

---

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

**Synthese neuartiger isobarer  
Markierungsreagenzien auf Sulfoxid-Basis  
für eine akkurate Quantifizierung von  
Proteinen**

**Jana Bogena**

aus Wilhelmshaven, Deutschland

**2020**

---

---

## **Erklärung**

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

## **Eidesstattliche Versicherung**

Diese Dissertation wurde eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 13.01.2021.

---

*Jana Bogena*

Dissertation eingereicht am: 06.10.2020

1. Gutachter

Prof. Dr. Thomas Carell

2. Gutachter

Prof. Dr. Konstantin Karaghiosoff

Mündliche Prüfung am:

26.11.2020

---

Diese Arbeiten wurden von Juni 2016 bis Dezember 2019 unter der Leitung von Prof. Dr. Thomas Carell an der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität, München, durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Thomas Carell, der mir die Gelegenheit gegeben hat, im Rahmen seiner Forschungsgruppe zu promovieren. Er hat mich bei meiner wissenschaftlichen Forschung in hervorragender Weise unterstützt.

In gleicher Weise möchte ich Herrn Prof. Dr. Konstantin Karaghiosoff meinen herzlichen Dank dafür aussprechen, dass er sich bereit erklärt hat, mein zweiter Gutachter zu sein.

Bei den Mitgliedern der Prüfungskommission Herrn Prof. Dr. Hans-Christian Böttcher, Frau Dr. Stefanie Kellner, Herrn Prof. Dr. Oliver Trapp und Frau Prof. Dr. Lena Daumann bedanke ich mich für die Mitwirkung an der mündlichen Prüfung.

Mein Dank geht auch an Herrn Dr. Markus Müller für die wertvollen Ratschläge und Anregungen sowie seine vielfältige und stetige Unterstützung. Dank gebührt auch Frau Slava Gärtner für die sorgfältige und akribische Erledigung sämtlicher bürokratischen Erfordernisse.

Auch geht mein Dank an Frau Dr. Nina Simon, Herrn Dr. Michael Stadlmeier und Herrn Ferdinand Lutter für die gewissenhafte und gründliche Korrektur des vorliegenden Manuskripts.

Beim gesamten Arbeitskreis und insbesondere bei meinem Labor F4.045 bedanke ich mich für die äußerst angenehme und von Freundschaft geprägte Arbeitsatmosphäre. Darüber hinaus gilt mein Dank allen meinen Kooperationspartnern. Bei Herrn Dr. Michael Stadlmeier und Frau Dr. Miriam Wallner bedanke ich mich für die sehr gelungene und erfolgreiche Kooperation auf dem Gebiet der isobaren Markierungsreagenzien auf Sulfoxid-Basis. Mein außerordentlicher Dank geht auch an Herrn Dr. Michael Stadlmeier für die massenspektrometrischen Analysen der in dieser Arbeit hergestellten Reagenzien und die sich daran anschließende Auswertung. Bedanken möchte ich mich darüber hinaus bei Frau Dilara Özdemir für die stets lustige Atmosphäre, ihr immer offenes Ohr und ihre stete Bereitschaft, mich zu unterstützen.

---

Auch meine Praktikanten haben mich stets wunderbar unterstützt, wofür ich ein ganz herzliches Dankeschön sage. Es bereitete mir viel Freude, mit euch als Schüler zusammenarbeiten zu dürfen. Das Gleiche gilt für alle meine ehemaligen Mitarbeiter der Carell-Gruppe, die mir stets mit ihrer Freundlichkeit und Hilfe zur Seite standen.

Besonderer Dank geht an meine Familie, die mich all diese Jahre während des Studiums und meiner Promotion und in vielen anderen Belangen unterstützt hat.

Zum Abschluss gilt mein Dank Jeffrey für seine Liebe und dafür, dass es ihm gelang, das letzte Jahr meiner Dissertation für mich zu einem unvergesslichen Erlebnis zu machen. Bei jedem Anliegen hast du mich gestärkt, mich stets bei guter Laune gehalten und mich motiviert.

---

**Teile dieser Dissertation sind veröffentlicht worden:**

1. M. Stadlmeier,\* J. Bogena,\* M. Wallner,\* T. Carell, A sulfoxide-based isobaric labelling reagent for accurate quantitative mass spectrometry, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2018**, *57*, 2958–2962.

\*Diese Autoren haben zu gleichen Teilen beigetragen.

---

*"Think like a proton ... always  
positive."*

**- Me**

---

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Massenspektrometrie in der Proteomik	1
1.2	Entwicklung der Methoden zur Proteinanalytik	2
1.3	Die Prinzipien der Protein-Identifikation in der MS	6
1.4	Peptid-Fragmentierung und Identifizierung	8
1.5	Methoden zur Quantifizierung von Proteinen in der MS	10
1.5.1	Massen Tags - Markierungsbasierte Quantifizierungsstrategien	11
1.5.2	Isobare Massen-Tags	13
1.5.3	TMT und iTRAQ Isobare Massen-Tags	15
1.5.4	Vorteile der isobaren markierungsbasierten Quantifizierungsstrategie	16
1.6	Herausforderungen und Lösungsansätze der Isobarenmarkierung	17
1.6.1	Bewertung der Markierungseffizienz und Korrektur von Isotopenverunreinigungen	17
<b>2</b>	<b>Aufgabenstellung</b>	<b>21</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisteil</b>	<b>22</b>
3.1	Synthesestrategie und Evaluierung eines neuartigen Sulfoxid-basierten isobaren Markierungsreagenzes	22
3.1.1	Erster Entwurf der Synthese Strategie des neuartigen isobaren Markierungsreagenzes	25
3.1.2	Syntheseoptimierung des neuartigen isobaren Markierungsreagenzes SOT	27
3.1.3	Erste Massenspektrometrische Untersuchungen des unmarkierten SOT-Tags im Vergleich zum TMT-Tag	32
3.1.4	Optimierung der Syntheseroute des Markierungsreagenzes SOT-Tag	37
3.1.5	Einführung der Amin-reaktiven Aktivester-Funktionalität	43
3.1.6	Darstellung eines SOT-Duplex-Set nach der optimierten Syntheseroute	47

---

3.1.7	Synthese des $^{13}\text{C}$ -markierten SOT $^{180}$ -Reagenz nach der optimierten Syntheseroute _____	47
3.1.8	Evaluierung des SOT Duplex _____	48
3.1.9	Untersuchung co-isolierender Interferenzen und des Ratio-distortion Effektes _____	49
3.1.10	Limitierung und Anpassung des Reagenzdesigns des neuen SOT-Reagenzes _____	
3.1.11	Synthese und Untersuchung der modifizierten Reagenzstruktur ____	50
3.1.12	Synthese-Strategie der modifizierten SOT-Struktur _____	51
3.1.13	Evaluierung und massenspektrometrische Analyse der modifizierten SOT-Struktur ohne Isotopenmarkierung _____	52
3.1.14	HPLC Studien mit der modifizierten SOT Struktur zur Verbesserung der Markierungseffizienz _____	71
3.1.15	Evaluierung des hochreinen IsST-Reagenz _____	56
3.1.16	Synthese Duplex-Sets des modifizierten SOT-Reagenzes zur Evaluierung der Quantifizierung _____	58
<b>4</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b> _____	<b>62</b>
<b>5</b>	<b>Experimenteller Teil</b> _____	<b>64</b>
5.1	Materialien und Methoden _____	64
5.2	Synthesevorschriften _____	69
5.2.1	Synthese der isobaren Markierungsreagenzien SOT _____	69
5.2.2	Synthese der isobaren Makierungsreagenzien IsSOT _____	83
<b>6</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> _____	<b>106</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> _____	<b>109</b>

---

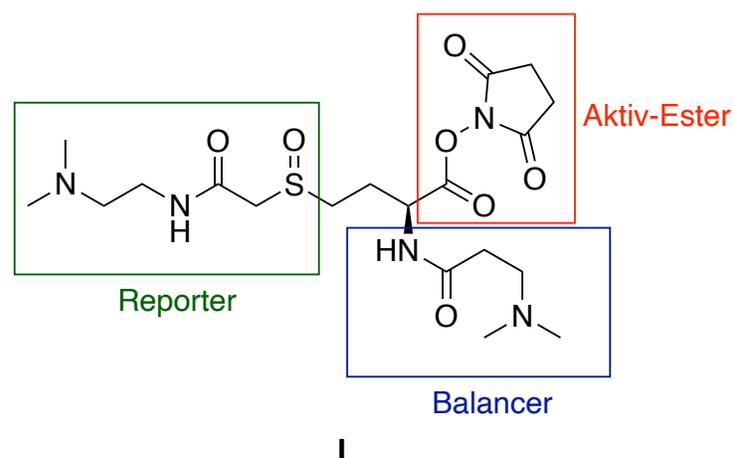
---

---

## Zusammenfassung

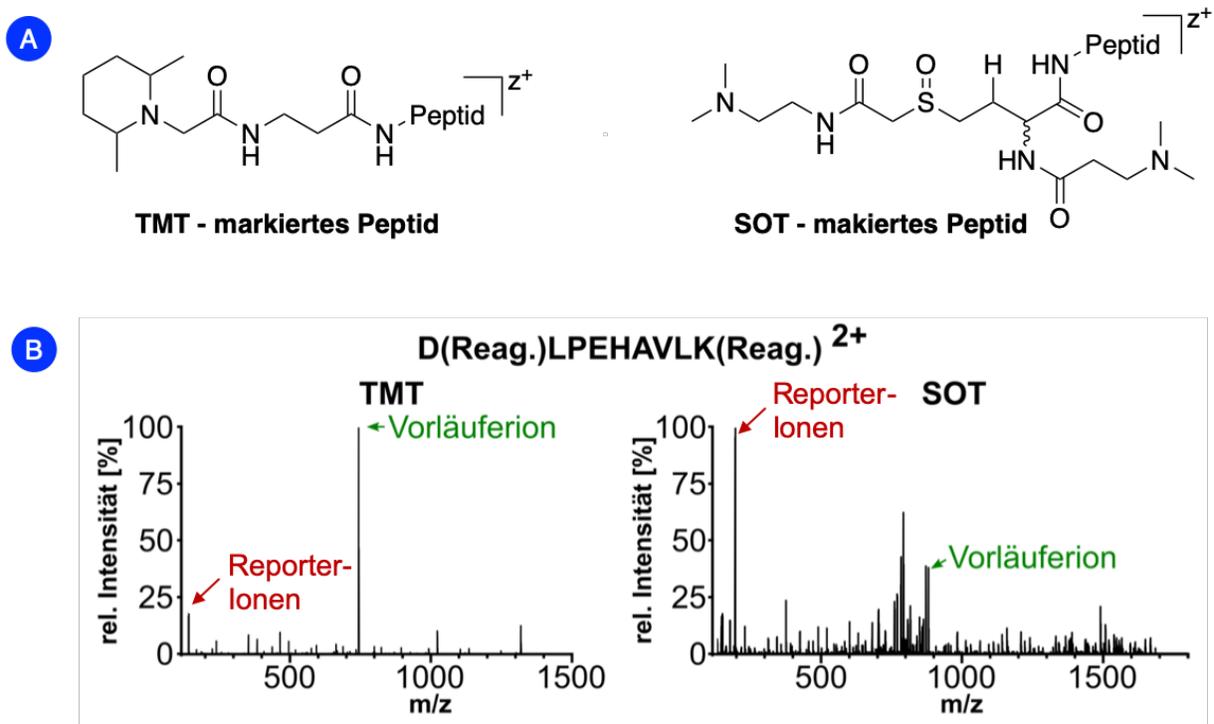
Die Aufklärung von Protein-Protein Interaktionen und die Forschung auf Proteinebene, besser bekannt als Proteomik, hat im Laufe des letzten Jahrzehnts eine große Entwicklung erfahren. Sie bietet wichtige Aufschlüsse über viele biologische Prozesse. Jedoch kommt es bei der Anwendung kommerzieller Quantifizierungs-reagenzien bei sehr komplexen Peptidproben zu vielen Einschränkungen. Co-eluierende Peptidionen verzerren das Ergebnis in Bezug auf Genauigkeit und Präzision der Proteinanalyse. So fordert die moderne Proteomik nicht nur eine stetige Optimierung der Analysemethoden und Massenspektrometer, vielmehr müssen auch die eingesetzten Reagenzien verbessert und auf deren Applikationen überprüft werden.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines neuartigen Sulfoxid-basierten isobaren Markierungsreagenz dem SulfOxid-Tag (SOT) und eine Optimierung der Syntheseroute zum Erhalt einer akkuraten Protein-Quantifizierung komplexer Proben. Aufgrund einer effektiven Gasphasen-basierten Sulfoxid-Spaltung ist es mit dem SOT-Tag möglich, bereits bei einer geringen Kollisionsenergie in der Gasphase neben den bereits etablierten Reporter-Ionen, auch über peptidgekoppelte *Balancer*-Konjugate (auch komplementäre Ionen genannt) interferenzfrei zu quantifizieren.



**Abbildung I** Darstellung des neuartigen SulfOxid-Tags (SOT) mit einer spaltbaren Sulfoxid-Gruppe, einer Reporter-Gruppe, *Balancer* und Amin-reaktive NHS-Funktionalität.

Neben der erstmaligen Darstellung und einer effizienten Syntheseoptimierung des unmarkierten SOT<sup>0</sup>-Tags, wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit die <sup>13</sup>C-markierte Variante (SOT<sup>180</sup>) der Duplex-Version des SOT-Tags für massenspektrometrische Analysen synthetisiert, um somit quantitative Aussagen über die Effizienz der Fragmentierung im Vergleich zu dem etablierten TMT-Reagenz treffen zu können. Die massenspektrometrischen Untersuchungen demonstrierten deutlich, dass SOT-markierte Peptide im Vergleich zu mit TMT-markierten Peptide effizienter fragmentieren und in einem höheren Ladungszustand vorliegen, was eine intensivere Bildung komplementärer Ionen und höhere Reporter-Intensitäten zur Folge hat. Besonders die effiziente Bildung peptidgekoppelter *Balancer*-Konjugate konnte den Verzerrungseffekt co-eluierender Peptidionen deutlich verringern. So konnte mit Hilfe dieser Methode eine akkuratere Quantifizierung einer sehr komplexen Probe durch den Einsatz des SOT-Tags gegenüber der Reporterquantifizierung etablierter Reagenzien gewährleistet werden.



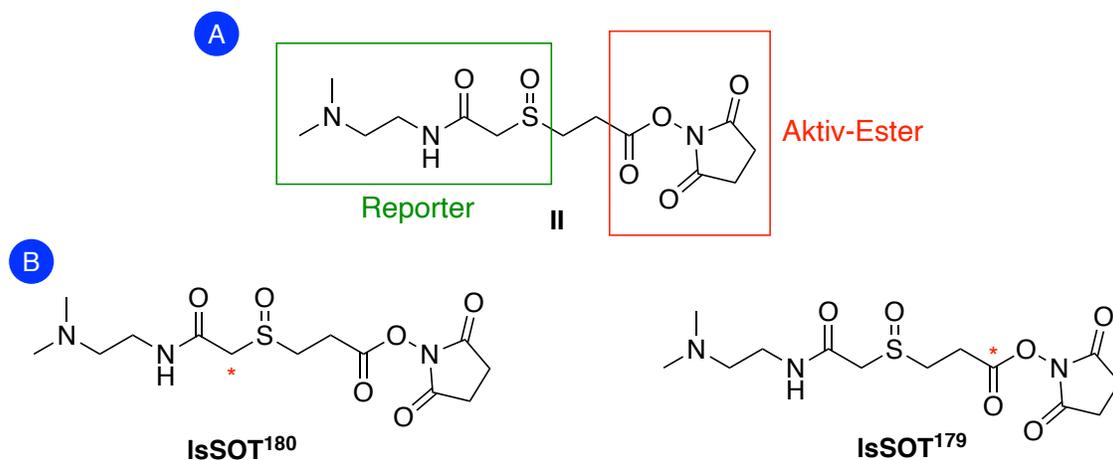
**Abbildung II** Fragmentierungsverhalten des neuartigen SOT-Tags im Vergleich zum etablierten TMT-Tag. **A)** Darstellung eines mit TMT- sowie SOT-markierten Peptids vor der Fragmentierung. **B)** Direkter

---

Vergleich der Peptidfragmentierung zwischen TMT und SOT an einem doppelt-markierten, zweifach positiven geladenen Peptids DLPEHAVLK bei einer normalisierten HCD-Energie von 28 % HCD.

Allerdings wiesen SOT-markierte Peptide eine Verminderung der Peptididentifikationsrate im Vergleich zu TMT auf. Auch die Markierungseffizienz SOT-markierter Peptide war deutlich geringer als die der mit TMT-markierten Peptide.

Um den Effekt der Markierungsreaktion auf die Peptididentifikation genauer zu überprüfen, wurden im zweiten Teil dieser Doktorarbeit ein sterisch weniger anspruchsvolles SOT-Reagenzdesign das **less steric SOT-Tag (IsSOT-Tag)** entwickelt, welches zu einer verbesserten Peptididentifikation beitragen soll. Ferner wurde eine HPLC-Methode entwickelt, die es erstmalig ermöglichte, die hydrolyseempfindlichen Endprodukte des IsSOT-Tags, hoch rein darzustellen was die rel. Markierungseffizienz von 63.6 % auf über 97 % steigern konnte.



**Abbildung III A)** Darstellung des Testreagenz IsSOT-Tag zur Untersuchung des Einflusses der fehlenden *Balancer*-Gruppe auf die Markierungseffizienz und Fragmentierungseigenschaften. **B)** Strukturen des Duplex-Reagenz Sets des IsSOT-Tags zur Evaluierung der Quantifizierung.

So konnte demonstriert werden, dass durch die Verwendung von hochreinen Molekülen, die eine Sulfoxidgruppe beinhalten, sehr hohe Markierungseffizienzen erreicht werden konnten. Basierend auf diesen Ergebnissen können Folgeuntersuchungen belegen, ob die die starke Fragmentierung des Sulfoxids

---

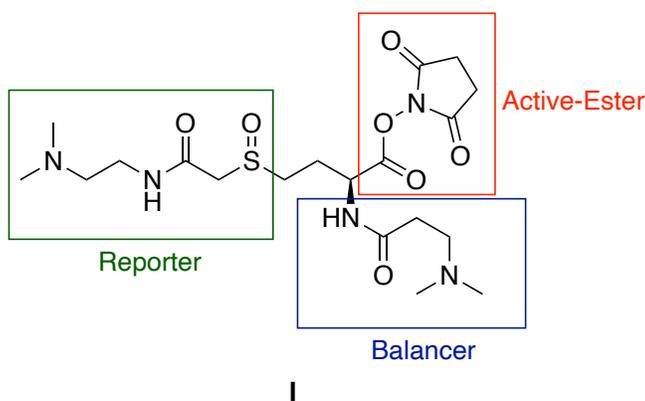
weiterhin Einfluss auf die Peptididentifikationsrate hat, auch wenn die Verwendung der Suchalgorithmen dem Reagenz angepasst werden.

---

## Summary

The elucidation of protein-protein interaction and research at the protein level, known as proteomics, has undergone great development over the last decade. It provides important information about many biological processes. However, the application of commercial quantification reagents leads to many limitations in very complex peptide samples. Co-eluting peptide ions distort the result in terms of the accuracy and precision of protein analysis. Modern proteomics does not only require the continuous optimization of analytical methods and mass spectrometers, but also the evaluation and improvement of progress in the field of reagents.

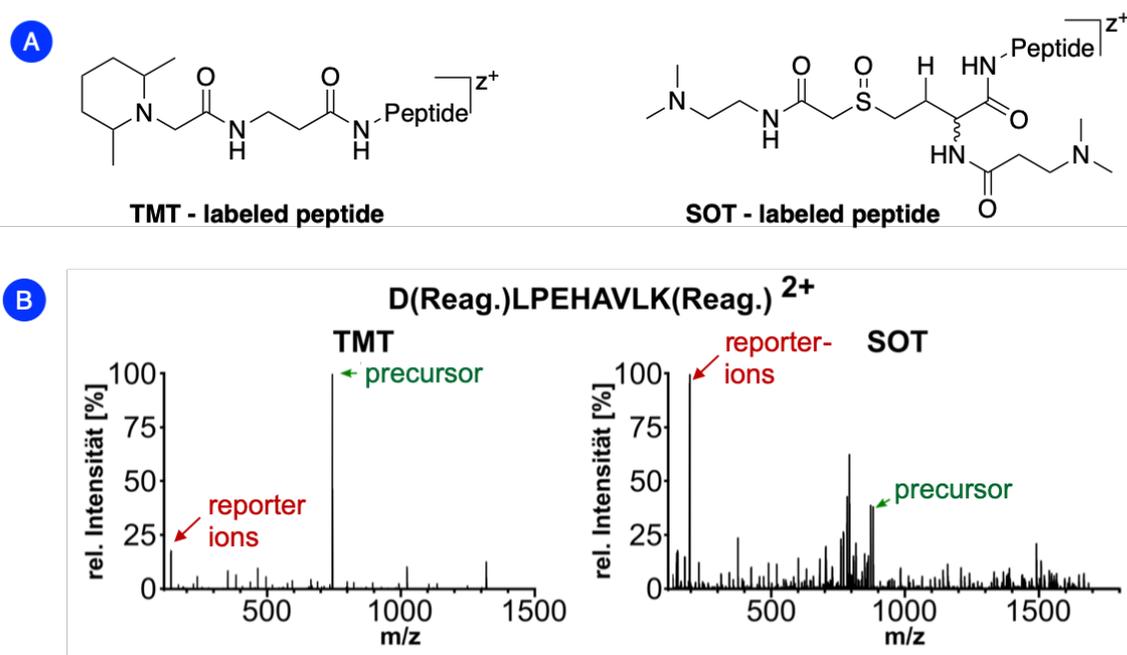
With the goal of accurate protein quantification, a novel sulfoxide-based isobaric labeling reagent, the SulfOxid-Tag (SOT), was developed for the accurate quantification of peptides in complex samples. Due to an effective sulfoxide cleavage, the SOT tag enables the interference-free quantification of already established reporter ions as well as peptide-coupled balancer conjugates (complementary ions) at low collision energy in the gas phase.



**Figure I** Representation of the novel sulfoxide tag (SOT) with a cleavable sulfoxide group, a reporter group, balancer and amine-reactive NHS functionality.

In addition to the synthesis of the unlabeled SOT<sup>0</sup> tag, the <sup>13</sup>C-labelled variant (SOT<sup>180</sup>) of the reagent was synthesized for quantitative studies, particularly compared to the established TMT reagent. Mass spectrometric measurements clearly demonstrated that

SOT-labelled peptides fragment more efficiently than TMT-labelled peptides. In addition, they are in a higher charge state, resulting in more intense formation of complementary ions and higher reporter ion intensities. Especially the efficient formation of peptide coupled balancer conjugates significantly reduced the distortion effect of co-eluting peptide ions. This method was able to provide a more accurate quantification of a strongly distorted sample.

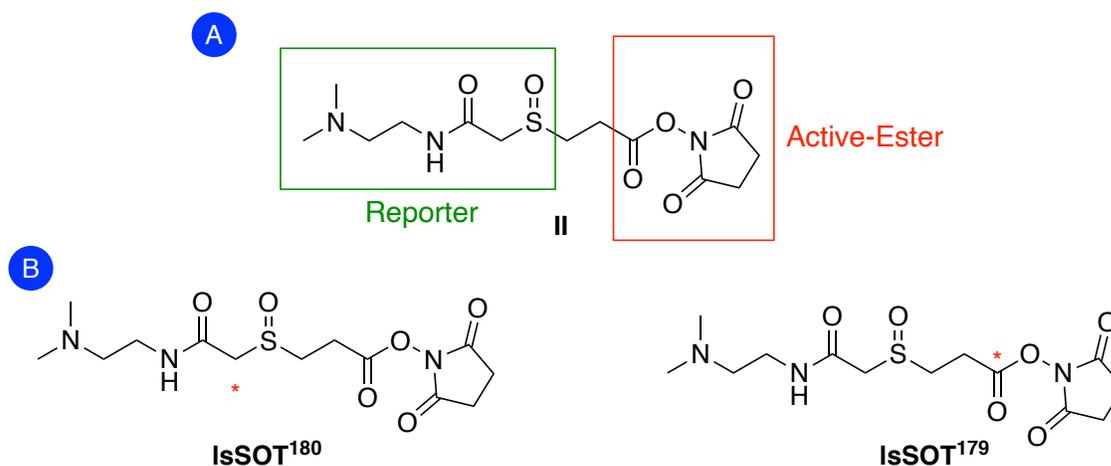


**Figure II** Fragmentation behavior of the novel SOT tag compared to the established TMT tag. **A)** Prefragmentation of a TMT- and SOT-labelled peptide. **B)** Direct comparison of the peptide fragmentation between TMT and SOT on a double-labelled double positive charged peptide DLPEHAVLK at a normalized HCD energy of 28% HCD.

However, despite accurate quantification, SOT-labelled peptides showed a decrease in peptide identification rate compared to TMT. The labeling efficiency of SOT-labelled peptides was also significantly lower than that of TMT-labelled peptides. In the second part of this PhD thesis, a sterically less demanding SOT reagent was developed. In

---

addition, an HPLC method was developed, which made it possible for the first time to present the hydrolysis-sensitive end products in high purity.



**Figure III A)** Presentation of the test reagent IsSOT-Tag to investigate the influence of the missing mass equalizer group on labeling efficiency and questioning properties. **B)** Structures of the duplex reagent set of the IsSOT tag to evaluate quantification.

It was demonstrated that very high labeling efficiencies were achieved by using high purity sulfoxide containing molecules.

---

# 1 Einleitung

## 1.1 Massenspektrometrie in der Proteomik

Sämtliche Erbinformation einer Zelle, die in der DNA gespeichert und kodiert ist, wird in Eiweißmoleküle übersetzt. Daraus resultierende Proteine variieren durch die Reihenfolge von 20 verschiedenen Aminosäurebausteinen.<sup>1</sup> Während die DNA rein als Informationsträger dient, sind Proteine die Funktionsträger in der Zelle. Das humane Genom besteht aus 3.6 Milliarden Basenpaaren<sup>2</sup> und etwa 19.000-20.000 Genen<sup>3</sup>. Die Information wird kodiert durch die unterschiedliche Abfolge der vier kanonischen Basen Adenin (A), Guanin (G), Cytosin (C) und Thymin (T). Hinzu kommen epigenetische Basen wie 5-Carboxycytosin (caC), 5-Formylcytosin (fC)<sup>4</sup>, 5-Methylcytosin (mC)<sup>5</sup> und 5-Hydroxymethylcytosin (hmC)<sup>6, 7</sup> dessen Anwesenheit transkriptionale Aktivität beeinflusst. Im Vergleich zum Genom bestehen Proteine aus mehr als 20 kanonischen proteinogenen Aminosäuren. Dies ermöglicht es der Natur Proteine verschiedenster chemischer Funktionalität zugänglich zu machen. Das Proteom vereint die Summe aller Proteine in einem Organismus oder einer Zellpopulation an einem definierten Ort zu einem bestimmten Zeitpunkt.<sup>8</sup> Diese zusätzliche Definition über Bedingungen und Zeitpunkt ist im Vergleich zum statischen Genom notwendig, da das Proteom wesentlich mehr Veränderungen unterliegen kann.<sup>85</sup> Mehr als 10.000 Proteine wurden in einer einzigen menschlichen Zelllinie identifiziert, so dass 10.000 Proteine eine untere Grenze der Komplexität eines menschlichen Proteoms darstellen.<sup>9</sup> All das macht die Erforschung des Proteoms, die Proteomik, deutlich komplexer und anspruchsvoller. Proteine sind für unzählige Aufgaben in der Zelle verantwortlich. Sie wirken zum Beispiel als Katalysatoren (Enzyme), sind für die Erzeugung von Bewegungen (Muskelproteine) zuständig, transportieren andere Moleküle wie zum Beispiel Sauerstoff an Hämoglobin oder verleihen der Zelle Stabilität (Cytoskelett). Auch das Immunsystem (Antikörper) basiert auf der Funktion von Proteinen, ebenso wie die Reizweiterleitung über die Nerven (Rezeptoren, Ionenkanäle).<sup>85</sup> Aufgrund der unterschiedlichen Aufgaben von Proteinen ist das Vorkommen in der Zelle sehr

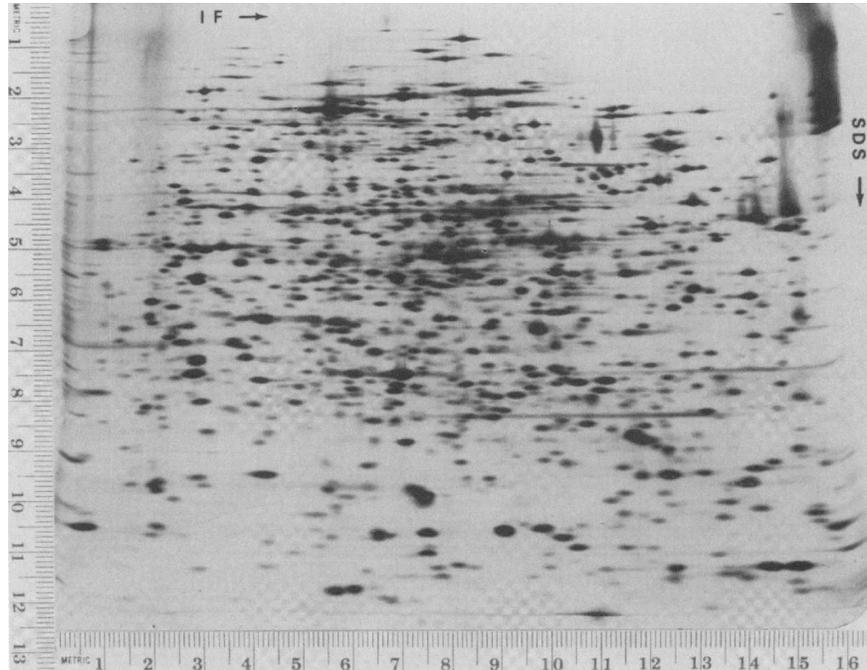
---

---

dynamisch und variabel. Es konnte nachgewiesen werden, dass enorme Änderungen der exprimierten Proteine in Zellen im Zusammenhang mit der Behandlung mit Chemotherapeutika<sup>10</sup>, oder mit dem Fortschreiten des Zellzyklus<sup>11</sup> wie auch der Stimulation durch Hormone<sup>12</sup> erfolgen.<sup>31</sup> Die große Varianz der Häufigkeit macht die Analyse von Proteinen sehr viel anspruchsvoller als die Genomanalyse. Die Abundanzunterschiede vom Genom zum Proteom sind vergleichsweise gering, denn beinahe jede Zelle enthält alle Gene sowie die gleiche Menge des Erbguts.<sup>85</sup> Da alle metabolischen Prozesse durch Proteine erfolgen, ist das Gebiet der Proteomik von höchstem Interesse. Besonders die Verwendung isobarer Markierungsreagenzien hat die Leistung im Bereich der quantitativen Proteomik dramatisch erhöht. Die moderne Proteomik findet auch viele Anwendungsgebiete in der klinischen Diagnostik. Es zeigte sich, dass proteomische Studien dazu beitragen können zu bestimmen, ob eine Person an Alzheimer<sup>13</sup>, Krebs<sup>14,15,16</sup>, Autoimmunerkrankungen<sup>17</sup> oder Infektionskrankheiten leidet.<sup>18,19,20</sup>

## **1.2 Entwicklung der Methoden zur Proteinanalytik**

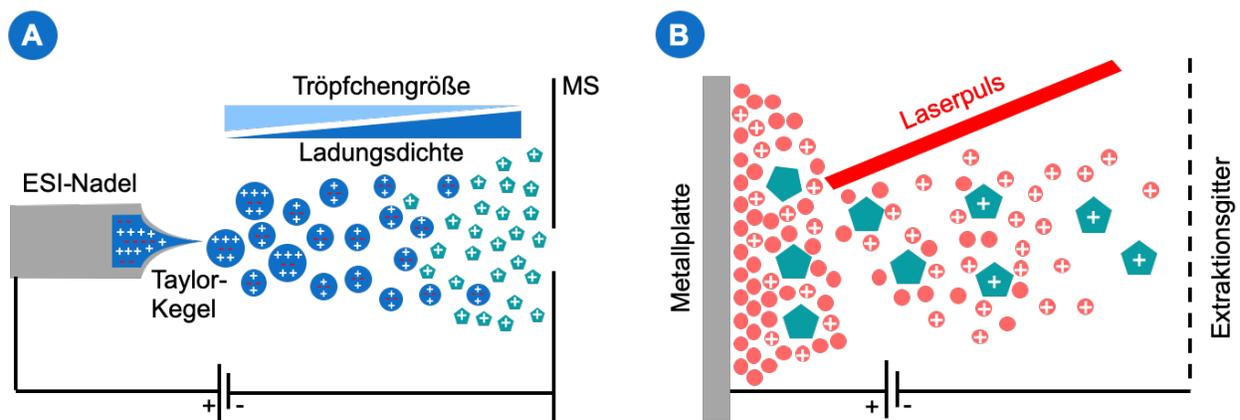
In der Vergangenheit war die zweidimensionale Polyacrylamid Gelelektrophorese, kurz 2D-Page eine gängige Methode zur Proteinanalytik. Sie diente zur Auftrennung komplexer Proteingemische und wurde 1975 gleichzeitig von KLOSE und O'FARREL entwickelt.<sup>21</sup> Der Prozess der 2D-Gelelektrophorese beginnt mit der Denaturierung und der Fixierung der Proteine auf einem pH-Gradientengel. Anschließend beginnt die Auftrennung des Proteingemisches mittels einer isoelektrischen Fokussierung der die Proteine basierend der Molekülgröße auftrennt.<sup>22</sup> Durch das Anfärben mit z.B. Coomassie-Brilliant-Blau werden die Proteine sichtbar gemacht und identifiziert.<sup>23</sup> Zur Anschauung zeigt Abbildung 1 ein Beispiel einer Proteinanalyse mittels der 2D-Gelelektrophorese.



**Abbildung 1** Darstellung einer Proteinanalyse durch die 2D Gelelektrophorese. Die Aufnahme zeigt die Auftrennung einer Proteinmischung eines *E. Coli* Lysats. Entnommen aus. <sup>21</sup>

Die 2D Gelelektrophorese ermöglicht somit die Auftrennung tausender individueller Proteinspezies und sogar deren Quantifizierung. Trotz der guten Auftrennung der 2D Gelelektrophorese gab es dennoch viele Einschränkungen. <sup>24</sup> Bei geringen Proteinmassen-Unterschieden ist es mit dieser Methode unmöglich Modifikationen zu identifizieren. Mit diesen Schwachstellen der 2D Gelelektrophorese begann die Ära MS-basierter Proteomik in den 1980er Jahren mit der Entwicklung von sanften Ionisierungsmethoden, wie beispielsweise der matrixunterstützten Laserdesorption/Ionisation (MALDI) <sup>25</sup> und der Elektrospray-Ionisation (ESI). <sup>26</sup> Die Massenspektrometrie ermöglichte die Generierung sehr genauer Informationen über die Massen von Ionen. Allerdings funktioniert diese Methode nur, wenn die neutralen Spezies zu geladenen Ionen überführt werden, um sie dann in der Gasphase massenspektrometrisch analysieren zu können. Damalige Ionisierungsmethoden wie Elektronenstoßionisation (EI) waren aufgrund der hohen Temperaturen für Peptide oder auch Proteine ungeeignet. Ferner kommt es zu zahlreichen Fragmentierungen in der Gasphase, die diesen Prozess ebenfalls erschwerten. Der Durchbruch gelang durch

die Elektrospray-Ionisation (ESI), die entwickelt wurde von J. B. FENN 1984. Hinzu kommt die von F. HILLENKAMP und M. KARAS entwickelten Matrix-unterstützten Laser-Desorption/Ionisation Methoden (MALDI) aus dem Jahr 1988.<sup>27,28</sup> Somit konnte durch die Nanospray-Techniken nicht nur die Nachweisgrenzen für Peptide in den attomolaren Bereich verlagert werden, sondern auch aufgrund der geringen Flussrate im Vergleich zum ESI-Spray, erhöhte Ionensichtbarkeit sowie eine höhere Toleranz im Vergleich zu Salzen erzielt werden.<sup>29</sup> In Verbindung mit modernen hochleistungsfähigen Trenntechniken bietet dies die Möglichkeit der Quantifizierung vieler tausender Peptide aus sehr komplexen Proben.<sup>30</sup> Abbildung 2 stellt die Prinzipien der Elektrospray-Ionisation dar.



**Abbildung 2** Schematische Darstellung der Ionisierungsmethoden ESI und MALDI für die massenspektrometrischen Untersuchungen von Peptiden. **A)** Ablauf der Ionenbildung in der Elektrospray-Ionenquelle im positiven Modus. Es treten positiv gelöste Ionen am ESI-Emitter aus. Diese werden in Richtung Kathode gezogen. Dabei bildet sich ein Taylor-Konus aus denen die Tröpfchen sich lösen und durch Verdampfung immer kleiner werden was mit der Steigerung der Ladungsdichte einhergeht und zur Bildung von Quasimolekülen führt (Coulomb Explosion). **B)** Funktionsweise der Matrix-unterstützten Laser-Desorption/Ionisation (MALDI). Die Matrix (rot) umgibt die Analyt-Ionen (türkis) in einer sogenannte Co-Kristallisation. Die Matrix nimmt durch den Laser-Beschuss Energie auf, um zusammen mit den Analyten in die Gasphase überzugehen. Es kommt somit zum Ladungstransfer auf die Analyt-Ionen und zur Bildung von Quasimolekül-Ionen. Modifiziert nach.<sup>31</sup>

Die Ionisierung der Elektrospray-Ionisation erfolgt unter normalen Atmosphärendruck wobei sich der zu untersuchende Analyt in einer flüssigen Phase befindet. Eine hohe Spannung zwischen der Flüssigphase und dem Zugang zum Massenspektrometer

---

sorgt für die Bildung eines elektrischen Feldes zwischen der Kapillare und der Gegenelektrode. Es bildet sich hierbei an der Spitze der Kapillare ein Überschuss an gleichartig geladenen Ionen, die sich untereinander abstoßen und dabei über die Bildung eines sogenannten Taylor-Kegels ein feines Aerosol aus geladenen Tröpfchen bilden.<sup>32</sup> Die Evaporation der Lösungsmittelmoleküle erfolgt mit einem neutralen Trägergas wie Stickstoff, was zu einer Verkleinerung der Tröpfchen-Größe führt. Das wiederum hat eine Steigerung der Ladungsdichte zur Folge, die nach Erreichen eines kritischen Maßes (Rayleigh-Limit) in einer so genannten *Coloumb*-Explosion in noch kleinere Tröpfchen zerfällt. Nach dem *Charged Residue* Modell von DOLE<sup>33</sup> kommt es durch eine mehrfache Coulomb-Explosionen zu Tröpfchen, die nur ein einziges Analyt-Ion enthalten. Erst durch das finale Verdampfen des Lösungsmittels entsteht es an der Eintrittsstelle zum Massenspektrometer das freie Ion.<sup>34</sup> Das zweite von IRIBANE und THOMSON IEM Modell (Ionenemissionsmodell)<sup>34</sup> geht davon aus, dass bereits aus größeren geladenen Tropfen freie Ionen in die Gasphase emittiert werden. So sorgt eine kontinuierliche Verdampfung und die Emission von freien Ionen für die Aufrechterhaltung der Ionenemission.<sup>85</sup> Jedoch wird für die meisten Proben eine Kombination aus beiden möglichen Mechanismen angenommen. Auch die Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (MALDI) ist ein seit vielen Jahren etabliertes Verfahren zur Ionisation von Molekülen. Die Ionisation bei der MALDI findet allerdings innerhalb einer festen Phase in einem Vakuumbereich statt und beruht auf der Cokristallisation von Matrix und Analyt. Als Matrixsubstanz werden kleine organische Moleküle wie  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymethylsäure oder Sinapinsäure verwendet, da diese in der Lage sind die Energie und das Licht des Laserstrahls effizient zu absorbieren. Die Anregung erfolgt dann durch den Beschuss von hochenergetischen Laserpulsen. Dabei nimmt die Matrix Energie auf und wird zusammen mit dem Analyten von der Metallplatte desorbiert. Die eingeschlossenen Analytmoleküle werden dabei zusammen mit der Matrix in das Vakuum des Massenspektrometers überführt und der massenspektrometrischen Analyse zugänglich gemacht.<sup>35</sup> Ein Vorteil der ESI-Ionisation im Vergleich zur MALDI ist die Online-Kopplung an einem LC-System. Mithilfe dieser Kopplung kann die Analyse komplexer Proben ermöglicht werden, da

---

mittels der LC eine Auftrennung der Analyten erfolgen kann.<sup>36</sup> Ferner erzeugt die ESI-Methode häufig mehrfach positiv geladenen Molekül-Ionen, die gerade die Messungen von sehr großen Molekülen, wie z.B. Proteine, ermöglicht. Allerdings ist die MALDI-Ionisation im Vergleich zur ESI-Methode weniger empfindlich gegenüber Verunreinigungen wie Salzen.<sup>37</sup>

Zusammenfassend machte die Etablierung beider milden Ionisationsmethoden eine Vielzahl von Biomolekülen der massenspektrometrischen Analyse zugänglich. Mit dieser Erkenntnis wurde 2002 der Chemienobelpreis zur Hälfte an JOHN B. FENN und KŌICHI TANAKA verliehen, welcher ähnlich zur MALDI eine weitere Laser-geschützte Methode entwickelte.<sup>38</sup> Durch die Anwendung dieser Methoden wurde es möglich bereits eine Vielzahl von Proteinen,<sup>39</sup> Peptiden,<sup>40</sup> Oligonukleotiden<sup>41,42</sup> und weitere Polymere<sup>43</sup> zu ionisieren und auch massenspektrometrisch zu analysieren.

### **1.3 Die Prinzipien der Proteinidentifikation in der MS**

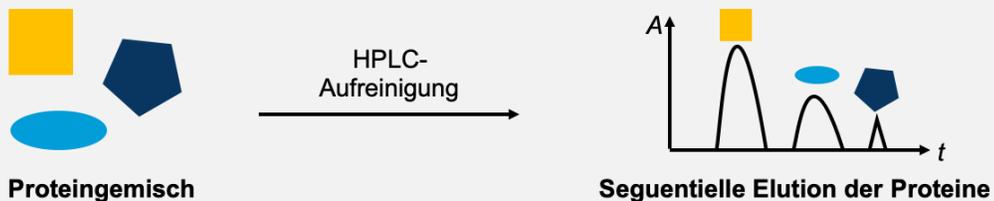
In der MS-basierten Proteomik-Forschung haben sich zwei komplementäre Methoden etabliert: die „*top-down*“ vs. die „*bottom-up*“ Strategie (Abbildung 3).<sup>44,45</sup> Bei der sogenannten „*top-down*“-Methode werden intakte, unverdaute Proteine gemessen.<sup>29</sup> In der Proteomik werden allerdings selten einzelne Proteine analysiert, weswegen es bei dieser Methode notwendig ist die Proteine über eine HPLC voneinander zu separieren. Nach einer erfolgreichen Separierung erfolgt im nächsten Schritt die Ionisation in der Gasphase. Allerdings wird bei besonders komplexe Proteingemische die „*bottom-up*“ Strategie bevorzugt.

