  Hz, C2'), 88.0 (d, <sup>2</sup> $J_{\text{C-F}} = 33.4$  Hz, C1'), 82.7 (C4'), 66.6 (d, <sup>2</sup> $J_{\text{C-F}} = 16.4$  Hz, C3'), 58.5 (C5'), 56.8 (C5).

**<sup>19</sup>F-NMR (282 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, ppm):**  $\delta = -201.2$  (ddd, <sup>2</sup> $J_{\text{F-H}} = 53.2$  Hz, <sup>3</sup> $J_{\text{F-H}} = 24.5$  Hz, <sup>3</sup> $J_{\text{F-H}} = 17.3$  Hz).

**HRMS (ESI+):** ber. für C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>FIN<sub>3</sub>O<sub>4</sub>Na<sup>+</sup> [M+Na]<sup>+</sup>: 393.9670 gef.: 393.9665.

**IR (ATR):**  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 3347 (w), 2984 (m), 2711 (w), 2501 (w), 1714 (m), 1626 (s), 1557 (s), 1475 (s), 1286 (m), 1100 (s), 1069 (s), 765 (s), 735 (s).

10.4.2 *O*<sup>3',5'</sup>-Bis(*tert*butyldimethylsilyl)-5-iod-2'-desoxy-2'(*R*)-fluor-cytidin (**43**)

In Abwandlung einer Vorschrift von *Münzel* wurden 9.69 g der Verbindung **129** (26.1 mmol, 1.0 Äq.) zusammen mit 11.8 g TBS-Cl (78.3 mmol, 3.0 Äq.) und 8.00 g Imidazol (118 mmol, 4.5 Äq.) in 50 mL eines Gemisches aus Pyridin/DMF (3:2, 0.5 M) bei 0 °C gelöst.<sup>[185]</sup> Die klare Lösung wurde langsam auf Raumtemperatur erwärmt und anschließend für 23 h gerührt. Nach vollständigem Umsatz erfolgte die Zugabe von Eis sowie von 125 mL einer ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung. Das Rohprodukt wurde mit 3x 150 mL EtOAc extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit 200 mL einer ges. NH<sub>4</sub>Cl-Lösung gewaschen und über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* und säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH 100:1 → 20:1 + 1% NEt<sub>3</sub>) wurden 13.6 g **43** (24.6 mmol, 95%) in Form eines farblosen Feststoffs erhalten.

**DC:**  $R_f = 0.55$  (DCM/MeOH 10:1).

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm):**  $\delta = 9.42$  (s, 1H, NH<sub>2</sub>), 7.97 (s, 1H, 6-H), 5.96 (dd, <sup>3</sup> $J_{\text{H-F}} = 16.5$  Hz, <sup>3</sup> $J = 1.8$  Hz, 1H, 1'-H), 5.83 (s, 1H, NH<sub>2</sub>), 4.79 (ddd, <sup>2</sup> $J_{\text{H-F}} = 52.3$  Hz, <sup>3</sup> $J = 4.3$  Hz, <sup>3</sup> $J = 1.9$  Hz, 1H, 2'-H), 4.17 (ddd, <sup>3</sup> $J_{\text{H-F}} = 19.0$  Hz, <sup>3</sup> $J = 7.3$  Hz, <sup>3</sup> $J = 4.3$  Hz, 1H, 3'-H), 4.07-4.01 (m, 2H, 4'-H, 5'-H), 3.77 (dd, <sup>2</sup> $J = 12.1$  Hz, <sup>3</sup> $J = 2.3$  Hz, 1H, 5'-H), 0.94 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.87 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.15 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.14 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.07 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.07 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

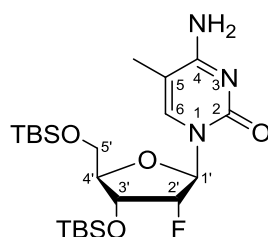
**<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm):**  $\delta = 164.2$  (C4), 154.7 (C2), 146.0 (C6), 93.1 (d, <sup>1</sup> $J_{\text{C-F}} = 192.9$  Hz, C2'), 89.0 (d, <sup>2</sup> $J_{\text{C-F}} = 34.0$  Hz, C1'), 83.7 (C4'), 68.6 (d, <sup>2</sup> $J_{\text{C-F}} = 16.3$  Hz, C3'), 60.9 (C5'), 57.4 (C5), 26.4 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 25.7 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 18.8 (Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 18.1 (Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), -3.4 (Si-CH<sub>3</sub>), -4.8 (Si-CH<sub>3</sub>), -4.9 (Si-CH<sub>3</sub>), -5.0 (Si-CH<sub>3</sub>).

**<sup>19</sup>F-NMR (282 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm):**  $\delta = -201.7$  (ddd, <sup>2</sup> $J_{\text{F-H}} = 52.3$  Hz, <sup>3</sup> $J_{\text{F-H}} = 19.0$  Hz, <sup>3</sup> $J_{\text{F-H}} = 16.8$  Hz).

**HRMS (ESI+):** ber. für C<sub>21</sub>H<sub>40</sub>FIN<sub>3</sub>O<sub>4</sub>Si<sub>2</sub><sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup>: 600.1581, gef.: 600.1580.

**IR (ATR):**  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 3454 (w), 3323 (w), 2928 (m), 1657 (s), 1486 (m), 1361 (w), 1253 (m), 1125 (m), 1074 (m), 994 (w), 836 (s), 778 (s).

### 10.4.3 *O*<sup>3',5'</sup>-Bis(*tert*butyldimethylsilyl)-5-methyl-2'-desoxy-2'(*R*)-fluor-cytidin (44)



In einem ausgeheiztem Rundkolben wurden 1.79 g der Verbindung **43** (3.00 mmol, 1.0 Äq.) zusammen mit 347 mg Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (300 μmol, 0.1 Äq.) in 30 mL THF (0.1 M) gelöst und für 10 min unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wurden langsam 3.90 mL AlMe<sub>3</sub> (2 M in Hexan, 7.80 mmol, 2.6 Äq.) zugetropft und für 17 h unter Rückflusskühlung erhitzt. Nach vollständigem Umsatz erfolgte die Zugabe von 15 mL ddH<sub>2</sub>O sowie 15 mL einer ges. NH<sub>4</sub>Cl-Lösung. Das Rohprodukt wurde mit 2x 300 mL DCM extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* und säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH 20:1 → 10:1) wurden 1.15 g **44** (2.36 mmol, 79%) in Form eines farblosen Feststoffs erhalten.

**DC:**  $R_f = 0.45$  (DCM/MeOH 10:1).

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm):** δ = 7.54 (d, <sup>4</sup>*J* = 1.1 Hz, 1H, 6-H), 6.00 (dd, <sup>3</sup>*J*<sub>H-F</sub> = 17.3 Hz, <sup>3</sup>*J* = 1.6 Hz, 1H, 1'-H), 4.85 (ddd, <sup>2</sup>*J*<sub>H-F</sub> = 52.7 Hz, <sup>3</sup>*J* = 4.3 Hz, <sup>3</sup>*J* = 1.6 Hz, 1H, 2'-H), 4.22 (ddd, <sup>3</sup>*J*<sub>H-F</sub> = 19.3 Hz, <sup>3</sup>*J* = 7.7 Hz, <sup>3</sup>*J* = 4.8 Hz, 1H, 3'-H), 4.10-4.02 (m, 2H, 4'-H, 5'-H), 3.80 (dd, <sup>2</sup>*J* = 11.9 Hz, <sup>3</sup>*J* = 2.4 Hz, 1H, 5'-H), 1.92 (d, <sup>4</sup>*J* = 1.1 Hz, 3H, C5-CH<sub>3</sub>), 0.94 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.89 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.13 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.11 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.10 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.08 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm):** δ = 165.8 (C4), 155.7 (C2), 138.7 (C6), 101.7 (C5), 93.4 (d, <sup>1</sup>*J*<sub>C-F</sub> = 190.9 Hz, C2'), 89.0 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>C-F</sub> = 34.7 Hz, C1'), 83.2 (C4'), 68.6 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>C-F</sub> = 16.5 Hz, C3'), 61.0 (C5'), 26.1 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 25.6 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 18.6 (Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 18.0 (Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 13.3 (C5-CH<sub>3</sub>), -4.5 (Si-CH<sub>3</sub>), -5.0 (Si-CH<sub>3</sub>), -5.2 (Si-CH<sub>3</sub>), -5.3 (Si-CH<sub>3</sub>).

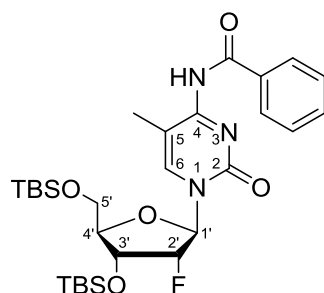
**<sup>19</sup>F-NMR (376 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm):** δ = -200.9 (dt, <sup>2</sup>*J*<sub>F-H</sub> = 52.6 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>F-H</sub> = 18.7 Hz).

**HRMS (ESI+):** ber. für C<sub>22</sub>H<sub>43</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>6</sub>Si<sub>2</sub><sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup>: 488.2771, gef.: 488.2774.

**IR (ATR):** ν (cm<sup>-1</sup>) = 3299 (m), 2953 (w), 2929 (m), 2858 (w), 1662 (s), 1622 (m), 1549 (s), 1486 (s), 1386 (m), 1361 (m), 1252 (m), 1130 (s), 1059 (s).

**Schmelzbereich:** 154-156 °C.

#### 10.4.4 *O*<sup>3',5'</sup>-Bis(*tert*butyldimethylsilyl)-*N*<sup>4</sup>-benzoyl-5-methyl-2'-desoxy-2'(*R*)-fluor-cytidin (**131**)



In einem ausgeheizten Rundkolben wurden 400 mg der Verbindung **44** (820  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äq.) in 4.1 mL Pyridin (0.2 M) bei 0 °C gelöst. Anschließend wurden 189  $\mu\text{L}$  Benzoylchlorid (1.64 mmol, 2.0 Äq.) tropfenweise zugefügt und die Reaktionslösung langsam auf Raumtemperatur erwärmen lassen. Nach 3 h wurde eine vollständige Umsetzung beobachtet und der Reaktionslösung Eis und 10 mL einer ges.  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung zugegeben. Das Rohprodukt wurde mit 2x 50 mL DCM extrahiert und mit 10 mL einer ges.  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Lösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurde über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet, das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH 1:0  $\rightarrow$  100:1  $\rightarrow$  50:1) wurden 295 mg der Verbindung **131** (498  $\mu\text{mol}$ , 61%) in Form eines farblosen Feststoffs erhalten.

**DC:**  $R_f = 0.85$  (DCM/MeOH 20:1).

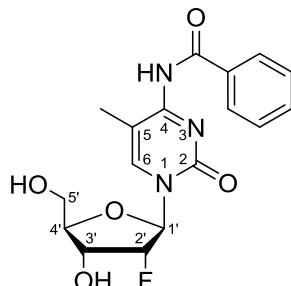
**<sup>1</sup>H-NMR (599 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm):**  $\delta = 8.31$  (d,  $^3J = 7.8$  Hz, 2H, 2x O=C-C=CH), 7.58 (s, 1H, 6-H), 7.53 (tt,  $^3J = 7.3$  Hz,  $^4J = 1.6$  Hz, 1H, O=C-C=CH-CH=CH), 7.44 (t,  $^3J = 8.0$  Hz, 2H, 2x O=C-C=CH-CH=CH), 6.09 (dd,  $^3J_{\text{H-F}} = 15.5$  Hz,  $^3J = 3.2$  Hz, 1H, 1'-H), 4.87 (ddd,  $^2J_{\text{H-F}} = 52.6$  Hz,  $^3J = 4.6$  Hz,  $^3J = 3.2$  Hz, 1H, 2'-H), 4.31 (ddd,  $^3J_{\text{H-F}} = 14.6$  Hz,  $^3J = 6.0$  Hz,  $^3J = 4.6$  Hz, 1H, 3'-H), 4.08 (dd,  $^3J = 6.1$  Hz,  $^3J = 1.8$  Hz, 1H, 4'-H), 4.02 (dd,  $^2J = 11.8$  Hz,  $^3J = 2.0$  Hz, 1H, 5'-H), 3.79 (dd,  $^2J = 11.8$  Hz,  $^3J = 2.3$  Hz, 1H, 5'-H), 2.11 (d,  $^4J = 1.2$  Hz, 3H, C5-CH<sub>3</sub>), 0.96 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.92 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.15 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.14 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.13 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.11 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm):**  $\delta = 179.9$  (C4-N-C=O), 159.7 (C4), 148.0 (C2), 137.2 (C4-N-(C=O)-C=CH-CH=CH), 136.5 (C6), 132.6 (C4-N-(C=O)-C=CH-CH=CH), 130.9 (C4-N-(C=O)-C=CH), 128.3 (C4-N-(C=O)-C=CH-CH=CH), 112.2 (C5), 92.6 (d,  $^1J_{\text{C-F}} = 191.4$  Hz, C2'), 88.1 (d,  $^2J_{\text{C-F}} = 36.6$  Hz, C1'), 84.6 (C4'), 69.5 (d,  $^2J_{\text{C-F}} = 15.5$  Hz, C3'), 61.7 (C5'), 26.2 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 25.8 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 18.7 (Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 18.3 (Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 13.8 (C5-CH<sub>3</sub>), -4.4 (Si-CH<sub>3</sub>), -4.9 (Si-CH<sub>3</sub>), -5.1 (Si-CH<sub>3</sub>), -5.2 (Si-CH<sub>3</sub>).

**<sup>19</sup>F-NMR (376 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm):**  $\delta = -203.7$  (dt,  $^2J_{\text{F-H}} = 52.8$  Hz,  $^3J_{\text{F-H}} = 14.7$  Hz).

**HRMS (ESI+):** ber. für  $C_{29}H_{47}FN_3O_5Si_2^+$   $[M+H]^+$ : 592.3033, gef.: 592.3040.

#### 10.4.5 *N*<sup>4</sup>-Benzoyl-5-methyl-2'-desoxy-2'(*R*)-fluor-cytidin (**45**)



In einem Polypropylengefäß wurden 265 mg der Verbindung **131** (448  $\mu$ mol, 1.0 Äq.) in 6.4 mL EtOAc (0.07 M) gelöst, mit 181  $\mu$ L Pyridin (2.24 mmol, 5.0 Äq.) sowie 169  $\mu$ L HF·Pyridin (70% HF, 6.72 mmol, 15.0 Äq.) versetzt und bei Raumtemperatur gerührt. Nach 21 h wurde ein vollständiger Reaktionsumsatz beobachtet und 6.72 mL TMSOMe (1 mL/mmol) der entstandenen Suspension zugefügt. Nach 1 h wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und mittels säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH 20:1  $\rightarrow$  10:1) konnten 160 mg der Verbindung **45** (441  $\mu$ mol, 98%) in Form eines farblosen Feststoffs erhalten.

**DC:**  $R_f = 0.25$  (DCM/MeOH 20:1).

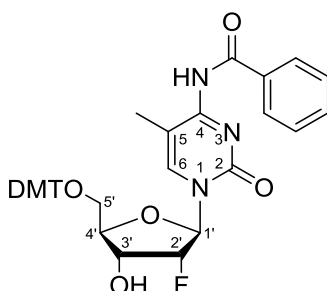
**<sup>1</sup>H-NMR (800 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, ppm):**  $\delta = 13.03$  (s, 1H, NH), 8.20 (b, 3H, 2x O=C-C=CH, 6-H), 7.60 (t,  $^3J = 6.3$  Hz, 1H, O=C-C=CH-CH=CH), 7.51 (t,  $^3J = 7.5$  Hz, 2H, 2x O=C-C=CH-CH=CH), 5.94 (dd,  $^3J_{H-F} = 17.0$  Hz,  $^3J = 1.0$  Hz, 1H, 1'-H), 5.65 (d,  $^3J = 6.06$  Hz, 1H, 3'-OH), 5.38 (d,  $^3J = 5.7$  Hz, 1H, 5'-OH), 5.08 (d,  $^2J_{H-F} = 55.0$  Hz, 1H, 2'-H), 4.21 (dddd,  $^3J_{H-F} = 24.0$  Hz,  $^3J = 15.2$  Hz,  $^3J = 6.8$  Hz,  $^3J = 4.2$  Hz, 1H, 3'-H), 3.94 (d,  $^3J = 8.0$  Hz, 1H, 4'-H), 3.86 (dd,  $^2J = 11.3$  Hz,  $^3J = 3.5$  Hz, 1H, 5'-H), 3.65 (ddd,  $^2J = 12.5$  Hz, 4.5 Hz,  $^3J = 2.7$  Hz, 1H, 5'-H), 2.00 (s, 3H, C5-CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR (201 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, ppm):**  $\delta = 178.2$  (C4-N-C=O), 159.0 (C4), 147.3 (C2), 138.6 (C6), 136.7 (C4-N-(C=O)-C=CH-CH=CH), 132.6 (C4-N-(C=O)-C=CH-CH=CH), 129.3 (C4-N-(C=O)-C=CH), 128.4 (C4-N-(C=O)-C=CH-CH=CH), 109.6 (C5), 93.6 (d,  $^1J_{C-F} = 186.7$  Hz, C2'), 87.6 (d,  $^2J_{C-F} = 37.3$  Hz, C1'), 83.2 (C4'), 66.9 (d,  $^2J_{C-F} = 14.9$  Hz, C3'), 58.9 (C5'), 13.2 (C5-CH<sub>3</sub>).

**<sup>19</sup>F-NMR (376 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, ppm):**  $\delta = -202.3$  (dt,  $^2J_{F-H} = 52.6$  Hz,  $^3J_{F-H} = 18.3$  Hz).

**HRMS (ESI+):** ber. für  $C_{17}H_{19}FN_3O_5^+$   $[M+H]^+$ : 364.1303, gef.: 364.1305.

### 10.4.6 *O*<sup>5'</sup>-Dimethoxytrityl-*N*<sup>4</sup>-benzoyl-5-methyl-2'-desoxy-2'(*R*)-fluor-cytidin (133)



In einem ausgeheiztem Rundkolben wurden 140 mg der Verbindung **45** (385  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äq.) in 2.6 mL Pyridin (0.15 M) gelöst, mit 3 Å Molsieb, 74  $\mu\text{L}$  Triethylamin (539  $\mu\text{mol}$ , 1.4 Äq.) und 182 mg DMT-Cl (539  $\mu\text{mol}$ , 1.4 Äq.) versetzt und für 15 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden mittels Zugabe von 5 mL MeOH unreaktierte DMT-Spezies für 5 min verethert. Nachfolgend wurden 30 mL einer ges.  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung zugegeben, das Rohprodukt mit 2x 50 mL DCM extrahiert, mit 50 mL einer ges.  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Lösung gewaschen und die vereinigten organischen Phasen über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo*, säulenchromatographischer Aufreinigung (passiviertes Silica, DCM/MeOH 1:0  $\rightarrow$  100:1  $\rightarrow$  50:1 (jeweils + 0.5% Pyridin) und Coevaporieren mit 100 mL Toluol wurden 235 mg der Verbindung **133** (353  $\mu\text{mol}$ , 92%) in Form eines farblosen Feststoffs erhalten.

**DC:**  $R_f = 0.65$  (DCM/MeOH 20:1).

**<sup>1</sup>H-NMR (800 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm):**  $\delta = 13.33$  (s, 1H, NH), 8.29 (dd,  $^3J = 8.0$  Hz,  $^4J = 1.5$  Hz, 2H, 2x O=C-C=CH), 7.75 (d,  $^4J = 1.4$  Hz, 1H, 6-H), 7.52 (tt,  $^3J = 6.3$  Hz,  $^3J = 1.4$  Hz, 1H, O=C-C=CH-CH=CH), 7.45-7.40 (m, 4H, 4x  $\text{CH}_2\text{-O-C-C=CH=CH=C-O-CH}_3$ ), 7.35-7.23 (m, 7H, 2x  $\text{CH}_2\text{-O-C-C=CH=CH=CH}$ , 2x O=C-C=CH-CH=CH, 2x  $\text{CH}_2\text{-O-C-C=CH=CH=CH}$ ,  $\text{CH}_2\text{-O-C-C=CH=CH=CH}$ ), 6.89-6.83 (m, 4H, 4x  $\text{CH}_2\text{-O-C-C=CH=CH=C-O-CH}_3$ ), 6.13 (dd,  $^3J_{\text{H-F}} = 16.5$  Hz,  $^3J = 2.3$  Hz, 1H, 1'-H), 5.16 (ddd,  $^2J_{\text{H-F}} = 52.6$  Hz,  $^3J = 4.5$  Hz,  $^3J = 2.3$  Hz, 1H, 2'-H), 4.59 (dt,  $^3J_{\text{H-F}} = 17.7$  Hz,  $^3J = 5.8$  Hz, 1H, 3'-H), 4.17-4.14 (m, 1H, 4'-H), 3.63 (dd,  $^2J = 11.1$  Hz,  $^3J = 2.2$  Hz, 1H, 5'-H), 3.47 (dd,  $^2J = 11.1$  Hz, 2.9 Hz, 1H, 5'-H), 1.61 (d,  $^4J = 1.2$  Hz, 3H, C5- $\text{CH}_3$ ).

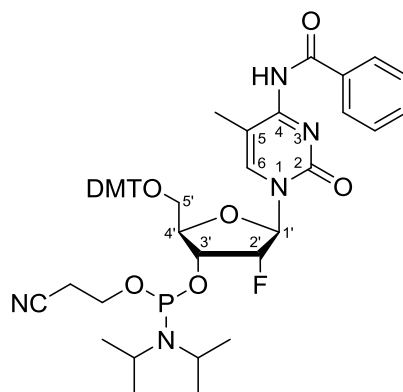
**<sup>13</sup>C-NMR (201 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm):**  $\delta = 179.9$  (C4-N-C=O), 159.7 (C4), 158.9 ( $\text{CH}_2\text{-O-C-C=CH=CH=C-O-CH}_3$ ), 158.9 ( $\text{CH}_2\text{-O-C-C=CH=CH=C-O-CH}_3$ ), 149.9 (C2), 144.4 ( $\text{CH}_2\text{-O-C-C=CH=CH=CH}$ ), 136.8 (C4-N-(C=O)-C=CH-CH=CH), 136.2 (C6), 135.4 ( $\text{CH}_2\text{-O-C-C=CH=CH=C-O-CH}_3$ ), 135.3 ( $\text{CH}_2\text{-O-C-C=CH=CH=C-O-CH}_3$ ), 132.7 (C4-N-(C=O)-C=CH-CH=CH), 130.2 (2x  $\text{CH}_2\text{-O-C-C=CH=CH=C-O-CH}_3$ ), 130.2 (2x  $\text{CH}_2\text{-O-C-C=CH=CH=C-O-CH}_3$ ).

130.1 (C4-N-(C=O)-C=CH), 128.3 (C4-N-(C=O)-C=CH-CH=CH), 128.3 (2x CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH=CH=CH), 128.2 (2x CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH=CH=CH), 127.4 (CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH=CH=CH), 113.5 (2x CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH=CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 113.5 (2x CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH=CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 112.6 (C5), 93.8 (d, <sup>1</sup>J<sub>C-F</sub> = 188.5 Hz, C2'), 88.1 (d, <sup>2</sup>J<sub>C-F</sub> = 34.4 Hz, C1'), 87.2 (CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH=CH=CH), 82.7 (C4'), 69.5 (d, <sup>2</sup>J<sub>C-F</sub> = 17.5 Hz, C3'), 61.8 (C5'), 55.4 (CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH=CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 55.4 (CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH=CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 13.1 (C5-CH<sub>3</sub>).

<sup>19</sup>F-NMR (376 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm): δ = -204.0 (dt, <sup>2</sup>J<sub>F-H</sub> = 52.9 Hz, <sup>3</sup>J<sub>F-H</sub> = 17.1 Hz).

HRMS (ESI+): ber. für C<sub>38</sub>H<sub>37</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>7</sub><sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup>: 666.2610, gef.: 666.2633.

#### 10.4.7 O<sup>3'</sup>-(Diisopropylcyanoethylphosphin)-O<sup>5'</sup>-dimethoxytrityl-N<sup>4</sup>-benzoyl-5-methyl-2'-desoxy-2'(R)-fluor-cytidin (46)



In einem ausgeheizten *Schlenk*-Rohr wurden 100 mg der Verbindung **133** (150 μmol, 1.0 Äq.) in 1.9 mL sorgfältig entgastem DCM (0.08 M) gelöst, mit 15 mg Diisopropylammoniumtetrazolid (90 μmol, 0.6 Äq.) und 62 μL 2-Cyanoethoxy-*N,N,N',N'*-tetraisopropylphosphordiamidit (195 μmol, 1.3 Äq.) versetzt und für 17 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittel im Argongas-Gegenstrom und säulenchromatographischer Aufreinigung (passiviertes Silica, entgastes Laufmittel, *i*Hex/EtOAc 1:2) wurden 126 mg der Verbindung **46** (146 μmol, 97%) als Gemisch zweier Diastereomeren in Form eines farblosen Feststoffs erhalten.

Die Verbindung wurde direkt für die DNA-Festphasensynthese verwendet. Der gelungene Einbau in DNA wies die erfolgreiche Umsetzung zum Phosphoramidit nach.

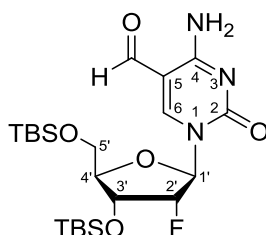
DC:  $R_f = 0.35$  (DCM/MeOH 40:1).

<sup>19</sup>F-NMR (376 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, ppm): δ = -201.3 (dtd, <sup>2</sup>J<sub>F-H</sub> = 52.2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>F-H</sub> = 17.5 Hz, <sup>4</sup>J<sub>F-P</sub> = 10.4 Hz), -200.9 (dddd, <sup>2</sup>J<sub>F-H</sub> = 52.6 Hz, <sup>3</sup>J<sub>F-H</sub> = 20.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>F-H</sub> = 16.6 Hz, <sup>4</sup>J<sub>F-P</sub> = 9.6 Hz).

**$^{31}\text{P}$ -NMR (162 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm):**  $\delta = 151.4$  (d,  $^4J_{\text{P-F}} = 9.6$  Hz),  $151.0$  (d,  $^4J_{\text{P-F}} = 10.4$  Hz).

**HRMS (ESI+):** ber. für  $\text{C}_{47}\text{H}_{54}\text{FN}_5\text{O}_8\text{P}^+$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 866.3689, gef.: 866.3700.

#### 10.4.8 *O*<sup>3',5'</sup>-Bis(*tert*butyldimethylsilyl)-5-formyl-2'-desoxy-2'(*R*)-fluor-cytidin (53)



In einem Hochdruckautoklaven wurden 1.81 g der Verbindung **43** (3.01 mmol, 1.0 Äq.) zusammen mit 473 mg Triphenylphosphin (1.81 mmol, 0.6 Äq.) und 312 mg  $\text{Pd}_2(\text{dba})_3\cdot\text{CHCl}_3$  (300  $\mu\text{mol}$ , 0.1 Äq.) vorgelegt. Das Reaktionsgefäß wurde zur Dichtigkeitsprüfung einmalig mit Kohlenstoffmonoxid mit einem Gasdruck von 3.5 bar für 15 min befüllt. Nach bestandem Drucktest wurde der Hochdruckautoklav belüftet, 45 mL Toluol (0.067 M) zugefügt, der Hochdruckautoklav zweimal mit Kohlenstoffmonoxid gespült und schließlich mit Kohlenstoffmonoxid mit einem Gasdruck von 3.5 bar befüllt. Nachfolgend wurde die Suspension auf 60 °C erhitzt und mit 1.01 mL  $\text{Bu}_3\text{SnH}$  (3.61 mmol, 1.2 Äq.) mit einer Flussrate von 0.15 mL/h versetzt. Nach Abschluss der  $\text{Bu}_3\text{SnH}$ -Zugabe wurde für weitere 4 h gerührt. Nach Belüften des Reaktionsgefäßes, Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* und säulenchromatographischer Aufreinigung (*dryload*, *i*Hex/EtOAc 4:1  $\rightarrow$  1:1) wurden 1.43 g der Verbindung **53** (2.85 mmol, 94%) in Form eines leicht gelblichen Feststoffs erhalten.

**DC:**  $R_f = 0.26$  (*i*Hex/EtOAc 1:1).

**$^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm):**  $\delta = 9.51$  (s, 1H, C(=O)-H), 8.54 (s, 1H, 6-H), 8.24 (s, 1H,  $\text{NH}_2$ ), 6.71 (s, 1H,  $\text{NH}_2$ ), 6.03 (dd,  $^3J_{\text{H-F}} = 16.0$  Hz,  $^3J = 2.0$  Hz, 1H, 1'-H), 4.92 (dd,  $^2J_{\text{H-F}} = 51.5$  Hz,  $^3J = 3.3$  Hz, 1H, 2'-H), 4.32-4.07 (m, 3H, 3'-H, 4'-H, 5'-H), 3.82 (dd,  $^2J = 14.5$  Hz,  $^3J = 3.7$  Hz, 1H, 5'-H), 0.94 (s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 0.89 (s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 0.15 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 0.15 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 0.11 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 0.08 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ).

**$^{13}\text{C}$ -NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm):**  $\delta = 187.1$  (C(=O)-H), 162.8 (C4), 153.0 (C2), 153.0 (C6), 105.5 (C5), 92.8 (d,  $^1J_{\text{C-F}} = 192.9$  Hz, C2'), 89.6 (d,  $^2J_{\text{C-F}} = 34.4$  Hz, C1'), 83.6 (C4'), 68.0 (d,  $^2J_{\text{C-F}} = 16.6$  Hz, C3'), 60.5 (C5'), 25.7 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 25.6 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 18.7 ( $\text{Si-C}(\text{CH}_3)_3$ ), 18.0 ( $\text{Si-}$



$C(CH_3)_3$ ,  $-4.5$  (Si- $CH_3$ ),  $-4.9$  (Si- $CH_3$ ),  $-4.9$  (Si- $CH_3$ ),  $-5.3$  (Si- $CH_3$ ).

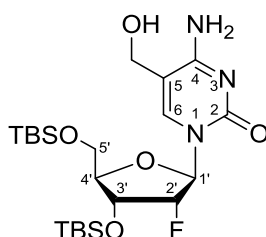
$^{19}F$ -NMR (376 MHz,  $CDCl_3$ , ppm):  $\delta = -200.9$  (dt,  $^2J_{F-H} = 52.3$  Hz,  $^3J_{F-H} = 19.0$  Hz).

HRMS (ESI+): ber. für  $C_{22}H_{41}FN_3O_5Si_2^+$   $[M+H]^+$ : 502.2563, gef.: 502.2565.

IR (ATR):  $\nu$  ( $cm^{-1}$ ) = 3274.0 (w), 2928.9 (m), 1666.3 (s), 1507.0 (m), 1471.9 (m), 1417.4 (m), 1361.6 (m), 1252 (m), 1120.5 (m), 1073.0 (m), 994.1 (m), 835.0 (s), 779.0 (s), 668.3 (m).

Schmelzpunkt: 74 °C.

#### 10.4.9 *O*<sup>3',5'</sup>-Bis(*tert*butyldimethylsilyl)-5-hydroxymethyl-2'-desoxy-2'(R)-fluor-cytidin (**49**)



In einem Rundkolben wurden 702 mg der Verbindung **53** (1.40 mmol, 1.0 Äq.) in 70 mL MeOH (0.02 M) gelöst und mit 1.56 g  $CeCl_3 \cdot 7 H_2O$  (4.20 mmol, 3.0 Äq.) versetzt. Nach vollständigem Lösen des Reagenzes wurden langsam 53 mg  $NaBH_4$  (1.40 mmol, 1.0 Äq.) zugefügt und für 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach vollständigem Umsatz erfolgte die Zugabe von 230 mL einer ges.  $NH_4Cl$ -Lösung beendet. Das Rohprodukt wurde zweimal mit je 100 mL EtOAc extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit 100 mL einer ges. NaCl-Lösung gewaschen und über  $Na_2SO_4$  getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* und säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH 20:1  $\rightarrow$  10:1) wurden 566 mg der Verbindung **49** (1.12 mmol, 80%) in Form eines farblosen Feststoffs erhalten.

DC:  $R_f = 0.38$  (DCM/MeOH 1:1).

$^1H$ -NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ , ppm):  $\delta = 8.86$  (s, 1H,  $NH_2$ ), 7.60 (s, 1H, 6-H), 6.49 (s, 1H,  $NH_2$ ), 5.64 (d,  $^3J_{H-F} = 19.6$  Hz, 1H, 1'-H), 4.87 (dd,  $^2J_{H-F} = 53.4$  Hz,  $^3J = 4.6$  Hz, 1H, 2'-H), 4.34 (s, 2H, C5- $CH_2$ ), 4.20 (ddd,  $^3J_{H-F} = 19.4$  Hz,  $^3J = 8.2$  Hz,  $^3J = 4.7$  Hz, 1H, 3'-H), 4.08-3.96 (m, 2H, 4'-H, 5'-H), 3.80 (dd,  $^2J = 11.8$  Hz,  $^3J = 4.7$  Hz, 1H, 5'-H), 0.93 (s, 9H,  $C(CH_3)_3$ ), 0.89 (s, 9H,  $C(CH_3)_3$ ), 0.13 (s, 3H,  $CH_3$ ), 0.11 (s, 3H,  $CH_3$ ), 0.08 (s, 3H,  $CH_3$ ), 0.07 (s, 3H,  $CH_3$ ).

$^{13}C$ -NMR (75 MHz,  $CDCl_3$ , ppm):  $\delta = 165.7$  (C4), 156.3 (C2), 140.8 (C6), 106.2 (C5), 93.1 (d,

$^1J_{C-F} = 190.3$  Hz, C2'), 91.8 (d,  $^2J_{C-F} = 36.2$  Hz, C1'), 83.9 (C4'), 69.4 (d,  $^2J_{C-F} = 16.1$  Hz, C3'), 62.4 (C5-CH<sub>2</sub>), 59.5 (C5'), 26.2 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 25.8 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 18.7 (Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 18.2 (Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), -4.4 (Si-CH<sub>3</sub>), -4.9 (Si-CH<sub>3</sub>), -5.1 (Si-CH<sub>3</sub>), -5.1 (Si-CH<sub>3</sub>).

