

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

Synthese und Strukturaufklärung von Queuosin- Derivaten

Markus Andreas Hillmeier

aus
München

2023

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 21.03.2023

Markus Hillmeier

Dissertation eingereicht am: 21.03.2023

1. Berichtstatter: Prof. Dr. Thomas Carell

2. Berichtstatter: Dr. Pavel Kielkowski

Datum der mündlichen Prüfung: 05.05.2023

Du musst nur entscheiden, was du mit der Zeit anfangen willst, die dir gegeben ist. [...] Hab Geduld. Geh dahin, wo du hingehen musst, und hoffe.

Gandalf, aus J.R.R. Tolkiens „*Der Herr der Ringe*“

PUBLIKATIONSLISTE

Teile dieser Arbeit wurden bereits publiziert, als Manuskript in Journalen eingereicht oder auf Konferenzen vorgestellt.

Publikationen

- “*Synthesis of Galactosyl-Queuosine and Distribution of Hypermodified Q-Nucleosides in Mouse Tissues*”, Peter Thumbs[†], Timm T. Ensfelder[†], **Markus Hillmeier**[†], Mirko Wagner[†], Matthias Heiss, Constanze Scheel, Alexander Schön, Markus Müller, Stylianos Michalakis, Stefanie Kellner, Thomas Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2020**, 59, 12352 – 12356.
- “*Synthesis and Structure Elucidation of the Human tRNA Nucleoside Mannosyl-Queuosine*”, **Markus Hillmeier**, Mirko Wagner, Timm Ensfelder, Eva Korytiaková, Peter Thumbs, Markus Müller, Thomas Carell, *Nat. Commun.* **2021**, 12, 7123.

[†] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen beigetragen.

Konferenzbeiträge und Sonstiges

- **Posterbeitrag** (Kurzvortrag): “*Structure elucidation of the natural queuosine derivatives galactosyl-queuosine (galQ) and mannosyl-queuosine (manQ) by total synthesis*”, **Markus Hillmeier**, IS3NA virtual online symposium, August 26-27, **2021**.
- “*Structure elucidation of mannosyl-queuosine (manQ)*”, **Markus Hillmeier**, *Nature: Behind the paper*, **2021**, verfügbar unter:
<https://chemistrycommunity.nature.com/posts/structure-elucidation-of-mannosyl-queuosine-manq>, abgerufen am 10.11.2022.

DANKSAGUNGEN

Zuallererst möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Thomas Carell bedanken. Vielen Dank, dass du mir die Möglichkeit gegeben hast, in deiner tollen Gruppe an diesem sehr spannenden und herausfordernden Projekt mitwirken zu können. Es war eine sehr lehrreiche, aufregende und spannende Zeit, in der ich das Privileg hatte, viele verschiedenste Sachen ausprobieren und lernen zu dürfen. Danke dir, Thomas, für diese Herausforderung, an der ich wachsen konnte und für deine Unterstützung in den letzten Jahren.

Bei Dr. Markus Müller möchte ich mich für seine unermüdliche Arbeit dafür bedanken, Ordnung im alltäglichem Laborgeschehen zu erhalten. Danke dir für viele anregende Austausche über Projektthemen und dafür, dass du immer ein offenes Ohr für alle Anliegen und Probleme des Alltags hast. Kerstin Kurz möchte ich für Ihre freundliche und hilfsbereite Art danken, und für die Organisation des alltäglichen Geschehens. Danke Kerstin, dass du immer hilfsbereit bist und uns immer wieder auch mit kleinen Freuden des Alltags (wie etwa Schokolade) überraschst. Frau Slava Gärtner danke ich für ihren gewissenhaften Blick auf alle verwaltungstechnischen Anliegen des Doktoranden-Alltag.

Bei meinen Laborkollegen, mit denen ich im Laufe der Jahre zusammenarbeiten durfte, möchte ich mich bedanken für die angenehme Atmosphäre im Labor, den vielen Spaß den wir zusammen hatten und die gegenseitige Unterstützung im nicht immer einfachen Laboralltag. Besonders bedanken möchte ich mich bei meiner „Labornachbarin“ Katerina Pappa für die immer super Zusammenarbeit im Labor und für die musikalische Untermalung des Laboralltags. Weiterhin möchte ich mich bedanken bei Alex Schön, Eva Korytiaková, Nobuhiro Tago und allen anderen, die mich am Anfang meiner Doktorarbeit in die Gruppe aufgenommen haben. Bei meinen Schafkopfkollegen Stefan Wiedemann, Alex Schön, Felix Hagelskamp und Florian Schelter bedanke ich mich für viele spaßige Abende und einige exzellente Gras-Solos.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei allen ManQ-lern, mit denen ich die Freude hatte, die letzten Jahre zusammen an diesem einzigartigen Thema forschen zu dürfen. Besonders möchte ich mich dabei bei Timm Ensfelder und Matthias Heiß bedanken für die biochemische Unterstützung. Insbesondere möchte ich auch Dr. Mirko Wagner ein großes Dankeschön aussprechen für die Durchführung der analytischen Experimente, für die Zusammenarbeit an den großartigen Veröffentlichungen, die wir zusammen schreiben konnten, und auch für die moralische Unterstützung. Mirko, ich wünsche dir das Allerbeste für die Zukunft! Meinem „Nachfolger“ Alex Pichler danke ich für die Zusammenarbeit die letzten Monate, und ich bin schon sehr gespannt auf die weiteren Ergebnisse aus dem Q-Projekt.

Zusätzlich möchte ich mich noch bedanken bei Simon Veth (Salut, Herr General), Dilara Özdemir (Candy-Mama), Leander Runtsch, Jonas Feldmann, Giacomo Gannazoli, Annika Tölke, Fabian Hernichel und allen anderen, die die letzten drei Jahre zu einer einzigartigen Zeit gemacht haben. Matthias Heiß und Eva Korytiaková danke ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Bei allen Praktikanten, die ich die Ehre hatte, über die Jahre zu betreuen möchte ich mich für die tolle Mitarbeit und Hilfe bedanken. Besonders möchte ich hier Ruochen Du, Dominik Putz, Thi-Tram Truong, Benedikt Nissl und Sarah Hügel hervorheben, danke euch!

Bei meiner Eva Korytiaková, die ich das unfassbar große Glück hatte, während dieser Zeit kennenlernen zu dürfen bedanke ich mich für die mehr als wundervolle Zeit zusammen. Danke dir, dass du immer für mich da bist und mich immer unterstützt. Ich freue mich schon sehr darauf, was das Leben für uns zusammen noch bringen wird.

Zuletzt möchte ich einen großen Dank an meine Familie aussprechen, meinen Eltern Josef und Christine Hillmeier und meinem Bruder Thomas Hillmeier, die mich über die vielen Jahre immer unterstützt und mir diesen Lebensweg ermöglicht haben. Ohne euch wäre das alles nicht möglich gewesen. Danke euch für die Unterstützung auch in schwierigen Zeiten und dass ihr nie den Glauben und das Vertrauen in mich verloren habt.

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG.....	I
SUMMARY.....	III
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 RNA-Modifikationen.....	1
1.2 Einfluss von RNA-Modifikationen auf Struktur und Funktion von tRNA.....	2
1.2.1 Modifikationen außerhalb des Anticodons.....	4
1.2.2 Modifikationen an Position 37 benachbart zum Anticodon.....	5
1.2.3 Modifikationen an Position 34 („ <i>Wobble</i> -Position“) des Anticodons.....	6
1.3 Queuosin – Struktur und Funktion.....	6
1.3.1 Struktur und Einbau von Queuosin.....	6
1.3.2 Biologische Funktion von Queuosin.....	9
1.3.3 Potenzielle medizinische Bedeutung von Queuosin.....	11
1.4 Biosynthese von Queuosin.....	12
1.5 Chemische Synthesen von Queuosin.....	14
1.5.1 Synthese von Queuosin.....	14
1.5.2 Synthese von Queuin.....	18
1.5.3 Synthese des Cyclopentenbausteins.....	21
1.6 Derivate von Queuosin.....	26
1.6.1 Glutamyl-Queuosin.....	26
1.6.2 Galactosyl- und Mannosylqueuosin.....	28

2	AUFGABENSTELLUNG.....	30
3	VERÖFFENTLICHTE ARBEITEN	35
3.1	Synthesis of Galactosyl-Queuosine and Distribution of Hypermodified Q-Nucleosides in Mouse Tissues.....	35
3.2	Synthesis and Structure Elucidation of the human tRNA Nucleoside Mannosyl-Queuosine	42
4	UNVERÖFFENTLICHTE ARBEITEN	53
4.1	Untersuchung von Queuin-Derivaten im löslichen Nucleosidpool mittels N ⁹ -methyltem Queuin.....	53
4.1.1	Einleitung	53
4.1.2	Synthese von N ⁹ -methyltem Queuin	54
4.1.3	Untersuchungen zur Glykosylierung von N ⁹ -Methylqueuin im löslichen Nucleosidpool.....	55
4.1.4	Potentielle Verwendung von N ⁹ -Methylqueuin als Inhibitor	57
4.1.5	Zusammenfassung und Ausblick	59
4.1.6	Material und Methoden.....	60
4.1.7	Autorenbeiträge.....	60
4.2	Experimente zur Ermittlung der an der Glykosylierung von Queuosin beteiligten Enzyme mittels eines 6-Thioqueuin-Derivats	61
4.2.1	Einleitung	61
4.2.2	Synthese von 6-Thioqueuin.....	61
4.2.3	Zellbiologische Verfütterung von 6-Thioqueuin an HEK293-Zellen	62
4.2.4	Zusammenfassung und Ausblick	64
4.2.5	Material und Methoden.....	64
4.2.6	Autorenbeiträge.....	64

4.3	Verbesserte stereoselektive Synthese von Mannosyl-Queuosin	65
4.3.1	Einleitung	65
4.3.2	Synthese des Mannosyldonors stereoselektive Glykosylierung	65
4.3.3	Synthese von ManQ aus den Bausteinen.....	66
4.3.4	Zusammenfassung und Ausblick.....	70
4.3.5	Material und Methoden.....	71
4.3.6	Autorenbeiträge.....	71
4.4	Synthese eines Vorläufers für die Herstellung von ¹⁵ N ₃ -markierten Queuin- und Queuosin-Derivaten	71
4.4.1	Einleitung	71
4.4.2	Erster Syntheseversuch des ¹⁵ N ₃ -markierten Nukleosid-Bausteins	72
4.4.3	Synthese des Deazaguanin-Bausteins aus ¹⁵ N ₃ -markiertem Guanidin	74
4.4.4	Zusammenfassung und Ausblick.....	77
4.4.5	Material und Methoden.....	78
4.4.6	Autorenbeiträge.....	79
4.5	Synthese und Strukturaufklärung von natürlichem Glutamyl-Queuosin.....	79
4.5.1	Einleitung	79
4.5.2	Synthese der geschützten Nukleobase	80
4.5.3	Synthese der regioisomeren geschützten α-Glutamyl-Queuosin-Derivate aus den Bausteinen.....	82
4.5.4	Synthese der regioisomeren geschützten γ-Glutamyl-Queuosin-Derivate aus den Bausteinen.....	85
4.5.5	Ergebnisse der LC-MS-Koinjektionsexperimente	87
4.5.6	Zusammenfassung und Ausblick.....	90
4.5.7	Material und Methoden.....	90
4.5.8	Autorenbeiträge.....	91

5	EXPERIMENTELLER TEIL	92
5.1	Material und Methoden chemische Synthese	92
5.2	Synthesevorschriften und Analytik	96
5.2.1	Vorschriften für die Synthese von N ⁹ -Methylqueuin	96
5.2.2	Vorschriften für die Synthese von 6-Thioqueuin	101
5.2.3	Vorschriften für die stereoselektive Synthese von ManQ	106
5.2.4	Vorschriften für die Synthese des ¹⁵ N ₃ -Deazaguanosin-Vorläufers	114
5.2.5	Vorschriften für die Synthese der Regioisomeren GluQ-Derivate	116
6	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	136
7	ANHANG	139
7.1	Supporting Information: Synthesis of Galactosyl-Queuosine and Distribution of Hypermodified Q-Nucleosides in Mouse Tissues	139
7.2	Supporting Information: Synthesis and Structure Elucidation of the human tRNA Nucleoside Mannosyl-Queuosine	189
7.3	NMR-Spektren von Glutamyl-Queuosin-Derivaten und Vorläufern	265
8	LITERATURVERZEICHNIS	302

ZUSAMMENFASSUNG

Ribonukleinsäure (RNA) ist ein zentrales Molekül für die biochemischen Vorgänge in lebenden Zellen und erfüllt vielfältige verschiedene Aufgaben. Hierfür liegen RNA-Moleküle meist chemisch stark modifiziert vor. Es finden sich also zusätzlich zu den kanonischen Nukleosiden weitere, post-transkriptionell modifizierte Basen. Diese Modifikationen üben in der Regel einen entscheidenden Einfluss auf die Funktionalität von RNA-Molekülen aus. Transfer-RNAs (tRNA) sind dabei die am stärksten modifizierten RNAs und insbesondere das Codon-Anticodon-Bindungsverhalten wird wesentlich durch RNA-Modifikationen mitgesteuert. Queuosin (Q) ist eine chemisch stark modifizierte Base, welche sich von Guanosin ableitet und im Anticodon von tRNAs verschiedenster Spezies mit phylogenetisch unterschiedlichem Ursprung auftritt. Hinsichtlich der biologischen Bedeutung von Queuosin wurden insbesondere ein Einfluss auf die Stabilität der tRNA, eine Unterdrückung des Amber-Stop-Codons sowie ein wesentlicher Effekt auf die Möglichkeit zum Ablesen synonymen Codons mittels *Wobble*-Basenpaarung gezeigt. Zusätzlich zu Queuosin existieren auch weitere modifizierte Derivate von Queuosin, deren Funktion bis heute nicht aufgeklärt wurde. Die Modifikationen Galactosyl-Queuosin (GalQ) sowie Mannosyl-Queuosin (ManQ) sind in tRNAs von höheren Eukaryoten zu finden. Die Strukturen beider Modifikationen wurden erstmals 1976 von Nishimura *et al.* mittels NMR-spektroskopischen Studien untersucht. Daraufhin wurde ein Strukturvorschlag für beide Moleküle ermittelt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte zunächst der bestehende Strukturvorschlag von β -homoallyl-GalQ bestätigt werden. Für ManQ konnte hingegen gezeigt werden, dass die bestehende Struktur falsch ist. Hierzu wurden Totalsynthesen für vier verschiedene mögliche Isomere, welche der Struktur von ManQ entsprechen könnten, entwickelt und anschließend die erhaltenen Verbindungen über LC-MS-Koinjektionsstudien mit natürlichem Material verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass die tatsächliche Struktur in zwei wesentlichen Punkten von der bisher postulierten Struktur abweicht und eine andere Regio- und Stereochemie der Mannosyl-Einheit aufweist als bisher angenommen. Das natürliche ManQ weist im Gegensatz zur bisher angenommenen β -homoallyl-Struktur eine α -allyl-Struktur auf. Für GalQ und ManQ konnten zudem die Modifikationslevel in verschiedenen Organen aus Mäusen quantifiziert und so eine organspezifische Verteilungskarte dieser Modifikationen erstellt werden. Für das natürliche α -allyl-ManQ konnte zudem eine verbesserte stereoselektive Synthese entwickelt werden. Zusätzlich zu ManQ und GalQ wurde in dieser Arbeit das in verschiedenen Bakterienspezies auftretende Glutamyl-Queuosin (GluQ) untersucht. Zu dieser Verbindung existieren bisher keine Strukturdaten hinsichtlich der Regiochemie der Glutamyl-Verknüpfung am Cyclopenten-Gerüst. Da aus Literaturdaten ersichtlich ist, dass die Glutamyl-Einheit an eine der beiden Hydroxygruppen des

Cyclopentenrings gebunden vorliegen muss und Glutamat zwei mögliche Carbonsäuren für eine Verknüpfung aufweist, wurden zur Ermittlung der Struktur Totalsynthesen für alle vier aufgrund der literaturbekannten Daten denkbaren Isomere entwickelt. Dabei zeigte sich, dass die Glutamyl-Einheit über die α -Carbonsäure verknüpft ist. Die vorliegenden Esterderivate sind jedoch an der *cis*-Diol-Einheit konfigurationell instabil und unterliegen einer Umlagerung, wodurch GluQ als schnell equilibrierendes Gemisch beider Regioisomere vorliegt. Nachdem die Strukturen aller drei verschiedenen Modifikationen ermittelt werden konnten, wurden weitere Studien zur Untersuchung der Biosynthese sowie zur Methodenentwicklung für eine massenspektrometrische Quantifizierung durchgeführt. Hierzu wurde zunächst die Synthese eines isotopenmarkierten Vorläufers für die Synthese von internen MS-Quantifizierungsstandards untersucht. Dabei konnte ein $^{15}\text{N}_3$ -markierter Vorläufer entwickelt werden, welcher im Weiteren für die Synthese der verschiedenen Queuosin-Derivate verwendet werden kann. Zur Untersuchung der Biosynthese der glykosylierten Queuosin-Derivate ManQ und GalQ wurden Studien mithilfe eines N^9 -methylierten Queuin-Derivats (N^9 -MeQ) durchgeführt. Da die eukaryotische Biosynthese von Queuosin-tRNAs über eine Basenaustauschreaktion verläuft, sollte so der Einbau dieses Testmoleküls in tRNA inhibiert und die Effekte von Queuin im löslichen Nukleosidpool sowie eine mögliche Glykosylierung von Queuin vor Einbau in die tRNA untersucht werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass N^9 -MeQ einen inhibitorischen Effekt auf den Einbau von Queuin in tRNA aufweist, eine mögliche Glykosylierung der Base im löslichen Nukleosidpool erscheint jedoch aus der erhaltenen Datenlage unwahrscheinlich. Zur weiteren Ermittlung der an der Glykosylierung beteiligten Enzyme wurde die Synthese eines 6-thiosubstituierten Queuin-Derivats entwickelt, welches als Photocrosslinker agieren sollte. Dieses wurde in ersten Vorversuchen für die Eignung in biologischen Verfütterungsexperimenten untersucht. Insgesamt wurden im Rahmen dieser Arbeit die Strukturen von GalQ, ManQ und GluQ aufgeklärt, sowie chemische Totalsynthesen für diese Queuosin-Derivate entwickelt. Weitere Untersuchungen zur Funktion und Biosynthese dieser Modifikationen konnten mithilfe verschiedener synthetischer Testmoleküle durchgeführt werden und legen die Grundlage für weitere Studien zur Ermittlung der Bedeutung dieser chemisch anspruchsvollen Hypermodifikationen in biologischen Systemen.

SUMMARY

Ribonucleic acid (RNA) is a central molecule for biochemical processes in living cells and fulfills many different tasks. For this purpose, RNA molecules are usually highly chemically modified, and in addition to the canonical nucleosides, further post-transcriptionally modified bases are found. These modifications usually exert a decisive influence on the functionality of RNA molecules. Transfer RNAs (tRNA) are usually the most modified RNAs and in particular the codon-anticodon binding behavior is significantly controlled by RNA modifications. Queuosine (Q) is a chemically highly modified base, which is derived from guanosine and occurs in the anticodon of tRNAs of a wide variety of species with phylogenetically diverse origins. With regard to the biological significance of queuosine, in particular an influence on the stability of the tRNA, a suppression of the amber stop codon as well as a significant effect on the possibility to read synonymous codons by means of wobble base pairing have been shown. In addition to queuosine, other modified derivatives of queuosine exist whose function has not yet been elucidated. The modifications galactosyl-queuosine (galQ) as well as mannosyl-queuosine (manQ) are found in tRNAs of higher eucaryotes. The structures of both modifications were first investigated by NMR spectroscopic studies in 1979 by Nishimura *et al.* Based on this, a structure for both molecules was proposed. In the present work, the existing structural proposal of β -homoallyl-galQ could be confirmed. For manQ, on the other hand, it could be shown that the existing proposed structure is incorrect. For this purpose, total syntheses for four different possible isomers, which could correspond to the structure of manQ, were developed and subsequently the obtained compounds were compared to the natural occurring manQ via LC-MS co-injection studies. It was shown that the actual structure differs in two major aspects from the previously postulated structure and exhibits a different regiochemistry and stereochemistry of the mannosyl unit than previously assumed. In contrast to the previously assumed β -homoallyl-structure, an α -allyl-structure was identified to be present in natural occurring manQ. For galQ and manQ, it was also possible to quantify the modification levels in different organs from mice, thus providing an organ-specific distribution map of these modifications. For the natural α -allyl-manQ, an improved stereoselective synthesis was also developed. In addition to manQ and galQ, glutamyl-queuosin (gluQ), a modification occurring in various bacteria, was investigated in this work. Since it is evident from literature data that the glutamyl moiety must be attached to one of the two hydroxyl groups of the cyclopentene ring and glutamate has two possible carboxylic acids for linkage, total syntheses were developed for all four conceivable isomers based on the literature data to determine the structure. This revealed that the glutamyl moiety is linked via the α -carboxylic acid. However, the present ester derivatives are configurationally unstable at the *cis*-diol unit

and are subject to rearrangement, resulting in gluQ existing as a rapidly equilibrating mixture of both regioisomers. After the structures of all three different modifications could be determined, further studies were carried out to investigate the biosynthesis as well as to develop methods for mass spectrometric quantification. To this end, the synthesis of an isotopically labeled precursor for the synthesis of internal MS quantification standards was investigated. This led to the development of a $^{15}\text{N}_3$ -labeled precursor, which can be further used for the synthesis of the various queuosine derivatives. To investigate the biosynthesis of the glycosylated queuosine derivatives manQ and galQ, studies were performed using an N^9 -methylated queuine derivative (N^9 -MeQ). Since the eukaryotic biosynthesis of queuosin tRNAs proceeds via a base exchange reaction, this was done to inhibit the incorporation of this test molecule into tRNA and to investigate the effects of queuine in the soluble nucleoside pool as well as possible glycosylation of queuine prior to incorporation into tRNA. It was shown that N^9 -MeQ has an inhibitory effect on the incorporation of queuine into tRNA. A possible glycosylation of the base in the soluble nucleoside pool seems unlikely from the data obtained. To further determine the enzymes involved in glycosylation, the synthesis of a 6-thiosubstituted queuine derivative was developed to act as a photocrosslinker. This derivative was investigated in preliminary biological feeding experiments. Overall, in this work the structures of galQ, manQ and gluQ were elucidated and the total syntheses for these queuosine derivatives were developed. Further studies on the function and biosynthesis of these modifications could be performed using various synthetic test molecules, which may lay the foundation for further studies to determine the importance of these chemically challenging hypermodifications in biological systems.

1 EINLEITUNG

1.1 RNA-Modifikationen

Ribonukleinsäure (RNA) ist ein zentrales Molekül in der Biochemie aller lebender Zellen. Wie bereits 1958 von Francis Crick im zentralen Dogma des Lebens postuliert,^[1-2] verbindet *messenger* RNA (mRNA) mittels seiner Funktion als Informationsüberträger Genotyp und Phänotyp jeder einzelnen Zelle miteinander.^[3] Obwohl mRNA insbesondere im Rahmen der Corona-Pandemie und im Zusammenhang mit den auf mRNA-Technologie basierenden Impfstoffen von Pfizer und Moderna in den letzten Jahren im Besonderen öffentliche Aufmerksamkeit erfahren hat,^[4-6] dient RNA nicht nur als Templat für die Proteinbiosynthese, sondern weist daneben auch eine Vielzahl anderer bedeutender biologischer Funktionen auf. Insbesondere die inzwischen an mehreren Beispielen gezeigte katalytische Aktivität von RNA,^[7-11] die auch die ribosomale RNA (rRNA) im Rahmen der Proteinbiosynthese umfasst,^[12] ist hierbei von großem Interesse. So könnte etwa am Anfang der Entstehung von Leben RNA gestanden haben, da dieses Molekül genotypische (Informationsspeicherung) und phänotypische (Katalyse) Eigenschaften miteinander vereinen kann.^[13-14] In dieser Hinsicht sind auch *transfer*-RNAs (tRNAs) bemerkenswert. Diese stellen die Schnittstelle zwischen der codierenden mRNA und der die Translation mitkatalysierenden rRNA im Ribosom dar. tRNAs erkennen spezifisch den aus Basentriplets bestehenden genetischen Code und übersetzen diesen in die Aminosäuresequenz von Proteinen im Rahmen der Translation.^[15] Neben mRNA, rRNA und tRNA existieren auch noch andere RNA-Typen, welche wichtige biologische Funktionen übernehmen. Kleine RNAs wie microRNAs oder siRNAs spielen etwa eine bedeutende Rolle im zellulären *host defence system* zur Abwehr von Fremd-DNA und -RNA, wie sie etwa von Viren in Wirtszellen eingeführt wird.^[16-18] Daneben wurde in den letzten Jahren auch immer mehr die biologische Bedeutung von sogenannten *long non-coding* RNAs (lncRNA) aufgedeckt, welche an der Regulation der Genexpression beteiligt sind.^[19-20] So können diese etwa die Expression an der DANN von Genen inhibieren^[21] oder über Histonrekrutierung indirekt zur Kontrolle der Genexpression beitragen.^[22] Die hier genannten verschiedenen Hauptklassen der bis heute bekannten RNAs und ihre Funktionen sind in Abbildung 1.1 dargestellt. Um diese Vielzahl von Funktionen erfüllen zu können, existieren neben den vier kanonischen RNA-Nukleosiden Adenosin (A, **1**), Guanosin (G, **2**), Uridin (U, **3**) und Cytidin (C, **4**) in RNA auch eine große Anzahl chemisch modifizierter Basen. Insgesamt sind bis heute über 170 verschiedene modifizierte RNA-Nukleoside bekannt, wobei die Modifikationen von einfachen Methylierungen bis hin zu deutlich komplexeren Funktionalisierungen reichen und einen großen chemisch-funktionellen Bereich umfassen.^[23]

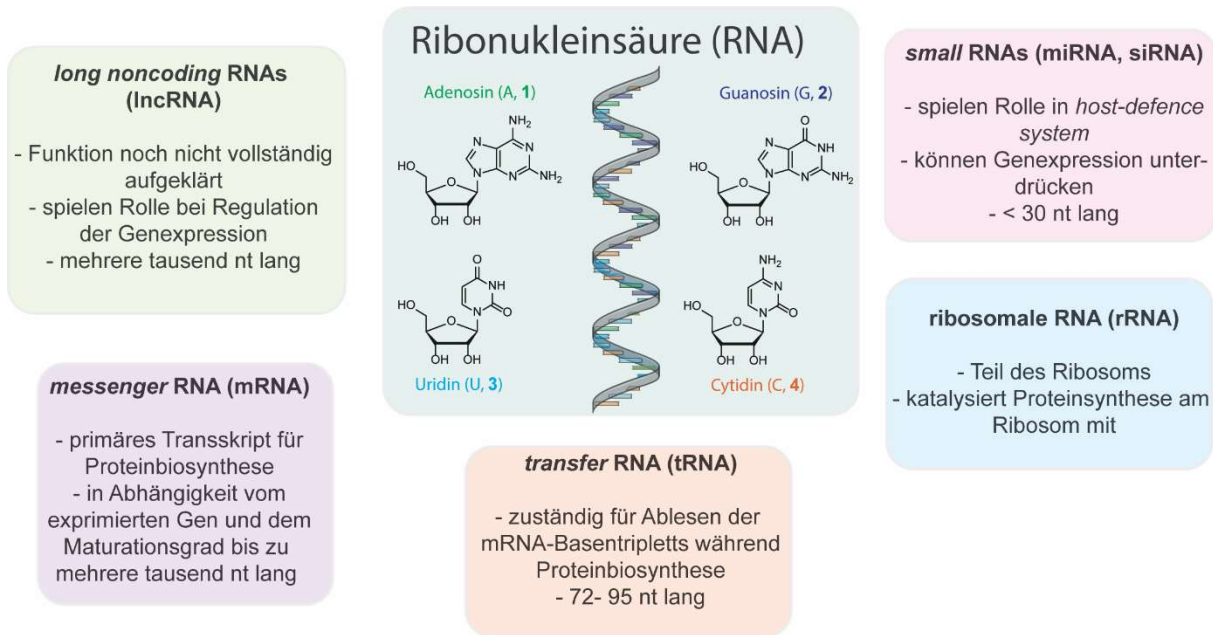


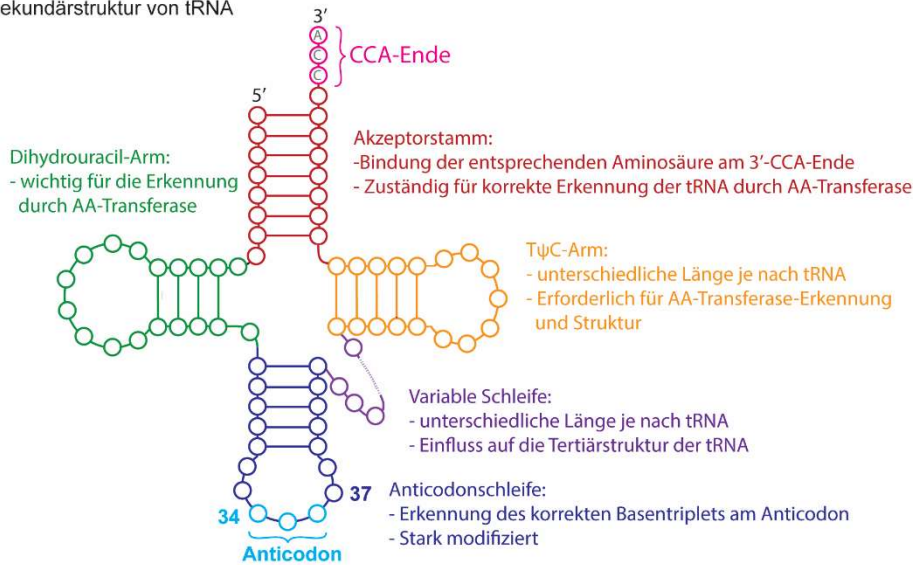
Abbildung 1.1: Ribonukleinsäure (RNA) besteht aus den vier kanonischen Nucleosiden Adenosin 1, Guanosin 2, Uridin 3 und Cytidin 4 und lässt sich in mehrere Hauptklassen untergliedern. Transfer RNA (tRNA) und ribosomale RNA (rRNA) spielen eine wichtige Rolle bei der Proteinbiosynthese und sind in der Regel stark modifiziert.