Der sogenannte „*bottom-up*“ Ansatz, der auch unter der Bezeichnung *Shotgun* Methode bekannt ist, ist mittlerweile zur Standardmethode der Proteinanalyse geworden. Im Rahmen dieses Ansatzes kommt es zunächst zu einer enzymatischen Verdauung der Proteine, dies wird häufig mit dem Enzym Trypsin zum durchgeführt.<sup>46</sup> Anschließend werden die Peptide via Flüssigkeitschromatographie gekoppelt und mittels LC-MS/MS analysiert. Die durch die Fragmentierung im Massenspektrometer erzeugten

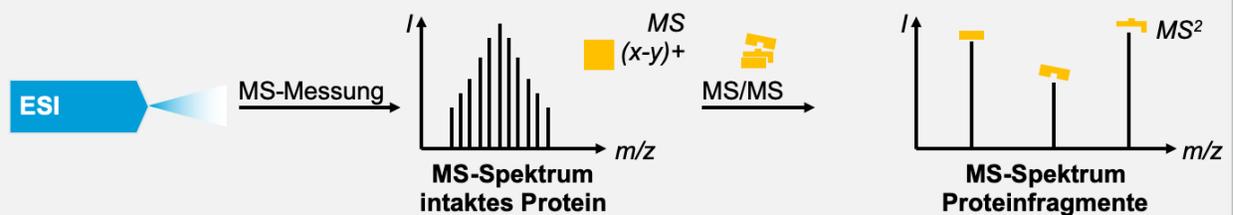
Peptidfragmenten können Rückschlüsse auf die vorhandenen Proteine liefern. Die Proteinidentifizierung wird mit dem Einsatz geeigneter Software, wie beispielsweise SEQUEST<sup>47</sup> oder MASCOT, durchgeführt.<sup>48</sup> Die dadurch erzeugten Daten werden im automatisierten Datenbankabgleich analysiert. Im Zusammenhang mit der Analyse intakter Proteine besteht auch die Möglichkeit, einen Top-Down Ansatz zu wählen, in dessen Rahmen eine Messung intakter, unverdauter Proteine im Massenspektrometer durchgeführt wird. Allerdings ist diese Methode weniger für komplexe Proteinmischungen geeignet.

## A Top-down-Ansatz

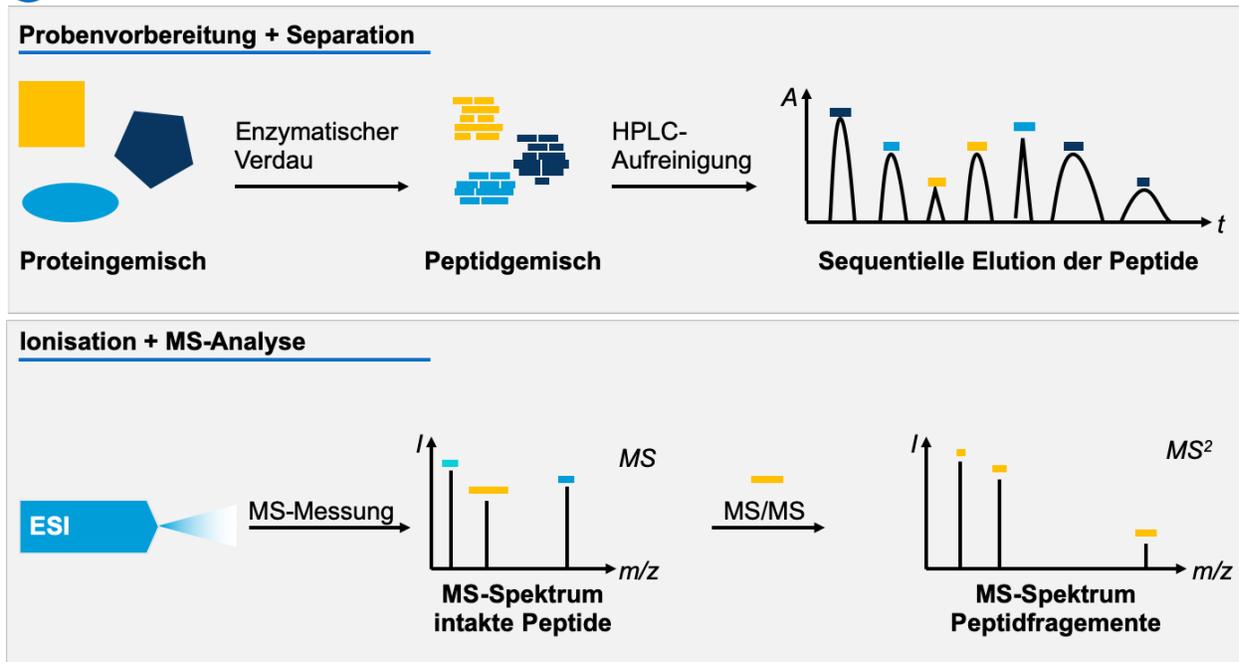
### Probenvorbereitung + Separation



### Ionisation + MS-Analyse



## B Bottom-up-Ansatz

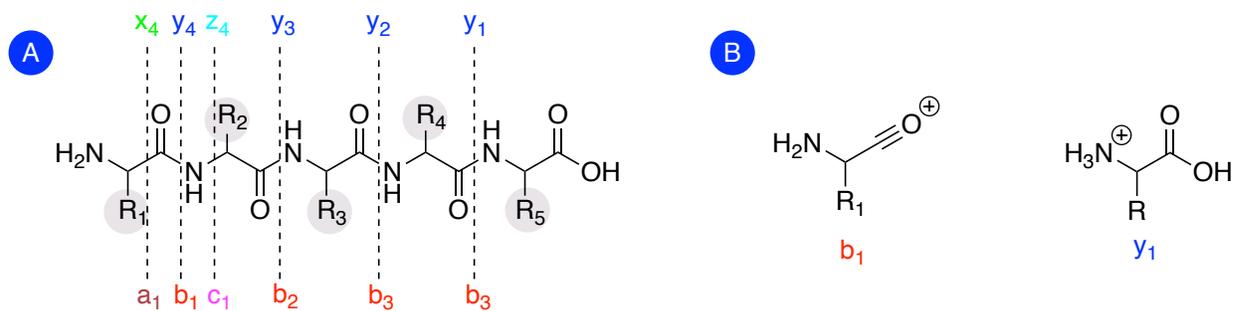


**Abbildung 3** Vergleich der zwei an den häufigsten verwendeten Methoden in MS-basierten Proteomikexperimenten. **A)** Im Rahmen des „top-down“ Ansatzes wird ein Proteingemisch nach einer HPLC-Aufreinigung massenspektrometrisch analysiert. Die Proteinionen werden in einem MS/MS-Experiment in der Gasphase isoliert und fragmentiert, um somit die Massen von Peptiden als Proteinfragmente zu detektieren. **B)** Im „bottom-up“ Ansatz wird die massenspektrometrische Analyse auf dem Peptid-Level durchgeführt. Die Proteine werden hier als erstes enzymatisch verdaut, gefolgt von einer HPLC-Separation und einem MS/MS-Experiment. Im MS<sup>1</sup>-Spektrum werden die intakten Peptide gemessen wohingegen im MS<sup>2</sup>-Scan die Fragmentierung der Peptide erfolgt, um sequenzspezifische Fragmente zu detektieren und deren Massen zu bestimmen.

### 1.4 Peptidfragmentierung und -identifizierung

Mit Hilfe der Massenspektrometrie ist es heute möglich bereits geringe Mengen eines oder mehrerer verschiedener Proteine zu identifizieren. Es ist allerdings bei der Identifikation nicht ausreichend nur die Peptidmasse akkurat zu bestimmen, da es eine enorme Anzahl an möglichen Peptiden und somit an möglichen Peptidsequenzen gibt, die innerhalb der geringen Fehlergrenzen übereinstimmen. Zunächst wird zur Identifikation der Peptide ein Massenspektrum über den gesamten  $m/z$  Bereich gemessen, um die intakte Peptidmassen zu erfassen. Die selektierten

Peptidkandidaten mit dem Ladungszustand +2 werden anschließend im Massenspektrometer fragmentiert, um ein MS<sup>2</sup>-Spektrum aufzunehmen. Eine Aufschlüsselung der Aminosäuresequenz kann im Weiteren über die Fragmentierung im Massenspektrometer erfolgen.<sup>49</sup> Unmodifizierte Peptide brechen in der Gasphase üblicherweise zuerst am Amid-Rückgrat. Es bilden sich sogenannte Ionenserien aus, die sich aus der Spaltung des Peptides entlang der Amidbindungen ergeben. Die in Abbildung 4 gezeigte Nomenklatur der Peptide wurde von JOHNSON *et al.* 1987 etabliert.<sup>50</sup>



**Abbildung 4** Fragmentierung intakter Peptidionen in einem MS/MS-Experiment. **A)** Darstellung der nach JOHNSON *et al.* benannten Ionenserien. **B)** Übersicht der im positiv-Modus entstehenden b- und y-Ionen.

Eine gängige Methode zur Fragmentierung von Peptiden ist die kollisionsinduzierte Dissoziation<sup>51</sup> (*collision-induced dissociation*, CID). Bei dieser Methode wird eine stoßinduzierte Dissoziation verwendet in der die Gasatome bzw. -moleküle mit den Analytationen kollidieren und somit durch Energieübertragung fragmentieren. Dabei erzeugt das Neutralgas oder auch Stoßgas, meist Helium, Mehrfachstöße mit dem Analytation bis dessen Energie so hoch ist, dass es schließlich in Fragmente zerfällt. Anschließend werden die Fragmentationen mit steigendem m/z-Verhältnis aus der Ionenfalle durch Regulierung der Spannung entlassen.<sup>85</sup> Bei der CID-Fragmentierung bilden sich bevorzugt b- und y-Ionen aus. Eine weitere kollisionsinduzierte Fragmentierungsmethode ist die in der die Analytationen über eine spezielle Kollisionskammer (Oktupol-Kollisionskammer) fragmentiert werden. Zur Beschleunigung der fragmentierten Ionen in der Kollisionskammer wird eine höhere Spannung angelegt als bei der CID Methode (*higher energy collisional dissociation*,

---

HCD).<sup>52</sup> Durch die weitaus höhere Energie werden die Analytionen bereits bei nur wenigen Kollisionen mit dem Stoßgas fragmentiert. So kommt es zu weniger Neutralverluste an den Peptiden und macht diese besser detektierbar. Nach der HDC Fragmentierung werden die Fragmente in der Orbitrap detektiert, was ebenfalls die Maßgenauigkeit erhöht.<sup>85</sup> Es werden ebenso wie bei der CID b- und y-Ionen gebildet. Eine weitere Möglichkeit zur Fragmentierung ist die ETD-Methode<sup>53</sup> (*electron-transfer dissociation*, EDT). Die Fragmentierung wird durch die Übertragung von Elektronen durch den Einsatz eines stabilen Radikalanions initiiert. Die Anionen (Fluoranthren) übertragen in der Ionenfalle ein Elektron an ein Peptid und induzieren so dessen Fragmentierung. Bei dieser Methode werden c- und z-Ionenserien erzeugt.<sup>54,85</sup>

Bei allen Methoden beinhalten die Fragmentionen Informationen über die Aminosäuresequenz des isolierten Peptids. Nach der Messung der Peptide mittels LC/MS/MS werden je nach Komplexität der Probe hunderte bis zehntausende Spektren erhalten, die mithilfe von Datenanalysebanken ausgewertet werden können. Allerdings lässt sich die gesamte Peptidsequenz nicht immer nur aus den Fragment-Ionen schließen. Es gibt darüber hinaus Datenbankanalysen mit einer großen Anzahl an Proteinsequenzen, die bei der Identifikation von Peptiden Aufschlüsse geben. Es stehen mehrere Algorithmen wie ANDROMEDA, SEQUEST oder MASCOT zur Datenanalyse zur Verfügung.<sup>55, 56</sup>

## **1.5 Methoden zur Quantifizierung von Proteinen in der MS**

Neben der Erkenntnis wichtiger Informationen einzeln Proteome ist für viele biologische Prozesse der Vergleich mehrere Proteome untereinander vielmehr von Interesse.<sup>57,24</sup> Die moderne quantitative Proteomik liefert eine bedeutsame Übersicht über alle Proteine, welche unter bestimmten Voraussetzungen Teil eines biologischen Systems sind. Während der letzten Jahre kam es zur Entwicklung einer großen Anzahl von quantitativen Proteomik-Methoden, durch die eine hohe Proteomabdeckung erzielt wird. Darüber hinaus ermöglichten diese Methoden eine genaue Quantifizierung, welche auf viele unterschiedliche Probenotypen angewendet werden können. In diesem

---

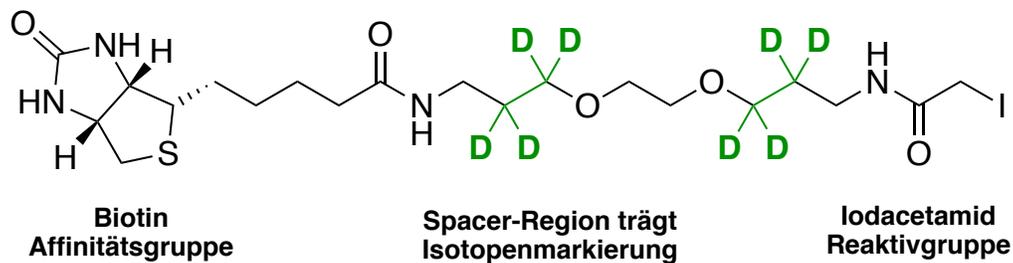
Zusammenhang hat sich vor allem die Quantifizierung über metabolische Markierung<sup>58</sup>, die markierungsfreie Quantifizierung und die Quantifizierung über chemische Markierung<sup>59</sup> etabliert. Aus diesem Grund wurden Methoden entwickelt, die eine relative Quantifizierung von Analyten zwischen den Proben erlauben.

Eine Methode zur Peptidquantifizierung ist die markierungsfreie Quantifizierung (eng. *label-free quantification*, LFQ). Es handelt sich bei dieser Methode um eine der am häufigsten angewandten Quantifizierungsmethoden, bei der, wie der Name bereits impliziert, Isotopenmarker bei der Quantifizierung verwandt werden. Die LFQ Methode lässt sich in zwei unterschiedlichen Herangehensweisen unterteilen. Zum einen die direkte Quantifizierung, die die Signalintensitäten der intakten Peptide im MS<sup>1</sup>-Scan als Grundlagen der Quantifizierung bietet und die indirekte Quantifizierung durch das Auszählen der Spektren. Erstere verwendet die MS-Signalintensitäten der Vorläufer-Ionen im MS<sup>1</sup>-Scan, welche über deren gesamten Retentionszeit zusammengefasst werden.<sup>60</sup> Wird dabei angenommen, dass die Bedingungen der gemessenen Proben während der Elution identisch sind, können die Integrale der Peptidsignale untereinander verglichen werden, wobei sich die rel. Verhältnisse der jeweiligen Proteine ergeben.<sup>61, 62, 63</sup> Aufgrund der getrennten Probenanalysen ist die geringe Reproduzierbarkeit ein Nachteil der markierungsfreien Quantifizierung. So ist eine exakt identische Probenvorbereitung unabdingbar.

### **1.5.1 Massen Tags - Markierungsbasierte Quantifizierungsstrategien**

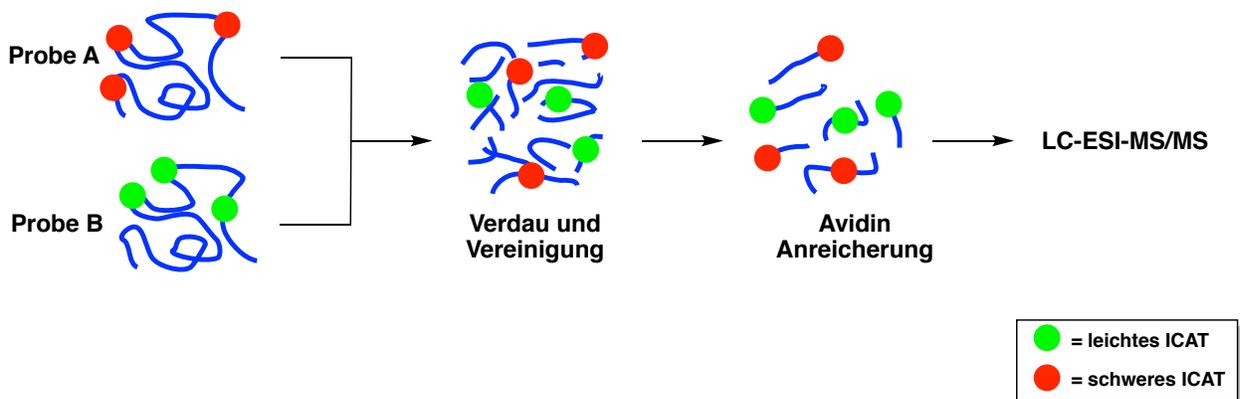
Alternative Methoden zur markierungsfreien Quantifizierung stellt die stabile Isotopenmarkierung von Proteinen in Proben vor der Analyse dar.<sup>64</sup> Die Markierung wird durch die Verwendung von kombinatorischen, schweren Isotopologen von C, H, N und O ermöglicht. Diese Standards sind stabile Isotope, die eine andere Masse als die vornehmlichen vorkommenden Isotope und sich deshalb im Massenspektrum unterscheiden. Die Einbringung der Isotope in die Proteine kann entweder mit metabolischen Mitteln oder durch chemische Derivatisierungsprozesse erfolgen. Die stabile Isotopenmarkierung oder kurz auch SILAC (eng. *stable isotope labeling with amino acids in cell culture*) ist dabei eine bewährte Art der Isotopenmarkierung.<sup>65,66</sup>

Hierbei werden die zu untersuchenden Proben mit verschiedenen Nährböden inkubiert, wobei dem Kulturmedium hierbei isoto­penmarkiertes Lysin und Arginin ( $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ) zugegeben wird. Die Quantifizierung erfolgt dabei über den Vergleich der MS-Intensitäten der markierten und unmarkierten Peptide. Die limitierte Anzahl an isoto­penmarkierten Versionen an Aminosäuren begrenzt auch die Anzahl an Zellzuständen, die verglichen werden können. Um diese Einschränkung zu umgehen, wurden Techniken wie die isoto­penkodierte Affinitäts-Tags (eng. *Isotope-coded affinity tag*, ICAT), oder auch isobare Massen-Tags entwickelt.<sup>67,68</sup>



**Abbildung 5** Darstellung des ICAT Reagenzes.

ICATs sind isoto­penmarkierte Affinitätsmarker, die als biotinylierte Iodacetamid-Derivate mit der Sulfhydrylgruppe der Cystein-Seitenketten denaturierter Peptide reagieren.<sup>59</sup> Abbildung 5 zeigt die Struktur eines ICAT Reagenzes. ICAT-Reagenzien verfügen zusätzlich zu einer variablen isoto­penmarkierten Linkerregion über eine Biotin-Gruppe zur Affinitätsanreicherung der markierten Peptide.



---

**Abbildung 6** Darstellung eines Experimentes mit dem ICAT-Reagenz. Proben A und B werden zunächst mit dem Reagenz-Set derivatisiert. Anschließend erfolgt der Verdau sowie die Vereinigung der beiden Proben. Über das Verhältnis der Signalintensitäten der leicht bzw. schwer markierten Peptidpaare erfolgt dann die Quantifizierung im MS<sup>1</sup>-Spektrum.

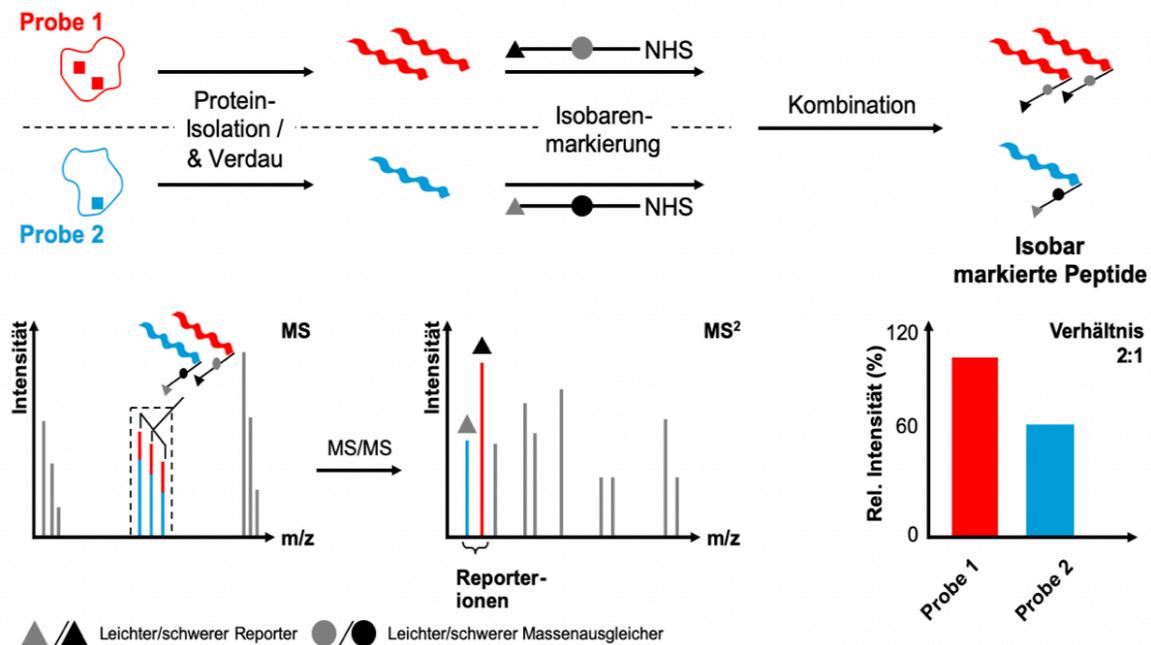
Um zwei Proteome quantitativ vergleichen zu können, wird eine Probe mit der leichten Version des Isotops markiert und die andere mit der schweren Version. Anhand der entstehenden Dupletts durch die Kombination von Proben, die entweder mit schwerem oder leichtem ICAT-Label markiert werden, kann so die Quantifizierung im MS<sup>1</sup>-Spektrum erfolgen. Abbildung 6 zeigt die schematische Darstellung eines typischen ICAT-Experiments.

### 1.5.2 Isobare Massen-Tags

In der Isobarenmarkierung oder auch Tandem-Massenspektrometrie der Proteomik werden Chemikalien verwendet, die aus drei Teilen bestehen. Sie beinhalten eine Reaktiv-Gruppe, eine Reporter-Gruppe und die Massenausgleicher-Gruppe, auch *Balancer*-Gruppe genannt. Eine massenspaltbare Gruppe verknüpft hierbei die *Balancer*- und die Reporter-Gruppe miteinander. Entscheidend bei der isobaren Quantifizierung ist, dass die Gesamtmasse der isobaren Massen-Tags identisch ist, während sich die schweren Isotope innerhalb der Struktur unterschiedlich verteilen. Die *Balancer*-Gruppe trägt hierbei zum Ausgleich der Massendifferenz bei, die beim Einbau verschiedener Isotope im Molekül entsteht. Am häufigsten werden isobare Tags eingesetzt, die aminreaktiv sind. Die aminreaktiven isobaren Massen-Tags reagieren mit dem N-Termini und den Lysin-Seitenketten der Peptide. Es stehen jedoch für spezielle Applikationen Reagenzien zur Verfügung, die beispielsweise Cystein- oder Carbonyl-reaktiv sind. Üblicherweise kommen als aminreaktive isobare Massen-Tags NHS-Ester (N-Hydroxysuccinimid) zum Einsatz. Der aminreaktive NHS-Ester reagiert mit den N-terminalen Amingruppen und den ε-Amingruppen von Lysinresten. Bei der isobaren Quantifizierung sind vor allem die Reporter-Gruppe und die *Balancer*-Gruppe von entscheidender Bedeutung. Beide Gruppen sind über eine spaltbare Gruppe verbunden, so dass bei der Fragmentierung in der Gasphase die Reporter-Gruppe vom Rest des Peptidkonjugats getrennt werden kann. Über die relativen Verhältnisse der

Reporter-Intensitäten können quantitative Informationen, die zu analysierenden Peptide der verschiedenen Proben, abgeleitet werden. Neben den im MS<sup>2</sup>-Spektrum erhaltenen Signalen der Reporter-Gruppen, können zusätzlich auch über die Signale der *Balancer*-Konjugate quantifiziert werden.<sup>69</sup>

In Abbildung 7 ist der schematische Verlauf eines allgemeinen isobaren Markierungsexperimentes gezeigt. Zur Untersuchung zwei verschiedener Proben werden diese nach dem enzymatischen Verdau individuell markiert. Dies wird gewährleistet durch das Ersetzen einer unterschiedlichen Anzahl an leichten Isotopen mit schweren Isotopen in der Reporter-Region der Reagenzien. Vor der Fragmentierung werden die markierten Peptidproben vereint und über eine LC-MS/MS Methode analysiert. Aufgrund der gleichen Massen sind die sequenzgleichen Peptide ununterscheidbar im MS<sup>1</sup>-Scan. Dies liegt darauf begründet, dass die Gesamtmasse der Markierungs-Reagenzien durch den Ausgleich an schweren Isotopen in der *Balancer*-Region alle dieselbe Masse haben. So entsteht im MS<sup>1</sup>-Spektrum ein einziges Signal unabhängig von der Anzahl der zu vergleichenden Proben.



---

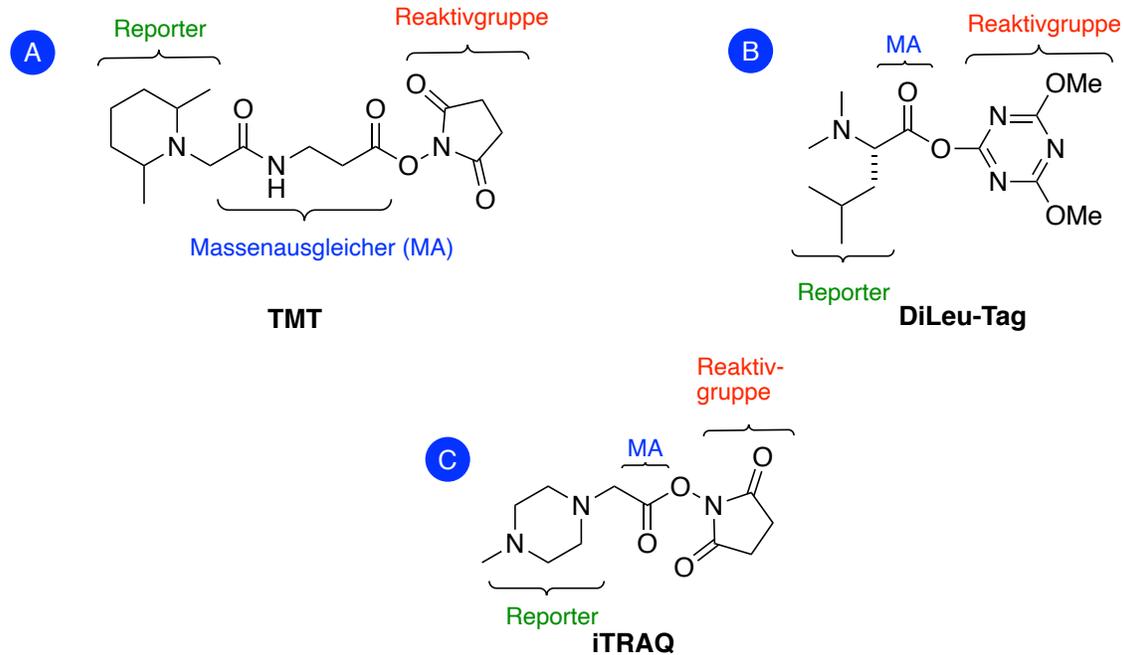
**Abbildung 7** Schematischer allgemeiner Ablauf eines isobaren Markierungsexperiments zur Quantifizierung von zwei Proben. Nach dem proteolytischen Verdau der Proteine, werden die erzeugten Peptide mit den isobaren Markierungsreagenzien markiert, kombiniert und analysiert. Aufgrund der gleichen Gesamtmasse der Reagenzien erscheinen die Peptidsignale der Proben als ein Peak im MS<sup>1</sup>-Scan. Nach der Isolierung und Fragmentierung der Vorläufer-Ionen erscheinen zwei unterscheidbare Signale im MS<sup>2</sup>-Spektrum. Die relativen Verhältnisse der Reporter-Ionen Intensitäten gibt die relative Menge der zu analysierten Peptide der Proben an. Modifiziert nach der Publikation.<sup>84</sup>

Anschließend können im MS<sup>2</sup>-Spektrum die abgespaltenen Reporter-Ionen-Intensitäten, die sich im niedrigen m/z-Bereich befinden, relativ zueinander quantifiziert werden.

### 1.5.3 TMT und iTRAQ - Isobare Massen-Tags

Erste Synthesen zur Darstellung von Reagenzien zur Isobarenmarkierung wurden bereits im Jahr 2003 von THOMPSON *et al.* veröffentlicht. Die ersten Reagenzien bestanden aus Deuterium-markierten Peptiden und enthielten aminreaktive NHS-Ester. Diese über Festphasensynthese hergestellten Peptide, nannten sie **Tandem mass tags** (TMT).<sup>67,75</sup> Aufgrund von störenden Isotopeneffekten bei Verwendung von Deuterium-Isotopen wurden in moderneren Reagenzien Isotope wie <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N oder <sup>18</sup>O verwendet. Weitere Anpassungen der damaligen Strukturen zu einem verbesserten kompakteren Molekül machten eine Kommerzialisierung zum heutigen TMT-Reagenz, welches bereits als 11-plex erhältlich ist, möglich.<sup>70,71</sup>

Eine weitere sehr attraktive Alternative zu TMT auf einem ähnlichen Prinzip basierend, sind die DiLeu-Tags<sup>72</sup> und die iTRAQ-Reagenzien <sup>68</sup> (Abbildung 8, B & C). DiLeu-Tags ermöglichen die relativen Quantifizierungen von Peptiden. Die aminreaktive Gruppe des Reagenzes bindet dabei an den N-Terminus und die ε-Aminogruppen der Lysin-Seitenketten eines Peptids. Besonderheiten des DiLeu-Reagenzes sind, neben den geringen Massen des Tags, die hohen Intensitäten der Reporter-Ionen im Vergleich zum TMT-Reagenz.



**Abbildung 8** Strukturen verschiedener isobaren Markierungsreagenzien in der Proteomik: **A)** Tandem Mass Tag (TMT); **B)** *N,N'*-Dimethyl Leucin Tag (DiLeu) und **C)** iTRAQ (*isobaric Tags for Relative and Absolute Quantification*).

#### 1.5.4 Vorteile der isobaren markierungsbasierten Quantifizierungsstrategie

Die Vorteile der isobaren Markierung in Hinblick auf Präzision und Reproduzierbarkeit im Vergleich zu den zuvor genannten Methoden sind zweifellos. Verglichen mit den übrigen stabilen isotopebasierten Markierungstechniken, ist die isobare markierungsbasierte Quantifizierung aus verschiedenen Gründen vorteilhaft. Obwohl die MS<sup>1</sup>-basierte Isotopenmarkierung eine exquisite Quantifizierung für viele Peptide bietet, fehlt die Multiplexing-Fähigkeit. So müssen viele Proben einzeln analysiert werden, was die Messgenauigkeit einschränkt und eine erhebliche Gerätezeit erfordert.<sup>73</sup> Die Multiplex-Proteomik, basierend auf isobaren Markierungsreagenzien, verspricht diese Limitierungen zu überwinden beziehungsweise abzuschwächen.<sup>67</sup> Isobare Tags sind Reagenzien, die im Gegensatz zu den zuvor diskutierten, isotopebasierten Methoden wie SILAC, identische Gesamtmassen aufweisen. Der einzige Unterschied besteht darin, wie die schweren Isotope entlang des Tags verteilt sind. Aufgrund der unterschiedlichen Verteilung der schweren Isotope im

---

gesamten Reagenz, entstehen nach der Fragmentierung im MS<sup>2</sup>-Spektrum Reporter-Ionen mit unterschiedlichen Massen, je nachdem aus welcher Probe das Peptid stammt. Identische Peptide eluieren aus verschiedenen Proben somit gleichzeitig und erscheinen daher als ein einziges Signal im MS<sup>1</sup>-Spektrum. Dies ist ein großer Vorteil im Vergleich zu anderen Quantifizierungsmethoden, da die Komplexität der MS<sup>1</sup>-Spektren mit der Anzahl der Proben nicht zunimmt. Dies steht im Gegensatz zu SILAC-ähnlichen Experimenten, bei denen selbst der Vergleich von Replikaten die Anzahl der Signale in den MS<sup>1</sup>-Spektren verdoppelt. Daher ist die Anzahl der Bedingungen, die mit isobaren Tag-Experimenten in einem einzigen Experiment verglichen werden können, höher (derzeit bis zu 11) als bei SILAC-ähnlichen Methoden. Die Quantifizierung erfolgt nach Isolierung und Fragmentierung dieser markierten Peptide im MS<sup>2</sup>-Spektrum.

## **1.6 Herausforderungen und Lösungsansätze der Isobarenmarkierung**

Paralleles Multiplexing ist neben einer akkuraten Quantifizierung eines der wichtigsten Eigenschaften der isobaren Markierungsstrategie. Allerdings zeigte sich, dass es bei dieser Methode zu einer Verzerrung der Verhältnisse kommt einer sogenannten *ratio-distortion*.<sup>70, 74, 69</sup> Die Intensitäten der Reporter-Ionen verhalten sich so zueinander, wie es der relativen Häufigkeit der Peptide entspricht, von denen die Ableitung erfolgt. Werden die relativen Quantifizierungsdaten zu den Peptiden integriert, ergeben sich daraus Erkenntnisse über die relative Proteinexpression. Bei sehr komplexen Proteinmischungen kommt es jedoch zu einer Verzerrung der Verhältnisse durch co-eluierender Peptide. In diesem Unterkapitel geht es um spezifische Fragen und Herausforderungen der Datenanalyse, die im Rahmen der markierungsbasierten isobaren Quantifizierung auftreten.

### **1.6.1 Bewertung der Markierungseffizienz und Korrektur von Isotopenverunreinigungen**

---

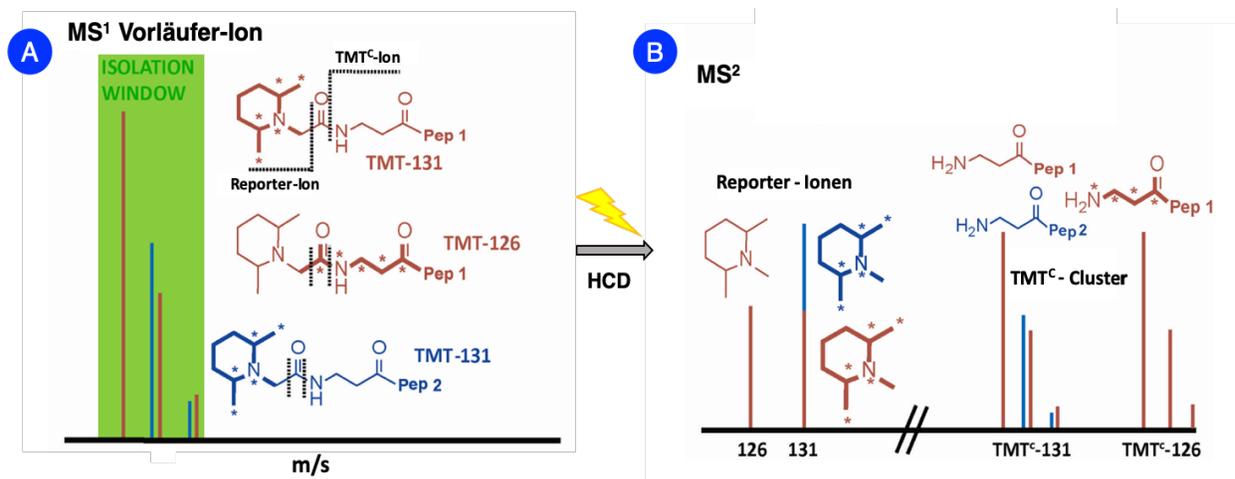
Eine akkurate Quantifizierung in der Isobarenmarkierung setzt voraus, dass die Signale der Reporter-Gruppen nur von dem zu quantifizierenden Peptid ausgehen. Jedoch lässt sich eine Verzerrung der Mengenverhältnisse durch interferierende Ionen in komplexen Proben kaum vermeiden. Bei der Isobarenmarkierung wird neben dem Zielpeptid auch Peptide mit ähnlichen  $m/z$ -Verhältnissen markiert und isoliert. Im  $MS^2$ -Spektrum kann zwischen dem Signal des interferierenden Ions und dem eigentlich zu quantifizierenden Peptid-Signal nicht unterschieden werden und so kommt es zu einer Überlagerung der beiden Quellen. Dieser Effekt der Verfälschung der Mengenverhältnisse wird als *ratio distortion* bezeichnet.<sup>75</sup>

In den vergangenen Jahren wurden verschiedene Konzepte und Ansätze zur Lösung des *ratio distortion* Problems vorgestellt:

- 1) Die zweite Gasphasenisolation ( $MS^3$ -Methode) nach TING *et al.*<sup>70</sup>
- 2) Protonen-Transfer-Ionen-Reaktion von WENGER *et al.*<sup>75</sup>
- 3)  $TMT^C$ -Methode nach WÜHR *et al.*<sup>69</sup>

Im Jahr 2011 veröffentlichten TING *et al.* eine Methode, die auf der Gasphasenaufreinigung beruht. In der  $MS^3$ -Methode wird die Quantifizierung anstatt im  $MS^2$ -Spektrum im  $MS^3$ -Spektrum durchgeführt. Das intensivste Signal im  $MS^2$ -Spektrum wird reisoliert und erneut fragmentiert. Der Unterschied der ersten Fragmentierung im  $MS^2$ -Scan ist nur, dass die Fragmentierung der Peptid-Ionen mit CID erfolgt und im  $MS^3$ -Scan mit HCD. Diese Gasphasenaufreinigung liefert somit durch einer weitere Co-Isolation die Möglichkeit, mögliche Interferenzen zu minimieren.<sup>70</sup> Eine weitere Methode, die auf Basis der Gasphasenaufreinigung beruht, wurde ebenfalls im Jahr 2011 von WENGER *et al.* veröffentlicht – die Protonen-Transfer-Ionen-Reaktion (PTR).<sup>75</sup> Bei dieser Methode wird durch Protonentransfer der Ladungszustand der des Mutterions verringert. Dies vergrößert den  $m/z$ -Abstand potentieller Interferenzen zum Zielpeptid so dass weniger interferierende Ionen co-isoliert werden.<sup>75</sup> Eine weitere sehr effiziente Methode für eine akkurate Quantifizierung wurde 2012 von WÜHR *et al.* etabliert. Diese Methode stellt eine alternative

Quantifizierungsmethode auf dem MS<sup>2</sup>-Level dar. Bei der sogenannten TMT<sup>C</sup>-Methode wird neben den gebildeten Reporter-Ionen auch über das sogenannte Komplementär-Ionen-Cluster quantifiziert. Isobare Markierungsreagenzien enthalten schwere Isotope nicht nur in der Reporter-Region sondern auch in der Massenausgleichsregion. So entstehen nach der Fragmentierung neben den Reporter-Ionen auch markierte Massenausgleichs-Peptid-Konjugate, die bei der Quantifizierung herangezogen werden können.<sup>69</sup> Abbildung 9 stellt die schematische Darstellung der Peptid-Quantifizierung mittels TMT<sup>C</sup>-Cluster am Beispiel von TMT dar.

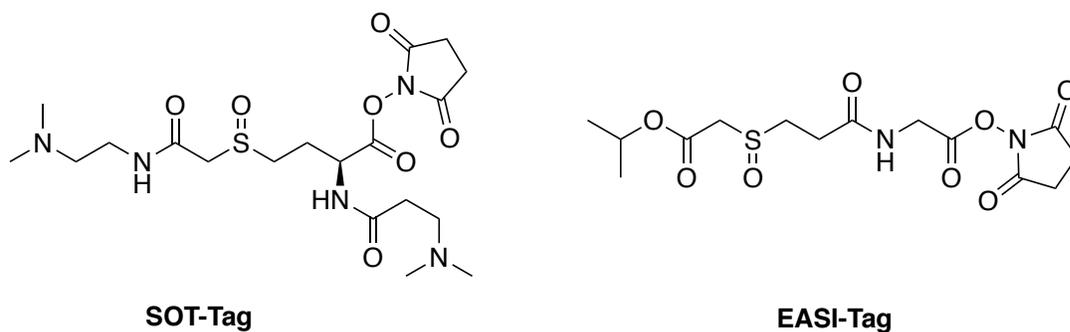


**Abbildung 9** Darstellung des *ratio distortion* Effektes und das Prinzip der akkuraten Quantifizierung mit der TMT<sup>C</sup>-Methode. **A)** Ein Peptid (braun) ist mit TMT-131 und TMT-126 markiert und in einem Verhältnis 1:1 gemischt. Im MS<sup>1</sup>-Spektrum co-eluiert ein interferierendes Peptid (blau) mit den Zielpeptid im gleichen Isolationsfenster. **B)** Nach der Fragmentierung der Peptid-Ionen mit einer erhöhten Energie (higher-energy collisional dissociation, HCD) werden im MS<sup>2</sup>-Spektrum neben den Reporter-Ionen (links) auch TMT<sup>C</sup>-Cluster gebildet. Die Quantifizierung nur auf Basis der Reporter-Ionen-Intensitäten wäre bei dieser verzerrten Probe ungenau. Modifiziert nach <sup>69</sup>.

Die m/z-Werte der komplementären Ionen hängen, anders als die der Reporter-Ionen, von dem Zielpeptid ab und ermöglichen somit eine interferenzfreie Quantifizierung. Jedoch weist die TMT<sup>C</sup>-Methode auch Limitationen auf, da die Generierung komplementärer Ionen nicht effizient genug und somit die Signale im MS<sup>2</sup>-Spektrum sehr gering ist. Diesbezüglich wurde im Jahr 2018 zwei Reagenzien entwickelt und veröffentlicht, welche diese Limitierungen adressieren und durch die Integration einer

---

Sulfoxid-Gruppe effektiv in der Gasphase fragmentieren: Das SOT-Reagenz<sup>84</sup>, und das EASI-Tag-Reagenz von WINTER *et al.*<sup>76</sup> Das SOT-Reagenz, welches im Rahmen dieser Arbeit entwickelt wurde, bildet neben den Reporter-Ionen auch gut sichtbare komplementär Fragmentionen, die bei der Quantifizierung herangezogen werden können. Im Vergleich dazu ist es bei EASI-Tag nur möglich über die Komplementär-Ionen zu quantifizieren und nicht zusätzlich über Reporter-Intensitäten, da es bei der Fragmentierung in der Gasphase zu einem Neutralverlust kommt.



**Abbildung 10** Struktur der isobaren Markierungsreagenzien SOT und EASI-Tag auf Basis eines Sulfoxids für eine effiziente Fragmentierung.