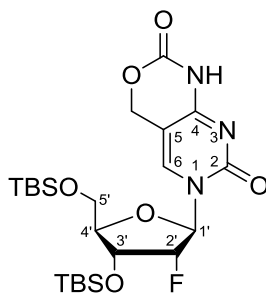
**$^{19}F$ -NMR (282 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm):**  $\delta = -198.8$  (s (breit)).

**HRMS (ESI+):** ber. für C<sub>22</sub>H<sub>43</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>5</sub>Si<sub>2</sub><sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup>: 504.2720, gef.: 504.2720.

**IR (ATR):**  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 3345.7 (w), 2929.8 (m), 1666.7 (s), 1492.2 (m), 1362.9 (m), 1253.5 (m), 1124.0 (s), 1082.0 (s), 994.9 (m), 840.0 (s), 780.3 (s).

**Schmelzbereich:** 84-86 °C.

#### 10.4.10 *O*<sup>3',5'</sup>-Bis(*tert*butyldimethylsilyl)-4,5-(1,3-[3*H*,6*H*]-oxazin-2-on)-2'-desoxy-2'(*R*)-fluor-cytidin (**50**)



In einem ausgeheizten Rundkolben wurden 1.65 g der Verbindung **49** (3.28 mmol, 1.0 Äq.) in 820 mL THF (0.004 M) und mit 197 mg NaH (60% in Mineralöl, 4.92 mmol, 1.5 Äq.) versetzt. Nach 1 h wurden 992 mg 4-Nitrophenylchloroformiat (4.92 mmol, 1.5 Äq.) langsam zugefügt und die Reaktionslösung bei Raumtemperatur für 21 h gerührt wurde. Zum vollständigen Reaktionsumsatz wurden nachfolgend 1.12 mL DIPEA (6.56 mmol, 2.0 Äq.) zugefügt und für weitere 22 h gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 150 mL einer ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung beendet. Das Rohprodukt wurde mit 3x 250 mL EtOAc extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit 2x 200 mL einer ges. NH<sub>4</sub>Cl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO<sub>4</sub> getrocknet, das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH 100:1 → 50:1) wurden 1.37 g der Verbindung **50** (2.58 mmol, 79%) in Form eines farblosen Feststoffs erhalten.

**DC:**  $R_f = 0.58$  (DCM/MeOH 10:1).

**$^1H$ -NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm):**  $\delta = 8.92$  (s, 1H, NH), 8.13 (s, 1H, 6-H), 6.02 (d,  $^3J_{H-F} =$

16.5 Hz, 1H, 1'-H), 5.11 (dd,  $^2J = 13.3$  Hz,  $^4J = 1.0$  Hz, 1H, 1x C5-CH<sub>2</sub>), 5.06 (dd,  $^2J = 13.3$  Hz,  $^3J = 0.9$  Hz, 1H, 1x C5-CH<sub>2</sub>), 4.91 (dd,  $^2J_{\text{H-F}} = 53.3$  Hz,  $^3J = 3.9$  Hz, 1H, 2'-H), 4.21 (ddd,  $^3J_{\text{H-F}} = 21.4$  Hz,  $^3J = 8.1$  Hz,  $^3J = 3.8$  Hz, 1H, 3'-H), 4.20-4.05 (m, 2H, 4'-H, 5'-H), 3.81 (dd,  $^2J = 12.4$  Hz,  $^3J = 2.3$  Hz, 1H, 5'-H), 0.95 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.89 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.15 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.12 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.11 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.08 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm):**  $\delta = 160.2$  (C4), 154.4 (C2), 149.9 (C4-NH-C(=O)-O), 138.4 (C6), 96.9 (C5), 92.9 (d,  $^1J_{\text{C-F}} = 192.5$  Hz, C2'), 89.7 (d,  $^2J_{\text{C-F}} = 34.5$  Hz, C1'), 83.6 (C4'), 68.0 (d,  $^2J_{\text{C-F}} = 16.6$  Hz, C3'), 64.8 (C5-CH<sub>2</sub>), 60.5 (C5'), 26.2 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 25.7 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 18.7 (Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 18.1 (Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), -4.4 (Si-CH<sub>3</sub>), -4.9 (Si-CH<sub>3</sub>), -5.0 (Si-CH<sub>3</sub>), -5.2 (Si-CH<sub>3</sub>).

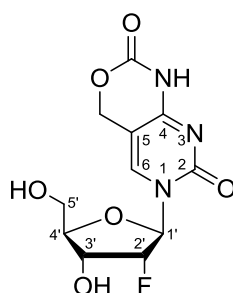
**<sup>19</sup>F-NMR (282 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm):**  $\delta = -201.0$  (ddd,  $^2J_{\text{F-H}} = 51.9$  Hz,  $^3J_{\text{F-H}} = 21.7$  Hz,  $^3J_{\text{F-H}} = 16.4$  Hz).

**HRMS (ESI+):** ber. für C<sub>23</sub>H<sub>41</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>6</sub>Si<sub>2</sub><sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup>: 530.2512, gef.: 530.2510.

**IR (ATR):**  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 2956 (m), 2930 (m), 2859 (s), 1762 (m), 1737 (m), 1681 (s), 1573 (m), 1505 (m), 1473 (m), 1424 (m), 1362 (m), 1338 (m), 1288 (m), 1255 (s), 1228 (s), 1167 (s), 1125 (s), 1082 (s), 940 (m), 838 (s), 781 (s), 670 (m).

**Schmelzbereich:** 128-129 °C.

#### 10.4.11 4,5-(1,3-[3H,6H]-Oxazin-2-on)-2'-desoxy-2'(R)-fluor-cytidin (51)



In einem Polypropylengefäß wurden 142 mg der Verbindung **50** (268  $\mu$ mol, 1.0 Äq.) in 3.8 mL EtOAc (0.07 M) gelöst, mit 108  $\mu$ L Pyridin (1.34 mmol, 5.0 Äq.) sowie 67  $\mu$ L HF·Pyridin (70% HF, 2.68 mmol, 10.0 Äq.) versetzt und bei Raumtemperatur gerührt. Nach 25 h wurde ein vollständiger Reaktionsumsatz beobachtet und 2.68 mL TMSOMe (1 mL/mmol) der entstandenen Suspension zugefügt. Nach 45 min wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und mittels säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH 15:1  $\rightarrow$  5:1) konnten 73 mg der Verbindung **51** (242  $\mu$ mol, 90%) in Form eines farblosen Feststoffs erhalten.

**DC:**  $R_f = 0.11$  (DCM/MeOH 10:1).

**$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ , ppm):**  $\delta = 11.2$  (s, 1H, NH), 8.29 (s, 1H, 6-H), 6.89 (dd,  $^3J_{\text{H-F}} = 17.2$  Hz,  $^3J = 1.1$  Hz, 1H, 1'-H), 5.59 (d,  $^3J = 6.4$  Hz, 1H, 3'-OH), 5.23 (s, 1H, 5'-OH), 5.13 (dd,  $^2J = 13.2$  Hz,  $^4J = 1.1$  Hz, 1H, 1x C5-CH<sub>2</sub>), 5.08 (dd,  $^2J = 13.2$  Hz,  $^3J = 1.1$  Hz, 1H, 1x C5-CH<sub>2</sub>), 4.92 (ddd,  $^2J_{\text{H-F}} = 52.9$  Hz,  $^3J = 4.2$  Hz,  $^3J = 1.1$  Hz, 1H, 2'-H), 4.19-4.03 (m, 1H, 3'-H), 3.93 (dd,  $^3J = 8.7$  Hz,  $^3J = 2.2$  Hz, 1H, 4'-H), 3.84 (d,  $^2J = 12.3$  Hz, 1H, 5'-H), 3.63 (dd,  $^2J = 12.5$  Hz,  $^3J = 3.2$  Hz, 1H, 5'-H).

**$^{13}\text{C-NMR}$  (101 MHz, DMSO- $d_6$ , ppm):**  $\delta = 160.4$  (C4), 154.1 (C2), 150.5 (C4-NH-C(=O)-O), 138.7 (C6), 96.9 (C5), 93.9 (d,  $^1J_{\text{C-F}} = 185.9$  Hz, C2'), 88.5 (d,  $^2J_{\text{C-F}} = 33.9$  Hz, C1'), 83.1 (C4'), 67.9 (d,  $^2J_{\text{C-F}} = 16.5$  Hz, C3'), 64.2 (C5-CH<sub>2</sub>), 59.0 (C5').

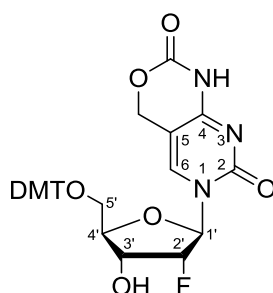
**$^{19}\text{F-NMR}$  (376 MHz, DMSO- $d_6$ , ppm):**  $\delta = -201.5$  (ddd,  $^2J_{\text{F-H}} = 52.9$  Hz,  $^3J_{\text{F-H}} = 24.6$  Hz,  $^3J_{\text{F-H}} = 17.2$  Hz).

**HRMS (ESI+):** ber. für C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>6</sub><sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup>: 302.0783, gef.: 302.0782.

**IR (ATR):**  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 3347 (m), 3081 (w), 2932 (w), 1752 (s), 1664 (s), 1568 (s), 1494 (s), 1429 (w), 1405 (m), 1230 (s), 1100 (s), 1070 (s), 986 (w), 946 (m), 873 (w), 787 (m), 765 (w).

**Schmelzbereich:** 158-161 °C.

#### 10.4.12 *O*<sup>5'</sup>-Dimethoxytrityl-4,5-(1,3-[3*H*,6*H*]-oxazin-2-on)-2'-desoxy-2'(R)-fluor-cytidin (134)



In einem ausgeheiztem Rundkolben wurden 546 mg der Verbindung **51** (1.81 mmol, 1.0 Äq.) in 12.0 mL Pyridin (0.1 M) gelöst, mit 3 Å Molsieb, 352  $\mu\text{L}$  Triethylamin (2.54 mmol, 1.4 Äq.) und 860 mg DMT-Cl (2.54 mmol, 1.4 Äq.) versetzt und für 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 150 mL einer ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung zugegeben, das Rohprodukt mit 2x 250 mL EtOAc extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit 150 mL einer ges. NH<sub>4</sub>Cl-Lösung gewaschen und über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo*, säulenchromato-

graphischer Aufreinigung (passiviertes Silica, DCM/MeOH 1:0 → 100:1 → 50:1 (+ jeweils 0.5% Pyridin) und Coevaporieren mit 120 mL Toluol wurden 718 mg der Verbindung **134** (1.19 mmol, 66%) in Form eines farblosen Feststoffs erhalten.

**DC:**  $R_f = 0.42$  (DCM/MeOH 10:1).

**$^1\text{H-NMR}$  (599 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm):**  $\delta = 8.37$  (s, 1H, 6-H), 7.37 (d,  $^3J = 7.4$  Hz, 2H, 2x  $\text{CH}_2\text{-O-C-C=CH=CH=CH}$ ), 7.30 (t,  $^3J = 7.5$  Hz, 2H, 2x  $\text{CH}_2\text{-O-C-C=CH=CH=CH}$ ), 7.28-7.23 (m, 5H, 4x  $\text{CH}_2\text{-O-C-C=CH=CH=C-O-CH}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{-O-C-C=CH=CH=CH}$ ), 6.85-6.81 (m, 4H, 4x  $\text{CH}_2\text{-O-C-C=CH=CH=C-O-CH}_3$ ), 5.99 (d,  $^3J_{\text{H-F}} = 15.9$  Hz, 1H, 1'-H), 5.19 (dd,  $^2J_{\text{H-F}} = 51.7$  Hz,  $^3J = 3.7$  Hz, 1H, 2'-H), 4.72 (ddd,  $^3J_{\text{H-F}} = 24.9$  Hz,  $^3J = 9.3$  Hz,  $^3J = 3.7$  Hz, 1H, 3'-H), 4.24 (d,  $^2J = 14.0$  Hz, 1H, 1x C5- $\text{CH}_2$ ), 4.21 (d,  $^3J = 9.5$  Hz, 1H, 4'-H), 3.95 (d,  $^2J = 13.5$  Hz, 1H, 1x C5- $\text{CH}_2$ ), 3.78 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3.77 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3.65 (d,  $^2J = 11.0$  Hz, 1H, 5'-H), 3.58 (dd,  $^2J = 11.2$  Hz,  $^3J = 1.6$  Hz, 1H, 5'-H).

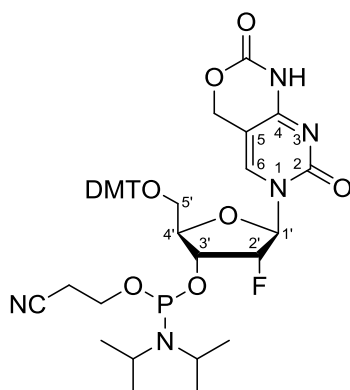
**$^{13}\text{C-NMR}$  (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm):**  $\delta = 160.4$  (C4), 159.0 (2x  $\text{CH}_2\text{-O-C-C=CH=CH=C-O-CH}_3$ ), 154.8 (C2), 150.4 (C4-NH-C(=O)-O), 144.2 ( $\text{CH}_2\text{-O-C-C=CH=CH=CH}$ ), 138.7 (C6), 135.2 ( $\text{CH}_2\text{-O-C-C=CH=CH=C-O-CH}_3$ ), 135.0 ( $\text{CH}_2\text{-O-C-C=CH=CH=C-O-CH}_3$ ), 130.2 (2x  $\text{CH}_2\text{-O-C-C=CH=CH=C-O-CH}_3$ ), 130.2 (2x  $\text{CH}_2\text{-O-C-C=CH=CH=C-O-CH}_3$ ), 128.3 (2x  $\text{CH}_2\text{-O-C-C=CH=CH=CH}$ ), 128.3 (2x  $\text{CH}_2\text{-O-C-C=CH=CH=CH}$ ), 127.6 ( $\text{CH}_2\text{-O-C-C=CH=CH=CH}$ ), 113.6 (4x  $\text{CH}_2\text{-O-C-C=CH=CH=C-O-CH}_3$ ), 97.6 (C5), 94.1 (d,  $^1J_{\text{C-F}} = 186.1$  Hz, C2'), 89.3 (d,  $^2J_{\text{C-F}} = 34.1$  Hz, C1'), 87.1 ( $\text{CH}_2\text{-O-C-C=CH=CH=CH}$ ), 82.2 (C4'), 68.0 (C3'), 64.1 (C5- $\text{CH}_2$ ), 60.5 (C5'), 55.4 (2x  $\text{CH}_2\text{-O-C-C=CH=CH=C-O-CH}_3$ ).

**$^{19}\text{F-NMR}$  (282 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm):**  $\delta = -203.3$  (ddd,  $^2J_{\text{F-H}} = 51.8$  Hz,  $^3J_{\text{F-H}} = 24.8$  Hz,  $^2J_{\text{F-H}} = 15.8$  Hz).

**HRMS (ESI+):** ber. für  $\text{C}_{32}\text{H}_{30}\text{FN}_3\text{O}_8\text{Na}^+$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 626.1909, gef.: 626.1915.

**IR (ATR):**  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 3347 (m), 3081 (w), 2932 (w), 1752 (s), 1664 (s), 1568 (s), 1494 (s), 1466 (w), 1429 (w), 1405 (m), 1343 (w), 1230 (s), 1100 (s), 1070 (s), 986 (w), 946 (m), 787(m).

**Schmelzbereich:** 145-147 °C.

**10.4.13 *O*<sup>3'</sup>-(Diisopropylcyanoethylphosphin)-*O*<sup>5'</sup>-dimethoxytrityl-4,5-(1,3-[<sup>3</sup>H,<sup>6</sup>H]-oxazin-2-on)-2'-desoxy-2'(R)-fluor-cytidin (52)**

In einem ausgeheizten *Schlenk*-Rohr wurden 50 mg der Verbindung **134** (83  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äq.) in 1.0 mL sorgfältig entgastem DCM (0.08 M) gelöst, mit 9 mg Diisopropylammoniumtetrazolid (53  $\mu\text{mol}$ , 0.6 Äq.) und 34  $\mu\text{L}$  2-Cyanoethoxy-*N,N,N',N'*-tetraisopropylphosphordiamidit (107  $\mu\text{mol}$ , 1.3 Äq.) versetzt und für 17 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittel im Argongas-Gegenstrom und säulenchromatographischer Aufreinigung (passiviertes Silica, entgastes Laufmittel, *i*Hex/EtOAc 1:2) wurden 63 mg der Verbindung **52** (79  $\mu\text{mol}$ , 96%) als Gemisch zweier Diastereomeren in Form eines farblosen Feststoffs erhalten.

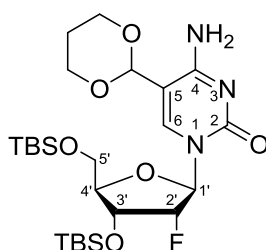
Die Verbindung wurde direkt für die DNA-Festphasensynthese verwendet. Der gelungene Einbau in DNA wies die erfolgreiche Umsetzung zum Phosphoramidit nach.

**DC:**  $R_f = 0.17$  (*i*Hex/EtOAc 1:1).

**<sup>31</sup>P-NMR (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm):**  $\delta = 150.6$  (d,  $^4J_{\text{P-F}} = 6.2$  Hz), 150.3 (d,  $^4J_{\text{P-F}} = 7.7$  Hz).

**HRMS (ESI<sup>-</sup>):** ber. für C<sub>41</sub>H<sub>46</sub>FN<sub>5</sub>O<sub>9</sub>P<sup>-</sup> [M-H]<sup>-</sup>: 802.3023, gef.: 802.3020.

### 10.4.14 *O*<sup>3',5'</sup>-Bis(*tert*butyldimethylsilyl)-5-(1,3-dioxan-2-yl)-2'-desoxy-2'(R)-fluor-cytidin (**54**)



In einem ausgeheizten Rundkolben wurden 2.99 g der Verbindung **53** (5.96 mmol, 1.0 Äq.) in 60 mL DCM (0.10 M) gelöst und mit 1.72 mL Propandiol (23.8 mmol, 4.0 Äq.) sowie 1.18 mL Orthoameisensäuretriethylester (7.15 mmol, 1.2 Äq.) bei 0 °C versetzt. Anschließend wurden 2.38 mL einer TiCl<sub>4</sub>-Lösung (2.38 mmol, 0.4 eq, 1 M in DCM) tropfenweise zugefügt, die Reaktionslösung langsam auf Raumtemperatur erwärmt und für 17 h rühren lassen. Nach vollständigem Umsatz erfolgte die vorsichtige Zugabe von Eis und 80 mL einer ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung. Das Rohprodukt wurde mit 2x 150 mL EtOAc extrahiert, die organische Phase mit 100 mL einer ges. NaCl-Lösung gewaschen und über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittel *in vacuo* und säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH 40:1 → 30:1) wurden 2.10 g der Verbindung **54** (3.75 mmol, 63%) in Form eines leicht gelblichen Feststoffs erhalten.

**DC:**  $R_f = 0.43$  (DCM/MeOH 20:1).

**<sup>1</sup>H-NMR (599 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm):**  $\delta = 7.72$  (s, 1H, 6-H), 7.24 (s, 1H, NH<sub>2</sub>), 6.56 (s, 1H, NH<sub>2</sub>), 5.95 (dd, <sup>3</sup> $J_{\text{H-F}} = 17.4$  Hz, <sup>3</sup> $J = 1.7$  Hz, 1H, 1'-H), 5.29 (s, 1H, O-CH-O), 4.86 (ddd, <sup>2</sup> $J_{\text{H-F}} = 52.6$  Hz, <sup>3</sup> $J = 4.5$  Hz, <sup>3</sup> $J = 1.7$  Hz, 1H, 2'-H), 4.25-4.16 (m, 3H, 3'-H, 2x O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 4.06-4.01 (m, 2H, 4'-H, 5'-H), 3.93-3.87 (m, 2H, 2x O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 3.81-3.77 (m, 1H, 5'-H), 2.18 (dt, <sup>2</sup> $J = 13.7$  Hz, <sup>3</sup> $J = 12.4$  Hz, <sup>3</sup> $J = 5.0$  Hz, 1H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 1.46 (dt, <sup>2</sup> $J = 13.7$  Hz, <sup>3</sup> $J = 2.6$  Hz, <sup>3</sup> $J = 1.4$  Hz, 1H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 0.95 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.89 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.13 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.12 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.10 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.08 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

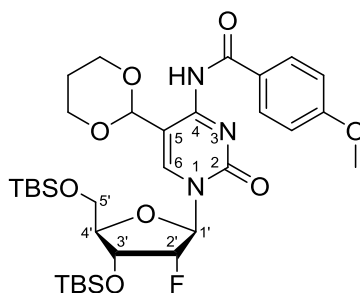
**<sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm):**  $\delta = 163.2$  (C4), 154.5 (C2), 140.5 (C6), 104.3 (C5), 99.3 (O-CH-O), 92.2 (d, <sup>1</sup> $J_{\text{C-F}} = 192.2$  Hz, C2'), 89.7 (d, <sup>2</sup> $J_{\text{C-F}} = 34.2$  Hz, C1'), 83.7 (C4'), 69.0 (d, <sup>2</sup> $J_{\text{C-F}} = 16.1$  Hz, C3'), 67.5 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 61.5 (C5'), 26.3 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 25.8 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 25.6 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 18.8 (Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 18.2 (Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), -4.4 (Si-CH<sub>3</sub>), -4.9 (Si-CH<sub>3</sub>), -5.1 (Si-CH<sub>3</sub>), -5.1 (Si-CH<sub>3</sub>).

**<sup>19</sup>F-NMR (282 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm):**  $\delta = -201.3$  (dt, <sup>2</sup> $J_{\text{F-H}} = 52.6$  Hz, <sup>3</sup> $J_{\text{F-H}} = 17.4$  Hz).

**HRMS (ESI+):** ber. für C<sub>25</sub>H<sub>47</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>6</sub>Si<sub>2</sub><sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup>: 560.2982, gef.: 560.2987.

**IR (ATR):**  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 3443 (w), 3101 (br, w), 2927 (w), 2884 (w), 1663 (m), 1511 (m), 1487 (m), 1471 (m), 1360 (w), 1251 (m), 1124 (m), 1083 (s), 992 (m), 833 (s), 777 (s), 671 (m).

#### 10.4.15 *O*<sup>3',5'</sup>-Bis(*tert*butyldimethylsilyl)-*N*<sup>4</sup>-(*para*-methoxybenzoyl)-5-(1,3-dioxan-2-yl)-2'-desoxy-2'(*R*)-fluor-cytidin (**135**)



In einem ausgeheizten Rundkolben wurden 1.74 g der Verbindung **54** (3.10 mmol, 1.0 Äq.) in 45 mL THF (0.07 M) bei 0 °C gelöst und mit 161 mg NaH (60% in Mineralöl, 4.03 mmol, 1.3 Äq.) versetzt. Nach 1 h wurden 462  $\mu\text{L}$  *para*-Methoxybenzoylchlorid (3.41 mmol, 1.1 Äq.) tropfenweise zugefügt und die Reaktionslösung langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Nach 5 h wurde die noch unvollständige Reaktion durch Zugabe von Eis und 50 mL einer ges.  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung beendet. Die wässrige Phase wurde mit 2x 100 mL EtOAc extrahiert und mit 20 mL einer ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die organischen Phase wurde über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet, das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und nach säulenchromatographischer Aufreinigung (*i*Hex/EtOAc 5:1  $\rightarrow$  3:1) wurden 1.22 g der Verbindung **135** (1.76 mmol, 57%) in Form eines farblosen Feststoffs erhalten.

**DC:**  $R_f$  = 0.60 (*i*Hex/EtOAc 2:1).

**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm):**  $\delta$  = 13.32 (s, 1H, NH), 8.23 (d,  $^3J$  = 7.6 Hz, 2H, 2x O=C=C=CH), 7.81 (s, 1H, 6-H), 6.94 (d,  $^3J$  = 8.6 Hz, 2H, 2x CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 5.97 (dd,  $^3J_{\text{H-F}}$  = 16.1 Hz,  $^3J$  = 3.7 Hz, 1H, 1'-H), 5.83 (s, 1H, O-CH-O), 4.94 (dt,  $^2J_{\text{H-F}}$  = 53.1 Hz,  $^3J$  = 4.4 Hz, 1H, 2'-H), 4.34 (dt,  $^3J_{\text{H-F}}$  = 15.9 Hz,  $^3J$  = 5.6 Hz, 1H, 3'-H), 4.27-4.22 (m, 2H, 2x O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 4.08-3.97 (m, 3H, 4'-H, 2x O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 3.93 (dd,  $^2J$  = 11.8 Hz,  $^3J$  = 1.3 Hz, 1H, 5'-H), 3.88 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.78 (dd,  $^2J$  = 11.8 Hz,  $^3J$  = 3.4 Hz, 1H, 5'-H), 2.24-2.14 (m, 1H, 1x O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 1.46 (d,  $^2J$  = 13.7 Hz, 1H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 0.94 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.92 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.13 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.13 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.12 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.11 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm):**  $\delta$  = 163.4 (C4-N-C=O, C-O-CH<sub>3</sub>), 157.3 (C4), 147.6 (C2), 140.0 (C6), 132.1 (C4-N-(C=O)-C=CH), 129.9 (C4-N-(C=O)-C=CH), 113.4 (CH=C-O-CH<sub>3</sub>),



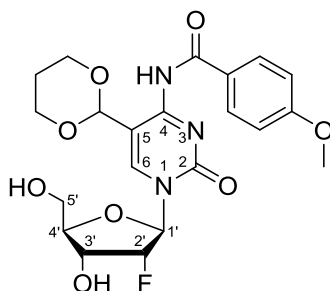
96.0 (C5), 95.9 (O-CH-O), 91.4 (d,  $^1J_{C-F} = 193.9$  Hz, C2'), 89.4 (d,  $^2J_{C-F} = 34.0$  Hz, C1'), 84.9 (C4'), 69.9 (d,  $^2J_{C-F} = 14.9$  Hz, C3'), 67.8 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 62.2 (C5'), 55.4 (O-CH<sub>3</sub>), 26.2 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 25.8 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 25.7 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 18.7 (Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 18.3 (Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), -4.6 (Si-CH<sub>3</sub>), -5.0 (Si-CH<sub>3</sub>), -5.1 (Si-CH<sub>3</sub>), -5.4 (Si-CH<sub>3</sub>).

**$^{19}\text{F}$ -NMR (282 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm):**  $\delta = -201.1$  (dt,  $^2J_{F-H} = 53.1$  Hz,  $^3J_{F-H} = 16.1$  Hz).

**HRMS (ESI+):** ber. für C<sub>33</sub>H<sub>53</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>8</sub>Si<sub>2</sub><sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup>: 694.3355, gef.: 694.3346.

**IR (ATR):**  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 2929 (w), 2856 (w), 1714 (m), 1654 (m), 1567 (s), 1508 (w), 1472 (m), 1418 (w), 1361 (w), 1332 (m), 1279 (m), 1247 (s), 1160 (s), 1125 (m), 1100 (s), 1084 (s), 1006 (m), 965 (m), 939 (w), 907 (m), 835 (s), 777 (s), 669 (m).

#### 10.4.16 *N*<sup>4</sup>-(*Para*-methoxybenzoyl)-5-(1,3-dioxan-2-yl)-2'-desoxy-2'(R)-fluor- cytidin (**55**)



In einem Polypropylengefäß wurden 992 mg der Verbindung **135** (1.43 mmol, 1.0 Äq.) in 20 mL EtOAc (0.07 M) gelöst, mit 577  $\mu\text{L}$  Pyridin (7.15 mmol, 5.0 Äq.) sowie 358  $\mu\text{L}$  HF·Pyridin (70% HF, 14.3 mmol, 10.0 Äq.) versetzt und bei Raumtemperatur gerührt. Nach 20 h wurde ein vollständiger Reaktionsumsatz beobachtet und 1.43 mL TMSOMe (1 mL/mmol) der entstandenen Suspension zugefügt. Nach 30 min wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und mittels säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH 15:1  $\rightarrow$  10:1) konnten 577 mg der Verbindung **55** (1.24 mmol, 87%) in Form eines farblosen Feststoffs erhalten.

**DC:**  $R_f = 0.49$  (DCM/MeOH 10:1).

**$^1\text{H}$ -NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, ppm):**  $\delta = 13.06$  (s, 0.7H, NH), 10.17 (s, 0.3H, NH), 8.51 (s, 0.3H, 6-H), 8.50 (s, 0.7H, 6-H), 8.10 (s, 1.4H, 2x O=C-C=CH), 7.85 (s, 0.6H, 2x O=C-C=CH), 7.11 (s, 0.6H, 2x CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 7.04 (s, 1.4H, 2x CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 5.94 (d,  $^3J_{H-F} = 17.4$  Hz, 1H, 1'-H), 5.75 (s, 0.7H, O-CH-O), 5.63 (s, 1H, 3'-OH), 5.43 (s, 0.3H, O-CH-O), 5.21 (s, 1H, 5'-OH), 5.10 (d,

$^2J_{\text{H-F}} = 50.4$  Hz, 1H, 2'-H), 4.20-4.05 (m, 3H, 3'-H, 2x O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 3.91-3.81 (m, 7H, 4'-H, 5'-H, 2x O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O, OCH<sub>3</sub>), 3.62 (d,  $^2J = 12.7$  Hz, 1H, 5'-H), 2.06-1.87 (m, 1H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 1.55-1.40 (m, 1H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O).

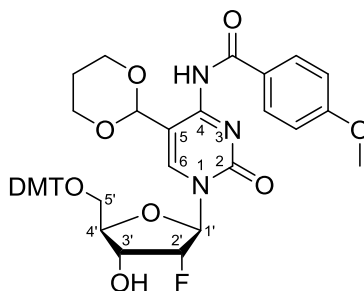
$^{13}\text{C-NMR}$  (101 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, ppm):  $\delta = 162.9$  (C4-N-C=O, C-O-CH<sub>3</sub>), 156.4 (C4), 147.0 (C2), 143.5 (0.3x C6), 140.9 (0.7x C6), 131.6 (0.7x C4-N-(C=O)-C=CH), 129.6 (0.3x C4-N-(C=O)-C=CH), 129.1 (C4-N-(C=O)-C=CH), 114.3 (0.7x CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 113.6 (0.7x CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 98.4 (C5), 94.9 (O-CH-O), 93.6 (d,  $^1J_{\text{C-F}} = 189.3$  Hz, C2'), 88.3 (d,  $^2J_{\text{C-F}} = 33.1$  Hz, C1'), 83.1 (C4'), 67.1 (d,  $^2J_{\text{C-F}} = 16.8$  Hz, C3'), 66.8 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 58.8 (C5'), 55.5 (O-CH<sub>3</sub>), 25.2 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O).

$^{19}\text{F-NMR}$  (376 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, ppm):  $\delta = -201.4$  (dt,  $^2J_{\text{F-H}} = 51.7$  Hz,  $^3J_{\text{F-H}} = 17.7$  Hz, 0.3F),  $-202.0$  (dt,  $^2J_{\text{F-H}} = 50.4$  Hz,  $^3J_{\text{F-H}} = 17.4$  Hz, 0.7F).

**HRMS (ESI+):** ber. für C<sub>21</sub>H<sub>23</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>8</sub><sup>-</sup> [M-H]<sup>-</sup>: 464.1469, gef.: 464.1474.

**IR (ATR):**  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 3331 (w), 2927 (w), 1712 (m), 1669 (m), 1638 (m), 1577 (s), 1516 (w), 1482 (m), 1450 (m), 1399 (m), 1310 (w), 1248 (s), 1146 (m), 1084 (s), 1021 (s), 961 (m), 916 (s), 856 (m), 817 (m), 709 (m), 676 (m).

#### 10.4.17 *O*<sup>5'</sup>-Dimethoxytrityl-*N*<sup>4</sup>-(*para*-methoxybenzoyl)-5-(1,3-dioxan-2-yl)-2'-desoxy-2'(R)-fluor-cytidin (136)



In einem ausgeheizten Rundkolben wurden 534 mg der Verbindung **55** (1.15 mmol, 1.0 Äq.) in 7.70 mL Pyridin (0.15 M) gelöst, mit 3 Å Molsieb, 223  $\mu\text{L}$  Triethylamin (1.61 mmol, 1.4 Äq.) und 546 mg DMT-Cl (1.61 mmol, 1.4 Äq.) versetzt und für 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden mittels Zugabe von 10 mL MeOH unreaktierte DMT-Spezies für 5 min verethert. Nachfolgend wurden 50 mL einer ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung zugegeben, die wässrige Phase mit 2x 50 mL EtOAc extrahiert, mit 50 mL einer ges. NH<sub>4</sub>Cl-Lösung gewaschen und die vereinigten organischen Phasen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo*, säu-

lenchromatographischer Aufreinigung (passiviertes Silica, DCM/MeOH 100:1 → 50:1 (+ jeweils 0.5% Pyridin) und Coevaporieren mit 50 mL Toluol wurden 810 mg der Verbindung **136** (1.05 mmol, 92%) in Form eines farblosen Feststoffs erhalten.