Betrachtet man die Anzahl von Modifikationen pro RNA sowie die Variabilität an Modifikationen, weisen die beiden an der Translation beteiligten RNAs rRNA und tRNA einen besonders hohen Modifizierungsgrad auf.^[24-27] Im Folgenden wird die Bedeutung dieser Modifikationen für die Funktion und Struktur von tRNA näher erläutert.

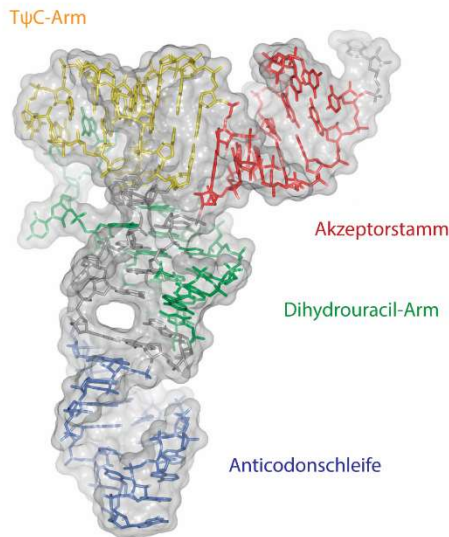
1.2 Einfluss von RNA-Modifikationen auf Struktur und Funktion von tRNA

Eine typische tRNA besteht in der Regel aus 72-95 Nucleosiden und weist eine klebattähnliche Sekundärstruktur auf, welche eine L-förmige Tertiärstruktur ausbildet.^[28-30] Funktionale tRNAs sind in mehrere Abschnitte gegliedert, wie im Folgenden näher erläutert und in Abbildung 1.2 dargestellt wird. Das 3'-Ende oder CCA-Ende ist für die Beladung der tRNA mit der jeweiligen spezifischen Aminosäure verantwortlich. Hierbei wird die Aminosäure durch die jeweilige Aminoacyl-tRNA-synthetase (AaRS) über eine Esterbindung an der 3'-Hydroxygruppe des terminalen Adenosinrests verknüpft.^[31] Der Akzeptorstamm liegt in der Nähe des CCA-Endes. Er ist für die korrekte Erkennung und Beladung der tRNA mit der entsprechenden Aminosäure durch die AaRS zuständig.^[32-33]

a) 2D-Sekundärstruktur von tRNA



b) 3D-Tertiärstruktur von tRNA am Beispiel von E.Coli tRNA^{Phe}



c) RNA-Modifikationen an bestimmten Stellen der tRNA

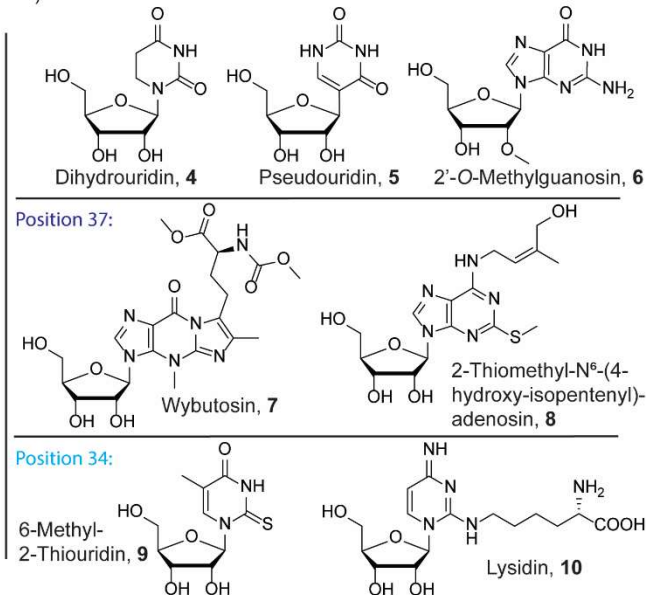


Abbildung 1.2: Struktur von tRNA sowie darin auftretende Modifikationen; a) tRNA weist eine kleeblattförmige 2-D-Struktur auf, welche sich strukturell in fünf verschiedene Abschnitte gliedern lässt. Der Akzeptorstamm ist für die korrekte Erkennung der tRNA durch die entsprechende AaRS notwendig, wobei die Aminosäure an das 3'-CCA-Ende über eine Esterbindung gebunden wird. Der Dihydrouracilarm sowie der TψC-Arm sind zusätzlich für die korrekte Interaktion mit der AaRS sowie für die Tertiärstruktur der tRNA erforderlich. Der variable Arm besteht je nach tRNA aus unterschiedlich vielen Nukleotiden, wobei dieser ebenfalls für die Tertiärstruktur der tRNA essentiell ist. Am Anticodonarm mit der Anticodonschleife findet die Erkennung des mRNA-Basentriplets statt. b) Wie hier am Beispiel von tRNA^{Phe} von E.Coli gezeigt besitzt tRNA eine L-förmige Tertiärstruktur (Abbildung modifiziert nach Byrne *et al.*)^[34] c) Verschiedene RNA-Modifikationen, die in tRNA auftreten sowie im Speziellen Beispiele für die im Bereich des Anticodons an Position 34 und 37 auftretenden Modifikationen.

Während andere Strukturelemente wie D-loop^[35-36], TψC-loop^[37] und der *variable loop* hauptsächlich für die Struktur der tRNA oder ebenfalls für die Erkennung durch die AaRS

mitverantwortlich sind, bildet die von den Positionen 32-38 sieben Nucleoside umfassende Anticodonschleife die Grundlage für die spezifische Erkennung der mRNA-Basentriplets, wobei Positionen 34-36 der tRNA das Anticodon selbst bilden.^[38-40] Speziell in diesem Bereich der tRNA finden sich vielfältige Modifikationen, welche nicht nur strukturelle Änderungen der tRNA bewirken, sondern auch in vielen Fällen bedeutende Auswirkungen auf das Codon-Anticodon-Bindungsverhalten ausüben. Hierbei sind besonders Modifikationen an den Positionen 34, der letzten Stelle des Anticodons, sowie der Position 37, benachbart zum Anticodon, hervorzuheben.^[41-42] Im Folgenden werden der Einfluss dieser Modifikationen auf das Bindungsverhalten von tRNAs sowie die daraus resultierenden biologischen Konsequenzen näher erläutert.

1.2.1 Modifikationen außerhalb des Anticodons

Wie bereits erwähnt weist tRNA mit im Durchschnitt 10-15% modifizierter Basen pro unmodifizierter Base eine extrem hohe Modifikationsdichte verglichen mit anderen RNAs auf.^[43-44] Modifikationen ausserhalb des Anticodons übernehmen dabei vornehmlich die Aufgabe, die Ausbildung der korrekten Tertiärstruktur zu unterstützen, sowie die Erkennung durch die Aminoacyltransferase zu erleichtern. Sie spielen auch eine Rolle für die Stabilität der tRNAs.^[45] Hierbei finden sich oft Methylierungen an den Basen, welche wesentlich die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen mit anderen Basen beeinflussen können. Einen besonders gut untersuchten Fall stellt die Modifikation 1-Methyladenosin (m^1A , **12**) an Position 9 von menschlicher mitochondrialer tRNA^{Lys} dar. An diesem Beispiel konnte gezeigt werden, dass das Nucleosid m^1A entscheidend für die korrekte Faltung der tRNA-Kleeblattstruktur ist.^[45-48] Ein ähnlicher die 3-D-Struktur stabilisierender Effekt konnte etwa beispielsweise in *E. Coli* durch eine Wechselwirkung zwischen 2'-O-Methylguanosin (Gm, **13**) und Pseudouridin (ψ , **14**) in tRNA gezeigt werden.^[49] Eine Übersicht verschiedener Modifikationen im Bereich des tRNA-Stamms sind in Abbildung 1.3 dargestellt.

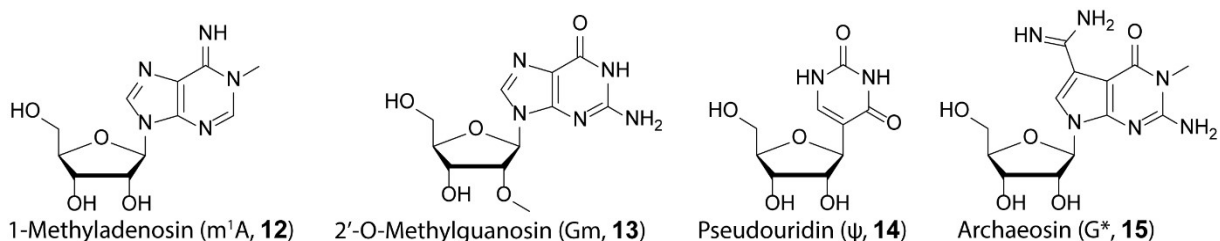


Abbildung 1.3: RNA-Modifikationen, die ausserhalb des Anticodons in tRNA auftreten.

Eine im Kontext dieser Arbeit interessante Modifikation stellt Archaeosin (G^* , **15**) dar, welches an Position 15 in tRNA von Archaeen auftritt.^[50-51] Dieses Nucleosid stellt eine Deazaguanosinmodifikation dar, welche zur Stabilisierung der Tertiärstruktur der tRNA durch

Ausbildung einer Tripletsstruktur beiträgt.^[52-54] Obwohl Modifikationen außerhalb des Anticodons häufig sind, treten die am stärksten hypermodifizierten Nukleoside an den Positionen 34 und 37 in der Anticodonschleife auf.^[55] Die Funktion dieser epigenetischen modifizierten RNA-Nukleoside wird im Folgenden näher erläutert.

1.2.2 Modifikationen an Position 37 benachbart zum Anticodon

Im Verlauf der Translation kann es durch falsches Ablesen der mRNA zu verschiedenen Fehlern kommen. Falsches Ablesen einer einzelnen Base des Codontripletts führt zu sogenannten *mismatch*-Fehlern. Dabei wird im naszierenden Protein eine falsche Aminosäure eingebaut. Diese Fehler treten relativ häufig auf, haben aber in der Regel nur wenig Einfluss auf die Funktion der fertigen Proteine. *Frameshift*-Fehler sind hingegen deutlich folgenreicher, da hierbei aufgrund einer Verschiebung der mRNA am Ribosom eine Verschiebung des Leserasters stattfindet (siehe Abbildung 1.4).^[56-58]

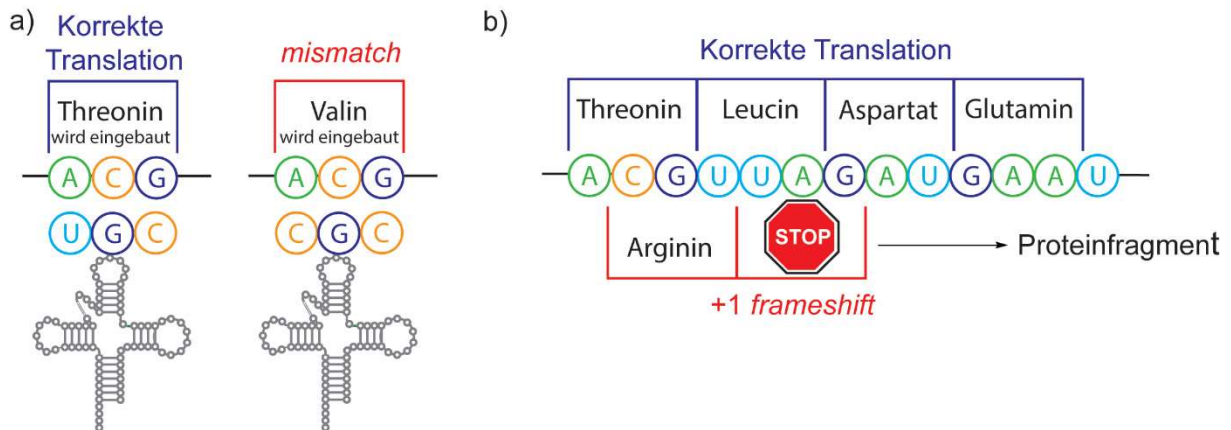


Abbildung 1.4: Bei der Translation können *mismatch*- und *frameshift*-Fehler auftreten; a) *mismatch*-Fehler entstehen durch die inkorrekte Erkennung des Basentripletts durch eine ähnliche tRNA und können zum Einbau einer falschen Aminosäure in das Protein führen; b) *frameshift*-Fehler entstehen durch Verschiebung des Leserasters am Ribosom und führen zu unterschiedlichen Proteinen bzw. Proteinfragmenten im Falle des Antreffens eines Stopp-Codons im neuen Leseraster.

Dies führt in der Regel zu vollkommen unterschiedlichen Proteinen, als in der mRNA eigentlich codiert oder es entstehen Proteinfragmente, wenn etwa ein Stoppcodon im Leseraster auftritt. Modifikationen an Position 37 spielen meist eine entscheidende Rolle in der Unterdrückung solcher *frameshifting*-Fehler. Diese Funktion ist beispielhaft etwa für die Modifikationen 1-Methylguanosin (m^1G), 2-Thiomethyl-6-(2-hydroxyisopentenyl)-adenosin (ms^2io^6A) oder auch Wybutosin (yW) belegt worden.^[59-61] Obwohl die Funktionen von RNA-Modifikationen an Position 37 vielfältig sind, wurden insbesondere auch Effekte hinsichtlich der Unterdrückung von *mismatch*-Fehlern sowie ein Einfluss auf die Translationsgeschwindigkeit beobachtet.^[62-63] Insgesamt scheinen Modifikationen an der dem Anticodon benachbarten Position 37 einen entscheidenden Einfluss auf die korrekte Durchführung der Translation aufzuweisen.

1.2.3 Modifikationen an Position 34 („*Wobble-Position*“) des Anticodons

Modifikationen an Position 34 kommt, neben der Funktion der Unterdrückung des *frameshiftings*,^[64] auch eine weitere bedeutende Rolle zu. Diese auch als „*Wobble-Position*“ bezeichnete Stelle in der tRNA dient unter Anderem dazu, nicht-kanonische *Wobble*-Basenpaarung zwischen dem Anticodon der tRNA und verschiedenen synonymen Codons zu ermöglichen.^[65] Synonyme Codons entstehen aus der Degeneriertheit des genetischen Codes. Obwohl theoretisch, abzüglich von drei Stop-Codons, 61 verschiedene Codons existieren, stehen dem nur 20 verschiedene kanonische Aminosäuren gegenüber. Daraus ergibt sich, dass eine Aminosäure in der Regel von mehreren Codons codiert werden kann, welche man als synonyme Codons bezeichnet.^[66-68] Zur Translation aller 61 Codons müsste die Zelle jedoch, wenn nur strenge Watson-Crick-Basenpaarung möglich wäre, 61 verschiedene tRNAs bereitstellen. Durch die alternative *Wobble*-Basenpaarung wird das Ablesen verschiedener Codons durch dieselbe tRNA ermöglicht, welche sich in der ersten Anticodon-Stelle unterscheidet. Diese zuerst von Crick postulierte „*Wobble-Hypothese*“^[69] wurde inzwischen anhand zahlreicher Beispiele belegt und erweitert.^[70-74] Durch verschiedene Affinitäten der tRNA zu unterschiedlichen, synonymen Codons ergibt sich auch der sogenannte *codon bias*, welcher eine wesentliche Rolle in der Regulation der Translation spielt.^[75-76] Insgesamt ist jedoch die Funktion von Modifikationen an Position 34 extrem vielfältig. Speziell Hypermodifikationen, die in diesem Bereich auftreten, haben oft viele verschiedene Funktionen, welche bis heute noch nicht komplett erforscht sind. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Derivate der RNA-Hypermodifikation Queuosin untersucht, auf welches im Folgenden näher eingegangen wird.

1.3 Queuosin – Struktur und Funktion

1.3.1 Struktur und Einbau von Queuosin

Queuosin (Q, **16**) tritt an Position 34, der *Wobble* Position von tRNA auf und ersetzt Guanosin in GUN-Anticodons. Insofern liegen die tRNAs von Histidin, Tyrosin, Aspartat und Asparagin mit Queuosin modifiziert vor.^[77-78]

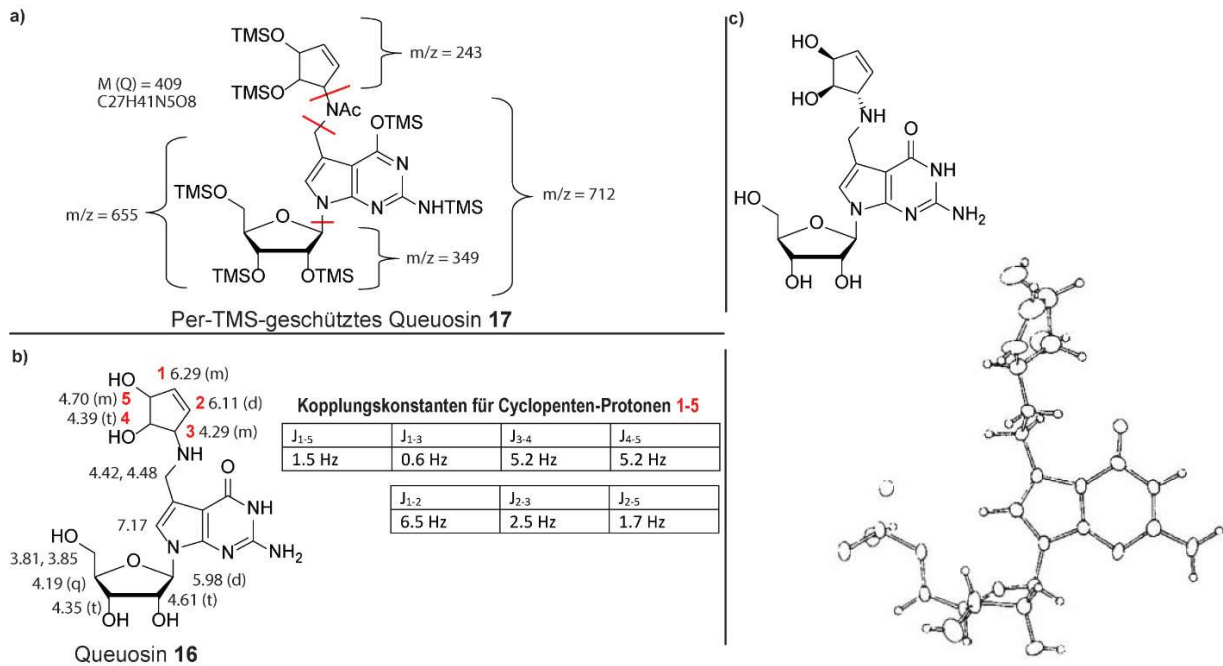


Abbildung 1.5: Analytische Daten, welche zur Strukturaufklärung von Queuosin herangezogen wurden; **a)** Massenspektrometrische Daten zu Zerfallsprodukten des Per-TMS-geschützten Queuosin-Derivats **17**; **b)** Chemische Verschiebungen der Protonen von Queuosin im NMR-Spektrum zusammen mit Kopplungskonstanten der Protonen des Cyclopentenrings (a und b nach Kasai *et al.*)^[79]; **c)** Die Struktur von Queuosin zusammen mit der Kristallstruktur von Queuosin-5'-Monophosphat (nach Yokoyama *et al.*)^[80]

Nach der erstmaligen Entdeckung von Queuosin 1968/69 in *E. Coli* tRNA^[77, 81-83] war allerdings zunächst die Struktur dieses außergewöhnlichen Nukleosids unklar. Diese konnte erst 1975 durch eine Zusammenarbeit mehrerer verschiedener Gruppen unter außerordentlichem Aufwand aufgeklärt werden (siehe Abbildung 1.5)^[79] Dazu wurden mehrere 100 g tRNA aus *E. Coli* isoliert, enzymatisch verdaut und aufgereinigt. So konnten insgesamt 20 mg Queuosin gewonnen werden, welches massenspektrometrisch und NMR-spektroskopisch untersucht wurde. Insbesondere die genaue Stereochemie des Cyclopentenrings war dabei schwierig zu klären, da bekannt war, dass Kopplungskonstanten bei Cyclopentanderivaten in der Regel nicht eindeutig Aufschluss über die genaue Konformation geben. Die zuerst postulierte Struktur konnte später durch Röntgenstrukturanalyse von kristallisiertem Queuosin-5'-monophosphat sowie durch Vergleich mit totalsynthetisch hergestelltem Queuosin-Standard bestätigt werden, wobei auch die absolute Stereochemie von Queuosin geklärt werden konnte.^[80, 84-86] Obwohl Queuosin sowohl in Prokaryoten als auch in Eukaryoten auftritt, verwenden beide unterschiedliche Quellen für Queuosin. Während Prokaryoten in der Lage sind, Queuosin *de novo* biosynthetisch herzustellen (siehe Kapitel 1.4), sind Eukaryoten auf die Aufnahme von Queuin (**18**) aus prokaryotischen Quellen (Nahrung, Darmflora) angewiesen.^[87-90]

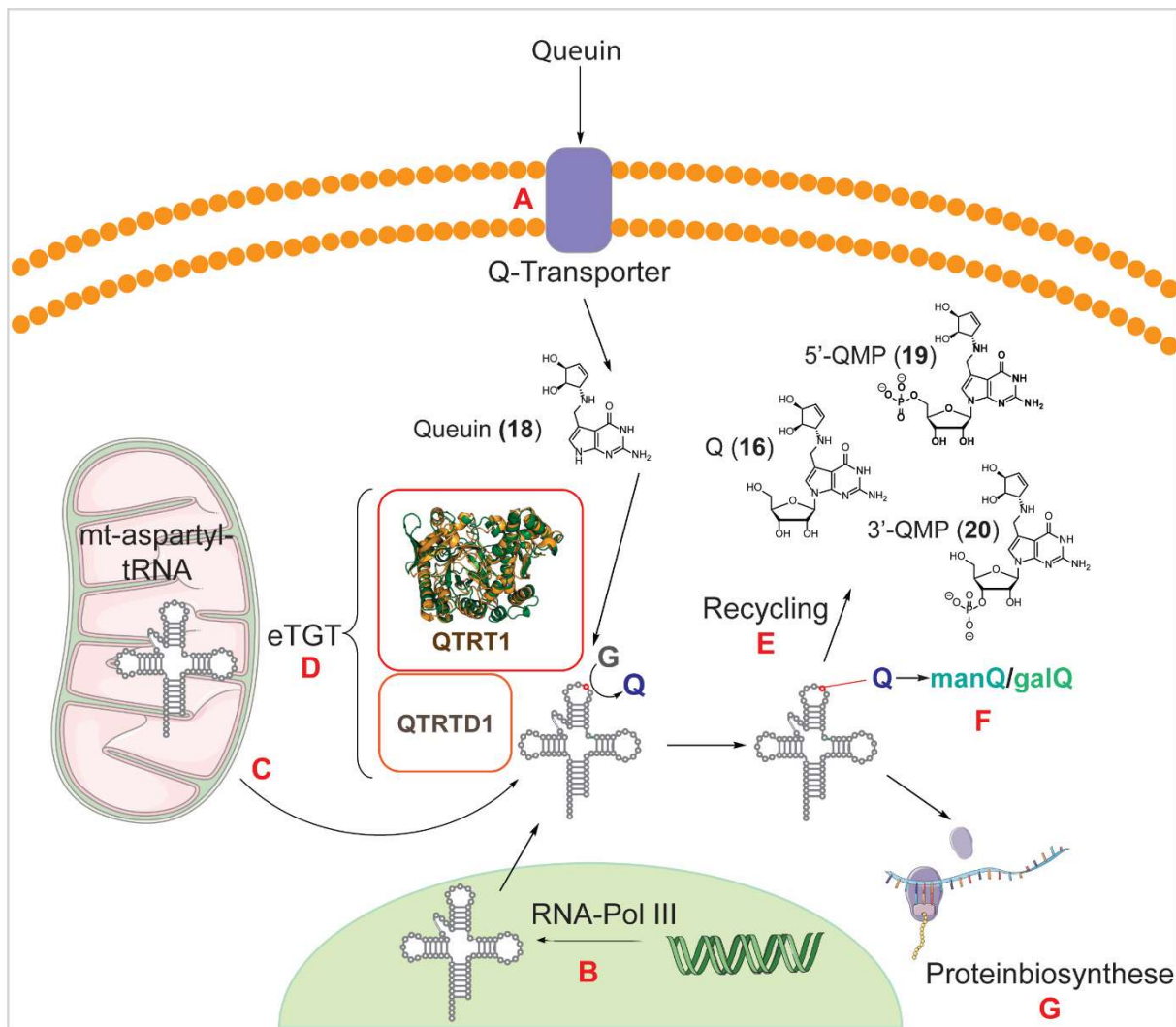


Abbildung 1.6: Aufnahme und Verwertung von Queuin in eukaryotischen Zellen (Abbildung reproduziert nach Fergus *et al.*)^[87]; **A:** Die Aufnahme von Queuin in die Zelle findet über einen bisher nicht identifizierten Transporter in der Zellmembran statt. **B** und **C:** Sowohl mitochondriale als auch cytosolische tRNA wird mit Queuosin modifiziert; im Zellkern wird die tRNA zunächst durch RNA-Polymerase III transkribiert, während in Mitochondrien eine spezielle mitochondriale RNA-Polymerase für die tRNA-Transkription zuständig ist. **D:** Der Einbau von Queuin in tRNA erfolgt durch das Enzym eTGT welches aus den zwei Untereinheiten QTRT1 und QTRTD1 besteht. Für QTRT1 wurde eine Kristallstruktur veröffentlicht (Abbildung nach Johannsson *et al.*)^[91] **E:** Queuosin wird aus tRNA recycelt; die genaue Quelle (Queuosin Q, Queuosin-3'-phosphat 3'-QMP oder Queuosin-5'-phosphat 5'-QMP) ist bisher nicht eindeutig geklärt. **F:** Queuosin in Queuosin-modifizierter tRNA wird durch bisher unbekannte Enzyme weiter zu Mannosyl-Queuosine (ManQ, in tRNA^{Asp}) bzw. Galactosyl-Queuosine (GalQ, in tRNA^{Tyr}) modifiziert. **G:** Q-modifizierte tRNA übt einen starken Einfluss auf die Translation in der Proteinbiosynthese aus.