---

## 2 Aufgabenstellung

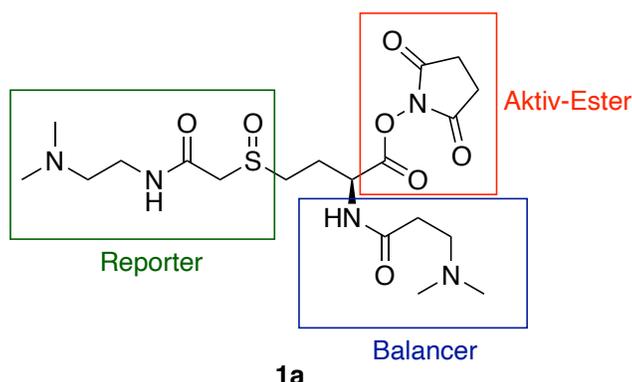
Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte ein isobares Markierungsreagenz entwickelt werden, welches die Limitierungen aktueller Reagenzien überwinden und eine akkurate Quantifizierung von Peptiden in komplexen Proben ermöglichen sollte. Auf der Basis eines Sulfoxids sollte eine bessere Spaltung in der Gasphase erreicht werden, die es ermöglicht, neben den bereits etablierten Reporter-Ionen auch gebildete *Balancer*-Konjugate oder auch so genannte Komplementär-Ionen zu quantifizieren. Nach erfolgreicher Entwicklung einer Synthesestrategie für das unmarkierte Reagenz, sollte ebenfalls ein Duplex-Reagenz Set realisiert werden. Dies sollte ermöglichen, das neue Reagenz in Hinblick auf die Quantifizierung von Proteinen anwenden und testen zu können. Ebenfalls sollte das Verhalten des neuen isobaren Tags hinsichtlich Fragmentierungsverhaltung und Bildung komplementärer Fragmentionen in Bezug auf den Verzerrungseffekts mit etablierten Reagenzien verglichen werden.

---

### 3 Ergebnisteil

#### 3.1 Synthesestrategie und Evaluierung eines neuartigen Sulfoxid-basierten isobaren Markierungsreagenzes

Isobare Markierungsreagenzien bestehen aus drei verschiedenen Segmenten: Das erste Segment ist die Reporter-Gruppe. Die Reporter-Gruppe besitzt eine massenspaltbare Gruppe, welche ein Fragment erzeugt dessen Intensität zur Quantifizierung verwendet werden kann. Die Reporter-Gruppe des von uns entwickelten isobaren Markierungsreagenzien, enthält eine Sulfoxid-Gruppe (Abbildung 11). Das zweite Fragment, der *Balancer*, gewährleistet die Isobarizität des Moleküls, in dem es die Massendifferenz ausgleicht, welche durch die Isotopenmarkierung im Reporter entsteht.

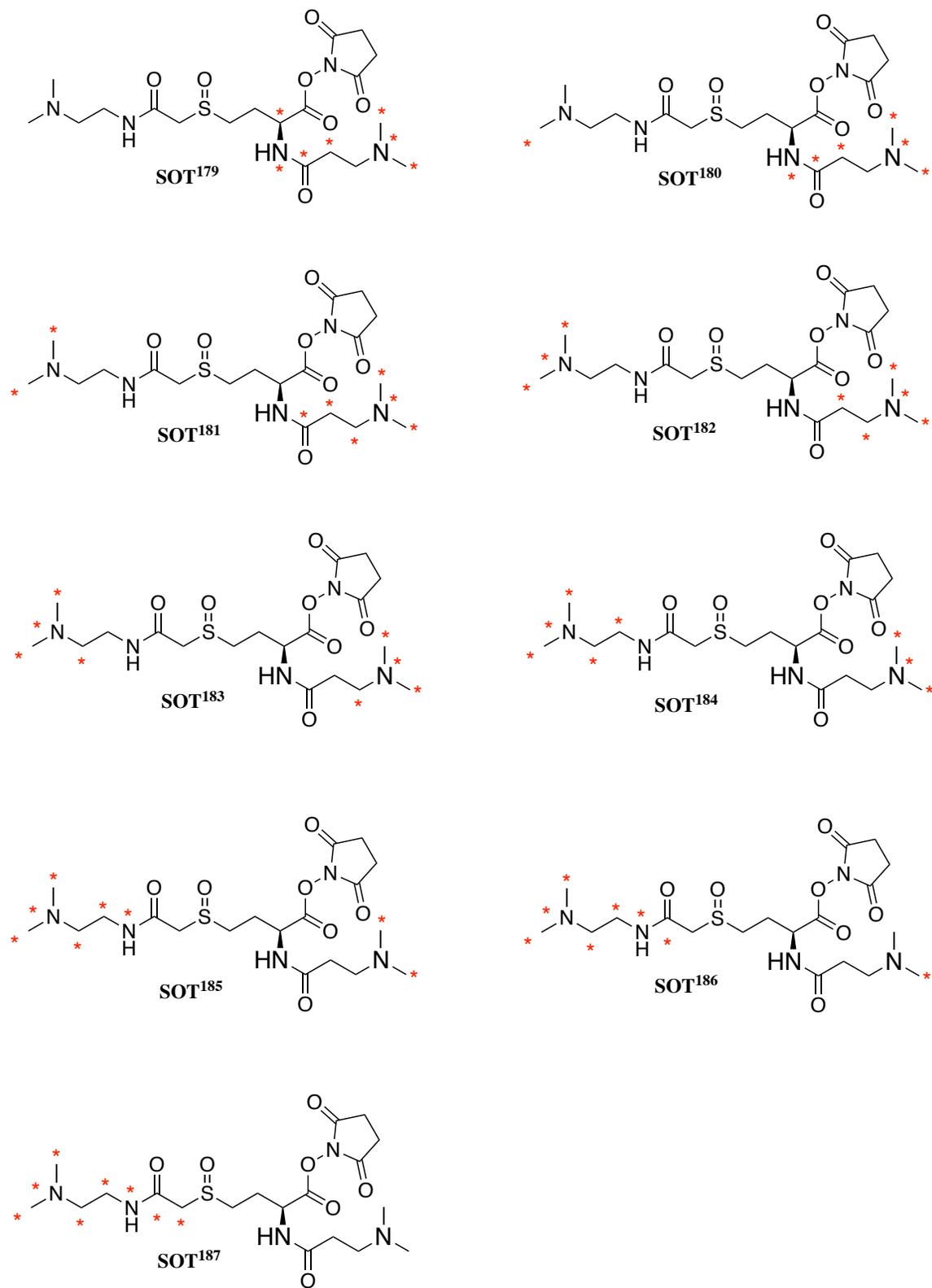


**Abbildung 11** Erster Entwurf eines neuartigen isobaren Markierungsreagenzes mit einer spaltbaren Sulfoxid-Gruppe, einer Reporter-Gruppe, *Balancer* und aminreaktiver NHS-Funktionalität.

Die herausragende Spaltbarkeit von Sulfoxiden bei niedrigen Energien, zeigten bereits Untersuchungen zur Spaltbarkeit von oxidierten Methionin-Seitenketten.<sup>77</sup> So qualifizierte sich das Sulfoxid als spaltbare Gruppe für den Einsatz des von uns entwickelten Quantifizierungsreagenzes dem SulfOxid-Tag (SOT-Tag). So können Reporter- und Komplementär-Ionen bei geringen Fragmentierungsenergien effizient gebildet werden. Das dritte Segment besitzt die Reaktiv-Gruppe, mit der das Reagenz quantitativ an das Peptide gebunden wird. Im Falle des SOT-Reagenzes handelt es sich hierbei um eine Amin-reaktive NHS-Ester Funktionalität.

---

Die Darstellung des angestrebten Moleküls erfolgte auf Basis von kommerziell erhältlichen Ausgangsstoffen. Das Grundgerüst des Reagenzes wird aus dem Baustein Homocystin dargestellt. Dabei ist die Erhöhung der Ladungsdichte durch den Einbau der zwei *tert*-Aminogruppen sehr hilfreich, da es die Fragmentierungseigenschaften des Reagenzes steigert. Neben exzellenten Fragmentierungseigenschaften sind in der modernen Proteomik sehr hohe Multiplexing-Qualitäten unverzichtbar geworden. Bei dem Strukturdesign des SOT-Tags wäre die prinzipielle Einführung von acht schweren Isotopen möglich und somit eine Quantifizierung von neun verschiedenen Proben in einem Experiment möglich. Im Unterschied zu bereits kommerziell erhältlichen Reagenzien, kommt es aufgrund eines perizyklischen Mechanismus der Sulfoxid-Spaltung zu keinem Neutralverlust isotopenmarkierter Segmente (Schema 7). Die Struktur eines potentiellen Neunplex ist in Abbildung 12 gezeigt.

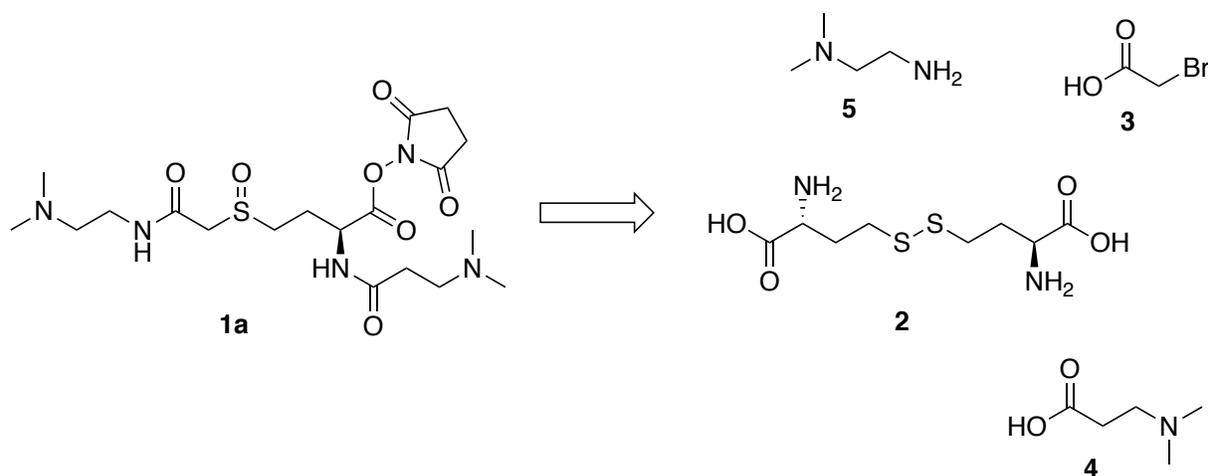


**Abbildung 12** Isotopomere Strukturen eines hypothetischen Neunplex des neuartigen isobaren Markierungsreagenzes SOT-Tag. <sup>13</sup>C- und <sup>15</sup>N-Isotope sind durch rote Sterne gekennzeichnet.

---

### 3.1.1 Erster Entwurf der Synthese Strategie des neuartigen isobaren Markierungsreagenzes SOT

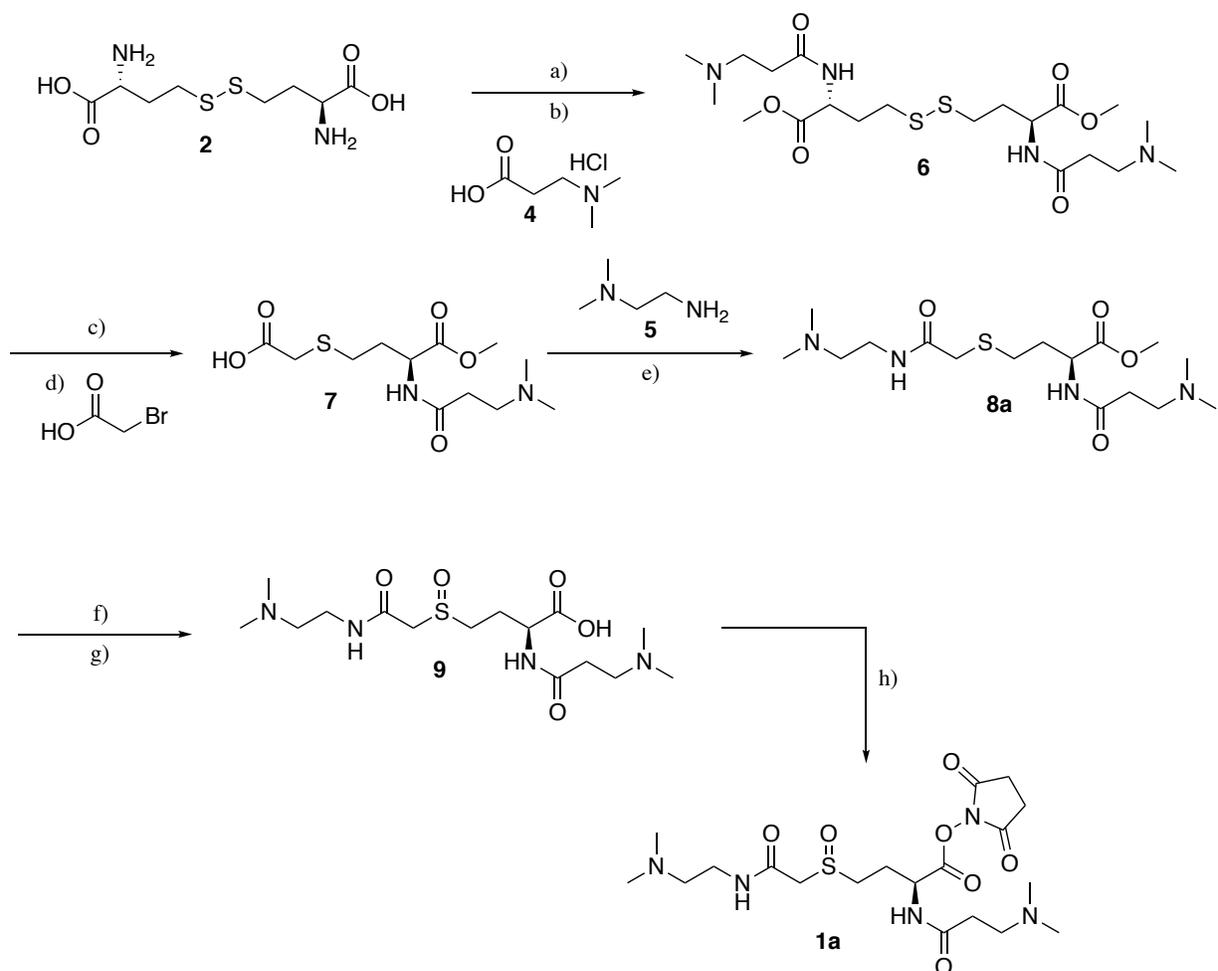
Im Folgenden ist die Retrosynthese des isobaren Markierungsreagenzes SOT-Tag dargestellt. Um die Synthese des SOT-Tags zu vereinfachen, wurde das Design aus einfach zugänglichen Ausgangsstoffen realisiert. Ausgehend von dem kommerziell erhältlichen DL-Homocystin **2**, Bromessigsäure **3**, *N,N'*-Dimethyl- $\beta$ -alanin (**4**) und 1,1-Dimethylethylendiamin (**5**) kann das angestrebte Testmolekül SOT-Tag **1a** über 8 Stufen dargestellt werden.



**Schema 1** Retrosynthetische Darstellung des SOT-Tags. Das angestrebte Testmolekül SOT **1a** kann über 8 Stufen mit den kommerziell erhältlichen DL-Homocystin **2**, Bromessigsäure **3**, *N,N'*-Dimethyl- $\beta$ -alanin (**4**) und 1,1-Dimethylethylendiamin (**5**) dargestellt werden. Das Grundgerüst des SOT-Reagenzes stellt das DL-Homocystin dar.

Die Syntheseroute, mit der das Markierungsreagenz SOT erstmalig synthetisiert wurde, ist in Schema 1 dargestellt. Das kommerziell erhältliche DL-Homocystin (**2**) wurde als Startmaterial gewählt, da die im Molekül enthaltene Sulfide in Form einer Disulfidbrücke geschützt vorliegen und somit keine störende Nebenreaktionen auftreten können. Im ersten Syntheseschritt wurde die Disäure **2** mit Thionylchlorid in Methanol als Dimethylester geschützt. Zur Einführung der *Balancer*-Gruppe erfolgte eine HOBT vermittelte Amidierung mit 1,1-Dimethylethylendiamin **4** welche das Disulfid **6** in guten

Ausbeuten zugänglich machte. Im nächsten Schritt wurde das Disulfid **6** mittels TCEP reaktiv zum Thiol gespalten. In einer nukleophilen Substitution mit 2-Bromessigsäure reagierte das Thiol zu Säure **7**. Eine HOBt-kopplungsvermittelte Amidierung mit *N,N'*-Dimethylethan-1,2-diamin **5** machte die Zwischenstufe **8a** zugänglich. Die Verseifung des Bisamids **8a** sowie die Oxidation führte zur SOT Vorstufe **9**. Die Aktivierung der Säurefunktionalität zum NHS-Ester lieferte das Endprodukt (**1a**).

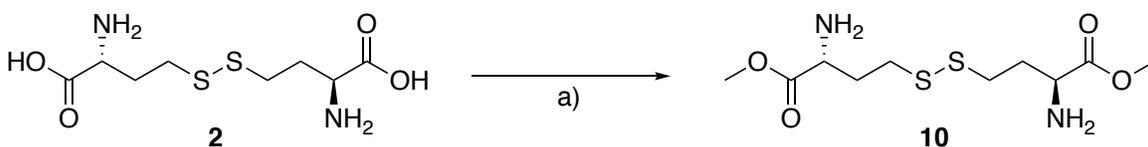


**Schema 2** Darstellung der Syntheseroute zum unmarkierten SOT-Tag Reagenz **1a**. a)  $\text{SOCl}_2$  (4.0 Äq), MeOH, RT, 3 h, quant.; b) **4** (2.4 Äq), EDC-HCl (2.6 Äq), DMAP (0.3 Äq), TEA (3.5 Äq), HOBt (2.5 Äq), DCM, RT, 95 %; c) d) TCEP-HCl (1.0 Äq),  $\text{NaHCO}_3$  (4.2 Äq), , DMF/ $\text{H}_2\text{O}$  (3:1), Bromessigsäure (1.0 Äq), DMF/ $\text{H}_2\text{O}$  (3:1), RT; 40 %; e) **5** (1.2 Äq), DIPEA (1.5 Äq), EDC-HCl (1.2 Äq), HOBt (1.2 Äq), DMF, RT, 30 %, 3 Stufen; f) basische Esterhydrolyse des Methylesters **8a** zur Säure **9**; LiOH (1.0 Äq.),  $\text{H}_2\text{O}$ :MeOH (1:2), RT, quant.; g) *m*CPBA (1.0 Äq.),  $\text{H}_2\text{O}$ , RT, 71 %; h) NHS-TFA (2.0 Äq), Pyridin (2.0 Äq), DMF, 2 h, RT, 30 %.

---

### 3.1.2 Syntheseoptimierung des neuartigen isobaren Markierungsreagenzes SOT

In Kapitel 3.1.1 sollte ein kurzer Überblick der Synthese des erstmals unmarkierten SOT-Tags geschaffen werden. In diesem Abschnitt soll detailliert auf die Optimierung der Syntheseroute eingegangen werden. Ziel war es eine effizientere Umsetzung der Reaktanten, als auch eine bessere Ausbeute zu erhalten. Zunächst wurde ausgehend vom kommerziell erwerblichen DL-Homocystin mittels Thionylchlorid und Methanol eine Veresterung durchgeführt um somit eine Schützung der Säurefunktionalitäten zu gewährleisten.

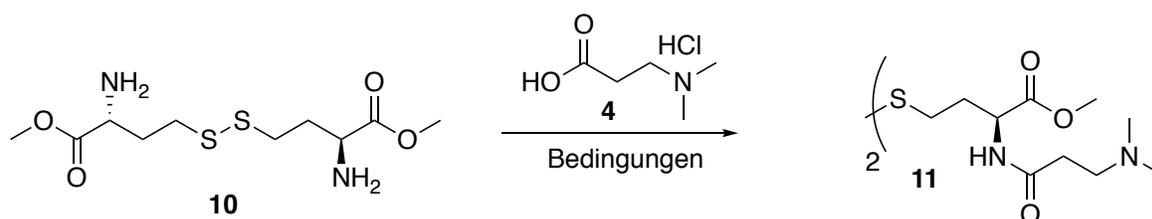


**Schema 3** Veresterung und gleichzeitige Schützung der Säurefunktionalität des DL-Homocystin **2**; a)  $\text{SOCl}_2$  (4.0 Äq), MeOH, RT, 3 h, quant.

Um die *Balancer*-Gruppe **4** direkt über eine Amidierung an den zuvor hergestellten Methylester **10** zu koppeln, wurden in diesem Zusammenhang unterschiedliche Kopplungsreagenzien und Lösungsmittel untersucht (Tabelle 1). Zum einen wurde die Umsetzung des Startmaterials nach der Amidierung mit dem Lösungsmittel DMF und DCM verglichen, um eine höchst mögliche Ausbeute zu garantieren. Hierbei fiel auf, dass DMF weitaus höhere Ausbeuten erzielte. Dies könnte mit der hohen Polarität des Reagenzes einhergehen. Auch die Verwendung unterschiedlicher Kopplungsreagenzien (siehe Tabelle 1) zeigte einen deutlichen Unterschied in der Umsetzung des Startmaterials sowie der Bildung des Produktes. Bei einer EDC- und HOBt-vermittelten Amidierung zeigte sich, dass eine Temperaturerhöhung auf 60 °C den Umsatz des Startmaterials deutlich erhöhen und die Reaktionszeit von 12 h auf 3 h verkürzen konnte. So konnte eine Ausbeute von bis zu 95 % erzielt werden. Bei dem Einsatz von HATU als Kopplungsreagenz konnte allerdings kein Umsatz zum Produkt

beobachtet werden. Auch mit einer säulenchromatographischen Aufreinigung konnte das gewünschte Produkt nicht isoliert werden. Es zeigte sich jedoch, dass die Verwendung des Amidierungsreagenzes PyBOP sehr hohe Ausbeute von bis zu 80 % ermöglicht bei einer Reaktionszeit von 2 h.

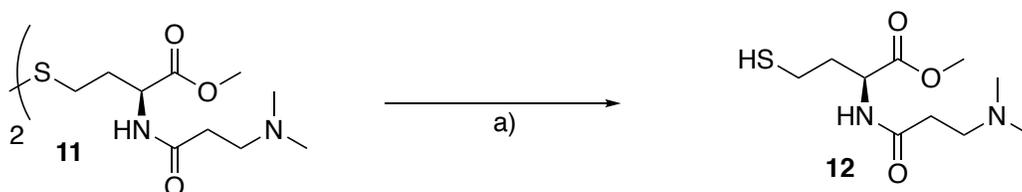
**Tabelle 1** Amidierung des Methylesters **10** zum Bisamid **11** zur Einführung der *Balancer*-Gruppe. Getestete Bedingungen zur Amidierung des Methylesters **10**.



Eintrag	Konditionen <sup>a</sup>	Base	Lösungs- mittel	Temp. (°C)	Zeit (h)	Ausbeute von <b>11</b> (%)	Beobachtung
1	EDC/HOBt	TEA	DCM	RT	12	0	Keine Reaktion
2	HATU	DIPEA	DMF	RT	12	0	Keine Reaktion
3	PyBOB	DIPEA	DMF	RT	2	80	~20% Zersetzung
4	EDC/HOBt	TEA	DMF	60	3	95	-

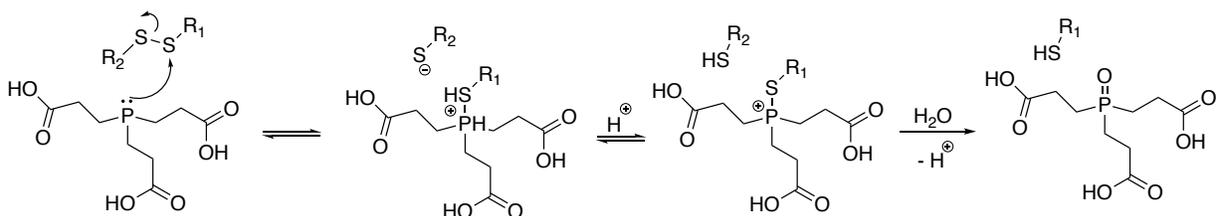
(a) Alle Reaktionen wurden im Maßstab von 10-25 mg durchgeführt; Aktivierungsreagenz (2.6 Äq.), Katalysator (2.5 Äq.), Base (1.2 Äq.); RT = Raumtemperatur.

Nach einer erfolgreichen Amidierung erfolgte eine TCEP induzierte Spaltung des Disulfids **11** zum freien Thiol **12**, um die Einführung der Reporter-Gruppe zu realisieren.



**Schema 4** TCEP induzierte Disulfid-Spaltung zum Thiol **12**; a) siehe Tabelle 2.

Bei der Wahl des Reduktionsmittels von Disulfiden zu Thiolen gibt es drei wesentliche Punkte zu bedenken. Erstens sollte die Disulfid-Reduktion quantitativ und schnell sein, zweitens sollte das Reduktionsmittel spezifisch sein und keine signifikanten Nebenreaktionen aufweisen und drittens sollte das Reduktionsmittel Folgereaktionen nicht erschweren. Die meisten Disulfid-Reduktionen werden meist von Thiol-Austauschreagenzien wie z.B. Dithiothreit (DTT) oder 2-Mercaptoethanol (ME) realisiert oder verschieden substituierte Phosphine wie Tris(2-Carboxyethyl)phosphin (TCEP). Im Gegensatz zu den Thiolreagenzien sind Phosphine irreversible Reduktionsmittel von Disulfidbindungen in wässrigen Lösungen. Bei dem nukleophilen Angriff des Phosphins auf eines der beiden Schwefelatome bildet sich ein Phosphoniumion-Schwefeladdukt, welches anschließend hydrolysiert, wodurch das entsprechende Phosphinoxid entsteht (siehe Abb. 13). Diese Irreversibilität überzeugte als Reduktionsmittel in der Synthese des SOT-Tags. Wie in Tabelle 2 gezeigt, wurde sowohl eine TCEP als auch eine Triphenylphosphan-induzierte Spaltung des Disulfids **11** durchgeführt.



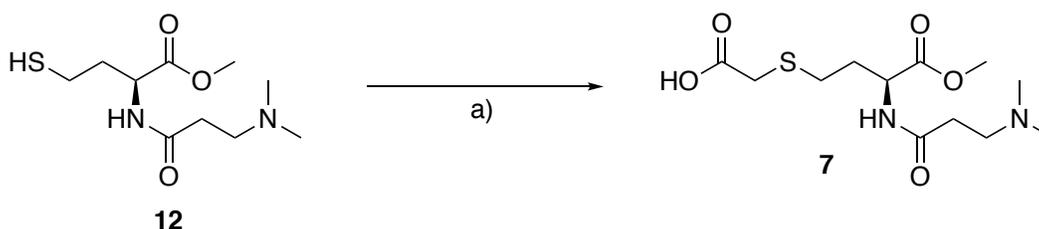
**Abbildung 13** Mechanismus der Disulfidspaltung mit Tris(2-Carboxyethyl)phosphin (TCEP).

**Tabelle 2** Getestete Bedingungen zur Spaltung des Disulfids **11** zum Thiol **12**.

Eintrag	Konditionen <sup>a</sup>	Lösungs- mittel	Temp. (°C)	Zeit (h)	Ausbeute von <b>11</b> (%)	Beobachtung
1	PPh <sub>3</sub>	THF/H <sub>2</sub> O 10 : 1	RT	12	20	~80% Zersetzung
2	TCEP	DMF/H <sub>2</sub> O 4 : 1	RT	2	45	~55% Zersetzung

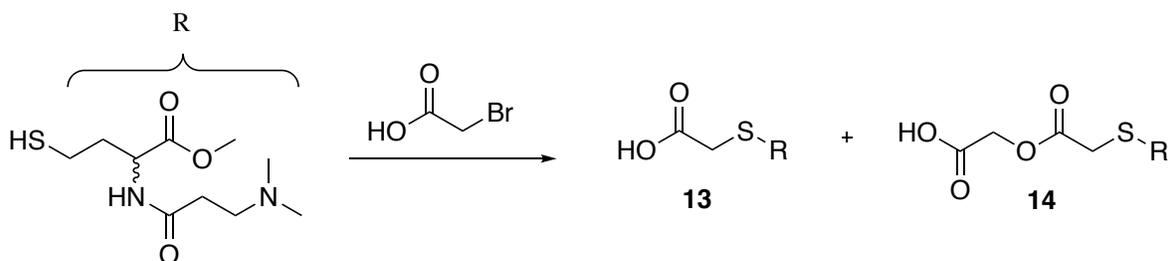
(a) Alle Reaktionen wurden im Maßstab von 10-25 mg durchgeführt; Reduktionsmittel (1.0 Äq.), RT = Raumtemperatur.

Bei der Verwendung des PPh<sub>3</sub> konnte allerdings trotz einer langen Reaktionszeit von mehr als 12 h keine höhere Ausbeute als 20 % erzielt werden. Auch bei Variation des Lösungsmittels konnte der Umsatz des Disulfids nicht signifikant erhöht werden. Eine TCEP-induzierte Disulfid-Spaltung zeigte *via* LC-MS jedoch nach bereits 2 h Reaktionszeit bei RT eine vollständige Umsetzung zum Thiol **12**. Nach einer säulenchromatographischen Aufreinigung konnte das freie Thiol mit Ausbeuten bis zu 45 % isoliert werden. Die trotz vollständiger Umsetzung des Disulfids geringe Ausbeute war darauf zurückzuführen, dass das freie Thiol, selbst bei Lagerung unter Schutzgas bei -20 °C sehr reaktiv war und zurück zum Disulfid **11** rekombinierte. Sowohl die gelbe Verfärbung des isolierten Produktes als auch Verunreinigungen im NMR-Spektrum war ein Indikator für die Reaktion zurück zum Disulfid **11**. Aufgrund der hohen Reaktivität des freien Thiols wurde die Folgereaktion zur Säure **7** unmittelbar nach der Isolierung eingeleitet.



**Schema 5** Nukleophile Substitution des Thiols **12** mit Bromessigsäure zur freien Säure **7**; a) Bromessigsäure (1.0 Äq), TEA (1.5 Äq), DMF, RT, 40 %.

Zur Installation der Reporter-Gruppe wurde in einer nukleophilen Substitutionsreaktion das freie Thiol **12** mit Bromessigsäure umgesetzt (Schema 5). Allerdings zeigte die Reaktionskontrolle über LC-MS nach wenigen Minuten, dass sich neben dem gewünschten Produkt **13** noch ein weiteres Nebenprodukt bildete. Bei genauerer Analyse des Nebenproduktes stellte sich heraus, dass das gebildete alkylierte Thiol **13** in einer weiteren Alkylierung mit Bromessigsäure das Nebenprodukt **14** bildet (Schema 6). Auch bei der Verwendung von Chloressigsäure konnte keine Verbesserung der Umsetzung *via* LC-MS beobachtet werden.



**Schema 6** Darstellung der Konkurrenzreaktion bei der Alkylierung des freien Thiols zur Einführung der Reporter-Gruppe.

Weitere Versuche die Nebenreaktion zu minimieren oder zu vermeiden blieben erfolglos. Nach vollständiger Umsetzung des freien Thiols **12** konnte das Mehrfachalkylierungsprodukt **14** säulenchromatographisch nicht von dem Hauptprodukt **7** vollständig getrennt werden. So wurde auf eine Aufreinigung des Zwischenproduktes verzichtet und das Gemisch erst nach der Amidierung zu **8** säulenchromatographisch aufgereinigt. Die zentrale Zwischenstufe **7** konnte über zwei Stufen mit einer Ausbeute von 30 % isoliert werden.

Trotz der sehr niedrigen Ausbeute und geringer Verunreinigungen wurde die Synthese zum angestrebten Endprodukt **1a** weiterverfolgt, um die Testsubstanz massenspektrometrisch zu analysieren und es mit etablierten isobaren Markierungsreagenzien vergleichen zu können. So folgte eine EDC-vermittelte Amidierung mit *N,N'*-Dimethylethan-1,2-diamin zur Einführung der Reporter-Gruppe. Das Amidierungsprodukt **8** wurde im nächsten Schritt einer basischen Esterhydrolyse unterzogen zur freien Säure. Aufgrund der fehlenden UV-Absorption und der sehr

---

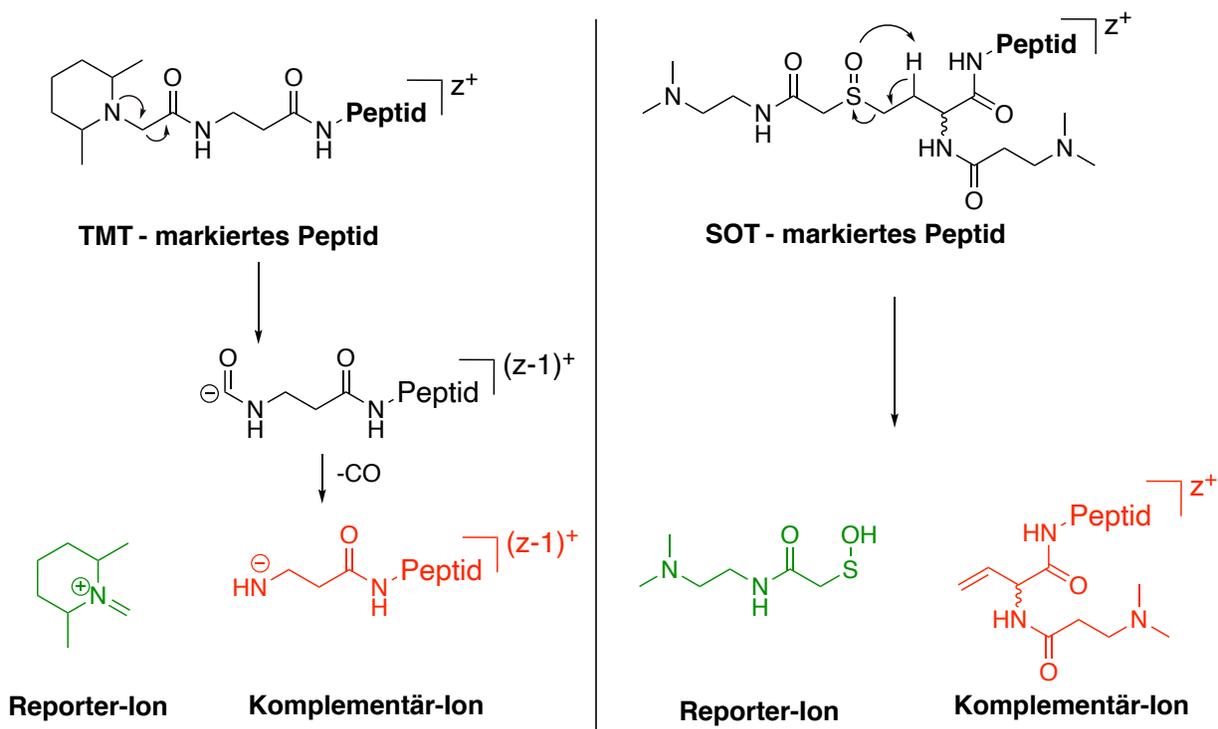
hohen Polarität des Moleküls war eine säulenchromatische Aufreinigung nicht möglich. Die Entsalzung mittels des C<sub>18</sub>-Materials ermöglichte jedoch eine ausreichende Aufreinigung und eine Befreiung des Produktes von überschüssigen Salzen. Zur Einführung der massenspaltbaren Gruppe wurde eine Oxidation zum Sulfoxid **9** mit äquimolaren Mengen an *m*CPBA durchgeführt. Um eine quantitative Umsetzung zu erhalten, muss der pH-Wert der Reaktionslösung mit HCl(aq) auf 2 eingestellt werden. Anschließend wird das Reaktionsgemisch in DCM aufgenommen, um Rückstände der ebenfalls gebildeten *m*-Chlorbenzoesäure zu extrahieren. Zur Aktivierung des Reagenzes im letzten Syntheseschritt zur Fertigstellung des SOT-Tags wurde das Sulfoxid **9** mit NHS-TFA Salz in Gegenwart von Pyridin zum Aktivester **1a** umgesetzt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand in Acetonitril aufgenommen und in Aceton gefällt. Das Produkt fiel als weißer Feststoff aus.

So gelang es geringe Mengen des unmarkierten SOT-Tags **1a** zu synthetisieren, um erste massenspektrometrischen Aussagen über das Verhalten des SOT-Tags im Vergleich zu herkömmlichen isobaren Markierungsreagenzien treffen zu können. Allerdings bedarf es einer Optimierung der Syntheseroute zur Darstellung Isotopenmarkierter Reagenzien, da bereits bei der Alkylierung mit Bromessigsäure der Verlust des Produktes aufgrund der Mehrfach-Alkylierung viel zu hoch ist. Es bedarf einer alternativen Syntheseroute, welche die auftretende Mehrfach-Alkylierung umgeht.

### **3.1.3 Erste Massenspektrometrische Untersuchungen des unmarkierten SOT-Tags im Vergleich zum TMT-Tag**

Die folgenden massenspektrometrischen Untersuchungen wurden von Dr. Michael Stadlmeier durchgeführt.<sup>31</sup> Zunächst sollten mit den ersten massenspektrometrischen Untersuchungen die Eigenschaften der Reagenzien mit dem kommerziell erwerblichen TMT-Reagenz verglichen werden. Die Fragmentierungsmechanismen von SOT und TMT zeigen bereits deutliche Unterschiede (Schema 7). Bei der Betrachtung des Fragmentierungsmechanismus TMT-markierter Peptide wird im Gegensatz zur

ladungsneutralen Fragmentierung des SOT-Reagenzes, ein positiv geladenes Immonium-Ion gebildet. Dies hat zur Folge, dass eine negative Ladung auf dem Peptid-Balancer-Konjugat verbleibt, welches aufgrund seiner Instabilität zu einem Neutralverlust von CO führt. Das dabei resultierende Komplementärion ist aufgrund seines verringerten Ladungszustands mit MS<sup>2</sup>-Spektrum nicht detektierbar. Somit ist eine Quantifizierung über entstehende Komplementärionen bei TMT schwierig, da sie oftmals als Neutralteilchen verloren gehen. Ferner ist der CO-Verlust bei der Fragmentierung ebenfalls bei der Quantifizierung mit dem TMT-Duplex als auch des TMT-Sixplex hinderlich, denn Isotopenmarkierungen, die sich in dieser Gruppe befinden, werden abgespalten und können somit nicht zur Quantifizierung beitragen.



**Schema 7** Mechanismus der Fragmentierung des TMT-Tags im Vergleich zum SOT-Tag.

Generell können bei der Quantifizierung von Peptiden sowohl Reporterintensitäten als auch die gebildeten komplementären Ionen herangezogen werden, sofern nach der Spaltung die Isotopenmarkierung in der *Balancer*-Region noch vorhanden ist. Bei der Fragmentierung SOT-markierter Peptide hingegen kommt es aufgrund des

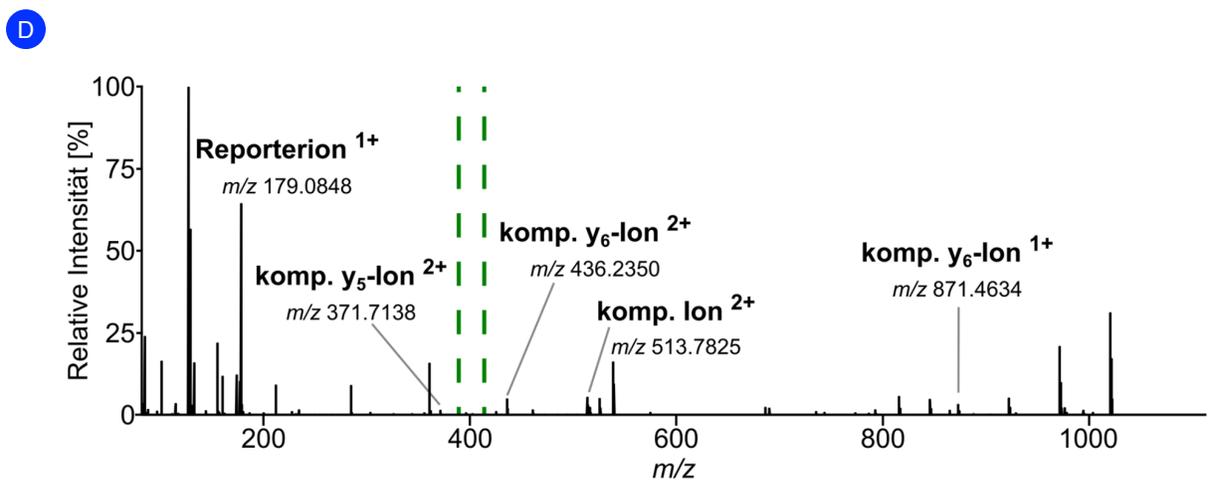
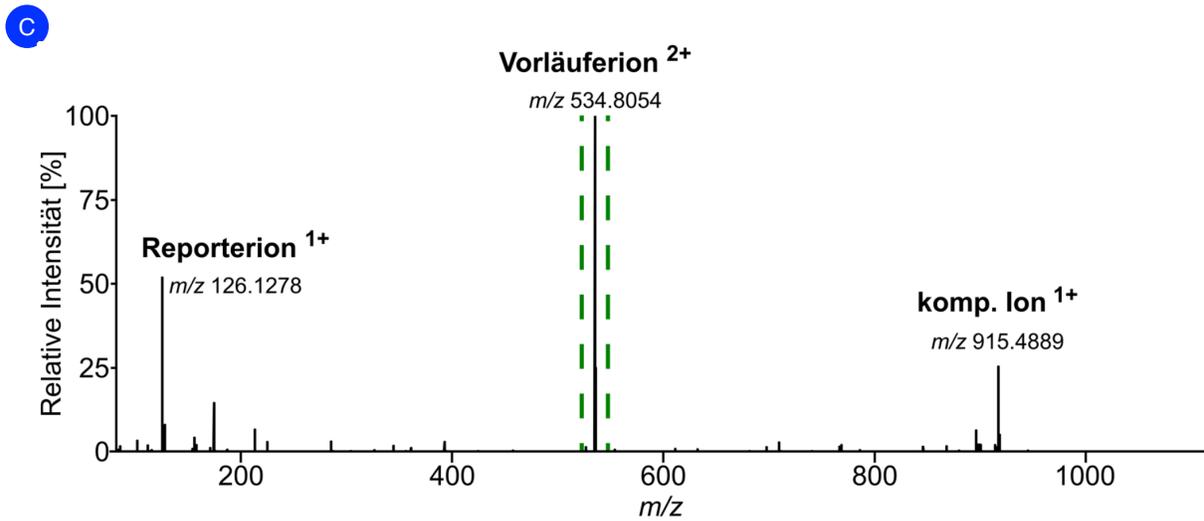
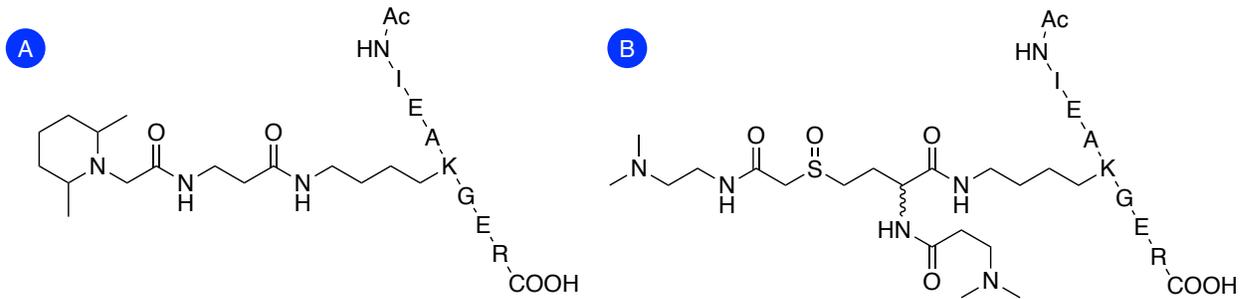
---

perizyklischen Mechanismus der Sulfoxid-Spaltung zu keinem Neutralverlust isotopenmarkierter Segmente. Wie in Schema 7 gezeigt, verändert sich auch der Ladungszustand der gebildeten komplementären Ionen nicht. Schlussfolgernd könnte eine Quantifizierung SOT-markierter Peptide sowohl über die Reporterintensitäten als auch über die gebildeten komplementären Ionen erfolgen. So könnte eine Quantifizierung über alle entstehenden komplementären Ionenpaare der Peptidfragmente sehr viel präziser sein, als über ein einzelnes Ionenpaar. Ein solches Konzept der Quantifizierung wurde bisweilen noch nicht in der Literatur untersucht und könnte eine wesentlich akkuratere Quantifizierung komplexer Proben auf MS<sup>2</sup>-Level ermöglichen.