**DC:**  $R_f = 0.36$  (DCM/MeOH 20:1).

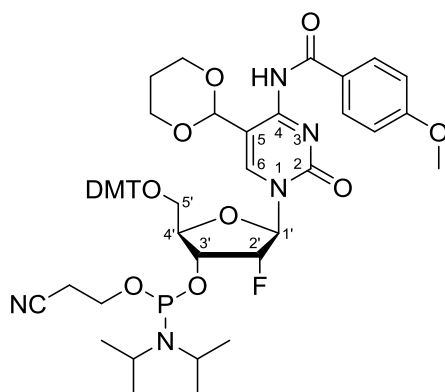
**$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm):**  $\delta = 13.38$  (s, 1H, NH), 8.21 (d,  $^3J = 8.3$  Hz, 2H, 2x O=C=C=CH=CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 8.12 (s, 1H, 6-H), 7.46 (dd,  $^3J = 7.8$  Hz,  $^4J = 1.4$  Hz, 2H, 2x CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH=CH=CH), 7.37-7.33 (m, 4H, 4x CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH=CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 7.33-7.28 (m, 2H, 2x CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH=CH=CH), 7.24-7.21 (m, 1H, CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH=CH=CH), 6.95-6.91 (m, 2H, O=C-C=CH=CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 6.88-6.82 (m, 4H, 4x CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH=CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 6.06 (dd,  $^3J_{\text{H-F}} = 16.6$  Hz,  $^3J = 2.8$  Hz, 1H, 1'-H), 5.75 (s, 1H, O-CH-O), 4.94 (ddd,  $^2J_{\text{H-F}} = 52.8$  Hz,  $^3J = 4.8$  Hz,  $^3J = 2.8$  Hz, 1H, 2'-H), 4.51-4.40 (m, 1H, 3'-H), 4.16-4.08 (m, 1H, 4'-H), 3.87 (s, 3H, O=C-C=CH=CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 3.90-3.74 (s, 10H, 2x O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O, 2x CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH=CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 3.64 (d,  $^2J = 11.1$  Hz, 1H, 5'-H), 3.30 (dd,  $^2J = 11.1$  Hz,  $^3J = 2.6$  Hz, 1H, 5'-H), 1.69-1.63 (m, 1H, 1x O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 1.11 (d,  $^2J = 13.2$  Hz, 1H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O).

**$^{13}\text{C-NMR}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm):**  $\delta = 163.4$  (C4-N-C(=O)-C=CH=CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 158.7 (2x CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH=CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 158.6 (C4), 147.6 (C2), 144.7 (CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH=CH=CH), 139.7 (C6), 136.0 (CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH=CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 135.7 (CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH=CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 132.2 (2x C4-N-(C=O)-C=CH), 130.3 (2x CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH=CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 130.2 (2x CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH=CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 129.2 (C4-N-(C=O)-C=CH), 128.3 (2x CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH=CH=CH), 128.1 (2x CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH=CH=CH), 127.0 (CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH=CH=CH), 113.6 (2x C4-N-C(=O)-C=CH=CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 113.4 (4x CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH=CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 95.8 (C5), 95.5 (O-CH-O), 92.4 (d,  $^1J_{\text{C-F}} = 193.7$  Hz, C2'), 88.8 (d,  $^2J_{\text{C-F}} = 34.4$  Hz, C1'), 86.8 (CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH=CH=CH), 82.8 (C4'), 69.7 (C3'), 67.4 (2x O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 62.4 (C5'), 55.6 (C4-N-C(=O)-C=CH=CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 55.4 (2x CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH=CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 25.2 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O).

**$^{19}\text{F-NMR}$  (282 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm):**  $\delta = -204.4$  (d,  $^2J_{\text{F-H}} = 52.8$  Hz).

**HRMS (ESI+):** ber. für C<sub>42</sub>H<sub>43</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>10</sub><sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup>: 768.2932, gef.: 768.2929.

**IR (ATR):**  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 2928 (w), 1713 (m), 1662 (w), 1604 (m), 1566 (s), 1508 (m), 1445 (m), 1300 (w), 1240 (s), 1172 (s), 1102 (s), 1075 (s), 1029 (s), 989 (m), 967 (m), 948 (m), 916 (m), 891 (m), 826 (m), 789 (m), 759 (m), 727 (m), 699 (m).

**10.4.18 *O*<sup>3'</sup>-(Diisopropylcyanoethylphosphin)-*O*<sup>5'</sup>-dimethoxytrityl-*N*<sup>4</sup>-(*para*-methoxybenzoyl)-5-(1,3-dioxan-2-yl)-2'-desoxy-2'(R)-fluor-cytidin (**56**)**

In einem ausgeheizten *Schlenk*-Rohr wurden 100 mg der Verbindung **136** (130  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äq.) in 1.6 mL sorgfältig entgastem DCM (0.08 M) gelöst, mit 13 mg Diisopropylammoniumtetrazolid (78  $\mu\text{mol}$ , 0.6 Äq.) und 54  $\mu\text{L}$  2-Cyanoethoxy-*N,N,N',N'*-tetraisopropylphosphordiamidit (170  $\mu\text{mol}$ , 1.3 Äq.) versetzt und für 17 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittel im Argongas-Gegenstrom und säulenchromatographischer Aufreinigung (passiviertes Silica, entgastes Laufmittel, *i*Hex/EtOAc 1:2) wurden 125 mg der Verbindung **56** (129  $\mu\text{mol}$ , 99%) als Gemisch zweier Diastereomeren in Form eines farblosen Feststoffs erhalten.

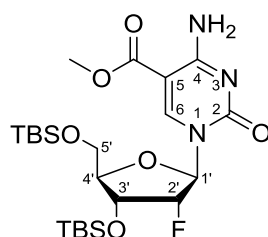
Die Verbindung wurde direkt für die DNA-Festphasensynthese verwendet. Der gelungene Einbau in DNA wies die erfolgreiche Umsetzung zum Phosphoramidit nach.

**DC:**  $R_f = 0.48$  (DCM/MeOH 20:1).

**<sup>31</sup>P-NMR (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm):**  $\delta = 151.3$  (d,  $^4J_{\text{P-F}} = 8.4$  Hz), 151.0 (d,  $^4J_{\text{P-F}} = 13.6$  Hz).

**HRMS (ESI+):** ber. für C<sub>51</sub>H<sub>60</sub>FN<sub>5</sub>O<sub>11</sub>P<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup>: 968.4006, gef.: 968.3992.

### 10.4.19 *O*<sup>3',5'</sup>-Bis(*tert*butyldimethylsilyl)-5-(methoxycarbonyl)-2'-desoxy-2'(*R*)-fluor-cytidin (**57**)



In einem Hochdruckautoklaven wurden 2.00 g der Verbindung **43** (3.03 mmol, 1.0 Äq.) zusammen mit 43 mg Pd<sub>2</sub>(MeCN)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (165 μmol, 0.05 Äq.) vorgelegt. Das Reaktionsgefäß wurde zur Dichtigkeitsprüfung einmalig mit Kohlenstoffmonooxid mit einem Gasdruck von 3.5 bar für 15 min befüllt. Nach bestandem Drucktest wurde der Hochdruckautoklav belüftet, 1.10 mL DIPEA (6.60 mmol, 2.0 Äq.) und 36 mL Methanol (0.9 M) zugefügt, der Hochdruckautoklav zweimal mit Kohlenstoffmonooxid gespült und schließlich mit Kohlenstoffmonooxid mit einem Gasdruck von 3.5 bar befüllt. Nachfolgend wurde die Suspension auf 60 °C erhitzt und für weitere 13 h gerührt. Nach Belüften des Reaktionsgefäßes wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und nach säulenchromatographischer Aufreinigung (*dryload*, DCM/MeOH 100:1 → 50:1 → 20:1 (+ jeweils 0.5% NEt<sub>3</sub>)) wurden 1.18 g der Verbindung **57** (2.21 mmol, 67%) in Form eines leicht gelblichen Feststoffs erhalten.

**DC:**  $R_f = 0.31$  (DCM/MeOH 20:1).

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm):** δ = 8.50 (s, 1H, 6-H), 8.01 (s, 1H, NH<sub>2</sub>), 6.10 (s, 1H, NH<sub>2</sub>), 5.93 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H-F</sub> = 18.1 Hz, <sup>3</sup>J = 2.0 Hz, 1H, 1'-H), 4.98 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>H-F</sub> = 52.7 Hz, <sup>3</sup>J = 4.6 Hz, <sup>3</sup>J = 2.0 Hz, 1H, 2'-H), 4.22 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>H-F</sub> = 18.1 Hz, <sup>3</sup>J = 7.4 Hz, <sup>3</sup>J = 4.6 Hz, 1H, 3'-H), 4.14-4.08 (m, 1H, 4'-H), 4.02 (dd, <sup>2</sup>J = 11.8 Hz, <sup>3</sup>J = 2.0 Hz, 1H, 5'-H), 3.84 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.80 (dd, <sup>2</sup>J = 11.8 Hz, <sup>3</sup>J = 3.6 Hz, 1H, 5'-H), 0.92 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.90 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.11 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.11 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.10 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.09 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm):** δ = 165.1 (C(=O)-OCH<sub>3</sub>), 163.6 (C4), 153.7 (C2), 148.3 (C6), 95.9 (C5), 92.6 (d, <sup>1</sup>J<sub>C-F</sub> = 192.9 Hz, C2'), 90.6 (d, <sup>2</sup>J<sub>C-F</sub> = 34.5 Hz, C1'), 84.2 (C4'), 69.2 (d, <sup>2</sup>J<sub>C-F</sub> = 16.3 Hz, C3'), 61.6 (C5'), 52.1 (C(=O)-OCH<sub>3</sub>), 26.0 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 25.6 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 18.5 (Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 18.1 (Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), -4.6 (Si-CH<sub>3</sub>), -5.0 (Si-CH<sub>3</sub>), -5.4 (Si-CH<sub>3</sub>), -5.5 (Si-CH<sub>3</sub>).

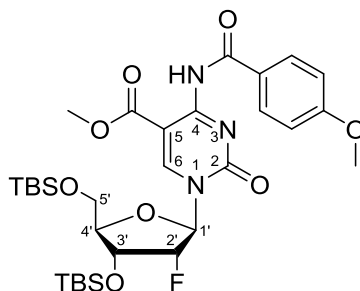
**<sup>19</sup>F-NMR (376 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm):** δ = -200.8 (dt, <sup>2</sup>J<sub>F-H</sub> = 52.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>F-H</sub> = 18.1 Hz).

**HRMS (ESI+):** ber. für C<sub>23</sub>H<sub>43</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>6</sub>Si<sub>2</sub><sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup>: 532.2669, gef.: 532.2673.

**IR (ATR):** ν (cm<sup>-1</sup>) = 3415.0 (w), 2929.9 (m), 1675.4 (s), 1472.3 (m), 1325.4 (m), 1252.0 (s),

1131 (m) 1081 (s), 985.3 (w), 840.0 (s), 779.8 (s).

#### 10.4.20 *O*<sup>3',5'</sup>-Bis(*tert*butyldimethylsilyl)-*N*<sup>4</sup>-(*para*-methoxybenzoyl)-5-(methoxycarbonyl)-2'-desoxy-2'(*R*)-fluor-cytidin (**58**)



In einem ausgeheizten Rundkolben wurden 250 mg der Verbindung **57** (470  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äq.) in 4.7 mL Pyridin (0.10 M) bei 0 °C gelöst. Anschließend wurden 92  $\mu\text{L}$  *para*-Methoxybenzoylchlorid (565  $\mu\text{mol}$ , 1.2 Äq.) tropfenweise zugefügt und die Reaktionslösung langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Nach 14 h wurde ein vollständiger Umsatz beobachtet und Eis sowie 20 mL einer ges.  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung zugegeben. Das Rohprodukt wurde mit 2x 50 mL DCM extrahiert und mit 20 mL einer ges.  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Lösung gewaschen. Die vereinten organischen Phasen wurden über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet, das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH 1:0  $\rightarrow$  50:1) wurden 304 mg der Verbindung **58** (457  $\mu\text{mol}$ , 97%) in Form eines farblosen Feststoffs erhalten.

**DC:**  $R_f = 0.58$  (DCM/MeOH 20:1).

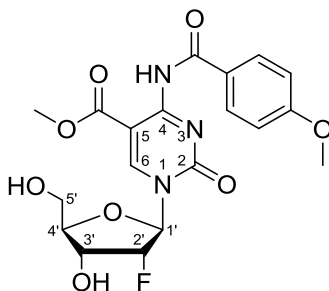
**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm):**  $\delta = 11.79$  (s, 1H, NH), 8.74 (s, 1H, 6-H), 7.99 (d,  $^3J = 8.9$  Hz, 2H, 2x O=C-C=CH), 6.99 (d,  $^3J = 8.8$  Hz, 2H, 2x CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 5.94 (dd,  $^3J_{\text{H-F}} = 16.9$  Hz,  $^3J = 1.3$  Hz, 1H, 1'-H), 5.07 (ddd,  $^2J_{\text{H-F}} = 52.2$  Hz,  $^3J = 4.1$  Hz,  $^3J = 1.5$  Hz, 1H, 2'-H), 4.24-4.16 (m, 2H, 3'-H, 4'-H), 4.06 (dd,  $^2J = 11.9$  Hz,  $^3J = 1.2$  Hz, 1H, 5'-H), 3.89 (s, 3H, Ph-OCH<sub>3</sub>), 3.88 (s, 3H, C(=O)-OCH<sub>3</sub>), 3.81 (dd,  $^2J = 11.9$  Hz,  $^3J = 3.1$  Hz, 1H, 5'-H), 0.91 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.89 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.11 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.11 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.10 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.08 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm):**  $\delta = 165.9$  (C(=O)-OCH<sub>3</sub>), 163.4 (C4-N-C=O), 163.0 (C-O-CH<sub>3</sub>), 160.4 (C4), 153.2 (C2), 149.2 (C6), 132.8 (C4-N-(C=O)-C=CH), 130.0 (C4-N-(C=O)-C=CH), 114.1 (CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 97.0 (C5), 92.3 (d,  $^1J_{\text{C-F}} = 191.2$  Hz, C2'), 90.9 (d,  $^2J_{\text{C-F}} = 32.6$  Hz, C1'), 84.5 (C4'), 68.9 (d,  $^2J_{\text{C-F}} = 17.6$  Hz, C3'), 61.5 (C5'), 55.5 (O-CH<sub>3</sub>), 52.7 (C(=O)-OCH<sub>3</sub>), 25.9 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 25.5 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 18.4 (Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 18.0 (Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), -4.7 (Si-CH<sub>3</sub>), -5.0 (Si-

CH<sub>3</sub>), -5.4 (Si-CH<sub>3</sub>), -5.5 (Si-CH<sub>3</sub>).

<sup>19</sup>F-NMR (376 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm): δ = -200.9 (dt, <sup>2</sup>J<sub>F-H</sub> = 54.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>F-H</sub> = 19.8 Hz).

#### 10.4.21 N<sup>4</sup>-(*Para*-methoxybenzoyl)-5-(methoxycarbonyl)-2'-desoxy-2'(*R*)-fluor-cytidin (59)



In einem Polypropylengefäß wurden 260 mg der Verbindung **58** (391 µmol, 1.0 Äq.) in 559 µL EtOAc (0.07 M) gelöst, mit 158 µL Pyridin (1.95 mmol, 5.0 Äq.) sowie 147 µL HF·Pyridin (70% HF, 5.86 mmol, 15.0 Äq.) versetzt und bei Raumtemperatur gerührt. Nach 15 h wurde ein vollständiger Reaktionsumsatz beobachtet und 391 µL TMSOMe (1 mL/mmol) der entstandenen Suspension zugefügt. Nach 30 min wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und mittels säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH 10:1 → 8:1) konnten 161 mg der Verbindung **59** (368 µmol, 94%) in Form eines farblosen Feststoffs erhalten.

**DC:**  $R_f = 0.22$  (DCM/MeOH 10:1).

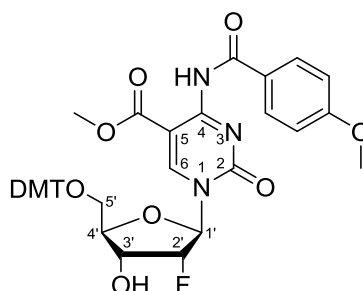
<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, ppm): δ = 11.61 (s, 1H, NH), 9.45 (s, 1H, 6-H), 7.92 (d, <sup>3</sup>J = 8.9 Hz, 2H, 2x O=C-C=CH), 7.13 (d, <sup>3</sup>J = 8.9 Hz, 2H, 2x CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 5.94 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-F</sub> = 16.4 Hz, 1H, 1'-H), 5.64 (d, <sup>3</sup>J = 6.2 Hz, 3'-OH), 5.46 (t, <sup>3</sup>J = 3.9 Hz, 5'-OH), 5.01 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>H-F</sub> = 52.7 Hz, <sup>3</sup>J = 3.7 Hz, 1H, 2'-H), 4.29-4.13 (m, 1H, 3'-H), 4.00 (d, <sup>3</sup>J = 9.3 Hz, 4'-H), 3.93 (ddd, <sup>2</sup>J = 12.2 Hz, <sup>3</sup>J = 4.0 Hz, <sup>3</sup>J = 2.3 Hz, 1H, 5'-H), 3.85 (s, 3H, Ph-OCH<sub>3</sub>), 3.76 (s, 3H, C(=O)-OCH<sub>3</sub>), 3.66 (ddd, <sup>2</sup>J = 12.3 Hz, <sup>3</sup>J = 3.6 Hz, <sup>3</sup>J = 1.8 Hz, 1H, 5'-H).

<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, ppm): δ = 165.6 (C(=O)-OCH<sub>3</sub>), 163.3 (C4-N-C=O), 163.0 (C-O-CH<sub>3</sub>), 160.4 (C4), 153.1 (C2), 149.8 (C6), 129.8 (C4-N-(C=O)-C=CH), 125.5 (C4-N-(C=O)-C=CH), 114.3 (CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 98.5 (C5), 93.9 (d, <sup>1</sup>J<sub>C-F</sub> = 192.3 Hz, C2'), 88.9 (d, <sup>2</sup>J<sub>C-F</sub> = 31.7 Hz, C1'), 82.9 (C4'), 66.1 (d, <sup>2</sup>J<sub>C-F</sub> = 16.2 Hz, C3'), 57.8 (C5'), 55.6 (O-CH<sub>3</sub>), 52.4 (C(=O)-OCH<sub>3</sub>).

<sup>19</sup>F-NMR (376 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm): δ = -201.9 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>F-H</sub> = 52.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>F-H</sub> = 27.1 Hz, <sup>3</sup>J<sub>F-H</sub> = 16.3 Hz).

**HRMS (ESI+):** ber. für  $C_{19}H_{21}FN_3O_8^+$   $[M+H]^+$ : 438.1307, gef.: 438.1306.

#### 10.4.22 *O*<sup>5'</sup>-Dimethoxytrityl-*N*<sup>4</sup>-(*para*-methoxybenzoyl)-5-(methoxycarbonyl)-2'-desoxy-2'(*R*)-fluor-cytidin (**137**)



In einem ausgeheiztem Rundkolben wurden 110 mg der Verbindung **59** (251  $\mu$ mol, 1.0 Äq.) in 1.70 mL Pyridin (0.15 M) gelöst, mit 3 Å Molsieb, 70  $\mu$ L Triethylamin (502  $\mu$ mol, 2.0 Äq.) und 170 mg DMT-Cl (502  $\mu$ mol, 2.0 Äq.) versetzt und für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden mittels Zugabe von 5 mL MeOH unreaktierte DMT-Spezies für 5 min verethert. Nachfolgend wurden 25 mL einer ges.  $NaHCO_3$ -Lösung zugegeben, die wässrige Phase mit 2x 25 mL DCM extrahiert, mit 25 mL einer ges.  $NH_4Cl$ -Lösung gewaschen und die vereinigten organischen Phasen über  $MgSO_4$  getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo*, Coevaporieren mit 100 mL Toluol und säulenchromatographischer Aufreinigung (passiviertes Silica, DCM/MeOH 1:0  $\rightarrow$  80:1  $\rightarrow$  40:1 (je + 0.5% Pyridin)) und Coevaporieren mit 50 mL Toluol wurden 176 mg der Verbindung **137** (238  $\mu$ mol, 95%) in Form eines farblosen Feststoffs erhalten.

**DC:**  $R_f = 0.59$  (DCM/MeOH 10:1).

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm):**  $\delta = 11.88$  (s, 1H, NH), 9.15 (s, 1H, 6-H), 7.94 (d, <sup>3</sup> $J = 9.3$  Hz, 2H, 2x O=C-C=CH=CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 7.44 (dd, <sup>3</sup> $J = 7.4$  Hz, <sup>4</sup> $J = 1.3$  Hz, 2H, 2x CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH=CH=CH), 7.38-7.16 (m, 7H, 4x CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH=CH=C-O-CH<sub>3</sub>, 2x CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH=CH=CH, CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH=CH=CH), 6.96 (d, <sup>3</sup> $J = 8.6$  Hz, 2H, O=C-C=CH=CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 6.82 (d, <sup>3</sup> $J = 9.0$  Hz, 2H, 2x CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH=CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 6.79 (d, <sup>3</sup> $J = 9.0$  Hz, 2H, 2x CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH=CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 6.03 (d, <sup>3</sup> $J_{H-F} = 17.0$  Hz, 1H, 1'-H), 4.28 (dd, <sup>2</sup> $J_{H-F} = 51.1$  Hz, <sup>3</sup> $J = 4.3$  Hz, 1H, 2'-H), 4.64 (ddd, <sup>3</sup> $J_{H-F} = 24.4$  Hz, <sup>3</sup> $J = 9.1$  Hz, <sup>3</sup> $J = 4.3$  Hz, 1H, 3'-H), 4.24 (d, <sup>3</sup> $J = 9.3$  Hz, 1H, 4'-H), 3.90-3.71 (m, 13H, O=C-C=CH=CH=C-O-CH<sub>3</sub>, C(=O)-OCH<sub>3</sub>, 2x CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH=CH=C-O-CH<sub>3</sub>, 5'-H), 3.64 (d, <sup>2</sup> $J = 11.1$  Hz, 1H, 5'-H), 3.30 (dd, <sup>2</sup> $J = 11.4$  Hz, <sup>3</sup> $J = 2.3$  Hz,



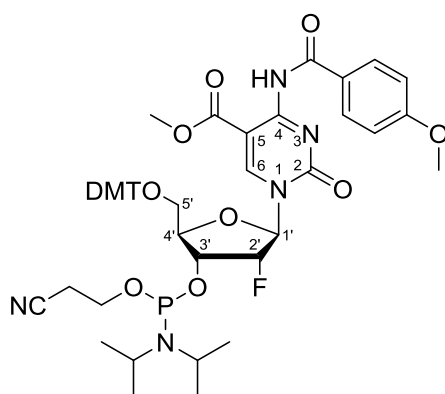
<sup>1</sup>H, 5'-H).

<sup>13</sup>C-NMR (201 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm): δ = 174.0 (C(=O)-OCH<sub>3</sub>), 164.7 (C(=O)-OCH<sub>3</sub>), 162.4 (C4-N-C(=O)-C=CH=CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 159.4 (C4), 157.6 (2x CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH=CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 152.4 (C2), 147.8 (C6), 143.4 (CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH=CH=CH), 134.5 (CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH=CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 134.3 (CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH=CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 129.0 (2x C4-N-(C=O)-C=CH), 128.9 (2x CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH=CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 128.8 (2x CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH=CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 128.1 (C4-N-(C=O)-C=CH), 126.9 (2x CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH=CH=CH), 126.7 (2x CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH=CH=CH), 125.9 (CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH=CH=CH), 113.2 (2x C4-N-C(=O)-C=CH=CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 112.1 (4x CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH=CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 96.2 (C5), 92.5 (d, <sup>1</sup>J<sub>C-F</sub> = 196.1 Hz, C2'), 88.9 (d, <sup>2</sup>J<sub>C-F</sub> = 33.2 Hz, C1'), 85.2 (CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH=CH=CH), 81.4 (C4'), 66.8 (d, <sup>2</sup>J<sub>C-F</sub> = 13.3 Hz, C3'), 59.2 (C5'), 54.4 (C4-N-C(=O)-C=CH=CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 54.2 (2x CH<sub>2</sub>-O-C-C=CH=CH=C-O-CH<sub>3</sub>), 50.7 (C(=O)-OCH<sub>3</sub>).

<sup>19</sup>F-NMR (376 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm): δ = -203.2 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>F-H</sub> = 51.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>F-H</sub> = 24.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>F-H</sub> = 16.6 Hz).

HRMS (ESI<sup>+</sup>): ber. für C<sub>40</sub>H<sub>39</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>10</sub><sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup>: 740.2614, gef.: 740.2616.

#### 10.4.23 *O*<sup>3'</sup>-(Diisopropylcyanoethylphosphin)-*O*<sup>5'</sup>-dimethoxytrityl-*N*<sup>4</sup>-(*para*-methoxybenzoyl)-5-(methoxycarbonyl)-2'-desoxy-2'(*R*)-fluor-cytidin (60)



In einem ausgeheizten *Schlenk*-Rohr wurden 96 mg der Verbindung **137** (130 μmol, 1.0 Äq.) in 1.6 mL sorgfältig entgastem DCM (0.08 M) gelöst, mit 13 mg Diisopropylammoniumtetrazolid (78 μmol, 0.6 Äq.) und 54 μL 2-Cyanoethoxy-*N,N,N',N'*-tetraisopropylphosphordiamidit (170 μmol, 1.3 Äq.) versetzt und für 17 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittel im Argongas-Gegenstrom und säulenchromatographischer Aufreinigung (passiviertes Silica, entgastes Laufmittel, *i*Hex/EtOAc 1:1 → 0:1) wurden 109 mg der Verbindung **60** (116 μmol,

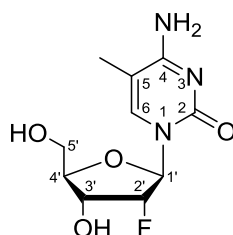
89%) als Gemisch zweier Diastereomeren in Form eines farblosen Feststoffs erhalten.

Die Verbindung wurde direkt für die DNA-Festphasensynthese verwendet. Der gelungene Einbau in DNA wies die erfolgreiche Umsetzung zum Phosphoramidit nach.

**DC:**  $R_f = 0.40$  (DCM/MeOH 20:1).

## 10.5 Vorschriften zur Synthese fluorierter Nukleoside

### 10.5.1 5-Methyl-2'-desoxy-2'(R)-fluor-cytidin (61)



In einem Polypropylengefäß wurden 1.40 g der Verbindung **44** (2.87 mmol, 1.0 Äq.) in 41 mL EtOAc (0.07 M) gelöst, mit 1.16 mL Pyridin (14.4 mmol, 5.0 Äq.) sowie 746 µL HF·Pyridin (70% HF, 28.7 mmol, 10.0 Äq.) versetzt und bei Raumtemperatur gerührt. Nach 18 h wurde ein vollständiger Reaktionsumsatz beobachtet und 2.87 mL TMSOMe (1 mL/mmol) der entstandenen Suspension zugefügt. Nach 30 min wurde die Suspension bei 6000 rpm für 15 min zentrifugiert, der Überstand dekantiert und der Rückstand in ddH<sub>2</sub>O gelöst. Nach Gefriertrocknung und Aufreinigung mittels präoperativer *reversed phase* HPLC wurden 580 mg der Verbindung **61** (2.24 mmol, 78%) in Form eines farblosen Feststoffs erhalten.

**DC:**  $R_f = 0.13$  (DCM/MeOH 5:1).

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O, ppm):**  $\delta = 7.67$  (s, 1H, 6-H), 6.00 (d,  $^3J_{\text{H-F}} = 20.9$  Hz, 1H, 1'-H), 5.14 (dd,  $^2J_{\text{H-F}} = 53.1$  Hz,  $^3J = 5.7$  Hz, 1H, 2'-H), 4.37 (ddd,  $^3J_{\text{H-F}} = 22.2$  Hz,  $^3J = 8.9$  Hz,  $^3J = 4.7$  Hz, 1H, 3'-H), 4.14 (dd,  $^3J = 12.0$  Hz,  $^3J = 3.3$  Hz, 1H, 4'-H), 4.04 (dd,  $^2J = 13.0$  Hz,  $^3J = 2.4$  Hz, 1H, 5'-H), 3.86 (dd,  $^2J = 11.9$  Hz,  $^3J = 4.5$  Hz, 1H, 5'-H), 1.97 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, D<sub>2</sub>O, ppm):**  $\delta = 166.2$  (C4), 157.0 (C2), 139.1 (C6), 104.4 (C5), 93.7 (d,  $^1J_{\text{C-F}} = 184.5$  Hz, C2'), 89.7 (d,  $^2J_{\text{C-F}} = 35.1$  Hz, C1'), 82.1 (C4'), 67.8 (d,  $^2J_{\text{C-F}} = 16.6$  Hz, C3'), 59.8 (C5'), 12.2 (CH<sub>3</sub>).

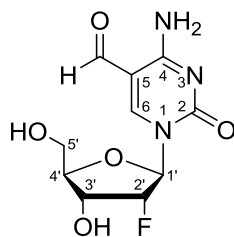
**<sup>19</sup>F-NMR (376 MHz, D<sub>2</sub>O, ppm):**  $\delta = -200.3$  (ddd,  $^2J_{\text{F-H}} = 53.2$  Hz,  $^3J_{\text{F-H}} = 22.2$  Hz,  $^3J_{\text{F-H}} = 20.1$  Hz).

**HRMS (ESI+):** ber. für C<sub>10</sub>H<sub>15</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>4</sub><sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup>: 260.1041 gef.: 260.1042.

**IR (ATR):**  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 3345.3 (w), 1650.7 (s), 1495 (m), 1436 (m), 1350 (w), 1250 (m), 1105 (m), 1068 (w), 778 (w), 651 (w).

**Schmelzbereich:** 164-165 °C (Zersetzung).

### 10.5.2 5-Formyl-2'-desoxy-2'(R)-fluor-cytidin (**62**)



In einem Polypropylengefäß wurden 704 mg der Verbindung **53** (1.40 mmol, 1.0 Äq.) in 20 mL EtOAc (0.07 M) gelöst, mit 565 µL Pyridin (7.00 mmol, 5.0 Äq.) sowie 364 µL HF·Pyridin (70% HF, 14.0 mmol, 10.0 Äq.) versetzt und bei Raumtemperatur gerührt. Nach 20 h wurde ein vollständiger Reaktionsumsatz beobachtet und 1.40 mL TMSOMe (1 mL/mmol) der entstandenen Suspension zugefügt. Nach 30 min wurde die Suspension bei 6000 rpm für 15 min zentrifugiert, der Überstand dekantiert und der Rückstand in ddH<sub>2</sub>O gelöst. Nach Gefriertrocknung und Aufreinigung mittels präoperativer *reversed phase* HPLC wurden 380 mg der Verbindung **62** (1.39 mmol, 98%) in Form eines farblosen Feststoffs erhalten.

**DC:**  $R_f = 0.13$  (DCM/MeOH 5:1).

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O, ppm):**  $\delta = 9.51$  (s, 1H, C(=O)-H), 8.88 (s, 1H, 6-H), 6.07 (d,  $^3J_{\text{H-F}} = 17.7$  Hz, 1H, 1'-H), 5.19 (dd,  $^2J_{\text{H-F}} = 52.4$  Hz,  $^3J = 4.3$  Hz, 1H, 2'-H), 4.37 (ddd,  $^3J_{\text{H-F}} = 24.1$  Hz,  $^3J = 9.3$  Hz,  $^3J = 4.3$  Hz, 1H, 3'-H), 4.27-4.19 (m, 1H, 4'-H), 4.13 (dd,  $^2J = 13.2$  Hz,  $^3J = 2.3$  Hz, 1H, 5'-H), 3.91 (dd,  $^2J = 13.2$  Hz,  $^3J = 3.5$  Hz, 1H, 5'-H).

**<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, D<sub>2</sub>O, ppm):**  $\delta = 190.2$  (C(=O)-H), 162.8 (C4), 155.0 (C2), 154.9 (C6), 105.9 (C5), 93.7 (d,  $^1J_{\text{C-F}} = 185.2$  Hz, C2'), 89.9 (d,  $^2J_{\text{C-F}} = 34.9$  Hz, C1'), 82.4 (C4'), 67.2 (d,  $^2J_{\text{C-F}} = 16.8$  Hz, C3'), 59.1 (C5').

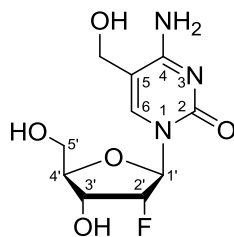
**<sup>19</sup>F-NMR (376 MHz, D<sub>2</sub>O, ppm):**  $\delta = -201.6$  (ddd,  $^2J_{\text{F-H}} = 52.4$  Hz,  $^3J_{\text{F-H}} = 24.3$  Hz,  $^3J_{\text{F-H}} = 17.8$  Hz).

**HRMS (ESI+):** ber. für C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>5</sub><sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup>: 274.0834 gef.: 274.0835.

**IR (ATR):**  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 3412 (w), 3314 (w), 1638 (s), 1597 (s), 1419 (m), 1236 (m), 1096 (s), 1062 (s), 987 (m), 947 (m), 789 (s), 763 (m).

**Schmelzbereich:** 168-169 °C (Zersetzung).

### 10.5.3 5-Hydroxymethyl-2'-desoxy-2'(R)-fluor-cytidin (**63**)



#### Methode 1:

In einem Rundkolben wurden 25 mg der Verbindung **62** (91  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äq.) in 4 mL MeOH (0.023 M) gelöst und mit 102 mg  $\text{CeCl}_3 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  (274  $\mu\text{mol}$ , 3.0 Äq.) versetzt. Nach vollständigen Lösen des Reagenzes wurden langsam 3.4 mg  $\text{NaBH}_4$  (91  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äq.) zugefügt und für 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach vollständigem Umsatz erfolgte die Zugabe von 1 mL einer 1 M  $\text{HNEt}_3\text{OAc}$ -Lösung. Das anschließende Entfernen des Lösungsmittel *in vacuo* und Aufreinigung mittels präoperativer *reversed phase* HPLC resultierte in 24 mg der Verbindung **63** (87  $\mu\text{mol}$ , 96%) in Form eines farblosen Feststoffs.