Das in Eukaryoten für den Einbau von Queuin in tRNA verantwortliche Enzym eTGT verwendet interessanterweise die Base Queuin als Substrat, wobei eine direkte Basenaustauschreaktion mit Guanin an Position 34 der tRNA erfolgt.^[92-93] Dabei erfolgt diese Austauschreaktion relativ unspezifisch für Guanin-Derivate. Das Enzym kann etwa auch Guanin gegen Guanin austauschen, wie anhand von Experimenten mit isotonenmarkiertem Guanin gezeigt werden konnte.^[94] Interessanterweise kann jedoch einmal eingebautes Queuin nicht mehr durch die

TGT entfernt werden. Dabei scheint die 7-Deazamodifikation eine Rolle zu spielen, da auch eine Reihe anderer 7-Deazaguaninmodifikationen irreversibel in die tRNA eingebaut werden können.^[95] Der genaue Mechanismus der Wiederverwertung von Queuin in Eukaryoten sowie die entsprechende Quelle sind bisher noch nicht vollständig geklärt. Verschiedene Experimente legen nahe, dass Queuin durch Enzyme der DUF2419-Familie aus Queuosin, Queuosin-5'-phosphat (**19**) oder Queuosin-3'-phosphat (**20**) wiederverwertet wird.^[96-99] Die Aufnahme von Queuin in eukaryotische Zellen erfolgt über bisher nicht identifizierte Transportermoleküle. Diese weisen zwei verschiedene K_M -Werte für die Aufnahme von Queuin auf, wobei einer eine schnelle Aufnahme bei relativ kleinen Konzentrationen ermöglicht, während der andere eine langsamere Aufnahme bei höheren Konzentrationen bewirkt.^[87, 100-101]

Insgesamt ist so die Aufnahme von Queuin selbst bei relativ geringen Konzentrationen möglich. Der Zellmetabolismus von Queuin ist in Abbildung 1.6 zusammengefasst. Queuosin erfüllt nach seiner Aufnahme innerhalb der Zelle verschiedenste biologische Funktionen, von denen einige, die bis heute bekannt sind, im Folgenden vorgestellt werden.

1.3.2 Biologische Funktion von Queuosin

Aufgrund seiner Lage an der *Wobble*-Position des Anticodons von tRNA ist es nicht überraschend, dass Queuosin eine große Rolle für die Erkennung synonymen Codons mittels *Wobble*-Basenpaarung ausübt. Es konnte etwa gezeigt werden, dass Queuosin-modifizierte tRNA, welche ein QUN- anstatt eines GUN-Anticodons aufweist (Q: Queuosin, N: A, C, G oder U), deutlich effizienter das nicht-Watson-Crick Codon NAU decodieren kann.^[102] Die Größe dieses Effektes ist jedoch stark vom untersuchten Modellorganismus abhängig. Im Fall von *S. Pombe* konnte so eine Umkehr der Präferenz hin zu einer stärkeren Bevorzugung von NAC-Codons beobachtet werden.^[103] Insgesamt scheint Queuosin einen Einfluss auf die Geschwindigkeit der Translation auszuüben, die genaue Natur dieses Effekts bleibt jedoch bis heute umstritten.^[104]

Das Amber-Stopp-Codon UAG kann von tRNA^{Tyr} als Tyrosin-Codon gelesen werden, da diese an Position 35 des Anticodons ein Pseudouridin tragen. Queuosin-Modifikation an Position 34 dieser tRNAs unterdrückt dieses *misreading*. Dies ist vermutlich auf eine Stabilisierung der Codon-Konformation durch den Cyclopentendiolrest des Queuosins zurückzuführen. So bewirkt Queuosin eine Unterdrückung dieses Fehlablesens des Stopp-Codons, welches in unmodifizierter tRNA^{Tyr} nicht auftritt.^[105-108]

Queuosin und seine Derivate haben weiterhin einen variierenden Einfluss auf die Stabilität der modifizierten tRNAs. So konnte im Modellorganismus *Dictyostelium discoideum* gezeigt werden, dass nach Hemmung der RNA-Synthese durch Actinomycin die tRNAs^{Asn,His} partiell degradiert werden, während die tRNAs^{Asp,Tyr} stabil bleiben.^[108-109]

Queuosinmangel weist einen erheblichen Einfluss auf die Tyrosinbiosynthese auf, wie anhand von Studien in keimfreien Mäusen gezeigt werden konnte. Wurden keimfreie Mäuse einer Queuin- und Tyrosin-freien Diät ausgesetzt, führte dies zum Tod der Versuchstiere.^[88, 110] Dies scheint auf eine Inhibition der Umsetzung von Phenylalanin zu Tyrosin zurückzuführen sein. Für die Synthese von Tyrosin aus Phenylalanin spielt der Kofaktor Tetrahydrobiopterin (BH₄) eine wesentliche Rolle.^[111] Bei Q-Mangel wurden deutlich erniedrigte BH₄-Level beobachtet, wodurch die Tyrosinbiosynthese stark eingeschränkt wird.^[112]

Interessanterweise konnte auch ein Zusammenhang zwischen Queuosin und anderen Modifikationen gezeigt werden. tRNA^{Asp} ist an Position 38 mit 5-Methylcytidin (m⁵C) modifiziert, welches durch die Methyltransferase Dnmt2 eingeführt wird.^[113] Der Modifikationsgrad hängt dabei stark vom Queuosin-Level ab und sinkt proportional zum Queuosin-Gehalt.^[114] Dabei wurde *in vitro* gezeigt, dass bereits das Nukleosid Queuosin einen direkten Einfluss auf die Aktivität der Dnmt2 aufweist.^[115] m⁵C bewirkt eine höhere Resilienz der tRNA^{Asp} gegen stressinduzierten Abbau und ein Fehlen dieser Modifikation wirkt sich direkt auf die beobachteten Level an tRNA^{Asp} in Zellen aus.^[108, 116-117] Interessanterweise konnte von Micura *et al.* gezeigt werden, dass ein an O⁶-methyliertes, mit Queuosin verwandtes preQ₁-Derivat eine direkte Methylierung von Cytosin in RNA durchführen kann. Dies könnte darauf hinweisen, dass ein gegenseitiger Einfluss von methylierten Cytidinderivaten und Queuosinderivaten evolutionshistorisch möglicherweise sehr alt ist.^[118] Zusätzlich konnte auch eine Wechselwirkung zwischen dem Fehlen von Queuosin und der Modifikation 2'-O-Methylguanosin (Gm) in tRNA^{His} und tRNA^{Tyr} beobachtet werden, wobei niedrigere Q-Level einen Anstieg von Gm bewirkten.^[104]

Die bisher bekannten biologischen Effekte von Queuosin sind insgesamt sehr vielfältig und unterstreichen die biologische Relevanz dieser RNA-Modifikation. Da Queuosin auch in menschlichen Zellen auftritt,^[119] ist insbesondere die Frage interessant, welchen Einfluss variierende Queuosin-Level auf die humane Physiologie aufweisen. Dieser Aspekt wird im Folgenden zusammen mit einer potentiellen Verwendung von Queuosin-Derivaten zur Behandlung verschiedener Erkrankungen näher beleuchtet.

1.3.3 Potenzielle medizinische Bedeutung von Queuosin

In den letzten Jahren wurde die mögliche Verwendung von Queuin sowie des TGT-Einbauwegs von Deazaguaninmodifikationen hinsichtlich einer möglichen medizinischen Bedeutung untersucht. Für Queuin konnte festgestellt werden, dass eine Fütterung an Mäuse eine neuroprotektive Wirkung aufweist^[120] und Queuin somit als Wirkstoff gegen neurodegenerative Erkrankungen wie *Morbus Alzheimer* oder *Morbus Parkinson* (PD) eingesetzt werden könnte. Verschiedene biologische Effekte, wie etwa eine stressinduzierte Aktivierung der *unfolded protein response* (UPR)^[121-123] oder stark schwankende Level an L-Dopamin (L-DOPA)^[124], sind Teil der typischen Ätiologie dieser Erkrankungen. Die *unfolded protein response* ist ein zellulärer Mechanismus, welcher in gesunden Zellen zur Wiederherstellung der Zellfunktionalität im Falle der Akkumulation ungefalteter bzw. inkorrekt gefalteter Proteine auftritt^[125-126], im Falle von PD etwa jedoch stark überaktiviert ist, was zur Apoptose der erkrankten Zellen führt.^[120] Beide Effekte, eine stressinduzierte Aktivierung der UPR sowie eine Reduktion an L-DOPA-Leveln durch Inhibition der Tyrosinbiosynthese (s. Kap. 1.3.2), wurden auch bei mangelnder Queuinaufnahme beobachtet.^[102, 127] Queuin und verschiedene Derivate von Queuin werden in diesem Zusammenhang zur Zeit hinsichtlich einer potentiellen medizinischen Applikation gegen *Morbus Alzheimer* und *Morbus Parkinson* untersucht.^[120]

Im Hinblick auf weitere, nicht-natürliche Deazaguanin-Modifikationen, welche durch die TGT in die tRNA eingebaut werden könnten und so einen Einfluss auf das Codon-Anticodon-Bindungsverhalten ausüben könnten, wurden von Fergus *et al.* die Synthese sowie der Einbau verschiedenster Deazaguaninderivate untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Aminomethylfunktionalität für den Einbau solcher Derivate essentiell ist. Abgesehen davon scheint die TGT jedoch eine breite Palette an Derivaten zu akzeptieren, welche an dieser Aminomethylfunktionalität weiter modifiziert vorliegen.^[95] Für ein modifiziertes Derivat konnte in einem Tiermodell eine Wirksamkeit gegen Multiple Sklerose gezeigt werden.^[128]

Weiterhin ist auch eine mögliche Verwendung von Queuosin als Biomarker für die Schwere einer Krebserkrankung denkbar. So konnte gezeigt werden, dass besonders bei schweren Krebsverläufen eine starke Hypomodifikation der Queuosin-Position in der tRNA von Krebszellen vorliegt. Obwohl dies kein universell auftretender Effekt ist, wurde bei einer Q-Hypomodifikation in Ovarial- und Lungenkarzinomen eine erhöhte Letalitätsrate beobachtet.^[129] Mechanistisch konnte gezeigt werden, dass bei Queuinmangel in Zellen verstärkt der sogenannte Warburg-Effekt auftritt.^[130] Dieser Effekt bezeichnet die zunehmende Energiegewinnung durch Glykolyse im Verhältnis zum Citratzyklus, welcher häufig in Krebszellen auftritt.^[131-132] Insgesamt scheint Queuosin eine Rolle auf die Zellproliferation in

Krebszellen auszuüben.^[133-134] Variierende Level an Queuosin stehen auch im Zusammenhang mit verschiedenen Zelldifferenzierungs- und Alterungsprozessen.^[135] Insofern ist auch eine Methode zur exakten Quantifizierung von Queuosin und dessen Derivaten hinsichtlich einer differenzierteren Diagnose verschiedener Erkrankungen, speziell Krebserkrankungen, von großem Interesse.

1.4 Biosynthese von Queuosin

Die *de-novo*-Biosynthese von Queuosin findet ausschließlich in Prokaryoten statt.^[87] Ein Übersichtsschema der einzelnen biochemischen Transformationen im Rahmen dieser komplexen Biosynthese ist in Abbildung 1.7 dargestellt. Ausgangspunkt hierfür ist Guanosintriphosphat (GTP, **21**), welches zunächst durch das Enzym Guanosintriphosphatcyclohydrolase 1 (GCH₁) unter Abspaltung von Ameisensäure in Dihydroneopterintriphosphat (H₂NTP, **22**) umgewandelt wird.^[136] Anschließend entsteht unter Einwirkung des Enzyms QueD 6-Carboxy-5,6,7,8-tetrahydropterin (CPH₄, **23**).^[137] Ringverengung durch Stickstoffverlust führt schließlich in einer durch QueE katalysierten Reaktion zu 7-Carboxy-7-deazaguanin (CDG) **24**.^[138] Im Anschluss wird die exozyklische Carboxylgruppe durch Einwirken des Enzyms QueC zu preQ₀ **25** umgesetzt.^[139-140] Im Rahmen der Queuosinbiosynthese wird preQ₀ durch das Enzym QueF unter Zuhilfenahme des Redox-Kofaktors NADPH zu preQ₁ **26** reduziert.^[141-142] PreQ₀ und preQ₁ stellen nicht nur ein Intermediat der Queuosinbiosynthese dar, sondern sind auch ein wesentlicher Kontrollfaktor für die Biosynthese von Queuosin und anderen verwandten Deazaguaninen. preQ₀ und preQ₁ werden von bestimmten zellulären Aptamer-Sensoren, den preQ₁ Riboswitches, erkannt und so die Biosynthese dieser Modifikationen reguliert.^[143-146] Im Rahmen der Queuosinbiosynthese wird preQ₁ anschließend in die prokaryotische tRNA eingebaut, bevor die weitere Transformation zu Q erfolgt. Durch das Einwirken der TGT auf Guanin an Position 34 von prokaryotischen tRNAs wird Guanin direkt durch die Base preQ₁ ausgetauscht. Es findet also eine Basenaustauschreaktion statt.^[147-150] Ausgehend von preQ₁-modifizierter tRNA **27** erfolgt die Einführung der Cyclopenten-Einheit über die Zwischenstufe Epoxyqueuosin-tRNA (oQ, **28**), welches in einer durch QueA vermittelten Reaktion unter Zuhilfenahme des Kofaktors S-Adenosyl-Methionin (SAM, **29**) aus preQ₁-tRNA gebildet wird. Interessanterweise wirkt hier SAM, eigentlich ein Methylgruppentransfer-Kofaktor, als Adenosylüberträger, wobei Adenin im Verlauf der Reaktion abgespalten wird, sodass *de facto* eine Ribosyl-Gruppe übertragen wird.^[151-153] Der Mechanismus dieser besonderen Reaktion ist in Abbildung 1.7b dargestellt. Epoxyqueuosin-tRNA wird abschließend durch das Enzym QueG in einer Vitamin B₁₂-abhängigen Reaktion zur fertigen Queuosin-tRNA **30** reduziert (vgl. Abbildung 1.7c). Als Elektronenquelle für die Reduktion dienen Eisen Schwefel-Cluster.^[154-157]

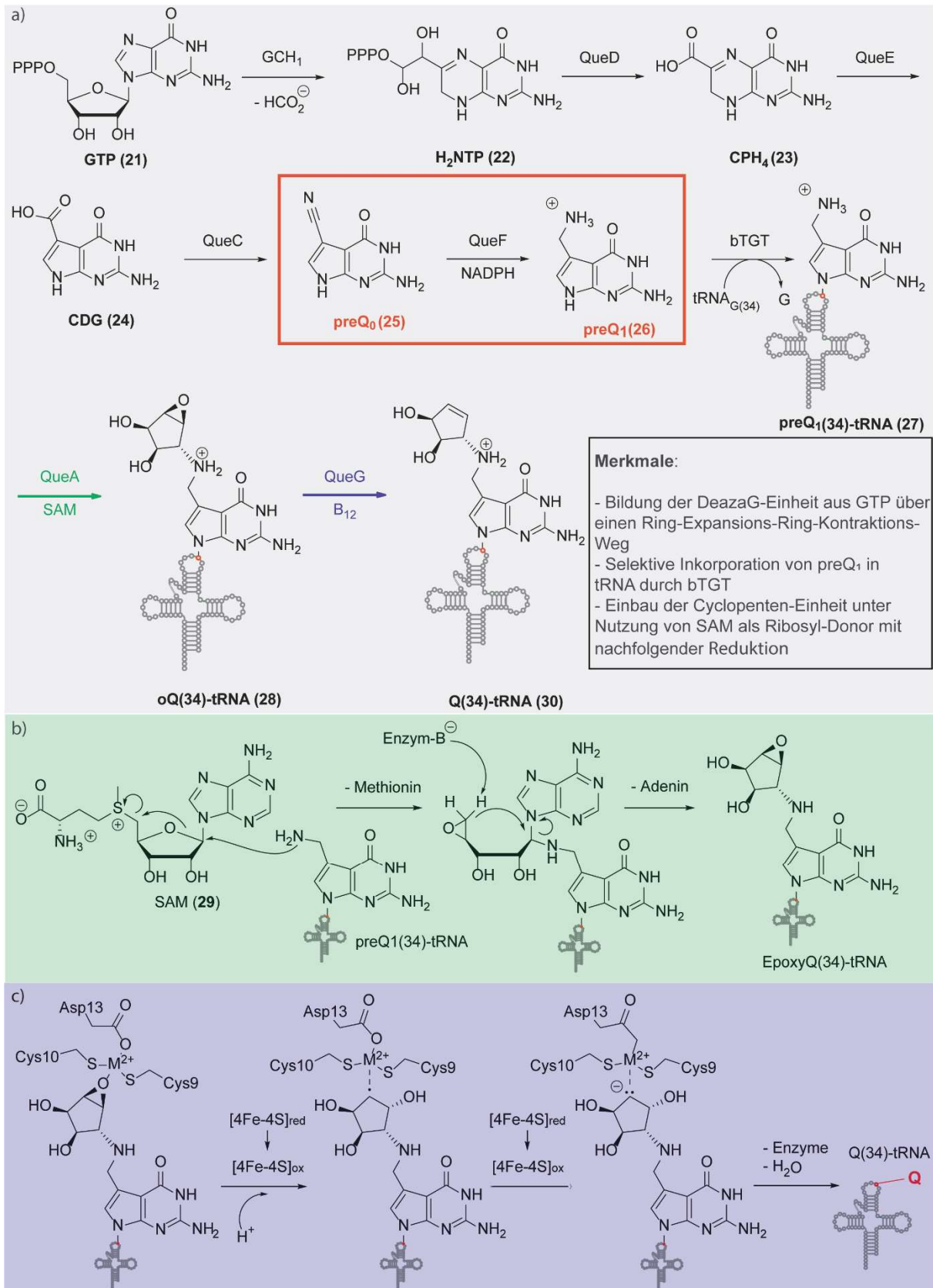


Abbildung 1.7: Biosynthese von Queuosin aus Guanosintriphosphat in Prokaryoten; **a)** Übersicht der Biosynthese: Unter Einwirkung verschiedener Enzyme (GCH₁, QueC-E) wird Guanosintriphosphat **21** zu preQ₀ **25** umgesetzt. Nach einer NADPH-abhängigen Reduktion durch QueF von preQ₀ zu preQ₁ **26** wird dieses von der bakteriellen TGT an Position 34 der tRNA eingebaut. Anschließend wird die

Biosynthese über die beiden Enzyme QueA sowie QueG komplettiert. **b)** Mechanismus der Biosynthese von oQ-tRNA aus preQ₁-tRNA. SAM **29** dient als Ribosyltransferreagens und baut unter Methionin- und Adeninverlust eine Epoxyqueuosin-einheit ein.^[151] **c)** Mechanismus der Vitamin-B₁₂-abhängigen Reduktion von Epoxyqueuosin-tRNA **28** zu Queuosin-tRNA **30** über intermediär auftretende Radikal- und Anionzwischenstufen. Eisen-Schwefel-Cluster liefern dabei die für die Reduktion nötigen Elektronen. Die Koordination eines zweiwertigen Metallions (Cobalt bzw. Zink) im aktiven Zentrum des Enzyms an den Epoxid-Sauerstoff ist für das Enzym essentiell.^[157]

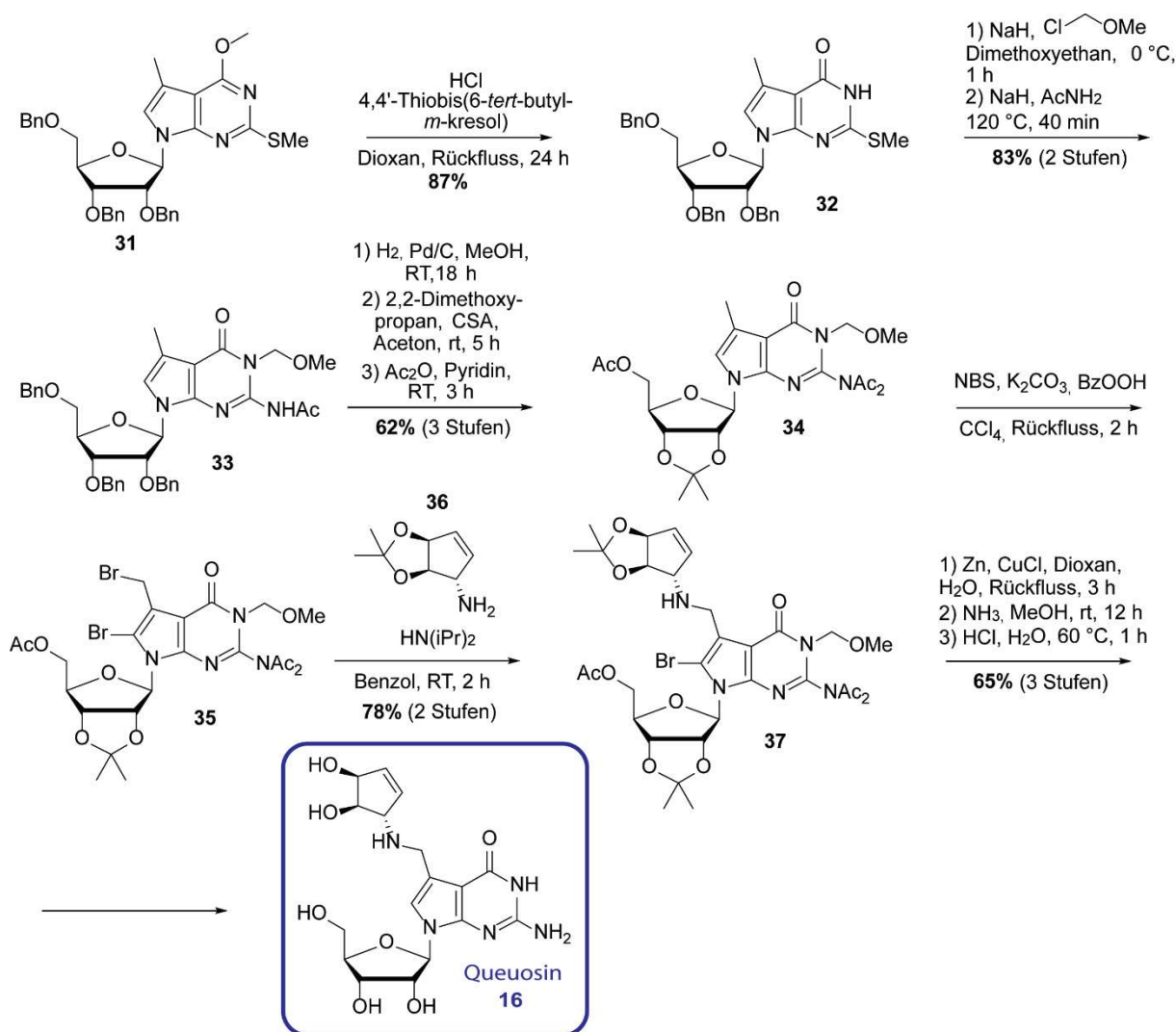
Insgesamt umfasst die Biosynthese von Q₃₄-modifizierter tRNA acht biosynthetische Schritte mit eigens für diese exprimierten Enzymen. Dieser enorme biosynthetische Aufwand, welcher zur Einführung von Queuosin unternommen wird, unterstreicht noch einmal die biologische Bedeutung dieses Prozesses, welcher sich im Laufe der Evolution entwickelt hat. In Anbetracht der Länge und Komplexität der Biosynthese erscheint es plausibel, dass auch chemisch-synthetische *man-made*-Synthesen dieser Modifikation äußerst anspruchsvoll sind. Zur Untersuchung der Funktion und Struktur dieser Modifikation ist das Vorhandensein einer effizienten chemischen Synthese jedoch unerlässlich. Im Folgenden werden daher verschiedene im Laufe der Jahre entwickelte Ansätze zur chemischen Synthese von Queuosin vorgestellt.