Zunächst sollte jedoch das theoretische Fragmentierungsverhalten des neuartigen SOT-Tags auch praktisch untersucht werden, um herauszufinden ob die Fragment-Ionen auch in MS-Messungen detektierbar sind. Wie bereits erwähnt soll das SOT-Tag mit etablierten Reagenzien verglichen werden, so wurden alle weiteren Messungen mit dem TMT-Tag gegenübergestellt. Um das SOT-Tag mit dem TMT-Tag adäquat zu vergleichen, wurden beide Reagenzien mit einem künstlich hergestellten Peptid mit der Peptidsequenz Ac-IEAKGER umgesetzt (Abb.14). Da der N-Terminus des Peptids acetyliert vorliegt, kann das Reagenz nur mit dem primären Amin der Lysin-Seitenkette reagieren. Nach einer erfolgreichen Reaktion der Aktivester mit den Peptiden zeigten erste MS<sup>1</sup>-Spektren Analysen eine erfolgreiche Amidierung der Lysin-Seitenketten. Es zeigte sich jedoch, dass SOT-markierte Peptide einen deutlich höheren Ladungszustand als TMT-markiert Peptide aufweisen. Die meisten Ladungszustände TMT-markierten Peptide liegen als +2 vor, wohingegen die meisten SOT-markierten Peptide einen Ladungszustand von +3 und höher aufweisen. Die Begründung der erhöhten Ladungszustände des SOT-Reagenzes liegt in der Reagenz-Struktur selbst.

Der Einbau der zwei basischen *tert*-Aminogruppen im Reagenz, welche in der Gasphase protoniert vorliegen, führt bei Konjugation an das Peptid zur Erhöhung der Ladungsdichte des Peptids, was wiederum zu einer besseren Fragmentierung beiträgt. Bei Betrachtung des MS<sup>2</sup>-Scans nach der Fragmentierung (Abb. 14c) wird deutlich,

dass der größte Teil des TMT-Volläufers unfragmentiert vorliegt, wohingegen das Signal des Reporter-Ions mit einer relativen Intensität von 45 % nicht einmal halb so groß ist. Die Bildung komplementärer Fragmentationen konnte bei einer normalisierten Energie von 25 % HCD im Falle von TMT nicht detektiert werden.<sup>31</sup>



---

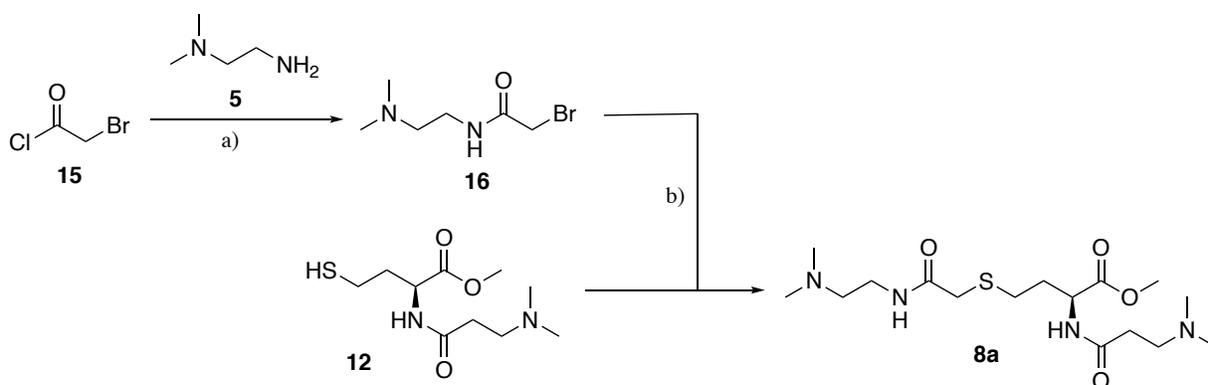
**Abbildung 14** Vergleich eines MS<sup>2</sup>-Experiments TMT<sup>0</sup> - und SOT<sup>0</sup> -markierter Peptide. **A)** Darstellung der Struktur des TMT<sup>0</sup>-Peptidkonjugats. **B)** Illustration der Struktur des mit SOT<sup>0</sup>-markierten Peptids. **C)** Zeigt das MS<sup>2</sup>-Spektrum eines zweifach positiv geladenen mit TMT<sup>0</sup>-markierten Testpeptids bei einer normalisierten Energie von 25 % HCD. **D)** Stellt den MS<sup>2</sup>-Scan eines dreifach positiv geladenen mit SOT<sup>0</sup>-markierten Peptids dar ebenfalls bei einer normalisierten Energie von 25 % HCD. Die grünen gestrichelten Markierungen zeigen die Bereiche des isolierten Vorläuferions.<sup>31</sup>

Beim Vergleich der gemessenen MS<sup>2</sup>-Spektren in Abbildung 14 wird deutlich, dass die Verteilung der gemessenen Fragmente SOT<sup>0</sup>-markierter Peptide sich stark von denen mit TMT<sup>0</sup>-markierter Peptide unterscheiden. Bei Verwendung der gleichen normalisierten Kollisionsenergie von 25 % zeigte sich, dass das Vorläufer-Ion mit einer Ladung von +3 fast vollständig fragmentierte und kaum detektierbar war. Das gebildete Reporter-Ion mit m/z 179.0848 hingegen wies mit einer relativen Intensität von 65 % eine sehr hohe Signalstärke auf. Neben der sehr hohen Reporter-Intensität konnten im Gegensatz zu TMT auch die Bildung vieler komplementärer Fragmentationen beobachtet werden.<sup>31</sup>

Zusammenfassend zeigt der Vergleich SOT-markierter Peptide mit TMT-markierten Peptiden auf dem MS<sup>2</sup>-Level deutliche Vorteile im Fragmentierungsverhalten. Die Effizienz der Bildung von Reporter-Ionen als auch deren Intensität hebt das SOT-Reagenz positiv vom herkömmlichen TMT-Reagenz ab. Zur weiteren Evaluierung des neuen SOT-Tags in Bezug auf Quantifizierungsverhalten wurde die Syntheseroute optimiert zur Synthese eines SOT-Duplex-Sets.

### 3.1.4 Optimierung der Syntheseroute des SOT-Markierungsreagenzes

Auf der Suche nach einer optimierten Syntheseroute, die es ermöglicht ein Duplex-Reagenz-Set in guten Ausbeuten zu synthetisieren, wurde zunächst die Einführung der Reporter-Gruppe untersucht. Die Einführung der Reporter-Gruppe und die damit einhergehende Problematik der Mehrfach-Alkylierung sollte zunächst durch die Verwendung eines bereits mit der Reporter-Gruppe konjugierten Alkylierungsreagenzes verhindert werden.

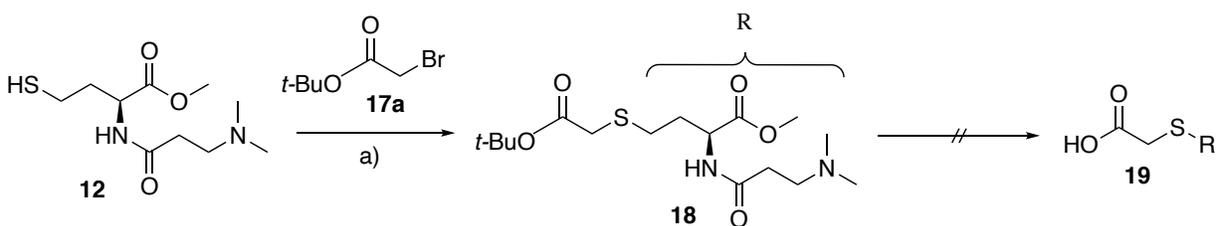


**Schema 8** Alternative Syntheseroute zur Einführung der Reporter-Gruppe durch die Bildung eines funktionellen Alkylierungsreagenzes **16** mit integrierter Reporter-Gruppe; a) Bromacetylchlorid (1.0 Äq), **5** (1.0 Äq), EtO<sub>2</sub>, -50°C, b) **12** (1.2 Äq), RT, 32 %, 2 Stufen.

Die Synthese zum Bisamid **8a** und die Herstellung der Alkylierungsreagenz **16** erfolgte *in situ*. Zunächst wurden die kommerziell erhältlichen Ausgangsstoffe 2-Bromacetylchlorid **15** und *N,N*-Dimethylethan-1,2-diamin **5** bei sehr niedrigen Temperaturen von -50 °C in Diethylether zur Reaktion gebracht. Die Isolation des Produktes **16** war allerdings nicht möglich, da bereits in wenigen Minuten das Produkt bei RT zerfiel. Deshalb wurde der Reaktionsverlauf *via* LC-MS überprüft und die Folgereaktion *in situ* eingeleitet. Nachdem die vollständige Umsetzung des Startmaterials *via* LC-MS bestätigt worden ist, wurde direkt das Thiol **12** zur Reaktionsmischung zugegeben. Nach säulenchromatischer Aufreinigung konnte das

Bisamid **8a** zwar in sehr hoher Reinheit gewonnen werden, jedoch nur in geringen Ausbeuten von bis zu 32 %.

Aufgrund der geringen Ausbeute wurde versucht einen alternativen Syntheseweg zu entwickeln, um die Mehrfach-Alkylierung zu umgehen und den Verbrauch von Isotopenmarkierten Material zu minimieren. So wurde zunächst die Verwendung von Schutzgruppen zu Vermeidung unerwünschter Nebenreaktion bei der Alkylierung untersucht. Zur Schützung der Bromessigsäure standen mehrere Schutzgruppen zur Auswahl. Zunächst wurde die Säurefunktionalität der Bromessigsäure mit *tert*-Butylester geschützt und mit dem freien Thiol **12** umgesetzt (Schema 9).



**Schema 9** Reaktion der *tert*-Butylester-geschützten Bromessigsäure mit Thiol **12** als alternative Syntheseroute zur Einführung der Reporter-Gruppe. a) **17** (1.5 Äq), TEA (1.5 Äq), DMF, RT.

Die anschließende Umsetzung des Thiols **12** mit Bromessigsäure-*tert*-Butylester **17a** bei RT in DMF und Triethylamin erfolgte erfolgreich und bildete **18** (Schema 9). Jedoch zeigte sich die Entschützung der Säurefunktionalität als problematisch. So blieb die Spaltung des Esters zu **19** unter verschiedenen getesteten Bedingungen erfolglos (Tab. 3).

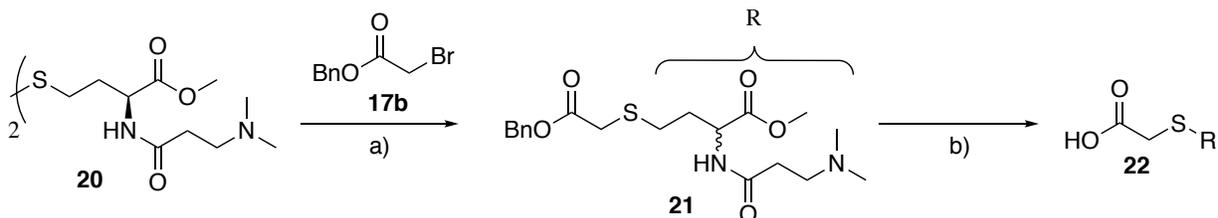
**Tabelle 3** Getestete Bedingungen zur Entschützung des *tert*-Butylschutzgruppe zur Bildung von **19**.

Eintrag	Konditionen <sup>a</sup>	Temp. (°C)	Zeit (h)	Ausbeute von <b>19</b> (%)	Beobachtung
1	HCl, AcOH, DCM	50°C	12	0	Keine Reaktion
2	Et <sub>3</sub> SiH, TFA, DCM	25°C	12	0	Keine Reaktion

3	TFA, DCM	40°C	12	0	Keine Reaktion
---	----------	------	----	---	----------------

(a) Alle Reaktionen wurden im Maßstab von 10-25 mg durchgeführt.

Neben der *tert*-Butylester-Schutzgruppe bietet sich die Benzyl-Schutzgruppe zur Maskierung der Säurefunktion an. Wie zuvor, erfolgte zunächst eine TCEP-induzierte Spaltung des Disulfids **20**. Nach vollständiger Spaltung zum freien Thiol **12**, welche durch einer positiver Reaktionskontrolle *via* Dünnschichtchromatographie und LC-MS bestätigt wurde, wurde eine *in situ* Reaktion mit Benzyl 2-Bromoacetat (**17a**) zum Sulfid **21** eingeleitet (Schema 10). Nach säulenchromatographischer Aufreinigung konnte das Produkt **21** in einer sehr hohen Reinheit mit Ausbeuten bis zu 95 % erhalten werden.



**Schema 10** Reaktion der Benzyl-geschützten Bromessigsäure mit Disulfid **20** als alternative Syntheseroute zur Einführung der Reporter-Gruppe; a) **17a** (1.0 Äq), TCEP (1.0 Äq), NaHCO<sub>3</sub> (4.2 Äq), DMF:H<sub>2</sub>O (3:1), RT; b) siehe Tabelle 4.

Um die vollständige Einführung der Reporter-Gruppe zu ermöglichen, muss als nächster Schritt die Entschützung der Säurefunktionalität eingeleitet werden, um die Säure **22** zu bilden. Zunächst wurde eine Entschützung auf Basis von Palladium auf Kohle in einer Wasserstoff-Atmosphäre angestrebt. Leider konnte kein Umsatz zur entschützten Säure festgestellt werden. In Zusammenarbeit mit Dr. Michael Stadlmeier konnte allerdings schließlich auf Basis von Ameisensäure als Wasserstoffdonor in Gegenwart von Palladium black (100 wt-%) eine Entschützung der Benzylschutzgruppe durchgeführt werden.<sup>78</sup> Um die freie Säure in hoher Reinheit und hoher Ausbeute zu erhalten, wurde **21** in einer Mischung aus 10 % Ameisensäure in Methanol gelöst und bei einer Temperatur von 40 °C mit dem Katalysator Palladium *black* zur Reaktion gebracht. So konnte durch den Einsatz der Benzylschutzgruppe die Mehrfach-Alkylierung vermieden und die Ausbeute auf 54 % über drei Stufen inklusive

---

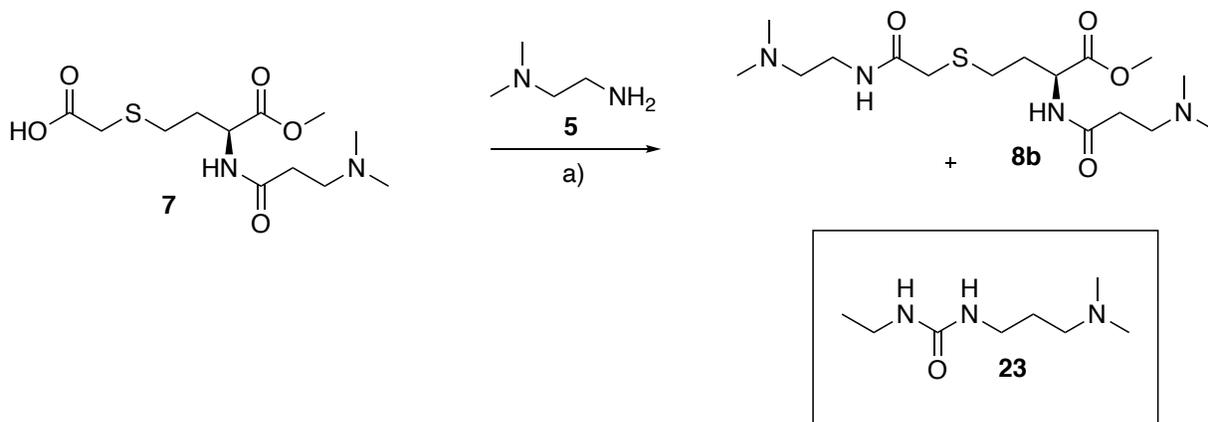
Entschützung erhöht werden. Der Thioester **22** konnte in hoher Reinheit isoliert werden.<sup>31</sup>

**Tabelle 4** Getestete Bedingungen zur Entschützung des Benzylschutzgruppe zur Bildung von **22**.

Eintrag	Konditionen <sup>a</sup>	Temp. (°C)	Zeit (h)	Ausbeute von <b>22</b> (%)	Beobachtung
1	H <sub>2</sub> , Pd-C (kat.)	RT	12	0	Keine Reaktion
2	NiCl <sub>2</sub> *H <sub>2</sub> O, NaBH <sub>4</sub>	RT	12	0	Keine Reaktion
3	Et <sub>3</sub> SiH, Pd-C (kat.)	RT	12	0	Keine Reaktion
4	Ameisensäure, Pd <i>black</i>	RT	6	62	~ 40% Zersetzung

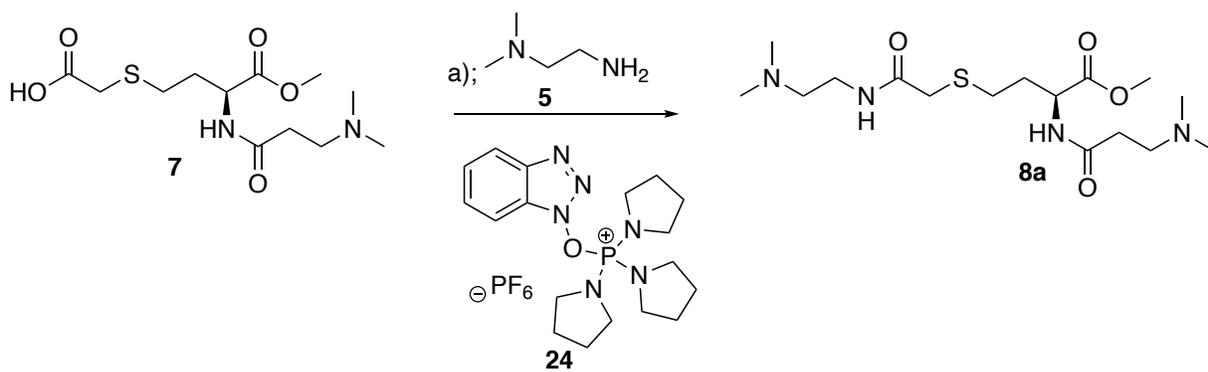
(a) Alle Reaktionen wurden im Maßstab von 10-25 mg durchgeführt; RT = Raumtemperatur.

Nach einer erfolgreichen Reaktion zum Thioether **7**, folgte im nächsten Schritt die Amidierung mit *N,N'*-Dimethylethan-1,2-diamin (**5**) zum Bisamid **8b** zur Einführung der Reporter-Gruppe. Zunächst wurde analog zur ersten Amidierung eine EDC-vermittelte Aktivierung mit EDC·HCl, HOBt und TEA in DMF getestet. Die Umsetzung des Thioethers **7** war nach bereits wenigen Stunden vollständig umgesetzt. Eine NMR-Analyse ergab jedoch, dass sich neben dem Produkt **8b** trotz säulenchromatographischen Aufreinigung starke Verunreinigung eines sich ebenfalls bei der Reaktion gebildeten Harnstoff-Derivats **23** befand (Schema 11).



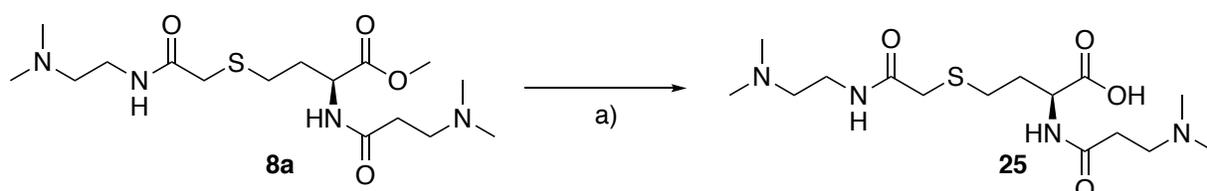
**Schema 11** Darstellung von **8b** in einer EDC-vermittelten Amidierung der Säure unter Bildung eines Harnstoffderivats **23**. a) **5** (1.2 Äq), DIPEA (1.5 Äq), EDC·HCl (1.2 Äq), HOBT (1.2 Äq), DMF, RT.

Aufgrund der ähnlichen Polaritäten des Bisamids **8b** zum Harnstoff **23** war es nicht möglich das Produkt in hoher Reinheit zu isolieren. Um die Entstehung des Harnstoffderivats mit gleicher Retentionszeit zu umgehen, musste trotz der sehr guten Umsetzung des Thioethers **7** zum Bisamid **8b** ein alternative Aktivierungsreagenz gefunden werden. Analog zu ersten Amidierung wurde ebenfalls eine PyBOP-vermittelte Aktivierung getestet. Es zeigte sich, dass die Umsetzung des Thioethers **7** mittels des Phosphoniumsalzes bereits nach einer Stunde vollständig umgesetzt war. Bei der PyBOP-vermittelten Amidierung entsteht ein Phosphorsäuretriamid, dies jedoch ließ sich aufgrund der deutlich unterschiedlichen Retentionszeiten zum Bisamid **8a** sehr leicht durch eine säulenchromatographische Aufreinigung abtrennen. So konnte das Bisamid **8b** in hoher Reinheit und einer Ausbeute von 73 % isoliert werden (Schema 12).



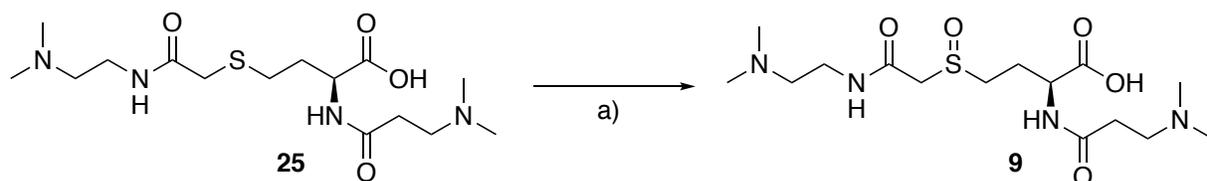
**Schema 12** Alternative Synthese zur Darstellung des Bisamids **8a** über eine PyBOP-vermittelte Amidierung; a) **5** (1.2 Äq), **24** (1.2 Äq), DIPEA (1.5 Äq), DMF, RT, 73 %.

Nach einer erfolgreichen Amidierung zum Bisamid **8a** musste im nächsten Schritt zur Einführung der finalen aminreaktiven Aktivester Funktionalität, der Methylester gespalten werden. In einer basischen Esterhydrolyse wurde der Methylester **8a** mit LiOH in H<sub>2</sub>O/MeOH umgesetzt und die zentrale Zwischenstufe **25** zugänglich gemacht (Schema 13). Nach der vollständigen Umsetzung zur freien Säure, wurde als nächstes ein Entsalzungsschritt eingeleitet. Da eine Entsalzung über Ionenaustauscher-Harze nicht möglich war, wurde über die HyperSep™ C<sub>18</sub> Kartuschen und einem Standardprotokoll entsalzt. Die erfolgreiche Entsalzung war durch die Umwandlung des Produktes von einen farblosen harzähnlichen Feststoff zu einem farblosen Schaum erkennbar.



**Schema 13** Verseifung des Methylesters **8a** zur Säure **25**; a) LiOH (1.0 Äq.), H<sub>2</sub>O: MeOH (1:2), RT, quant.

Nachdem die *Balancer*- und die Reporter-Gruppe erfolgreich im Molekül installiert wurden, muss nun noch die zur Fragmentierung erforderliche massenspaltbare Sulfoxid-Gruppe in das Reagenz integriert werden. In einer Oxidationsreaktion zum Sulfoxid **9** wurden äquimolaren Mengen *m*CPBA eingesetzt (Schema 14)



**Schema 14** Oxidation des Bisamids **25** zum Sulfoxid **9**; a) *m*CPBA (1.0 Äq.), H<sub>2</sub>O, RT, 71 %.

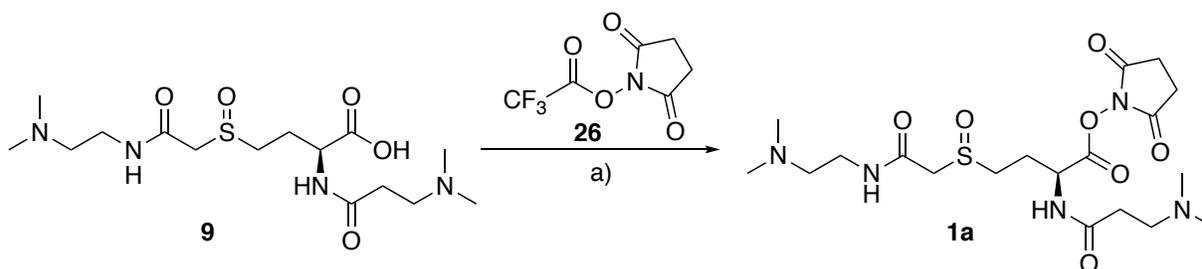
Für eine quantitative Umsetzung muss der pH-Wert der Reaktionslösung mit HCl (aq) auf 2 eingestellt werden, da es in vorherigen Versuchen bei neutralem pH-Wert zur

---

Weiteroxidation zum Sulfon geführt hat. Nachdem der Reaktionsverlauf, welcher mittels LC-MS verfolgt wurde, die vollständiger Oxidation zum Sulfoxide **9** zeigte, wurde die Reaktionsmischung in DCM aufgenommen, um Rückstände des ebenfalls gebildeten *m*-Chlorbenzoesäure zu extrahieren. Das Produkt **9** wurde nach sorgfältiger Trocknung *in vacuo* als farbloser Feststoff erhalten.

### 3.1.5 Einführung der Amin-reaktiven Aktivester-Funktionalität

Die gängigsten Techniken zur Vernetzung von Peptiden und Proteinen ist die Verwendung von chemischen Gruppen, die mit primären Aminen reagieren. Denn primären Amine existieren sowohl am N-Terminus jeder Polypeptidkette als auch in der Lysin-Seitenkette. Obwohl die Auswahl solch chemischer Gruppen sehr groß ist, sind die beliebtestenaminspezifischen Funktionsgruppen N-Hydroxysuccinimid-Ester (NHS) wie bspw. NHS-TFA<sup>79</sup> und Imido-Ester, die in Reagenzien zur Proteinvernetzung und Markierung eingebaut werden. Schließlich wurde zur Einführung der aminreaktiven Aktivester-Funktionalität des Sulfoxids **9** im letzten Syntheseschritt zur Fertigstellung des SOT-Tags eine Aktivester Aktivierung mit NHS-TFA **26** durchgeführt.

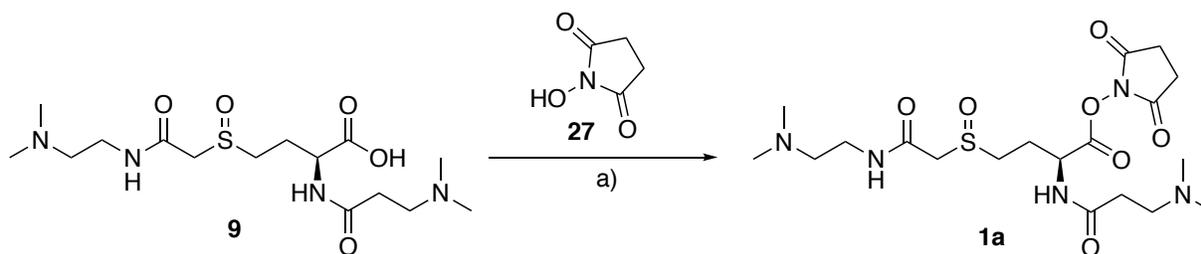


**Schema 15** Aktivester-Synthese der Säure **9** mit NHS-TFA **26**; a) **26** (2.0 Äq), Pyridin (2.0 Äq), DMF, 2 h, RT, 30 %.

Die in Schema 15 dargestellte Aktivierung mit NHS-TFA in Gegenwart von Pyridin, führte zu einer erfolgreichen Umsetzung zum Aktivester **1a**. Die Reaktion wurde bei Raumtemperatur und unter Schutzgas durchgeführt, da das NHS-TFA-Salz äußerst hydrolyseempfindlich ist. Nach vollständiger Umsetzung des Startmaterials, wurde das

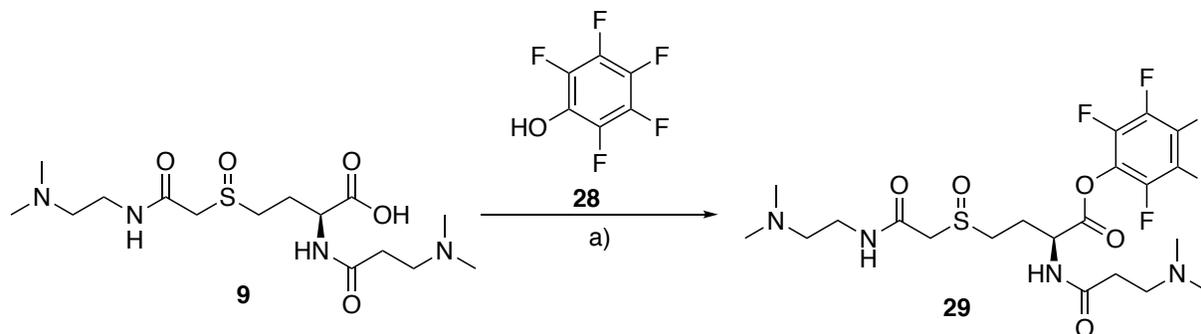
Lösungsmittels *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde in Acetonitril aufgenommen und in Aceton gefällt. Das Produkt **1a** fiel als weißer Feststoff aus und wurde anschließend unter Schutzgas bei -20 °C gelagert.

Um die Ausbeute zum Aktivester zu erhöhen, wurde in einem weiteren Versuch die freie Säure **9** mit N-Hydroxysuccinimid **27** und Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) umgesetzt (Schema 16).



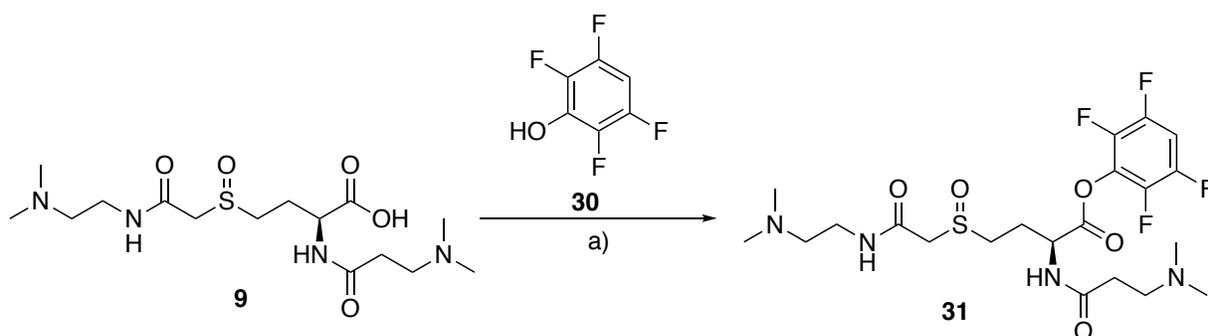
**Schema 16** Aktivester-Synthese der Säure **9** mit N-Hydroxysuccinimid **27**; a) DCC (1.5 Äq), TEA (2.0 Äq), DMF, 4 h, RT, 10 %.

Jedoch verlief die Reaktion zum Aktivester **1a** mit DCC verglichen zur NHS-TFA-Aktivierung wesentlich ineffizienter. Der über LC-MS verfolgte Reaktionsverlauf zeigte nach 4 h nur geringe Umsetzung zum gewünschten Produkt **1a**. Die Umsetzung des Startmaterials konnte auch durch eine längere Reaktionszeit oder durch einen Anstieg der Reaktionstemperatur nicht gesteigert werden. Alternativ sollte die Verwendung von Pentafluorphenol (PFP) **28** als Kopplungsreagenz untersucht werden (Schema 17).<sup>80</sup>



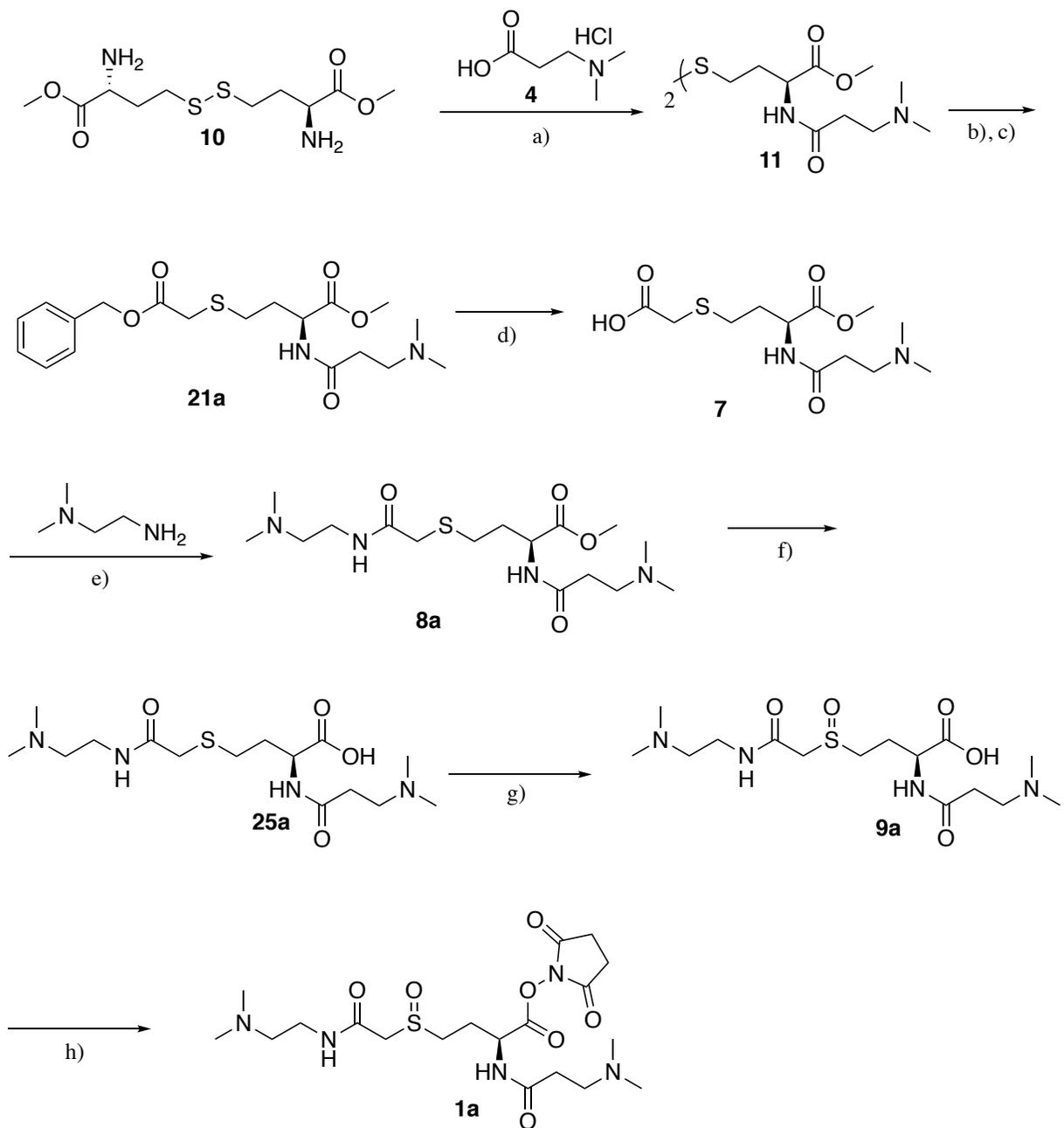
**Schema 17** Aktivester-Synthese der Säure **9** mit PFP **28**. A) DCC (1.1 Äq), TEA (2.0 Äq), DMF, 1 h, RT, 10 %.

Trotz einer vollständigen Umsetzung des Sulfoxids **9** nach bereits einer Stunde Reaktionszeit bei RT konnte der Aktivester **29** nicht isoliert werden. Die Analyse des Reaktionsgemisches des PFP-Aktivesters *via* HPLC zeigte, im Vergleich zu dem NHS-Ester **1a** zusätzlich zu dem erwarteten Hauptprodukt-Peak, noch einige weitere Signale im Spektrum. Die Herkunft anderer häufig beobachteter Masseabweichungen konnten nicht erklärt werden. Auch eine HPLC-Aufreinigung des Aktivesters **29** blieb erfolglos. Es konnte lediglich hydrolysiertes Startmaterial wiedergewonnen werden. Auch die Reaktion des Sulfoxids **9** mit dem weniger hydrolyseempfindlichen Tetrafluorphenol (TFP)<sup>81</sup> **30** und dem Kopplungsreagenz EDC zeigte keine Steigerung der Umsetzung zum Reaktivesters (Schema 18).



**Schema 18** Aktivester-Synthese der Säure **9** mit TFP **30**. a) TFP (1.5 Äq), EDC (1.1 Äq), TEA (1.0 Äq), DMF, 1 h, RT, 10 %.

Diese Versuchsreihe zeigt, dass die Verwendung von NHS-TFA Salz sich am besten für die Umsetzung des Sulfoxids **9** zum SOT-Tag qualifizierte. Zusammenfassend konnte nach einer erfolgreichen Optimierung der Syntheseroute, das neuartige isobare Markierungsreagenz das SOT-Tag in einer 8 stufigen Synthese mit einer Gesamtausbeute von 30 % erhalten werden (Schema 19).

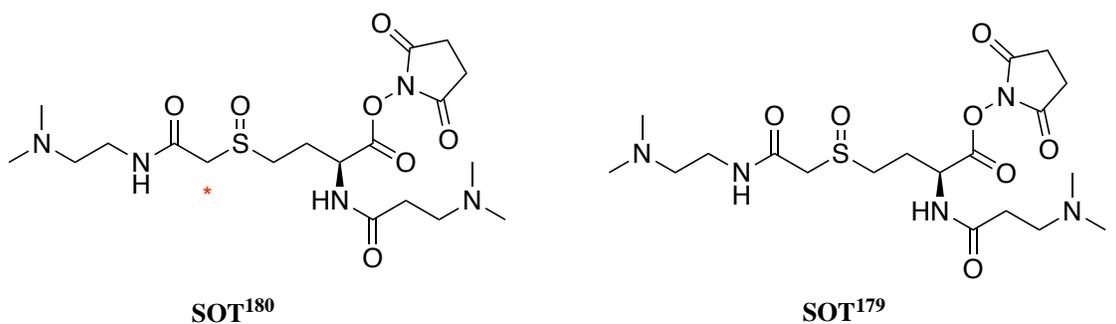


**Schema 19** Übersicht der optimierten Syntheseroute zur Darstellung des neuartigen Markierungsreagenzes SOT **1a**. a) **4** (2.4 Äq), EDC·HCl (2.6 Äq), DMAP (0.3 Äq), TEA (3.5 Äq) HOBT (2.5 Äq), DCM, RT, 95 %; b),c) TCEP·HCl (1.0 Äq), NaHCO<sub>3</sub> (4.2 Äq), Benzylbromoacetat (2.3 Äq), DMF/H<sub>2</sub>O (3:1), RT, 95 %; d) 10 % Ameisensäure in MeOH, 100 wt Pd *black*, 40 °C, 2 h, 80 %; e) **5** (1.2 Äq), DIPEA (1.5 Äq), DMF, RT, 73 %; f) basische Esterhydrolyse des Methylesters **8a** zur Säure **25a**; LiOH (1.0 Äq.), H<sub>2</sub>O: MeOH (1:2), RT, 100 %; g) *m*CPBA (1.0 Äq.), H<sub>2</sub>O, RT, 71 %; h) NHS-TFA (2.0 Äq), Pyridin (2.0 Äq), DMF, 2 h, RT, 30 %

---

### 3.1.6 Darstellung eines SOT-Duplex-Set nach der optimierten Syntheseroute

Da die ersten massenspektrometrischen Untersuchungen des neuartigen SOT-Reagenzes überzeugten, wurde ein Duplex-Reagenz Set hergestellt. In Zusammenarbeit mit Dr. Miriam Wallner <sup>82</sup> wurde die Einführung der Isotopenmarkierung in das SOT Reagenz synthetisch durchgeführt. Die Strukturen des SOT-Duplex Sets sind in der Abbildung 15 gezeigt. Nach dem Vorbild der optimierten Syntheseroute (Schema 19) wurde SOT<sup>179</sup> und SOT<sup>180</sup> dargestellt. Für die Einführung der Isotopenmarkierung des SOT<sup>180</sup>-Reagenzes im Reporterbereich wurde <sup>13</sup>C-markierter Bromessigsäure verwendet. Der *Balancer*-Bereich des SOT<sup>179</sup>-Reagenzen hingegen, wurde durch die Einführung von <sup>13</sup>C-markiertes Formlaldehyd isotopenmarkiert.



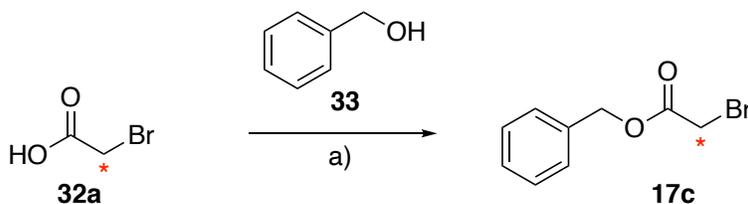
**Abbildung 15** Isotopomere Strukturen des SOT-Duplex. Die Einführung der Isotopen gelang entweder über die *Balancer*-Gruppe (SOT<sup>179</sup>) oder über die Reporter-Gruppe (SOT<sup>180</sup>). Die Namen der jeweiligen Isotopomeren lassen sich von Molekulargewicht der generierten Reporter-Ionen 179 Da und 180 Da ableiten. Die Synthese des SOT<sup>179</sup> Isotopomers wurde von Dr. Miriam Wallner durchgeführt.