#### Methode 2:

In einem Polypropylengefäß wurden 1.00 g der Verbindung **53** (1.98 mmol, 1.0 Äq.) in 28 mL EtOAc (0.07 M) gelöst, mit 799  $\mu\text{L}$  Pyridin (9.90 mmol, 5.0 Äq.) sowie 515  $\mu\text{L}$  HF·Pyridin (70% HF, 19.8 mmol, 10.0 Äq.) versetzt und bei Raumtemperatur gerührt. Nach 24 h wurde ein vollständiger Reaktionsumsatz beobachtet und 1.98 mL TMSOMe (1 mL/mmol) der entstandenen Suspension zugefügt. Nach Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo*, säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH 5:1  $\rightarrow$  3:1) sowie eine weitere Aufreinigung mittels präoperativer *reversed phase* HPLC wurden 336 mg der Verbindung **63** (1.22 mmol, 62%) in Form eines farblosen Feststoffs erhalten.

**DC:**  $R_f = 0.13$  (DCM/MeOH 5:1).

**$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , ppm):**  $\delta = 7.94$  (s, 1H, 6-H), 6.01 (d,  $^3J_{\text{H-F}} = 19.2$  Hz, 1H, 1'-H), 5.16 (dd,  $^2J_{\text{H-F}} = 52.9$  Hz,  $^3J = 4.6$  Hz, 1H, 2'-H), 4.45 (s, 2H, C5'-CH<sub>2</sub>), 4.37 (ddd,  $^3J_{\text{H-F}} = 22.8$  Hz,  $^3J = 9.0$  Hz,  $^3J = 4.6$  Hz, 1H, 3'-H), 4.16 (dd,  $^3J = 8.9$  Hz,  $^3J = 3.0$  Hz, 1H, 4'-H), 4.06 (dd,  $^2J = 13.0$  Hz,  $^3J = 2.3$  Hz, 1H, 5'-H), 3.87 (dd,  $^2J = 13.1$  Hz,  $^3J = 4.1$  Hz, 1H, 5'-H).

**$^{13}\text{C-NMR}$  (101 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , ppm):**  $\delta = 165.3$  (C4), 156.9 (C2), 140.9 (C6), 106.5 (C5), 93.7 (d,  $^1J_{\text{C-F}} = 184.6$  Hz, C2'), 89.8 (d,  $^2J_{\text{C-F}} = 35.1$  Hz, C1'), 82.1 (C4'), 67.7 (d,  $^2J_{\text{C-F}} = 16.9$  Hz, C3'), 59.6

(C5'), 57.7 (C5'-CH<sub>2</sub>).

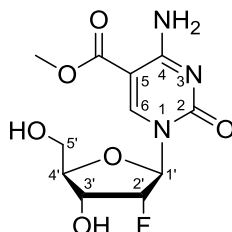
**<sup>19</sup>F-NMR (376 MHz, D<sub>2</sub>O, ppm):**  $\delta = -201.2$  (ddd,  $^2J_{F-H} = 52.9$  Hz,  $^3J_{F-H} = 22.8$  Hz,  $^3J_{F-H} = 19.2$  Hz).

**HRMS (ESI+):** ber. für C<sub>10</sub>H<sub>15</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>5</sub><sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup>: 276.0990 gef.: 276.0991.

**IR (ATR):**  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 3476 (w), 3339 (w), 2890 (w), 1653 (s), 1489 (m), 1464 (m), 1299 (m), 1108 (s), 1069 (s), 786 (m).

**Schmelzbereich:** 169-170 °C (Zersetzung).

### 10.5.4 5-Methoxycarbonyl-2'-desoxy-2'(R)-fluor-cytidin (138)



In einem Polypropylengefäß wurden 1.18 g der Verbindung **57** (2.21 mmol, 1.0 Äq.) in 32 mL EtOAc (0.07 M) gelöst, mit 892  $\mu$ L Pyridin (11.1 mmol, 5.0 Äq.) sowie 574  $\mu$ L HF·Pyridin (70% HF, 22.1 mmol, 10.0 Äq.) versetzt und bei Raumtemperatur gerührt. Nach 24 h wurde ein vollständiger Reaktionsumsatz beobachtet und 2.21 mL TMSOMe (1 mL/mmol) der entstandenen Suspension zugefügt. Nach 30 min wurde die Suspension bei 6000 rpm für 15 min zentrifugiert, der Überstand dekantiert und der Rückstand in ddH<sub>2</sub>O gelöst. Nach Gefriertrocknung wurden 600 mg der Verbindung **138** (1.90 mmol, 86%) in Form eines leicht gelblichen Feststoffs erhalten.

**DC:**  $R_f = 0.33$  (DCM/MeOH 10:1).

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, ppm):**  $\delta = 9.18$  (s, 1H, 6-H), 8.03 (s, 1H, NH<sub>2</sub>), 7.70 (s, 1H, NH<sub>2</sub>), 5.90 (dd,  $^3J_{H-F} = 17.1$  Hz,  $^3J = 5.1$  Hz, 1H, 1'-H), 5.56 (s, 1H, 3'-OH), 5.33 (s, 1H, 5'-OH), 4.93 (dd,  $^2J_{H-F} = 52.9$  Hz,  $^3J = 4.2$  Hz, 1H, 2'-H), 4.22-4.08 (m, 1H, 3'-H), 4.98-4.82 (m, 2H, 4'-H, 5'-H), 3.81 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.61 (d,  $^2J = 11.9$  Hz, 1H, 5'-H).

**<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, ppm):**  $\delta = 165.2$  (C(=O)-OH), 163.1 (C4), 153.0 (C2), 148.3 (C6), 94.8 (C5), 91.6 (d,  $^1J_{C-F} = 188.4$  Hz, C2'), 88.4 (d,  $^2J_{C-F} = 33.8$  Hz, C1'), 82.7 (C4'), 66.3 (d,  $^2J_{C-F} = 17.2$  Hz, C3'), 58.1 (C5'), 51.7 (OCH<sub>3</sub>).

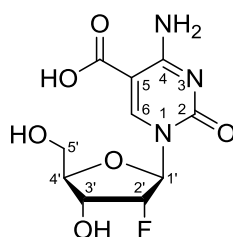
**<sup>19</sup>F-NMR (376 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, ppm):**  $\delta = -196.6$  (ddd,  $^2J_{F-H} = 53.4$  Hz,  $^3J_{F-H} = 26.7$  Hz,  $^3J_{F-H} = 17.2$  Hz).

**HRMS (ESI+):** ber. für  $C_{11}H_{15}FN_3O_6^+$   $[M+H]^+$ : 304.0939, gef.: 304.0946.

**IR (ATR):**  $\nu$  ( $cm^{-1}$ ) = 3403 (w), 3302 (w), 1715 (s), 1650 (s), 1583 (m), 1417 (m), 1329 (m), 1074 (s), 798 (m).

**Schmelzbereich:** 202-204 °C (Zersetzung).

### 10.5.5 5-Carboxy-2'-desoxy-2'(R)-fluor-cytidin (64)



In einem Rundkolben wurden 600 mg der Verbindung **138** (1.90 mmol, 1.0 Äq.) in 190 mL eines Gemisches aus  $ddH_2O/MeCN$  (1:1, 0.01 M) gelöst und mit 550 mg LiOH (22.8 mmol, 12.0 Äq.) versetzt. Nach 16 h bei Raumtemperatur wurde die Reaktionslösung auf pH = 4 mit 2 N HCl eingestellt. Nach Entfernen des Lösungsmittel *in vacuo* und Aufreinigung mittels präoperativer *reversed phase* HPLC wurden 351 mg der Verbindung **64** (1.22 mmol, 64%) in Form eines farblosen Feststoffs erhalten.

**DC:**  $R_f$  = 0.06 (DCM/MeOH 5:1).

**$^1H$ -NMR (400 MHz,  $D_2O$ , ppm):**  $\delta$  = 8.55 (s, 1H, 6-H), 6.05 (d,  $^3J_{H-F}$  = 19.0 Hz, 1H, 1'-H), 5.17 (dd,  $^2J_{H-F}$  = 52.7 Hz,  $^3J$  = 4.6 Hz, 1H, 2'-H), 4.38 (ddd,  $^3J_{H-F}$  = 22.8 Hz,  $^3J$  = 9.0 Hz,  $^3J$  = 4.6 Hz, 1H, 3'-H), 4.25-4.11 (m, 1H, 4'-H), 4.06 (dd,  $^2J$  = 13.0 Hz,  $^3J$  = 2.3 Hz, 1H, 5'-H), 3.88 (dd,  $^2J$  = 11.9 Hz,  $^3J$  = 4.5 Hz, 1H, 5'-H).

**$^{13}C$ -NMR (101 MHz,  $D_2O$ , ppm):**  $\delta$  = 170.3 (C(=O)-OH), 164.6 (C4), 155.6 (C2), 146.9 (C6), 102.9 (C5), 91.6 (d,  $^1J_{C-F}$  = 188.4 Hz, C2'), 89.9 (d,  $^2J_{C-F}$  = 35.3 Hz, C1'), 82.3 (C4'), 67.8 (d,  $^2J_{C-F}$  = 16.8 Hz, C3'), 59.7 (C5').

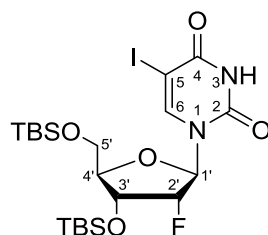
**$^{19}F$ -NMR (376 MHz,  $D_2O$ , ppm):**  $\delta$  = -200.8 (ddd,  $^2J_{F-H}$  = 52.8 Hz,  $^3J_{F-H}$  = 22.8 Hz,  $^3J_{F-H}$  = 19.2 Hz).

**HRMS (ESI+):** ber. für  $C_{10}H_{13}FN_3O_6^+$   $[M+H]^+$ : 290.0783 gef.: 290.0785.

**IR (ATR):**  $\nu$  ( $cm^{-1}$ ) = 3248 (w), 1650 (s), 1559 (m), 1066 (m), 815 (w), 681 (w).

**Schmelzbereich:** 125-127 °C.

### 10.5.6 *O*<sup>3',5'</sup>-bis(*Tert*butyldimethylsilyl)-5-iod-2'-desoxy-2'(R)-fluor-uridin (**66**)



In einem ausgeheizten Rundkolben wurden 10.0 g (40.6 mmol, 1.0 Äq.) 2'-Desoxy-2'(R)-fluor-uridin, 6.20 g Iod (24.4 mmol, 0.6 Äq.) und 10.6 g *m*CPBA (70%, 42.7 mmol, 1.05 Äq.) in 112 mL DMF (0.36 M) gelöst und für 17 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel entfernt und nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH 10:1 → 5:1 (+ jeweils 1% NEt<sub>3</sub>)) wurden ein Gemisch aus hauptsächlich F-IdU sowie nicht abtrennbaren Verbindungen erhalten. Nachfolgend wurde dieses Gemisch zusammen mit 18.4 g TBS-Cl (122 mmol, 3.0 Äq.) und 12.5 g Imidazol (184 mmol, 4.5 Äq.) in 76.8 mL eines Gemisches aus Pyridin/DMF (3:2, 0.53 M) bei 0 °C gelöst. Die Reaktionslösung wurde langsam auf Raumtemperatur erwärmt und anschließend für 19 h gerührt. Nach vollständigem Umsatz erfolgte die Zugabe von Eis sowie von 250 mL einer ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung. Das Rohprodukt wurde mit 3x 150 mL EtOAc extrahiert, die organischen Phasen mit 200 mL einer ges. NH<sub>4</sub>Cl-Lösung gewaschen und über Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* und säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH 100:1 → 20:1) wurden 10.3g **43** (17.1 mmol, 42% über zwei Stufen) in Form einer sehr viskosen, farblosen Flüssigkeit erhalten.

**DC:**  $R_f = 0.60$  (DCM/MeOH 10:1).

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm):**  $\delta = 8.84$  (s, 1H, NH), 7.98 (s, 1H, 6-H), 6.09 (dd, <sup>3</sup> $J_{\text{H-F}} = 14.2$  Hz, <sup>3</sup> $J = 4.2$  Hz, 1H, 1'-H), 4.81 (dt, <sup>2</sup> $J_{\text{H-F}} = 52.7$  Hz, <sup>3</sup> $J = 4.4$  Hz, 1H, 2'-H), 4.28 (dt, <sup>3</sup> $J_{\text{H-F}} = 11.7$  Hz, <sup>3</sup> $J = 9.5$  Hz, 1H, 3'-H), 4.08 (dd, <sup>3</sup> $J = 4.5$  Hz, <sup>3</sup> $J = 1.5$  Hz, 1H, 4'-H), 3.98 (dd, <sup>2</sup> $J = 12.1$  Hz, <sup>3</sup> $J = 1.3$  Hz, 1H, 5'-H), 3.77 (dd, <sup>2</sup> $J = 12.1$  Hz, <sup>3</sup> $J = 2.2$  Hz, 1H, 5'-H), 0.96 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.91 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.17 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.12 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.11 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.10 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm):**  $\delta = 159.7$  (C4), 149.6 (C2), 143.9 (C6), 92.3 (d, <sup>1</sup> $J_{\text{C-F}} = 196.5$  Hz, C2'), 87.4 (d, <sup>2</sup> $J_{\text{C-F}} = 31.6$  Hz, C1'), 85.2 (C4'), 69.7 (d, <sup>2</sup> $J_{\text{C-F}} = 15.5$  Hz, C3'), 69.1 (C5'), 61.7 (C5), 26.3 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 25.6 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 18.7 (Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 18.2 (Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), -4.4 (Si-CH<sub>3</sub>), -4.7 (Si-CH<sub>3</sub>), -5.0 (Si-CH<sub>3</sub>), -5.1 (Si-CH<sub>3</sub>).

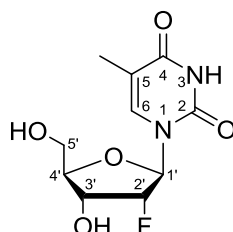
**<sup>19</sup>F-NMR (282 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm):**  $\delta = -205.5$  (dt, <sup>2</sup> $J_{\text{F-H}} = 52.7$  Hz, <sup>3</sup> $J_{\text{F-H}} = 13.1$  Hz).

**HRMS (ESI<sup>-</sup>):** ber. für C<sub>21</sub>H<sub>37</sub>FIN<sub>2</sub>O<sub>5</sub>Si<sub>2</sub><sup>-</sup> [M-H]<sup>-</sup>: 599.1275, gef.: 599.1269.



**IR (ATR):**  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 2951 (m), 2927 (m), 2884 (w), 1691 (m), 1604 (w), 1470 (s), 1360 (m), 1321 (m), 1252 (m), 1224 (s), 1127 (s), 1023 (m), 979 (s), 888 (m), 828 (m), 776 (m).

### 10.5.7 2'-Desoxy-2'(R)-fluor-thymidin (67)



In einem ausgeheizten Rundkolben wurden 400 mg der Verbindung **66** (666  $\mu$ mol, 1.0 Äq.) in 13.3 mL HMDS (0.05 M) gelöst, mit 3.3 mg Diammoniumsulfat versetzt und anschließend für 3 h bis zum vollständigen Reaktionsumsatz unter Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wurde nachfolgend *in vacuo* entfernt, Lösungsmittelrückstände mit 100 mL Toluol coevaporiert und der Rückstand für 20 min am Hochvakuum getrocknet. Dieser wurde in 26.6 mL THF (0.025 M) gelöst, mit 6 mg PdCl<sub>2</sub> (33  $\mu$ mol, 0.05 Äq.) und 17 mg Triphenylphosphin (66  $\mu$ mol, 0.1 Äq.) versetzt und für 10 min unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wurden langsam 666  $\mu$ L AlMe<sub>3</sub> (1.33 mmol, 2 Äq., 2 M in Hexan) zugetropft. Nach 20 h wurde ein vollständiger Umsatz beobachtet und der Reaktionslösung langsam 20 mL Wasser zugegeben. Das Rohprodukt wurde mit 2x 30 mL EtOAc extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit 30 mL einer ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gewaschen und über Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sowie im Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wurde in ein Polypropylengefäß überführt, in 900  $\mu$ L EtOAc (0.07 M) gelöst, mit 269 mL Pyridin (3.33 mmol, 5.0 Äq.) sowie 251  $\mu$ L HF·Pyridin (70% HF, 999 mmol, 15.0 Äq.) versetzt und bei Raumtemperatur gerührt. Nach 17 h wurde ein vollständiger Reaktionsumsatz beobachtet und 666  $\mu$ L TMSOMe (1 mL/mmol) zugefügt. Nach 30 min wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und mittels säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH 10:1  $\rightarrow$  5:1) wurden 140 mg der Verbindung **67** (538  $\mu$ mol, 81%) in Form eines farblosen Feststoffs erhalten.

**DC:**  $R_f$  = 0.19 (DCM/MeOH 10:1).

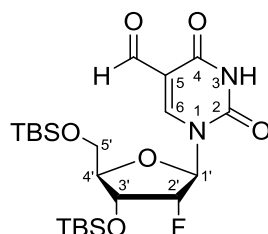
**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O, ppm):**  $\delta$  = 7.54 (d, <sup>4</sup> $J$  = 1.2 Hz, 1H, 6-H), 5.87 (dd, <sup>3</sup> $J_{\text{H-F}}$  = 19.9 Hz, <sup>3</sup> $J$  = 1.5 Hz, 1H, 1'-H), 5.07 (ddd, <sup>2</sup> $J_{\text{H-F}}$  = 52.9 Hz, <sup>3</sup> $J$  = 4.8 Hz, <sup>3</sup> $J$  = 1.5 Hz, 1H, 2'-H), 4.28 (ddd, <sup>3</sup> $J_{\text{H-F}}$  = 21.2 Hz, <sup>3</sup> $J$  = 8.7 Hz, <sup>3</sup> $J$  = 4.9 Hz, 1H, 3'-H), 4.01-3.96 (m, 1H, 4'-H), 3.89 (dd, <sup>2</sup> $J$  = 13.0 Hz, <sup>3</sup> $J$  = 2.5 Hz, 1H, 5'-H), 3.71 (dd, <sup>2</sup> $J$  = 13.0 Hz, <sup>3</sup> $J$  = 4.2 Hz, 1H, 5'-H), 1.75 (d, <sup>4</sup> $J$  = 1.2 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>).

**$^{13}\text{C}$ -NMR (101 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , ppm):**  $\delta = 166.6$  (C4), 151.3 (C2), 138.0 (C6), 111.1 (C5), 93.2 (d,  $^1J_{\text{C-F}} = 184.8$  Hz, C2'), 89.1 (d,  $^2J_{\text{C-F}} = 35.5$  Hz, C1'), 82.2 (C4'), 67.8 (d,  $^2J_{\text{C-F}} = 16.6$  Hz, C3'), 59.6 (C5'), 11.4 ( $\text{CH}_3$ ).

**$^{19}\text{F}$ -NMR (376 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , ppm):**  $\delta = -200.8$  (dt,  $^2J_{\text{F-H}} = 52.8$  Hz,  $^3J_{\text{F-H}} = 20.5$  Hz).

**HRMS (ESI+):** ber. für  $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{FN}_2\text{O}_5^+$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 261.0881 gef.: 261.0881.

### 10.5.8 *O*<sup>3',5'</sup>-bis(*Tert*butyldimethylsilyl)-5-formyl-2'-desoxy-2'(*R*)-fluor-uridin (139)



In einem Hochdruckautoklaven wurden 3.62 g der Verbindung **66** (6.02 mmol, 1.0 Äq.) zusammen mit 948 mg Triphenylphosphin (3.61 mmol, 0.6 Äq.) und 624 mg  $\text{Pd}_2(\text{dba})\cdot\text{CHCl}_3$  (600  $\mu\text{mol}$ , 0.1 Äq.) vorgelegt. Das Reaktionsgefäß wurde zur Dichtigkeitsprüfung einmalig mit Kohlenstoffmonoxid mit einem Gasdruck von 3.5 bar für 15 min befüllt. Nach bestandem Drucktest wurde der Hochdruckautoklav belüftet, 90 mL Toluol (0.067 M) zugefügt, der Hochdruckautoklav zweimal mit Kohlenstoffmonoxid gespült und schließlich mit Kohlenstoffmonoxid mit einem Gasdruck von 3.5 bar befüllt. Nachfolgend wurde die Suspension auf 60 °C erhitzt und mit 2.02 mL  $\text{Bu}_3\text{SnH}$  (7.21 mmol, 1.2 Äq.) mit einer Flussrate von 0.15 mL/h versetzt. Nach Abschluss der  $\text{Bu}_3\text{SnH}$ -Zugabe wurde für weitere 4 h gerührt. Nach Belüften des Reaktionsgefäßes, Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* und säulenchromatographischer Aufreinigung (*dryload*, *i*Hex/EtOAc 4:1  $\rightarrow$  1:1) wurden 2.00 g der Verbindung **139** (3.98 mmol, 66%) in Form eines farblosen Feststoffs erhalten.

**DC:**  $R_f = 0.62$  (*i*Hex/EtOAc 1:1).

**$^1\text{H}$ -NMR (599 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm):**  $\delta = 10.01$  (s, 1H, C(=O)-H), 9.07 (s, 1H, NH), 8.42 (s, 1H, 6-H), 6.12 (dd,  $^3J_{\text{H-F}} = 14.0$  Hz,  $^3J = 3.9$  Hz, 1H, 1'-H), 4.89 (dt,  $^2J_{\text{H-F}} = 52.5$  Hz,  $^3J = 4.3$  Hz, 1H, 2'-H), 4.32 (dt,  $^3J_{\text{H-F}} = 11.5$  Hz,  $^3J = 4.9$  Hz, 1H, 3'-H), 4.13 (dd,  $^3J = 4.9$  Hz,  $^3J = 2.1$  Hz, 1H, 4'-H), 3.99 (dd,  $^2J = 11.8$  Hz,  $^3J = 2.0$  Hz, 1H, 5'-H), 3.78 (dd,  $^2J = 11.8$  Hz,  $^3J = 2.5$  Hz, 1H, 5'-H), 0.93

(s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.91 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.15 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.15 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.13 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.11 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm):** δ = 185.4 (C(=O)-H), 161.5 (C4), 149.0 (C2), 145.1 (C6), 111.6 (C5), 92.5 (d, <sup>1</sup>J<sub>C-F</sub> = 196.3 Hz, C2'), 88.3 (d, <sup>2</sup>J<sub>C-F</sub> = 33.4 Hz, C1'), 85.7 (C4'), 69.8 (d, <sup>2</sup>J<sub>C-F</sub> = 15.3 Hz, C3'), 61.7 (C5'), 26.0 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 25.6 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 18.5 (Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 18.1 (Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), -4.7 (Si-CH<sub>3</sub>), -5.1 (Si-CH<sub>3</sub>), -5.5 (Si-CH<sub>3</sub>), -5.6 (Si-CH<sub>3</sub>).

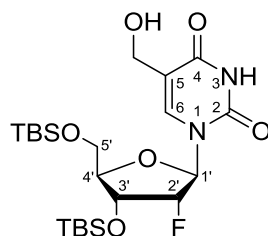
**<sup>19</sup>F-NMR (282 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm):** δ = -205.2 (dt, <sup>2</sup>J<sub>F-H</sub> = 52.9 Hz, <sup>3</sup>J<sub>F-H</sub> = 12.7 Hz).

**HRMS (ESI+):** ber. für C<sub>22</sub>H<sub>40</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>6</sub>Si<sub>2</sub><sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup>: 503.2409, gef.: 503.2405.

**IR (ATR):** ν (cm<sup>-1</sup>) = 3058 (w), 2955 (m), 2630 (m), 2858 (m), 1698 (s), 1601 (s), 1472 (s), 1378 (m), 1362 (m), 1256 (s), 1224 (w), 1166 (m), 1123 (s), 1075 (s), 998 (w), 940 (m), 838 (s), 781 (s), 673 (w).

**Schmelzbereich:** 62-63 °C.

### 10.5.9 *O*<sup>3',5'</sup>-bis(*Tert*butyldimethylsilyl)-5-hydroxymethyl-2'-desoxy-2'(*R*)-fluoruridin (**68**)



In einem Rundkolben wurden 780 mg der Verbindung **139** (1.55 mmol, 1.0 Äq.) in 75 mL MeOH (0.021 M) gelöst und mit 1.73 g CeCl<sub>3</sub>·7 H<sub>2</sub>O (4.65 mmol, 3.0 Äq.) versetzt. Nach vollständigen Lösen des Reagenzes wurden langsam 59 mg NaBH<sub>4</sub> (1.55 μmol, 1.0 Äq.) zugefügt und für 72 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach vollständigem Umsatz erfolgte die Zugabe von 250 mL einer ges. NH<sub>4</sub>Cl-Lösung beendet. Das Rohprodukt wurde zweimal mit je 125 mL EtOAc extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit 200 mL einer ges. NaCl-Lösung gewaschen und über Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* und säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH 50:1 → 10:1) wurden 743 mg der Verbindung **68** (1.47 mmol, 95%) in Form eines farblosen Feststoffs erhalten.

**DC:** R<sub>f</sub> = 0.47 (DCM/MeOH 10:1).

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm):** δ = 9.13 (s, 1H, NH), 7.60 (s, 1H, 6-H), 6.07 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H-F</sub> =

15.4 Hz,  $^3J = 3.4$  Hz, 1H, 1'-H), 4.84 (ddd,  $^2J_{\text{H-F}} = 52.7$  Hz,  $^3J = 4.7$  Hz,  $^3J = 3.4$  Hz, 1H, 2'-H), 4.41 (dd,  $^2J = 13.0$  Hz,  $^3J = 6.3$  Hz, 1H, C5'-CH<sub>2</sub>), 4.35 (dd,  $^2J = 13.0$  Hz,  $^3J = 6.3$  Hz, 1H, C5'-CH<sub>2</sub>), 4.29 (dt,  $^3J_{\text{H-F}} = 13.8$  Hz,  $^3J = 5.3$  Hz, 1H, 3'-H), 4.05 (dt,  $^3J = 5.6$  Hz,  $^3J = 1.9$  Hz, 1H, 4'-H), 3.98 (dd,  $^2J = 11.8$  Hz,  $^3J = 2.1$  Hz, 1H, 5'-H), 3.77 (dd,  $^2J = 11.8$  Hz,  $^3J = 2.5$  Hz, 1H, 5'-H), 2.98 (t,  $^3J = 6.3$  Hz, 1H, C5'-CH<sub>2</sub>-OH), 0.93 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.91 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.12 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.12 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.12 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.10 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm):**  $\delta = 163.7$  (C4), 149.9 (C2), 137.4 (C6), 114.2 (C5), 92.5 (d,  $^1J_{\text{C-F}} = 194.3$  Hz, C2'), 88.0 (d,  $^2J_{\text{C-F}} = 33.7$  Hz, C1'), 84.7 (C4'), 69.6 (d,  $^2J_{\text{C-F}} = 15.7$  Hz, C3'), 61.8 (C5'), 58.9 (C5'-CH<sub>2</sub>), 26.0 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 25.6 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 18.7 (Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 18.3 (Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), -4.5 (Si-CH<sub>3</sub>), -4.9 (Si-CH<sub>3</sub>), -5.2 (Si-CH<sub>3</sub>), -5.2 (Si-CH<sub>3</sub>).

**<sup>19</sup>F-NMR (282 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm):**  $\delta = -204.2$  (dt,  $^2J_{\text{F-H}} = 52.9$  Hz,  $^3J_{\text{F-H}} = 14.7$  Hz).

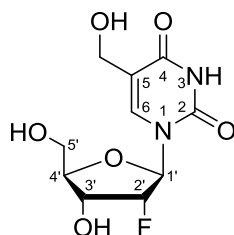
**HRMS (ESI+):** ber. für C<sub>22</sub>H<sub>41</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>6</sub>Si<sub>2</sub>Na<sup>+</sup> [M+Na]<sup>+</sup>: 527.2379, gef.: 527.2383,

(ESI-): ber. für C<sub>22</sub>H<sub>40</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>6</sub>Si<sub>2</sub><sup>-</sup> [M-H]<sup>-</sup>: 503.2414, gef.: 503.2409.

**IR (ATR):**  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 3416 (w), 3188 (w), 3061 (w), 2955 (m), 2930 (m), 2858 (m), 1686 (s), 1472 (s), 1389 (m), 1362 (m), 1255 (s), 1159 (m), 1123 (s), 1080 (s), 1006 (w), 938 (m), 836 (s), 779 (s), 671 (w), 510 (s).

**Schmelzbereich:** 51-53 °C.

### 10.5.10 5-Hydroxymethyl-2'-desoxy-2'(R)-fluor-uridin (69)



In einem Polypropylengefäß wurden 50 mg der Verbindung **68** (81  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äq.) in 1.15 mL EtOAc (0.07 M) gelöst, mit 33  $\mu\text{L}$  Pyridin (404  $\mu\text{mol}$ , 5.0 Äq.) sowie 41  $\mu\text{L}$  HF·Pyridin (70% HF, 1.62 mmol, 20.0 Äq.) versetzt und bei Raumtemperatur gerührt. Nach 15 h wurde ein vollständiger Reaktionsumsatz beobachtet und 1.62 mL TMSOMe (1 mL/mmol (HF)) der entstandenen Suspension zugefügt. Nach Entfernen des Lösungsmittels in vacuo und Aufreinigung mittels präparativer *reversed phase* HPLC wurden 11 mg der Verbindung **69** (40  $\mu\text{mol}$ , 50%) in Form eines farblosen Feststoffs erhalten.

**DC:**  $R_f = 0.47$  (DCM/MeOH 10:1).

**$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , ppm):**  $\delta = 7.89$  (s, 1H, 6-H), 5.97 (dd,  $^3J_{\text{H-F}} = 19.4$  Hz,  $^3J = 1.4$  Hz, 1H, 1'-H), 5.17 (ddd,  $^2J_{\text{H-F}} = 52.8$  Hz,  $^3J = 4.5$  Hz,  $^3J = 1.4$  Hz, 1H, 2'-H), 4.36 (ddd,  $^3J_{\text{H-F}} = 21.5$  Hz,  $^3J = 8.6$  Hz,  $^3J = 4.7$  Hz, 1H, 3'-H), 4.31 (s, 2H, C5'-CH<sub>2</sub>), 4.09 (dt,  $^3J = 8.6$  Hz,  $^3J = 3.2$  Hz, 1H, 4'-H), 3.98 (dd,  $^2J = 13.1$  Hz,  $^3J = 2.4$  Hz, 1H, 5'-H), 3.79 (dd,  $^2J = 13.0$  Hz,  $^3J = 4.0$  Hz, 1H, 5'-H).

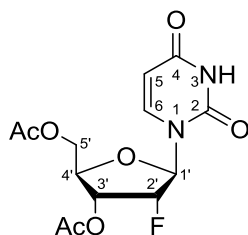
**$^{13}\text{C-NMR}$  (101 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , ppm):**  $\delta = 164.9$  (C4), 151.1 (C2), 140.0 (C6), 113.3 (C5), 93.3 (d,  $^1J_{\text{C-F}} = 189.9$  Hz, C2'), 89.3 (d,  $^2J_{\text{C-F}} = 35.4$  Hz, C1'), 82.3 (C4'), 67.6 (d,  $^2J_{\text{C-F}} = 16.2$  Hz, C3'), 59.4 (C5'), 56.4 (C5'-CH<sub>2</sub>).

**HRMS (ESI<sup>-</sup>):** ber. für  $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{FN}_2\text{O}_6^-$  [M-H]<sup>-</sup>: 275.0685, gef.: 275.0687.

## 10.6 Vorschriften zur Synthese fluorierter, isotopenmarkierter Nukleoside

Die Verbindungen **72**<sup>[215]</sup> und **77**<sup>[215]</sup> in **Schema 20** sowie **80**<sup>[216]</sup>, **75**<sup>[216]</sup>, **81**<sup>[216]</sup> und **19**<sup>[78]</sup> in **Schema 21** wurden ohne Abwandlung nach Literaturvorschriften synthetisiert. Die Charakterisierung der Verbindungen stimmte mit der beschriebenen überein.

### 10.6.1 *O*<sup>3',5'</sup>-Bis(acetyl)-2'-desoxy-2'(*R*)-fluor-uridin (**140**)



In einem ausgeheizten Rundkolben wurden 2.46 g (10.0 mmol, 1.0 Äq.) 2'-Desoxy-2'(*R*)-fluor-uridin in 63 mL Pyridin (0.16 M) gelöst, mit 2.27 mL Acetanhydrid (24.0 mmol, 2.4 Äq.) und 122 mg DMAP (1.00 mmol, 0.1 Äq.) versetzt und für 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach vollständigem Umsatz erfolgte die Zugabe von Eis sowie von 50 mL einer ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung. Das Rohprodukt wurde mit 3x 50 mL DCM extrahiert, die organischen Phasen mit 50 mL einer ges. NH<sub>4</sub>Cl-Lösung gewaschen und über Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* und Coevaporieren mit 150 mL Toluol wurden 3.12 g **140** (9.45 mmol, 95%) in Form eines farblosen Feststoffs erhalten.

**DC:** *R*<sub>f</sub> = 0.19 (DCM/MeOH 20:1).

**<sup>1</sup>H-NMR (599 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm):** δ = 8.80 (s, 1H, NH), 7.39 (d, <sup>3</sup>*J* = 8.1 Hz, 1H, 6-H), 5.79 (dd, <sup>3</sup>*J*<sub>H-F</sub> = 19.8 Hz, <sup>3</sup>*J* = 1.7 Hz, 1H, 1'-H), 5.76 (dd, <sup>3</sup>*J* = 8.1 Hz, <sup>4</sup>*J* = 2.0 Hz, 1H, 5-H), 5.37 (ddd, <sup>2</sup>*J*<sub>H-F</sub> = 52.2 Hz, <sup>3</sup>*J* = 5.0 Hz, <sup>3</sup>*J* = 1.7 Hz, 1H, 2'-H), 5.15 (ddd, <sup>3</sup>*J*<sub>H-F</sub> = 17.8 Hz, <sup>3</sup>*J* = 8.3 Hz, <sup>3</sup>*J* = 4.9 Hz, 1H, 3'-H), 4.45 (dd, <sup>2</sup>*J* = 12.4 Hz, <sup>3</sup>*J* = 2.6 Hz, 1H, 5'-H), 4.41 (ddd, <sup>3</sup>*J* = 8.1 Hz, <sup>3</sup>*J* = 4.6 Hz, <sup>3</sup>*J* = 2.7 Hz, 1H, 4'-H), 4.30 (dd, <sup>2</sup>*J* = 12.4 Hz, <sup>3</sup>*J* = 4.6 Hz, 1H, 5'-H), 2.16 (s, 3H, C3'-O-C(=O)-CH<sub>3</sub>), 2.11 (s, 3H, C5'-O-C(=O)-CH<sub>3</sub>).