1.5 Chemische Synthesen von Queuosin

1.5.1 Synthese von Queuosin

Kurz nach der Entdeckung von Queuosin wurde die erste chemische Synthese des Nukleosids sowie der freien Base von Ohgi *et al.* durchgeführt.^[84] Ein Schema dieser Synthese ist in Schema 1.1 dargestellt. Ausgehend von der bekannten Verbindung **31**^[158] wurde zunächst die 6-O-Methylgruppe sauer gespalten, um **32** zu erhalten. Hierzu war die Zugabe eines Radikalfängers erforderlich, um die Thiomethylfunktionalität zu erhalten. Nach Schützung der N¹-Position als Methoxymethylderivat konnte die Thiomethylgruppe mithilfe von Acetamid zum geschützten Deazaguanosinderivat **33** umgesetzt werden. Anschließend erfolgte eine Umschützung der Riboseeinheit durch hydrogenolytische Spaltung der Benzylschutzgruppen sowie anschließender Schützung der 2'- und 3'-Position als Dimethylacetal und der 5'-Position durch Acetylierung, wodurch Verbindung **34** erhalten wurde. Schlüsselschritt für die weitere Funktionalisierung stellte eine Wohl-Ziegler-Bromierung der benzyllischen Position dar, wobei eine zusätzliche unerwünschte elektrophile Bromierung der C⁸-Position erfolgte und das Dibromid **35** erhalten wurde. Die enantiomerenreine Cyclopenteneinheit **36** wurde aus dem bekannten Racemat^[159] mittels Resolution mit Mandelsäure erhalten und über eine nukleophile Substitution an der benzyllischen Position eingeführt, um **37** zu erhalten. Zuletzt erfolgte die Umsetzung von **37** zu Queuosin **16** durch eine Cu/Zn vermittelte reduktive Debromierung und anschließende Entschützung mittels Ammoniak und gefolgt von HCl. Obwohl die Synthese

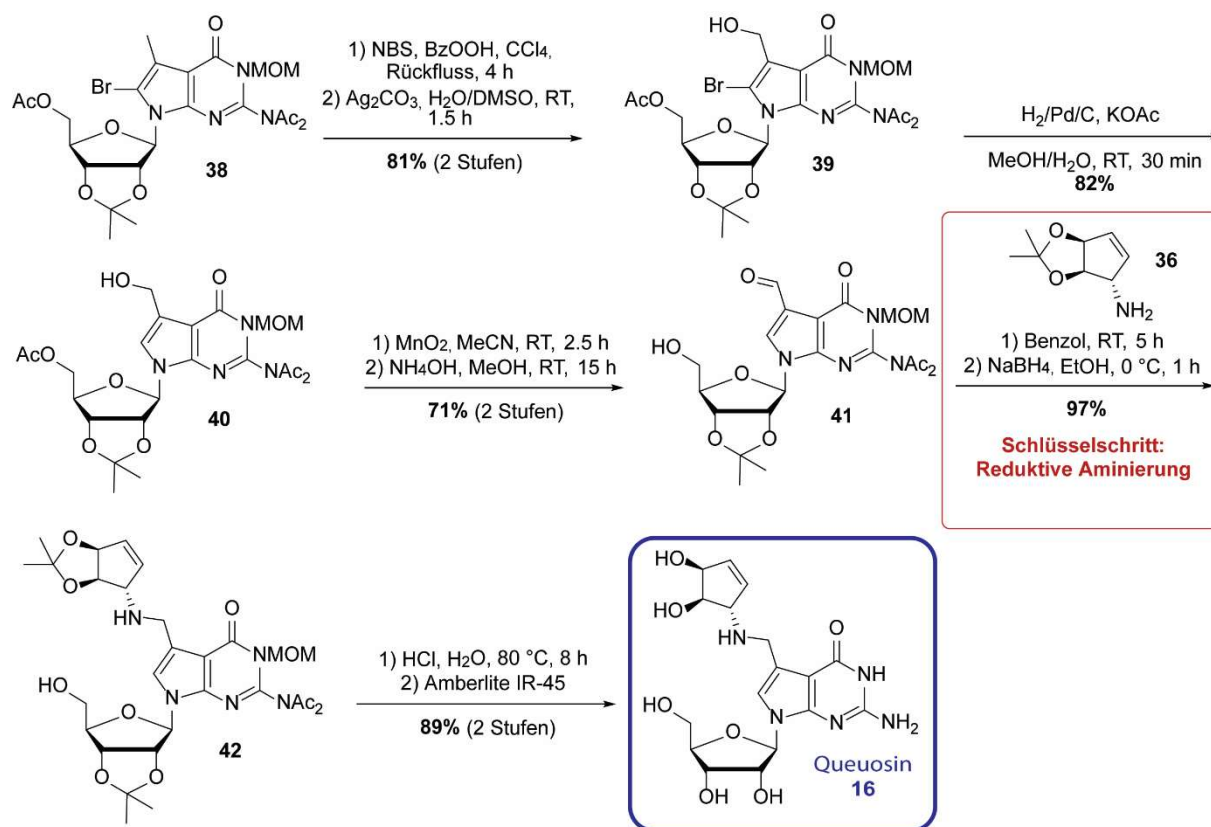
Queuosin in akzeptablen Ausbeuten lieferte, erscheint die Synthese in vielerlei Hinsicht verbesserungswürdig. Insbesondere die Länge der Synthese und der damit verbundene synthetische Aufwand sowie die für die Cyclopenteneinheit **36** erforderliche Racematspaltung lassen Raum für Optimierungen. Weiterhin wurde später festgestellt, dass die Synthese hinsichtlich ihrer Reproduzierbarkeit problematisch ist. Deshalb wurden in diesem Zusammenhang inzwischen verschiedene alternative Synthesestrategien entwickelt. Diese werden im Folgenden vorgestellt.



Schema 1.1: Erste bekannte Synthese von Queuosin **16** nach Ohgi *et al.*^[84]

Ausgehend von der von Ohgi *et al.* veröffentlichten Erstsynthese des Queuosin-Nukleosids wurde 1986 von Kondo *et al.* eine verbesserte Version veröffentlicht.^[160] In der Synthese wurde ausgehend vom Vorläufer **38**^[161] zuerst eine Bromierung der benzylicchen Position durchgeführt und das resultierende Bromid im Anschluss zum Alkohol **39** hydrolysiert. Reduktive Dehalogenierung an der C⁸-Position zu Derivat **40** sowie anschließende Benzyl-

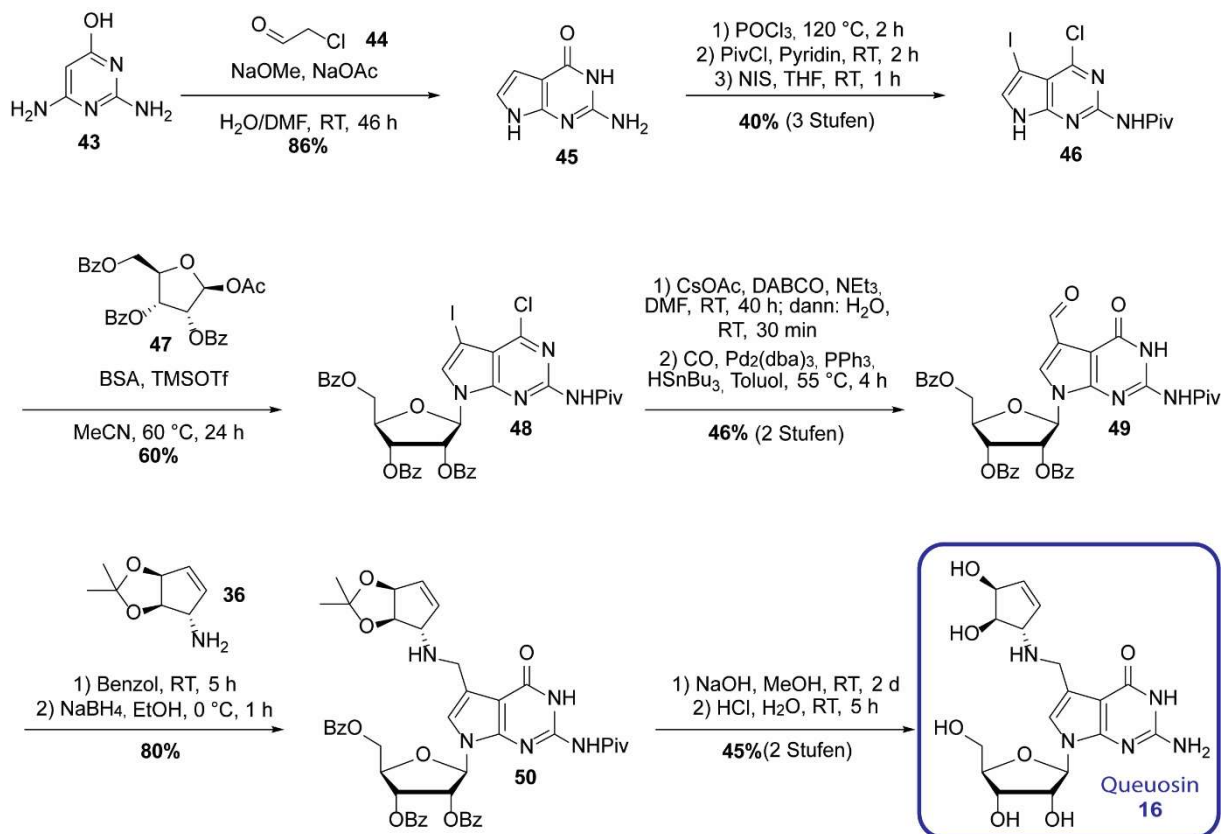
Oxidation mit MnO_2 und basische Spaltung der Esterschutzgruppe an der C⁵-Hydroxygruppe der Riboseinheit ergab Verbindung **41** als Vorläufer für die reduktive Aminierung. Die reduktive Aminierung von **41** mit Amin **36** stellt den Schlüsselschritt für die Kopplung der beiden Bausteine von Queuosin dar und ergab Verbindung **42** in exzellenter Ausbeute von 97%. Abschließende Entschützung ergab Queuosin **16**. Die Synthese adressiert im Wesentlichen die Problematik bei der Einführung der Cyclopentenyleinheit **36** über eine Substitutionsreaktion eines Bromids an der benzylichen Position. Aminierungsreaktionen dieses Typs weisen in der Regel das Problem auf, dass Amine in Alkylierungsreaktionen zu Überalkylierung neigen und somit ein großer Überschuss des entsprechendenamins erforderlich ist.^[162] Dieses Problem wurde, wie in Schema 1.2 dargestellt, durch Einführung einer benzylichen Formylgruppe behoben, wodurch eine deutlich bessere reduktive Aminierung ermöglicht wurde.



Schema 1.2: Verbesserte Queuosin-Synthese nach Kondo *et al.*; Der Schlüsselschritt der Kopplung der beiden Bausteine **36** und **41** wird durch eine reduktive Aminierung ermöglicht.^[160]

Aufbauend auf dieser Strategie wurde 2007 eine optimierte Synthese von Queuosin von Klepper *et al.* vorgestellt, welche in Schema 1.3 dargestellt ist.^[54, 163] Hierbei wurde das für die reduktive Aminierung benötigte 7-Formyl-7-deazaguanosin Grundgerüst direkt aus Deazaguanin hergestellt. Ausgangspunkt der Synthese war eine Hantzsch-Pyrrolsynthese mit 2,6-Diamino-4-hydroxypyrimidin **43** und Chloracetaldehyd **44**, wobei der 7-Deazaguanin-

Heterozyklus **45** ausgebildet wurde. Im Anschluss daran wurde eine Chlorierung der C⁶-Position durchgeführt. Diese sollte im weiteren Verlauf der Synthese die N¹-Position deaktivieren. Nach Schützung der exozyklischen Aminogruppe als Pivaloylamid erfolgte zunächst die Funktionalisierung der C⁷-Position durch elektrophile Iodierung mit *N*-Iodsuccinimid zu Verbindung **46**. Eine anschließende Ribosylierung unter Vorbrücken-Bedingungen mit 1-*O*-Acetyl-2,3,5-tri-*O*-benzylribose **47** lieferte selektiv das β-Nukleosid **48**. Nach DABCO-vermittelter Hydrolyse des Chloro-Substituenten konnte die erforderliche Formylgruppe über eine Stille-Kreuzkupplungsreaktion mit Kohlenstoffmonoxid und Tributylzinnhydrid eingeführt werden. Der so erhaltene Baustein **49** wurde anschließend in einer reduktiven Aminierungsreaktion mit dem Cyclopentenbaustein **36** umgesetzt, wobei geschütztes Queuosin **50** erhalten wurde. Nach finaler Entschützung lieferte die Synthese freies Queuosin **16**.



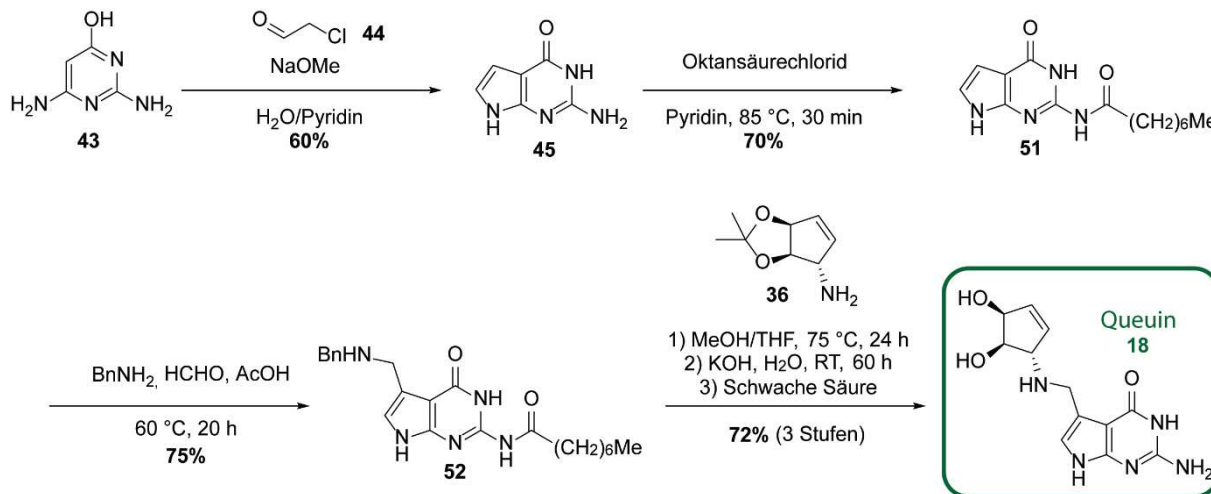
Schema 1.3: Neueste Synthese von Queuosin **16** nach Klepper *et al.*^[54, 163]

Die von Klepper *et al.* publizierte Synthese stellt bis heute die effizienteste und kürzeste Route zur Herstellung von Queuosin dar und bietet aus heutiger Sicht nur noch wenig Raum für Optimierungen, speziell hinsichtlich der Synthese des Cyclopentenbausteins, welcher in einer sehr kurzen und effizienten Synthese hergestellt werden konnte. Diese wird in Kapitel 1.5.3 näher besprochen.

1.5.2 Synthese von Queuin

Für die Synthese der freien Base Queuin wurden zum Teil dieselben Konzepte verwendet, wie bereits für Queuosin beschrieben, wobei anstatt eines Deazaguanosinbausteins ein Deazaguaninbaustein verwendet wurde. Die erste Synthese von Queuin nach Kondo *et al.* bedient sich eines solchen Ansatzes, welcher im Wesentlichen der zuvor beschriebenen Synthese von Queuosin nach Kondo *et al.* ähnelt und deshalb hier nicht näher behandelt wird.^[164]

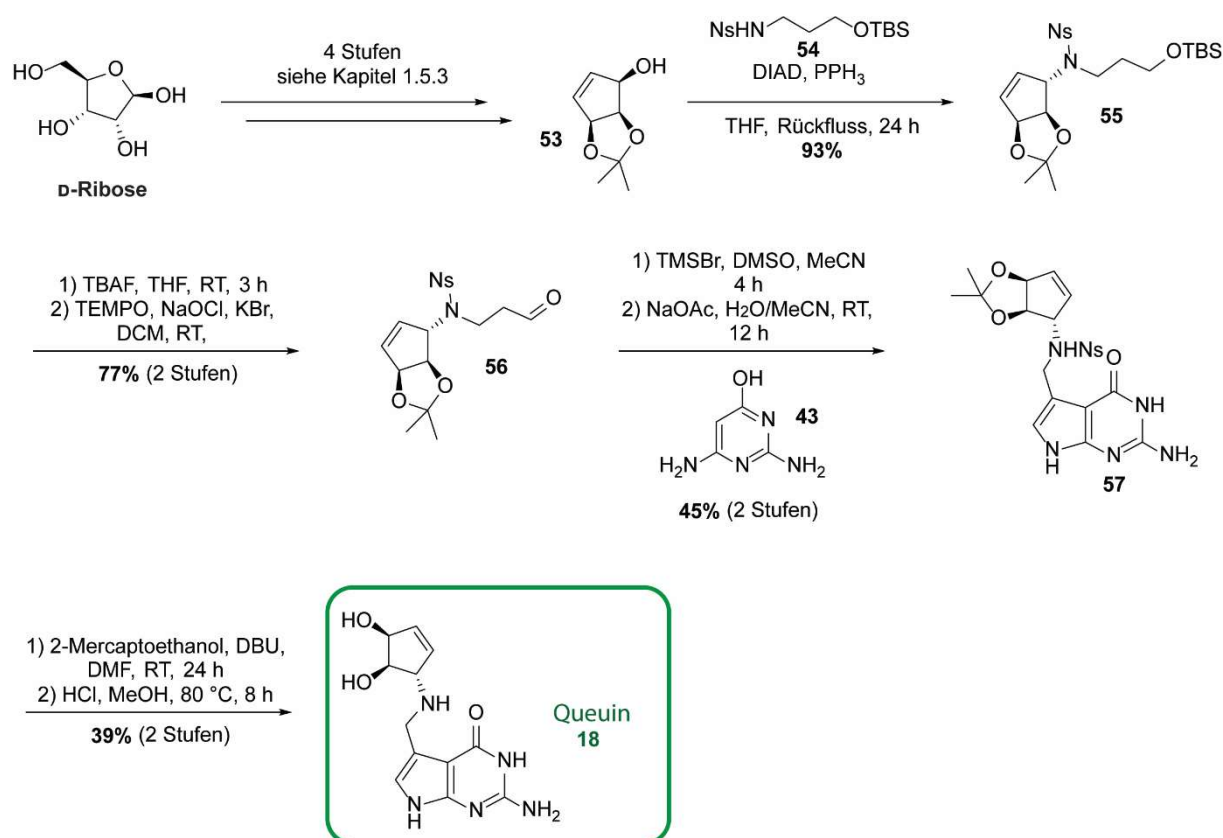
Akimoto *et al.* veröffentlichte in 1988 eine verbesserte Synthese von Queuin **18**, welche in Schema 1.4 gezeigt wird.^[165] Dabei wurde zunächst 7-Deazaguanin **45** über eine Hantzsch-Pyrrolsynthese von 2,6-Diamino-4-pyrimidinon **43** mit Chloracetaldehyd **44** hergestellt. Nach einer Schützung der exozyklischen Aminogruppe mit *n*-Oktansäurechlorid wurde das geschützte Derivat **51** erhalten und anschließend eine Benzylaminomethyl-Funktionalität an der 7-Position mittels einer Mannich-Reaktion eingeführt um Verbindung **52** zu generieren. Die Einführung der Cyclopenten-Einheit **36** erfolgte über eine Transaminierungsreaktion, wobei ein 5-facher Überschuss an Cyclopenten eingesetzt werden musste. Abschließende Entschützung mit Base und anschließend mit Säure führte zu Queuin **18**. Dabei wurde eine Gesamtausbeute von 23% über 6 Stufen ausgehend von Verbindung **43** erreicht.



Schema 1.4: Verbesserte Synthese von Queuin **18** nach Akimoto *et al.* ausgehend von 2,6-Diamino-4-pyrimidinon **43**.^[165]

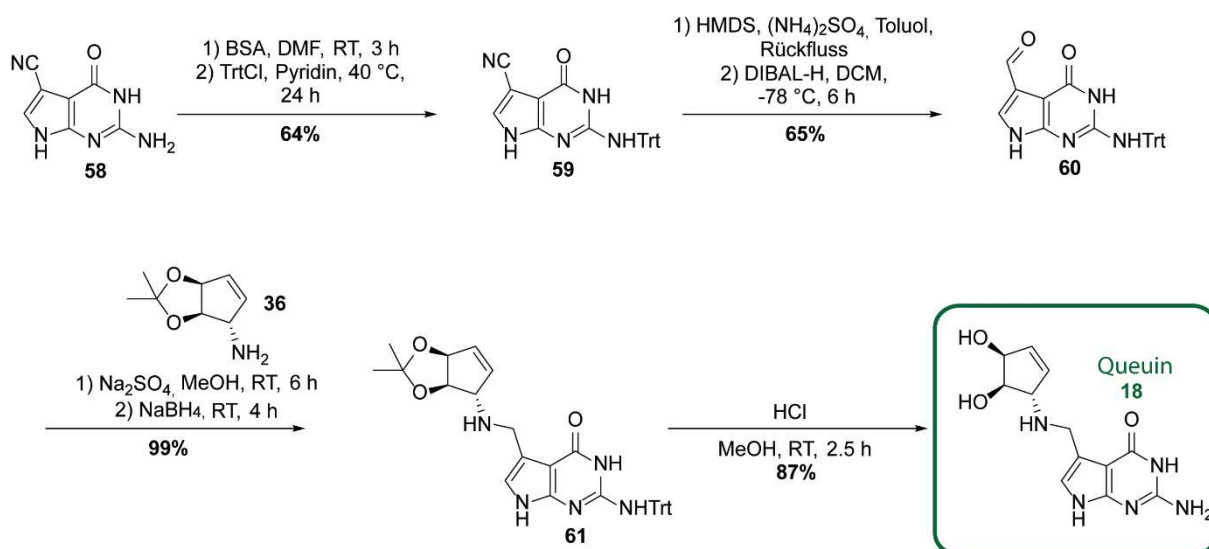
In einem weiteren literaturbekannten Ansatz wurde die Base Queuin an dem Cyclopentengrundgerüst aufgebaut. In der von Barnett *et al.* entwickelten Synthese, welche in Schema 1.5 dargestellt ist, wurde zuerst die Cyclopenteneinheit ausgehend von D-Ribose hergestellt.^[166] Die Synthese der Cyclopenteneinheit verlief dabei ähnlich wie bei Klepper *et al.* beschrieben,^[163] diese Synthese wird in Kapitel 1.5.3 ausführlich besprochen. Im

Unterschied hierzu erfolgte jedoch ausgehend vom Hydroxycyclopenten-Derivat **53** eine Aminierung unter Mitsunobu-Bedingungen mit dem geschützten aliphatischen Amin **54** zum Cyclopentylaminderivat **55**. Nach Entschützung der terminalen Hydroxygruppe und einer TEMPO-vermittelten Oxidation zum Aldehyd **56** erfolgte eine α -Bromierung dieses Aldehyds. Der so gewonnene substituierte Bromoacetaldehyd-Baustein wurde in einer Hantzsch-Pyrrolsynthese – analog zu der Synthese von 7-Deazaguanin **45** – wie oben beschrieben mit 2,6-Diaminopyrimidinon **43** zum geschützten Queuin **57** umgesetzt. Eine zweistufige Entschützung ergab Queuin **18** in einer Gesamtausbeute von 23% über 6 Stufen.