### 3.1.7 Synthese des <sup>13</sup>C-markierten SOT<sup>180</sup>-Reagenz nach der optimierten Syntheseroute

Für die Darstellung des <sup>13</sup>C-markierten SOT<sup>180</sup>-Reagenzes **1b** wurde zunächst die <sup>13</sup>C-markierte Bromessigsäure mit Benzylalkohol **33** zu **17c** umgesetzt. Dies sollte die unerwünschte Nebenreaktionen der Mehrfachalkylierung verhindern. Hierbei wurde die

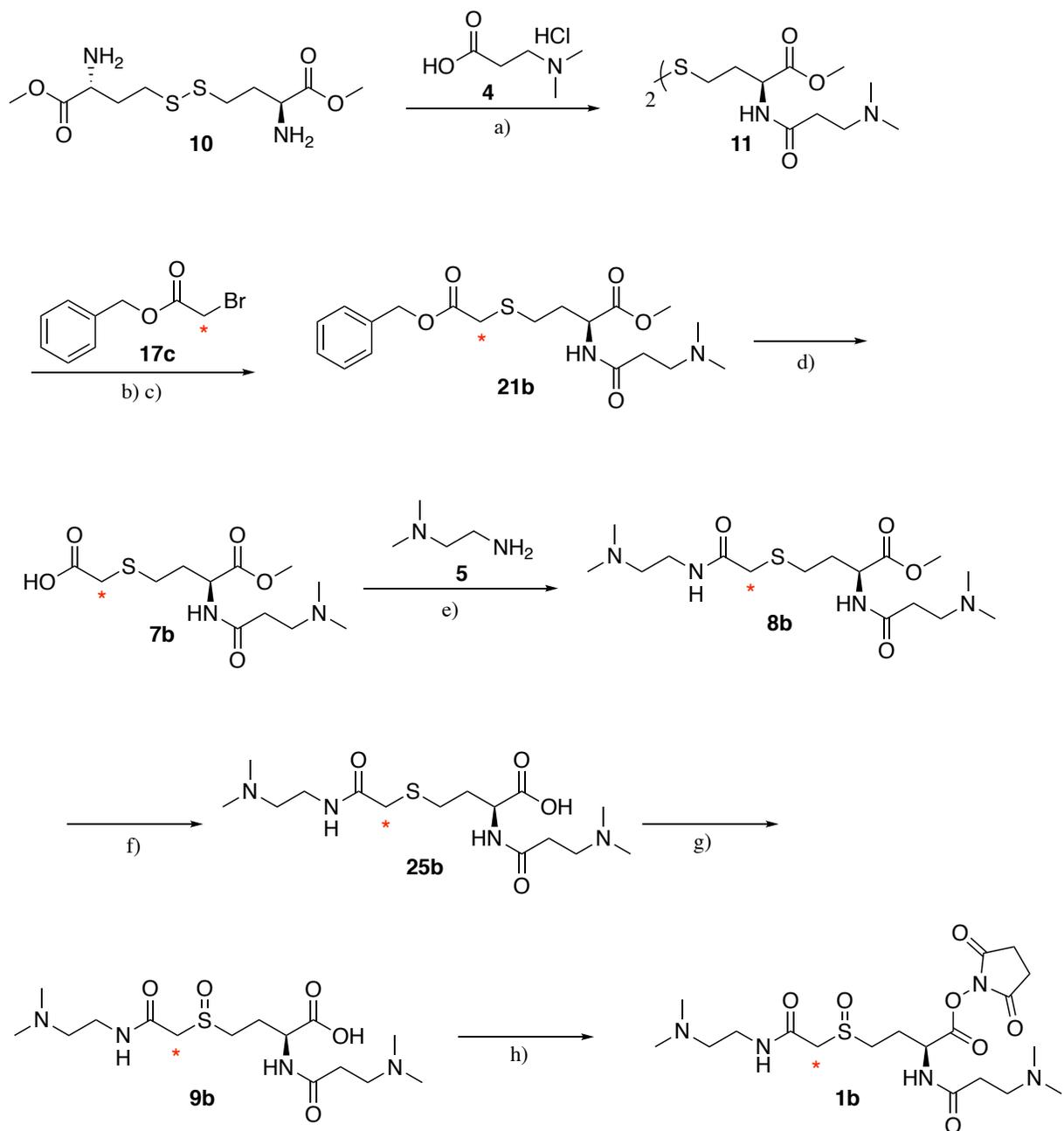
---

kommerziell erhältliche  $^{13}\text{C}$ -markierten Bromessigsäure **32a** in Benzylalkohol gelöst und bei  $111\text{ }^\circ\text{C}$  für 2 h rühren gelassen.



**Schema 20** Darstellung des  $^{13}\text{C}$ -markierten Benzylbromoacetat **17c** zur Isotopen-Einführung der Reporter-Gruppe von  $\text{SOT}^{180}$ ; a) Benzylalkohol **33** (1.0 Äq), *p*-Toluolsulfonsäure (0.02 Äq), Toluol,  $111\text{ }^\circ\text{C}$ , 2 h, 87 %.

Nach der erfolgreichen Einführung der  $^{13}\text{C}$ -Markierung in die Reporter-Gruppe, wurde die Synthese nach der optimierten Syntheseroute des  $\text{SOT}^0$ -Tags fortgeführt und das Produkt  $\text{SOT}^{180}$  konnte so über 7 Stufen mit 9 % Gesamtausbeute synthetisiert werden (Schema 21). Die Evaluierung des  $\text{SOT}$  Duplex Sets wurde von Dr. Michael Stadlmeier durchgeführt und in der Dissertation über die ‘*Synthese Sulfoxid-basierter Reagenzien für die Proteomik und deren Anwendung*’ ausführlich beschrieben.<sup>51</sup>

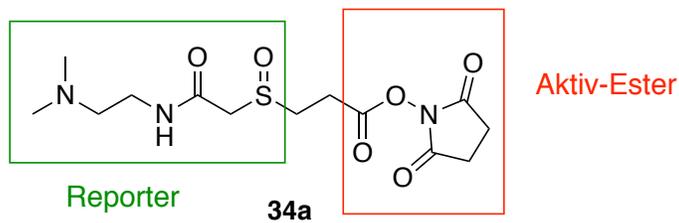


**Schema 21** Übersicht der optimierten Syntheseroute zur Darstellung des  $^{13}\text{C}$ -markierten isobaren Markierungsreagenzes SOT **1b**. a) **4** (2.4 Äq), EDC·HCl (2.6 Äq), DMAP (0.3 Äq), TEA (3.5 Äq) HOBt (2.5 Äq), DCM, RT, 95 %. b),c) TCEP·HCl (1.0 Äq),  $\text{NaHCO}_3$  (4.2 Äq), **17c** (2.3 Äq), DMF/ $\text{H}_2\text{O}$  (3:1), RT, 92 %; d) 10 % Ameisensäure in MeOH, 100 wt Pd *black*, 40 °C, 2 h, 62 %; e) **5** (1.2 Äq), DIPEA (1.5 Äq), DMF, RT, 74 %; f) basische Esterhydrolyse des Methylesters **8b** zur Säure **25b**; LiOH (1.0 Äq.),  $\text{H}_2\text{O}$ : MeOH (1:2), RT, 98 %; g) *m*CPBA (1.0 Äq.),  $\text{H}_2\text{O}$ , RT, 70 %; h) NHS-TFA (2.0 Äq), Pyridin (2.0 Äq), DMF, 2 h, RT, 32 %.

---

### 3.1.8 Synthese und Untersuchung der modifizierten Reagenzstruktur

Auf Basis der Struktur des SOT-Reagenzes wurden Strategien entwickelt, die zur Reduktion der Datenkomplexität und zur Verbesserung der Peptidentifikationsrate beitragen könnten. Es wurde wie in Abbildung 23 gezeigt ein vereinfachtes Testmolekül **34a** entwickelt, welches den erwünschten Effekt einer höheren Peptidentifikation erzielen könnte.

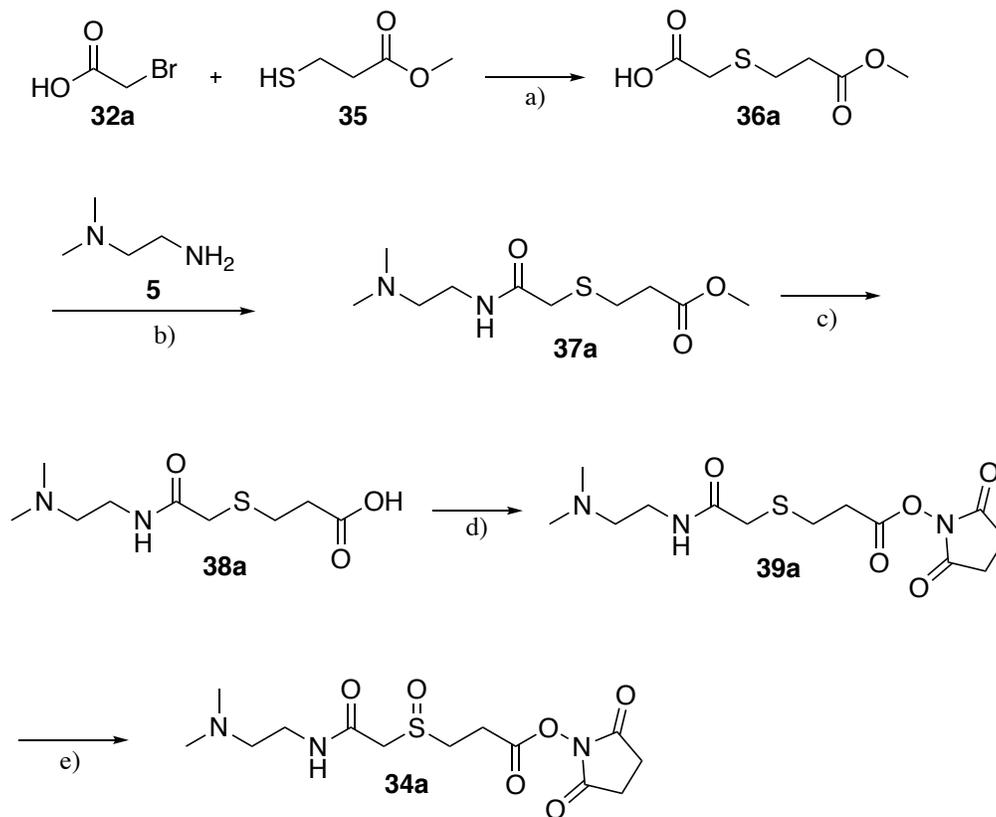


**Abbildung 15** Design der modifizierten SOT-Struktur zur Untersuchung des Einflusses der *Balancer*-Gruppe in Bezug auf Peptidentifikation und Fragmentierungseigenschaften.

Beim Betrachten der modifizierten Struktur des SOT-Reagenzes, welche im weiteren Verlauf IsSOT (*less steric* SOT) genannt wird, fällt sofort die fehlende *Balancer*-Gruppe auf. Es soll so zunächst der Einfluss der *Balancer*-Gruppe in Hinblick auf die Markierungseffizienz und Fragmentierungseigenschaften untersucht werden. Dies könnte Aufschlüsse darüber geben, ob die geringe Markierungseffizienz des SOT-Reagenzes **34a** auf Basis der Steric begründet liegt. Ferner könnte die Verminderung der Anzahl an protonierbaren Gruppen eine Auswirkung auf die Fragmentierungseigenschaften haben, denn der Verlust einer tertiären Amin-Gruppe senkt die Ladungsdichte markierter Peptide. Dies könnte zur Folge haben, dass das IsSOT zwar geringer als das SOT aber immer noch stärker als das TMT-Analog fragmentiert. Was die Bildung unspezifischer Fragmente verringern würde trotz guter Fragmentierungseigenschaften.

### 3.1.9 Synthese-Strategie der modifizierten SOT-Struktur

Die Syntheseroute des vereinfachten modifizierten SOT-Tags **34a** (Schema 22) beginnt mit einer nukleophilen Substitutionsreaktion der kommerziellen erhältlichen Bromessigsäure (**32a**) mit 3-Mercaptopropionsäure (**35**) um das Grundgerüst des neuen Testmoleküls entstehen zu lassen. Eine anschließende Amidierung von **36a** mit *N,N'*-Dimethylethan-1,2-diamin (**5**) liefert die zentrale Zwischenstufe **37a**. Die Verseifung des Methylesters **37a** erfolgt über eine basische Esterhydrolyse und macht die Vorstufe zum Aktivester **38a** zugänglich. Eine abschließende Aktivierung zum Aktivester mit NHS-TFA zu **39a** und Oxidation mit *m*CPBA liefert das fertige Testmolekül **34a**.



**Schema 22** Syntheseroute zum modifizierten und vereinfachten Testmolekül IsSOT **34a**. a) 3-Mercaptopropionsäure Methyl ester **35** (1.0 Äq.), Bromoessigsäure **32a** (1.0 Äq.), TEA, in DMF, 12 h, RT, 20 %; b) *N,N'*-Dimethylethylenediamin **5** (1.0 Äq) PyBOB (1.1 Äq) HOBt (1.1 Äq), TEA (1.7 Äq), in DMF, RT, 47 %; c) LiOH (1.0 Äq), MeOH:H<sub>2</sub>O (3:1), RT, 30 min, quant. ; d) NHS-TFA (3.0 Äq), Pyridin (1.7 Äq), in DMF, RT, 1h, 16 %; e) *m*CPBA (1.0 Äq), DCM, RT, 61 %.

---

Es stellte sich heraus, dass sich die Reihenfolge der letzten beiden Syntheseschritte deutlich auf die Reinheit des Produktes auswirkte. In der ursprünglichen Syntheseroute wurde zunächst nach der basischen Esterhydrolyse die Oxidation zum Sulfoxid eingeleitet bevor die Aktivierung mit NHS-TFA durchgeführt wurde. Jedoch zeigte sich, dass die Umsetzung der Säure **38a** zu aminreaktiven NHS-Ester wesentlich höher war und auch weniger Nebenreaktionen aufwies, als bei der Synthesestufe, in der die Oxidation zum Sulfoxid voran gegangen ist. Allerdings war eine Oxidation in Wasser aufgrund der hohen Hydrolyseempfindlichkeit des Aktivesters nicht mehr möglich. So wurde die Reaktion in trockenem DCM durchgeführt. Das Endprodukt **34a** wurde in wenig Acetonitril gelöst und in Aceton ausgefällt. Um erste massenspektrometrische Aussagen über das Verhalten des modifizierten SOT-Tags im Vergleich zu herkömmlichen isobaren Markierungsreagenzien zu treffen, wurde das Reagenz zunächst ohne Isotopen-Markierung ersten Messungen unterzogen.

### **3.1.10 Evaluierung und massenspektrometrische Analyse der modifizierten SOT-Struktur ohne Isotopenmarkierung**

Die massenspektrometrischen Auswertungen wurden von in Zusammenarbeit mit *Dr. Michael Stadlmeier* durchgeführt.<sup>31</sup> Um die Markierungseffizienz des neuen Testmoleküls **34a** mit dem des erstmalig synthetisierten SOT-Designs zu vergleichen, wurden wie bei den vorherigen *E.coli* Proben zunächst unter den gleichen Bedingungen mit TMT126 und IsSOT **34a** markiert. Anschließend erfolgte eine dynamische Suche zur Auswertung der Daten. Jedoch zeigten die Auswertung keine Steigerung der Markierungseffizienz, eher im Gegenteil. Obwohl die Ergebnisse des TMT126 ähnliche Markierungszustände aufwiesen (~7 % unvollständig markierte Peptide) wiesen die Auswertungen der mit IsSOT markierte Peptide ein wesentlich schlechteres Markierungslevel auf. Lediglich ~56 % aller identifizierten Peptide waren vollständig gelabelt. Von den ~44 % der identifizierten Peptide welche unvollständig markiert waren, enthielten ~21 % unmarkierte Lysine. Um die Markierungseffizienz zu erhöhen wurde im nächsten Schritt ein optimiertes Markierungsprotokoll verwendet welches die

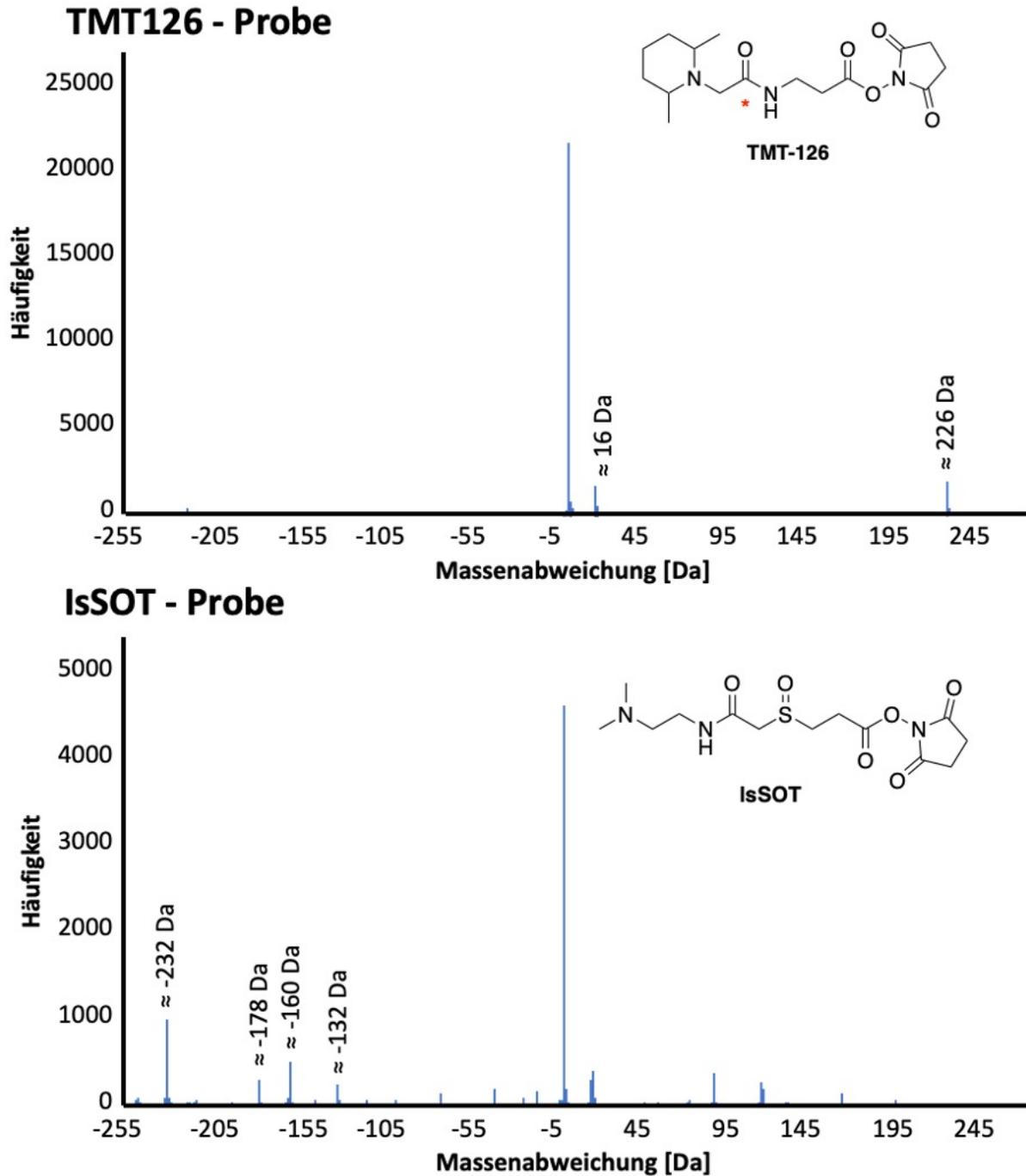
---

Anzahl unvollständig markierter Peptide im Fall von TMT von ~7 % auf ~2 % reduzieren konnte. Jedoch war die Markierungseffizienz IsSOT-markierte Peptide trotz erheblicher Steigerung auf nur ~36 % unvollständig markierte Peptide immer noch nicht optimal.

Auch weitere Versuche die optimalen Markierungsbedingungen des neuen IsSOT-Reagenzes zu finden blieben erfolglos. Sowohl eine Erhöhung der Reagenzmenge pro Peptidmenge, die Variation des pH-Werts als auch die Verwendung unterschiedlicher Puffersysteme konnte die Markierungseffizienz des neuen Testmoleküls nicht steigern.

Auch Versuche die Zugabe des IsSOT-Reagenz in sechs Portionen alle zehn Minuten zu variieren, da so immer frisches Reagenz ohne Hydrolyse zur Verfügung steht, blieben erfolglos. Bei der Überprüfung und Analyse auf unerwünschte Nebenreaktionen während der Markierungsreaktion wurden einige Messungen nach der Markierung einer offenen Suche unterzogen. In dieser lässt der *Sequest*-Algorithmus sehr große Fehlergrenzen des Vorläuferions zu, um unbekannte Modifikationen festzustellen. Hierbei zeigte sich, dass ein Großteil häufig beobachteter Modifikationen nicht erklärt werden können und dass es so scheint, dass die Reinheit der Reagenzien verbessert werden muss, um unspezifische Nebenreaktionen zu verhindern. Während das Histogramm der TMT126-markierten Probe mit wenigen Massenabweichungen die erwartete Verteilung darstellt, zeigt das Histogramm von der IsSOT-markierten Probe viele unerwarteten zusätzlichen Signale.<sup>31</sup>

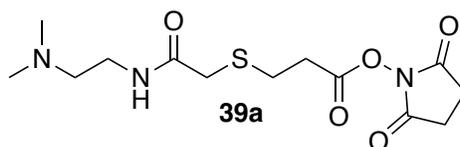
Abweichungen der TMT126-markierten Probe bei 16 Da könnte auf die Oxidation von Methionin-Seitenketten zurückzuführen sein. Darüber hinaus lässt sich eine Abweichung bei 226 Da durch eine zusätzliche Markierung von TMT erklären. Jedoch zeigten sich bei der IsSOT-markierten Probe neben den erwarteten Signalen zwischen 0 - 16 Da häufige Abweichung bei -178 Da und 232 Da, was durch den Verlust der Reporter-Gruppe in der Ionenquelle verursacht worden sein kann. Weitere Modifikationen bleiben bisher ungeklärt. Es scheint allerdings, dass die Reinheit des Reagenzes deutlich verbessert werden muss, um damit akkurat quantifizieren zu können.<sup>31</sup>



**Abbildung 16** Histogramme von IsSOT- und TMT-126 nach offenen Suchen markierter E.Coli Proben. Obwohl im Falle von TMT<sup>126</sup>-Markierung kaum unerwartete Massenabweichungen detektiert werden konnten, konnte im Histogramm IsSOT-markierten Peptide einige zusätzliche häufig vorkommende Modifikationsmassen detektiert werden.<sup>31</sup>

---

Für die Analyse der Markierungseffizienz des IsSOT in Bezug auf die Reinheit wurde zunächst das unpolare Vorläufermolekül **39a** getestet. Da zunächst lediglich die Auswirkungen des HPLC-gereinigten NHS-Esters auf das Peptid-Labeling getestet werden sollte, war die Oxidation zum Sulfoxid nicht erforderlich. Ferner liefert ein unpolares Molekül, besonders bei der starken Polarität des SOT-Reagenzes, eine bessere Trennung auf der HPLC. Das unpolare IsST ist in Abbildung 17 gezeigt und wurde nach der in Schema 22 gezeigten Syntheseroute synthetisiert.



**Abbildung 17** Struktur der SOT2.0 Vorstufe zur Untersuchung der Markierungseffizienz. Die fehlende Sulfoxidgruppe macht es ungeeignet für Quantifizierungsexperimente. Testmolekül wurde und nach der Syntheseroute Schema 22 synthetisiert und via HPLC aufgereinigt.

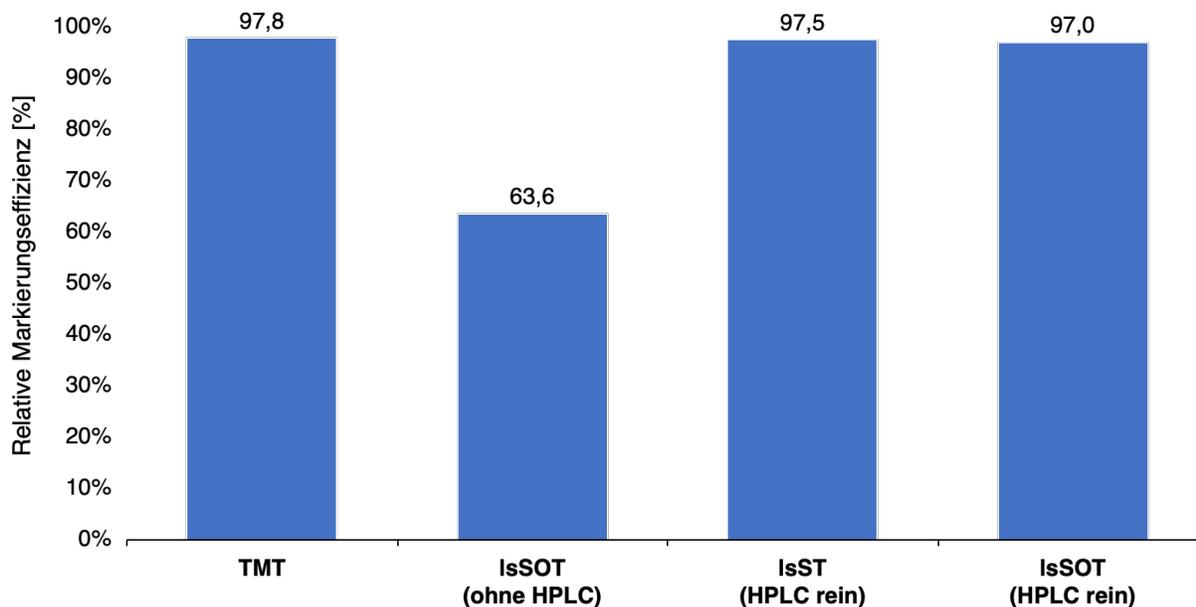
Bei der Suche nach einer geeigneten HPLC-Trennung wurden mehrerer Bedingungen analytischer HPLC-Läufe der Rohprodukte getestet (Reverse Phase Silica-C<sup>18</sup>). Aufgrund der hohen Hydrolyse-Empfindlichkeit des IsST-Reagenzes **34** und der geringen UV-Adsorption war die Suche nach einer geeigneten HPLC-Methode schwierig. Die optimalen Bedingungen der Eluenten lagen bei einem pH-Wert von 3, da so die Hydrolyse des Aktivesters vermindert wird. Ebenfalls durfte bei der HPLC-Methode kein Puffersystem verwendet werden, da sonst aufgrund der hohen Polarität und Hydrolyse-Empfindlichkeit verbleibende Salze nicht mehr vom Endprodukt entfernt werden können. Die beste Auftrennung wurde mit einem Gradienten von 0 % auf 20 % MeCN bei pH = 3 in 45 min erzielt. Die Einstellung des pH-Wertes gelang mit HPLC-reiner Ameisensäure. Das Produkt konnte mit einer Retentionszeit von 12 min bei genannten Bedingungen eluiert werden. Die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 190 nm.

---

### 3.1.11 Evaluierung des hochreinen IsST-Reagenz

Um einen Vergleich zu TMT herzustellen wurde das Experiment mit dem IsST **39a** wieder mit TMT-126 unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Während wie in vorherigen Experimenten wieder 2.2 % der identifizierten Peptide der TMT-Kontrolle nicht vollständig markiert waren, betrug die unvollständige Markierung IsST-markierter Peptide nur 2.5 % (Abbildung 26). Die Anzahl der nicht vollständig markierten Peptide konnte sogar bei einer Verdopplung der eingesetzten Reagenzmenge auf 1.9 % gesenkt werden. Nachdem eine geeignete Methode zur Aufreinigung des Reagenzes entwickelt wurde, wurden erneut Markierungsexperimente mit E. Coli-Lysat durchgeführt. Die Auswertung der Daten zeigte, dass bei Verwendung des aufgereinigten IsST **39a** eine weitaus bessere Markierungseffizienz erzielt werden konnte. So konnte gezeigt werden, dass das neuartige IsST-Reagenz in hoher Reinheit vergleichbare Markierungseffizienzen wie das kommerziell erhältliche TMT-Reagenz erzielen kann. Es konnte somit bewiesen werden, dass die Reinheit des Reagenzes ein entscheidender Faktor für das Erlangen sehr guter Markierungseffizienzen führen kann.

Analog dazu wurde das IsSOT **34a** unter den gleichen HPLC-Bedingungen wie **39a** in hoher Reinheit isoliert, um die Einführung der Sulfoxid-Gruppe unter den gleichen Bedingungen auf die Markierungseffizienzen zu testen. Trotz der sehr ähnlichen Struktur zu **39a** eluierte das Produkt **34a** bereits nach 8 min aufgrund der höheren Polarität basierend auf der Sulfoxid-Gruppe. Nach einer erfolgreichen Aufreinigung *via* HPLC zeigten wie erwartet auch diese Daten der Markierungs-Analysen, dass es möglich war eine sehr hohe Markierungseffizienz zu erlangen. Vergleichbar zu dem Testmolekül **39a** wurden nur 3.0 % nicht vollständig markierten Peptide identifiziert (Abbildung 26). Ebenfalls konnte die Verdopplung der eingesetzten Reagenzmenge eine Verbesserung der Markierungseffizienz bewirken indem nur 2.5 % nicht vollständig markierte Peptide detektiert wurden.



**Abbildung 18** Übersicht der relativen Markierungseffizienzen des HPLC-reinen IsST- und des IsSOT Reagenzes im Vergleich zum unaufgereinigten IsSOT-Reagenzes und zu TMT.

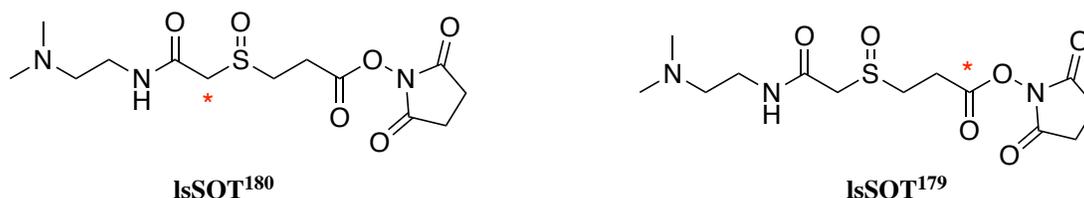
Es zeigte sich jedoch, dass trotz fast vollständiger Markierung der IsSOT-markierten Peptide die Peptididentifikationsrate im Vergleich zu dem IsST deutlich verringert wird. Im Kontrollexperiment konnten mit IsST noch 11695 Peptide identifiziert werden, wohingegen der Wert bei IsSOT Proben auf nur 3164 bzw. 3310 identifizierten Peptiden sank. Dies würde einer Verringerung der MS/MS-Identifikationsrate von 58.7 % auf 28.4 % bzw. 27.7 % bedeuten. So konnte mit diesem Experiment der Einfluss der starken Fragmentierung der Sulfoxid-Gruppe auf die Peptididentifikation gezeigt werden.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass durch die Verwendung von HPLC-reinen Sulfoxid-enthaltenden Molekülen die Markierungseffizienzen deutlich gesteigert werden können. Es muss allerdings näher untersucht werden, ob die starke Fragmentierung des Sulfoxids weiterhin Einfluss auf die Peptididentifikationsrate hat auch wenn Verwendung der Suchalgorithmen dem Reagenz angepasst werden kann.

---

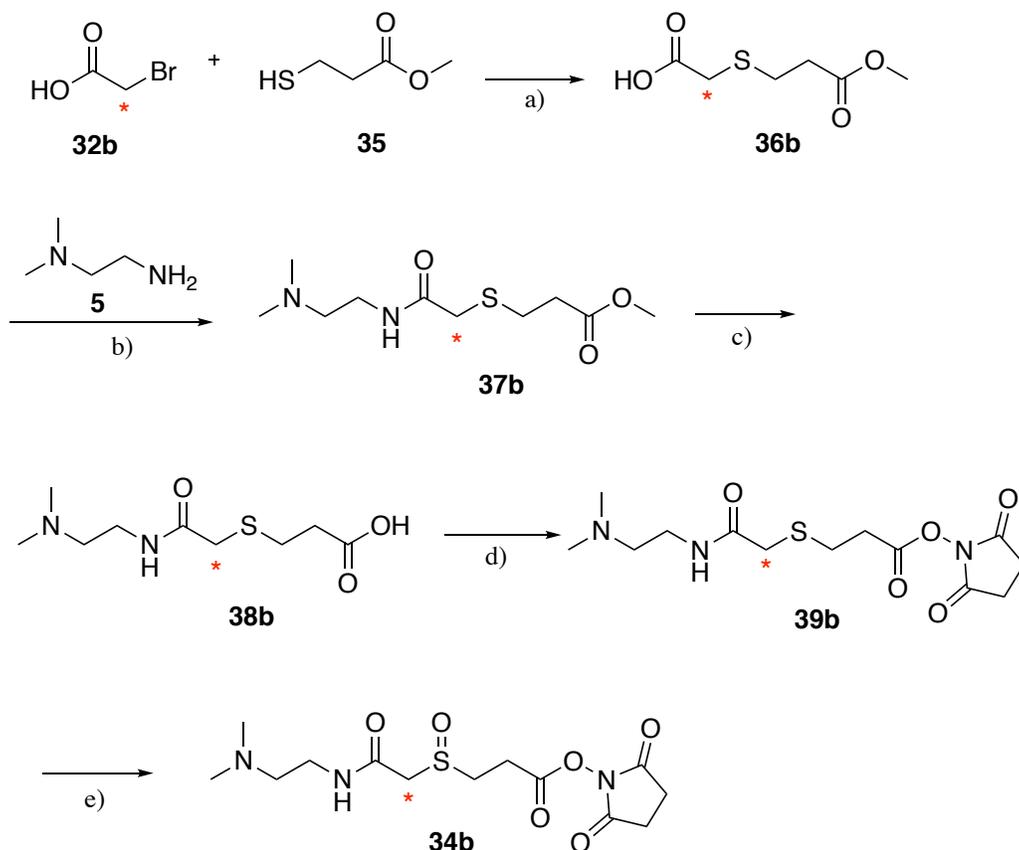
### 3.1.12 Synthese Duplex-Sets des modifizierten SOT-Reagenzes zur Evaluierung der Quantifizierung

Aufgrund der sehr vielversprechenden Daten der Markierungseffizienzen der Vorstufe der modifizierten SOT-Tags wird im nächsten Schritt die Quantifizierung mittels des Duplex-Reagenz-Sets untersucht. Abbildung 19 zeigt die Strukturen des IsSOT-Duplex SOT<sup>180</sup> und SOT<sup>179</sup>.



**Abbildung 19** Isotopomere Strukturen des modifizierten SOT-Duplex. Die Namen der jeweiligen Isotopomeren lassen sich von Molekulargewicht der generierten Reporter-Ionen 179 Da und 180 Da ableiten. Die Einführung der Isotopen gelang zum einen über die Reporter-Gruppe IsSOT<sup>179</sup> und über eine Michael Addition von Methylacrylat mit Mercaptoessigsäure zur Synthese der Grundstruktur IsSOT<sup>180</sup>.

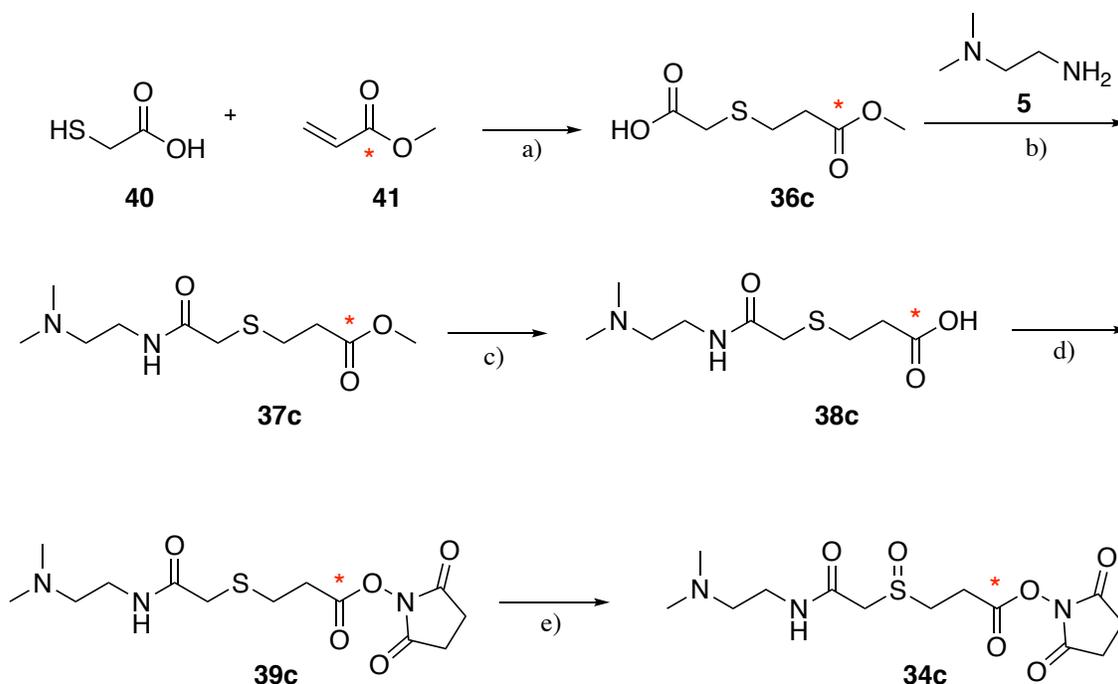
Zur Darstellung des isotopenmarkierten SOT Reagenzes **34b** wurde zunächst in einer nukleophilen Substitutionsreaktion die kommerziell erhältliche Bromessigsäure mit dem 3-Mercaptopropionsäure zur Reaktion gebracht, um das Grundgerüst des neuen Testmoleküls zu bilden. Eine anschließende Amidierung mit *N,N*-Dimethylethylenediamin (**5**) liefert die Darstellung von **37b**. Die Verseifung des Methylesters **37b** erfolgt über eine basische Esterhydrolyse und macht freie Säure **38b** zugänglich. Eine abschließende Aktivierung zum Aktivester mit NHS-TFA und Oxidation mit *m*CPBA liefert das fertige Testmolekül **34b**.



**Schema 23** Syntheseroute zum  $^{13}\text{C}$ -markierten IsSOT **34b**. a) 3-Mercaptopropionsäure Methyl ester **35** (1.0 Äq.), Bromoessigsäure **32b** (1.0 Äq.), TEA, in DMF, 12 h, RT, 20 %; b) *N,N'*-Dimethylethylenediamin **5** (1.0 Äq) PyBOB (1.1 Äq) HOBt (1.1 Äq), TEA (1.7 Äq), in DMF, RT, 31%; c) LiOH (1.0 Äq), MeOH: H<sub>2</sub>O (3:1), RT, 30 min, 100 %; d) NHS-TFA (3.0 Äq), Pyridin (1.7 Äq), in DMF, RT, 1h, 36 %; e) *m*CPBA (1.0 Äq), DCM, RT, 55 %.

So konnte das modifizierte isobare Markierungsreagenz das IsSOT **34b** in einer 5 stufigen Synthese zugänglich gemacht werden (Schema 23).

Die Einführung der  $^{13}\text{C}$ -Markierung in das IsSOT<sup>179</sup> Reagenz **34c** gelang über einer Michael-Addition der kommerziell erhältlichen Mercaptoessigsäure **40** mit dem  $^{13}\text{C}$ -markierten Methylacrylat **41**. Nach erfolgreicher Einführung der  $^{13}\text{C}$ -Markierung in das Grundgerüst, wurde die Synthese nach der optimierten Syntheseroute des IsSOT<sup>0</sup>-Tags fortgeführt. Das Produkt **34c** konnte so über 5 Stufen synthetisiert werden (Schema 24).



**Schema 24** Syntheseroute zum  $^{13}\text{C}$ -markierten IsSOT **34c**. a) **40** (1.0 Äq), **41** (1.0 Äq), TEA (1.0 Äq), Toluol, RT, 48 h, 51 %; b) *N,N*-Dimethylethylenediamin **5** (1.0 Äq) PyBOB (1.1 Äq) HOBt (1.1 Äq), TEA (1.7 Äq), in DMF, RT, 19%; c) LiOH (1.0 Äq), MeOH: H<sub>2</sub>O (3:1), RT, 30 min, 54 %; d) NHS-TFA (3.0 Äq), Pyridin (1.7 Äq), in DMF, RT, 1h, 50 %; e) *m*CPBA (1.0 Äq), DCM, RT, 14 %.

Nachdem die Isotopologen des IsSOT-Reagenzes zugänglich gemacht worden sind, wurde das Duplex-Set nach der Vorschrift der in dieser Arbeit entwickelte HPLC-Methode zur Aufreinigung der Endstufen **34b** und **34c** angewendet. Jedoch konnte aufgrund der geringen Gesamtausbeute kaum hochreines Produkt *via* HPLC isoliert werden. Ebenfalls zeigte eine LC-MS Analyse kleine Verunreinigungen, sowie eine fortschreitende Hydrolyse des Aktivesters. Auch die massenspektrometrischen Analysen zur Quantifizierung und zur Untersuchung der Markierungseffizienz des IsSOT-Duplex Sets bestätigten die fortgeschrittene Hydrolyse des Reagenzes. Sowohl die Markierungseffizienz als auch die Peptididentifikation lagen deutlich unter den erwarteten Werten der unmarkierten Isotopologen. Was darauf schließen lässt, dass Verunreinigungen in den Reagenzien oder eine fortschreitende Hydrolyse des Aktivesters die angenommen Mengen der Reagenzien beim Experiment verfälscht haben und somit fehlschlagen. Für weitere Experimente und einer routinemäßigen

---

Anwendung der Reagenzien ist eine sehr hohe Reinheit enorm wichtig, damit die Markierung der Peptide effizient und robust ist. Die Synthese von deutlich größeren Mengen könnte dabei von Vorteil sein, da die Aufreinigung mit Hilfe von Umkristallisation möglich macht, was zu einer erhöhten Reinheit des Produktes führen kann.

---

## 4 Ausblick

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde das Design eines neuen isobaren Markierungsreagenzes entwickelt, welches eine effiziente und gleichzeitige Bildung von Reporter-Ionen und Komplementär-Ionen-Cluster für die Peptidquantifizierung ermöglicht und damit die Limitierungen aktueller Reagenzien überwindet. Das Sulfoxid-basierte SOT-Tag unterscheidet sich in seinem Fragmentierungsverhalten deutlich vom herkömmlichen Quantifizierungsreagenzien wie das etablierte TMT-Tag. Durch die effiziente Spaltung des SOT-Reagenzes, welches die Bildung von Komplementär-Ionen und somit eine verzerrungsfreie Quantifizierung begünstigt, können zukünftig deutliche Fortschritte im Bereich der Quantitativen Proteomik erzielt werden. Besonders die Verwendung von komplementären Fragmentationen zur genauen Bestimmung von Peptid- bzw. Proteinverhältnissen auch in komplexeren Proben könnte in Zukunft sehr interessant werden.