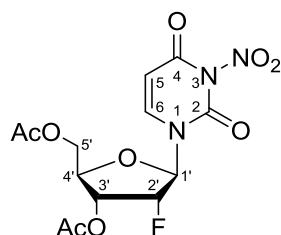
**<sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm):** δ = 170.3 (C5'-O-C(=O)-CH<sub>3</sub>), 169.9 (C3'-O-C(=O)-CH<sub>3</sub>), 162.7 (C4), 149.7 (C2), 140.7 (C6), 103.1 (C5), 91.5 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>C-F</sub> = 35.5 Hz, C1'), 91.0 (d, <sup>1</sup>*J*<sub>C-F</sub> = 192.9 Hz, C2'), 78.8 (C4'), 69.8 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>C-F</sub> = 15.5 Hz, C3'), 62.4 (C5'), 20.9 (C5'-O-C(=O)-CH<sub>3</sub>), 20.5 (C3'-O-C(=O)-CH<sub>3</sub>).

**<sup>19</sup>F-NMR (376 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm):** δ = -199.0 (ddd, <sup>2</sup>*J*<sub>F-H</sub> = 52.2 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>F-H</sub> = 19.7 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>F-H</sub> = 17.8 Hz).

**HRMS (ESI+):** ber. für  $C_{13}H_{16}FN_2O_7^+$   $[M+H]^+$ : 331.0936, gef.: 331.0942.

**Schmelzbereich:** 173-175 °C.

### 10.6.2 *O*<sup>3',5'</sup>-Bis(acetyl)-*N*<sup>3</sup>-nitryl-2'-desoxy-2'(*R*)-fluor-uridin (**83**)



In einem ausgeheiztem Rundkolben wurde zu einer Lösung aus 800 mg (10.0 mmol, 2.0 Äq.) feingemörsertem Ammoniumnitrat in 25 mL DCM (0.2 M) bei 0 °C langsam mit 2.80 mL Trifluoressigsäureanhydrid (20.0 mmol, 4.0 Äq.) versetzt und bei Raumtemperatur für 2 h gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung auf 0 °C gekühlt, 1.65 g der Verbindung **140** (5.00 mmol, 1.0 Äq.) zugegeben und für 3 h gerührt. Nach vollständigem Umsatz wurde die Reaktionslösung auf Raumtemperatur erwärmt, mit 30 mL eines PBS-Puffers (pH = 7.4) versetzt, das Rohprodukt mit 2x 50 mL DCM extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über  $MgSO_4$  getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* und säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH 1:0 → 50:1) wurden 840 mg **83** (2.24 mmol, 44%) in Form eines farblosen Feststoffs erhalten.

**DC:**  $R_f = 0.78$  (DCM/MeOH 20:1).

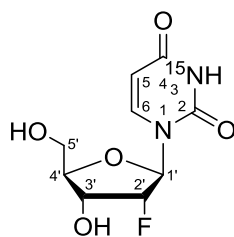
**<sup>1</sup>H-NMR (599 MHz,  $CDCl_3$ , ppm):**  $\delta = 7.47$  (d,  $^3J = 8.4$  Hz, 1H, 6-H), 5.90 (d,  $^3J = 8.4$  Hz, 1H, 5-H), 5.81 (dd,  $^3J_{H-F} = 18.7$  Hz,  $^3J = 1.7$  Hz, 1H, 1'-H), 5.42 (ddd,  $^2J_{H-F} = 51.8$  Hz,  $^3J = 4.9$  Hz,  $^3J = 1.7$  Hz, 1H, 2'-H), 5.14 (ddd,  $^3J_{H-F} = 18.0$  Hz,  $^3J = 8.2$  Hz,  $^3J = 4.9$  Hz, 1H, 3'-H), 4.46 (dd,  $^2J = 12.6$  Hz,  $^3J = 2.5$  Hz, 1H, 5'-H), 4.44 (ddd,  $^3J = 8.1$  Hz,  $^3J = 3.9$  Hz,  $^3J = 2.6$  Hz, 1H, 4'-H), 4.31 (dd,  $^2J = 12.7$  Hz,  $^3J = 4.0$  Hz, 1H, 5'-H), 2.16 (s, 3H, C3'-O-C(=O)-CH<sub>3</sub>), 2.11 (s, 3H, C5'-O-C(=O)-CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR (151 MHz,  $CDCl_3$ , ppm):**  $\delta = 170.3$  (C5'-O-C(=O)-CH<sub>3</sub>), 169.9 (C3'-O-C(=O)-CH<sub>3</sub>), 154.9 (C4), 145.1 (C2), 140.1 (C6), 102.0 (C5), 92.0 (d,  $^2J_{C-F} = 36.0$  Hz, C1'), 90.7 (d,  $^1J_{C-F} = 193.3$  Hz, C2'), 79.3 (C4'), 69.8 (d,  $^2J_{C-F} = 15.2$  Hz, C3'), 61.8 (C5'), 20.8 (C5'-O-C(=O)-CH<sub>3</sub>), 20.5 (C3'-O-C(=O)-CH<sub>3</sub>).

**<sup>19</sup>F-NMR (376 MHz,  $CDCl_3$ , ppm):**  $\delta = -199.4$  (dt,  $^2J_{F-H} = 51.7$  Hz,  $^3J_{F-H} = 18.3$  Hz).

**HRMS (ESI+):** ber. für  $C_{13}H_{18}FN_4O_9^+$   $[M+NH_4]^+$ : 393.1052, gef.: 393.1056.

### 10.6.3 2'-desoxy-2'(R)-fluor-[N<sup>3-15</sup>N<sub>2</sub>]-uridin (**84**)



In einem ausgeheizten Rundkolben wurden 750 mg (2.00 mmol, 1.0 Äq.) der Verbindung **83** in 10 mL MeCN gelöst. Daraufhin wurde eine Lösung aus 130 g Iod (2.40 mmol, 1.2 Äq.), 158 mg KOH (85%, 2.4 mmol, 1.2 Äq.), 415 mL Triethylamin (3.00 mmol, 1.5 Äq.) in 10 mL eines Gemisches aus H<sub>2</sub>O/MeCN (1:1) zugegeben und für 2.5 d bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel entfernt und nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH 20:1 → 10:1) wurde ein Gemisch aus nicht Acetyl- und einfach Acetyl-entschütztem Produkt isoliert. Dieses Gemisch wurde nachfolgend in 20 mL methanolischem Ammoniak (7 N) gelöst und für 19 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo*, säulenchromatographischer (DCM/MeOH 10:1 → 5:1) sowie präoperativer *reversed phase* HPLC-Aufreinigung wurden 287 mg <sup>15</sup>N-F-dU **84** (1.16 mmol, 58%) in Form eines farblosen Feststoffs erhalten.

**DC:**  $R_f = 0.48$  (DCM/MeOH 10:1).

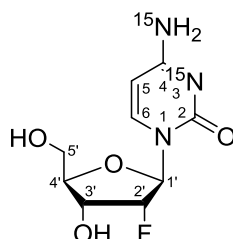
**<sup>1</sup>H-NMR (800 MHz, D<sub>2</sub>O, ppm):**  $\delta = 7.73$  (d,  $^3J = 8.1$  Hz, 1H, 6-H), 5.91 (dd,  $^3J_{\text{H-F}} = 19.8$  Hz,  $^4J = 1.4$  Hz, 1H, 1'-H), 5.78 (dd,  $^3J = 8.2$  Hz,  $^3J = 2.7$  Hz, 1H, 5-H), 5.13 (ddd,  $^2J_{\text{H-F}} = 52.9$  Hz,  $^3J = 4.9$  Hz,  $^3J = 0.7$  Hz, 1H, 2'-H), 4.29 (ddd,  $^3J_{\text{H-F}} = 21.5$  Hz,  $^3J = 8.6$  Hz,  $^3J = 4.8$  Hz, 1H, 3'-H), 4.03 (ddd,  $^3J = 8.1$  Hz,  $^3J = 4.4$  Hz,  $^3J = 2.5$  Hz, 1H, 4'-H), 3.91 (dd,  $^2J = 13.0$  Hz,  $^3J = 2.4$  Hz, 1H, 5'-H), 3.72 (dd,  $^2J = 13.0$  Hz,  $^3J = 4.5$  Hz, 1H, 5'-H).

**<sup>13</sup>C-NMR (201 MHz, D<sub>2</sub>O, ppm):**  $\delta = 162.6$  (C4), 149.9 (C2), 140.9 (C6), 103.3 (C5), 93.2 (d,  $^1J_{\text{C-F}} = 193.4$  Hz, C2'), 89.2 (d,  $^2J_{\text{C-F}} = 35.7$  Hz, C1'), 82.5 (C4'), 67.6 (d,  $^2J_{\text{C-F}} = 15.8$  Hz, C3'), 59.6 (C5').

**<sup>19</sup>F-NMR (376 MHz, D<sub>2</sub>O, ppm):**  $\delta = -200.9$  (dt,  $^2J_{\text{F-H}} = 52.7$  Hz,  $^3J_{\text{F-H}} = 20.5$  Hz).

**HRMS (ESI<sup>-</sup>):** ber. für C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>FN<sup>15</sup>NO<sub>7</sub><sup>-</sup> [M+OAc]<sup>-</sup>: 306.0761, gef.: 306.0764.



**10.6.4 2'-desoxy-2'(R)-fluor-[N<sup>3</sup>,N<sup>4</sup>-<sup>15</sup>N<sub>2</sub>]-cytidin (85)**

In einem ausgeheiztem Rundkolben wurden 247 mg <sup>15</sup>N-F-dU **84** (1.00 mmol, 1.0 Äq.) zusammen mit 452 mg TBS-Cl (3.00 mmol, 3.0 Äq.) und 306 mg Imidazol (4.50 mmol, 4.5 Äq.) in 2.00 mL eines Gemisches aus Pyridin/DMF (3:2, 0.5 M) bei 0 °C gelöst. Die klare Lösung wurde langsam auf Raumtemperatur erwärmt und anschließend für 22 h gerührt. Nach vollständigem Umsatz erfolgte die Zugabe von Eis sowie von 20 mL einer ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung. Das Rohprodukt wurde mit 2x 100 mL EtOAc extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit 50 mL einer ges. NH<sub>4</sub>Cl-Lösung gewaschen und über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* und säulenchromatographischer Aufreinigung (iHex/EtOAc 100:1 → 1:1) wurden 117 mg des doppelt TBS-geschützten <sup>15</sup>N-F-dU (246 µmol, 79%) in Form eines farblosen Feststoffs erhalten und ohne weitere Charakterisierung direkt umgesetzt.

148 mg (2.21 mmol, 9 Äq.) Triazol wurden in 3.85 mL MeCN gelöst und bei 0 °C langsam mit 46 µL POCl<sub>3</sub> (480 µmol, 2 Äq.) versetzt. Nach 15 min erfolgte die Zugabe von 291 µL Triethylamin, nach weiteren 15 min die Zugabe des doppelt TBS-geschützten <sup>15</sup>N-F-dU (117 mg, 246 µmol, 1.0 Äq.), woraufhin die Reaktionslösung auf Raumtemperatur erwärmt und für 12 h gerührt wurde. Aufgrund unzulänglicher Umsetzung wurde die Reaktionslösung für 6 d auf 50 °C geheizt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 200 µL Triethylamin und 48 µL ddH<sub>2</sub>O beendet, mit 50 mL DCM versetzt, die Reaktionslösung mit 25 mL einer ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gewaschen und das Rohprodukt mit 50 mL DCM extrahiert. Nach Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* wurde das Rohprodukt in 0.5 mL Dioxan gelöst und 0.40 mL einer <sup>15</sup>NH<sub>3</sub>-Lösung (3 M in ddH<sub>2</sub>O, 5 Äq.) zugefügt. Nach 24 h Rühren bei Raumtemperatur wurde ein vollständiger Umsatz beobachtet und 5.0 mL einer ges. NH<sub>4</sub>Cl-Lösung zugefügt. Nach Extraktion mit 2x 25 mL DCM wurden die vereinigten organischen Phasen über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittels *in vacuo* entfernt und ohne weitere Charakterisierung direkt umgesetzt.

Das Rohprodukt wurde in ein Polypropylengefäß überführt, in 3.5 mL EtOAc (0.07 M) gelöst, mit 98 µL Pyridin (1.23 mmol, 5.0 Äq.) sowie 123 µL HF·Pyridin (70% HF, 4.92 mmol, 20.0 Äq.) versetzt und bei Raumtemperatur gerührt. Nach 22 h wurde ein vollständiger Reaktionsumsatz beobachtet und 4.92 mL TMSOMe (1 mL/mmol) zugefügt. Nach 1 h wurde das Lösungsmittel *in vacuo*

entfernt und der Rückstand in ddH<sub>2</sub>O gelöst. Nach Aufreinigung mittels präoperativer *reversed phase* HPLC wurden 44 mg von <sup>15</sup>N<sub>2</sub>-F-dC **85** (180 μmol, 18% über 3 Stufen) in Form eines farblosen Feststoffs erhalten. Die Isotopenreinheit konnte massenspektrometrisch durch *K. Iwan* (AK Carell) auf über 95% bestimmt werden.

**DC:**  $R_f = 0.26$  (DCM/MeOH 5:1).

**<sup>1</sup>H-NMR (800 MHz, D<sub>2</sub>O, ppm):**  $\delta = 7.81$  (d, <sup>3</sup> $J = 7.6$  Hz, 1H, 6-H), 6.02 (d, <sup>3</sup> $J = 7.7$  Hz, 1H, 5'-H), 5.97 (d, <sup>3</sup> $J_{\text{H-F}} = 19.8$  Hz, 1H, 1'-H), 5.15 (ddd, <sup>2</sup> $J_{\text{H-F}} = 52.9$  Hz, <sup>3</sup> $J = 4.9$  Hz, <sup>3</sup> $J = 1.1$  Hz, 1H, 2'-H), 4.34 (ddd, <sup>3</sup> $J_{\text{H-F}} = 22.5$  Hz, <sup>3</sup> $J = 9.0$  Hz, <sup>3</sup> $J = 4.6$  Hz, 1H, 3'-H), 4.16-4.08 (m, 1H, 4'-H), 4.01 (dd, <sup>2</sup> $J = 13.0$  Hz, <sup>3</sup> $J = 2.4$  Hz, 1H, 5'-H), 3.83 (dd, <sup>2</sup> $J = 13.0$  Hz, <sup>3</sup> $J = 4.4$  Hz, 1H, 5'-H).

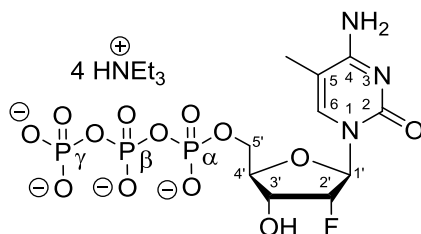
**<sup>13</sup>C-NMR (201 MHz, D<sub>2</sub>O, ppm):**  $\delta = 162.6$  (C4), 149.9 (C2), 140.6 (C6), 96.0 (C5), 93.2 (d, <sup>1</sup> $J_{\text{C-F}} = 193.8$  Hz, C2'), 89.9 (d, <sup>2</sup> $J_{\text{C-F}} = 35.7$  Hz, C1'), 82.2 (C4'), 67.8 (d, <sup>2</sup> $J_{\text{C-F}} = 15.5$  Hz, C3'), 59.9 (C5').

**<sup>19</sup>F-NMR (376 MHz, D<sub>2</sub>O, ppm):**  $\delta = -200.3$  (dt, <sup>2</sup> $J_{\text{F-H}} = 53.1$  Hz, <sup>3</sup> $J_{\text{F-H}} = 19.0$  Hz).

**HRMS (ESI<sup>-</sup>):** ber. für C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>FN<sup>15</sup>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub><sup>-</sup> [M+OAc]<sup>-</sup>: 306.0891, gef.: 306.0894.

## 10.7 Vorschriften zur Synthese fluorierter Triphosphate

### 10.7.1 5-Methyl-2'-desoxy-2'(R)-fluor-cytidin-5'-triphosphat (als Tetra-kis(triethylammonium-Salz) (86a)



21 mg F-mdC (**61**, 80  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äq.) und 132 mg Bis(tributylammonium)pyrophosphat (240  $\mu\text{mol}$ , 3.0 Äq.) wurden im Hochvakuum, 450  $\mu\text{L}$  Tributylamin (1.90 mmol, 23.7 Äq.) wurde über 3 Å Molsieb für 15 h getrocknet. Anschließend wurde das getrocknete Bis(tributylammonium)pyrophosphat in 405  $\mu\text{L}$  DMF gelöst, mit Tributylamin versetzt, die entstandene Emulsion einer Lösung aus 49 mg 2-Chlor-1,3,2-benzodioxaphosphorin-4-on (240  $\mu\text{mol}$ , 3.0 Äq., hergestellt von *S. Serdjukow*, AK Carell) in 405  $\mu\text{L}$  DMF zugegeben und für 30 min bei Raumtemperatur gerührt.

Im weiteren Verlauf wurde diese Triphosphat-Reagenzlösung mit getrocknetem F-mdC bei 0 °C versetzt und unter langsamer Erwärmung auf Raumtemperatur gerührt. Nach 3 h wurde ein vollständiger Reaktionsumsatz beobachtet, woraufhin eine Iod-Lösung (20 mM I<sub>2</sub> in Pyridin/ddH<sub>2</sub>O 9:1, ca. 1 mL) solange zugeführt wurde bis die leicht bräunliche Verfärbung der Reaktionslösung für mindestens 15 min anhielt. Anschließend wurden 2.5 mL ddH<sub>2</sub>O und nach einer weiteren Stunde 1.5 mL einer 3 M wässrige NaCl-Lösung zugegeben. Die Lösung wurde in ein Polypropylengefäß überführt, kurz mithilfe eines Vortexmischers geschüttelt, mit 17 mL absolutem Ethanol versetzt und für 40 min bei -80 °C gekühlt. Anschließend wurde die erhaltene Suspension zentrifugiert (5 min, 6000 rpm), der Überstand verworfen, der Rückstand in 1.5 mL Puffer A gelöst und gefriergetrocknet. Nach dreimaliger Aufreinigung mittels präoperativer *reversed phase* HPLC (0-15% Puffer B in 45 min) wurden 6.7  $\mu\text{mol}$  der Verbindung **86a** (8%, mittels UV/VIS-Spektroskopie bestimmt) in Form eines farblosen Feststoffs erhalten.

**DC:**  $R_f = 0.40$  (DCM/MeOH 3:1).

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O, ppm):**  $\delta = 7.81$  (s, 1H, 6-H), 5.97 (d,  $^3J_{\text{H-F}} = 16.8$  Hz, 1H, 1'-H), 5.02 (dd,  $^2J_{\text{H-F}} = 52.7$  Hz,  $^3J = 4.3$  Hz, 1H, 2'-H), 4.41 (ddd,  $^3J_{\text{H-F}} = 23.0$  Hz,  $^3J = 8.5$  Hz,  $^3J = 4.6$  Hz, 1H, 3'-H), 4.31 (ddd,  $^2J = 12.2$  Hz,  $^3J_{\text{H-P}} = 4.0$  Hz,  $^3J = 1.9$  Hz, 1H, 5'-H), 4.23-4.13 (m, 2H, 4'-H, 5'-H),

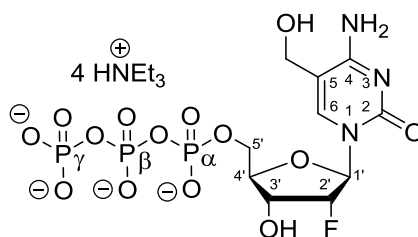
1.88 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

<sup>31</sup>P-NMR (162 MHz, D<sub>2</sub>O, ppm): δ = -11.0 (d, <sup>2</sup>J<sub>P-P</sub> = 19.9 Hz, γ-P), -11.8 (dt, <sup>2</sup>J<sub>P-P</sub> = 20.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>P-H</sub> = 2.9 Hz, α-P), -23.4 (t, <sup>2</sup>J<sub>P-P</sub> = 20.0 Hz, β-P).

HRMS (ESI<sup>-</sup>): ber. für C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>13</sub>P<sub>3</sub><sup>-</sup> [M-H]<sup>-</sup>: 497.9886 gef.: 497.9886.

Aufgrund der sehr geringen isolierten Mengen, die jedoch für eine Vielzahl von PCR-Ansätzen ausreichte, und der Hydrolyselabilität des Triphosphat wurde auf Aufnahme eines <sup>13</sup>C-NMR und IR-Spektrums, sowie der Messung des Schmelzpunkts verzichtet. Eine weitere Charakterisierung von **86a** erfolgte durch den enzymatischen Einbau mittels PCR und der LC-MS-Analyse der erhaltenen DNA-Stränge.

### 10.7.2 5-Hydroxymethyl-2'-desoxy-2'(R)-fluor-cytidin-5'-triphosphat (als Tetraakis(triethylammonium-Salz) (**86b**))



22 mg F-hmdC (**63**, 80 μmol, 1.0 Äq.) und 132 mg Bis(tributylammonium)pyrophosphat (240 μmol, 3.0 Äq.) wurden im Hochvakuum, 450 μL Tributylamin (1.90 mmol, 23.7 Äq.) wurde über 3 Å Molsieb für 15 h getrocknet. Anschließend wurde das getrocknete Bis(tributylammonium)pyrophosphat in 405 μL DMF gelöst, mit Tributylamin versetzt, die entstandene Emulsion einer Lösung aus 49 mg 2-Chlor-1,3,2-benzodioxaphosphorin-4-on (240 μmol, 3.0 Äq., hergestellt von *S. Serdjukow*, AK Carell) in 405 μL DMF zugegeben und für 30 min bei Raumtemperatur gerührt.

Im weiteren Verlauf wurde diese Triphosphat-Reagenzlösung mit getrocknetem F-hmdC bei 0 °C versetzt und unter langsamer Erwärmung auf Raumtemperatur gerührt. Nach 3 h wurde ein vollständiger Reaktionsumsatz beobachtet, woraufhin eine Iod-Lösung (20 mM I<sub>2</sub> in Pyridin/ddH<sub>2</sub>O 9:1, ca. 1 mL) solange zugeführt wurde bis die leicht bräunliche Verfärbung der Reaktionslösung für mindestens 15 min anhielt. Anschließend wurden 2.5 mL ddH<sub>2</sub>O und nach einer weiteren Stunde 1.5 mL einer 3 M wässrige NaCl-Lösung zugegeben. Die Lösung wurde in ein Polypropylengefäß überführt, kurz mithilfe eines Vortexmischers geschüttelt, mit 17 mL absolutem Ethanol versetzt und für 40 min bei -80 °C gekühlt. Anschließend wurde die erhaltene Suspension zentrifugiert

(5 min, 6000 rpm), der Überstand verworfen, der Rückstand in 1.5 mL Puffer A gelöst und gefriergetrocknet. Nach dreimaliger Aufreinigung mittels präparativer *reversed phase* HPLC (0-15% Puffer B in 45 min) wurden 7.2  $\mu\text{mol}$  der Verbindung **86b** (9%, mittels UV/VIS-Spektroskopie bestimmt) in Form eines farblosen Feststoffs erhalten.

**DC:**  $R_f = 0.32$  (DCM/MeOH 3:1).

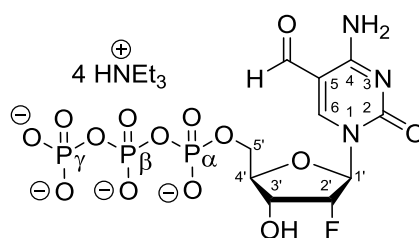
**$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , ppm):**  $\delta = 7.99$  (s, 1H, 6-H), 5.96 (d,  $^3J_{\text{H-F}} = 16.5$  Hz, 1H, 1'-H), 5.02 (dd,  $^2J_{\text{H-F}} = 52.1$  Hz,  $^3J = 4.8$  Hz, 1H, 2'-H), 4.42 (ddd,  $^3J_{\text{H-F}} = 19.3$  Hz,  $^3J = 8.9$  Hz,  $^3J = 4.3$  Hz, 1H, 3'-H), 4.39 (s, 2H, C5- $\text{CH}_2$ ), 4.34 (ddd,  $^2J = 12.5$  Hz,  $^3J_{\text{H-P}} = 3.8$  Hz,  $^3J = 2.5$  Hz, 1H, 5'-H), 4.23-4.13 (m, 2H, 4'-H, 5'-H).

**$^{31}\text{P-NMR}$  (162 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , ppm):**  $\delta = -11.0$  (d,  $^2J_{\text{P-P}} = 19.9$  Hz,  $\gamma\text{-P}$ ),  $-11.7$  (dt,  $^2J_{\text{P-P}} = 19.9$  Hz,  $^3J_{\text{P-H}} = 3.8$  Hz,  $\alpha\text{-P}$ ),  $-23.4$  (t,  $^2J_{\text{P-P}} = 19.9$  Hz,  $\beta\text{-P}$ ).

**HRMS (ESI<sup>-</sup>):** ber. für  $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{FN}_3\text{O}_{14}\text{P}_3^-$  [M-H]<sup>-</sup>: 513.9835 gef.: 513.9836.

Aufgrund der sehr geringen isolierten Mengen, die jedoch für eine Vielzahl von PCR-Ansätzen ausreichte, und der Hydrolyselabilität des Triphosphats wurde auf Aufnahme eines  $^{13}\text{C-NMR}$  und IR-Spektrums, sowie der Messung des Schmelzpunkts verzichtet. Eine weitere Charakterisierung von **86b** erfolgte durch den enzymatischen Einbau mittels PCR und der LC-MS-Analyse der erhaltenen DNA-Stränge.

### 10.7.3 5-Formyl-2'-desoxy-2'(R)-fluor-cytidin-5'-triphosphat (als Tetraakis(triethylammonium-Salz) (**86c**))



21 mg F-fdC (**62**, 80  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äq.) und 132 mg Bis(tributylammonium)pyrophosphat (240  $\mu\text{mol}$ , 3.0 Äq.) wurden im Hochvakuum, 450  $\mu\text{L}$  Tributylamin (1.90 mmol, 23.7 Äq.) wurde über 3 Å Molsieb für 15 h getrocknet. Anschließend wurde das getrocknete Bis(tributylammonium)pyrophosphat in 405  $\mu\text{L}$  DMF gelöst, mit Tributylamin versetzt, die entstandene Emulsion einer Lösung aus 49 mg 2-Chlor-1,3,2-benzodioxaphosphorin-4-on (240  $\mu\text{mol}$ ,

3.0 Äq., hergestellt von S. Serdjukow, AK Carell) in 405  $\mu\text{L}$  DMF zugegeben und für 30 min bei Raumtemperatur gerührt.

Im weiteren Verlauf wurde diese Triphosphat-Reagenzlösung mit getrocknetem F-fdC bei 0 °C versetzt und unter langsamer Erwärmung auf Raumtemperatur gerührt. Nach 3 h wurde ein vollständiger Reaktionsumsatz beobachtet, woraufhin eine Iod-Lösung (20 mM  $\text{I}_2$  in Pyridin/ddH<sub>2</sub>O 9:1, ca. 1 mL) solange zugeführt wurde bis die leicht bräunliche Verfärbung der Reaktionslösung für mindestens 15 min anhielt. Anschließend wurden 2.5 mL ddH<sub>2</sub>O und nach einer weiteren Stunde 1.5 mL einer 3 M wässrige NaCl-Lösung zugegeben. Die Lösung wurde in ein Polypropylengefäß überführt, kurz mithilfe eines Vortexmischers geschüttelt, mit 17 mL absolutem Ethanol versetzt und für 40 min bei -80 °C gekühlt. Anschließend wurde die erhaltene Suspension zentrifugiert (5 min, 6000 rpm), der Überstand verworfen, der Rückstand in 1.5 mL Puffer A gelöst und gefriergetrocknet. Nach dreimaliger Aufreinigung mittels präoperativer *reversed phase* HPLC (0-15% Puffer B in 45 min) wurden 2.4  $\mu\text{mol}$  der Verbindung **86c** (3%, mittels UV/VIS-Spektroskopie bestimmt) in Form eines farblosen Feststoffs erhalten.

**DC:**  $R_f = 0.81$  (DCM/MeOH 3:1).

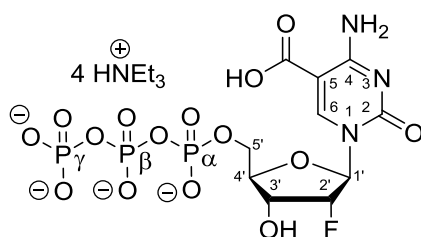
**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O, ppm):**  $\delta = 9.56$  (s, 1H, C(=O)-H), 8.79 (s, 1H, 6-H), 5.98 (d,  $^3J_{\text{H-F}} = 16.6$  Hz, 1H, 1'-H), 5.05 (dd,  $^2J_{\text{H-F}} = 52.6$  Hz,  $^3J = 4.8$  Hz, 1H, 2'-H), 4.47-4.34 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 4.28-4.17 (m, 2H, 4'-H, 5'-H).

**<sup>31</sup>P-NMR (162 MHz, D<sub>2</sub>O, ppm):**  $\delta = -11.0$  (d,  $^2J_{\text{P-P}} = 19.8$  Hz,  $\gamma$ -P), -11.8 (dt,  $^2J_{\text{P-P}} = 20.1$  Hz,  $^3J_{\text{P-H}} = 3.1$  Hz,  $\alpha$ -P), -23.4 (t,  $^2J_{\text{P-P}} = 20.0$  Hz,  $\beta$ -P).

**HRMS (ESI<sup>-</sup>):** ber. für C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>14</sub>P<sub>3</sub><sup>-</sup> [M-H]: 511.9678 gef.: 511.9679.

Aufgrund der sehr geringen isolierten Mengen, die jedoch für eine Vielzahl von PCR-Ansätzen ausreichte, und der Hydrolyselabilität des Triphosphats wurde auf die Aufnahme eines <sup>13</sup>C-NMR und IR-Spektrums, sowie der Messung des Schmelzpunkts verzichtet. Eine weitere Charakterisierung von **86c** erfolgte durch den enzymatischen Einbau mittels PCR und der LC-MS-Analyse der erhaltenen DNA-Stränge.

### 10.7.4 5-Carboxy-2'-desoxy-2'(R)-fluor-cytidin-5'-triphosphat (als Tetra-kis(triethylammonium-Salz) (86d)



21 mg F-cadC (**64**, 80  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äq.) und 132 mg Bis(tributylammonium)pyrophosphat (240  $\mu\text{mol}$ , 3.0 Äq.) wurden im Hochvakuum, 450  $\mu\text{L}$  Tributylamin (1.90 mmol, 23.7 Äq.) wurde über 3 Å Molsieb für 15 h getrocknet. Anschließend wurde das getrocknete Bis(tributylammonium)pyrophosphat in 405  $\mu\text{L}$  DMF gelöst, mit Tributylamin versetzt, die entstandene Emulsion einer Lösung aus 49 mg 2-Chlor-1,3,2-benzodioxaphosphorin-4-on (240  $\mu\text{mol}$ , 3.0 Äq., hergestellt von *S. Serdjukow*, AK Carell) in 405  $\mu\text{L}$  DMF zugegeben und für 30 min bei Raumtemperatur gerührt.

Im weiteren Verlauf wurde diese Triphosphat-Reagenzlösung mit getrocknetem F-cadC bei 0 °C versetzt und unter langsamer Erwärmung auf Raumtemperatur gerührt. Nach 3 h wurde ein vollständiger Reaktionsumsatz beobachtet, woraufhin eine Iod-Lösung (20 mM I<sub>2</sub> in Pyridin/ddH<sub>2</sub>O 9:1, ca. 1 mL) solange zugeführt wurde bis die leicht bräunliche Verfärbung der Reaktionslösung für mindestens 15 min anhielt. Anschließend wurden 2.5 mL ddH<sub>2</sub>O und nach einer weiteren Stunde 1.5 mL einer 3 M wässrige NaCl-Lösung zugegeben. Die Lösung wurde in ein Polypropylengefäß überführt, kurz mithilfe eines Vortexmischers geschüttelt, mit 17 mL absolutem Ethanol versetzt und für 40 min bei -80 °C gekühlt. Anschließend wurde die erhaltene Suspension zentrifugiert (5 min, 6000 rpm), der Überstand verworfen, der Rückstand in 1.5 mL Puffer A gelöst und gefriergetrocknet. Nach dreimaliger Aufreinigung mittels präoperativer *reversed phase* HPLC (0-15% Puffer B in 45 min) wurden 4.5  $\mu\text{mol}$  der Verbindung **86d** (6%, mittels UV/VIS-Spektroskopie bestimmt) in Form eines farblosen Feststoffs erhalten.

**DC:**  $R_f = 0.19$  (DCM/MeOH 3:1).

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O, ppm):**  $\delta = 8.38$  (s, 1H, 6-H), 5.87 (d,  $^3J_{\text{H-F}} = 20.3$  Hz, 1H, 1'-H), 5.15 (dd,  $^2J_{\text{H-F}} = 53.1$  Hz,  $^3J = 5.0$  Hz, 1H, 2'-H), 4.40 (ddd,  $^3J_{\text{H-F}} = 21.7$  Hz,  $^3J = 8.1$  Hz,  $^3J = 4.9$  Hz, 1H, 3'-H), 4.27 (ddd,  $^2J = 11.0$  Hz,  $^3J_{\text{H-P}} = 5.2$  Hz,  $^3J = 1.7$  Hz, 1H, 5'-H), 4.22-4.10 (m, 2H, 4'-H, 5'-H).