Schema 1.5: Synthese von Queuin **18** nach Barnett *et al.*^[166]

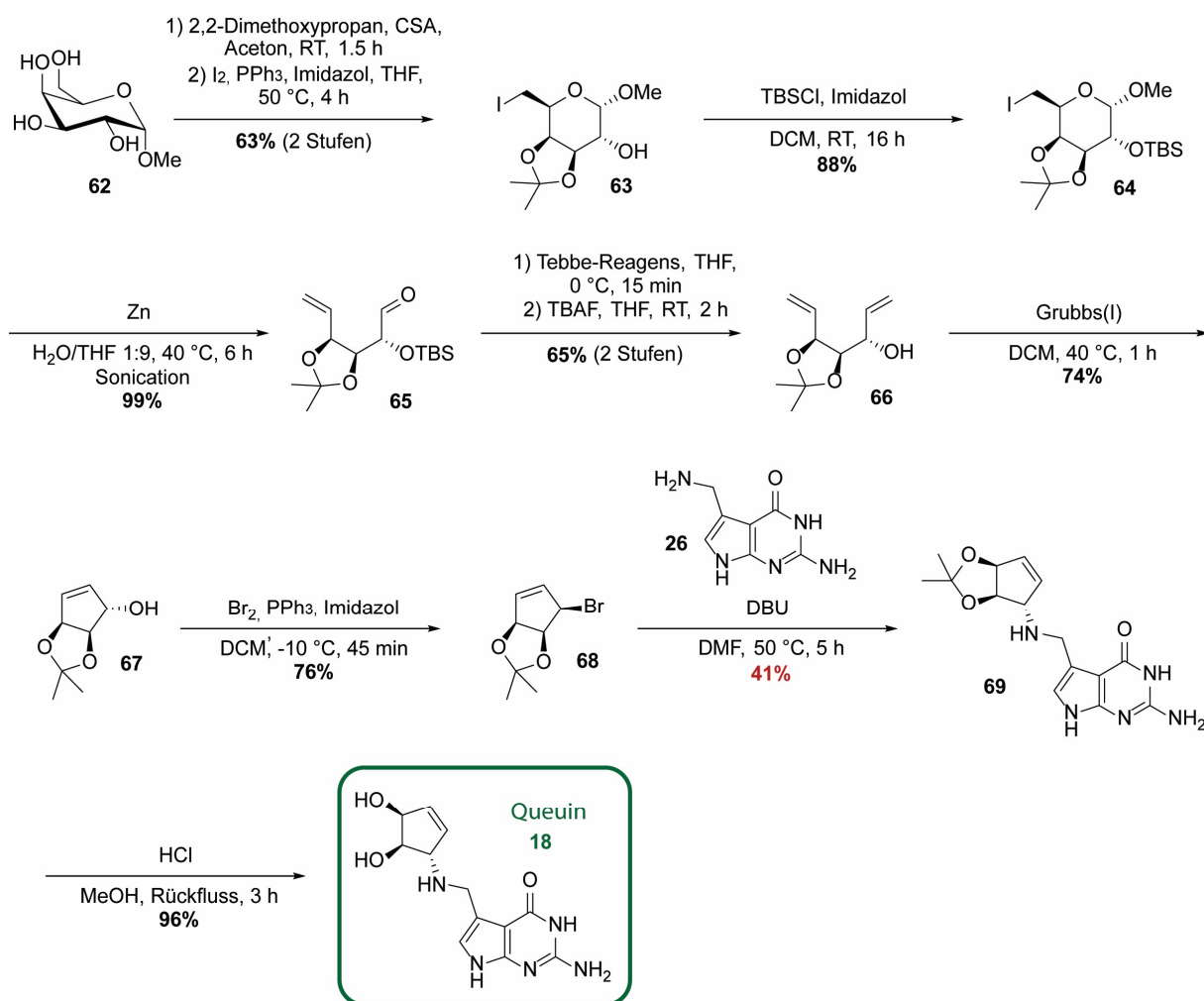
In einer neueren Synthese nach Brooks *et al.* (s. Schema 1.6) wurde Queuin ausgehend von preQ₀ **58** hergestellt.^[167-168] Dabei wurde zuerst die exozyklische Aminogruppe mit einer Tritylschutzgruppe versehen, um Derivat **59** zu erhalten. Anschließend erfolgte eine Umsetzung der Cyano-Funktionalität zum entsprechenden Aldehyd **60** über Reduktion mit DIBAL-H in DCM und anschließender Hydrolyse des intermediär gebildeten Imins. Der Cyclopentenbaustein **36**, welcher nach Klepper *et al.* hergestellt wurde, wurde dann in einer reduktiven Aminierung mit dem Deazaguanin-Gerüst verknüpft, um geschütztes Queuin **61** zu erhalten. Nach Entschützung unter sauren Bedingungen lieferte die Synthese Queuin **18** in exzellenter Ausbeute von 35% ausgehend von der Deazaguanin-Einheit **58** in 4 Stufen.



Schema 1.6: Synthese von Queuin **18** nach Brooks *et al.*^[167, 168]

Die bisher neueste Synthese von Queuin wurde von M. Krull entwickelt (s. Schema 1.7).^[115, 169] Hierbei wurde die Cyclopenteneinheit ausgehend von 1-O-Methylgalactose **62** synthetisiert. Nach Schützung der Hydroxygruppen an Position 3 und 4 als Dimethylacetal wurde an der 6-Position eine Appel-Iodierung durchgeführt um Verbindung **63** zu erhalten. TBS-Schützung der 2-Position in **63** lieferte Verbindung **64**. In einer Zink-vermittelten reduktiven Fragmentierung wurde Verbindung **65** erhalten. Umsetzung mit Tebbe-Reagens und anschließende TBS-Entschützung lieferte das Di-Alken **66**, welches in einer Grubbs-Metathese zum Hydroxycyclopenten **67** umgesetzt wurde. Appel-Bromierung lieferte das entsprechende Bromid **68** unter Inversion. Dieses wurde mit preQ₁ **26** umgesetzt, um das geschützte Queuin **69** zu erhalten. Saure Entschützung lieferte abschließend Queuin **18** in einer Gesamtausbeute von 8% über 10 Stufen. Die Synthese zeigt erneut die Problematik der Einführung der Aminofunktionalität über eine Alkylierungsreaktion auf, für diesen Schritt wurden lediglich 41% Ausbeute erhalten.

Die effizienteste Strategie für die Synthese von Queuin- und Queuosinderivaten scheint jedoch insgesamt auf dem Ansatz der reduktiven Aminierung zu beruhen. Diese Synthesestrategie ist auch insbesondere im Hinblick auf die Konvergenz der Synthese besonders hervorzuheben. Dabei ermöglicht diese Strategie auch eine einfache weitere Funktionalisierung der verschiedenen Bausteine, da diese so nach dem Baukastenprinzip zusammengesetzt werden können. Dabei erscheint insbesondere die Synthese des chiralen Cyclopentenbausteins speziell aufgrund der enthaltenen Stereochemie eine der größten Herausforderungen darzustellen.

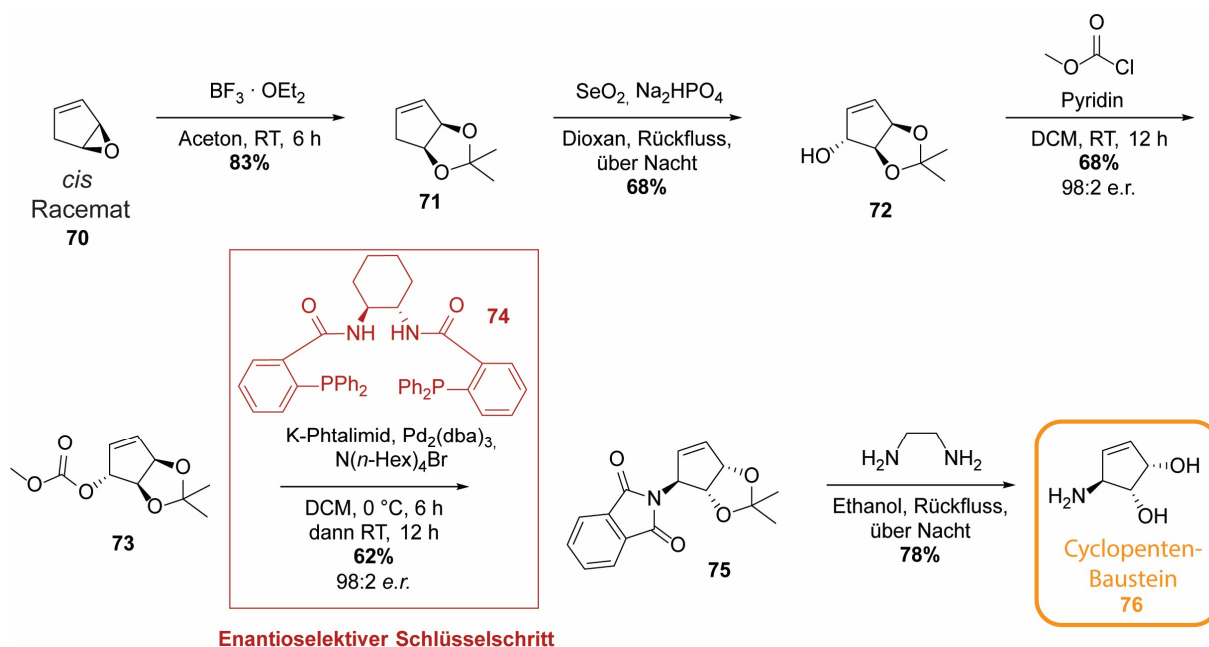


Schema 1.7: Synthese von Queuin nach M. Krull.^[115, 169]

1.5.3 Synthese des Cyclopentenbausteins

Nachdem erste Synthesen des chiralen Cyclopentenbausteins eine Racematspaltungsstrategie erfordern, wurden verschiedene Ansätze zur Einführung der chiralen Information verfolgt: Einerseits kann die chirale Information mithilfe enantioselektiver Syntheseschritte aus achiralen Reagenzien eingeführt werden, andererseits kann der chirale Baustein aus kommerziell erhältlichen und billigen Ausgangsmaterialien, sogenannten *chiral pool materials*, durch geeignete Transformationen erhalten werden.^[170] Eine Synthese, welche sich der ersteren Strategie, der Verwendung enantioselektiver Schritte, bedient, ist die von Trost *et al.* veröffentlichte Synthese (s. Schema 1.8).^[171] Hierbei diente racemisches Cyclopentenoxid **70**, das durch Oxidation von Cyclopentadien erhalten werden kann, als Ausgangsmaterial. Zunächst erfolgte eine Ringöffnung des Epoxids, wobei BF₃ · OEt₂ als starke Lewisäure benötigt wurde, um eine S_N1-Ringöffnung über ein Allylkation als Zwischenstufe zu bewirken, sodass das als Dimethylacetal geschützte, thermodynamisch stabilere *cis*-Diol **71** erhalten werden konnte. Die anschließende Einführung einer

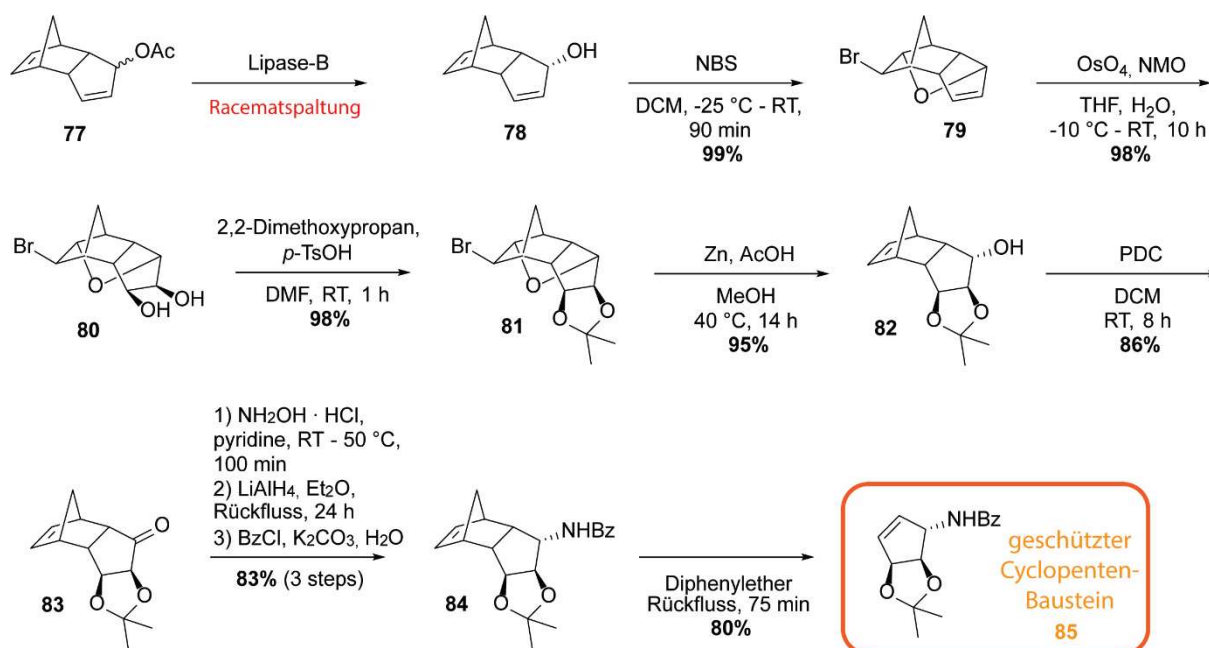
Hydroxyfunktion in **72** mittels Riley-Oxidation erfolgte *trans* zu den beiden bestehenden Hydroxygruppen, da der sterische Anspruch des bicyclischen Systems lediglich einen Angriff von der konvexen Seite des Moleküls zulässt. Die so eingeführte Hydroxygruppe wurde anschließend durch Umsetzung mit Methylchloroformat zum Carbonat-Ester **73** als Abgangsgruppe aktiviert. Die Einführung der chiralen Information erfolgte anschließend über einen enantioselektiven Schlüsselschritt, wobei der chirale Trost-Ligand **74** die Enantioselektivität der Gabriel-Typ-Reaktion steuert und so aus dem Racemat **73** das geschützte Amin **75** mit einer ausgezeichneten Enantiomerenrate von 98:2 *e.r.* erhalten werden konnte. Eine abschließende Entschützung der Aminogruppe mittels Ethylendiamin ergab das nahezu enantiomerenreine Produkt **76**. Dabei wurde eine Gesamtausbeute von 19% über 5 Stufen erzielt. Die Synthese ist mit 5 Stufen sehr effizient und weist eine ausgezeichnete Enantioselektivität (98:2 *e.r.*) auf.



Schema 1.8: Enantioselektive Synthese des Cyclopentenbausteins **76** nach Trost *et al.*; Die chirale Information wird über eine stereoselektive Substitution mithilfe des chiralen Trost-Liganden **74** eingeführt.^[171]

Einen weiteren Ansatz stellt die Synthesestrategie nach Tanaka *et al.* dar (s. Schema 1.9).^[172] Hierbei wurde mittels einer lipasevermittelten Esterspaltungsreaktion ausgehend von Verbindung **77** enantiomerenreines (-)-*endo*-3-Hydroxydicyclopentadien **78** als ein chirales Ausgangsmaterial generiert. Die Einführung der chiralen Information erfolgte hier also über eine enzymatische Racematspaltung. Ausgehend von diesem chiralen Material wurde anschließend eine regioselektive Bromierung der zugänglicheren der beiden Doppelbindungen mit NBS durchgeführt. Hierbei öffnete sich das intermediär gebildete Bromoniumion nach einem intramolekularen Angriff der Hydroxygruppe, wobei der cyclische

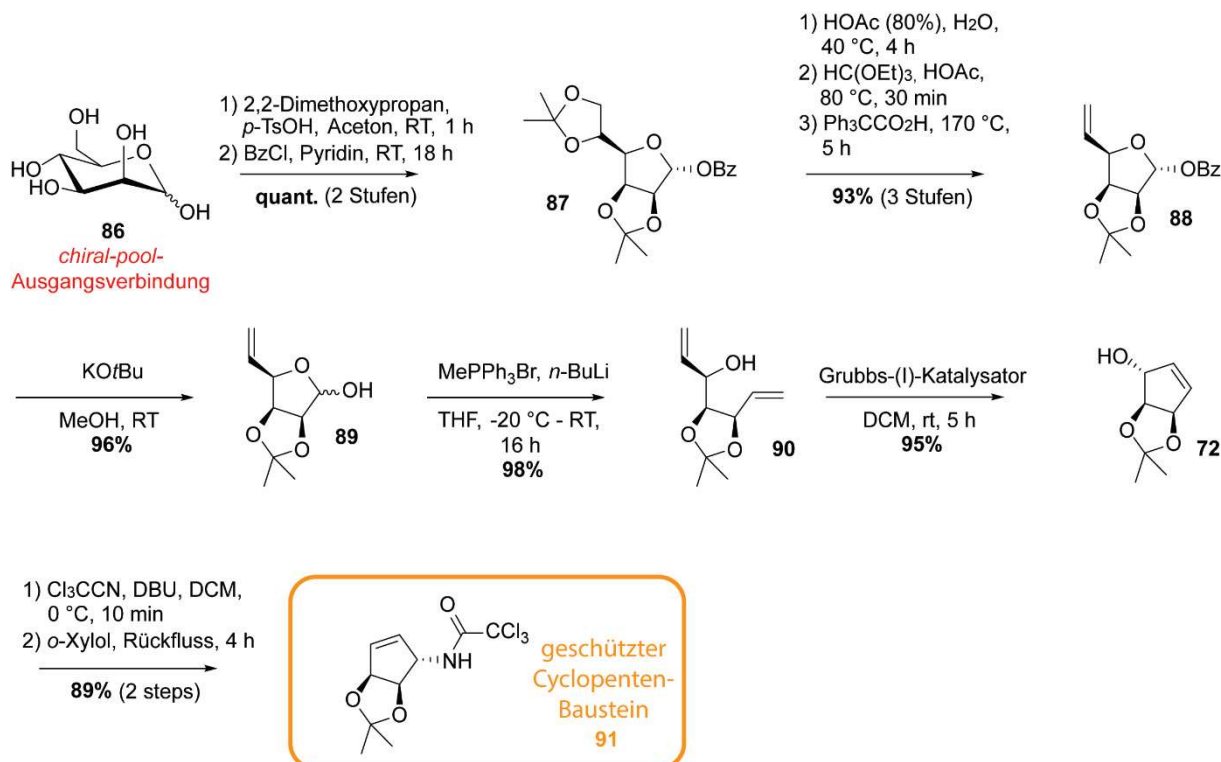
Ether **79** entstand. Anschließend erfolgte eine Dihydroxylierung der verbleibenden Doppelbindung mit OsO_4 , wobei stereoselektiv das *exo*-Produkt **80** gebildet wurde. Nach einer Schützung der beiden vicinalen Hydroxygruppen als Dimethylacetal in **81** wurde die als Bromoether maskierte Doppelbindung mittels Umsetzung mit Zink und Essigsäure freigesetzt, um Verbindung **82** zu erhalten. Anschließende Oxidation der freien Hydroxygruppe zum Keton **83** mit PDC sowie eine reduktive Aminierung mit Hydroxylamin und LiAlH_4 als Reduktionsmittel lieferte das freie Amin in guter Diastereoselektivität (83:15 d.r.). Nach Schützung desamins als Benzylamid **84** erfolgte eine Retro-Diels-Alder-Reaktion, wodurch das geschützte Cyclopenten-Derivat **85** erhalten wurde.



Schema 1.9: Synthese des geschützten Cyclopentenbausteins **85** nach Tanaka *et al.*; Die chirale Ausgangsverbindung wurde über eine Lipase-vermittelte Racematspaltungsstrategie erhalten.^[172]

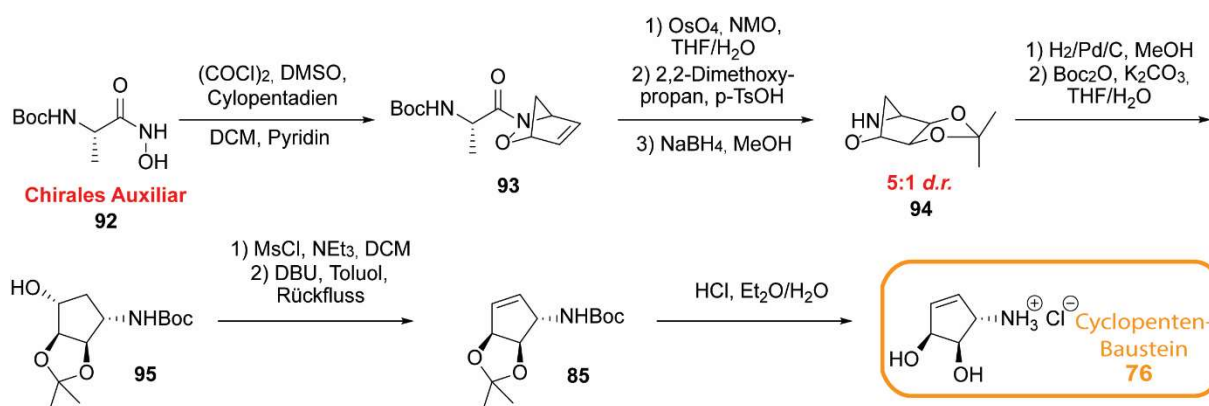
Eine Synthese von Ova *et al.* benutzt hingegen die *chiral pool* Strategie (s. Schema 1.10).^[173] Hierbei wurde D-Mannose **86** als Ausgangsmaterial gewählt, welche in optisch reiner Form erhältlich ist. Nach Schützung der *cis*-Diolfunktionen an den Positionen 2 und 3 sowie an 4 und 6 als Dimethylacetal und der Schützung der anomeren Position als Benzylester zu Verbindung **87** wurde mittels einer 3-stufigen Synthese eine Alken-Funktionalität eingeführt. Hierzu wurde die labilere Acetalschutzgruppe an den Positionen 4 und 6 in Essigsäure entfernt und anschließend eine Orthoester-vermittelte Eliminierung der Hydroxygruppen durchgeführt, um Verbindung **88** zu erhalten. Nach basischer Entschützung der anomeren Schutzgruppe zu **89** wurde eine Methylengruppe mittels einer Wittig-Reaktion eingeführt. Das so entstandene Molekül **90** mit zwei terminalen Alkenfunktionalitäten wurde anschließend unter Grubbs-Bedingungen zum entsprechenden Cyclopenten **72** cyclisiert. Abschließend lieferte eine

Umsetzung der freien Hydroxygruppe zum Trichloracetimidat mit anschließender stereoselektiver Overman-Umlagerung das geschützte Cyclopenten-Derivat **91**.



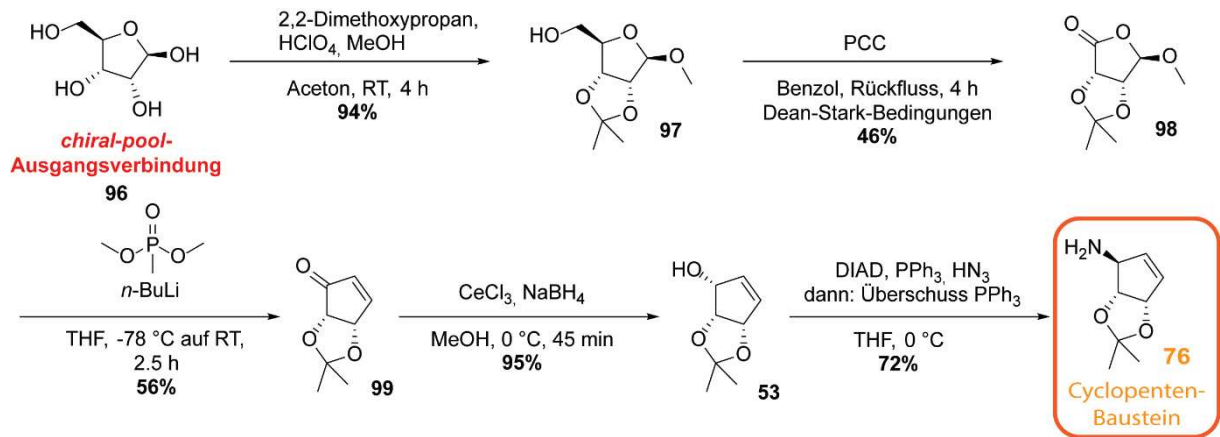
Schema 1.10: Synthese des geschützten Cyclopentenbausteins **91** nach Ova *et al.*; Die Synthese geht von einer *chiral-pool*-Ausgangsverbinding (D-Mannose, **86**) mit vordefinierter Stereochemie aus.^[173]

Die Synthese weist eine Ausbeute von von 74% über 10 Stufen auf, wobei ein Vorteil die bereits von Anfang an festgelegte Stereochemie der *chiral pool* Ausgangsverbinding ist. In einer weiteren in 2003 veröffentlichten Synthese nach Kim *et al.* wurde die Stereochemie mittels eines chiralen Auxiliars eingeführt (s. Schema 1.11).^[174] Die Synthese geht von dem von D-Alanin abgeleiteten Derivat **92** aus. Hierbei wurde zunächst eine Acylnitrosospezies generiert, welche *in situ* durch Cyclopentadien abgefangen wurde. Das so erhaltene Cycloaddukt **93** wurde im Anschluss mittels OsO₄ dihydroxyliert, wobei das gewünschte exo-Produkt in einem 5:1 Überschuss gebildet wurde. Eine Schützung der vicinalen Hydroxygruppen gefolgt von einer reduktiven Spaltung der chiralen N-Acyleinheit ergab Verbindung **94**. Reduktive Spaltung der N-O-Bindung des Tetrahydroisoxazolrings sowie eine selektive Boc-Schützung der Amino-Funktionalität ergab den Vorläufer des Cyclopentens **95** mit einer freien Hydroxygruppe. Abschließend wurde eine zweistufige Eliminierung der Hydroxygruppe durchgeführt. Hierzu wurde zuerst der Alkohol mesyliert, um den Alkohol als Abgangsgruppe zu aktivieren. Umsetzung des Mesylats mit DBU in Toluol unter Rückfluss ergab das geschützte Cyclopenten **85** in einer selektiven *anti*-Eliminierungsreaktion.



Schema 1.11: Synthese des Cyclopentenbausteins **76** nach Kim *et al.*; Die chirale Information wird über das chirale Auxiliar **92** eingeführt.^[174]

Saure Entschützung ergab das Cyclopenten-Derivat **76** als Hydrochlorid-Salz in einer Gesamtausbeute von 43% über 9 Stufen. Die neueste und effizienteste Synthese für die Cyclopenteneinheit wurde 2007 von Klepper *et al.* veröffentlicht (s. Schema 1.12).^[54, 163] Diese bedient sich auch der *chiral pool* Strategie, wobei als Ausgangsverbindung D-Ribose **96** dient. Hiervon ausgehend wurde zunächst eine *one-pot* Schützung der *cis*-Diol-Funktionalität als Dimethylacetal sowie eine Schützung der anomeren Position mit einer Methylgruppe durchgeführt. Beide Reaktionen konnten sequenziell unter saurer Katalyse durchgeführt werden, um Verbindung **97** zu erhalten. Im Anschluss erfolgte eine oxidative Spaltung der C4-C5-Bindung mithilfe von PCC, wobei das cyclische Lacton **98** gebildet wurde. Dieses wurde anschließend in einer Horner-Wadsworth-Emmons-Reaktion (HWE-Reaktion) mit Dimethylmethylphosphonat und *n*-Butyllithium umgesetzt, wobei zusätzlich eine zweite intramolekulare HWE-Reaktion zur Ausbildung des carbazyklischen Cyclopentenrings führte. Das so entstandene Cyclopentenon **99** konnte anschließend in einer Luche-Reduktion stereoselektiv zum Alkohol **53** umgesetzt werden. Die Stereoselektivität der Reaktion beruht dabei auf der sterischen Hinderung der konkaven Seite des bicyclischen Systems, sodass ein Angriff des Reduktionsmittels Natriumborhydrid von der konvexen Seite erfolgt. Die Einführung der Amin-Funktionalität wurde abschließend durch eine Staudinger-Aminierung mit Stickstoffwasserstoffsäure erreicht, wobei aufgrund der S_N2-Bedingungen eine Inversion des Stereozentrums erfolgt, welches für die korrekte Stereochemie des Cyclopentens essentiell ist. Hierbei war es erforderlich, dass die Reaktionstemperatur bei 0 °C gehalten wurde, da über dieser Temperatur eine Racemisierung aufgrund einer stattfindenden Overman-Umlagerung des intermediär gebildeten Azids erfolgte.