Durch die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten HPLC- Methoden, war es erstmals möglich wenige Milligramm der Endstufen des SOT-Tags hoch rein zu isolieren. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Verwendung von HPLC-aufgereinigten Sulfoxid-enthaltenden Molekülen sehr hohe Markierungseffizienzen erreicht werden können.

Es bedarf jedoch, bei einer routinemäßigen Verwendung des SOT-Tags, einen Aufreinigungsschritt im großen Maßstab. Dies könnte bei der Synthese von größeren Mengen durch eine Umkristallisation beispielsweise erfolgen. Es muss allerdings näher untersucht werden, ob die die starke Fragmentierung des Sulfoxids weiterhin Einfluss auf die Peptididentifikationsrate hat. So müssten herkömmliche Suchalgorithmen dem Reagenz angepasst werden, um die zusätzlich gebildeten komplementären Fragmentationen zuordnen zu können. Auf der Suche nach dem perfekt geeigneten Reagenz, welches einen Kompromiss eingeht zwischen der effizienten Bildung von komplementären Ionen und einer geringeren Komplexität im MS<sup>2</sup>-Spektren, müssen weiterhin neue Strukturen durch die organische Synthese hergestellt und sukzessiv angepasst werden.

---

Eine weitere sehr interessante Anwendung der Sulfoxid-basierten Quantifizierungsreagenzien wäre im Bereich der gezielten Quantifizierung von Peptiden (engl. targeted proteomics). Bei dieser Methode sind die Identitäten der Zielpeptide bereits bekannt und eine Modifikation der Suchalgorithmen nicht nötig. So könnte die relative Quantifizierung anhand der effizient gebildeten komplementären Fragmentationen erfolgen.

---

## 5 Experimenteller Teil

### 5.1 Materialien und Methoden

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle feuchtigkeits- oder sauerstoffempfindlichen Reaktionen unter Schlenk-Bedingungen in einer Argon- oder Stickstoffatmosphäre durchgeführt. Vor Verwendung der Glasgeräte wurden diese unter Hochvakuum mit einer Heizluftpistole von jeglichen Sauerstoffresten befreit und ausgeheizt.

#### Chemikalien und Lösemittel

Falls nicht anderweitig vermerkt wurden die verwendeten Chemikalien von den Firmen *Sigma-Aldrich (jetzt Merck)*, *Fluka*, *TCI Europe*, *Bachem*, *ABCR*, *Acros Organics* oder *Carbosynth* bezogen und verwendet. Falls nicht anders benannt, wurde das Wasser aus der Hausleitung in destillierter Form bezogen.

Die zur Synthese verwendeten trockenen Lösungsmittel (Wassergehalt > 50 ppm) wurden von Sigma Aldrich (Merck) oder Acros bezogen und unter Argonatmosphäre über ein Molekularsieb aufbewahrt. Lösungsmittel technischer Qualität wurde hingegen für Extraktionen oder auch Säulenchromatographie verwendet, die vor der Benutzung einmal destilliert wurden.

#### Chromatographie

Zur qualitativen Reaktionskontrolle wurde die Dünnschichtchromatographie (DC) mit den Fertigplatten Kieselgel F254 von Merck durchgeführt. Ausgehend von den jeweiligen Verbindungen wurden unterschiedliche Methoden zur Detektion verwendet. Aromatische und fluoreszente Verbindungen wurden durch Bestrahlung der DC-Platten mit UV-Licht ( $\lambda_1=254$  nm,  $\lambda_2=366$  nm) sichtbar gemacht. Ferner wurden Dünnschichtchromatogramme ungesättigter Substanzen in eine Iodkammer gegeben (ca. 10 sek). Aminverbindungen wurden durch Anfärbung der Chromatogramme in eine

---

Ninhydrin-Lösung (0.3 g Ninhydrin, 3 mL AcOH, in 100 mL n-Butanol) und anschließendes Erhitzen mit einem Heißluftföhn sichtbar gemacht. Eine Cer-Ammoniummolybdän-Lösung (5g  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 2g  $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 20 mL konz. Schwefelsäure, 180 mL Wasser) wurde für das Chromatogramm eher unspezifischer Verbindungen verwendet.

### **Säulenchromatographie**

Die bei der Synthese erhaltenen Rohprodukte wurde nach der Flash-Methode (Überdruck mit Hilfe von Stickstoff) mithilfe der Säulenchromatographie zur Aufreinigung der Verbindungen durchgeführt. Als stationäre Phase diente Kieselgel 60 (Korngröße 0.063– 0.200 mm) der Firma Merck. Bei säureempfindlichen Stoffen wurde das Kieselgel vor der Aufreinigung mit Pyridin oder auch Net3 deaktiviert.

### **Entsalzung**

Mittels der HyperSep™ C18 Kartuschen der Firma *Thermo Scientific* wurden die Reagenzvorstufen entsalzt.

### **Gefriertrocknung**

Bei Wasser- und Acetonitrilrückständen wurde eine *Alpha 2-4 LD plus*-Lyophylle verwendet.

### **Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)**

Analytischen Umkehrphasen-HPL-Chromatogramme wurden an einer Waters-Anlage (alliance 2695 mit Photodiode Array Detector 2996) mit einer VP 250/10 Nucleodur 100-5 C<sub>18</sub> eC-Säule oder auch einer CC 250/4 Nucleosil N 120-3 C18-Säule von Machery-Nagel aufgenommen. Als Eluenten wurde ein Gemisch aus Wasser und Acetonitril verwendet unter pufferfreien Bedingungen mit einem eingestellten pH-Wert

---

von 3. Der Fluss betrug 0.5 mL/min. Zur präparativen Umkehrphasen- HPLC 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 C<sub>18</sub>EC-Säule von Machery-Nagel und das oben beschriebene Eluenten System 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 DuraSample IR II Messkopf von Smiths ohne weitere Präparation der Proben aufgenommen. Die Proben wurden zur Messung in geringen Mengen Aceton gelöst und so die Lösung auf dem Messkopf aufgetragen. Nach dem Verdampfen des Lösungsmittels konnten der Probenrückstand vermessen werden. Die Wellenzahlen wurde in cm<sup>-1</sup> angegeben. Die Intensität der Signale wurde mit s (stark), m (medium), w (schwach) konkretisiert wobei die Bezeichnung br für sehr breite Signale steht.

### **Kernresonanzspektroskopie (NMR)**

<sup>1</sup>H-NMR-Spektren und <sup>13</sup>C-NMR- (300, 400 und 600 MHz) sowie 2D-Spektren (COSY, HSQC, HMBC) wurden, soweit nicht spezifiziert, bei Raumtemperatur von der NMR-Abteilung der LMU München, Department Chemie (Haus F), an einem Bruker ARX 300, Varian Inova 400 sowie an einem Bruker ARX 600, einem Bruker ARX 800 oder persönlich an einem Bruker Ascend 400 gemessen. Die gemessenen <sup>13</sup>C-NMR Spektren wurden <sup>1</sup>H-entkoppelt aufgenommen. Die chemische Verschiebung  $\delta$  sind in parts per million (ppm) angegeben und beziehen sich auf die Mitte des jeweiligen Kopplungsmusters, wobei es sich bei einem Multipllett auf die Ausdehnung bezieht. Die chemischen Verschiebungen wurden relativ zum Lösungsmittel als internen Standard aufgezeichnet. Über das Lösungsmittelsignal erfolgte die Kalibrierung der Spektren. Die Multiplizitäten der Signale wurden als s (Singulett), d (Dublett), t (Triplett), q (Quartett), p (Pentett), m (Multipllett) und deren Kombinationen angegeben. Kopplungskonstanten in <sup>1</sup>H-Spektren beziehen sich, soweit nicht spezifiziert auf <sup>1</sup>H,<sup>1</sup>H-Kopplungen. Eine

---

Zuordnung der Signale im  $^1\text{H}$ -NMR oder  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektrum wurde mit Hilfe von 2D-Experimenten (COSY, NOESY, HMBC, HSQC, TOCSY). Zur Auswertung der NMR-Spektren wurde die Software MestReNova von Mestrelab Research S.L.K in den aktuellsten Versionen verwendet.

### **Massenspektrometrie kleiner Moleküle (MS, HRMS)**

Alle hochaufgelösten Massenspektren wurden von der Analytik-Abteilung der LMU München, Department Chemie (Haus F), wobei ein Finnigan LTQ FTICR (ESI) (Thermo Fisher Scientific) oder die Thermo Finnigan MAT 95 (EI) verwendet wurden.

Die zur Reaktionskontrolle aufgezeichneten niederaufgelöste Massenspektren wurden an einem MSQ Plus System (ESI) (Thermo Fisher Scientific) aufgezeichnet. Die Zuordnung der erhaltenen Signale bezieht sich auf das am häufigsten vorkommenden Isotop.

### **Rotationsverdampfer**

Sowohl das Erntfernen von Lösemittelrückständen als auch das Destillieren der Lösemittel technischer Qualität wurde ein Rotationsverdampfer Laborta 4000 von Heidolph verwendet.

### **Schmelzpunktmessung**

Schmelzpunkte wurden an dem Gerät *Büchi Melting Point B-540* ohne weitere Korrektur gemessen.

### **pH-Meter**

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

---

## **Zentrifuge**

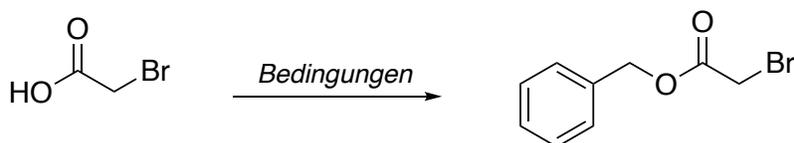
Es diente eine MiniSpin-Zentrifuge (Eppendorf) zum Sedimentieren.

---

## 5.2 Synthesevorschriften

### 5.2.1 Synthese der isobaren Markierungsreagenzien (SOT-Tag)

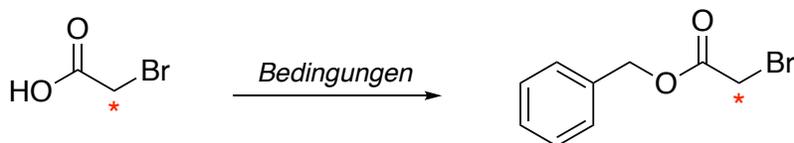
#### Benzylbromacetat (17b)<sup>83</sup>



**Allgemeine Vorschrift 1 (AV1)** In einem trockenen mit Argon gefluteten Schlenkcolben, wurde Bromessigsäure (1.00 g, 7.19 mmol, 1.2 Äq), Benzylalkohol (640  $\mu$ L, 6.20 mmol, 1.0 Äq) and *p*-Toluolsulfonsäure (21 mg, 0.12 mmol, 0.02 Äq) gelöst in 10 mL Toluol und 2 h unter Rückfluss gerührt. Nach einer vollständigen Umsetzung des Startmaterials, wurde die Reaktionsmischung auf Raumtemperatur abgekühlt und mit einer 20 % Natriumhydrogencarbonat Lösung (2 x 20 mL), Natriumchlorid-Lösung (2 x 20 mL) und destilliertem Wasser (2 x 20 mL) gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden anschließend über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und *in vacuo* eingeeengt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Silica, EtOAc/DCM 1:4) wurde **17b** als farblos Öl erhalten (1.38 g, 6.02 mmol, 84 %).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, Methanol-*d*<sub>4</sub>)  $\delta$  = 7.46 – 7.13 (m, 5H), 5.16 (s, 2H), 3.95 (s, 2H) ppm.

#### Benzylbrom(2-<sup>13</sup>C)acetat (17c)



Entsprechend **AV1** wurde Bromessigsäure-2-<sup>13</sup>C (500 mg, 3.60 mmol, 1.2 Äq) und Benzylalkohol (320  $\mu$ L, 3.10 mmol, 1.0 Äq) in Toluol (5 mL) gelöst. Anschließend wurde

---

*p*-Toluolsulfonsäure (11 mg, 60  $\mu$ mol, 0.02 Äq) hinzugegeben und das Reaktionsgemisch wurde für 2 h unter Rückfluss gerührt. Die Aufarbeitung des Reaktionsgemisch erfolgte wie in **AV1**. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Silica, EtOAc/DCM 1:4) wurde **17c** als farblos Öl erhalten (427 mg, 1.86 mmol, 52 %).

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, Methanol-*d*<sub>4</sub>)  $\delta$  = 7.41 – 7.33 (m, 5H), 5.20 (s, 2H), 4.18 (s, 1H), 3.80 (s, 1H) *ppm*.

**<sup>13</sup>C-NMR** (201 MHz, Methanol-*d*<sub>4</sub>)  $\delta$  = 142.6, 136.8, 129.5, 129.42, 129.3, 68.7, 65 *ppm*.

**HRMS** (EI): Berechnet für C<sub>8</sub><sup>13</sup>CH<sub>10</sub>BrO<sub>2</sub><sup>+</sup> [M]<sup>+</sup>: 229.9820; gefunden: 229.9718 *m/z*.

**IR** (cm<sup>-1</sup>):  $\tilde{\nu}$  = 3065, 1733, 1587, 1497, 1455, 1376, 1278, 1213, 1147, 1106, 967, 736.

### **S-(((*R*)-3-Amino-3-carboxypropyl)thio)-L-homocystein (**10**)<sup>84</sup>**

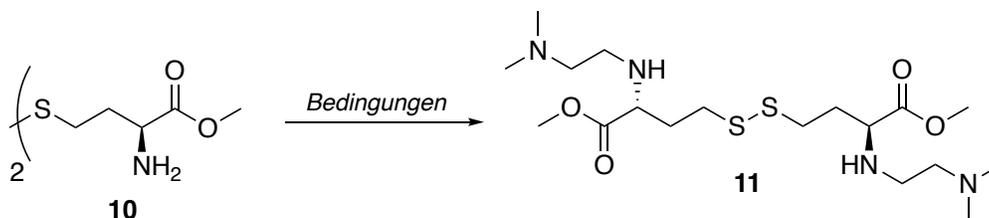


In einem trockenen mit Argon gefluteten Schlenkkolben wurde DL-Homocystin (3.00 g, 0.01 mol, 1.0 Äq) in 40 mL Methanol gelöst und mittels eines Eisbads auf 0 °C runtergekühlt. Anschließend wurde Thionylchlorid (3.24 mL, 0.04 mmol, 4.0 Äq) hinzugegeben und das Reaktionsgemisch auf RT erwärmt. Nach 3 h Reaktionszeit wurde das farblose Reaktionsgemisch *in vacuo* eingeeengt und an der HV getrocknet. Das Produkt **10** wurde als farbloser Feststoff erhalten (3.5 g, 11.80 mmol, 100 %).

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, Methanol-*d*<sub>4</sub>)  $\delta$  = 4.21 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 3.86 (s, 6H), 2.94 – 2.80 (m, 4H), 2.44 – 2.23 (m, 4H) *ppm*.

---

**Methyl (2*R*)-2-[3-(dimethylamino)propanamido]-4-((3*S*)-3-[3-(dimethyl-amino)-propanamido]-4-methoxy-4-oxobutyl)disulfanyl)butanoat (**6**)**



**Allgemeine Vorschrift 2 (AV2)** In einem trockenen mit Argon gefluteten Schlenkkolben, wurde 3-(Dimethylamino)propionsäure (372 mg, 2.42 mmol, 2.4 Äq), Methylester **10** (300 mg, 1.01 mmol, 1.0 Äq) wurden in 5 mL trockenem DMF gelöst. Anschließend wurde TEA (491  $\mu$ L, 2.12 mmol, 3.5 Äq), HOBt (340 mg, 2.50 mmol, 2.5 Äq) and EDC·HCl (405 mg, 2.61 mmol, 2.6 Äq) zugegeben und für 2 h bei 60 °C gerührt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* wurde die orange Suspension an der HV getrocknet. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Silica, DCM/MeOH 16:1) wurde **6** als farbloser Feststoff erhalten (426 mg, 861  $\mu$ mol, 86 %).

**<sup>1</sup>H-NMR** (800 MHz, Methanol-*d*<sub>4</sub>)  $\delta$  = 4.62 – 4.55 (m, 2H), 3.75 (d, *J* = 1.5 Hz, 3H), 3.37 (s, 3H), 2.84 – 2.79 (m, 2H), 2.78 – 2.72 (m, 2H), 2.71 – 2.63 (m, 4H), 2.46 (td, *J* = 7.3, 2.8 Hz, 4H), 2.30 – 2.04 (m, 16H) *ppm*.

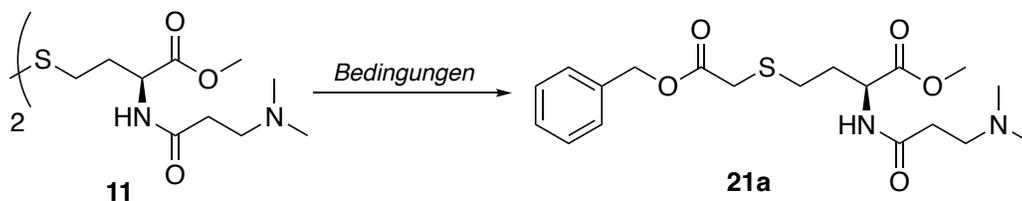
**<sup>13</sup>C-NMR** (201 MHz, Methanol-*d*<sub>4</sub>)  $\delta$  = 174.4, 173.5, 52.9, 52.4, 49.9, 35.6, 35.5, 34.1, 32.1 *ppm*.

**HRMS** (ESI): Berechnet für C<sub>20</sub>H<sub>39</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>S<sub>2</sub><sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup>: 495.2305; gefunden: 495.2303 *m/z*.

**IR** (cm<sup>-1</sup>):  $\tilde{\nu}$  = 3382, 2953, 2833, 2498, 2069, 1733, 1643, 1548, 1439, 1222, 1173, 1119, 977, 856.

---

**Methyl (2S)-4-{{2-(benzyloxy)-2-oxoethyl}sulfanyl}-2-[3-(dimethylamino)propanamido]-butanoat (21a)**



**Allgemeine Vorschrift 3 (AV3)** Disulfid **11** (750 mg, 1.51 mmol, 1.0 Äq) wurde in einem ausgeheizten mit Argon gefluteten Schlenkkolben in einem Gemisch aus H<sub>2</sub>O/DMF (1:3) (5 mL/15 mL) gelöst. Dann wurden NaHCO<sub>3</sub> (535 mg, 6.37 mmol, 4.2 Äq) und TCEP·HCl (435 mg, 151 mmol, 1.0 Äq) zur Reaktionslösung gegeben bei RT gerührt. Reaktionskontrolle erfolgte *via* DC und LC-MS. Nach vollständiger Reduktion zum freien Thiol, wurde Benzylbromacetat (600 µL, 3.79 mmol, 2.5 Äq) zugegeben und für weiter 2 h bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wurde in vacuo eingeeengt und mittels Säulenchromatographie (Silica, 5 % MeOH in DCM) aufgereinigt. So wurde **21a** (510 mg, 1.29 mmol, 42 %) als farbloses Öl erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, methanol-*d*<sub>4</sub>) δ = 7.53 – 7.15 (m, 5H), 5.18 (s, 2H), 4.56 (dd, *J* = 8.9, 4.8 Hz, 1H), 3.71 (s, 3H), 3.33 (s, 2H), 2.75 – 2.58 (m, 4H), 2.45 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.29 (s, 6H), 2.17 – 2.05 (m, 1H), 2.02 – 1.90 (m, 1H) *ppm*.

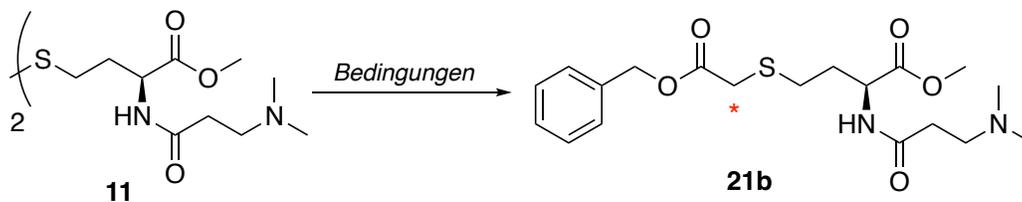
**<sup>13</sup>C-NMR** (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 172.6, 172.5, 170.2, 135.6, 128.7, 128.5, 128.4, 67.2, 55.1, 52.5, 51.1, 44.6, 33.5, 32.8, 31.8, 28.5 *ppm*.

**HRMS** (ESI): berechnet für: C<sub>19</sub>H<sub>29</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup>: 397.1791; gefunden: 397.1791 *m/z*.

**IR** (cm<sup>-1</sup>):  $\tilde{\nu}$  = 3285, 2950, 2864, 1736, 1655, 1539, 1455, 1440, 1374, 1271, 1213, 1170, 1146, 1025, 748, 698.

---

**Methyl (2S)-4-([2-(benzyloxy)-2-oxo(1-<sup>13</sup>C)ethyl]sulfanyl)-2-[3-(dimethylamino)propan-amido]butanoat (21b)**



Entsprechend **AV3**, wurde Disulfid **11** (370 mg, 750  $\mu$ mol, 1.0 equiv) in H<sub>2</sub>O/DMF (1:3) (2.5 mL/8 mL) gelöst und NaHCO<sub>3</sub> (285 mg, 3.39 mmol, 4.2 Äq) und TCEP·HCl (232 mg, 0.8 mmol, 1.0 Äq) hinzugegeben. Nach Zugabe von Benzylbromacetat (294  $\mu$ L, 1.86 mmol, 2.3 Äq) wurde weiter 2 h bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wurde *in vacuo* eingeeengt und mittels Säulenchromatographie (Silica, 5 % MeOH in DCM) aufgereinigt. So wurde **21b** (550 mg, 1.38 mmol, 92 %) als farbloses Öl erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, Methanol-*d*<sub>4</sub>)  $\delta$  = 7.42 – 7.28 (m, 5H), 5.16 (s, 2H), 4.59 – 4.52 (m, 1H), 3.70 (s, 3H), 3.50 (s, 1H), 3.15 (s, 1H), 2.93 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.75 – 2.60 (m, 2H), 2.56 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.50 (s, 6H), 2.19 – 2.05 (m, 1H), 2.04 – 1.86 (m, 1H) *ppm*.

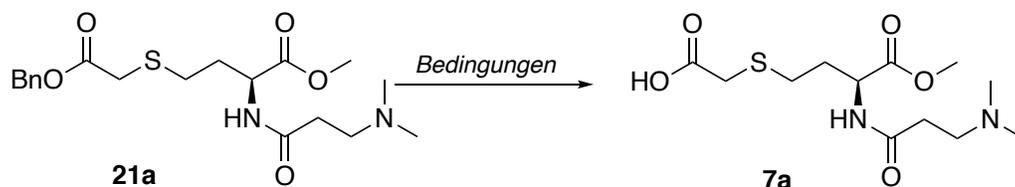
**<sup>13</sup>C-NMR** (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 173.6, 173.5, 137.3, 131.4, 129.6, 129.3, 129.2, 67.9, 60.6, 60.4, 60.1, 55.6, 52.8, 52.6, 45.3, 44.5 *ppm*.

**HRMS** (ESI): berechnet für C<sub>18</sub><sup>13</sup>CH<sub>29</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup>: 398.1825; gefunden: 398.1824 *m/z*.

**IR** (cm<sup>-1</sup>):  $\tilde{\nu}$  = 3271, 2951, 2828, 1739, 1652, 1540, 1438, 1373, 1260, 1213, 1173, 1123, 1083, 987, 850, 740.

---

**{{(3S)-3-[3-(Dimethylamino)propanamido]-4-methoxy-4-oxobutyl}sulfanyl)-essigsäure (7a)**



**Allgemeine Vorschrift 4 (AV4)** In einem ausgeheizten mit Argon gefluteten Schlenkkolben wurde das Benzyl-geschützte Sulfid **21a** (160 mg, 400  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äq) in 10 % Ameisensäure in Methanol gelöst. Zu dieser Lösung wurde Palladium black Katalysator (160 mg, 100 wt %) gegeben und bei 40 °C für 2 h erhitzt. Die Entschützung wurde über LC-MS und Dünnschichtchromatographie verfolgt. Nach vollständiger Umsetzung der Reaktanden, wurde der Katalysator über Filterspritzen abfiltriert, *in vacuo* eingeeengt und säulenchromatographisch aufgereinigt (Silica, 25 % MeOH in DCM). So wurde **7a** (100 mg, 326  $\mu\text{mol}$ , 81 %) als farbloses Öl erhalten.

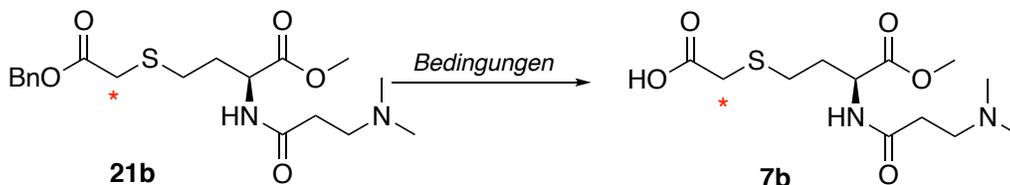
**$^1\text{H-NMR}$**  (400 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  = 4.61 (dd,  $J$  = 9.4, 4.2 Hz, 1H), 3.27 (t,  $J$  = 6.8 Hz, 3H), 3.21 (t,  $J$  = 6.5 Hz, 1H), 3.12 (s, 2H), 2.75 (s, 6H), 2.73 – 2.55 (m, 4H), 2.18 – 2.07 (m, 1H), 2.05 – 1.93 (m, 1H) ppm.

**LRMS** (ESI<sup>+</sup>): berechnet für  $\text{C}_{12}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}^+$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 307.1322; gefunden: 307.10  $m/z$ .

**IR** ( $\text{cm}^{-1}$ ):  $\tilde{\nu}$  = 3253, 1734, 1652, 1574, 1468, 1372, 1217, 1147, 1084, 977, 761.

---

**((3*S*)-3-[3-(Dimethylamino)propanamido]-4-methoxy-4-oxobutyl)sulfanyl(2-<sup>13</sup>C)essigsäure (7b)**



Entsprechend **AV4**, wurde Sulfid **21b** (580 mg, 1.46 mmol, 1.0 Äq) in 10 % Ameisensäure in Methanol (5 mL) gelöst. Nach Zugabe von Palladium black (580 mg, 100 wt%) wurde bei 40 °C für 2 h erhitzt. Nach vollständiger Entschützung wurde der Katalysator über Filterspritzen abfiltriert, *in vacuo* eingeeengt und säulenchromatographisch aufgereinigt (Silica, 25 % MeOH in DCM). So wurde **7b** (280 mg, 911 µmol, 62 %) als farbloses Öl erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, Methanol-*d*<sub>4</sub>)  $\delta$  = 4.62 (dd, *J* = 9.4, 4.2 Hz, 1H), 3.72 (s, 3H), 3.35 (s, 2H), 3.30 – 3.24 (m, 2H), 3.17 (dq, *J* = 13.0, 6.4 Hz, 1H), 2.74 (s, 6H), 2.72 – 2.60 (m, 4H), 2.18 – 1.94 (m, 2H) ppm.

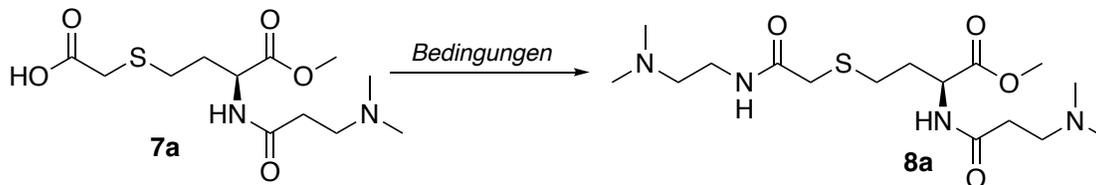
**<sup>13</sup>C-NMR** (101 MHz, Methanol-*d*<sub>4</sub>)  $\delta$  = 173.9, 172.4, 170.2, 55.2, 52.8, 49.8, 44.0, 37.3, 31.8, 31.6, 29.2 ppm.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): berechnet für C<sub>11</sub><sup>13</sup>CH<sub>23</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup>: 308.1356; gefunden: 308.1356 *m/z*.

**IR** (cm<sup>-1</sup>):  $\tilde{\nu}$  = 3401, 1731, 1660, 1544, 1438, 1377, 1216, 969, 1084, 745, 699.

---

**Methyl (2S)-4-[(2-{[2-(dimethylamino)ethyl]amino}-2-oxoethyl)sulfanyl]-2-[3-(dimethyl-amino)propanamido]butansäure (8a)**



**Allgemeine Vorschrift 5 (AV5)** Die Säure **7a** (100 mg, 330  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äq) wurde in einem ausgeheizten mit Argon gefluteten Schlenkcolben in 10 mL trockenem DMF gelöst. Nach Zugabe von *N,N'*-Dimethylethylendiamin (42  $\mu\text{L}$ , 390  $\mu\text{mol}$ , 1.2 Äq), DIPEA (83  $\mu\text{L}$ , 490  $\mu\text{mol}$ , 1.5 Äq) und PyBOP (203 mg, 39  $\mu\text{mol}$ , 1.2 Äq) wurde die Reaktionsmischung 1 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und das Reaktionsgemisch säulenchromatographisch aufgereinigt (Silica, 1:12 MeOH/DCM) lieferte **8a** (90 mg, 239  $\mu\text{mol}$ , 73 %) als farbloses Öl.

**$^1\text{H-NMR}$**  (400 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  = 4.56 (dd,  $J$  = 9.0, 4.8 Hz, 1H), 3.72 (s, 3H), 3.38 – 3.32 (m, 2H), 3.19 (d,  $J$  = 1.3 Hz, 2H), 2.74 – 2.57 (m, 4H), 2.47 (dt,  $J$  = 11.6, 6.8, 4H), 2.30 (d,  $J$  = 4.3 Hz, 12H), 2.12 (dddd,  $J$  = 13.2, 8.3, 7.2, 4.9 Hz, 1H), 2.03 – 1.92 (m, 1H) ppm.

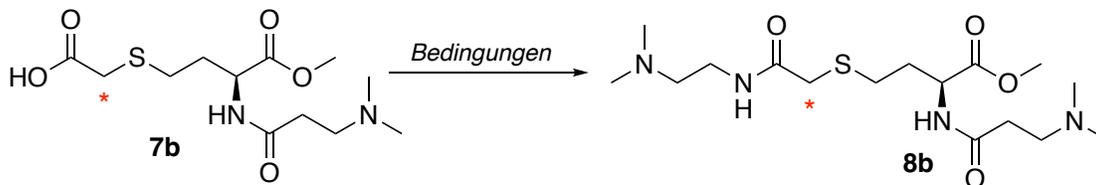
**$^{13}\text{C-NMR}$**  (101 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  = 174.4, 173.6, 172.5, 59.0, 56.0, 52.8, 52.6, 45.4, 45.0, 38.2, 36.0, 34.0, 32.1, 29.7 ppm.

**LRMS** (ESI<sup>+</sup>): berechnet für  $\text{C}_{16}\text{H}_{33}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}^+$  [M+H]<sup>+</sup>: 377.2217; gefunden: 377.19  $m/z$ .

**IR** ( $\text{cm}^{-1}$ ):  $\tilde{\nu}$  = 3375, 2878, 1774, 1597, 1509, 1439, 1226, 1144, 1066, 1022, 903, 843, 744.

---

**Methyl-(2S)-4-{[2-{[2-(dimethylamino)ethyl]amino}-2-oxo(1-<sup>13</sup>C)ethyl]sulfanyl}-2-[3-(dimethylamino)propanamido]butanoat (8b)**



Entsprechend **AV5**, wurde Säure **7b** (270 mg, 870  $\mu$ mol, 1.0 Äq) in 15 mL trockenem DMF gelöst. Nach Zugabe von *N,N*-Dimethylethylendiamin (115  $\mu$ L, 1.0 mmol, 1.2 Äq), DIPEA (224  $\mu$ L, 1.3 mmol, 1.5 Äq) und PyBOP (548 mg, 1.05 mmol, 1.2 Äq) wurde die Reaktionsmischung 1 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und das Reaktionsgemisch Säulenchromatographische aufgereinigt (Silica, 1:12 MeOH/DCM) lieferte **8b** (246 mg, 652  $\mu$ mol, 74 %) als farbloses Öl.

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, methanol-*d*<sub>4</sub>)  $\delta$  = 4.56 (dd, *J* = 9.0, 4.8 Hz, 1H), 3.72 (s, 3H), 3.36 – 3.33 (m, 4H), 2.74 – 2.58 (m, 4H), 2.47 (dt, *J* = 11.4, 7.0 Hz, 4H), 2.30 (d, *J* = 4.1 Hz, 12H), 2.18 – 1.92 (m, 1H), 1.29 – 1.15 (m, 1H) ppm.

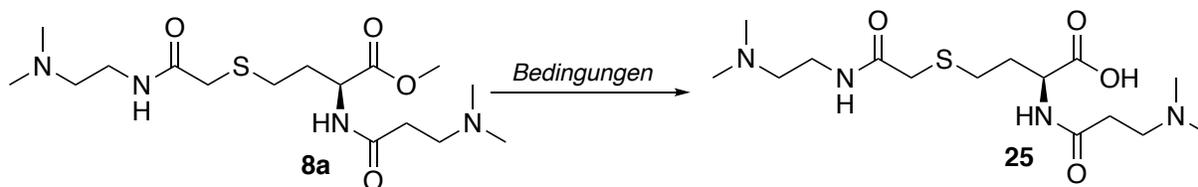
**<sup>13</sup>C-NMR** (101 MHz, Methanol-*d*<sub>4</sub>)  $\delta$  = 174.4, 173.6, 172.2, 59.1, 56.1, 52.8, 52.7, 45.5, 45.0, 38.3, 36.0, 34.0, 32.2, 29.7 ppm.

**LRMS** (ESI<sup>+</sup>): berechnet für C<sub>15</sub><sup>13</sup>CH<sub>33</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup>: 378.2251; gefunden: 378.24 *m/z*.

**IR** (cm<sup>-1</sup>):  $\tilde{\nu}$  = 3331, 2951, 1738, 1638, 1557, 1441, 1377, 1260, 1171, 1099, 1037.

---

**(2S)-4-[(2-{[2-(Dimethylamino)ethyl]amino}-2-oxoethyl)sulfanyl]-2-[3-(dimethylamino)propanamido]butansäure (25a)**



**Allgemeine Vorschrift 6 (AV6)** Bisamid **8a** (173 mg, 460  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äq) wurde in einem ausgeheizten mit Argon gefluteten Schlenkkolben in einer Mischung aus  $\text{H}_2\text{O}$  (2 mL) und MeOH (5 mL) gelöst. Anschließend wurde LiOH (17.0 mg, 710  $\mu\text{mol}$ , 3.0 Äq) zugegeben und die Reaktionslösung für 1 h bei RT gerührt. Nach vollständiger Umsetzung wurde die Reaktionslösung *in vacuo* eingeeengt und über HyperSep<sup>TM</sup> C18 Kartuschen entsalzt (Äquilibrieren: 15 mL Acetonitril; 10 mL  $\text{H}_2\text{O}$ ; Beladen: 25 mg in 0.3 mL  $\text{H}_2\text{O}$ ; Waschen: 0.5 mL  $\text{H}_2\text{O}$ ; Elution: 6 mL 4:1 Acetonitril/ $\text{H}_2\text{O}$ ). Das Eluat wurde an der Lyophilie getrocknet. Das Produkt **9** (87 mg, 240  $\mu\text{mol}$ , 100 %) wurde als farbloser Feststoff erhalten.

**$^1\text{H-NMR}$**  (400 MHz, methanol- $d_4$ )  $\delta$  = 4.55 (dd,  $J$  = 9.3, 4.5 Hz, 1H), 3.64 (t,  $J$  = 5.9 Hz, 2H), 3.46 (t,  $J$  = 6.7 Hz, 2H), 3.35 (t,  $J$  = 6.0 Hz, 2H), 2.95 (d,  $J$  = 13.2 Hz, 12H), 2.90–2.83 (m, 2H), 2.81–2.64 (m, 2H), 2.22–2.11 (m, 1H), 2.09–1.97 (m, 1H) ppm.

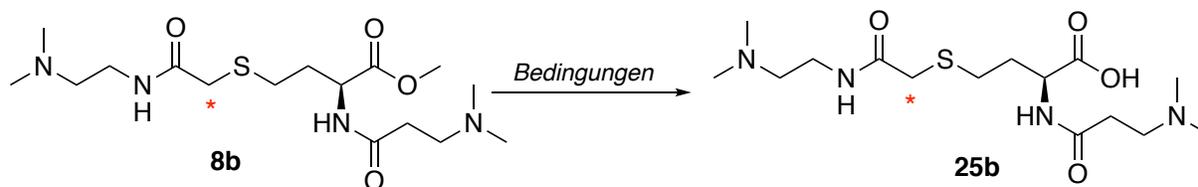
**$^{13}\text{C-NMR}$**  (101 MHz, methanol- $d_4$ )  $\delta$  = 174.8, 173.7, 171.9, 58.0, 54.9, 52.7, 43.9, 43.7, 36.2, 36.0, 32.1, 30.8, 30.1 ppm.

**HRMS** (ESI): berechnet für  $\text{C}_{15}\text{H}_{29}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}^-$   $[\text{M-H}]^-$ : 361.1915; gefunden: 361.1919  $m/z$ .

**IR** ( $\text{cm}^{-1}$ ):  $\tilde{\nu}$  = 3368, 2916, 1743, 1632, 1524, 1439, 1311, 1227, 1160, 1059, 984, 845.

---

**(2S)-4-{[2-{[2-(Dimethylamino)ethyl]amino}-2-oxo(1-<sup>13</sup>C)ethyl]sulfanyl}-2-[3-(dimethylamino)propanamido]butansäure (25b)**



Entsprechend **AV6** wurde Methylester **8b** (220 mg, 580  $\mu$ mol, 1.0 Äq) in einer Mischung aus H<sub>2</sub>O (4 mL) und MeOH (10 mL) gelöst. Anschließend wurde LiOH (42 mg, 1.74 mmol, 3.0 Äq) zugegeben und die Reaktionslösung für 1 h bei RT gerührt. Das Produkt **25b** (145 mg, 398  $\mu$ mol, 98 %) wurde als farbloser Feststoff erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, methanol-*d*<sub>4</sub>)  $\delta$  = 4.33 (dd, *J* = 7.8, 4.6 Hz, 1H), 3.39 – 3.02 (m, 4H), 2.67 – 2.56 (m, 4H), 2.45 (dt, *J* = 14.7, 7.1 Hz, 4H), 2.27 (d, *J* = 3.2, 12H), 2.18 – 1.87 (m, 2H) ppm.

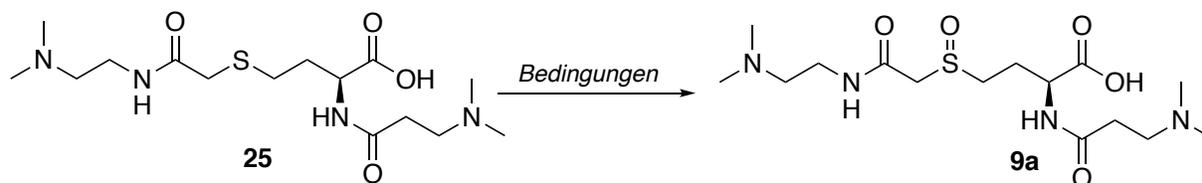
**<sup>13</sup>C-NMR** (101 MHz, methanol-*d*<sub>4</sub>)  $\delta$  = 176.8, 172.3, 172.3, 57.6, 54.8, 54.2, 44.1, 43.7, 37.0, 36.9, 33.2, 32.7, 28.6 ppm.

**HRMS** (ESI): berechnet für C<sub>14</sub><sup>13</sup>CH<sub>29</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S<sup>-</sup> [M-H]<sup>-</sup> : 362.1949; gefunden: 362.1952 *m/z*.

**IR** (cm<sup>-1</sup>):  $\tilde{\nu}$  = 3511, 2954, 1707, 1414, 1438, 1362, 1249, 1198, 1132, 1015, 978, 889.

---

**(2S)-4-(2-{[2-(Dimethylamino)ethyl]amino}-2-oxoethanesulfinyl)-2-[3-(dimethylamino)propanamido]-butansäure (9a)**



**Allgemeine Vorschrift 7 (AV7)** Die Säure **25** (105 mg, 290  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äq) wurde in einem ausgeheizten mit Argon gefluteten Schlenkkolben in 2 mL dest.  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst. Nach dem Einstellen des pH-Werts auf  $\text{pH} = 2$  ( $\text{HCl}$ , 2 M), wurde *m*CPBA (31 mg, 140  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äq) zugegeben. Anschließend wurde die Reaktionslösung für 20 min bei RT gerührt. Die Oxidation wurde über LC-MS und DC verfolgt. Nach vollständigem Umsatz zum Sulfoxid **9a**, wurde das Nebenprodukt *m*CBA durch Extraktion mit DCM (4 x 10 mL) entfernt. Die wässrige Phase wurde an der Lyophille über Nacht getrocknet. Das Produkt **9a** (40 mg, 0.11 mmol, 75%) wurde als farbloser Feststoff erhalten.

**$^1\text{H-NMR}$**  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta = 4.46$  (td,  $J = 8.1, 5.1$ , 1H), 3.90 – 3.72 (m, 2H), 3.6 – 3.51 (m, 2H), 3.34 (td,  $J = 6.7$ , 1.8 Hz, 2H), 3.25 (t,  $J = 6.0$  Hz, 2H), 3.06 – 2.85 (m, 2H), 2.82 (d,  $J = 9.5$  Hz, 12H), 2.76 (t,  $J = 6.8$  Hz, 2H), 2.34 – 2.19 (m, 1H), 2.17 – 2.04 (m, 1H) ppm.

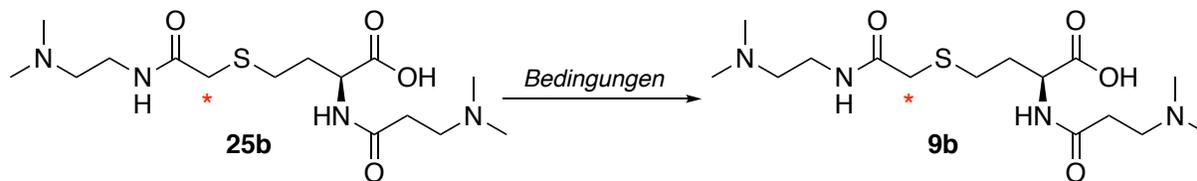
**$^{13}\text{C-NMR}$**  (101 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta = 174.4, 171.7, 166.9, 56.2, 56.0, 55.9, 53.3, 47.3, 47.2, 42.9, 42.8, 34.9, 29.5, 24.0$  ppm.

**HRMS** ( $\text{ESI}^+$ ): berechnet für  $\text{C}_{15}\text{H}_{31}\text{N}_4\text{O}_5\text{S}^+$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  : 379.2010; gefunden: 379.2012 *m/z*.