**<sup>31</sup>P-NMR (162 MHz, D<sub>2</sub>O, ppm):**  $\delta = -11.0$  (d,  $^2J_{\text{P-P}} = 19.8$  Hz,  $\gamma$ -P), -11.4 (dt,  $^2J_{\text{P-P}} = 19.8$  Hz,  $^3J_{\text{P-H}} = 6.2$  Hz,  $\alpha$ -P), -23.4 (t,  $^2J_{\text{P-P}} = 19.7$  Hz,  $\beta$ -P).

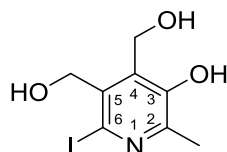
**HRMS (ESI<sup>-</sup>):** ber. für  $C_{10}H_{14}FN_3O_{15}P_3^-$  [M-H]<sup>-</sup>: 527.9627 gef.: 527.9628.

Aufgrund der sehr geringen isolierten Mengen, die jedoch für eine Vielzahl von PCR-Ansätzen ausreichte, und der Hydrolyselabilität des Triphosphats wurde auf die Aufnahme eines <sup>13</sup>C-NMR und IR-Spektrums, sowie der Messung des Schmelzpunkts verzichtet. Eine weitere Charakterisierung von **86d** erfolgte durch den enzymatischen Einbau mittels PCR und der LC-MS-Analyse der erhaltenen DNA-Stränge.



## 10.8 Vorschriften zur Synthese von PLP-Derivaten zur Proteinmarkierung

### 10.8.1 2-Methyl-3-hydroxy-4,5-dihydroxymethyl-6-iod-pyridin (**141**)



In Anlehnung an die Vorschrift von *Mason et al.* wurden in einem ausgeheizten Rundkolben 20.0 g (118 mmol, 1.0 Äq.) Pyridoxin als Hydrochloridsalz, 30.0 g Iod (118 mmol, 1.0 Äq.) in 340 mL einer 10%-igen Kaliumcarbonat-Lösung (0.35 M) suspendiert und für 3 h bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss gerührt.<sup>[273]</sup> Nach vollständiger Umsetzung wurden 1.88 g Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (14.9 mmol, 0.2 Äq.) zugegeben und weitere 10 min gerührt. Anschließend wurde eine 2 M HCl-Lösung bis zur Einstellung von pH = 3 hinzugeetropt, das Präzipitat durch Filtration gesammelt und mit kaltem ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Nach Trocknung im Hochvakuum wurden 22.1 g der Verbindung **141** (74.9 mmol, 63%) in Form eines leicht gelblichen Feststoffs erhalten werden.

**DC:**  $R_f = 0.68$  (DCM/MeOH 5:1).

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, ppm):**  $\delta = 9.51$  (s, 1H, C3-OH), 4.79 (s, 2H, C4-CH<sub>2</sub>), 4.55 (s, 2H, C5-CH<sub>2</sub>), 2.30 (s, 3H, C2-CH<sub>3</sub>).

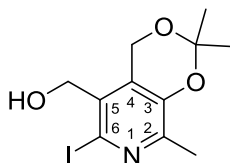
**<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, ppm):**  $\delta = 150.4$  (C3), 148.2 (C2), 136.2 (C4), 135.0 (C5), 112.1 (C6), 64.0 (C5-CH<sub>2</sub>), 57.0 (C4-CH<sub>2</sub>), 19.0 (C2-CH<sub>3</sub>).

**HRMS (ESI+):** ber. für C<sub>8</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>I<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup>: 295.9778 gef.: 295.9780.

**IR (ATR):**  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 3098 (m), 2722 (m), 1582 (w), 1413 (s), 1296 (m), 1241 (s), 1031 (m), 1013 (s), 956 (m), 749 (m), 713 (m).

**Schmelzbereich:** 176-178 °C (Zersetzung).

### 10.8.2 2-Methyl-3,4-(1,3-(2,2-dimethyl)-[4H]-dioxen)-5-hydroxymethyl-6-iod-pyridin (**103**)



In Anlehnung an die Vorschrift von *Korytnyk* wurden in einem ausgeheizten Rundkolben 22.1 g der Verbindung **141** (74.9 mmol, 1.0 Äq.) in 500 mL DCM (0.15 M) gelöst, mit 96.0 mL 2,2-Dimethoxypropan (784 mmol, 8.2 Äq.) versetzt, die Reaktionslösung unter Rückfluss erhitzt und 36.0 mL konz. Schwefelsäure (96%, 648 mmol, 8.7 Äq.) über einen Zeitraum von 10 min zuge-  
tropft.<sup>[274]</sup> Nach vollständiger Umsetzung wurden 100 mL einer ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung zugegeben, das Rohprodukt mit 3x 150 mL DCM extrahiert und die vereinigten die organischen Phasen über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* und säulenchromatographischer Aufreinigung (*i*Hex/EtOAc 4:1 → 2:1) wurden 14.5 g **103** (43.3 mmol, 58%) in Form eines leicht gelblichen Feststoffs erhalten.

**DC:**  $R_f = 0.24$  (*i*Hex/EtOAc 4:1).

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm):**  $\delta = 4.96$  (s, 2H, C4-CH<sub>2</sub>), 4.62 (d, <sup>3</sup> $J = 5.8$  Hz, 2H, C5-CH<sub>2</sub>), 2.37 (s, 3H, C2-CH<sub>3</sub>), 2.13 (d, <sup>3</sup> $J = 6.2$  Hz, 1H, C5-OH), 1.54 (s, 6H, 2x, C3-O-C-CH<sub>3</sub>).

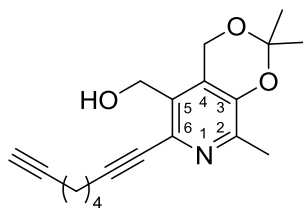
**<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm):**  $\delta = 150.1$  (C2), 146.7 (C3), 132.4 (C4), 127.8 (C5), 110.6 (C6), 100.1 (C3-O-C-CH<sub>3</sub>), 65.1 (C5-CH<sub>2</sub>), 56.3 (C4-CH<sub>2</sub>), 24.8 (C3-O-C-CH<sub>3</sub>), 19.0 (C2-CH<sub>3</sub>).

**HRMS (ESI+):** ber. für C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>3</sub>I<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup>: 336.0091 gef.: 336.0094.

**IR (ATR):**  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 3310 (w), 2942 (w), 1583 (w), 1374 (s), 1394 (s), 1276 (m), 1252 (s), 1203 (s), 1137 (s), 1068 (s), 1017 (m), 947 (m), 860 (s), 780 (m), 740 (s), 700 (s), 665 (m).

**Schmelzbereich:** 89-91 °C.

### 10.8.3 2-Methyl-3,4-(1,3-(2,2-dimethyl)-[4H]-dioxen)-5-hydroxymethyl-6-(octa(1,7)dien-1-yl)-pyridin (**142**)



In einem ausgeheizten Rundkolben wurden 2.00 g der Verbindung **103** (5.97 mmol, 1.0 Äq.) in 10 mL DMF (0.6 M) gelöst, mit 10.2 mL DIPEA (59.7 mmol, 10.0 Äq.) versetzt und die Reaktionslösung dreimal entgast (*freeze, pump, thaw*). Anschließend wurden 227 mg CuI (1.19 mmol, 0.2 Äq.) und 419 mg Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (597  $\mu$ mol, 0.1 Äq.) zugegeben. Nach 15 min Rühren bei Raumtemperatur wurden 1.85 mL Octa(1,7)dienyl (11.9 mmol, 2.0 Äq.) zugetropft. Das Reaktionsge-

misch wurde 48 h gerührt, bevor weitere 114 mg CuI (595  $\mu\text{mol}$ , 0.1 Äq.) und 210 mg Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (299  $\mu\text{mol}$ , 0.05 Äq.) zugegeben wurden. Zur vollständigen Umsetzung wurde anschließend das Reaktionsgemisch auf 50 °C für 17 h erhitzt und anschließend 30 mL einer ges. NH<sub>4</sub>Cl-Lösung zugegeben. Das Rohprodukt wurde mit 3x 150 mL DCM extrahiert und die vereinigten die organischen Phasen über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* und säulenchromatographischer Aufreinigung (*dryload*, DCM/MeOH 1:0 → 100:1 → 50:1) wurden 1.23 g **142** (3.92 mmol, 66%) in Form einer leicht gelblichen, viskosen Flüssigkeit erhalten.

**DC:**  $R_f = 0.27$  (DCM/MeOH 20:1).

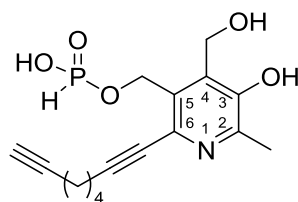
**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm):**  $\delta = 4.95$  (s, 2H, C4-CH<sub>2</sub>), 4.73 (d, <sup>3</sup> $J = 5.8$  Hz, 2H, C5-CH<sub>2</sub>), 2.47 (t, <sup>3</sup> $J = 6.8$  Hz, 2H, C6-C≡C-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C≡CH), 2.37 (s, 3H, C2-CH<sub>3</sub>), 2.31 (s, 1H, C6-C≡C-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C≡CH), 2.23 (td, <sup>3</sup> $J = 6.8$  Hz, <sup>4</sup> $J = 2.7$  Hz, 2H, C6-C≡C-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C≡CH), 1.78-1.59 (m, 4H, C6-C≡C-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C≡CH, C6-C≡C-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C≡CH), 1.53 (s, 6H, 2x, C3-O-C-CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm):**  $\delta = 148.3$  (C2), 145.7 (C3), 132.6 (C6), 130.1 (C4), 126.2 (C5), 100.1 (C3-O-C-CH<sub>3</sub>), 92.1 (C6-C≡C-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C≡CH), 84.2 (C6-C≡C-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C≡CH), 78.6 (C6-C≡C-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C≡CH), 68.8 (C6-C≡C-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C≡CH), 59.7 (C5-CH<sub>2</sub>), 58.9 (C4-CH<sub>2</sub>), 27.8 (C6-C≡C-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C≡CH), 27.5 (C6-C≡C-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C≡CH), 24.8 (C3-O-C-CH<sub>3</sub>), 19.2 (C6-C≡C-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C≡CH), 19.0 (C2-CH<sub>3</sub>), 18.1 (C6-C≡C-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C≡CH).

**HRMS (ESI+):** ber. für C<sub>19</sub>H<sub>24</sub>NO<sub>3</sub><sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup>: 314.1751 gef.: 314.1752.

**IR (ATR):**  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 3293 (w), 2938 (m), 2861 (w), 1667 (w), 1587 (w), 1429 (s), 1407 (s), 1385 (s), 1375 (s), 1355 (m), 1325 (w), 1287 (s), 1242 (s), 1204 (s), 1142 (s), 1126 (s), 1069 (s), 1027 (m), 951 (w), 863 (s), 791 (w), 722 (m), 694 (m), 674 (m).

### 10.8.4 2-Methyl-3-hydroxyl-4-hydroxymethyl-5-((hydroxy-hydrophosphoryl-oxy)methyl)-6-(octa(1,7)dien-1-yl)-pyridin (**143**)



In einem ausgeheizten Rundkolben wurde zu einer Suspension aus 1.63 g Imidazol (23.9 mmol, 15 Äq.) in 20 mL DCM 6.63 mL Triethylamin (47.9 mmol, 30 Äq.) zugegeben und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurden 700 µL Phosphortrichlorid (7.98 mmol, 5.0 Äq.) langsam zugetropft und für 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Nach erneutem Kühlen auf 0 °C wurden 500 mg **142** der Verbindung (1.60 mmol, 1.0 Äq.) zugegeben und die Suspension für 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach vollständiger Umsetzung wurde die Reaktionslösung mit 5 mL ddH<sub>2</sub>O versetzt und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Die säulenchromatographische Aufreinigung (DCM/MeOH 50:1 → 10:1 → 4:1) resultierte in dem Hydrogenphosphonat-Derivat der Verbindung **142** ( $R_f = 0.51$  (EtOAc/Aceton/EtOH/H<sub>2</sub>O 15:3:4:3)) mit Verunreinigungen an Imidazol und Triethylammoniumsalzen und wurde direkt weiter umgesetzt.

Das Hydrogenphosphonat-Derivat wurde in 18 mL eines Gemisches aus 10%-iger, wässriger Ameisensäure und Dioxan (5:1) gelöst und für 18 h bei 50 °C gerührt. Nach vollständiger Umsetzung wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt mittels präparativer *reversed phase* HPLC aufgereinigt. Dabei wurden 85 mg **143** (252 µmol, 6%) als gelbliche, viskose Flüssigkeit erhalten.

**DC:**  $R_f = 0.42$  (EtOAc/Aceton/EtOH/H<sub>2</sub>O 15:3:4:3).

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O, ppm):**  $\delta = 6.87$  (d,  $^1J_{P-H} = 634$  Hz, 1H, P-H), 5.07-5.04 (m, 2H, C5-CH<sub>2</sub>), 4.92-4.92 (m, 2H, C4-CH<sub>2</sub>), 2.58-2.54 (m, 2H, C6-C≡C-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C≡CH), 2.43 (s, 3H, C2-CH<sub>3</sub>), 2.38 (s, 1H, C6-C≡C-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C≡CH), 2.30-2.26 (m, 2H, C6-C≡C-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C≡CH), 1.77-1.72 (m, 2H, C6-C≡C-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C≡CH), 1.71-1.66 (m, 2H, C6-C≡C-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C≡CH).

**<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, D<sub>2</sub>O, ppm):**  $\delta = 153.4$  (C2), 147.0 (C3), 136.7 (C4), 132.0 (C5), 128.5 (C6), 97.7 (C6-C≡C-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C≡CH), 86.7 (C6-C≡C-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C≡CH), 74.6 (C6-C≡C-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C≡CH), 69.3 (C6-C≡C-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C≡CH), 60.0 (C5-CH<sub>2</sub>), 56.6 (C4-CH<sub>2</sub>), 26.9 (C6-C≡C-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C≡CH), 26.6 (C6-C≡C-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C≡CH).

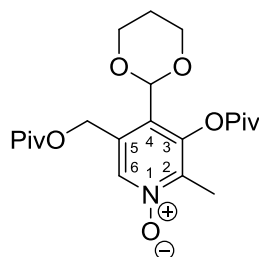
18.2 (C6-C≡C-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C≡CH), 17.1 (C6-C≡C-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C≡CH), 16.6 (C2-CH<sub>3</sub>).

<sup>31</sup>P-NMR (162 MHz, D<sub>2</sub>O, ppm): δ = 6.1.

HRMS (ESI+): ber. für C<sub>16</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>3</sub>P<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup>: 338.1152 gef.: 338.1151.

IR (ATR): ν (cm<sup>-1</sup>) = 3278 (m), 2986 (m), 2949 (m), 2864 (w), 2632 (w), 2493 (w), 2356 (w), 1446 (m), 1413 (m), 1375 (w), 1273 (w), 1208 (s), 1134 (w), 1074 (s), 1037 (s), 979 (s), 845 (w), 789 (w), 762 (w), 659 (w).

### 10.8.5 2-Methyl-3-(pivaloyloxy)-4-(1,3-dioxolan-2-yl)-5-((pivaloyl-oxy)methyl)-pyridin-1-oxid (105)



In einem ausgeheizten Rundkolben wurden 500 mg Pyridoxal als Hydrochloridsalz (2.45 mmol, 1.0 Äq.) in 4.1 mL THF (0.6 M) gelöst, mit 3 Å Molsieb, 885 µL Propan-(1,3)-diol (12.3 mmol, 5.0 Äq.) und 303 µL BF<sub>3</sub>·OEt<sub>2</sub> (2.45 mmol, 1.0 Äq.) versetzt und die Suspension für 2 h unter Rückfluss erhitzt. Nach vollständigem Umsatz wurde die nun klare Lösung auf 0 °C gekühlt, 6.03 mL PivCl (49.0 mmol, 20 Äq.) sowie 13.6 mL Triethylamin (98.0 mmol, 40 Äq.) der Reaktionslösung langsam zugegeben und für 19 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach vollständigem Umsatz erfolgte die Zugabe von Eis sowie von 20 mL einer ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung. Das Rohprodukt wurde mit 3x 50 mL EtOAc extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit 20 mL einer ges. NH<sub>4</sub>Cl-Lösung gewaschen und über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* wurde das Rohprodukt in 7.0 mL DCM (3.5 M) gelöst, vorsichtig mit 2.75 g *m*CPBA (70%, 12.3 mmol, 5 Äq.) bei 0 °C versetzt und für 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach vollständigem Umsatz erfolgte die Zugabe von 40 mL einer ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung. Das Rohprodukt wurde mit 2x 50 mL DCM extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* und säulenchromatographischer Aufreinigung (*i*Hex/EtOAc 1:1 → 1:10 → 0:1 (+ jeweils 0.5% NEt<sub>3</sub>)) wurden 505 mg **105** (1.23 mmol, 50%) in Form einer farblosen Flüssigkeit erhalten.

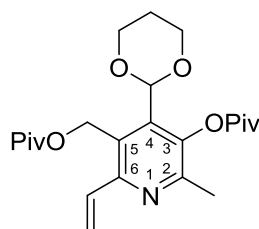
**DC:**  $R_f = 0.20$  (*i*Hex/EtOAc 1:1, + 0.5% NEt<sub>3</sub>).

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm):**  $\delta = 8.18$  (s, 1H, C6-H), 6.08 (d, <sup>4</sup> $J = 1.9$  Hz, 1H, C4-CH), 5.16 (d, <sup>2</sup> $J = 13.2$  Hz, 1H, C5-CH<sub>2</sub>), 5.02 (d, <sup>2</sup> $J = 13.2$  Hz, 1H, C5-CH<sub>2</sub>), 4.18-4.00 (m, 2H, C4-CH-O-CH<sub>2</sub>), 3.75-3.65 (m, 1H, C4-CH-O-CH<sub>2</sub>), 3.61-3.51 (m, 1H, C4-CH-O-CH<sub>2</sub>), 2.34 (s, 3H, C2-CH<sub>3</sub>), 1.93-1.84 (m, 2H, C4-CH-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 1.39 (s, 9H, C5-CH<sub>2</sub>-O-C(=O)-O-C-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.17 (s, 9H, C3-O-C(=O)-O-C-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm):**  $\delta = 178.4$  (C5-CH<sub>2</sub>-O-C(=O)-O-C-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 174.8 (C3-O-C(=O)-O-C-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 143.7 (C3), 142.4 (C2), 136.1 (C6), 130.8 (C5), 128.7 (C4), 104.8 (C4-CH), 70.4 (C5-CH<sub>2</sub>), 63.9 (C4-CH-O-CH<sub>2</sub>), 61.2 (C4-CH-O-CH<sub>2</sub>), 39.4 (C5-CH<sub>2</sub>-O-C(=O)-O-C-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 38.4 (C3-O-C(=O)-O-C-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 29.2 (C4-CH-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 27.2 (C5-CH<sub>2</sub>-O-C(=O)-O-C-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 27.0 (C3-O-C(=O)-O-C-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 11.5 (C2-CH<sub>3</sub>).

**HRMS (ESI+):** ber. für C<sub>21</sub>H<sub>32</sub>NO<sub>7</sub><sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup>: 410.2173 gef.: 410.2180.

### 10.8.6 2-Methyl-3-(pivaloyloxy)-4-(1,3-dioxolan-2-yl)-5-((pivaloyl-oxy)methyl)-6-vinyl-pyridin (144)



In einem ausgeheiztem Rundkolben wurden 3.00 g der Verbindung **105** (7.32 mmol, 1.0 Äq.) in 18.0 mL THF (0.4 M) gelöst, auf  $-78$  °C gekühlt, mit 9.52 mL Isobutylchloroformiat (73.2 mmol, 10 Äq.) versetzt und 45 min gerührt. Anschließend wurden langsam 14.6 mL (Vinyl)MgBr (1 M in THF, 14.6 mmol, 2 Äq.) zugegeben und für 20 min gerührt. Nach vollständigem Umsatz erfolgte die Zugabe von 50 mL einer ges. NH<sub>4</sub>Cl-Lösung. Das Rohprodukt wurde mit 2x 50 mL EtOAc extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* und säulenchromatographischer Aufreinigung (*i*Hex/EtOAc 10:1 → 1:1 (+ jeweils 0.5% NEt<sub>3</sub>)) wurden 2.29 g **144** (5.46 mmol, 75%) in Form einer farblosen Flüssigkeit erhalten.

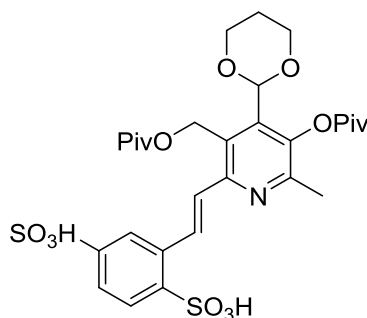
**DC:**  $R_f = 0.66$  (*i*Hex/EtOAc 4:1, + 0.5% NEt<sub>3</sub>).

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm):**  $\delta = 6.69$  (dd, <sup>3</sup> $J = 16.3$  Hz, <sup>3</sup> $J = 11.5$  Hz, 1H, C6-CH), 6.13 (s,

1H, C4-CH), 5.96 (d,  $^3J = 16.8$  Hz, 1H, C6-CH-CH<sub>2</sub>), 5.55 (d,  $^3J = 11.4$  Hz, 1H, C6-CH-CH<sub>2</sub>), 5.25 (d,  $^2J = 13.1$  Hz, 1H, C5-CH<sub>2</sub>), 5.10 (d,  $^2J = 13.9$  Hz, 1H, C5-CH<sub>2</sub>), 3.98-3.88 (m, 2H, C4-CH-O-CH<sub>2</sub>), 3.71-3.61 (m, 1H, C4-CH-O-CH<sub>2</sub>), 3.60-3.50 (m, 1H, C4-CH-O-CH<sub>2</sub>), 2.42 (s, 3H, C2-CH<sub>3</sub>), 1.98-1.82 (m, 2H, C4-CH-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 1.38 (s, 9H, C5-CH<sub>2</sub>-O-C(=O)-O-C-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.16 (s, 9H, C3-O-C(=O)-O-C-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

**HRMS (ESI+):** ber. für C<sub>23</sub>H<sub>34</sub>NO<sub>6</sub><sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup>: 420.2381 gef.: 420.2385.

### 10.8.7 (E)-2-(2-(4-(1,3-dioxolan-2-yl)-6-methyl-5-(pivaloyloxy)-3-((pivaloyloxy)methyl)pyridin-2-yl)vinyl)benzene-1,4-disulfonsäure (106)



In einem ausgeheiztem Rundkolben wurden 130 mg der Verbindung **144** (310  $\mu$ mol, 1.0 Äq.) in 3.1 mL MeOH (0.1 M) gelöst, mit 163 mg 2,5-Disulfobenzoldiazoniumtetrafluorborat (464  $\mu$ mol, 1.5 Äq., hergestellt von *S. Becker*, AK Carell), 127 mg NaOAc (1.55 mmol, 5.0 Äq.) und 32 mg Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub>·CHCl<sub>3</sub> (31  $\mu$ mol, 0.1 Äq.) und für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach vollständigem Umsatz wurde das Lösungsmittels *in vacuo* entfernt und mittels säulenchromatographischer Aufreinigung (EtOAc/Aceton/EtOH/H<sub>2</sub>O 15:3:4:3) wurden 75 mg **106** (114  $\mu$ mol, 37%) in Form eines farblosen Feststoffs erhalten.

**DC:**  $R_f = 0.65$  (EtOAc/Aceton/EtOH/H<sub>2</sub>O 15:3:4:3).

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm):**  $\delta = 8.24$  (d,  $^4J = 1.8$  Hz, 1H, *o*-Ph), 8.05 (d,  $^3J = 8.3$  Hz, 1H, *m*-Ph), 7.90 (d,  $^3J = 16.5$  Hz, 1H, C6-CH=CH), 7.83 (dd,  $^3J = 8.3$  Hz,  $^4J = 1.7$  Hz, 1H, *p*-Ph), 7.15 (d,  $^3J = 16.5$  Hz, 1H, C6-CH=CH), 6.23 (d,  $^4J = 1.7$  Hz, 1H, C4-CH), 5.42 (d,  $^2J = 13.6$  Hz, 1H, C5-CH<sub>2</sub>), 5.24 (d,  $^2J = 13.7$  Hz, 1H, C5-CH<sub>2</sub>), 4.14-3.96 (m, 2H, C4-CH-O-CH<sub>2</sub>), 3.65-3.57 (m, 2H, C4-CH-O-CH<sub>2</sub>), 2.33 (s, 3H, C2-CH<sub>3</sub>), 1.87-1.77 (m, 2H, C4-CH-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 1.20 (s, 9H, C5-CH<sub>2</sub>-O-C(=O)-O-C-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.03 (s, 9H, C3-O-C(=O)-O-C-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

**$^{13}\text{C}$ -NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm):**  $\delta$  = 179.9 (C5-CH<sub>2</sub>-O-C(=O)-O-C-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 178.1 (C3-O-C(=O)-O-C-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 151.3 (C6), 146.3 (C2), 145.4 (C6-CH=CH-C=CH-C-SO<sub>3</sub>H), 143.1 (C3), 139.7 (C6-CH=CH-C=C-SO<sub>3</sub>H), 138.8 (C4), 134.3 (C6-CH=CH-C), 133.5 (C6-CH=CH), 131.5 (C6-CH=CH-C=C(-SO<sub>3</sub>H)-CH), 128.5 (C6-CH=CH-C=CH-C(-SO<sub>3</sub>H)-CH), 128.2 (C5), 125.5 (C6-CH), 123.7 (C6-CH=CH-C=CH), 103.7 (C4-CH), 63.7 (2x C4-CH-O-CH<sub>2</sub>), 61.9 (C5-CH<sub>2</sub>), 38.9 (C5-CH<sub>2</sub>-O-C(=O)-O-C-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 38.5 (C3-O-C(=O)-O-C-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 28.2 (C4-CH-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 26.2 (C5-CH<sub>2</sub>-O-C(=O)-O-C-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 26.0 (C3-O-C(=O)-O-C-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 17.2 (C2-CH<sub>3</sub>).

**HRMS (ESI+):** ber. für C<sub>29</sub>H<sub>38</sub>NO<sub>12</sub>S<sub>2</sub><sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup>: 685.1830 gef.: 685.1831.



## 11 Abkürzungsverzeichnis

AP	Abasische Stelle (apurinische/apyrimidinische Stelle)
Äq.	Äquivalente
Aid	activation induced cytidine deaminase
Apobec	Apolipoprotein mRNA-editing catalytic polypeptide
ATR	Attenuated Total Reflection
au	Willkürliche Einheit (engl. arbitrary unit)
BER	Basenexzisionsreparatur
ber.	berechnet
bp	Basenpaar (engl. base pair)
br	breit (Signale bei NMR-Spektroskopie beziehungsweise IR-Spektroskopie)
Bz	Benzoyl-Rest
cadC	5-Carboxy-2'-desoxycytidin
cadU	5-Carboxy-2'-desoxyuridin
CAN	Cer(IV)-ammoniumnitrat $\text{Ce}(\text{NH}_4)_2(\text{NO}_3)_6$
CD	Circulardichroismus
CED	2-Cyanethyl-N,N-diisopropylphosphoramidit
d	Duplett (Signale bei NMR-Spektroskopie)
dA	2'-Desoxyadenosin
DAST	Diethylaminschwefeltrifluorid
dba	Dibenzylidenaceton
DC	Dünnschichtchromatographie
dC	2'-Desoxycytidin
DCM	Dichlormethan
dCTP	2'-Desoxycytidin-Triphosphat
dG	2'-Desoxyguanosin
DIPEA	Ethyl-di(isopropyl)amin
DMAP	N,N-Dimethylaminpyridin
DMT	4,4'-Dimethoxytrityl-Rest
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. deoxyribonucleic acid)

Dnmt	DNA Nukleotidmethyltransferase
dT	2'-Desoxythymidin
dU	2'-Desoxyuridin
EI	Elektroionisation (Ionisierungsmethode für die Massenspektrometrie)
ESI	Elektrosprayionisation (Ionisierungsmethode für Massenspektrometrie)
EtOAc	Essigsäureethylester
F-cadC	5-Carboxy-2'-( <i>R</i> )-fluor-2'-desoxycytidin
F-dC	2'-( <i>R</i> )-fluor-2'-desoxycytidin
F-fdC	5-Formyl-2'-( <i>R</i> )-fluor-2'-desoxycytidin
F-hmdC	5-Hydroxymethyl-2'-( <i>R</i> )-fluor-2'-desoxycytidin
F-mdC	5-Methyl-2'-( <i>R</i> )-fluor-2'-desoxycytidin
fdC	5-Formyl-2'-desoxycytidin
fdU	5-Formyl-2'-desoxyuridin
gef.	gefunden
hmdC	5-Hydroxymethyl-2'-desoxycytidin
hmdU	5-Hydroxymethyl-2'-desoxyuridin
IR	Infrarotspektroskopie
HMDS	Hexamethyldisilazan
hNEIL	humanes nei endonuclease VIII-like
hUBF	human upstream binding factor
HOAc	Essigsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HR	hochaufgelöst (engl. high resolution)
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence (2D-NMR-Methode)
IDCase	Isoorotat-Decarboxylase
konz.	konzentriert
LC	Flüssigchromatographie (engl. liquid chromatography)
m	medium (Signale bei IR-Spektroskopie)
m	Multiplett (Signale bei NMR-Spektroskopie)
MALDI-TOF	matrix assisted laser desorption ionization Massenspektrometer mit time of flight-Detektor
MBD	Methyl-CpG-bindende Domäne

mdC	5-Methyl-2'-desoxycytidin
MeCN	Acetonitril
mES	embryonale Stammzellen der Maus (engl. murine embryonic stem cells)
HhaI	Haemophilus haemolyticus
MS	Massenspektrometrie
NEt <sub>3</sub>	Triethylamin
NMR	Kernresonanzspektroskopie (engl. nuclear magnetic resonance)
Nu	Nukleophil
Oct4	Octamer binding transcription factor 4
ODN	Oligodesoxynukleotid
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
PDB	Proteindatenbank
PLP	Pyridoxalphosphat
ppm	parts per million
Py	Pyridin
q	Quartett (Signale bei NMR-Spektroskopie)
quant.	quantitativer Umsatz
R <sub>f</sub>	Retentionsfaktor (Dünnschichtchromatographie)
RNA	Ribonukleinsäure (engl. ribonucleic acid)
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. rounds per minute)
s	stark (Signale bei IR-Spektroskopie)
s	Singulett (Signale bei NMR-Spektroskopie)
SAM	S-Adenosylmethionin
SMUG	single-strand selective monofunctional uracil DNA N-glycosylase
T	Temperatur
t	Zeit (engl. time)
t	Triplett (Signale bei NMR-Spektroskopie)
TBS	<i>tert.</i> -Butyldimethylsilyl-Rest
TDG	Thymin-DNA-Glykosylase
Tet	ten-eleven translocation
TFA	Trifluoressigsäure (engl. trifluoroacetic acid)
TMS	Trimethylsilyl-Rest
THF	Tetrahydrofuran

Tol	Toluoyl-Rest
U	Units (Einheit für Enzymmengen)
UV/VIS	Licht der Wellenlänge 10–750 nm
UHPLC	Ultrahochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. ultra high performance liquid chromatography)
w	schwach (engl. weak) (Signale bei IR-Spektroskopie)

## 12 Literaturverzeichnis

- [1] Focus, [http://www.focus.de/gesundheit/gesundleben/lebensstil-hinterlaesst-spur-in-erbgut-fettleibigkeit-ist-vererbbar\\_id\\_5357036.html](http://www.focus.de/gesundheit/gesundleben/lebensstil-hinterlaesst-spur-in-erbgut-fettleibigkeit-ist-vererbbar_id_5357036.html), 16.03.2016
- [2] P. Huypens, S. Sass, M. Wu, D. Dyckhoff, M. Tschop, F. Theis, S. Marschall, M. H. de Angelis, J. Beckers, *Nat. Genet.* **2016**, *advance online publication*, Epigenetic germline inheritance of diet-induced obesity and insulin resistance.
- [3] U. Welsch, T. Deller, *Sobotta Lehrbuch Histologie*, 3 Aufl., Elsevier GmbH, München, **2010**.
- [4] P. A. Levene, *J. Biol. Chem.* **1919**, *40*, 415-424, The structure of yeast nucleic acid: IV. Ammonia hydrolysis.
- [5] J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature* **1953**, *171*, 737-738, Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid.
- [6] E. Chargaff, S. Zamenhof, C. Green, *Nature* **1950**, *165*, 756-757, Human Desoxyribose Nucleic Acid: Composition of Human Desoxyribose Nucleic Acid.
- [7] R. E. Franklin, R. G. Gosling, *Nature* **1953**, *171*, 740-741, Molecular Configuration in Sodium Thymonucleate.
- [8] J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature* **1953**, *171*, 964-967, Genetical Implications of the Structure of Deoxyribonucleic Acid.
- [9] M. H. F. Wilkins, A. R. Stokes, H. R. Wilson, *Nature* **1953**, *171*, 738-740, Molecular Structure of Nucleic Acids: Molecular Structure of Deoxyribose Nucleic Acids.
- [10] M. Meselson, F. W. Stahl, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1958**, *44*, 671-682, The replication of DNA in Escherichia Coli.
- [11] E. T. Kool, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 602-608, Synthetically modified DNAs as substrates for polymerases.
- [12] F. Crick, *Nature* **1970**, *227*, 561-563, Central Dogma of Molecular Biology.
- [13] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemistry*, Vol. 6, W. H. Freeman, New York, **2006**.
- [14] F. H. Crick, *Symp. Soc. Exp. Biol.* **1958**, *12*, 138-163, On protein synthesis.
- [15] R. Wing, H. Drew, T. Takano, C. Broka, S. Tanaka, K. Itakura, R. E. Dickerson, *Nature* **1980**, *287*, 755-758, Crystal structure analysis of a complete turn of B-DNA.
- [16] R. Holliday, *Biol. Rev.* **1990**, *65*, 431-471, Mechanism for the control of gene activity during development.
- [17] A. Bird, *Nature* **2007**, *447*, 396-398, Perceptions of epigenetics.
- [18] G. Egger, G. Liang, A. Aparicio, P. A. Jones, *Nature* **2004**, *429*, 457-463, Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy.
- [19] O. J. Rando, K. J. Verstrepen, *Cell*, *128*, 655-668, Timescales of Genetic and Epigenetic Inheritance.
- [20] T. Bartke, M. Vermeulen, B. Xhemalce, S. C. Robson, M. Mann, T. Kouzarides, *Cell*, *143*, 470-484, Nucleosome-Interacting Proteins Regulated by DNA and Histone Methylation.
- [21] R. Bonasio, S. Tu, D. Reinberg, *Science* **2010**, *330*, 612-616, Molecular Signals of Epigenetic States.
- [22] H. Cedar, Y. Bergman, *Nat. Rev. Genet.* **2009**, *10*, 295-304, Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms.
- [23] A. Portela, M. Esteller, *Nat. Biotech.* **2010**, *28*, 1057-1068, Epigenetic modifications and human disease.
- [24] Z. D. Smith, A. Meissner, *Nat. Rev. Genet.* **2013**, *14*, 204-220, DNA methylation: roles in mammalian development.
- [25] T. B. Johnson, R. D. Coghill, *J. Am. Chem. Soc.* **1925**, *47*, 2838-2844, Researches on