Schema 1.12: Synthese des Cyclopentenbausteins **76** nach Klepper *et al.*; Die Synthese geht von D-Ribose **96** als *chiral-pool*-Ausgangsverbindung aus.^[54, 163]

Die hier beschriebene Synthese stellt bis heute mit 5 Stufen die kürzeste Syntheseroute für die Cyclopenteneinheit dar. Die hier ausgewählten Beispiele verdeutlichen trotz der relativ einfach erscheinenden Struktur die Komplexität der Synthese der chiralen Cyclopenteneinheit. Hier wird insbesondere die Effizienz der Biosynthese deutlich, welche die Cyclopenteneinheit im Wesentlichen in zwei enzymatischen Schritten ausgehend von SAM als Ribosyltransferreagens installiert.

1.6 Derivate von Queuosin

1.6.1 Glutamy-Queuosin

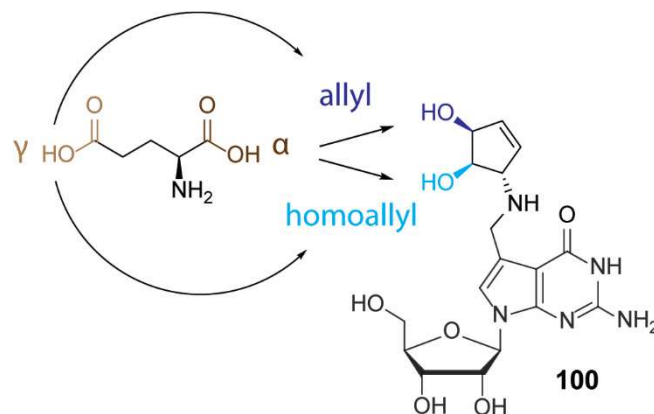


Abbildung 1.8: Darstellung der möglichen Strukturen von Glutamy-Queuosin **100**. Glutamat ist über eine Ester-Bindung mit einer der beiden Hydroxygruppen am Cyclopentenring verknüpft. Die genaue Verknüpfung der Aminosäure (allyl vs. homoallyl und α -Carbonsäure vs. γ -Carbonsäure) ist bisher unbekannt.

Zusätzlich zu Queuosin selbst finden sich sowohl in prokaryotischen als auch in eukaryotischen Zellen weiter modifizierte Derivate von Q. In *E.coli* wurde ein Derivat nachgewiesen, welches zusätzlich eine Glutamylierung aufweist (siehe Abbildung 1.8). Das

Nukleosid Glutamy-Queuosin (GluQ, **100**) wurde 2004 zusammen mit dem Enzym, welches diese Modifikation einbaut, entdeckt.^[175-176] Dieses Enzym, YadB, ist interessanterweise ein Paralog zur Glutamy-Aminoacyltransferase, welches für die Beladung von tRNA^{Glu} mit der entsprechenden Aminosäure verantwortlich ist.^[177-178] Im Gegensatz hierzu weist dieses Enzym jedoch eine Spezifität für tRNA^{Asp} auf. Im Zusammenhang mit der Entdeckung dieser neuen RNA-Modifikation konnte gezeigt werden, dass die Glutamylierung an Queuosin an Position 34 dieser RNA stattfindet.

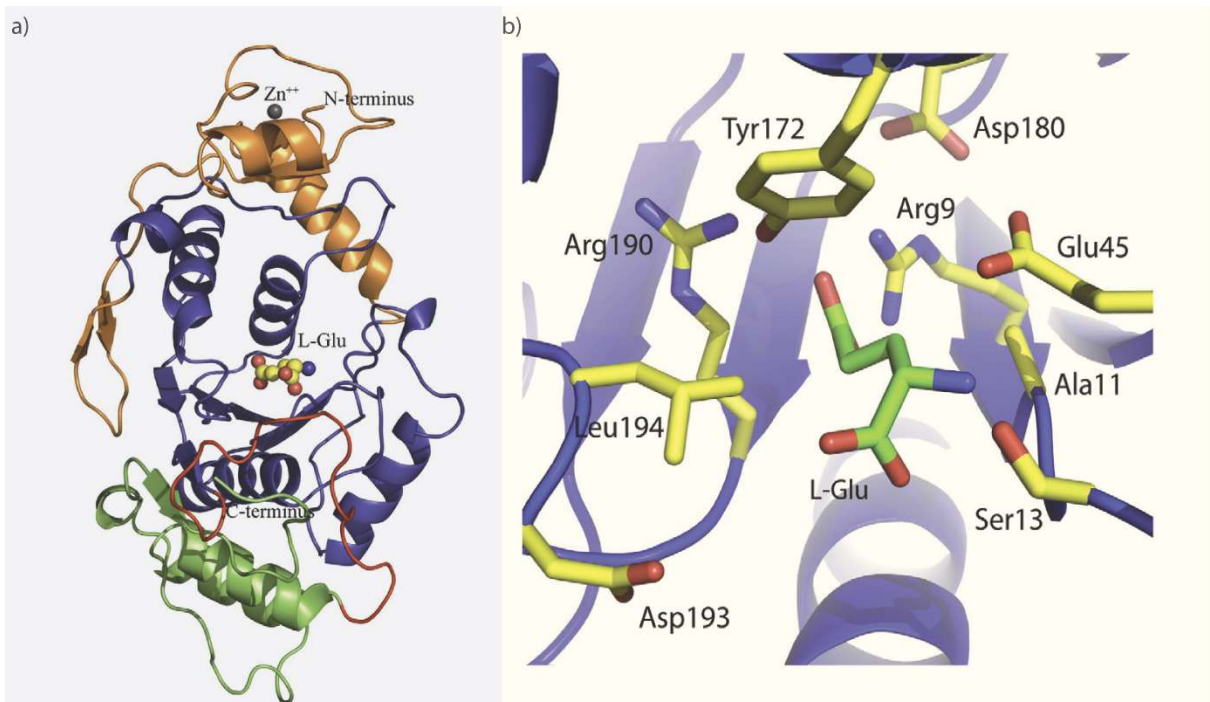


Abbildung 1.9: Grafische Darstellung der Kristallstruktur von YadB nach Blaise *et al.*^[179] a) Darstellung der Proteinstruktur; b) Darstellung der Glutamat-Bindungsstelle, welche mit L-Glutamat komplexiert vorliegt. Eine Salzbrücke zwischen der Seitenkette-Carbonsäure von Glutamat und Arg⁹ ist für die Bindung in der Enzymtasche und speziell für die Unterscheidung von Glutamin und Glutamat entscheidend.

Zudem konnte bestätigt werden, dass die Glutamylierung an einer der beiden Hydroxygruppen der Cyclopenteneinheit stattfindet, da nach der Glutamylierung eine chemische Periodatspaltung dieser beiden cis-Hydroxygruppen nicht mehr erfolgreich war.^[176] Dies ist auf die „Schützung“ einer dieser beiden Hydroxygruppen durch Glutamat zurückzuführen. Die genaue Verknüpfung von Glutamat ist jedoch bis heute unbekannt. Das Enzym YadB wurde nach seiner Entdeckung 2004 inzwischen weiter untersucht. In 2008 konnte von Blaise *et al.* das Enzym YadB von *E.Coli*, welches mit L-Glutamat komplexiert vorlag, kristallisiert und mittels Röntgenstrukturanalyse untersucht werden (siehe Abbildung 1.9).^[179] Hinsichtlich der Funktion wurde anhand von Daten aus *Shigella flexneri* spekuliert, dass die Modifikation eine Rolle für das effiziente Ablesen bestimmter Codons spielt. Dadurch wird die Translation von

Proteinen, welche in der zellulären Reaktion auf Stressfaktoren wie etwa osmotischen Stress auftreten, beschleunigt. Hierdurch kann der Organismus schneller auf entsprechende äußere Stressfaktoren reagieren.^[180] Insgesamt bleibt die Funktion sowie die exakte Struktur dieser Hypermodifikation jedoch bis heute weitgehend ungeklärt.

1.6.2 Galactosyl- und Mannosylqueuosin

In Eukaryoten finden sich neben Queuosin auch Derivate, welche zusätzlich durch Hexosen modifiziert sind. Diese Hexosen wurden als Galactose bzw. Mannose identifiziert und eine erste Strukturaufklärung dieser Derivate wurde 1976 von Nishimura *et al.* durch Analyse von aus Hasenleber isoliertem natürlichem Material veröffentlicht.^[78, 181] Die so postulierten Strukturen für natürliches Galactosyl-Queuosin (GalQ) und Mannosyl-Queuosin (ManQ) sind zusammen mit den für den Strukturvorschlag zugrundeliegenden Daten in Abbildung 1.10 dargestellt. Der Strukturvorschlag basierte im Wesentlichen auf drei verschiedenen Faktoren. Zunächst wurde mittels Massenspektrometrie festgestellt, dass die Masse dieser modifizierten Q-Derivate sich um $m/z = 180$ von der Masse von Queuosin unterscheiden, dabei jedoch noch das für den Heterozyklus + Ribose typische Fragment aufweisen. Es wurde daher spekuliert, dass es sich bei diesen Derivaten um am Cyclopentenring mit einer Hexose modifizierte Derivate handeln müsste. In einem zweiten Schritt wurde die Identität der Zucker durch Ko-Elution mit Standards ermittelt. Hierzu erfolgte eine Behandlung der Derivate mit 1 M Schwefelsäure, wodurch eine Spaltung der glykosidischen Bindung erfolgte.

Der so erhaltene Zucker wurde anschließend über dünnenschichtchromatographische Ko-Elutionsexperimente mit Mannose bzw. Galactose nachgewiesen. Die Regiochemie der Verknüpfung wurde zuletzt über vergleichende ¹H-NMR-Spektroskopie mit Queuosin als Referenz durchgeführt. Hierzu wurde argumentiert, dass ein *shift* des Cyclopenten-Ring-Protons an der Position erfolgen muss, an der die Hexose gebunden vorliegt. Die hierzu angegebenen Daten sind jedoch ausschließlich für Mannosyl-Queuosin nachvollziehbar. Zuletzt wurde die Konformation des anomeren Zentrums aufgrund eines Vergleiches der chemischen Verschiebungen der anomeren Protonen mit bekannten Werten^[182] für α - bzw β -Mannose und -Galactose postuliert. Insgesamt wurde so ermittelt, dass es sich bei den untersuchten Queuosin-Derivaten um β -homoallyl-GalQ (**101**) und β -homoallyl-ManQ (**102**) handeln sollte. Die angegebenen Daten lassen jedoch Raum für Interpretation zu. Insbesondere eine Bestimmung der Konformation der Mannose mittels vergleichender NMR-Spektroskopie erscheint im Hinblick auf die bekannte Problematik der Unterscheidung von α - und β -Mannosiden mittels NMR-Spektroskopie^[183] aus heutiger Sicht problematisch. Eine entsprechende Widerlegung der postulierten Struktur von ManQ konnte bereits von P. Thumbs gezeigt werden.^[184]

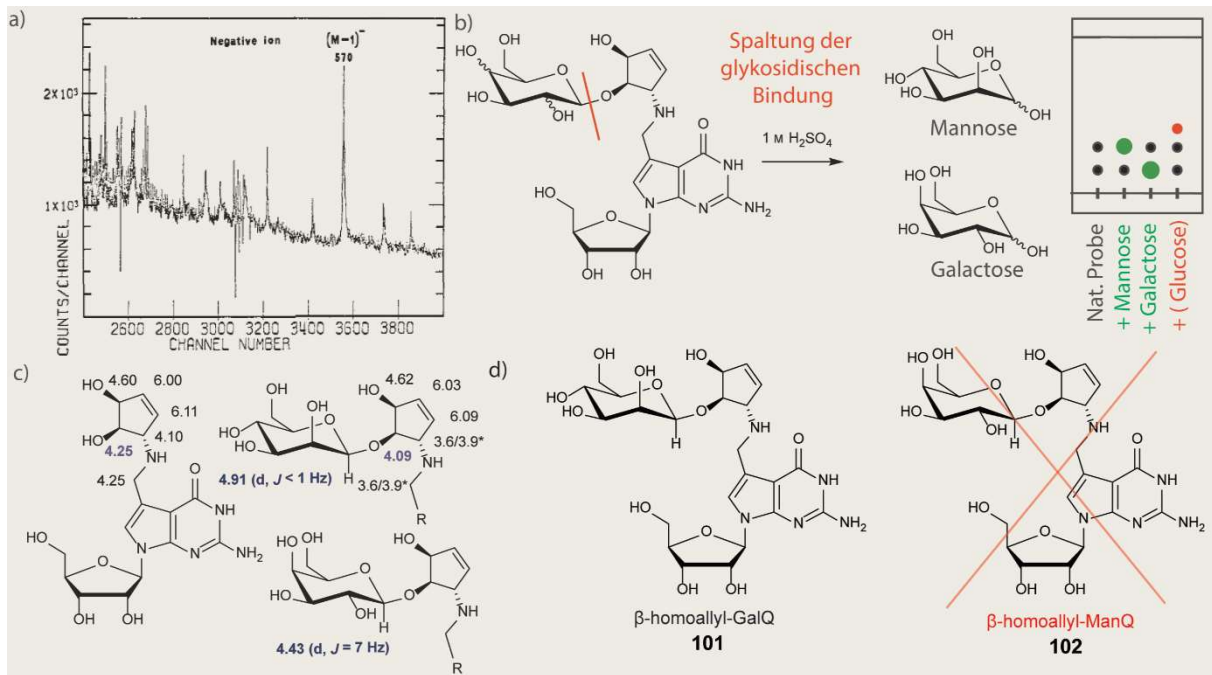


Abbildung 1.10: Strukturaufklärung von ManQ und GalQ; a) Plasma-Desorptions-Massenspektrum der Queuosin-Derivate zeigt eine um $m/z = 180$ schwerere Masse im Vergleich zu Queuosin (aus Kasai *et al.*)^[181]; b) Nachweis der Hexose erfolgte durch acidische Spaltung der glykosidischen Bindung und anschließende Ko-Elution mit Dünnschichtchromatographie; die dargestellte Dünnschichtchromatographie ist schematisch und gibt nicht die korrekten R_f -Werte wieder; c) Vergleichende $^1\text{H-NMR}$ -Analyse führte zur Postulierung einer Glykosylierung der homoallylischen Position sowie einer β -Konformation beider Zucker; d) Die aus der Arbeit resultierenden Strukturen von GalQ (**101**) und ManQ (**102**) besitzen beide β -homoallyl-Konnektivität. Der Strukturvorschlag **102** für natürliches ManQ konnte bereits von P. Thumbs widerlegt werden.^[184]

Über die Funktion dieser hypermodifizierten Queuosin-Derivate ist bis heute wenig bekannt. Es wurde *in vitro* gezeigt, dass Mannosyl-Queuosin für den Einbau in tRNA das Substrat GDP-Mannose benötigt.^[185] Die entsprechenden Glykosyltransferasen konnten jedoch bis heute nicht identifiziert werden. Für beide Modifikationen wurden bisher zur genauen Quantifizierung LC-MS-^[186] sowie auf Northern Blot Analysen mit einem denaturierenden APB-Gel beruhende Verfahren entwickelt.^[133] Dabei wurde vor allem die Modifikationsdynamik untersucht. Insgesamt ist jedoch die Funktion dieser Derivate bis heute weitgehend unaufgeklärt. Insofern sind sensitive Verfahren zur exakten Quantifizierung, welche etwa auf synthetischen Standards beruhen, von höchstem Interesse.

2 AUFGABENSTELLUNG

RNA-Modifikationen sind in den letzten Jahren immer mehr in den Fokus der Forschung gerückt, da Defekte in den natürlichen Modifikationsprozessen dieser auf vielfältige Weise eine Rolle bei verschiedensten Erkrankungen spielen können. Der exakte Einfluss und die Funktion vieler dieser Nucleoside ist bis heute ungeklärt.^[42] Das hypermodifizierte Nucleosid Queuosin und seine Derivate gehören mit zu den biosynthetisch aufwändigsten RNA-Modifikationen und der bedeutende Einfluss von Queuosin auf viele verschiedene zelluläre Prozesse konnte, wie bereits einleitend beschrieben, anhand mehrerer Beispiele gezeigt werden.^[87]

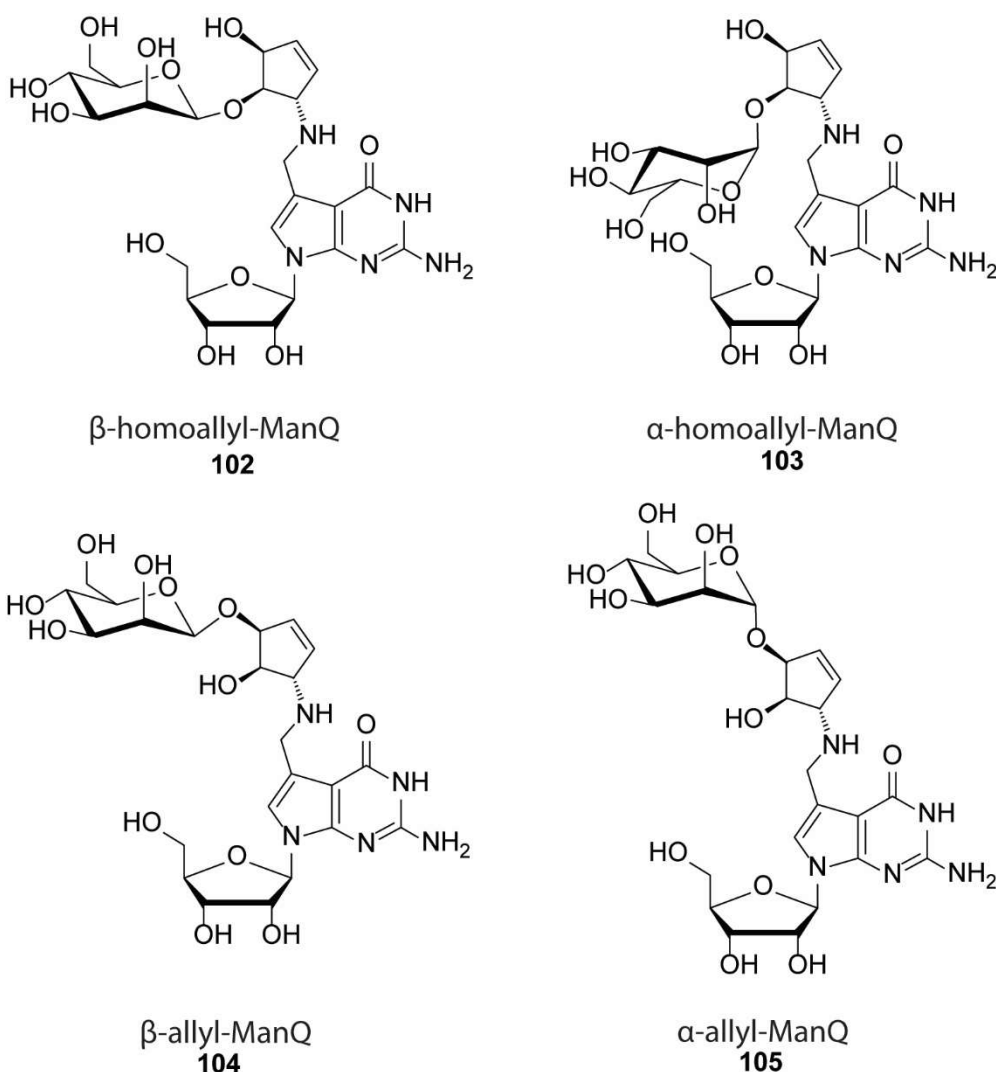


Abbildung 2.1: Strukturformeln aller vier möglichen Isomere **102-105**, welche für die Struktur von natürlichem ManQ in Betracht kommen.

Die glykosylierten Derivate ManQ und GalQ wurden bisher, obwohl bereits seit 1976 bekannt,^[181] kaum untersucht. Die Funktion dieser auch in Menschen auftretenden

Hypermodifikationen ist bis heute unbekannt. Ein erster Strukturvorschlag für GalQ und ManQ beruht aus heutiger Sicht auf einer eher unzureichenden Datenlage. Für ManQ konnte bereits gezeigt werden, dass die daraus abgeleitete Struktur nicht mit der tatsächlichen Struktur übereinstimmt.^[184] Ein Ziel dieser Arbeit war es, die Struktur von ManQ zu ermitteln. Hierzu sollte eine regio- und stereoselektive Synthese aller vier in Abbildung 2.1 gezeigten möglichen Isomere **102-105**, welche die potentiell möglichen Strukturen von ManQ darstellen, entwickelt werden. Anschließend sollte mittels LC-MS-Koinjektion der synthetische Standard mit dem natürlichen Material abgeglichen werden und so die Struktur des natürlichen ManQ aufgeklärt werden.

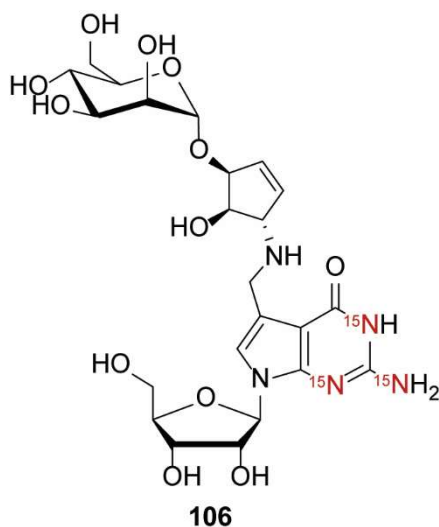


Abbildung 2.2: Mögliche Positionen für Isotopenlabel in Mannosylqueuosin für die Synthese eines $^{15}\text{N}_3$ -Standards von ManQ (**106**).

Durch die Aufklärung der Struktur sowie die Entwicklung einer synthetischen Route sollte die Herstellung eines Standards für massenspektrometrische Untersuchungen ermöglicht werden. Dies würde weitere biologische Experimente zur Ermittlung der Funktion von ManQ im Rahmen von exakten LC-MS-Quantifizierungsexperimenten ermöglichen. Hierzu sollte ein isotopenmarkierter Standard von Mannosyl-Queuosin entwickelt werden, um eine exakte Quantifizierung mithilfe der Isotopenverdünnungs-Massenspektrometrie-Technik zu ermöglichen. Die Struktur eines möglichen Isotopenstandards von ManQ ist in Abbildung 2.2 dargestellt.

Auch das in Prokaryoten auftretende Queuosin-Derivat Glutamyl-Queuosin sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden. Für GluQ konnte zwar belegt werden, dass es sich von Queuosin durch die Veresterung einer der beiden Hydroxygruppen mit Glutamat ableitet (vgl. Abbildung 1.8), die genaue Regioselektivität dieser Verknüpfung ist jedoch bis heute unbekannt. Zur Aufklärung der Struktur sollten vier verschiedene mögliche Isomere (siehe

Abbildung 2.3), welche als Struktur in Betracht kommen, synthetisiert und mittels LC-MS-Koinjektion mit dem aus *E. Coli* isolierten natürlichen Nucleosid verglichen werden. Hierbei sollte zunächst eine Synthese für die regioselektive Verknüpfung der Aminosäure entwickelt werden. Weiterhin musste für die Darstellung der GluQ-Derivate aufgrund der Labilität der Ester-Funktionalität eine neue Schutzgruppenstrategie sowie aufbauend darauf eine neue Synthese entwickelt werden.

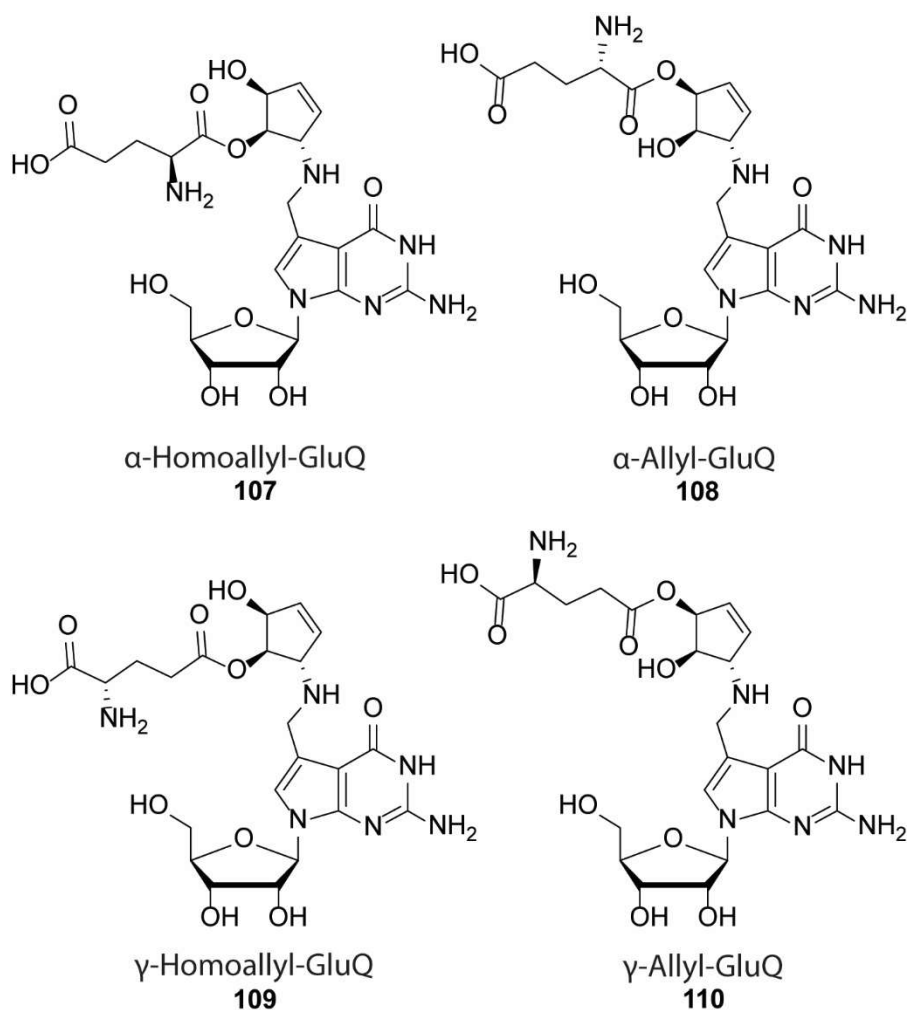


Abbildung 2.3: Strukturformeln aller vier möglichen Isomere 107-110, welche für die Struktur von natürlichem GluQ in Betracht kommen.