**IR** ( $\text{cm}^{-1}$ ):  $\tilde{\nu} = 3012, 2826, 1718, 1676, 1471, 1419, 1384, 1267, 1239, 1075, 993, 901$ .

---

**(2S)-4-[2-{[2-(Dimethylamino)ethyl]amino}-2-oxo(1-<sup>13</sup>C)ethanesulfinyl]-2-[3-(dimethylamino)propanamido]-butansäure (9b)**



Entsprechend **AV7** wurde die Säure **25b** (145 mg, 390  $\mu$ mol, 1.0 Äq) in 5 mL dest. H<sub>2</sub>O gelöst. Nach Zugabe von *m*CPBA (57 mg, 275  $\mu$ mol, 1.0 Äq) wurde die Reaktionslösung für 20 min bei RT gerührt. Das Produkt **9b** (104 mg, 273  $\mu$ mol, 70 %) wurde als farbloser Feststoff erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  = 4.46 (ddt,  $J$  = 15.6, 10.1, 5.0 Hz, 1H), 4.10 – 3.50 (m, 4H), 3.35 (dt,  $J$  = 8.0, 4.0 Hz, 2H), 3.24 (t,  $J$  = 6.2 Hz, 2H), 3.07 – 2.95 (m, 2H), 2.82 (d,  $J$  = 9.4 Hz, 12H), 2.75 (q,  $J$  = 6.7 Hz, 2H), 2.29 (dp,  $J$  = 13.5, 7.4 Hz, 1H), 2.19 – 2.00 (m, 1H) ppm.

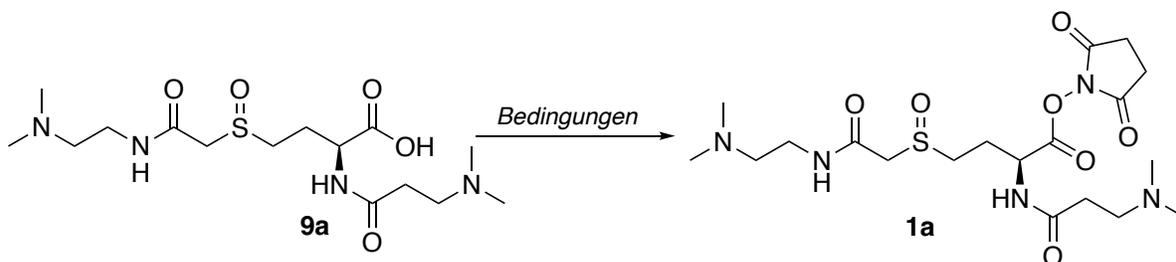
**<sup>13</sup>C-NMR** (101 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  = 176.77, 172.26, 172.3, 57.64, 54.84, 54.15, 44.12, 43.73, 36.99, 34.36, 33.25, 32.65, 28.61 ppm.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): berechnet für C<sub>14</sub><sup>13</sup>CH<sub>31</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>S<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup>: 380.2043 gefunden: 380.2045 *m/z*.

**IR** (cm<sup>-1</sup>):  $\tilde{\nu}$  = 3331, 2951, 1738, 1638, 1557, 1441, 1463, 1377, 1260, 1171, 1037.

---

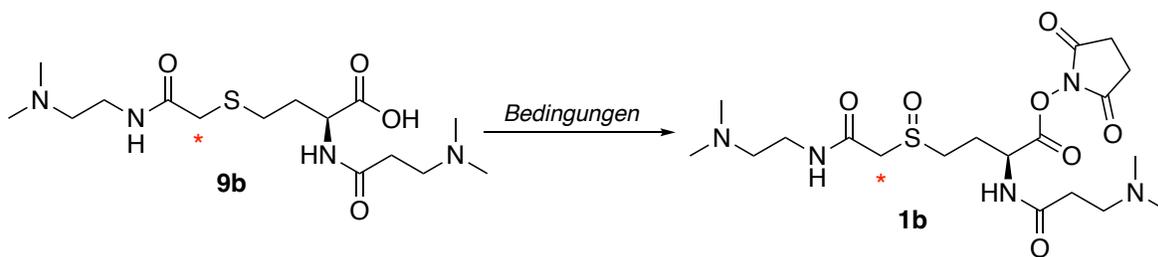
**2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl(2S)-4-[(2-{[2-(dimethylamino)ethyl]amino}-2-oxoethyl)-sulfanyl]-2-[3-(dimethylamino)propanamido]butanoat (1a)**



**Allgemeine Vorschrift 8 (AV8)** Sulfoxid **9a** (75.0 mg, 200  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äq) wurde in einem ausgeheizten mit Argon gefluteten Schlenkcolben in 5 mL DMF gelöst. Anschließend wurde trockenes Pyridin (33.0  $\mu\text{L}$ , 422  $\mu\text{mol}$ , 2.0 Äq) und NHS-TFA (89 mg, 422  $\mu\text{mol}$ , 2.0 Äq) zugegeben und für 4 h bei RT gerührt. Es wurde eine Reaktionskontrolle *via* LC-MS durchgeführt. Nach vollständigem Umsatz des Startmaterials wurde die Reaktionslösung *in vacuo* eingeeengt. Das gelb-braune Reaktionsgemisch wurde in Acetonitril gelöst und mit eiskaltem Aceton gefällt. Das Produkt **1a** (35 mg, 73.4  $\mu\text{mol}$ , 35 %) wurde als farbloser Feststoff erhalten.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): berechnet für  $\text{C}_{18}^{13}\text{CH}_{34}\text{N}_5\text{O}_7\text{S}^+$  [M+H]<sup>+</sup> : 476.2174; gefunden: 476.2173 *m/z*

**2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl(2S)-4-{[2-{[2-(dimethylamino)ethyl]amino}-2-oxo(1-13C)ethyl]sulfanyl}-2-[3-(dimethylamino)propanamido]butanoat (1b)**



Entsprechend **AV8** wurde Sulfoxid **9b** (50 mg, 132  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äq) in 4 mL DMF gelöst. Anschließend wurde trockenes Pyridin (21  $\mu\text{L}$ , 263  $\mu\text{mol}$ , 2.0 Äq) und NHS-TFA (42 mg,

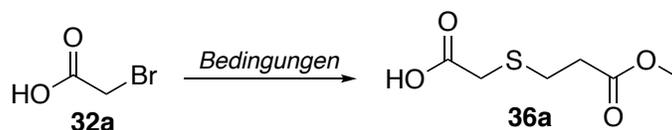
---

197  $\mu\text{mol}$ , 2.0  $\text{\AA}q$ ) zugegeben und für 4 h bei RT gerührt. Das Produkt **1b** (20 mg, 42  $\mu\text{mol}$ , 32 %) wurde als farbloser Feststoff erhalten.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): berechnet für  $\text{C}_{18}^{13}\text{CH}_{34}\text{N}_5\text{O}_7\text{S}^+$  [M+H]<sup>+</sup> : 477.2207; gefunden: 477.2212  $m/z$

## 5.2.2 Synthese der vereinfachten isobaren Makierungsreagenzien IsSOT

### 2-((3-Methoxy-3-oxopropyl)thio)acetat (**36a**)



**Allgemeine Vorschrift 9 (AV9)** 3-Mercaptopropionsäure Methylester **35** (2.00 g, 14.4 mmol, 1.0  $\text{\AA}q$ ) wurde in einem ausgeheizten mit Argon gefluteten Schlenkkolben in 20 mL DMF gelöst. Nach Zugabe von TEA (3.00 mL, 21.6 mmol, 1.5  $\text{\AA}q$ ) und Bromessigsäure **32a** (1.73 mg, 14.2 mmol, 1.0  $\text{\AA}q$ ) wurde das Reaktionsgemisch 14 h bei RT gerührt. Nachdem die Reaktionskontrolle mittels LC-MS die vollständige Umsetzung des Startmaterials zeigte wurde das Lösungsmittels *in vacuo* reduziert. Der Rückstand wurde anschließend in EtOAc (100 mL) aufgenommen und mit Wasser (3 x 100 mL) gewaschen. Die organische Phase wurden kombiniert, über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet, das Trockenmittel abfiltriert und das Lösungsmittel entfernt. Das Produkt **36a** (500 mg, 2.8 mmol, 20 %) wurde als farbloses Öl erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  = 3.57 (s, 3H), 3.16 (s, 2H), 2.77 (t,  $J$  = 7.2 Hz, 2H), 2.57 (t,  $J$  = 7.2 Hz, 2H) ppm.

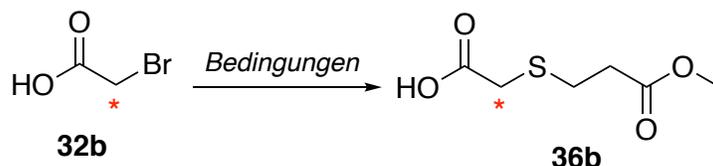
**<sup>13</sup>C-NMR** (101 MHz Methanol- $d_4$ )  $\delta$  = 171.5, 170.8, 52.3, 34.8, 34.2, 28.3 ppm.

**HRMS** (EI): berechnet für  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_3\text{S}^+$  [M-H<sub>2</sub>O]: 160.0200; gefunden: 160.0188  $m/z$ .

**IR** ( $\text{cm}^{-1}$ ):  $\tilde{\nu}$  = 3350, 2978, 2605, 2498, 2013, 1660, 1587, 1474, 1389, 1121, 1017, 852.

---

### 2-((3-Methoxy-3-oxopropyl)thio)acetat-2-<sup>13</sup>C (36b)



Entsprechend **AV9**, wurde 3-Mercaptopropionsäure Methylester **35** (500 mg, 3.57 mmol, 1.0 Äq) in 5 mL DMF gelöst. Nach Zugabe von TEA (0.75 mL, 5.35 mmol, 1.5 Äq) und <sup>13</sup>C-markierter Bromessigsäure **32b** (429 mg, 3.75 mmol, 1.0 Äq) wurde das Reaktionsgemisch 14 h bei RT gerührt. Das Produkt **36b** (100 mg, 0.56 mmol, 20 %) wurde als farbloses Öl erhalten.

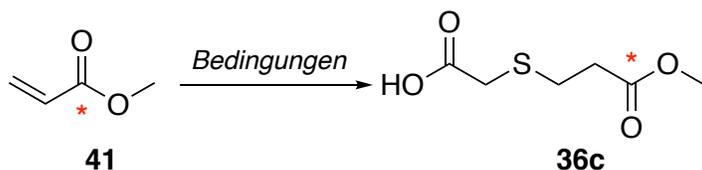
**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, Methanol-*d*<sub>4</sub>)  $\delta$  = 3.44 (s, 1H), 3.09 (s, 1H), 2.92 – 2.85 (m, 2H), 2.67 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR** (101 MHz Methanol-*d*<sub>4</sub>)  $\delta$  = 180.1, 172.7, 59.0, 45.5, 38.3, 28.5 ppm.

**LRMS** (ESI<sup>+</sup>): berechnet für C<sub>5</sub><sup>13</sup>CH<sub>8</sub>O<sub>3</sub>S<sup>+</sup> [M-H<sub>2</sub>O]: 180.0406; gefunden: 180.19 *m/z*.

**IR** (cm<sup>-1</sup>):  $\tilde{\nu}$  = 3359, 2972, 2699, 2500, 2047, 1658, 1588, 1403, 1312, 1017, 939, 853.

### 2-((3-methoxy-3-oxopropyl-3-<sup>13</sup>C)thio)acetat (36c)



In einem ausgeheizten mit Argon gefluteten Schlenk Kolben wurde Thioglykolsäure **40** (150  $\mu$ L, 2.17 mmol, 1.0 Äq), <sup>13</sup>C-markierte Methylacrylat **41** (196  $\mu$ L, 2.17 mmol, 1.0 Äq) und TEA (243  $\mu$ L, 2.69 mmol, 1.0 Äq) in 6 mL Toluol gelöst und 2 Tage bei RT gerührt. Nachdem die Reaktionskontrolle mittels LC-MS die vollständige Umsetzung des Startmaterials zeigte, wurde das Lösungsmittel *in vacuo* reduziert. Der Rückstand wurde anschließend in 100 mL EtOAc und mit dest. H<sub>2</sub>O (3 x 100 mL) gewaschen. Die organische Phase wurden kombiniert, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet, das Trockenmittel

---

abfiltriert und das Lösungsmittel entfernt. Das Produkt **36c** (200 mg, 1.12 mmol, 51 %) wurde als farbloses Öl erhalten.

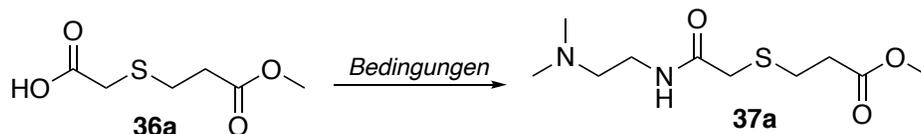
**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, Methanol-*d*<sub>4</sub>)  $\delta$  = 3.67 (s, 2H), 3.26 (s, 2H), 2.91-2.86 (m, 2H), 2.70-2.65 (m, 2H) *ppm*.

**<sup>13</sup>C-NMR** (101 MHz Methanol-*d*<sub>4</sub>)  $\delta$  = 193.5, 167.9, 50.8, 41.6, 31.3, 25.4 *ppm*.

**LRMS** (ESI<sup>+</sup>): berechnet für C<sub>5</sub><sup>13</sup>CH<sub>8</sub>O<sub>3</sub>S<sup>+</sup> [M-H<sub>2</sub>O]: 180.0406; gefunden: 180.23 *m/z*.

**IR** (cm<sup>-1</sup>):  $\tilde{\nu}$  = 3382, 2953, 2154, 1983, 1690, 1583, 1434, 1356, 1146, 975, 747.

### Methyl 3-((2-((2-(dimethylamino)ethyl)amino)-2-oxoethyl)thio)propionat (**37a**)



**Allgemeine Vorschrift 10 (AV10)** Säure **36a** (500 mg, 2.80 mmol, 1.0 Äq) wurde in einem ausgeheizten mit Argon gefluteten Schlenkkolben in 20 mL trockenem DMF gelöst. Nach Zugabe von TEA (660  $\mu$ L, 4.76 mmol, 1.7 Äq), HOBt (416 mg, 3.08 mmol, 1.1 Äq) und EDC·HCl (592 mg, 3.08 mmol, 1.1 Äq) wurden das Reaktionsgemisch 10 min bei RT gerührt, bevor *N,N'*-Dimethylethylendiamin (367  $\mu$ L, 3.36 mmol, 1.2 Äq) zugegeben und über Nacht gerührt wurde. Nachdem die Reaktionskontrolle mittels LC-MS und DC die vollständige Umsetzung des Startmaterials zeigte, wurde das Lösungsmittel *in vacuo* reduziert. Das Reaktionsgemisch wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Silica, 20:1 MeOH/DCM). Das Produkt **37a** (310 mg, 1.32 mmol, 47 %) wurde als farbloses Öl erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, Methanol-*d*<sub>4</sub>)  $\delta$  = 3.76 (s, 3H), 3.44 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 3.31 (s, 2H), 2.94 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.76 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.57 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 2.37 (s, 6H) *ppm*.

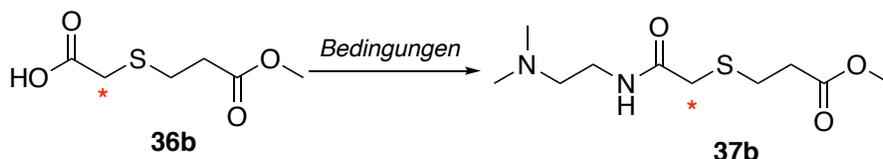
---

$^{13}\text{C-NMR}$  (101 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  = 173.9, 172.3, 59.0, 52.2, 45.0, 38.2, 36.2, 35.0, 28.4 ppm.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): berechnet für  $\text{C}_{10}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}^+$  [M+H]<sup>+</sup>: 249.1267; gefunden: 249.1267 m/z.

**IR** (cm<sup>-1</sup>):  $\tilde{\nu}$  = 3290, 2947, 2774, 2205, 1984, 1733, 1651, 1538, 1436, 1360, 1302, 1192, 1040, 979.

**Methyl-3-((2-((2-(dimethylamino)ethyl)amino)-2-oxoethyl-1- $^{13}\text{C}$ )thio)propionat (37b)**



Entsprechend **AV10**, wurde Säure **36b** (500 mg, 2.80 mmol, 1.0 Äq) in 20 mL trockenem DMF gelöst. Nach Zugabe von TEA (660  $\mu\text{L}$ , 4.76 mmol, 1.7 Äq), HOBt (416 mg, 3.08 mmol, 1.1 Äq), EDC·HCl (592 mg, 3.07 mmol, 1.1 Äq) und *N,N*-Dimethylethylendiamin (367  $\mu\text{L}$ , 3.36 mmol, 1.2 Äq) wurde das Reaktionsgemisch über Nacht gerührt. Das Produkt **37b** (205 mg, 0.87 mmol, 31 %) wurde als farbloses Öl erhalten.

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  = 3.68 (s, 3H), 3.39 – 3.33 (m, 2H), 3.22 (d,  $J$  = 4.8 Hz, 2H), 2.84 (t,  $J$  = 7.0 Hz, 2H), 2.66 (t,  $J$  = 7.0 Hz, 2H), 2.52 (t,  $J$  = 6.7 Hz, 2H), 2.32 (s, 6H) ppm.

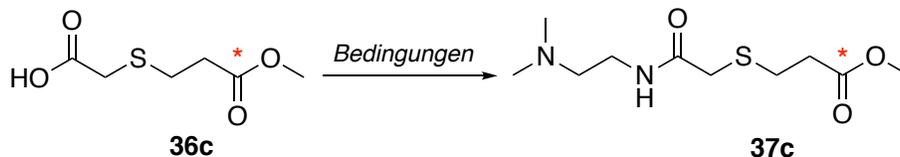
$^{13}\text{C-NMR}$  (101 MHz, Methanol- $d_4$ )  $\delta$  = 171.6, 171.0, 61.2, 57.5, 51.3, 44.5, 36.3, 33.6, 27.1 ppm.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): berechnet für  $\text{C}_9^{13}\text{CH}_{21}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}^+$  [M+H]<sup>+</sup>: 250.1301; gefunden: 250.1301 m/z.

---

IR (cm<sup>-1</sup>):  $\tilde{\nu}$  = 3371, 2831, 2153, 1986, 1583, 1429, 1409, 1360, 1188, 1107, 940, 827.

**Methyl-3-((2-((2-(dimethylamino)ethyl)amino)-2-oxoethyl)thio)propionat-1-<sup>13</sup>C**  
**(37c)**



Entsprechend **AV10**, wurde Säure **36c** (200 mg, 1.12 mmol, 1.0 Äq) in 10 mL trockenem DMF gelöst. Nach Zugabe von TEA (180  $\mu$ L, 1.90 mmol, 1.7 Äq), HOBt (120 mg, 1.23 mmol, 1.1 Äq), EDC·HCl (180 mg, 1.23 mmol, 1.1 Äq) und *N,N'*-Dimethylethylendiamin (140  $\mu$ L, 1.34 mmol, 1.2 Äq) wurde das Reaktionsgemisch über Nacht gerührt. Das Produkt **37c** (52 mg, 0.2 mmol, 19 %) wurde als farbloses Öl erhalten.

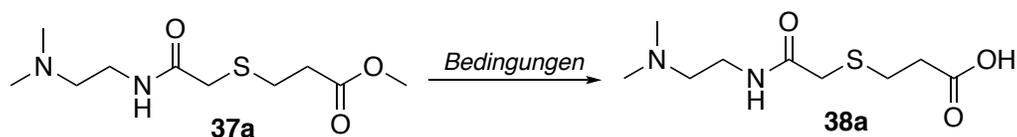
**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz Methanol-*d*4)  $\delta$  = 3.69 (s, 3H), 3.43 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 3.23 (s, 2H), 2.88 – 2.81 (m, 2H), 2.74 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 2.69-2.64 (m, 2H), 2.50 (s, 6H) ppm.  
**<sup>13</sup>C-NMR** (101 MHz, Methanol-*d*4)  $\delta$  = 173.2, 172.8, 52.2, 52.16, 44.9, 37.5, 36.1, 34.7, 28.5 ppm.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): berechnet für C<sub>9</sub><sup>13</sup>CH<sub>21</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> S<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup>: 250.1301; gefunden: 250.1301 *m/z*.

IR (cm<sup>-1</sup>):  $\tilde{\nu}$  = 3244, 2953, 2211, 2113, 1731, 1621, 1538, 1437, 1251, 1127, 1021, 980.

---

### 3-((2-((2-(Dimethylamino)ethyl)amino)-2-oxoethyl)thio)propionsäure (38a)



Entsprechend **AV6** wurde Methylester **37c** (130 mg, 0.52 mmol, 1.0 Äq) in einer Mischung aus H<sub>2</sub>O (2 mL) und MeOH (4 mL) gelöst. Anschließend wurde LiOH (38 mg, 1.56 mmol, 3.0 Äq) zugegeben und die Reaktionslösung für 1 h bei RT gerührt. Das Produkt **38a** (120 mg, 0.52 mmol, 100 %) wurde als farbloser Feststoff erhalten.

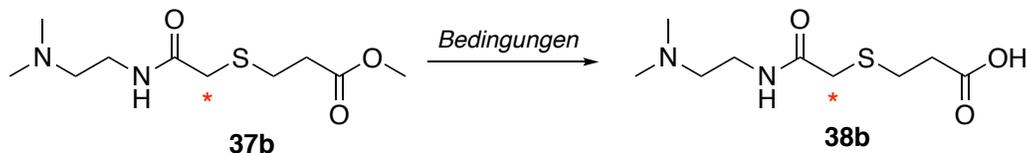
**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, , Methanol-*d*<sub>4</sub>)  $\delta$  = 3.60 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H), 3.11 (s, *J* = 6.2 Hz, 2H), 2.88 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.79 (s, 6H), 2.70 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR** (101 MHz, Methanol-*d*<sub>4</sub>)  $\delta$  = 180.1, 172.7, 62.7, 59.0, 45.5, 39.0, 38.3, 35.7, 30.2 ppm.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): berechnet für C<sub>9</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup>: 235,1111; gefunden: 335.1110 *m/z*.

**IR** (cm<sup>-1</sup>):  $\tilde{\nu}$  = 3306, 2926, 2770, 2363, 2139, 1968, 1580, 1428, 1361, 1190, 1078, 869.

### 3-((2-((2-(Dimethylamino)ethyl)amino)-2-oxoethyl-<sup>13</sup>C)thio)propionsäure (38b)



Entsprechend **AV6** wurde Methylester **37b** (93 mg, 0.37 mmol, 1.0 Äq) in einer Mischung aus H<sub>2</sub>O (1 mL) und MeOH (2.5 mL) gelöst. Anschließend wurde LiOH (27 mg, 1.12 mmol, 3.0 Äq) zugegeben und die Reaktionslösung für 1 h bei RT gerührt. Das Produkt **38b** (87 mg, 0.37 mmol, 100 %) wurde als farbloser Feststoff erhalten.

---

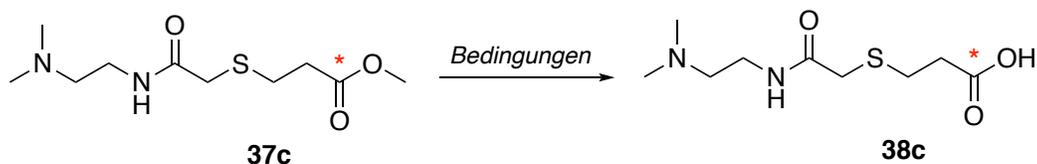
**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, Methanol-*d*<sub>4</sub>) δ 3.44 (m, 2H), 3.31 (d, 2H), 2.81 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.51-2.41(m,4H), 2.28 (s, 6H) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR** (101 MHz, Methanol-*d*<sub>4</sub>) δ = 180.1, 178.2, 58.9, 49.5, 45.5, 38.9, 38.3, 30.1 ppm.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): berechnet für C<sub>8</sub><sup>13</sup>CH<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup>: 236.1144; gefunden: 236.1144 *m/z*.

**IR** (cm<sup>-1</sup>):  $\tilde{\nu}$  = 3472, 2950 2835, 2132, 1783, 1681, 1431, 1200, 1134, 1081, 997.

### 3-((2-((2-(Dimethylamino)ethyl)amino)-2-oxoethyl)thio)propionsäure-1-<sup>13</sup>C (38c)



Entsprechend **AV6** wurde Methylester **37c** (52 mg, 0.20 mmol, 1.0 Äq) in einer Mischung aus H<sub>2</sub>O (1 mL) und MeOH (2.5 mL) gelöst. Anschließend wurde LiOH (16 mg, 0.62 mmol, 3.0 Äq) zugegeben und die Reaktionslösung für 1 h bei RT gerührt. Das Produkt **38c** (47 mg, 0.20 mmol, 100 %) wurde als farbloser Feststoff erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ = 3.42 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 3.30 (s, 2H), 2.78 – 2.66 (m, 6H), 2.43 (s,6H) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR** (101 MHz, D<sub>2</sub>O) δ = 178.9, 178.3, 56.1, 43.5, 37.2, 36.7, 34.9, 28.5 ppm.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): berechnet für C<sub>8</sub><sup>13</sup>CH<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup>: 236.1144; gefunden: 236.1144 *m/z*.

**IR** (cm<sup>-1</sup>):  $\tilde{\nu}$  = 3369, 2955, 2831, 2114, 1738, 1602, 1396, 1254, 1166, 1018.

---

### 3-((2-((2-(Dimethylamino)ethyl)amino)-2-oxoethyl)sulfinyl)propionsäure (42a)



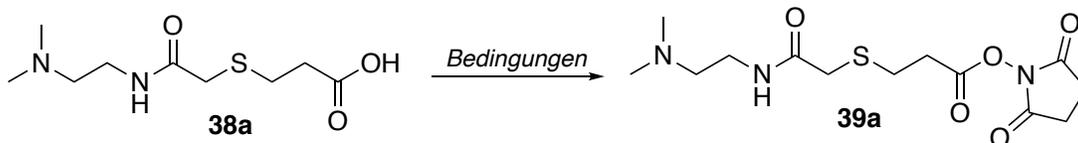
Säure **38a** (100 mg, 426  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äq) wurde in einem ausgeheizten mit Argon gefluteten Schlenkcolben in 6 mL dest.  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst. Nach dem Einstellen des pH-Werts auf  $\text{pH} = 2$  ( $\text{HCl}$ , 2 M), wurde *m*CPBA (73 mg, 426  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äq) zugegeben. Anschließend wurde die Reaktionslösung für 20 min bei RT gerührt. Die Oxidation wurde über LC-MS und DC verfolgt. Nach vollständigem Umsatz zum Sulfoxid **42**, wurde das Nebenprodukt *m*CBA durch Extraktion mit DCM (4 x 10 mL) entfernt. Die wässrige Phase wurde an der Lyophilie über Nacht getrocknet. Das Produkt **42** (83 mg, 331  $\mu\text{mol}$ , 79 %) wurde als farbloser Schaum erhalten.

**$^1\text{H-NMR}$**  (400 MHz, Methanol-*d*4)  $\delta = 3.93$  (dd,  $J = 94.8, 13.6$  Hz, 2H), 3.77 – 3.61 (m, 2H), 3.39 (dt,  $J = 6.7, 4.7$  Hz, 2H), 2.99 (s,  $J = 3.0$  Hz, 6H), 2.88 – 2.82 (m, 2H) ppm  
 **$^{13}\text{C-NMR}$**  (101 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta = 173.2, 167.1, 57.7, 57.4, 47.5, 43.9, 43.7, 35.9, 27.7$  ppm.

**HRMS** ( $\text{ESI}^+$ ): berechnet für  $\text{C}_9\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}^+$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  : 251.1060; gefunden: 251,1062  $m/z$ .

**IR** ( $\text{cm}^{-1}$ ):  $\tilde{\nu} = 3369, 2729, 2083, 1970, 1696, 1643, 1549, 1423, 1398, 1239, 1109, 916$ .

### 2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl-3-((2-((2-(dimethylamino)ethyl)amino)-2-oxoethyl)thio)propanoat (39a)

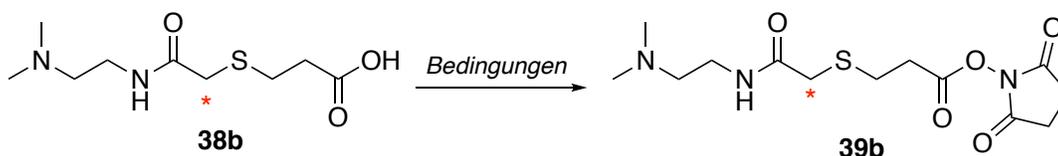


---

Entsprechend **AV8** wurde Sulfid **38a** (180 mg, 768  $\mu\text{mol}$ , 1.0  $\text{\AA}q$ ) in 5 mL DMF gelöst. Anschließend wurde trockenes Pyridin (124  $\mu\text{L}$ , 1.54 mmol, 2.0  $\text{\AA}q$ ) und NHS-TFA (324 mg, 1.54 mmol, 2.0  $\text{\AA}q$ ) zugegeben und für 4 h bei RT gerührt. Das Produkt **39a** (40 mg, 120  $\mu\text{mol}$ , 16 %) wurde als farbloser Feststoff erhalten.

**LRMS** (ESI<sup>+</sup>): berechnet für  $\text{C}_{13}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}^+$  [M+H]<sup>+</sup>: 333.1115; gefunden: 333.14 *m/z*.

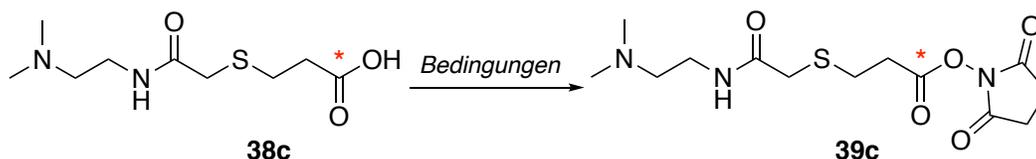
**2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl-3-((2-((2-(dimethylamino)ethyl)amino)-2-oxoethyl)-1-<sup>13</sup>C)thio)propanoat (**39b**)**



Sulfid **38b** (60 mg, 254  $\mu\text{mol}$ , 1.0  $\text{\AA}q$ ) wurde in einem ausgeheizten mit Argon gefluteten Schlenkkolben in 4 mL DMF gelöst. Anschließend wurde trockenes Pyridin (48  $\mu\text{L}$ , 509  $\mu\text{mol}$ , 2.0  $\text{\AA}q$ ) und NHS-TFA (107 mg, 509  $\mu\text{mol}$ , 2.0  $\text{\AA}q$ ) zugegeben und für 4 h bei RT gerührt. Es wurde eine Reaktionskontrolle *via* LC-MS durchgeführt. Nach vollständigem Umsatz des Startmaterials wurde die Reaktionslösung *in vacuo* eingeeengt. Das gelbbraune Reaktionsgemisch wurde in Acetonitril gelöst und mit eiskaltem Aceton gefällt. Das Produkt **39b** (30 mg, 90  $\mu\text{mol}$ , 36 %) wurde als farbloser Feststoff erhalten.

**LRMS** (ESI<sup>+</sup>): berechnet für  $\text{C}_{12}^{13}\text{CH}_{22}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}^+$  [M+H]<sup>+</sup>: 333.13; gefunden: 333.14 *m/z*.

**2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl 3-((2-((2-(dimethylamino)ethyl)amino)-2-oxoethyl)thio)propanoat-1-<sup>13</sup>C (**39c**)**

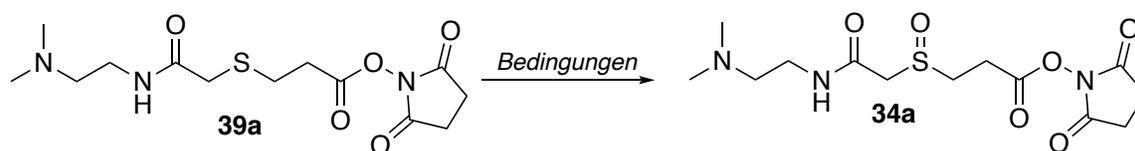


---

Sulfid **38c** (47 mg, 0.20 mmol, 1.0 Äq) wurde in einem ausgeheizten mit Argon gefluteten Schlenk Kolben in 3 mL DMF gelöst. Anschließend wurde trockenes Pyridin (32 µL, 0.40 mmol, 2.0 Äq) und NHS-TFA (84 mg, 0.40 mmol, 2.0 Äq) zugegeben und für 4 h bei RT gerührt. Es wurde eine Reaktionskontrolle *via* LC-MS durchgeführt. Nach vollständigem Umsatz des Startmaterials wurde die Reaktionslösung *in vacuo* eingeeengt. Das gelb-braune Reaktionsgemisch wurde in Acetonitril gelöst und mit eiskaltem Aceton gefällt. Das Produkt **39c** (33.3 mg, 0.09 mmol, 50 %) wurde als farbloser Feststoff erhalten.

**LRMS** (ESI<sup>+</sup>): berechnet für C<sub>12</sub><sup>13</sup>CH<sub>22</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup>: 333.13; gefunden: 333.14 *m/z*.

**2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl-3-((2-((2-(dimethylamino)ethyl)amino)-2-oxoethyl)-sulfinyl)-propanoat (34a)**

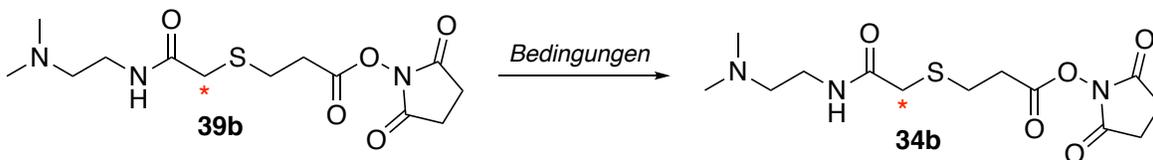


Aktivester **39a** (40 mg, 120 µmol, 1.0 Äq) wurde in einem ausgeheizten mit Argon gefluteten Dreihalskolben in 1 mL trockenem DMF gelöst. Die Reaktionslösung wurde mit wenigen Tropfen 2 M HCl angesäuert. Anschließend wurden mittels eines Tropftrichters *m*CPBA (20 mg, 120 µmol, 1.0 Äq) gelöst in DCM vorsichtig hinzugegeben. Die Oxidation wurde über LC-MS verfolgt. Nach vollständigem Umsatz zum Sulfoxid **34a**, wurde das Lösungsmittel reduziert *in vacuo* und das Nebenprodukt *m*-Chlorbenzoesäure durch Extraktion mit DCM (4 x 10 mL) entfernt. Das Produkt **34a** (26 mg, 74 µmol, 61 %) wurde als farbloser Schaum erhalten.

**HRMS** (ESI): berechnet für C<sub>13</sub>H<sub>22</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>S<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup>: 348.1224; gefunden: 348.1224 *m/z*.

---

**2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl 3-((2-((2-(dimethylamino)ethyl)amino)-2-oxoethyl)-<sup>13</sup>C)sulfinyl)propanoat (**34b**)**



Aktivester **39b** (44 mg, 131  $\mu$ mol, 1.0 Äq) wurde in einem ausgeheizten mit Argon gefluteten Dreihalskolben in 0.5 mL trockenem DMF gelöst. Die Reaktionslösung wurde mit wenigen Tropfen 2 M HCl angesäuert. Anschließend wurden mittels eines Tropftrichters *m*CPBA (23 mg, 131  $\mu$ mol, 1.0 Äq) gelöst in DCM vorsichtig hinzugetropft. Die Oxidation wurde über LC-MS verfolgt. Nach vollständigem Umsatz zum Sulfoxid **34b**, wurde das Lösungsmittel reduziert *in vacuo* und das Nebenprodukt *m*-Chlorbenzoesäure durch Extraktion mit DCM (4 x 5 mL) entfernt. Das Produkt **34b** (25 mg, 71  $\mu$ mol, 55 %) wurde als farbloser Schaum erhalten.

**HRMS** (ESI): berechnet für  $C_{12}^{13}CH_{22}N_3O_6S^+$   $[M+H]^+$ : 349.1257; gefunden: 349.1255 *m/z*.

**2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl 3-((2-((2-(dimethylamino)ethyl)amino)-2-oxoethyl)-sulfinyl)propanoat-1-<sup>13</sup>C (**34c**)**



Zunächst wurde Aktivester **39c** (33.3 mg, 0.10 mmol, 1.0 Äq) in einem ausgeheizten mit Argon gefluteten Dreihalskolben in 0.5 mL trockenem DMF gelöst. Die

---

Reaktionslösung wurde mit wenigen Tropfen 2 M HCl angesäuert. Anschließend wurden mittels eines Tropftrichters *m*CPBA (17 mg, 0.10 mmol, 1.0 Äq) gelöst in DCM vorsichtig hinzugegossen. Die Oxidation wurde über LC-MS verfolgt. Nach vollständigen Umsatz zum Sulfoxid **34c**, wurde das Lösungsmittel reduziert *in vacuo* und das Nebenprodukt *m*-Chlorbenzoesäure durch Extraktion mit DCM (4 x 5 mL) entfernt. Das Produkt **34c** (5 mg, 14 µmol, 14 %) wurde als farbloser Schaum erhalten.

**HRMS** (ESI): berechnet für C<sub>12</sub><sup>13</sup>CH<sub>22</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub> S<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> : 349.1257; gefunden: 349.1256 *m/z*.