- pyrimidines. C111: The discovery of 5-Methylcytosine in tuberculinic acid, the nucleic acid of the tubercle bacillus1.
- [26] G. R. Wyatt, *Nature* **1950**, *166*, 237-238, Occurrence of 5-Methyl-Cytosine in Nucleic Acids.
- [27] P. A. Jones, D. Takai, *Science* **2001**, *293*, 1068-1070, The Role of DNA Methylation in Mammalian Epigenetics.
- [28] J. A. Law, S. E. Jacobsen, *Nat. Rev. Genet.* **2010**, *11*, 204-220, Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals.
- [29] A. Jeltsch, *ChemBioChem* **2002**, *3*, 382-382, Beyond Watson and Crick: DNA Methylation and Molecular Enzymology of DNA Methyltransferases.
- [30] R. Z. Jurkowska, T. P. Jurkowski, A. Jeltsch, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 206-222, Structure and Function of Mammalian DNA Methyltransferases.
- [31] G. Liang, M. F. Chan, Y. Tomigahara, Y. C. Tsai, F. A. Gonzales, E. Li, P. W. Laird, P. A. Jones, *Mol. Cell. Biol.* **2002**, *22*, 480-491, Cooperativity between DNA Methyltransferases in the Maintenance Methylation of Repetitive Elements.
- [32] M. Okano, D. W. Bell, D. A. Haber, E. Li, *Cell* **1999**, *99*, 247-257, DNA Methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b Are Essential for De Novo Methylation and Mammalian Development.
- [33] R. M. Kohli, Y. Zhang, *Nature* **2013**, *502*, 472-479, TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation.
- [34] P. A. Jones, *Nat. Rev. Genet.* **2012**, *13*, 484-492, Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond.
- [35] J. S. Griffith, H. R. Mahler, *Nature* **1969**, *223*, 580-582, DNA Ticketing Theory of Memory.
- [36] R. Holliday, J. Pugh, *Science* **1975**, *187*, 226-232, DNA modification mechanisms and gene activity during development.
- [37] A. D. Riggs, *Cytogenet. Genome Res.* **1975**, *14*, 9-25, X-inactivation, differentiation, and DNA methylation.
- [38] A. Kuroda, T. A. Rauch, I. Todorov, H. T. Ku, I. H. Al-Abdullah, F. Kandeel, Y. Mullen, G. P. Pfeifer, K. Ferreri, *PLoS ONE* **2009**, *4*, e6953, Insulin Gene Expression Is Regulated by DNA Methylation.
- [39] J. P. Thomson, P. J. Skene, J. Selfridge, T. Clouaire, J. Guy, S. Webb, A. R. W. Kerr, A. Deaton, R. Andrews, K. D. James, D. J. Turner, R. Illingworth, A. Bird, *Nature* **2010**, *464*, 1082-1086, CpG islands influence chromatin structure via the CpG-binding protein Cfp1.
- [40] S. Feng, S. E. Jacobsen, W. Reik, *Science* **2010**, *330*, 622-627, Epigenetic reprogramming in plant and animal development.
- [41] T. Kafri, X. Gao, A. Razin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 10558-10562, Mechanistic aspects of genome-wide demethylation in the preimplantation mouse embryo.
- [42] J. Oswald, S. Engemann, N. Lane, W. Mayer, A. Olek, R. Fundele, W. Dean, W. Reik, J. Walter, *Curr. Biol.* **2000**, *10*, 475-478, Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote.
- [43] N. Rougier, D. Bourc'his, D. M. Gomes, A. Niveleau, M. Plachot, A. Paldi, E. Viegas-Péquignot, *Genes Dev.* **1998**, *12*, 2108-2113, Chromosome methylation patterns during mammalian preimplantation development.
- [44] H. Wu, Y. Zhang, *Cell*, *156*, 45-68, Reversing DNA Methylation: Mechanisms, Genomics, and Biological Functions.
- [45] K. Iqbal, S.-G. Jin, G. P. Pfeifer, P. E. Szabó, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 3642-3647, Reprogramming of the paternal genome upon fertilization involves genome-wide oxidation of 5-methylcytosine.
- [46] F. Santos, B. Hendrich, W. Reik, W. Dean, *Dev. Biol.* **2002**, *241*, 172-182, Dynamic Reprogramming of DNA Methylation in the Early Mouse Embryo.

- [47] M. Wossidlo, T. Nakamura, K. Lepikhov, C. J. Marques, V. Zakhartchenko, M. Boiani, J. Arand, T. Nakano, W. Reik, J. Walter, *Nat. Commun.* **2011**, *2*, 241, 5-Hydroxymethylcytosine in the mammalian zygote is linked with epigenetic reprogramming.
- [48] F. Guo, X. Li, D. Liang, T. Li, P. Zhu, H. Guo, X. Wu, L. Wen, T.-P. Gu, B. Hu, Colum P. Walsh, J. Li, F. Tang, G.-L. Xu, *Cell Stem Cell* **2014**, *15*, 447-458, Active and Passive Demethylation of Male and Female Pronuclear DNA in the Mammalian Zygote.
- [49] M. Monk, M. Boubelik, S. Lehnert, *Development* **1987**, *99*, 371-382, Temporal and regional changes in DNA methylation in the embryonic, extraembryonic and germ cell lineages during mouse embryo development.
- [50] D. Bruniquel, R. H. Schwartz, *Nat. Immunol.* **2003**, *4*, 235-240, Selective, stable demethylation of the interleukin-2 gene enhances transcription by an active process.
- [51]
- [52] K. Martinowich, D. Hattori, H. Wu, S. Fouse, F. He, Y. Hu, G. Fan, Y. E. Sun, *Science* **2003**, *302*, 890-893, DNA Methylation-Related Chromatin Remodeling in Activity-Dependent Bdnf Gene Regulation.
- [53] S. C. Wu, Y. Zhang, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2010**, *11*, 607-620, Active DNA demethylation: many roads lead to Rome.
- [54] R. Bransteitter, P. Pham, M. D. Scharff, M. F. Goodman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 4102-4107, Activation-induced cytidine deaminase deaminates deoxycytidine on single-stranded DNA but requires the action of RNase.
- [55] 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.
- [56] K. Wiebauer, J. Jiricny, *Nature* **1989**, *339*, 234-236, In vitro correction of G o T mispairs to G o C pairs in nuclear extracts from human cells.
- [57] B. Hendrich, U. Hardeland, H.-H. Ng, J. Jiricny, A. Bird, *Nature* **1999**, *401*, 301-304, The thymine glycosylase MBD4 can bind to the product of deamination at methylated CpG sites.
- [58] Y.-F. 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.
- [59] S. Kriaucionis, N. Heintz, *Science* **2009**, *324*, 929-930, The Nuclear DNA Base 5-Hydroxymethylcytosine Is Present in Purkinje Neurons and the Brain.
- [60] T. Pfaffeneder, B. Hackner, M. Truß, M. Münzel, M. Müller, C. A. Deiml, C. Hagemeyer, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 7008-7012, The Discovery of 5-Formylcytosine in Embryonic Stem Cell DNA.
- [61] M. Tahiliani, K. P. Koh, Y. Shen, W. A. Pastor, H. Bandukwala, Y. Brudno, S. Agarwal, L. M. Iyer, D. R. Liu, L. Aravind, A. Rao, *Science* **2009**, *324*, 930-935, Conversion of 5-Methylcytosine to 5-Hydroxymethylcytosine in Mammalian DNA by MLL Partner TET1.
- [62] 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.
- [63] C. Loenarz, C. J. Schofield, *Chem. Biol.* **2009**, *16*, 580-583, Oxygenase Catalyzed 5-Methylcytosine Hydroxylation.
- [64] S. Liu, J. Wang, Y. Su, C. Guerrero, Y. Zeng, D. Mitra, P. J. Brooks, D. E. Fisher, H. Song, Y. Wang, *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, 6421-6429, Quantitative assessment of Tet-induced oxidation products of 5-methylcytosine in cellular and tissue DNA.
- [65] R. J. Boorstein, A. Cummings, D. R. Marenstein, M. K. Chan, Y. Ma, T. A. Neubert, S. M. Brown, G. W. Teebor, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 41991-41997, Definitive Identification of Mammalian 5-Hydroxymethyluracil DNAN-Glycosylase Activity as SMUG1.

- [66] S. Cortellino, J. Xu, M. Sannai, R. Moore, E. Caretti, A. Cigliano, M. Le Coz, K. Devarajan, A. Wessels, D. Soprano, Lara K. Abramowitz, Marisa S. Bartolomei, F. Rambow, Maria R. Bassi, T. Bruno, M. Fanciulli, C. Renner, Andres J. Klein-Szanto, Y. Matsumoto, D. Kobi, I. Davidson, C. Alberti, L. Larue, A. Bellacosa, *Cell*, **146**, 67-79, Thymine DNA Glycosylase Is Essential for Active DNA Demethylation by Linked Deamination-Base Excision Repair.
- [67] M. C. Hollstein, P. Brooks, S. Linn, B. N. Ames, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, *81*, 4003-4007, Hydroxymethyluracil DNA glycosylase in mammalian cells.
- [68] A. Masaoka, M. Matsubara, R. Hasegawa, T. Tanaka, S. Kurisu, H. Terato, Y. Ohyama, N. Karino, A. Matsuda, H. Ide, *Biochemistry* **2003**, *42*, 5003-5012, Mammalian 5-Formyluracil–DNA Glycosylase. 2. Role of SMUG1 Uracil–DNA Glycosylase in Repair of 5-Formyluracil and Other Oxidized and Deaminated Base Lesions.
- [69] T. Pfaffeneder, F. Spada, M. Wagner, C. Brandmayr, S. K. Laube, D. Eisen, M. Truss, J. Steinbacher, B. Hackner, O. Kotljarova, D. Schuermann, S. Michalakis, O. Kosmatchev, S. Schiesser, B. Steigenberger, N. Raddaoui, G. Kashiwazaki, U. Müller, C. G. Spruijt, M. Vermeulen, H. Leonhardt, P. Schär, M. Müller, T. Carell, *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10*, 574-581, Tet oxidizes thymine to 5-hydroxymethyluracil in mouse embryonic stem cell DNA.
- [70] 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.
- [71] E.-A. Raiber, D. Beraldi, G. Ficiz, H. E. Burgess, M. R. Branco, P. Murat, D. Oxley, M. J. Booth, W. Reik, S. Balasubramanian, *Genome Biol.* **2012**, *13*, 1-11, Genome-wide distribution of 5-formylcytosine in embryonic stem cells is associated with transcription and depends on thymine DNA glycosylase.
- [72] L. Zhang, X. Lu, J. Lu, H. Liang, Q. Dai, G.-L. Xu, C. Luo, H. Jiang, C. He, *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *8*, 328-330, Thymine DNA glycosylase specifically recognizes 5-carboxylcytosine-modified DNA.
- [73] A. Maiti, A. Z. Michelson, C. J. Armwood, J. K. Lee, A. C. Drohat, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 15813-15822, Divergent Mechanisms for Enzymatic Excision of 5-Formylcytosine and 5-Carboxylcytosine from DNA.
- [74] A. C. Drohat, A. Maiti, *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 8367-8378, Mechanisms for enzymatic cleavage of the N-glycosidic bond in DNA.
- [75] S. S. Malik, C. T. Coey, K. M. Varney, E. Pozharski, A. C. Drohat, *Nucleic Acids Res.* **2015**, 10.1093/nar/gkv890, Thymine DNA glycosylase exhibits negligible affinity for nucleobases that it removes from DNA.
- [76] L. Schomacher, D. Han, M. U. Musheev, K. Arab, S. Kienhofer, A. von Seggern, C. Niehrs, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2016**, *23*, 116-124, Neil DNA glycosylases promote substrate turnover by Tdg during DNA demethylation.
- [77] Z. Liutkeviciute, G. Lukinavicius, V. Masevicius, D. Daujotyte, S. Klimasauskas, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 400-402, Cytosine-5-methyltransferases add aldehydes to DNA.
- [78] S. Schiesser, B. Hackner, T. Pfaffeneder, M. Müller, C. Hagemeyer, 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.
- [79] Z. Liutkevičiūtė, E. Kriukienė, J. Ličytė, M. Rudytė, G. Urbanavičiūtė, S. Klimašauskas, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 5884-5887, Direct Decarboxylation of 5-Carboxylcytosine by DNA C5- Methyltransferases.
- [80] S. Schiesser, T. Pfaffeneder, K. Sadeghian, B. Hackner, B. Steigenberger, A. S. Schröder, J. Steinbacher, G. Kashiwazaki, G. Höfner, K. T. Wanner, C. Ochsenfeld, T. Carell, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 14593-14599, Deamination, Oxidation, and C–C Bond Cleavage Reactivity of 5-Hydroxymethylcytosine, 5-Formylcytosine, and 5-Carboxycytosine.



- [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] 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.
- [83] M. Münzel, 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.
- [84] T. M. Ali Shaikh, L. Emmanuvel, A. Sudalai, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 5043-5046, NaIO<sub>4</sub>-Mediated Selective Oxidation of Alkylarenes and Benzylic Bromides/Alcohols to Carbonyl Derivatives Using Water as Solvent.
- [85] M. J. Booth, G. Marsico, M. Bachman, D. Beraldi, S. Balasubramanian, *Nat. Chem.* **2014**, *6*, 435-440, Quantitative sequencing of 5-formylcytosine in DNA at single-base resolution.
- [86] X. Lu, D. Han, B. S. Zhao, C.-X. Song, L.-S. Zhang, L. C. Dore, C. He, *Cell Res.* **2015**, *25*, 386-389, Base-resolution maps of 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine reveal genome-wide DNA demethylation dynamics.
- [87] L. Shen, H. Wu, D. Diep, S. Yamaguchi, Ana C. D'Alessio, H.-L. Fung, K. Zhang, Y. Zhang, *Cell* **2013**, *153*, 692-706, Genome-wide Analysis Reveals TET- and TDG-Dependent 5-Methylcytosine Oxidation Dynamics.
- [88] C.-X. Song, Keith E. Szulwach, Q. Dai, Y. Fu, S.-Q. Mao, L. Lin, C. Street, Y. Li, M. Poidevin, H. Wu, J. Gao, P. Liu, L. Li, G.-L. Xu, P. Jin, C. He, *Cell* **2013**, *153*, 678-691, Genome-wide Profiling of 5-Formylcytosine Reveals Its Roles in Epigenetic Priming.
- [89] H. Wu, X. Wu, L. Shen, Y. Zhang, *Nat. Biotech.* **2014**, *32*, 1231-1240, Single-base resolution analysis of active DNA demethylation using methylase-assisted bisulfite sequencing.
- [90] M. J. Booth, E.-A. Raiber, S. Balasubramanian, *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 2240-2254, Chemical Methods for Decoding Cytosine Modifications in DNA.
- [91] T. J. Johnson, R. A. Jones, *Tetrahedron* **1978**, *34*, 547-551, The chemistry of terpenes—VIII: Characterisation of the bisulphite adducts of  $\alpha,\beta$ -unsaturated aldehydes by NMR spectroscopy.
- [92] M. J. Booth, M. R. Branco, G. Ficiz, D. Oxley, F. Krueger, W. Reik, S. Balasubramanian, *Science* **2012**, *336*, 934-937, Quantitative Sequencing of 5-Methylcytosine and 5-Hydroxymethylcytosine at Single-Base Resolution.
- [93] A. Okamoto, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 21-26, Chemical approach toward efficient DNA methylation analysis.
- [94] K. Tanaka, A. Okamoto, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 1912-1915, Degradation of DNA by bisulfite treatment.
- [95] C.-X. Song, C. He, *Trends Biochem. Sci* **2013**, *38*, 480-484, Potential functional roles of DNA demethylation intermediates.
- [96] Cornelia G. Spruijt, F. Gnerlich, Arne H. Smits, T. Pfaffeneder, Pascal W. T. C. Jansen, C. Bauer, M. Münzel, M. Wagner, M. Müller, F. Khan, H. C. Eberl, A. Mensinga, Arie B. Brinkman, K. Lephikov, U. Müller, J. Walter, R. Boelens, H. van Ingen, H. Leonhardt, T. Carell, M. Vermeulen, *Cell* **2013**, *152*, 1146-1159, Dynamic Readers for 5-(Hydroxy)Methylcytosine and Its Oxidized Derivatives.
- [97] D. P. Lane, *Nature* **1992**, *358*, 15-16, p53, guardian of the genome.
- [98] M. W. Kellinger, C.-X. Song, J. Chong, X.-Y. Lu, C. He, D. Wang, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2012**, *19*, 831-833, 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine reduce the rate and substrate

- specificity of RNA polymerase II transcription.
- [99] M. Bachman, S. Uribe-Lewis, X. Yang, H. E. Burgess, M. Iurlaro, W. Reik, A. Murrell, S. Balasubramanian, *Nat. Chem. Biol.* **2015**, *11*, 555-557, 5-Formylcytosine can be a stable DNA modification in mammals.
- [100] M. Bachman, S. Uribe-Lewis, X. Yang, M. Williams, A. Murrell, S. Balasubramanian, *Nat. Chem.* **2014**, *6*, 1049-1055, 5-Hydroxymethylcytosine is a predominantly stable DNA modification.
- [101] M. Wagner, J. Steinbacher, T. F. J. Kraus, S. Michalakis, B. Hackner, T. Pfaffeneder, A. Perera, M. Müller, A. Giese, H. A. Kretschmar, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 12511-12514, Age-Dependent Levels of 5-Methyl-, 5-Hydroxymethyl-, and 5-Formylcytosine in Human and Mouse Brain Tissues.
- [102] E. Nogales, N. Grigorieff, *J. Cell Biol.* **2001**, *152*, F1-F10, Molecular Machines: Putting the Pieces Together.
- [103] C. T. Walsh, S. Garneau-Tsodikova, G. J. Gatto, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7342-7372, Protein Posttranslational Modifications: The Chemistry of Proteome Diversifications.
- [104] J. M. Chalker, G. J. L. Bernardes, Y. A. Lin, B. G. Davis, *Chem. Asian. J* **2009**, *4*, 630-640, Chemical Modification of Proteins at Cysteine: Opportunities in Chemistry and Biology.
- [105] E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6974-6998, Bioorthogonal Chemistry: Fishing for Selectivity in a Sea of Functionality.
- [106] O. Boutourea, G. J. L. Bernardes, *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 2174-2195, Advances in Chemical Protein Modification.
- [107] C. D. Spicer, B. G. Davis, *Nat. Commun.* **2014**, *5*, Selective chemical protein modification.
- [108] J. A. Prescher, D. H. Dube, C. R. Bertozzi, *Nature* **2004**, *430*, 873-877, Chemical remodelling of cell surfaces in living animals.
- [109] L. S. Witus, M. B. Francis, *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 774-783, Using Synthetically Modified Proteins to Make New Materials.
- [110] A. J. de Graaf, M. Kooijman, W. E. Hennink, E. Mastrobattista, *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 1281-1295, Nonnatural Amino Acids for Site-Specific Protein Conjugation.
- [111] L. Wang, A. Brock, B. Herberich, P. G. Schultz, *Science* **2001**, *292*, 498-500, Expanding the Genetic Code of *Escherichia coli*.
- [112] E. Kaya, M. Vrabel, C. Deiml, S. Prill, V. S. Fluxa, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 4466-4469, A Genetically Encoded Norbornene Amino Acid for the Mild and Selective Modification of Proteins in a Copper-Free Click Reaction.
- [113] S. Greiss, J. W. Chin, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 14196-14199, Expanding the Genetic Code of an Animal.
- [114] A. R. Parrish, X. She, Z. Xiang, I. Coin, Z. Shen, S. P. Briggs, A. Dillin, L. Wang, *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7*, 1292-1302, Expanding the Genetic Code of *Caenorhabditis elegans* Using Bacterial Aminoacyl-tRNA Synthetase/tRNA Pairs.
- [115] M. Ehrlich, M. J. Gattner, B. Viverge, J. Bretzler, D. Eisen, M. Stadlmeier, M. Vrabel, T. Carell, *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 7701-7704, Orchestrating the Biosynthesis of an Unnatural Pyrrolysine Amino Acid for Its Direct Incorporation into Proteins Inside Living Cells.
- [116] N. Lundell, T. Schreitmüller, *Anal. Biochem.* **1999**, *266*, 31-47, Sample Preparation for Peptide Mapping— A Pharmaceutical Quality-Control Perspective.
- [117] D. R. Goddard, L. Michaelis, *J. Biol. Chem.* **1935**, *112*, 361-371, Derivatives of keratin.
- [118] M. E. B. Smith, F. F. Schumacher, C. P. Ryan, L. M. Tedaldi, D. Papaioannou, G. Waksman, S. Caddick, J. R. Baker, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 1960-1965, Protein Modification, Bioconjugation, and Disulfide Bridging Using Bromomaleimides.
- [119] D. J. Betting, K. Kafi, A. Abdollahi-Fard, S. A. Hurvitz, J. M. Timmerman, *J. Immunol.* **2008**, *181*, 4131-4140, Sulfhydryl-Based Tumor Antigen-Carrier Protein Conjugates

- Stimulate Superior Antitumor Immunity against B Cell Lymphomas.
- [120] Y. Zhang, V. S. Bhatt, G. Sun, P. G. Wang, A. F. Palmer, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 2221-2230, Site-Selective Glycosylation of Hemoglobin on Cys  $\beta$ 93.
- [121] R. I. Nathani, V. Chudasama, C. P. Ryan, P. R. Moody, R. E. Morgan, R. J. Fitzmaurice, M. E. B. Smith, J. R. Baker, S. Caddick, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 2408-2411, Reversible protein affinity-labelling using bromomaleimide-based reagents.
- [122] B.-Q. Shen, K. Xu, L. Liu, H. Raab, S. Bhakta, M. Kenrick, K. L. Parsons-Reponte, J. Tien, S.-F. Yu, E. Mai, D. Li, J. Tibbitts, J. Baudys, O. M. Saad, S. J. Scales, P. J. McDonald, P. E. Hass, C. Eigenbrot, T. Nguyen, W. A. Solis, R. N. Fuji, K. M. Flagella, D. Patel, S. D. Spencer, L. A. Khawli, A. Ebens, W. L. Wong, R. Vandlen, S. Kaur, M. X. Sliwowski, R. H. Scheller, P. Polakis, J. R. Junutula, *Nat. Biotech.* **2012**, *30*, 184-189, Conjugation site modulates the in vivo stability and therapeutic activity of antibody-drug conjugates.
- [123] W. H. Schaefer, T. M. Harris, F. P. Guengerich, *Arch. Biochem. Biophys.* **1987**, *257*, 186-193, Reaction of the model thiol 2-mercaptoethanol and glutathione with methylvinylmaleimide, a Michael acceptor with extended conjugation.
- [124] R. F. Doolittle, *Redundancies in protein sequences*, 10.1007/978-1-4613-1571-1, Plenum Press, New York, **1989**.
- [125] E. Baslé, N. Joubert, M. Pucheault, *Chem. Biol.* **2010**, *17*, 213-227, Protein Chemical Modification on Endogenous Amino Acids.
- [126] S. Kalkhof, A. Sinz, *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *392*, 305-312, Chances and pitfalls of chemical cross-linking with amine-reactive N-hydroxysuccinimide esters.
- [127] T. Nakamura, Y. Kawai, N. Kitamoto, T. Osawa, Y. Kato, *Chem. Res. Toxicol.* **2009**, *22*, 536-542, Covalent Modification of Lysine Residues by Allyl Isothiocyanate in Physiological Conditions: Plausible Transformation of Isothiocyanate from Thiol to Amine.
- [128] K. Tanaka, T. Masuyama, K. Hasegawa, T. Tahara, H. Mizuma, Y. Wada, Y. Watanabe, K. Fukase, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *47*, 102-105, A Submicrogram-Scale Protocol for Biomolecule-Based PET Imaging by Rapid  $6\pi$ -Azoelectrocyclization: Visualization of Sialic Acid Dependent Circulatory Residence of Glycoproteins.
- [129] N. Jentoft, D. G. Dearborn, *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 4359-4365, Labeling of proteins by reductive methylation using sodium cyanoborohydride.
- [130] R. L. Lundblad, *Chemical Reagents for Protein Modification, Vol. 4*, CRC Press, Boca Raton, **2014**.
- [131] E. M. Pelegri-O'Day, E.-W. Lin, H. D. Maynard, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 14323-14332, Therapeutic Protein-Polymer Conjugates: Advancing Beyond PEGylation.
- [132] M. L. Smith, J. A. Lindbo, S. Dillard-Telm, P. M. Brosio, A. B. Lasnik, A. A. McCormick, L. V. Nguyen, K. E. Palmer, *Virology* **2006**, *348*, 475-488, Modified Tobacco mosaic virus particles as scaffolds for display of protein antigens for vaccine applications.
- [133] N. Krall, F. P. da Cruz, O. Boutureira, G. J. L. Bernardes, *Nat. Chem.* **2016**, *8*, 103-113, Site-selective protein-modification chemistry for basic biology and drug development.
- [134] Y. Takaoka, A. Ojida, I. Hamachi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 4088-4106, Protein Organic Chemistry and Applications for Labeling and Engineering in Live-Cell Systems.
- [135] I. Chen, A. Y. Ting, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2005**, *16*, 35-40, Site-specific labeling of proteins with small molecules in live cells.
- [136] T. L. Foley, M. D. Burkart, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, *11*, 12-19, Site-specific protein modification: advances and applications.
- [137] M. Fernandez-Suarez, H. Baruah, L. Martinez-Hernandez, K. T. Xie, J. M. Baskin, C. R. Bertozzi, A. Y. Ting, *Nat. Biotech.* **2007**, *25*, 1483-1487, Redirecting lipoic acid ligase for cell surface protein labeling with small-molecule probes.
- [138] B. A. Griffin, S. R. Adams, R. Y. Tsien, *Science* **1998**, *281*, 269-272, Specific Covalent

## Labeling of Recombinant Protein Molecules Inside Live Cells.

- [139] S. R. Adams, R. E. Campbell, L. A. Gross, B. R. Martin, G. K. Walkup, Y. Yao, J. Llopis, R. Y. Tsien, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6063-6076, New Biarsenical Ligands and Tetracysteine Motifs for Protein Labeling in Vitro and in Vivo: Synthesis and Biological Applications.
- [140] M. F. Langhorst, S. Genisyuerek, C. A. O. Stuermer, *Histochem. Cell Biol.* **2006**, *125*, 743-747, Accumulation of FIASH/Lumio Green in active mitochondria can be reversed by  $\beta$ -mercaptoethanol for specific staining of tetracysteine-tagged proteins.
- [141] K. Stroffekova, C. Proenza, K. G. Beam, *Pflugers Arch.*, *442*, 859-866, The protein-labeling reagent FLASH-EDT2 binds not only to CCXXCC motifs but also non-specifically to endogenous cysteine-rich proteins.
- [142] T. L. Halo, J. Appelbaum, E. M. Hobert, D. M. Balkin, A. Schepartz, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 438-439, Selective Recognition of Protein Tetraserine Motifs with a Cell-Permeable, Pro-fluorescent Bis-boronic Acid.
- [143] S. Tsukiji, M. Miyagawa, Y. Takaoka, T. Tamura, I. Hamachi, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 341-343, Ligand-directed tosyl chemistry for protein labeling in vivo.
- [144] C. Zhang, M. Welborn, T. Zhu, N. J. Yang, M. S. Santos, T. Van Voorhis, B. L. Pentelute, *Nat. Chem.* **2016**, *8*, 120-128,  $\pi$ -Clamp-mediated cysteine conjugation.
- [145] J. I. MacDonald, H. K. Munch, T. Moore, M. B. Francis, *Nat. Chem. Biol.* **2015**, *11*, 326-331, One-step site-specific modification of native proteins with 2-pyridinecarboxyaldehydes.
- [146] T. G. M. Schmidt, A. Skerra, *Nat. Protocols* **2007**, *2*, 1528-1535, The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins.
- [147] A. Skerra, T. G. M. Schmidt, in *Methods Enzymol.*, Vol. Volume 326, Academic Press, **2000**, pp. 271-304.
- [148] E. Hochuli, H. Döbeli, A. Schacher, *J. Chromatogr. A* **1987**, *411*, 177-184, New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues.
- [149] E. Hochuli, W. Bannwarth, H. Dobeli, R. Gentz, D. Stuber, *Nat. Biotech.* **1988**, *6*, 1321-1325, Genetic Approach to Facilitate Purification of Recombinant Proteins with a Novel Metal Chelate Adsorbent.
- [150] F. Khan, M. He, M. J. Taussig, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 3072-3079, Double-Hexahistidine Tag with High-Affinity Binding for Protein Immobilization, Purification, and Detection on Ni-Nitrilotriacetic Acid Surfaces.
- [151] E. G. Guignet, R. Hovius, H. Vogel, *Nat. Biotech.* **2004**, *22*, 440-444, Reversible site-selective labeling of membrane proteins in live cells.
- [152] A. N. Kapanidis, Y. W. Ebright, R. H. Ebright, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 12123-12125, Site-Specific Incorporation of Fluorescent Probes into Protein: Hexahistidine-Tag-Mediated Fluorescent Labeling with (Ni<sup>2+</sup>:Nitrilotriacetic Acid)<sub>n</sub>-Fluorochrome Conjugates.
- [153] S. Lata, A. Reichel, R. Brock, R. Tampé, J. Piehler, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10205-10215, High-Affinity Adaptors for Switchable Recognition of Histidine-Tagged Proteins.
- [154] C. R. Goldsmith, J. Jaworski, M. Sheng, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 418-419, Selective Labeling of Extracellular Proteins Containing Polyhistidine Sequences by a Fluorescein-Nitrilotriacetic Acid Conjugate.
- [155] M. Valko, H. Morris, M. T. D. Cronin, *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 1161-1208, Metals, Toxicity and Oxidative Stress.
- [156] N. Stephanopoulos, M. B. Francis, *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 876-884, Choosing an effective protein bioconjugation strategy.
- [157] P. Carter, *Nat. Rev. Cancer* **2001**, *1*, 118-129, Improving the efficacy of antibody-based