Da die an der Biosynthese der glykosylierten Queuosin-Derivate beteiligten Glykosylasen bisher unbekannt sind, sollte in einem ersten Experiment ermittelt werden, ob die Glykosylierung von Queuin ausschließlich auf tRNA-Ebene oder bereits im *soluble pool* der Zellen stattfindet. Hierzu sollte ein Queuin-Derivat dargestellt werden, welches nicht in die tRNA eingebaut werden kann. Zu diesem Zweck sollte an der N⁹-Position von Queuin eine Methylgruppe eingeführt werden, da in einem solchen Queuinderivat eine Transglykosylierung

durch die TGT *in vivo* verhindert werden würde. Hierzu musste zunächst eine Synthese für das nicht-literaturbekannte Queuinderivat N⁹-Methylqueuin (N⁹-MeQ, **111**) entwickelt werden. Anschließend sollte dieses Derivat an HEK293-Zellen verfüttert und mittels UHPLC-MS/MS eine Analyse des *soluble pool* der Zellen sowie der Gesamt-RNA der Zelle durchgeführt werden. Hierbei sollte vor allem geprüft werden, ob sich glykosyliertes N⁹-Methylqueuin (N⁹-MeQ) im *soluble pool* der Zellen findet, da dies auf eine potentielle *soluble pool*-Glykosylierung hindeuten würde. Das experimentelle Setup ist in Abbildung 2.4 dargestellt.

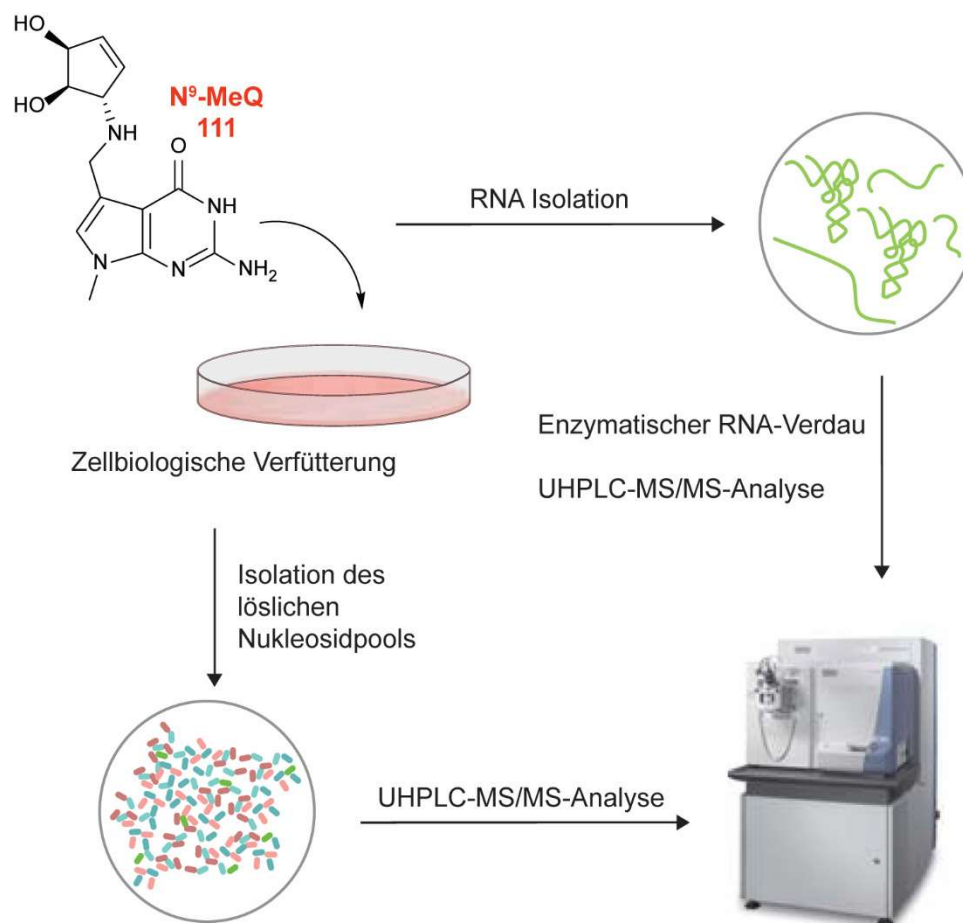


Abbildung 2.4: Workflow für die Untersuchung des Einflusses von N⁹-methylierten Queuin-Spezies auf den Queuin-Einbau sowie zur Identifizierung einer möglichen Glykosylierung von Queuin im löslichen Nucleosidpool.

Die Biosynthese der Queuosin-Derivate ManQ und GalQ ist bis heute ungeklärt. Obwohl bisher insgesamt wenig Daten zur Einführung dieser Modifikationen existieren, ist davon auszugehen, dass die Modifizierung ausgehend von Queuosin-modifizierter tRNA über entsprechende Glykosyltransferasen mithilfe von aktivierter Mannose oder Galactose erfolgt. Eine Identifizierung dieser bisher unbekanntes Glykosyltransferasen würde einen bedeutenden Schritt zum besseren Verständnis der RNA-Modifikationen GalQ und ManQ darstellen. Hierzu sollten im Rahmen dieser Arbeit erste Vorversuche zur Identifizierung dieser

Enzyme mithilfe eines Photocrosslinkers entwickelt werden. Da 6-thiofunktionalisierte Guanosinderivate bereits erfolgreich als Photocrosslinker eingesetzt wurden^[187-188], sollte die Verwendung von 6-Thioqueuin (6-ThioQ, **112**) in dieser Hinsicht getestet werden. Hierzu sollte zunächst 6-ThioQ synthetisch hergestellt werden. Anschließend sollte in ersten Vorversuchen die Eignung von 6-ThioQ als *photocrosslinker* in zellbiologischen Verfütterungsexperimenten geprüft werden. Eine Übersicht über die geplanten Versuche ist in Abbildung 2.5 dargestellt.

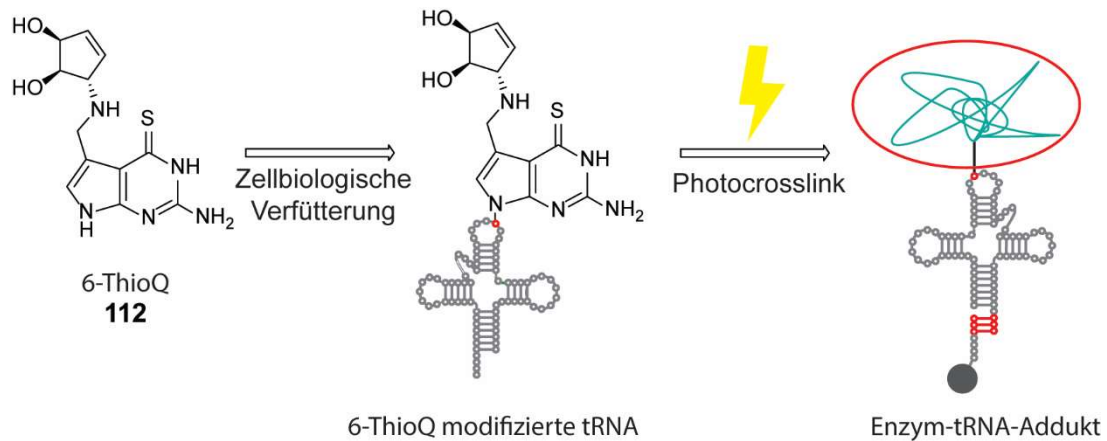


Abbildung 2.5: Geplante Vorgehensweise zur Identifizierung der bisher unbekanntenen Glycosyltransferasen, welche *in vivo* die Synthese von ManQ und GalQ katalysieren. 6-ThioQ **112** sollte hierzu als Photocrosslinker in zellbiologischen Experimenten eingesetzt werden. Hierzu wurden erste Eignungsversuche durchgeführt.

3 VERÖFFENTLICHTE ARBEITEN

3.1 Synthesis of Galactosyl-Queuosine and Distribution of Hypermodified Q-Nucleosides in Mouse Tissues

Dr. Peter Thumbs*, M. Sc. Timm Ensfelder*, M. Sc. Markus Hillmeier*, Dr. Mirko Wagner*, M. Sc. Matthias Heiss, M. Sc. Constanze Scheel, M. Sc. Alexander Schön, Dr. Markus Müller, Prof. Dr. Stylianos Michalakis, Dr. Stefanie Kellner, Prof. Dr. Thomas Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 12352 –12356.

*: Diese Autoren haben zu gleichen Teilen beigetragen.

Zusammenfassung

Die glykosylierten Q-Derivate Mannosyl- und Galactosylqueuosin finden sich, wie bereits in der Einleitung beschrieben, in verschiedensten Säugetierzellen, unter anderem auch in menschlichen Zellen. Obwohl ein erster Strukturvorschlag für diese Moleküle bereits 1976 von Kasai *et al.* erarbeitet wurde^[181], konnte diese Hypothese noch nicht abschließend bestätigt werden. Hierzu wurde in der vorliegenden Arbeit das Nucleosid Galactosyl-Queuosin totalsynthetisch hergestellt und mittels LC-MS-Koinjektion mit auf Nucleosidebene verdauter RNA aus Mäuseleber verglichen. Die postulierte Struktur konnte anhand der gezeigten Daten bestätigt werden. Weiterhin wurden mithilfe von Standards für Galactosyl-Queuosin und einem regionsomeren Standard für Mannosyl-Queuosin die Level beider Modifikationen sowie von unmodifiziertem Queuosin in verschiedenen Organen von unterschiedlich alten Mäusen gemessen. Dabei konnten organ- sowie altersspezifische Unterschiede der Level dieser Modifikationen beobachtet werden, wobei insbesondere eine Korrelation der Q-Level mit den verschiedenen Leveln an Proteinbiosyntheseaktivität in den einzelnen Organen auffällig war. Zuletzt wurden die Modifikationslevel pro tRNA in An- bzw. Abwesenheit von Queuin im Medium bestimmt. Es konnte eine starke Korrelation zwischen zugeführter Queuin-Menge und Modifizierungsgrad der einzelnen tRNAs gezeigt werden, wobei Mannosyl-Queuosin-Level jedoch relativ unverändert blieben. Zudem konnte bei Queuin-Mangel eine Hypomodifikation von tRNA^{Tyr} in Bezug auf Galactosyl-Queuosin festgestellt werden. Insgesamt zeigt die Studie nicht nur eine erste synthetische Route für Galactosyl-Queuosin auf, sondern belegt auch die Struktur dieser Verbindung und legt erste Daten zu den Modifikationsleveln der verschiedenen hypermodifizierten Q-Derivate in lebendem Gewebe vor.

Autorenbeitrag

Bei dieser Studie war ich für die Entwicklung und Synthese eines neuen unbekanntes regioisomeren Standards zur Quantifizierung von Mannosyl-Queuosin verantwortlich. Dieser war essentiell, um genaue Daten bezüglich der Modifikationslevel von Mannosyl-Queuosin in den einzelnen Gewebetypen zu erhalten. Die Synthese dieses Standards ist in Kapitel 3.2 gezeigt. Dr. Peter Thumbs entwickelte die Synthese von Galactosyl-Queuosin und führte diese für die veröffentlichte Studie durch. Timm Ensfelder war für die Handhabung der Mausgewebeproben sowie die Isolierung von RNA aus diesen verantwortlich. Dr. Mirko Wagner führte die Aufbereitung die massenspektrometrische Analyse der RNA-Proben sowie die entsprechende Quantifizierung in den verschiedenen Organen durch. Matthias Heiss führte Studien zum Modifizierungsgrad der einzelnen RNAs in Zellkultur mit HEK293 Zellen durch. Dabei übernahm er auch die massenspektrometrische Auswertung dieser Experimente. Constanze Scheel führte die Aufzucht und Ernte der für die Organproben verwendeten Mäuse durch. Alexander Schön führte Re-Synthesen von Galactosyl-Queuosin-Standard aus Vorläufern durch, welcher für die Studie verwendet wurde. Prof. Stylianos Michalakis, Dr. Stefanie Kellner, Dr. Markus Müller und Prof. Thomas Carell waren für die Planung der Experimente sowie die Koordination der einzelnen Projektteile verantwortlich.

Lizenz

Kopie der Open Access Publikation auf Basis der Creative Commons Attribution-NonCommercial License (CC BY-NC 4.0), die den nicht-kommerziellen Abdruck des Artikels erlaubt.

Artikel einsehbar unter:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/anie.202002295>

Lizenz einsehbar unter:

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

Die *Supporting Information* dieser Veröffentlichung ist im Anhang (Kapitel 7.1) zu finden.



Hypermodified Nucleosides Hot Paper

Synthesis of Galactosyl-Queuosine and Distribution of Hypermodified Q-Nucleosides in Mouse Tissues

Peter Thumbs⁺, Timm T. Ensfelder⁺, Markus Hillmeier⁺, Mirko Wagner⁺, Matthias Heiss, Constanze Scheel, Alexander Schön, Markus Müller, Stylianos Michalakis, Stefanie Kellner, and Thomas Carell*

In memory of Rolf Huisgen

Abstract: Queuosine (Q) is a hypermodified RNA nucleoside that is found in tRNA^{His}, tRNA^{Asn}, tRNA^{Tyr}, and tRNA^{Asp}. It is located at the wobble position of the tRNA anticodon loop, where it can interact with U as well as C bases located at the respective position of the corresponding mRNA codons. In tRNA^{Tyr} and tRNA^{Asp} of higher eukaryotes, including humans, the Q base is for yet unknown reasons further modified by the addition of a galactose and a mannose sugar, respectively. The reason for this additional modification, and how the sugar modification is orchestrated with Q formation and insertion, is unknown. Here, we report a total synthesis of the hypermodified nucleoside galactosyl-queuosine (galQ). The availability of the compound enabled us to study the absolute levels of the Q-family nucleosides in six different organs of newborn and adult mice, and also in human cytosolic tRNA. Our synthesis now paves the way to a more detailed analysis of the biological function of the Q-nucleoside family.

In all three domains of life, RNA contains next to the canonical bases (A, C, G, and U) a large variety of modified nucleosides.^[1] Most of these are chemically simple derivatives

How to cite: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 12352–12356
International Edition: doi.org/10.1002/anie.202002295
German Edition: doi.org/10.1002/ange.202002295

[*] Dr. P. Thumbs,^[†] M. Sc. T. T. Ensfelder,^[†] M. Sc. M. Hillmeier,^[†] Dr. M. Wagner,^[†] M. Sc. M. Heiss, M. Sc. A. Schön, Dr. M. Müller, Dr. S. Kellner, Prof. Dr. T. Carell
Department of Chemistry
Ludwig-Maximilians-Universität München
Butenandtstr. 5–13, 81377 Munich (Germany)
E-mail: Thomas.Carell@lmu.de
Homepage: <https://www.carellgroup.de>
M. Sc. C. Scheel, Prof. Dr. S. Michalakis
Department of Pharmacy
Ludwig-Maximilians-Universität München
Butenandtstr. 5–13, 81377 Munich (Germany)
Prof. Dr. S. Michalakis
Department of Ophthalmology
Ludwig-Maximilians-Universität München
Mathildenstr. 8, 80336 Munich (Germany)

[†] These authors contributed equally to this work.

Supporting information and the ORCID identification number(s) for the author(s) of this article can be found under: <https://doi.org/10.1002/anie.202002295>.

© 2020 The Authors. Published by Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

of the canonical nucleosides. They often carry methylations at various positions of the heterocycle or the sugar, but others are heavily modified, involving multistep biosynthesis pathways. Queuosine **1** (Q) is one of the most complex of these so-called hypermodified nucleosides. (Figure 1). It is found in a large number of different species and also present in the cytosolic and mitochondrial tRNA^{Tyr}, tRNA^{Asp}, tRNA^{His}, and tRNA^{Asn} of humans.^[2–8] Interestingly, in the human cytosolic tRNA^{Tyr} and tRNA^{Asp}, Q is further modified with galactose (galQ) and mannose (manQ), respectively.^[9,10] In these tRNAs, the sugar is proposed to be attached to the homoallylic hydroxyl group of the cyclopentene ring system that is linked to the 7-deazaheterocycle.^[11] While the chemical synthesis of Q has been achieved,^[12–14] no reports exist about the preparation of its sugar-modified derivatives galQ **2** and manQ **3**, which has hampered investigations of their biological role. Accordingly, the exact function of galQ and manQ as part of the human cytosolic tRNA^{Tyr} and tRNA^{Asp} is unknown. In addition, we do not know to which extent the corresponding tRNAs are modified with different Q-family nucleosides, and how the G/Q-exchange process and the sugar derivatization is orchestrated. Furthermore, quantitative data about Q-modification levels in different organs is also lacking.

To address these questions, we performed the first total synthesis of galactosyl-queuosine **2**. This allowed us to confirm its proposed structure and to report the absolute levels of all Q-family members in different tissues of newborn and adult mice. Finally, we were able to measure to which extent human cytosolic tRNAs are modified with the three Q-family nucleosides.

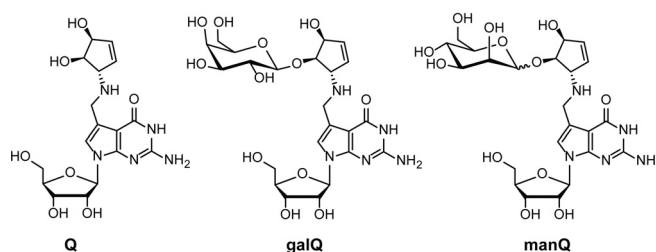


Figure 1. Depiction of the hypermodified RNA nucleoside queuosine (**1**, Q) and of the galactosylated and mannosylated Q derivatives galQ (**2**) and manQ (**3**) present in human cytosolic tRNA^{Tyr} and tRNA^{Asp}, respectively.

Galactosyl-Q **2** was constructed from three appropriately protected parts (Figure 2): The 7-formyl-7-deazaguanosine **6** was prepared, as reported by us, with Bz-protected hydroxyl groups at the ribose, and a pivaloylate protection group at the 2-amino residue.^[14] The galactose sugar was introduced as a TBS- and 2-chloroisobutyryl-protected trichloroacetimidate **4**, and the cyclopentene unit **5** was used with Fmoc-protected allyl amine and a TBS-protected allylic alcohol. We choose the 2-chlorobutyryl protecting group for the sugar-donor **4** because of its bulkiness in order to avoid unwanted orthoester formation as the main product of the glycosylation reaction, a strategy reported by Szpilman et al.^[15]

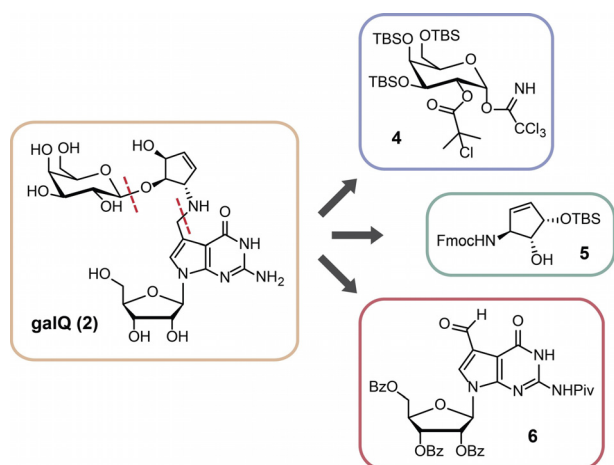
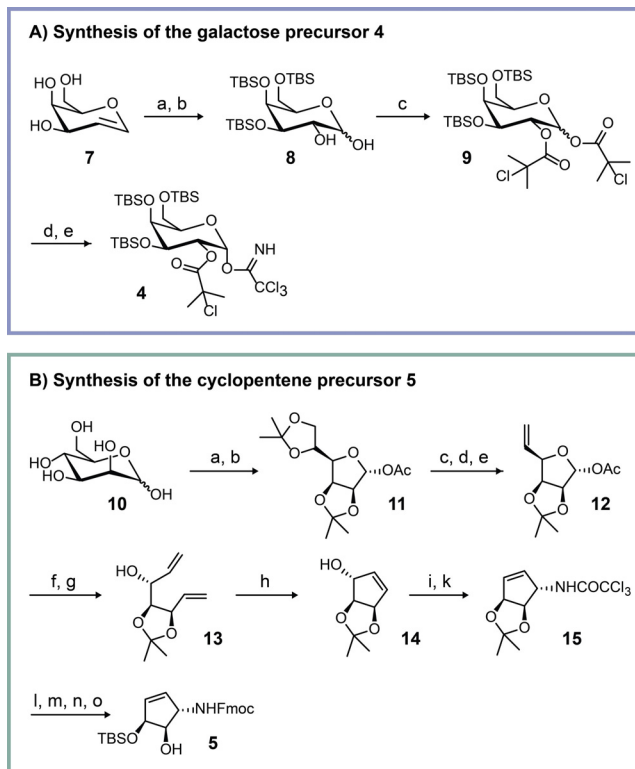


Figure 2. Retrosynthetic analysis for galQ **2**, showing the three key precursors **4**, **5**, and **6**.

The galactosyl-donor **4** itself was prepared from D-galactal **7**, which was first TBS-protected (Scheme 1 A).^[16] *cis*-Dihydroxylation of the double bond from the sterically less shielded side furnished compound **8**.^[17] This step was followed by protection of the two newly introduced hydroxyl groups with 2-chloroisobutyric acid to give the galactose-donor precursor **9**. Deprotection of the anomeric hydroxyl group with hydrazine provided the galactose precursor with a free anomeric hydroxyl group which was subsequently converted into the trichloroacetimidate donor **4** using a standard procedure.

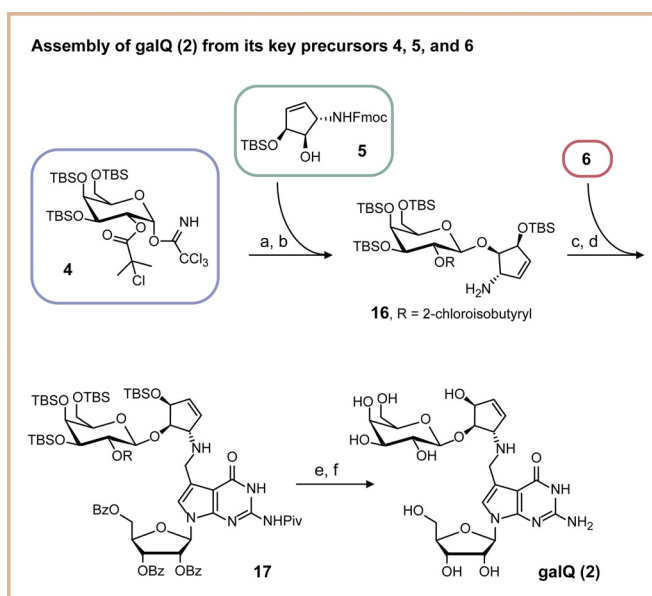
Scheme 1 B shows the synthesis of the protected 5(*S*)-amino-3(*S*),4(*R*)-dihydroxycyclopent-1-ene **5**. The starting point was mannose **10**,^[18] which was converted as reported into the double-acetonide-protected mannofuranoside **11** with an acetyl-protected anomeric center in two steps. Selective cleavage of the acetonide protecting group at the primary hydroxyl group, followed by an orthoester-based elimination, allowed introduction of a terminal double bond (**12**). Anomeric deprotection, followed by a Wittig reaction, provided the precursor **13** for the ring-closing metathesis reaction. The free hydroxyl group in **14** was then the starting point for an Overman rearrangement, providing the amine protected as the trichloroacetamide-protected amine **15**.^[19] Cleavage of this protecting group with NaOH was followed by Fmoc protection of the free amine using a standard procedure.



Scheme 1. Synthesis of the key precursors **4** and **5**. A) Synthesis of the galactose precursor **4**: a) TBSCl, imidazole, DMF, 55 °C, 2 d; b) K₂OsO₄·2H₂O, NMO, THF, *t*-BuOH, H₂O, rt, 4 h; c) 2-chloroisobutyric acid, DIC, DMAP, 0 °C, 30 min → rt, 2 h; d) N₂H₄·AcOH, DMF, −40 °C to rt, 3 h; e) Cl₃CCN, Cs₂CO₃, DCM, rt, 4 h. B) Synthesis of the cyclopentene precursor **5**: a) 2,2-dimethoxypropane, acetone, *p*-TsOH, rt, 1 h; b) Ac₂O, pyridine, 0 °C → rt, 18 h; c) aq. AcOH (66%), 55 °C, 4 h; d) triethylorthoformate, 100 °C, 30 min; e) Ac₂O, 130 °C, 5 h; f) *t*-BuOK, MeOH, 20 min; g) NaH, DMSO, Ph₃PMeBr, THF, rt → 68 °C, 2 h; h) Grubbs(I) catalyst, DCM, rt, 26 h; i) Cl₃CCN, DBU, DCM, rt, 20 min; j) *o*-xylene, 150 °C, 5 h; k) NaOH, MeOH, rt, overnight; m) Fmoc-OSu, NaHCO₃, H₂O, 1,4-dioxane; n) AcOH, H₂O, EtOAc, 50 °C, 24 h; o) TBSOTf, DMF, −55 °C, 15 min.

We finally opened the acetal and protected the allylic hydroxyl group selectively with TBS-OTf in DMF at −55 °C. In this reaction, the temperature is particularly important. When the reaction was performed at higher temperatures and with prolonged reaction times, we noted selective protection of the homoallylic position.

The assembly of the galQ nucleoside **2** from the precursors **4–6** is shown in Scheme 2. We first galactosylated the cyclopentene derivative **5**. This sterically demanding step was successfully achieved by activation of the trichloroacetimidate with 2-chloro-6-methylpyridinium triflate in dichloromethane at room temperature.^[15,20] We achieved selective formation of the β-configured galactoside due to the neighboring-group effect. Subsequent cleavage of the Fmoc protection group gave product **16**, which was followed by a two-step reductive amination. First, the imine was formed in benzene, subsequently followed by reduction of the imine with NaBH₄ in methanol to afford protected galQ **17**. In a two-step deprotection protocol, we first removed the TBS groups with HF·NEt₃, followed by cleavage of ester-type



Scheme 2. Depiction of the galQ **2** assembly from the three key precursors **4**, **5**, and **6**. a) 2-Chloro-6-methylpyridinium triflate, DCM, rt, 2 h; b) DBU, MeCN, rt, 1.25 h; c) benzene, rt, 5 h; d) NaBH₄, MeOH, 0 °C, 1 h; e) HF·NEt₃, DCM, rt, 4 d; f) NaOMe, MeOH, rt, 2 d.

protecting groups under Zemplén conditions. For the cleavage of the pivaloyl amide protecting group, we needed to use 0.5 M NaOMe in methanol. This strategy provided the target compound **2** with an overall yield of 0.5% in 20 linear steps from the mannose starting molecule for the cyclopentene unit. The synthesis provided a sufficient amount of material for all further investigations.