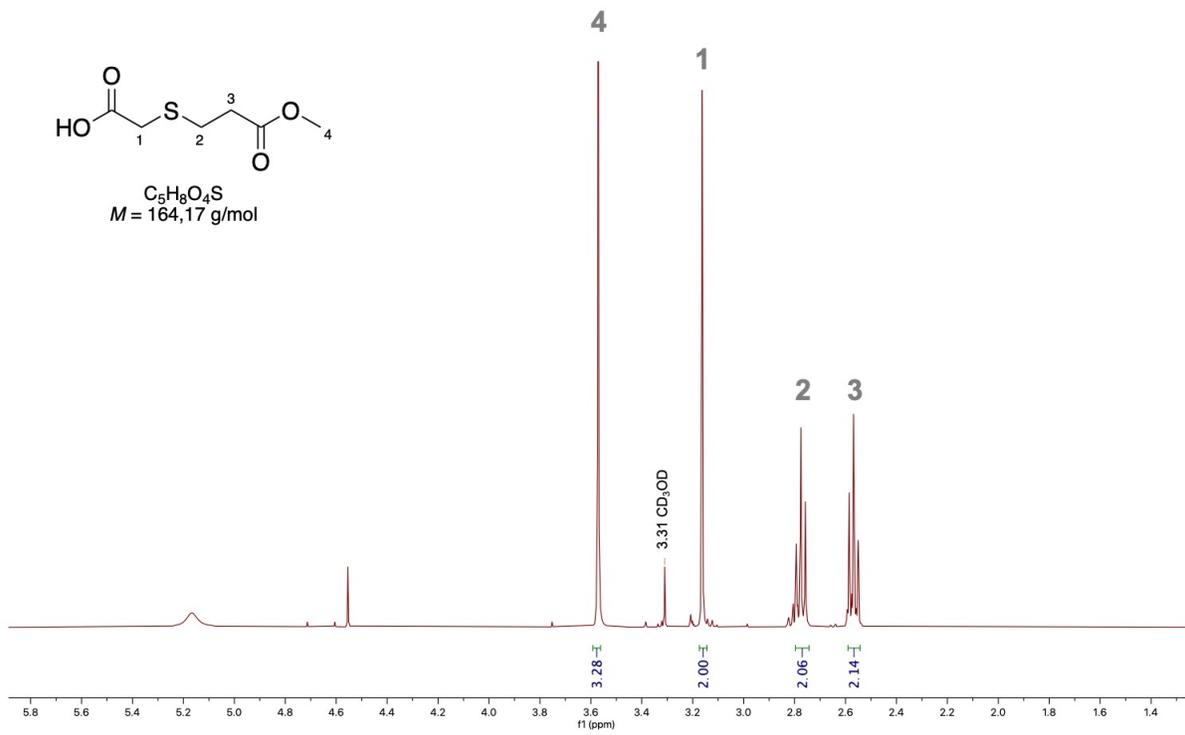
---

**6 Anhang**

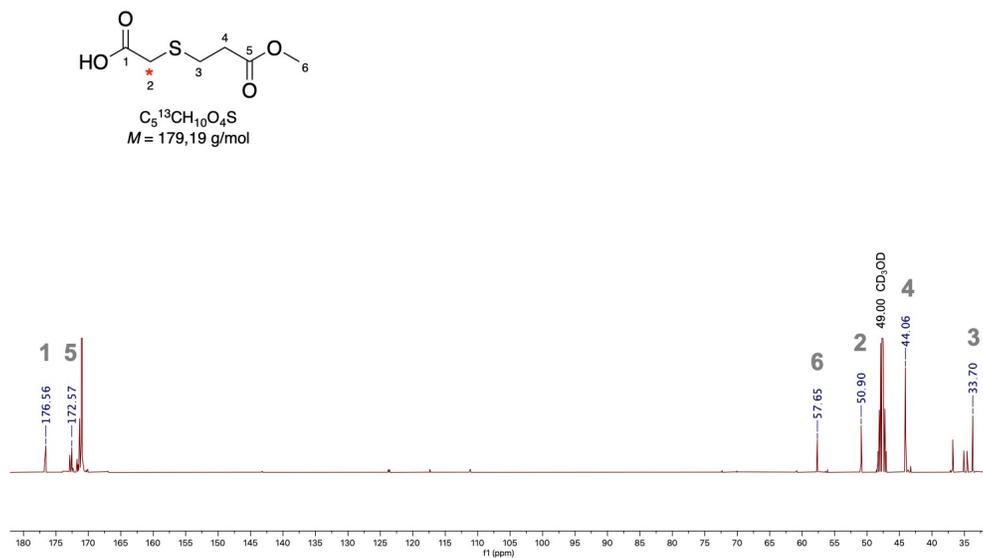
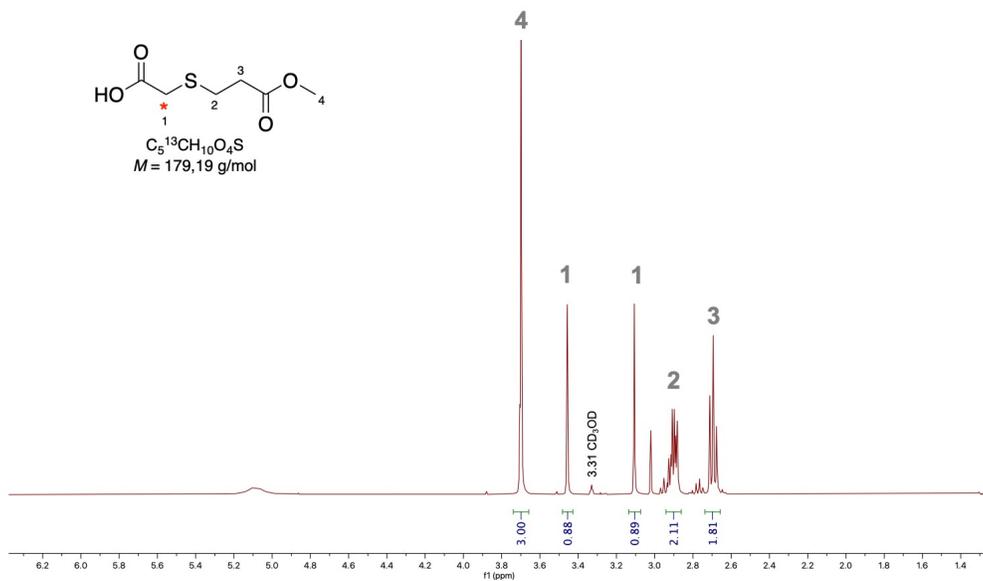
---

---

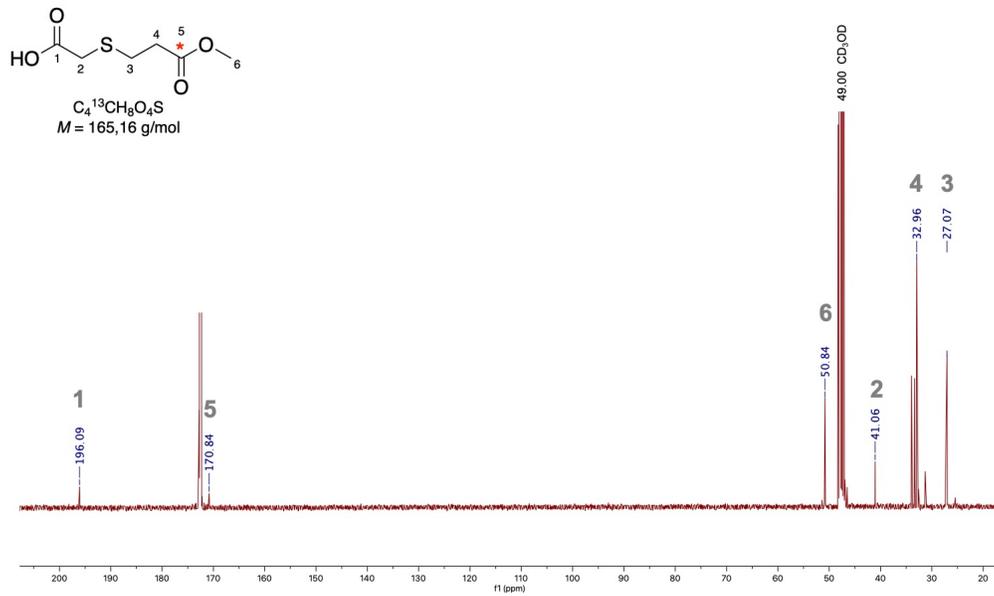
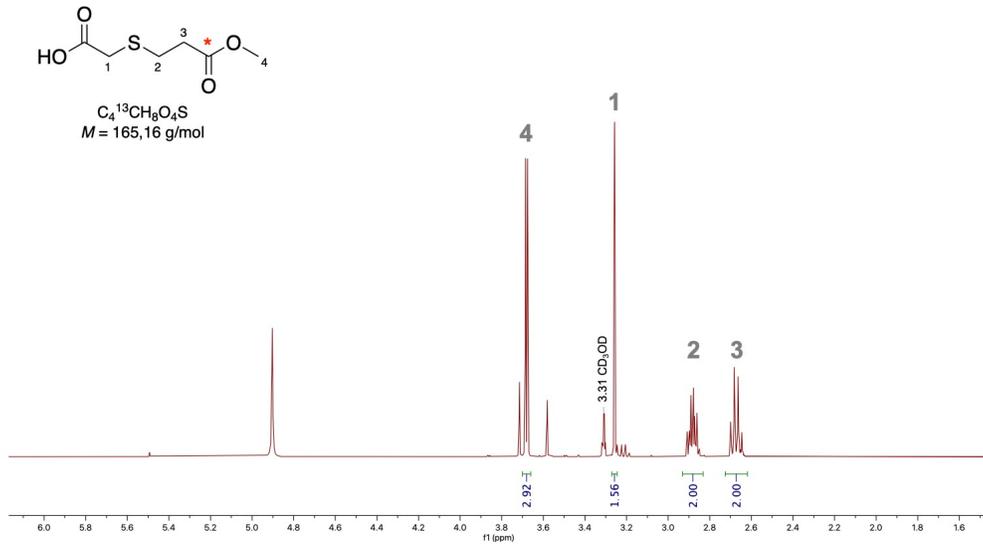
## **$^1\text{H}$ und $^{13}\text{C}$ NMR Spektren**



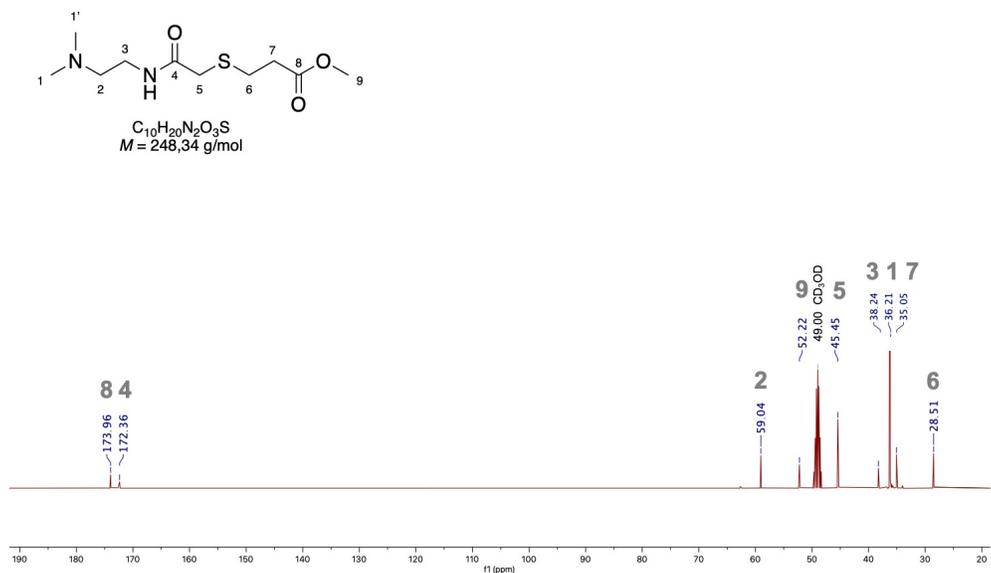
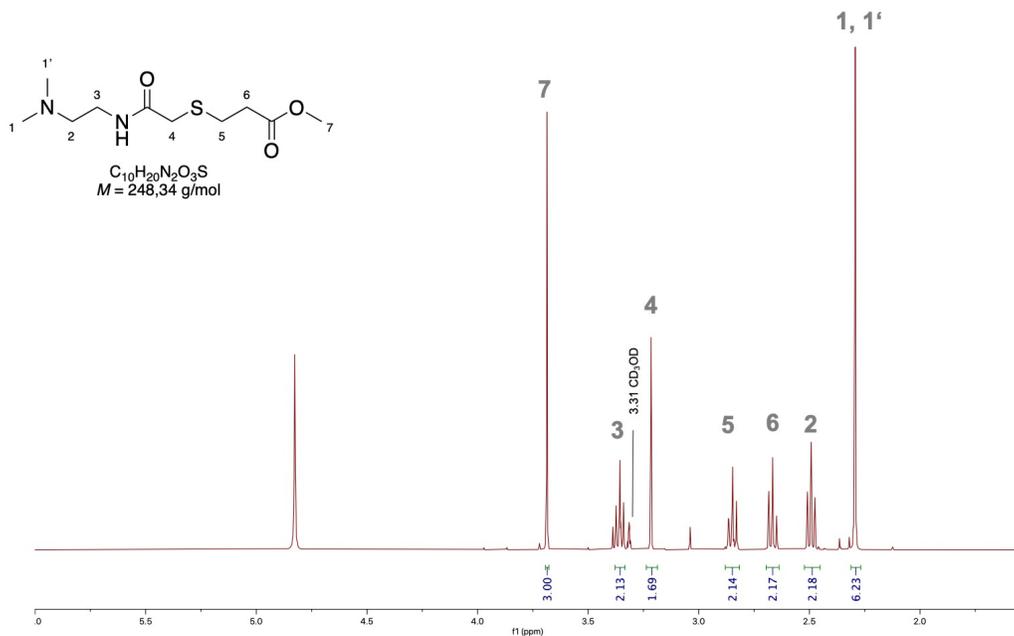
<sup>1</sup>H NMR Spektrum der Verbindung 2-((3-Methoxy-3-oxopropyl)thio)acetat (36a) in CD<sub>3</sub>OD.



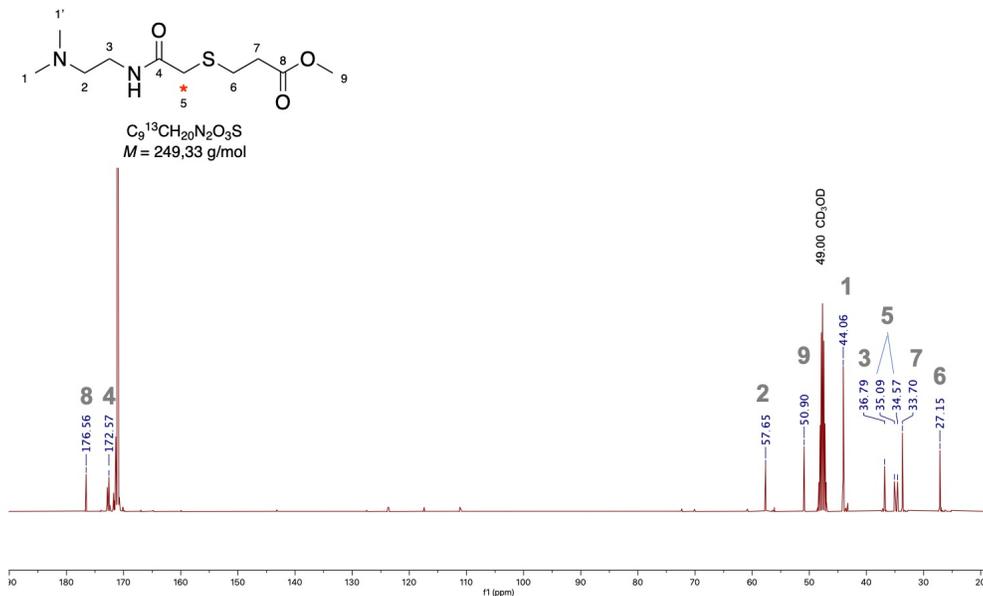
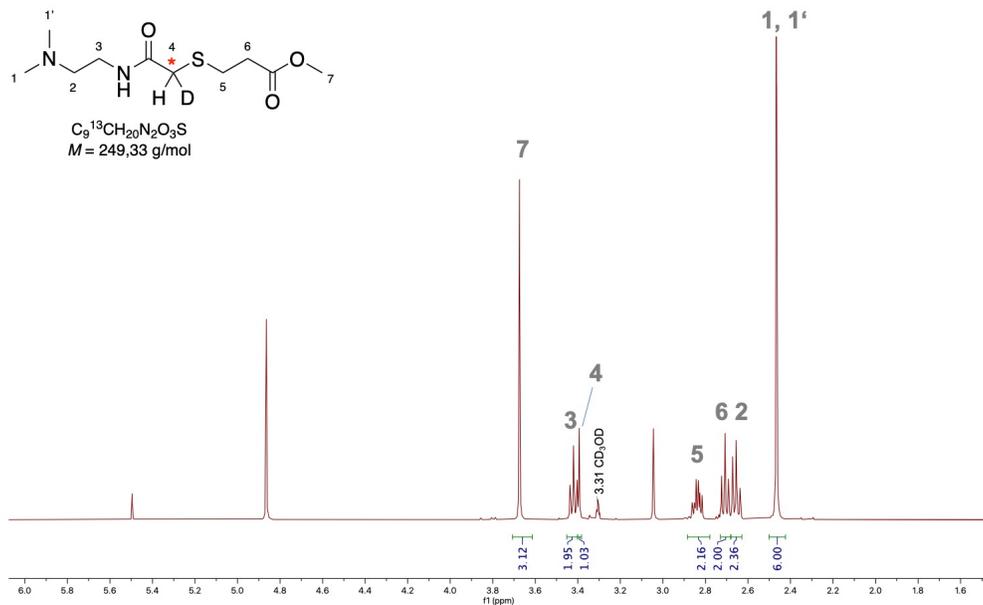
$^1H$  NMR und  $^{13}C$  NMR Spektrum der Verbindung 2-((3-Methoxy-3-oxopropyl)thio)acetat-2- $^{13}C$  (36b) in  $CD_3OD$ .



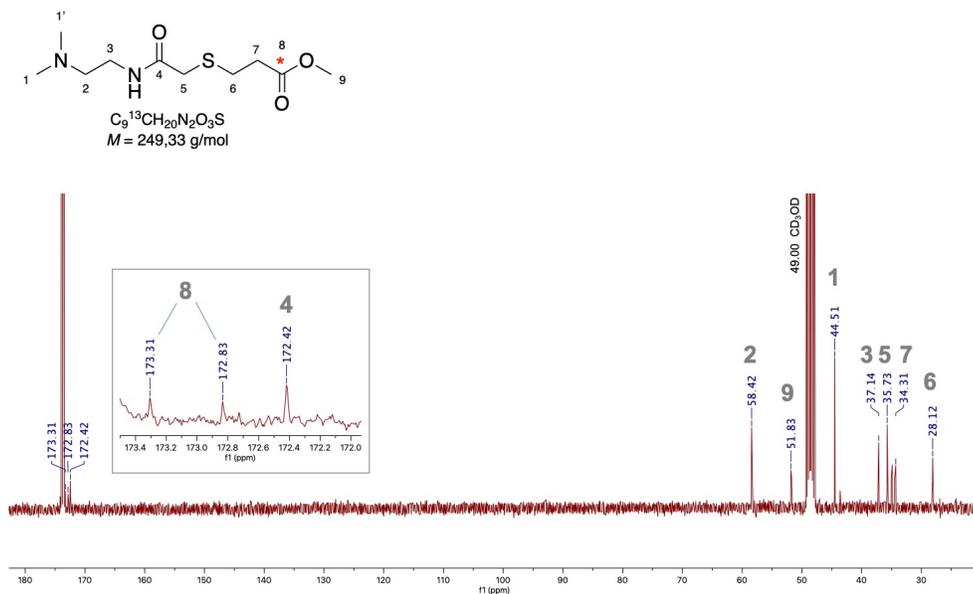
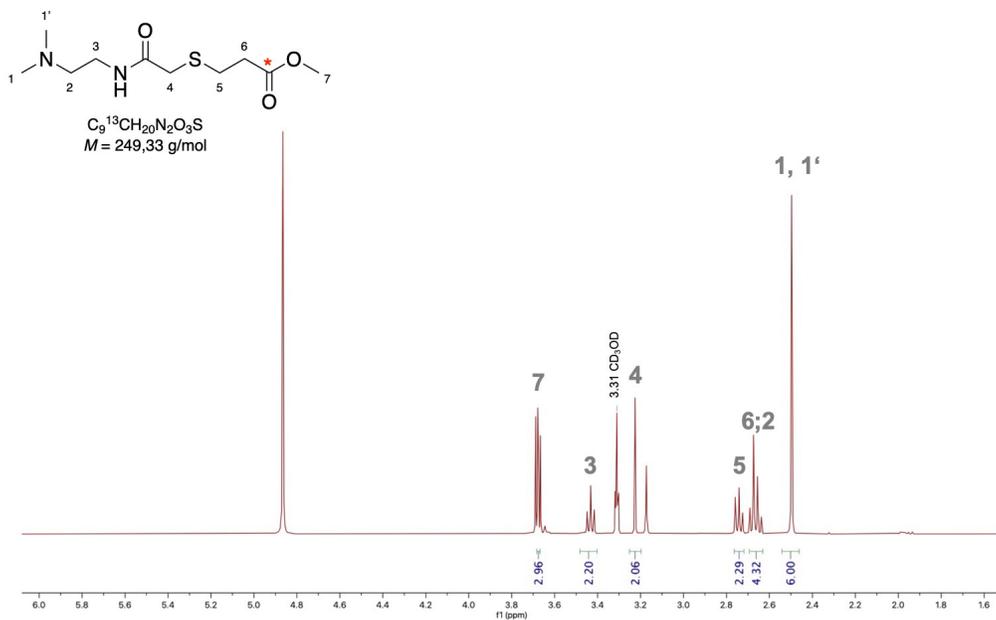
$^1H$  NMR und  $^{13}C$  NMR Spektrum der Verbindung 2-((3-methoxy-3-oxopropyl-3- $^{13}C$ )thio)acetat (36c) in  $CD_3OD$ .



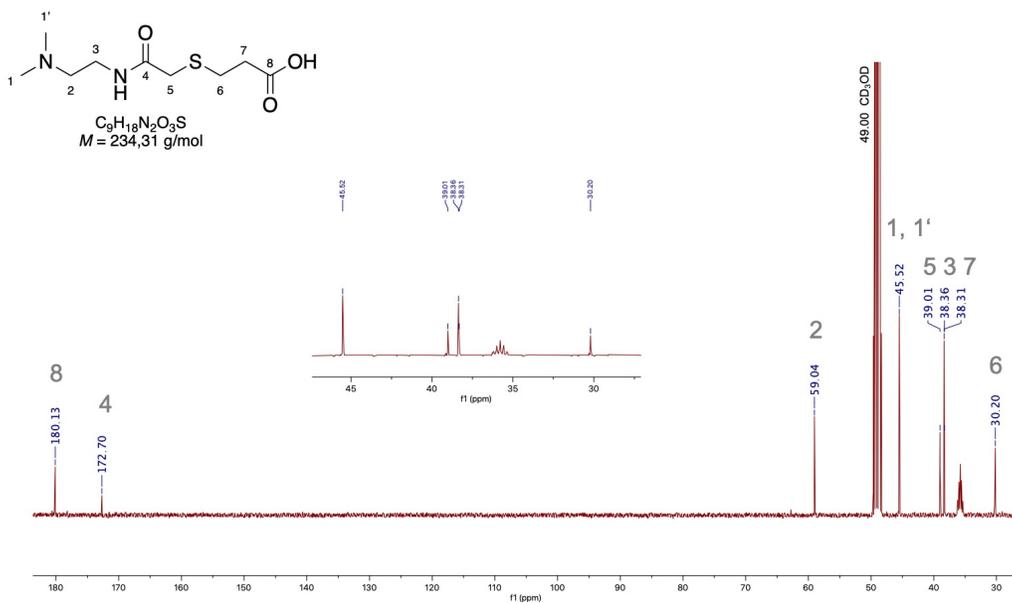
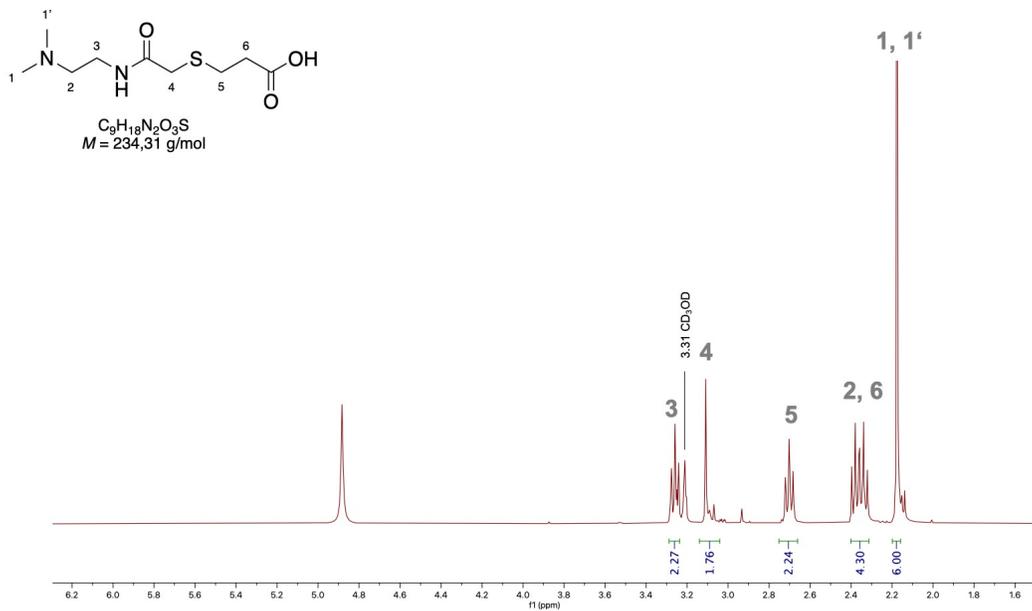
*<sup>1</sup>H NMR und <sup>13</sup>C NMR Spektrum der Verbindung Methyl 3-((2-((2-(dimethylamino)ethyl)-amino)-2-oxoethyl)thio)propionat (37a) in CD<sub>3</sub>OD.*



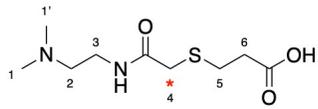
<sup>1</sup>H NMR und <sup>13</sup>C NMR Spektrum der Verbindung Methyl-3-((2-((2-(dimethylamino)ethyl)-amino)-2-oxoethyl-1-<sup>13</sup>C)thio)propionat (37b) in CD<sub>3</sub>OD. \*Aufgrund eines Deuterium-Shifts an der Stelle C-4 (<sup>1</sup>H NMR) durch Reaktion mit dem Lösungsmittel CD<sub>3</sub>CO ergibt das Integral 1.



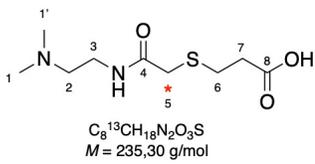
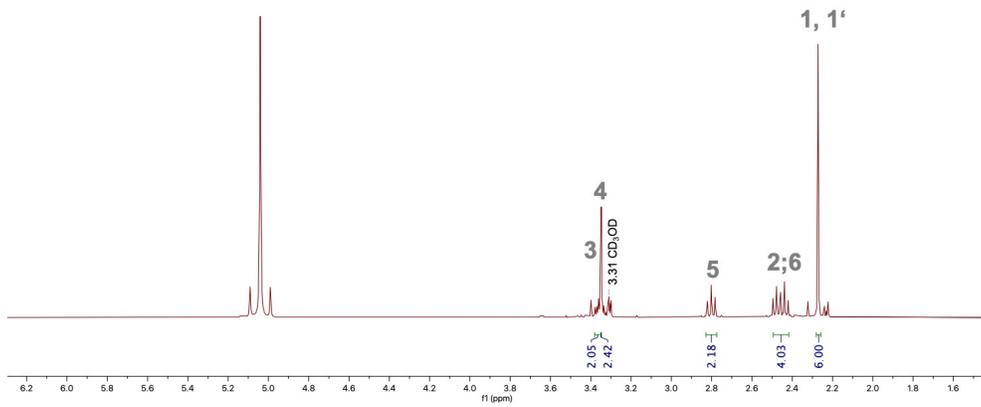
*$^1H$  NMR und  $^{13}C$  NMR Spektrum der Verbindung Methyl-3-((2-((2-(dimethylamino)ethyl)amino)-2-oxoethyl)thio)propionat-1- $^{13}C$  (37c) in  $CD_3OD$ .*



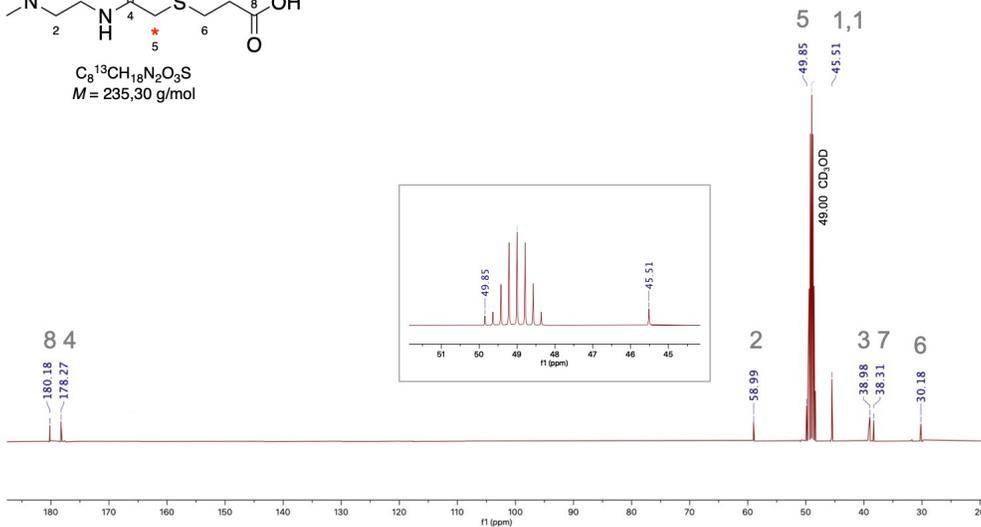
$^1H$  NMR und  $^{13}C$  NMR Spektrum der Verbindung 3-((2-((2-(Dimethylamino)ethyl)amino)-2-oxoethyl)thio)propionsäure (38a) in  $CD_3OD$ .



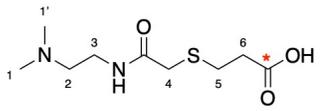
$C_8^{13}CH_{18}N_2O_3S$   
 $M = 235,30 \text{ g/mol}$



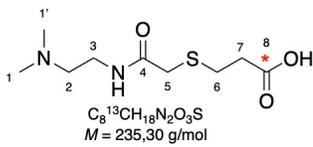
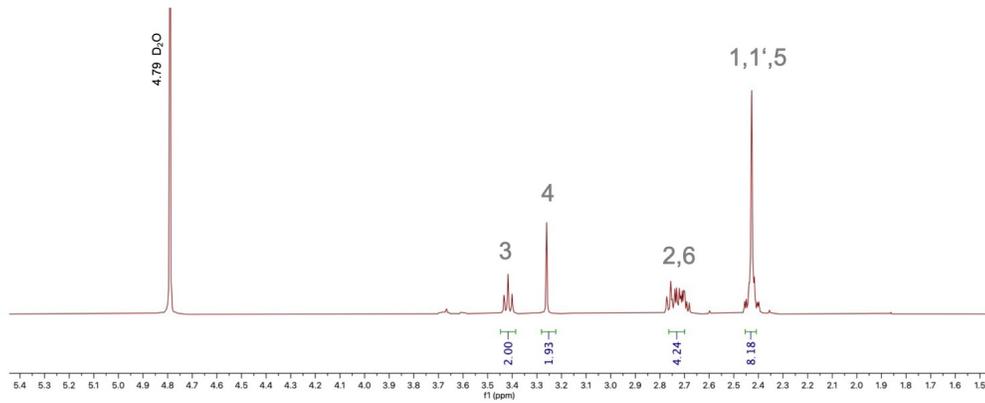
$C_8^{13}CH_{18}N_2O_3S$   
 $M = 235,30 \text{ g/mol}$



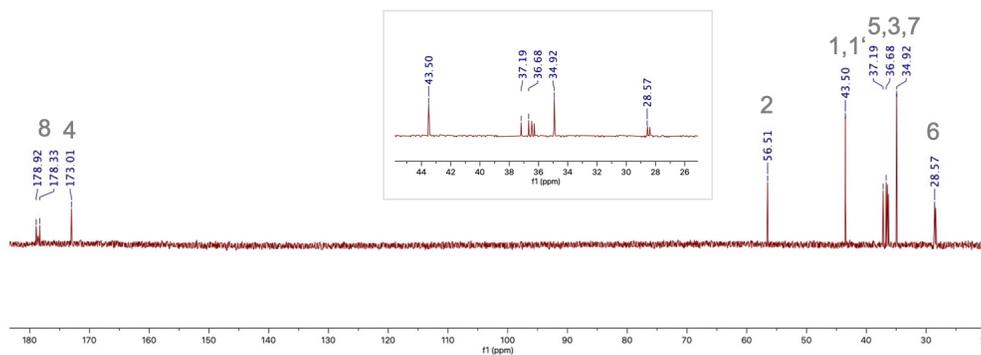
$^1H$  und  $^{13}C$  NMR Spektrum der Verbindung 3-((2-((2-(Dimethylamino)ethyl)amino)-2-oxoethyl-1- $^{13}C$ )thio)propionsäure (38b) in  $CD_3OD$ .



$C_8^{13}CH_{18}N_2O_3S$   
 $M = 235,30 \text{ g/mol}$



$C_8^{13}CH_{18}N_2O_3S$   
 $M = 235,30 \text{ g/mol}$



$^1H$  NMR und  $^{13}C$  NMR Spektrum der Verbindung 3-((2-((2-(Dimethylamino)ethyl)amino)-2-oxoethyl)thio)propionsäure-1- $^{13}C$  (38c) in  $D_2O$ .

---

## 7 Abkürzungsverzeichnis

<b>2D</b>	zweidimensional
<b>4-DMAP</b>	4-(Dimethylamino)-pyridin
<b>A</b>	Adenin
<b>AcOH</b>	Essigsäure
<b>Arg</b>	Arginin
<b>Äq</b>	Äquivalente
<b>Boc</b>	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
<b>BSA</b>	<i>Bovine Serum Albumin</i> , Rinderserumalbumin
<b>C</b>	Cytosin
<b>CAN</b>	Cer(IV)-ammoniumnitrat
<b>CID</b>	<i>Collision induced dissociation</i>
<b>DCM</b>	Dichlormethan
<b>CMT</b>	eng. combinatorial isobaric mass tag
<b>Da</b>	Dalton
<b>DIPEA</b>	<i>N,N</i> -Dimethylaminopyridin
<b>DMF</b>	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	eng. desoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
<b>DSSO</b>	Disuccinimidylsulfoxid
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b>Duplex</b>	Reagenz-Set bestehend aus zwei isobaren Strukturen
<b>EASY-Tag</b>	eng. easily abstractable sulfoxide-based isobaric-tag
<b>EI</b>	Elektronenstoß-Ionisation
<b>EDC</b>	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
<b>ESI</b>	Elektrospray-Ionisation
<b>EtOAc</b>	Ethylacetat
<b>EtOH</b>	Ethanol

---

<b>FA</b>	eng. formic acid, Ameisensäure
<b>fC</b>	5-Formylcytosin
<b>G</b>	Guanin
<b>HBTU</b>	2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
<b>HCD</b>	<i>Higher-energy collisional dissociation</i>
<b>HEK</b>	<i>Human Embryonic Kidney</i>
<b>HEPES</b>	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
<b>HOBt</b>	1-Hydroxybenzotriazol
<b>HPLC</b>	<i>High performance liquid chromatography</i>
<b>HRMS</b>	<i>High resolution mass spectrometry</i>
<b>ICAT</b>	<i>Isotope-coded affinity tag</i> ,Isotopen-kodierte Affinitätsmarkierung
<b>IR</b>	Infrarotspektroskopie
<b>iTRAQ</b>	Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantification
<b>LiOH</b>	Lithiumhydroxid
<b>LRMS</b>	Low resolution mass spectrometry
<b>IsSOT</b>	Less-steric SOT
<b>IsST</b>	Less-steric sulfide tag
<b>LC</b>	Liquid chromatography
<b>MALDI</b>	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation
<b>mCPBA</b>	meta-Chlorperbenzoesäure
<b>MeCN</b>	Acetonitril
<b>MeOH</b>	Methanol
<b>MS</b>	Massenspektroskopie
<b>MS/MS</b>	Tandem Massenspektroskopie
<b>NaOAc</b>	Natriumacetat
<b>NEt<sub>3</sub></b>	Triethylamin
<b>Neunplex</b>	Reagenz-Set bestehend aus neun isobaren Strukturen
<b>NHS</b>	N-Hydroxysuccinimid
<b>NMR</b>	Nuclear magnetic resonance

---

---

<b>PDA</b>	photo diode array
<b>ppm</b>	parts per million
<b>PTM</b>	Posttranslationale Modifikation
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>pyBOP</b>	Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat
<b>SILAC</b>	stable isotope labeling by/with amino acids in cell culture
<b>SOT</b>	SulfOxid-Tag
<b>SRM</b>	Selected reaction monitoring
<b>TFA</b>	Trifluoressigsäure
<b>TCEP</b>	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
<b>TMS</b>	Trimethylsilyl
<b>TMT</b>	Tandem Mass Tags
<b>Tr</b>	Trityl
<b>Triplex</b>	Reagenz-Set bestehend aus drei isobaren Strukturen
<b>THF</b>	Tetrahydrofuran
<b>UHPLC</b>	Ultra high liquid chromatography
<b>UV/Vis</b>	Ultraviolette und sichtbares Licht

---

## 8 Literaturverzeichnis

- <sup>1</sup> M. Mann (2016). Das erste vollständige Proteom. Abgerufen am 6. Januar 2020, von <https://www.mpg.de/314596/forschungsSchwerpunkt1>.
- <sup>2</sup> D. R. Zerbino, P. Achuthan, W. Akanni, *et al.*, *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, 754–761.
- <sup>3</sup> I. Ezkurdia, D. Juan, J. M. Rodriguez, *et al.*, *Nucleic Acids Res.* **2018**, *23*, 5866–5878.
- <sup>4</sup> T. Pfaffeneder, B. Hackner, M. Truss, *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 7008–7012.
- <sup>5</sup> G. R. Wyatt, *Nature* **1950**, *166*, 237–238.
- <sup>6</sup> G. R. Wyatt, S. S. Cohen, *Nature* **1952**, *170*, 1072–1073.
- <sup>7</sup> M. Münzel, D. Globisch, T. Brückl, *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *122*, 5503–5505.
- <sup>8</sup> M. R. Wilkins, C. Pasquali, R. D. Appel, *et al.*, *Biotechnology* **1996**, *14*, 61–65.
- <sup>9</sup> J. Cox, M. Mann, *et al.*, *Annu. Rev. Biochem.* **2011**, *80*, 273–299.
- <sup>10</sup> A. A. Cohen, N. Geva-Zatorsky, E. Eden, *et al.*, *Science* **2008**, *322*, 1511–1516.
- <sup>11</sup> T. Ly, A. Whigham, R. Clarke, *et al.*, *Elife* **2017**, *6*, e27574.
- <sup>12</sup> S. R. Nagarajan, A. E. Brandon, J. A. McKenna, *et al.*, *PLoS One* **2017**, *12*, e0174431.
- <sup>13</sup> I. J. Martins, *Proteomes* **2016**, *4*, 1–19.
- <sup>14</sup> J. Solassol, W. Jacot, L. Lhermitte, *et al.*, *Expert Rev. Proteomic.* **2006**, *3*, 311–320.
- <sup>15</sup> M. C. Gast, J. H. Schellens, J. H. Beijnen, *Breast Cancer Res. Tr.* **2009**, *116*, 17–29.
- <sup>16</sup> C. H. Lee, E. J. Im, P. G. Moon, *et al.*, *BMC Cancer* **2018**, *18*, 1058–1062.
- <sup>17</sup> M. Plebani, M. Pittoni, M. Celadin, *et al.*, *Autoimmun. Rev.* **2009**, *8*, 238–243.
- <sup>18</sup> A. Venkatesh, C. Gil, M. Fuentes, *et al.*, *Proteomic. Clin. Appl.* **2018**, *12*, e1700139.
- <sup>19</sup> T. M. Greco, I. M. Cristea, *Mol. Cell. Proteomics* **2017**, *16*, 5–14.
- <sup>20</sup> K. L. Oxford, J. P. Wendler, *et al.*, *Expert Rev. Proteomic.* **2016**, *13*, 579–591.
- <sup>21</sup> P. H. O'Farrell, *J Biol. Chem.* **1975**, *250*, 4007–4021.
- <sup>22</sup> C. Lelong, M. Chevallet, S. Luche, *et al.*, *Methods Mol. Biol.* **2009**, *519*, 339–350.
- <sup>23</sup> H.J. Chial, H. B. Thompson, *et al.*, *Anal. Biochem.* **1993**, *209*, 258–266.
- <sup>24</sup> S. Ong, M. Mann, *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 252–262.
- <sup>25</sup> M. Karas, F. Hillenkamp, *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 2299–2301.
- <sup>26</sup> J. Fenn, M. Mann, *et al.*, *Science* **1988**, *60*, 64–71.
- <sup>27</sup> M. Yamashita, J. B. Fenn, *J. Phys. Chem.* **1984**, *88*, 4451–4459.
- <sup>28</sup> M. Karas, D. Bachmann, F. Hillenkamp, *Anal. Chem.* **2002**, *57*, 2935–2939.
- <sup>29</sup> R. Juraschek T. Dulcks, M. Karas, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1999**, *10*, 300–308.
- <sup>30</sup> A. Cristobal M. L. Hennrich, *et al.*, *Analyst* **2012**, *137*, 3541–3548.
- <sup>31</sup> M. Stadlmeier, Synthese Sulfoxid-basierter Reagenzien für die Proteomik und deren Anwendung, Dissertation, Universität LMU München, **2019**.
- <sup>32</sup> G. Taylor, *Proc. R. Soc. Lon. Ser. A* **1964**, *280*, 383–397.
- <sup>33</sup> M. Dole, L. L. Mack, *et al.*, *J. Chem. Phys.* **1968**, *49*, 2240–2249.
- <sup>34</sup> J. V. Iribarne, *J. Chem. Phys.* **1976**, *64*, 2287–2294.
- <sup>35</sup> M. Glückmann, M. Karas, *J. Mass Spectrom.* **1999**, *34*, 467–477.
- <sup>36</sup> R. Aebersold, M. Mann, *Nature* **2003**, *422*, 198–207.
- <sup>37</sup> J. Kast, C. E. Parker, *et al.*, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2003**, *17*, 1825–1834.
- <sup>38</sup> K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, *et al.*, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1988**, *2*, 151–153.
- <sup>39</sup> J. Mohr, R. Swart, M. Samonig, *et al.*, *Proteomics* **2010**, *10*, 3598–3609.
- <sup>40</sup> P. Chaurand, F. Luetzenkirchen, *et al.*, *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **1999**, *10*, 91–103.
- <sup>41</sup> G. Chowdhury, *et al.*, *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* **2011**, **Chapter 7**, Unit 7.16.1–17.16.11.
- <sup>42</sup> S. Shah, S. H. Friedman, *Nat. Prot.* **2008**, *3*, 351–356.

- 
- 43 A. Marie, F. Fournier, J. C. Tabet, *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 5106–5114.
- 44 Z. Zhang, W. Si, D. L. Stenoien, *et al.*, *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2014**, *7*, 427–454.
- 45 L. M. Smith, N. L. Kelleher, *Nat. Methods* **2013**, *10*, 186–87.
- 46 J. V. Olsen, S.-E. Ong, M. Mann, *Mol. Cell. Proteomics* **2004**, *3*, 608–614.
- 47 J. K. Eng, A. L. McCormack, J. R. Yates, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1994**, *5*, 976–989.
- 48 D. N. Perkins, D. J. Pappin, *et al.*, *Electrophoresis* **1999**, *20*, 3551–3567.
- 49 F. Lottspeich, J. W. Engels, Bioanalytik. *Spektrum Akademischer Verlag*: Heidelberg, **2012**.
- 50 R. S. Johnson, S. A. Martin, K. Biemann, *et al.*, *Anal. Chem.* **1987**, *59*, 2621–2625.
- 51 Wells, J. M.; McLuckey, S. A., Collision-induced dissociation (CID) of peptides and proteins. In *Methods in Enzymology*, Elsevier: **2005**; Vol. 402, 148–185.
- 52 J. V. Olsen, *et al.*, *Nat. Methods* **2007**, *4*, 709–712.
- 53 J. Wiesner, T. Premisler, *et al.*, *Proteomics* **2008**, *21*, 4466–4483.
- 54 J. E. Syka, J. J. Coon, M. J. Schroeder, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2004**, *101*, 9528–9533.
- 55 J. R. Yates, 3rd, J. K. Eng, A. L. McCormack, *et al.*, *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 1426–1436.
- 56 J. Cox, N. Neuhauser, A. Michalski, *et al.*, *J. Proteome Res.* **2011**, *10*, 1794–1805.
- 57 W. A. Tao, R. Aebersold, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, *14*, 110–118.
- 58 C. Pan, Y. Oda, *et al.*, *Mol. Cell. Proteomics* **2008**, *7*, 938–948.
- 59 S. P. Gygi, B. Rist, S. A. Gerber, *et al.*, *Nat. Biotechnol.* **1999**, *17*, 994–999.
- 60 W. Wang, H. Zhou, *et al.*, *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 4818–4826.
- 61 P. V. Bondarenko, D. Chelius, T. A. Shaler, *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 4741–4749.
- 62 J. Cox, M. Y. Hein, C. A. Luber, *et al.*, *Mol. Cell. Proteomics* **2014**, *13*, 2513–2526.
- 63 V. Granholm, L. Käll, *Proteomics* **2011**, *11*, 1086–1093.
- 64 N. Rauniyar, J. R. Yates III, *J. Proteome Res.* **2014**, *13*, 5293–5309.
- 65 S. E. Ong, B. Blagoev, *et al.*, *Mol. Zelle. Proteomik* **2002**, *1*, 376–386.
- 66 S. E. Ong, M. Mann, *Nat Protoc* **2006**, *1*, 2650–2660.
- 67 A. Thompson, J. Schafer, K. Kuhn, *et al.*, *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 1895–1904.
- 68 P. L. Ross, Y. N. Huang, *et al.*, *Mol. Cell. Proteomics* **2004**, *3*, 1154–1169.
- 69 M. W. Hr, W. Haas, G. C. McAlister, *et al.*, *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 9214 – 9221.
- 70 L. Dayon, A. Hainard, V. Licker, *et al.*, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 2921–2931.
- 71 G. C. McAlister, E. L. Huttlin, W. Haas, *et al.*, *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 7469–7478.
- 72 F. Xiang, H. Ye, R. Chen, *et al.*, *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 2817–2825.
- 73 N. Pappireddi *et al.*, *ChemBioChem* **2019**, *20*, 1210–1224.
- 74 C. D. Wenger, *et al.*, *Nat. Methods* **2011**, *8*, 933–937.
- 75 S. Y. Ow, M. Salim, J. Noirel, *et al.*, *J. Proteome Res.* **2009**, *8*, 5347–5355.
- 76 S. Virreira Winter, F. Meier, C. Wichmann, *et al.*, *Nat. Methods* **2018**, *15*, 527–530.
- 77 G. E. Reid, K. D. Roberts, E. A. Kapp, *et al.*, *J. Proteome Res.* **2004**, *3*, 751–759.
- 78 B. ElAmin, G. M. Anantharamaiah, *et al.*, *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 3442–3444.
- 79 N. M. Leonard, J. Brunckova, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 9169–9174.
- 80 E. Valeur, M. Bradley, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 606–631.
- 81 M. R. Lockett, *Langmuir*, **2008**, *24*, 69–75.
- 82 M. Wallner, Synthese von Reagenzien zur ultrasensitiven massenspektrometrischen Quantifizierung von Proteinen und Steroiden, Dissertation, Universität LMU München, **2018**.
- 83 T. Itoh, *et al.*, *Tetrahedron* **2008**, *64*, 1823–1828.
- 84 E. Okun, *et al.*, *FEBS Journal* **2007**, *274*, 3159–3170.
- 85 Verena Tinnefeld, Methodenentwicklung zur Analyse von Proteinen und Proteinkomplexen mittels Cross-Linking und Massenspektrometrie, Dissertation, Technische Universität Dortmund, **2017**.
-