- cancer therapies.
- [158] J. A. Francisco, C. G. Cervený, D. L. Meyer, B. J. Mixan, K. Klussman, D. F. Chace, S. X. Rejniak, K. A. Gordon, R. DeBlanc, B. E. Toki, C.-L. Law, S. O. Doronina, C. B. Siegall, P. D. Senter, A. F. Wahl, *Blood* **2003**, *102*, 1458-1465, cAC10-vcMMAE, an anti-CD30–monomethyl auristatin E conjugate with potent and selective antitumor activity.
- [159] A. Younes, D. A. Berry, *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2012**, *9*, 643-653, From drug discovery to biomarker-driven clinical trials in lymphoma.
- [160] Q. Dai, P. J. Sanstead, C. S. Peng, D. Han, C. He, A. Tokmakoff, *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10*.1021/acscchembio.5b00762, Weakened N3 Hydrogen Bonding by 5-Formylcytosine and 5-Carboxylcytosine Reduces Their Base-Pairing Stability.
- [161] M. Münzel, D. Globisch, C. Trindler, T. Carell, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 5671-5673, Efficient Synthesis of 5-Hydroxymethylcytosine Containing DNA.
- [162] W. Bannwarth, A. Trzeciak, *Helv. Chim. Acta* **1987**, *70*, 175-186, A Simple and Effective Chemical Phosphorylation Procedure for Biomolecules.
- [163] M. H. Caruthers, *Acc. Chem. Res.* **1991**, *24*, 278-284, Chemical synthesis of DNA and DNA analogs.
- [164] A. C. Rios, H. T. Yu, Y. Tor, *J. Phys. Org. Chem.* **2015**, *28*, 173-180, Hydrolytic fitness of N-glycosyl bonds: comparing the deglycosylation kinetics of modified, alternative, and native nucleosides.
- [165] S. L. Beaucage, M. H. Caruthers, *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 1859-1862, Deoxynucleoside phosphoramidites—A new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis.
- [166] N. D. Sinha, J. Biernat, J. McManus, H. Köster, *Nucleic Acids Res.* **1984**, *12*, 4539-4557, Polymer support oligonucleotide synthesis XVIII(1.2): use of  $\beta$ -cyanoethyl-N,N-dialkylamino-/N-morpholino phosphoramidite of deoxynucleosides for the synthesis of DNA fragments simplifying deprotection and isolation of the final product.
- [167] T. Ando, *Biochim. Biophys. Acta Nucleic Acids Protein Synth.* **1966**, *114*, 158-168, A nuclease specific for heat-denatured DNA isolated from a product of *Aspergillus oryzae*.
- [168] M. Rina, C. Pozidis, K. Mavromatis, M. Tzanodaskalaki, M. Kokkinidis, V. Bouriotis, *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 1230-1238, Alkaline phosphatase from the Antarctic strain TAB5.
- [169] T. Nihei, G. L. Cantoni, W. t. t. a. o. R. Rothenberg, *J. Biol. Chem.* **1963**, *238*, 3991-3998, Studies on Soluble Ribonucleic Acid: The Action of Snake Venom Phosphodiesterase on Soluble Ribonucleic Acid in Yeast.
- [170] E.-A. Raiber, P. Murat, D. Y. Chirgadze, D. Beraldi, B. F. Luisi, S. Balasubramanian, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2015**, *22*, 44-49, 5-Formylcytosine alters the structure of the DNA double helix.
- [171] T. Haraguchi, S. Shimizu, X. Ma, T. Kurose, E. C. M. Juan, A. Ohkubo, M. Sekine, T. Shibata, C. L. Millington, D. M. Williams, A. Takénaka, *Nucleic Acids Symp. Ser.* **2008**, *52*, 127-128, Crystal structures of DNA duplexes stabilized by bicyclic-C residues.
- [172] M. T. Hossain, T. Sunami, M. Tsunoda, T. Hikima, T. Chatake, Y. Ueno, A. Matsuda, A. Takénaka, *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 3949-3954, Crystallographic studies on damaged DNAs IV. N 4-methoxycytosine shows a second face for Watson–Crick base-pairing, leading to purine transition mutagenesis.
- [173] E. C. Magat Juan, S. Shimizu, X. Ma, T. Kurose, T. Haraguchi, F. Zhang, M. Tsunoda, A. Ohkubo, M. Sekine, T. Shibata, C. L. Millington, D. M. Williams, A. Takénaka, *Nucleic Acids Res.* **2010**, *10*.1093/nar/gkq519, Insights into the DNA stabilizing contributions of a bicyclic cytosine analogue: crystal structures of DNA duplexes containing 7,8-dihydropyrido [2,3-d]pyrimidin-2-one.
- [174] F. Seela, V. R. Sirivolu, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 1674-1687, Pyrrolo-dC oligonucleotides bearing alkynyl side chains with terminal triple bonds: synthesis, base

- pairing and fluorescent dye conjugates prepared by the azide-alkyne "click" reaction.
- [175] B. Xia, D. Han, X. Lu, Z. Sun, A. Zhou, Q. Yin, H. Zeng, M. Liu, X. Jiang, W. Xie, C. He, C. Yi, *Nat Meth* **2015**, *12*, 1047-1050, Bisulfite-free, base-resolution analysis of 5-formylcytosine at the genome scale.
- [176] R. K. Hill, N. D. Ledford, L. A. Renbaum, *J. Labelled Comp. Radiopharm.* **1985**, *22*, 143-148, Convenient preparation of deuterated uracils and dihydrouracils.
- [177] T. M. Pfaffeneder, Ludwig-Maximilians Universität München (München), **2014**.
- [178] K. Kai, Y. Wataya, H. Hayatsu, *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 2089-2090, Bisulfite-catalyzed isotope labeling of cytidine 5'-phosphate at its 5 position.
- [179] M. Sono, Y. Wataya, H. Hayatsu, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 4745-4749, Role of bisulfite in the deamination and the hydrogen isotope exchange of cytidylic acid.
- [180] Y. Wataya, H. Hayatsu, *Biochemistry* **1972**, *11*, 3583-3588, Effect of amines on the bisulfite-catalyzed hydrogen isotope exchange at the 5 position of uridine.
- [181] M. Maeda, Y. Kawazoe, *Tetrahedron Lett.* **1975**, *16*, 1643-1646, Chemical alteration of nucleic acids and their components. XI. Hydrogen-deuterium exchange of nucleosides and nucleotides catalyzed by platinum.
- [182] H. Sajiki, H. Esaki, F. Aoki, T. Maegawa, K. Hirota, *Synlett* **2005**, *2005*, 1385-1388, Palladium-Catalyzed Base-Selective H-D Exchange Reaction of Nucleosides in Deuterium Oxide.
- [183] J. Atzrodt, V. Derdau, T. Fey, J. Zimmermann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 7744-7765, The Renaissance of H/D Exchange.
- [184] J. Thiem, H. Mohn, A. Heesing, *Synthesis* **1985**, *1985*, 775-778, Anwendung der Perdeuteroallyl Schutz-Gruppe.
- [185] M. Münzel, Ludwig-Maximilians Universität München (München), **2011**.
- [186] A. Ramanathan, L. S. Jimenez, *Synthesis* **2010**, *2010*, 217-220, Reductive Dehalogenation of Aryl Bromides and Chlorides and Their Use as Aryl Blocking Groups.
- [187] A. M. Kawasaki, M. D. Casper, S. M. Freier, E. A. Lesnik, M. C. Zounes, L. L. Cummins, C. Gonzalez, P. D. Cook, *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 831-841, Uniformly modified 2'-deoxy-2'-fluoro-phosphorothioate oligonucleotides as nuclease-resistant antisense compounds with high affinity and specificity for RNA targets.
- [188] 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. Driscoll, *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 978-985, Acid-stable 2'-fluoro purine dideoxynucleosides as active agents against HIV.
- [189] O. D. Schaerer, G. L. Verdine, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 10781-10782, A Designed Inhibitor of Base-Excision DNA Repair.
- [190] K. M. Schermerhorn, S. Delaney, *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47*, 1238-1246, A Chemical and Kinetic Perspective on Base Excision Repair of DNA.
- [191] M. L. Sinnott, *Chem. Rev.* **1990**, *90*, 1171-1202, Catalytic mechanism of enzymic glycosyl transfer.
- [192] Q. Dai, X. Lu, L. Zhang, C. He, *Tetrahedron* **2012**, *68*, 5145-5151, Synthesis of DNA oligos containing 2'-deoxy-2'-fluoro-d-arabinofuranosyl-5-carboxylcytosine as hTDG inhibitor.
- [193] R. S. Rowland, R. Taylor, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 7384-7391, Intermolecular Nonbonded Contact Distances in Organic Crystal Structures: Comparison with Distances Expected from van der Waals Radii.
- [194] W. Saenger, *Principles of Nucleic Acid Structure.*, Springer-Verlag, New York, **1984**.
- [195] A. A. Williams, A. Darwanto, J. A. Theruvathu, A. Burdzy, J. W. Neidigh, L. C. Sowers, *Biochemistry* **2009**, *48*, 11994-12004, Impact of Sugar Pucker on Base Pair and Mismatch Stability.
- [196] 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.
- [197] 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.
- [198] I. Alves Ferreira-Bravo, C. Cozens, P. Holliger, J. J. DeStefano, *Nucleic Acids Res.* **2015**, Selection of 2'-deoxy-2'-fluoroarabinonucleotide (FANA) aptamers that bind HIV-1 reverse transcriptase with picomolar affinity.
- [199] J. G. Niedzwicki, M. H. El Kouni, C. Shih Hsi, S. Cha, *Biochem. Pharmacol.* **1983**, *32*, 399-415, Structure-activity relationship of ligands of the pyrimidine nucleoside phosphorylases.
- [200] R. McKenzie, M. W. Fried, R. Sallie, H. Conjeevaram, A. M. Di Bisceglie, Y. Park, B. Savarese, D. Kleiner, M. Tsokos, C. Luciano, T. Pruett, J. L. Stotka, S. E. Straus, J. H. Hoofnagle *N. Engl. J. Med.* **1995**, *333*, 1099-1105, Hepatic Failure and Lactic Acidosis Due to Fialuridine (FIAU), an Investigational Nucleoside Analogue for Chronic Hepatitis B.
- [201] L. J. Stuyver, T. R. McBrayer, T. Whitaker, P. M. Tharnish, M. Ramesh, S. Lostia, L. Cartee, J. Shi, A. Hobbs, R. F. Schinazi, K. A. Watanabe, M. J. Otto, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 651-654, Inhibition of the Subgenomic Hepatitis C Virus Replicon in Huh-7 Cells by 2'-Deoxy-2'-Fluorocytidine.
- [202] F. C. Richardson, B. C. Tennant, D. J. Meyer, K. A. Richardson, P. C. Mann, G. R. Mcginty, J. L. Wolf, P. M. Zack, R. A. Bendele, *Toxicol. Pathol.* **1999**, *27*, 607-617, An Evaluation of the Toxicities of 2'-Fluorouridine and 2'-Fluorocytidine-HCl in F344 Rats and Woodchucks (*Marmota monax*).
- [203] B. Kierdaszuk, K. Krawiec, Z. Kazimierczuk, U. Jacobsson, N. G. Johansson, B. Munch-petersen, S. Eriksson, D. Shugar, *Nucleosides and Nucleotides* **1999**, *18*, 1883-1903, Substrate/Inhibitor Properties of Human Deoxycytidine Kinase (dCK) and Thymidine Kinases (Tk1 And Tk2) Towards the Sugar Moiety of Nucleosides, Including O'-Alkyl Analogues.
- [204] T. Brückl, I. Thoma, A. J. Wagner, P. Knochel, T. Carell, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, *2010*, 6517-6519, Efficient Synthesis of Deazaguanosine-Derived tRNA Nucleosides PreQ0, PreQ1, and Archaeosine Using the Turbo-Grignard Method.
- [205] P. Knochel, W. Dohle, N. Gommermann, F. F. Kneisel, F. Kopp, T. Korn, I. Sapountzis, V. A. Vu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4302-4320, Highly Functionalized Organomagnesium Reagents Prepared through Halogen-Metal Exchange.
- [206] K. Hirota, Y. Kitade, Y. Kanbe, Y. Isobe, Y. Maki, *Synthesis* **1993**, *1993*, 213-215, Facile Synthesis of Thymidine Derivatives by Cross-Coupling of 5-Halogenouridine Derivatives with Trimethylaluminum.
- [207] J. L. Luche, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 2226-2227, Lanthanides in organic chemistry. 1. Selective 1,2 reductions of conjugated ketones.
- [208] B. Sammet, *Synlett* **2009**, *2009*, 3050-3051, 4-Nitrophenyl Chloroformate: A Versatile Coupling Reagent.
- [209] 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.
- [210] Y. Nomura, N. Haginoya, Y. Ueno, A. Matsuda, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 2811-2816, Nucleosides and nucleotides. 161. Incorporation of 5-(N-aminoalkyl)carbamoyl-2'-deoxycytidines into oligodeoxyribonucleotides by a convenient post-synthetic modification method.
- [211] H. Hashimoto, S. Hong, A. S. Bhagwat, X. Zhang, X. Cheng, *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*,

- 10203-10214, Excision of 5-hydroxymethyluracil and 5-carboxylcytosine by the thymine DNA glycosylase domain: its structural basis and implications for active DNA demethylation.
- [212] A. Maiti, M. S. Noon, A. D. MacKerell, E. Pozharski, A. C. Drohat, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 8091-8096, Lesion processing by a repair enzyme is severely curtailed by residues needed to prevent aberrant activity on undamaged DNA.
- [213] P. Sieber, *Helv. Chim. Acta* **1977**, *60*, 2711-2716, Der 2-Trimethylsilyläthyl-Rest als selektiv abspaltbare Carboxy-Schutzgruppe.
- [214] D. C. Liotta, G. R. Painter, G. R. Bluemling, *Vol. WO2014124430A1*, Emory University, USA, **2014**.
- [215] Y. Cen, A. A. Sauve, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 5779-5789, Diastereocontrolled Electrophilic Fluorinations of 2-Deoxyribonolactone: Syntheses of All Corresponding 2-Deoxy-2-fluorolactones and 2'-Deoxy-2'-fluoro-NAD<sup>+</sup>s.
- [216] C. H. Larsen, B. H. Ridgway, J. T. Shaw, D. M. Smith, K. A. Woerpel, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10879-10884, Stereoselective C-Glycosylation Reactions of Ribose Derivatives: Electronic Effects of Five-Membered Ring Oxocarbenium Ions.
- [217] S. Rozen, Y. Faust, H. Ben-Yakov, *Tetrahedron Lett.* **1979**, *20*, 1823-1826, A new method for fluorination of sterols.
- [218] Z. Wang, in *Comprehensive Organic Name Reactions and Reagents*, 10.1002/9780470638859.conrr652, John Wiley & Sons, Inc., **2010**.
- [219] Z. Wang, in *Comprehensive Organic Name Reactions and Reagents*, 10.1002/9780470638859.conrr314, John Wiley & Sons, Inc., **2010**.
- [220] X. Ariza, V. Bou, J. Vilarrasa, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 3665-3673, A New Route to 15N-Labeled, N-Alkyl, and N-Amino Nucleosides via N-Nitration of Uridines and Inosines.
- [221] S. Neuner, T. Santner, C. Kreutz, R. Micura, *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 11634-11643, The "Speedy" Synthesis of Atom-Specific 15N Imino/Amido-Labeled RNA.
- [222] V. K. La Mer, J. Greenspan, *T. Faraday Soc.* **1937**, *33*, 1266-1272, Kinetics of the solvent decomposition of nitramid in H<sub>2</sub>O-D<sub>2</sub>O mixtures.
- [223] B. Steigenberger, S. Schiesser, B. Hackner, C. Brandmayr, S. K. Laube, J. Steinbacher, T. Pfaffeneder, T. Carell, *Org. Lett.* **2013**, *15*, 366-369, Synthesis of 5-Hydroxymethyl-, 5-Formyl-, and 5-Carboxycytidine-triphosphates and Their Incorporation into Oligonucleotides by Polymerase Chain Reaction.
- [224] T. Ono, M. Scalf, L. M. Smith, *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 4581-4588, 2'-Fluoro modified nucleic acids: Polymerase-directed synthesis, properties and stability to analysis by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry.
- [225] J. Ludwig, F. Eckstein, *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 631-635, Rapid and efficient synthesis of nucleoside 5'-O-(1-thiotriphosphates), 5'-triphosphates and 2',3'-cyclophosphorothioates using 2-chloro-4H-1,3,2-benzodioxaphosphorin-4-one.
- [226] 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.
- [227] J. v. Hagen, *Proteomics Sample Preparation*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, **2011**.
- [228] R. L. Levine, N. J. Hoogenraad, N. Kretchmer, *Pediatr. Res.* **1974**, *8*, 724-734, A Review: Biological and Clinical Aspects of Pyrimidine Metabolism.
- [229] F. A. Carey, R. J. Sundberg, *Advanced Organic Chemistry, Part A: Structure and Mechanisms*, 10.1007/978-0-387-44899-2, 5th Aufl., Springer US, New York, **2007**.
- [230] R. A. Houghten, C. Pinilla, S. E. Blondelle, J. R. Appel, C. T. Dooley, J. H. Cuervo, *Nature* **1991**, *354*, 84-86, Generation and use of synthetic peptide combinatorial libraries for basic



- research and drug discovery.
- [231] K. S. Lam, S. E. Salmon, E. M. Hersh, V. J. Hruby, W. M. Kazmierski, R. J. Knapp, *Nature* **1991**, *354*, 82-84, A new type of synthetic peptide library for identifying ligand-binding activity.
- [232] R. A. Scheck, M. T. Dedeo, A. T. Iavarone, M. B. Francis, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 11762-11770, Optimization of a Biomimetic Transamination Reaction.
- [233] X. Li, L. Zhang, S. E. Hall, J. P. Tam, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 4069-4073, A new ligation method for N-terminal tryptophan-containing peptides using the Pictet–Spengler reaction.
- [234] N. de la Figuera, S. Fiol, J.-C. Fernández, P. Forns, D. Fernández-Forner, F. Albericio, *Synlett* **2006**, *2006*, 1903-1907, Role of the Acid Group in the Pictet–Spengler Reaction of  $\alpha$ -Amino Acids.
- [235] C. Godoy-Alcántar, A. K. Yatsimirsky, J. M. Lehn, *J. Phys. Org. Chem.* **2005**, *18*, 979-985, Structure-stability correlations for imine formation in aqueous solution.
- [236] J. Crugeiras, A. Rios, E. Riveiros, J. P. Richard, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 15815-15824, Substituent Effects on the Thermodynamic Stability of Imines Formed from Glycine and Aromatic Aldehydes: Implications for the Catalytic Activity of Pyridoxal-5'-phosphate.
- [237] R. Joseph, E. Masson, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 3116-3127, Subtle "supramolecular buttressing effects" in Cucurbit[7]uril/guest assemblies.
- [238] O. Trott, A. J. Olson, *J. Comput. Chem.* **2010**, *31*, 455-461, AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading.
- [239] C. Ramakrishnan, V. S. Dani, T. Ramasarma, *Protein Eng.* **2002**, *15*, 783-798, A conformational analysis of Walker motif A [GXXXXGKT (S)] in nucleotide-binding and other proteins.
- [240] A. K. H. Hirsch, F. R. Fischer, F. Diederich, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 338-352, Phosphate Recognition in Structural Biology.
- [241] M. Allert, K. Broo, *Chem. Commun.* **1998**, 1547-1548, Non-covalent control of site-selective incorporation of the pyridoxal phosphate cofactor into a folded polypeptide motif-mimicking a key step in enzymatic transamination.
- [242] A. A. Antson, T. V. Demidkina, P. Gollnick, Z. Dauter, R. L. Von Tersch, J. Long, S. N. Berezhnoy, R. S. Phillips, E. H. Harutyunyan, K. S. Wilson, *Biochemistry* **1993**, *32*, 4195-4206, Three-dimensional structure of tyrosine phenol-lyase.
- [243] M. Chan-Huot, A. Dos, R. Zander, S. Sharif, P. M. Tolstoy, S. Compton, E. Fogle, M. D. Toney, I. Shenderovich, G. S. Denisov, H.-H. Limbach, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 18160-18175, NMR Studies of Protonation and Hydrogen Bond States of Internal Aldimines of Pyridoxal 5'-Phosphate Acid–Base in Alanine Racemase, Aspartate Aminotransferase, and Poly-l-lysine.
- [244] K.-C. Hsien, H.-T. Chen, Y.-C. Chen, Y.-L. Chen, C.-Y. Lu, C.-L. Kao, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 3526-3529, Pyridoxal 5'-Phosphate Binding in Lysine-Modified PAMAM Dendrimers: A Biomimetic Approach.
- [245] L. C. Hsu, M. Okamoto, E. E. Snell, *Biochimie* **1989**, *71*, 477-489, L-Histidinol phosphate aminotransferase from *Salmonella typhimurium*. Kinetic behavior and sequence at the pyridoxal-P binding site.
- [246] L. Minchiotti, S. Ronchi, M. Rippa, *Biochim. Biophys. Acta Enzymology* **1981**, *657*, 232-242, Amino acid sequence around the pyridoxal 5'-phosphate binding sites of 6-phosphogluconate dehydrogenase.
- [247] I. Romero, J. Téllez, L. E. Yamanaka, M. Steindel, A. J. Romanha, E. C. Grisard, *Parasit. Vectors* **2014**, *7*, 197-197, Transsulfuration is an active pathway for cysteine biosynthesis in *Trypanosoma rangeli*.

- [248] M. A. Shogren-Knaak, B. Imperiali, *Biorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 1993-2002, Modulating pyridoxamine-mediated transamination through a  $\beta\beta\alpha$  motif peptide scaffold.
- [249] E. S. Simon, J. Allison, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2009**, *23*, 3401-3408, Determination of pyridoxal-5'-phosphate (PLP)-bonding sites in proteins: a peptide mass fingerprinting approach based on diagnostic tandem mass spectral features of PLP-modified peptides.
- [250] K.-H. Tang, A. Harms, P. A. Frey, *Biochemistry* **2002**, *41*, 8767-8776, Identification of a Novel Pyridoxal 5'-Phosphate Binding Site in Adenosylcobalamin-Dependent Lysine 5,6-Aminomutase from *Porphyromonas gingivalis*.
- [251] J. E. Walker, M. Saraste, M. J. Runswick, N. J. Gay, *The EMBO Journal* **1982**, *1*, 945-951, Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold.
- [252] E. F. Pai, U. Krengel, G. A. Petsko, R. S. Goody, W. Kabsch, A. Wittinghofer, *The EMBO journal* **1990**, *9*, 2351-2359, Refined crystal structure of the triphosphate conformation of H-ras p21 at 1.35 Å resolution: implications for the mechanism of GTP hydrolysis.
- [253] W. G. J. Hol, P. T. van Duijnen, H. J. C. Berendsen, *Nature* **1978**, *273*, 443-446, The [alpha]-helix dipole and the properties of proteins.
- [254] J. J. He, F. A. Quijcho, *Protein Sci.* **1993**, *2*, 1643-1647, Dominant role of local dipoles in stabilizing uncompensated charges on a sulfate sequestered in a periplasmic active transport protein.
- [255] E. J. Milner-White, *Protein Sci.* **1997**, *6*, 2477-2482, The partial charge of the nitrogen atom in peptide bonds.
- [256] J. D. Watson, E. J. Milner-White, *J. Mol. Biol.* **2002**, *315*, 171-182, A novel main-chain anion-binding site in proteins: the nest. A particular combination of  $\phi, \psi$  values in successive residues gives rise to anion-binding sites that occur commonly and are found often at functionally important regions I.
- [257] A. Bianchi, C. Giorgi, P. Ruzza, C. Toniolo, E. J. Milner-White, *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* **2012**, *80*, 1418-1424, A synthetic hexapeptide designed to resemble a proteinaceous p-loop nest is shown to bind inorganic phosphate.
- [258] J. R. Morrow, T. L. Amyes, J. P. Richard, *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 539-548, Phosphate Binding Energy and Catalysis by Small and Large Molecules.
- [259] G. A. Jeffrey, *An Introduction to Hydrogen Bonding*, Oxford University Press, New York, **1997**.
- [260] C. Janiak, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **2000**, 10.1039/b003010o, 3885-3896, A critical account on [small pi]-[small pi] stacking in metal complexes with aromatic nitrogen-containing ligands.
- [261] E. E. Harris, R. A. Firestone, K. Pfister, R. R. Boettcher, F. J. Cross, R. B. Currie, M. Monaco, E. R. Peterson, W. Reuter, *J. Org. Chem.* **1962**, *27*, 2705-2706, A New Synthesis of Pyridoxine (Vitamin B6)
- [262] W. Böll, H. König, *Liebigs Ann. Chem.* **1979**, *1979*, 1657-1664, Vitamin B6; eine neue Synthese durch Diels-Alder-Reaktion.
- [263] R. A. Firestone, E. E. Harris, W. Reuter, *Tetrahedron* **1967**, *23*, 943-955, Synthesis of pyridoxine by diels-alder reactions with 4-methyl-5-alkoxy oxazoles.
- [264] V. W. V. Velde, N. E. Mackenzie, A. I. Scott, *J. Labelled Comp. Radiopharm.* **1985**, *22*, 595-606, Synthesis of [4'-<sup>13</sup>C] pyridoxol.
- [265] S. Sharif, D. Schagen, M. D. Toney, H.-H. Limbach, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 4440-4455, Coupling of Functional Hydrogen Bonds in Pyridoxal-5'-phosphate-Enzyme Model Systems Observed by Solid-State NMR Spectroscopy.
- [266] B. G. Caulkins, B. Bastin, C. Yang, T. J. Neubauer, R. P. Young, E. Hilario, Y.-m. M. Huang,

- C.-e. A. Chang, L. Fan, M. F. Dunn, M. J. Marsella, L. J. Mueller, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 12824-12827, Protonation States of the Tryptophan Synthase Internal Aldimine Active Site from Solid-State NMR Spectroscopy: Direct Observation of the Protonated Schiff Base Linkage to Pyridoxal-5'-Phosphate.
- [267] Y.-C. Kim, E. Camaioni, A. U. Ziganshin, X.-d. Ji, B. F. King, S. S. Wildman, A. Rychkov, J. Yoburn, H. Kim, A. Mohanram, T. K. Harden, J. L. Boyer, G. Burnstock, K. A. Jacobson, *Drug Dev. Res.* **1998**, *45*, 52-66, Synthesis and structure-activity relationships of pyridoxal-6-arylazo-5'-phosphate and phosphonate derivatives as P2 receptor antagonists.
- [268] A. N. Wilson, S. A. Harris, *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, *73*, 4693-4694, Phosphates of the Vitamin B6 Group. V.1 A Synthesis of Codecarboxylase2.
- [269] G. Lambrecht, T. Friebe, U. Grimm, U. Windscheif, E. Bungardt, C. Hildebrandt, H. G. Bäumert, G. Spatz-Kümbel, E. Mutschler, *Eur. J. Pharmacol.* **1992**, *217*, 217-219, PPADS, a novel functionally selective antagonist of P2 purinoceptor-mediated responses.
- [270] A. U. Ziganshin, C. H. V. Hoyle, X. Bo, G. Lambrecht, E. Mutschler, H. G. Bäumert, G. Burnstock, *Br. J. Pharmacol.* **1993**, *110*, 1491-1495, PPADS selectively antagonizes P2X-purinoceptor-mediated responses in the rabbit urinary bladder.
- [271] Y.-C. Kim, S. G. Brown, T. K. Harden, J. L. Boyer, G. Dubyak, B. F. King, G. Burnstock, K. A. Jacobson, *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 340-349, Structure-Activity Relationships of Pyridoxal Phosphate Derivatives as Potent and Selective Antagonists of P2X1 Receptors.
- [272] Y.-C. Kim, K. A. Jacobson, *Synthesis* **2000**, *2000*, 119-122, Versatile Synthesis of 6-Alkyl and Aryl Substituted Pyridoxal Derivatives.
- [273] J.-X. Yu, W. Cui, V. A. Bourke, R. P. Mason, *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 6814-6821, 6-Trifluoromethylpyridoxine: Novel 19F NMR pH Indicator for in Vivo Detection.
- [274] W. Korytnyk, *J. Org. Chem.* **1962**, *27*, 3724-3726, A Seven-Membered Cyclic Ketal of Pyridoxol1.
- [275] Y. Wu, P. Ahlberg, *Acta Chem. Scand.* **1989**, *43*, 1009-1011, On the formation of Isopropylidenepyridoxindes.
- [276] F. Seela, V. R. Sirivolu, *Helv. Chim. Acta* **2007**, *90*, 535-552, Nucleosides and Oligonucleotides with Diynyl Side Chains: Base Pairing and Functionalization of 2'-Deoxyuridine Derivatives by the Copper(I)-Catalyzed Alkyne-Azide 'Click' Cycloaddition.
- [277] R. Chinchilla, C. Nájera, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 874-922, The Sonogashira Reaction: A Booming Methodology in Synthetic Organic Chemistry.
- [278] B. Schmidt, F. Hölder, R. Berger, S. Jessel, *Adv. Synth. Catal.* **2010**, *352*, 2463-2473, Mizoroki-Heck Reactions with 4-Phenoldiazonium Salts.
- [279] M. L. Pratt, J. A. DeMoss, *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 6872-6876, Neurospora tryptophan synthase. Characterization of the pyridoxal phosphate binding site.
- [280] P. D. Robison, W. B. Whitman, F. Waddill, A. F. Riggs, F. R. Tabita, *Biochemistry* **1980**, *19*, 4848-4853, Isolation and sequence of the pyridoxal 5'-phosphate active-site peptide from *Rhodospirillum rubrum* ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase.
- [281] J. E. Churchich, U. Moses, *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 1101-1104, 4-Aminobutyrate aminotransferase. The presence of nonequivalent binding sites.
- [282] K.-J. Oh, J. E. Churchich, *J. Biol. Chem.* **1973**, *248*, 7370-7375, Binding of Pyridoxal 5-Phosphate to Cystathionase.
- [283] J. García-Muriana Francisco, C. Alvarez-Ossorioa María, M. Sánchez-Garcés María, F. d. l. Rosa, M. Relimpio Angel, in *Zeitschrift für Naturforschung C*, Vol. 50, **1995**, p. 241.
- [284] F. Malerba, A. Bellelli, A. Giorgi, F. Bossa, R. Contestabile, *The Biochemical Journal* **2007**, *404*, 477-485, The mechanism of addition of pyridoxal 5'-phosphate to *Escherichia coli* aposerine hydroxymethyltransferase.
- [285] C. Schmuck, M. Schwegmann, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 3373-3379, A Molecular

- Flytrap for the Selective Binding of Citrate and Other Tricarboxylates in Water.
- [286] L. Fielding, *Tetrahedron* **2000**, *56*, 6151-6170, Determination of Association Constants ( $K_a$ ) from Solution NMR Data.
- [287] Z. D. Hill, P. MacCarthy, *J. Chem. Educ.* **1986**, *63*, 162, Novel approach to Job's method: An undergraduate experiment.
- [288] E. J. Olson, P. Bühlmann, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 8406-8412, Getting More out of a Job Plot: Determination of Reactant to Product Stoichiometry in Cases of Displacement Reactions and n:n Complex Formation.
- [289] J. S. Renny, L. L. Tomasevich, E. H. Tallmadge, D. B. Collum, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 11998-12013, Method of Continuous Variations: Applications of Job Plots to the Study of Molecular Associations in Organometallic Chemistry.
- [290] M. Blázquez, T. Pineda, J. M. Sevilla, M. Domínguez, F. García-Blanco, *J. Phys. Org. Chem.* **1991**, *4*, 372-380, The schiff base between pyridoxal-5'-phosphate (PLP) and hexylamine. Formation of the unprotonated form of the imine by reaction of the unprotonated PLP and free amine.
- [291] J. H. Bell, K. Curley, R. F. Pratt, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, *274*, 732-735, Inhibition of serine amidohydrolases by complexes of vanadate with hydroxamic acids.
- [292] M. H. O'Leary, J. M. Malik, *J. Biol. Chem.* **1971**, *246*, 544-545, Kinetics of the Binding of Pyridoxal 5'-Phosphate to Glutamate Decarboxylase.
- [293] M. H. O'Leary, J. M. Malik, *J. Biol. Chem.* **1972**, *247*, 7097-7105, Kinetics and Mechanism of the Binding of Pyridoxal 5'-Phosphate to Apoglutamate Decarboxylase: Evidence for a rate-determining conformation change.
- [294] Thieme, <https://roempp.thieme.de/roempp4.0/do/data/RD-12-01906#article-about>, 26.04.2016
- [295] M. Bertoldi, B. Cellini, T. Clausen, C. B. Voltattorni, *Biochemistry* **2002**, *41*, 9153-9164, Spectroscopic and Kinetic Analyses Reveal the Pyridoxal 5'-Phosphate Binding Mode and the Catalytic Features of *Treponema denticola* Cystalysin.
- [296] M. Bertoldi, B. Cellini, S. D'Aguzzo, C. B. Voltattorni, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 37336-37343, Lysine 238 Is an Essential Residue for  $\alpha,\beta$ -Elimination Catalyzed by *Treponema denticola* Cystalysin.
- [297] H. N. Christensen, *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 99-105, Three Schiff Base Types Formed by Amino Acids, Peptides and Proteins with Pyridoxal and Pyridoxal-5-phosphate1.
- [298] M. P. Hill, E. C. Carroll, M. C. Vang, T. A. Addington, M. D. Toney, D. S. Larsen, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 16953-16961, Light-Enhanced Catalysis by Pyridoxal Phosphate-Dependent Aspartate Aminotransferase.
- [299] C. M. Metzler, A. Cahill, D. E. Metzler, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 6075-6082, Equilibria and absorption spectra of Schiff bases.
- [300] S. Nagpal, V. Gupta, K. J. Kaur, D. M. Salunke, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 23296-23304, Structure-Function Analysis of Tritrypticin, an Antibacterial Peptide of Innate Immune Origin.
- [301] D. V. Santi, T. M. Ouyang, A. K. Tan, D. H. Gregory, T. Scanlan, C. W. Carreras, *Biochemistry* **1993**, *32*, 11819-11824, Interaction of thymidylate synthase with pyridoxal 5'-phosphate as studied by UV/visible difference spectroscopy and molecular modeling.
- [302] N. J. Greenfield, *Nat. Protocols* **2007**, *1*, 2876-2890, Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure.
- [303] R. W. Woody, *Eur. Biophys. J.*, *23*, 253-262, Contributions of tryptophan side chains to the far-ultraviolet circular dichroism of proteins.
- [304] H. M. D. Bandara, S. C. Burdette, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1809-1825, Photoisomerization in different classes of azobenzene.

- [305] J. Garcia-Amorós, M. Díaz-Lobo, S. Nonell, D. Velasco, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 12820-12823, Fastest Thermal Isomerization of an Azobenzene for Nanosecond Photoswitching Applications under Physiological Conditions.
- [306] A. V. Bryksin, I. Matsumura, *BioTechniques* **2010**, *48*, 463-465, Overlap extension PCR cloning: a simple and reliable way to create recombinant plasmids.
- [307] M. Tomás-Gamasa, S. Serdjukow, M. Su, M. Müller, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 796-800, "Post-It" Type Connected DNA Created with a Reversible Covalent Cross-Link.
- [308] X. Wei, *Tetrahedron* **2013**, *69*, 3615-3637, Coupling activators for the oligonucleotide synthesis via phosphoramidite approach.
- [309] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, 7. Aufl., Thieme, Stuttgart, **2005**.
- [310] E. C. Hulme, M. A. Trevethick, *Br. J. Pharmacol.* **2010**, *161*, 1219-1237, Ligand binding assays at equilibrium: validation and interpretation.
- [311] T. D. Pollard, *Mol. Biol. Cell* **2010**, *21*, 4061-4067, A Guide to Simple and Informative Binding Assays.
- [312] A. Dierckx, F.-A. Miannay, N. Ben Gaied, S. Preus, M. Björck, T. Brown, L. M. Wilhelmsson, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 5987-5997, Quadracyclic Adenine: A Non-Perturbing Fluorescent Adenine Analogue.