We next investigated whether our synthetic β -homoallylic galQ **2** is identical with the natural product, because analytical data available for galQ was very limited.^[11] For this experiment, we isolated total RNA from mouse liver and performed an enzymatic digestion of the isolated RNA to the nucleoside level. This nucleoside mixture was analyzed by HPLC-MS. Indeed, under our HPLC conditions, we detected two signals with the appropriate m/z value for galQ and manQ in the extracted ion chromatogram with a retention time of around 32 and 35 min. No other peaks were present in the same m/z range. We next co-injected our synthetic β -homoallylic galQ **2**, which led to a marked increase of the second signal with a retention time of about 35 min (Figure 3). This result unambiguously showed that our synthetic compound galQ **2** and the co-eluting natural compound with the same mass are identical. Therefore, this natural compound is indeed a β -galactosylated Q derivative. Taken together, our experiment confirms the proposed chemical structure of galQ, in which the bond between the homoallylic hydroxyl group of queuosine and galactose is in β -configuration.

Having identified the HPLC retention time of galQ and therefore also of manQ, we finally were able to determine the absolute levels of galQ, manQ, and Q in different tissues of newborn (postnatal day 1; pd1) and adult mice (postnatal month 3; pm3). For an initial broad study, we measured the respective nucleoside levels in cortex, cerebellum, liver,

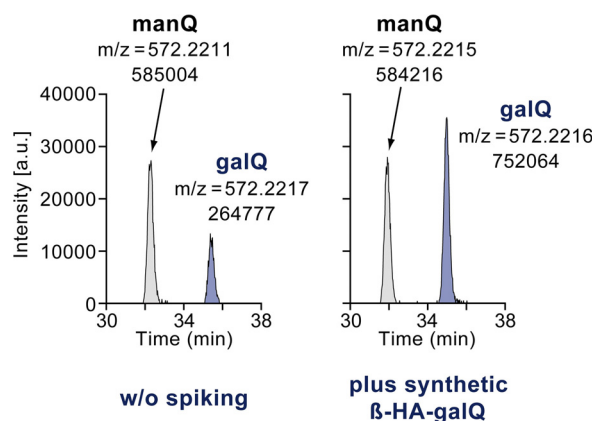


Figure 3. Results of a co-injection study confirming the identity of our synthetic β -homoallylic-galQ **2** and the natural product. Depicted are the extracted-ion chromatograms ($m/z = 572.2148$ – 572.2248) of two HPLC-MS analyses, either with (right) or without (left) prior spiking of the synthetic galQ **2**. The exact mass $[M+H]^+$ of galQ (and manQ) is 572.2198 u, showing a perfect match to the two MS peaks observed by us with less than 4 ppm deviation.

kidney, heart, and spleen, using the same RNA isolation and digestion protocol as for the co-injection experiment (Figure 4A).

From our data it is clearly evident that the levels of all three modifications (galQ, manQ, and Q) generally increase with age. This effect is by far most pronounced with Q, while galQ and manQ only show a modest increase, if at all. Furthermore, and for all three modifications investigated, we see differences between the six organs at the same age. Heart, followed by brain tissues, contains the largest levels of Q and its sugar-modified derivatives, followed by kidney, liver, and spleen. In general, the changes of the modification levels observed by us positively correlate with the respective organ-specific protein-synthesis demands, as we have shown before.^[7] Nevertheless, there are some prominent outliers. These outliers (e.g. heart tissue) seem to rather correlate with the organ-specific density of mitochondria. It was shown before that the Q-base in mitochondrial tRNA^{Tyr} and tRNA^{Asp} is not sugar-modified.^[8] We therefore speculate that the organ-specific differences in the levels of galQ, manQ, and Q are due to a combination of two independent effects: The organ-specific protein-synthesis ratio and the organ-specific mitochondrial density.

It is well-established that for biosynthesis of Q (and its sugar-modified derivatives), eukaryotes have to take up the queuine base from their diet,^[21,22] mammals thereby profiting from their gut microbiome.^[23] We therefore speculate that the low levels of Q-family nucleosides in newborn mice observed here may be caused by a lack of queuine supply in newborn mice, which only later establish their microbiome. Furthermore, high rates of cell division and tissue development in young mice may cause additional queuine supply problems.

To further study the influence of queuine availability on Q-family modification levels, cell culture experiments were performed: Human embryonic kidney cells (HEK 293T) were grown either in culture medium supplemented with 20 nM queuine (enriched medium) or in medium without additional

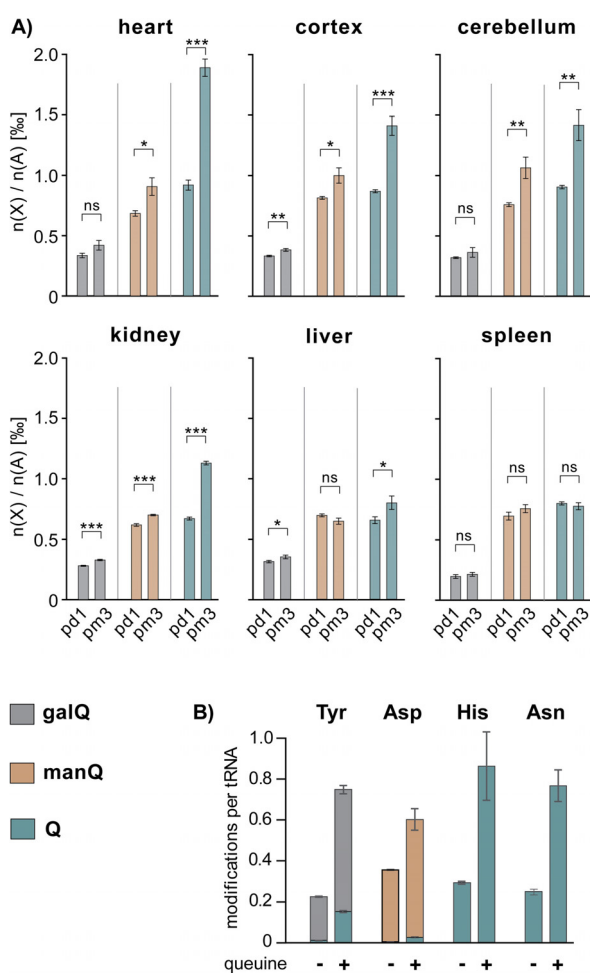


Figure 4. A) Absolute levels of galQ **2**, manQ **3**, and Q **1** in six different organs of newborn (postnatal day 1, pd1) and adult (postnatal month 3, pm3) mice. Values are given as number of xQ modifications n(X) per 1000 adenosine nucleosides n(A). Error bars represent the standard deviation of three biological replicates. For statistical analysis, Student's unpaired two-tailed t-test was used. n.s.: not significant, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$. B) Number of galQ, manQ, and Q modifications per cytosolic tRNA^{Tyr}, tRNA^{Asp}, tRNA^{His}, and tRNA^{Asn} from human HEK 293T cells, respectively. queueine +: cells grown in queuine-enriched medium, queueine -: cells grown in standard medium. Values are given as average number of modifications per tRNA molecule. Error bars represent the standard deviation of three biological replicates.

queuine (standard medium). Queuine is the substrate of the TGT enzyme, which performs the exchange of a guanine base by the queuine heterocycle during tRNA maturation.^[24–26] From both cell populations, cytosolic tRNA^{Tyr}, tRNA^{Asp}, tRNA^{His}, and tRNA^{Asn} were isolated and digested to the nucleoside level. For each of these four individual tRNA species, the number of galQ, manQ, and Q modifications per tRNA was then determined by a mass-spectrometry-based isotope-dilution method using the reference compound synthesized here (see the Supporting Information).

Indeed, our data show that the extent of Q-modification in the wobble position of cytosolic tRNA^{Tyr}, tRNA^{Asp}, tRNA^{His}, and tRNA^{Asn} is strongly dependent on queuine availability (Figure 4B).^[24] In the case of tRNA^{Tyr} (galQ), tRNA^{His}, and

tRNA^{Asn} (Q), the difference in modification extent between cells grown in enriched versus standard medium is threefold, while for tRNA^{Asp} (manQ) it is 1.7 fold. These results are well in line with our hypothesis and might therefore explain the lower modification levels in newborn mice. Of note, in all of our experiments even a sufficient queuine supply did not lead to fully modified tRNAs. This might again be an indication of the modification machinery lagging behind the de novo synthesis of tRNA in highly proliferating cells.

Furthermore, we detected a Q-only-modified tRNA^{Tyr} form in our experiments lacking the galactose sugar, while tRNA^{Asp} was always found to be either modified with manQ or completely unmodified. It seems that, in our experimental setup, mannosylation of tRNA^{Asp} may be more tightly connected to G/Q-exchange than the galactosylation of Q-only-bearing tRNA^{Tyr}. Testing this exciting hypothesis is an interesting starting point for future studies.

In summary, we here report the first total synthesis of the human natural product galactosyl-queuosine **2**. Our synthetic material allowed us to confirm the proposed galQ structure by direct comparison with natural material, and we show that this hypermodified nucleoside is present in all tissues of newborn and adult mice. We furthermore report the absolute levels of all three Q-family members in six different mouse organs and in human cytosolic tRNAs. Taken together, our results confirm the crucial importance of tRNA galQ and manQ modification.

Acknowledgements

This work was funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation) -Project-ID 255344185 – SPP 1784; Project-ID 325871075 – SFB 1309, and Project-ID 393547839 – SFB 1361. This project has received additional funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under the Marie Skłodowska-Curie grant agreement No. 765266 (LightDyNAMics) and from the European Research Council (ERC) under the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No 741912 (EPiR).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Keywords: galactosylation · mannosylation · mannosyl-queuosine · queuosine · RNA modifications

- [1] P. Boccaletto, M. A. Machnicka, E. Purta, P. Piątkowski, B. Bagiński, T. K. Wirecki, V. de Crécy-Lagard, R. Ross, P. A. Limbach, A. Kotter, M. Helm, J. M. Bujnicki, *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, D303–D307.
- [2] F. Harada, S. Nishimura, *Biochemistry* **1972**, *11*, 301–308.
- [3] H. Kasai, Y. Kuchino, K. Nihei, S. Nishimura, *Nucleic Acids Res.* **1975**, *2*, 1931–1940.
- [4] H. Grosjean, M. Sprinzl, S. Steinberg, *Biochemie* **1995**, *77*, 139–141.

- [5] A. Costa, J.-P. Pais de Barros, G. Keith, W. Baranowski, J. Desgrès, *J. Chromatogr. B* **2004**, *801*, 237–247.
- [6] D. Globisch, D. Pearson, A. Hienzsch, T. Brückl, M. Wagner, I. Thoma, P. Thumbs, V. Reiter, A. C. Kneuttinger, M. Müller, S. A. Sieber, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 9739–9742; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 9913–9916.
- [7] C. Brandmayr, M. Wagner, T. Brückl, D. Globisch, D. Pearson, A. C. Kneuttinger, V. Reiter, A. Hienzsch, S. Koch, I. Thoma, P. Thumbs, S. Michalakis, M. Müller, M. Biel, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 11162–11165; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 11324–11328.
- [8] T. Suzuki, T. Suzuki, *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, 7346–7357.
- [9] N. Okada, N. Shindo-Okada, S. Nishimura, *Nucleic Acids Res.* **1977**, *4*, 415–423.
- [10] N. Okada, S. Nishimura, *Nucleic Acids Res.* **1977**, *4*, 2931–2937.
- [11] H. Kasai, K. Nakanishi, R. D. Macfarlane, D. F. Torgerson, Z. Ohashi, J. A. McCloskey, H. J. Gross, S. Nishimura, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 5044–5046.
- [12] T. Ohgi, T. Kondo, T. Goto, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 3629–3633.
- [13] T. Kondo, K. Okamoto, T. Ohgi, T. Goto, *Tetrahedron* **1986**, *42*, 207–213.
- [14] F. Klepper, E.-M. Jahn, V. Hickmann, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 2325–2327; *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 2377–2379.
- [15] A. M. Szpilman, E. M. Carreira, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 1305–1307.
- [16] D. Crich, T. J. Ritchie, *Carbohydr. Res.* **1989**, *190*, C3–C6.
- [17] U. P. Singhi, R. K. Brown, *Can. J. Chem.* **1971**, *49*, 1179–1186.
- [18] D. Vonlanthen, C. J. Leumann, *Synthesis* **2003**, 1087–1090.
- [19] H. Ovaa, B. Lastdrager, J. D. C. Codée, G. A. van der Marel, H. S. Overkleeft, J. H. van Boom, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **2002**, 2370–2377.
- [20] A. M. Szpilman, J. M. Manthorpe, E. M. Carreira, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 4339–4342; *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 4411–4414.
- [21] J. P. Reyniers, J. R. Pleasants, B. S. Wostmann, J. R. Katze, W. R. Farkas, *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 11591–11594.
- [22] J. R. Katze, B. Basile, J. A. McCloskey, *Science* **1982**, *216*, 55–56.
- [23] W. R. Farkas, *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 6832–6835.
- [24] N. Okada, F. Harada, S. Nishimura, *Nucleic Acids Res.* **1976**, *3*, 2593–2604.
- [25] N. Shindo-Okada, N. Okada, T. Ohgi, T. Goto, S. Nishimura, *Biochemistry* **1980**, *19*, 395–400.
- [26] C. Boland, P. Hayes, I. Santa-Maria, S. Nishimura, V. P. Kelly, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 18218–18227.
- [27] F. Tuorto, C. Legrand, C. Cirzi, G. Federico, R. Liebers, M. Müller, A. E. Ehrenhofer-Murray, G. Dittmar, H.-J. Gröne, F. Lyko, *EMBO J.* **2018**, *37*, e99777.

Manuscript received: February 14, 2020

Accepted manuscript online: March 11, 2020

Version of record online: April 21, 2020

3.2 Synthesis and Structure Elucidation of the human tRNA Nucleoside Mannosyl-Queuosine

Markus Hillmeier, Dr. Mirko Wagner, Dr. Timm Ensfelder, E. Korytiaková, Dr. Peter Thumbs, Dr. Markus Müller, Prof. Dr. Thomas Carell *Nat. Comm.* **2021**, 12, 7132.

Zusammenfassung

Nach der Entdeckung von Mannosyl-Queuosin wurde bereits 1976 ein erster Strukturvorschlag für diese RNA-Modifikation basierend auf NMR- und massenspektrometrischen Studien von aus Hasenleber extrahiertem biologischem Material durchgeführt (vgl. Kapitel 1.6.2). Dabei sollte Mannosyl-Queuosin die in Abbildung 1.10 gezeigte Struktur aufweisen, wobei eine Mannoseeinheit an der homoallylischen Position der Cyclopenteneinheit gebunden vorliegt und eine β -Konfiguration am anomeren Zentrum der Mannoseeinheit aufweist.^[181] Um diesen Strukturvorschlag verifizieren zu können wurde im Rahmen der hier vorgestellten Arbeit eine Syntheseroute für die Verbindung mit dieser postulierten Struktur entwickelt und durch LC-MS-Koinjektion mit natürlichem Material aus Mäuseleber verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass der zuvor postulierte Strukturvorschlag nicht mit dem natürlichen Material identisch ist. Da aufgrund der massenspektrometrischen Daten die Modifikation von Queuosin mit einer Hexose in dem glykosylierten Queuosin-Derivat eindeutig ist, wurde zunächst geprüft, ob es sich bei dieser Hexose tatsächlich um Mannose handelt. Hierzu wurden Fütterungsexperimente mit isotopenmarkierten Zuckerderivaten an HEK293-Zellen durchgeführt, wobei der Einbau des schweren Zuckers jeweils mittels LC-MS beobachtet wurde. Es konnte gezeigt werden, dass die Fütterung schwerer $^{13}\text{C}_6$ -markierter Mannose zu einem dramatischen Anstieg an isotopenmarkiertem glykosyliertem Queuosin führte, während die Verwendung schwerer Glucose bzw. Galactose nur einen leichten Anstieg aufwies, welcher auf die Interkonversion der Zuckerderivate unter biologischen Bedingungen zurückzuführen ist. Nachdem so bestätigt wurde, dass es sich bei dem glykosylierten Derivat tatsächlich um ein Mannosyl-Queuosin handelt, erschienen 3 verschiedene Isomere möglich (vgl. Abbildung 2.1), welche totalsynthetisch dargestellt und anschließend mit dem natürlichen Material verglichen wurden. Dabei gelang eine stereo- und regioselektive Totalsynthese aller Isomere. Es konnte gezeigt werden, dass natürliches Mannosyl-Queuosin eine α -allyl-Konnektivität aufweist und so deutlich von der zuerst postulierten Struktur abweicht. Insgesamt konnte eine erste Totalsynthese dieser komplexen RNA-Hypermodifikation sowie von 3 verschiedenen Regio- bzw. Stereoisomeren zusammen mit einer Aufklärung der Struktur dieser RNA-Modifikation erzielt werden.

Autorenbeitrag

Im Rahmen dieser Studie führte ich die Synthese der vier verschiedenen Isomere, welche als Strukturvorschlag für Mannosyl-Queuosin in Frage kamen, durch. Hierbei entwickelte ich neue Methoden zur regioselektiven Schützung der Cyclopenteneinheit sowie zur stereoselektiven Einführung der Mannosyl-Einheit. Weiterhin führte ich erste Ko-Injektionsstudien zum Strukturabgleich mit natürlichem Mannosyl-Queuosin durch. Dr. Mirko Wagner führte die abschließenden Ko-Injektionsstudien durch, wie sie in der Publikation gezeigt sind, durch. Dr. Mirko Wagner und Eva Korytiaková entwickelten massenspektrometrische Methoden zur Auftrennung der vier Isomere mittels UHPLC, wodurch ein Vergleich aller synthetischen Standards mit der natürlichen Probe ermöglicht wurde. Dr. Timm Ensfelder führte die Isotopenfütterungsexperimente durch, welche zur Bestätigung der Modifikation von Queuosin mit Mannose führten. Dr. Peter Thumbs entwickelte erste Synthesen für zwei der untersuchten Isomere und legte mit seinen Erkenntnissen den Grundstein für die synthetische Arbeit. Dr. Markus Müller war an der Planung der Experimente sowie dem Verfassen des Textes beteiligt. Prof. Dr. Thomas Carell war für die Koordination des Projekts, die Planung der Experimente und das Verfassen der wissenschaftlichen Abhandlung verantwortlich.

Lizenz

Kopie der Open Access Publikation auf Basis der Creative Commons Attribution-NonCommercial License (CC BY-NC 4.0), die den nicht-kommerziellen Abdruck des Artikels erlaubt.

Artikel einsehbar unter:



<https://www.nature.com/articles/s41467-021-27371-9>

Lizenz einsehbar unter:

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

Die *Supporting Information* dieser Veröffentlichung ist im Anhang (Kapitel 7.2) zu finden.

Synthesis and structure elucidation of the human tRNA nucleoside mannosyl-queuosine

Markus Hillmeier¹, Mirko Wagner¹, Timm Ensfelder¹, Eva Korytiakova¹, Peter Thumbs¹, Markus Müller ¹ & Thomas Carell ¹✉

Queuosine (Q) is a structurally complex, non-canonical RNA nucleoside. It is present in many eukaryotic and bacterial species, where it is part of the anticodon loop of certain tRNAs. In higher vertebrates, including humans, two further modified queuosine-derivatives exist - galactosyl- (galQ) and mannosyl-queuosine (manQ). The function of these low abundant hypermodified RNA nucleosides remains unknown. While the structure of galQ was elucidated and confirmed by total synthesis, the reported structure of manQ still awaits confirmation. By combining total synthesis and LC-MS-co-injection experiments, together with a metabolic feeding study of labelled hexoses, we show here that the natural compound manQ isolated from mouse liver deviates from the literature-reported structure. Our data show that manQ features an α -allyl connectivity of its sugar moiety. The yet unidentified glycosylases that attach galactose and mannose to the Q-base therefore have a maximally different constitutional connectivity preference. Knowing the correct structure of manQ will now pave the way towards further elucidation of its biological function.

¹Department Chemie, Ludwig-Maximilians-Universität München, Butenandtstraße 5-13, 81377 München, Germany. ✉email: thomas.carell@cup.uni-muenchen.de

Ribonucleic acid (RNA) is a central molecule of life, linking the genotype to the phenotype by integrating both catalytic and coding properties in the synthesis of proteins^{1,2}. To fulfil the plethora of functions known for RNA today, a huge chemical diversity has developed regarding the nucleobases through the evolution of life^{3,4}. The most densely modified RNA molecules are the tRNAs⁵. Those small adaptor molecules feed the required amino acids to the growing peptide chain in the ribosome. Of particular interest are the non-canonical nucleosides that are found in the anticodon loop of tRNAs, in particular at position 34, known as the Wobble position of the anticodon⁶. Here, any chemical modification has a direct impact on the coding potential of the tRNA^{6–9}. Queuosine (1, Q, Fig. 1a) is a particularly complex non-canonical nucleoside^{10–12}. It is found in many bacterial and eukaryotic species, where it is located at position 34 of the anticodon loop of tRNA^{Tyr}, tRNA^{Asp}, tRNA^{His} and tRNA^{Asn}^{13,14}.

In eukaryotes, queuosine 1 is found in both cytosolic and mitochondrial tRNA^{Asp}¹⁵. It is biochemically derived from guanosine (G) and characterised by the exchange of the N7-nitrogen for a C7-carbon atom and the addition of a 1(S)-amino-2(R),3(S)-dihydroxycyclopent-4-ene unit to the C7-position via a methylene linker^{12,16}. The presence of the Q-base in position 34 of the anticodon equips the corresponding tRNAs with the possibility to decode synonymous codons by wobble base pairing^{17,18}. The Q-base is furthermore affecting translational speed¹⁹, decoding fidelity²⁰, and it is essential for survival particularly in the absence of sufficient tyrosine^{21,22}. Eukaryotes are unable to biosynthesize Q, which forces them to acquire it from prokaryotic sources^{21,23–25}. This establishes a link between the central process of translation and the gut microbiome²⁶. Defective RNA modification processes are increasingly recognised as drivers for severe diseases^{27,28}.

In higher vertebrates, including humans, two glycosylated queuosine derivatives exist, which have yet unidentified functions. The first of these hypermodified Q derivatives is found in cytosolic tRNA^{Tyr}, where the Q-base is modified with a galactose residue (galQ, 2, Fig. 1b)^{10,29}. The cytosolic tRNA^{Asp}, in contrast,

contains a Q-derivative, which is suggested to be mannosylated (manQ, Fig. 1c, d). A first effort to elucidate the structure of these nucleosides was reported in 1976 by Kasai et al. They derived the structure of galQ and proposed a structure for manQ based on NMR- and MS-data that was obtained from isolated material from rabbit liver. This data lead to the proposal of structure 3 for natural manQ²⁹. Here, we report the total synthesis of the human natural product manQ and show that the originally proposed structure 3 (Fig. 1c) needs to be revised in two important aspects: in contrast to the original structure suggestion, we show that the mannose glycosidic bond is not β - but α -configured. Furthermore, and in contrast to β -galQ, the mannose is attached not to the homoallylic, but to the allylic hydroxyl group at C3. manQ has consequently the structure 4 shown in Fig. 1d. This result reveals that the yet unknown galactosyl and mannosyl transferases that attach the respective hexose to the Q-nucleobase in tRNA^{Tyr} and tRNA^{Asp}, are able to differentiate the two hydroxyl groups (allyl vs. homoallyl) at the cyclopentene substructure for yet unknown reasons.

Results and discussion

Synthesis of literature-reported manQ. The compounds galQ and manQ are found in the anticodon loop of one cytosolic tRNA each³⁰. Consequently, the amounts that can be isolated from nature (e.g. porcine liver) are very small, so that a structure elucidation from isolated material only is very difficult. tRNA^{Asp}, which contains one molecule of manQ per tRNA, can be isolated³⁰, but in our hands it was impossible to obtain sufficient amounts for a full structure elucidation. Therefore, synthesis of the proposed manQ compound and comparison of the synthetic standard with natural material by LC-MS was the method of choice for us to investigate the manQ structure. The synthesis of compound 3, proposed to be natural manQ, was performed as depicted in Fig. 2a.

For the synthesis of the difficult-to-access β -mannosyl connectivity, we employed the Crich-method³¹, which required the preparation of the mannosyl donor 5. This was achieved along the

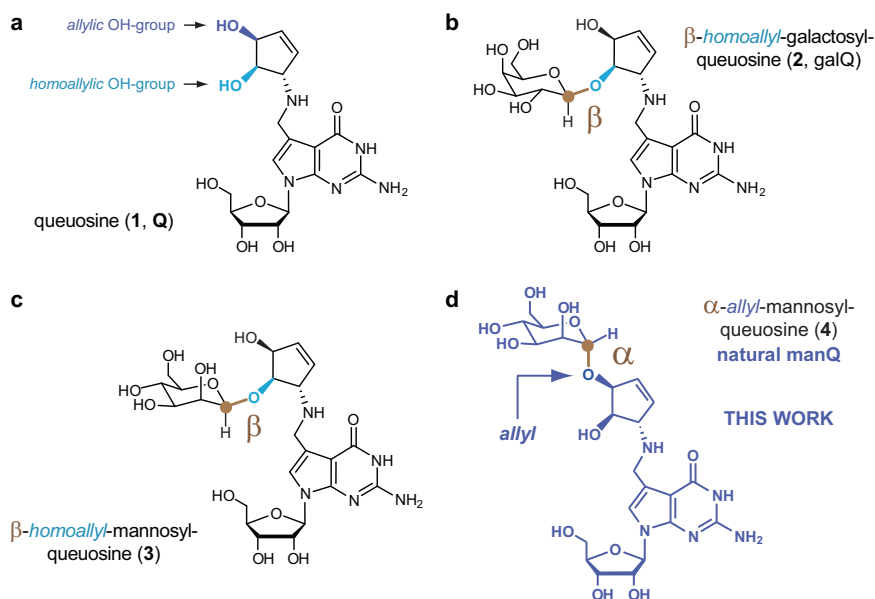


Fig. 1 Nucleosides of the queuosine family present in higher vertebrates. **a** Queuosine 1 is derived from a 7-deazaguanosine base with a 1(S)-amino-2(R),3(S)-dihydroxycyclopent-4-ene unit attached via a methylene linker to the C7-position of the 7-deazaguanosine. Possible glycosylation sites are depicted in dark blue (allylic hydroxyl group) and light blue (homoallylic hydroxyl group); **b** Structure of the naturally occurring nucleoside β -homoallyl-galQ 2; **c** Structure 3 shows the originally proposed structure of manQ, which we revise in this work; **d** Corrected structure of natural manQ 4 featuring an α -allylic connectivity.

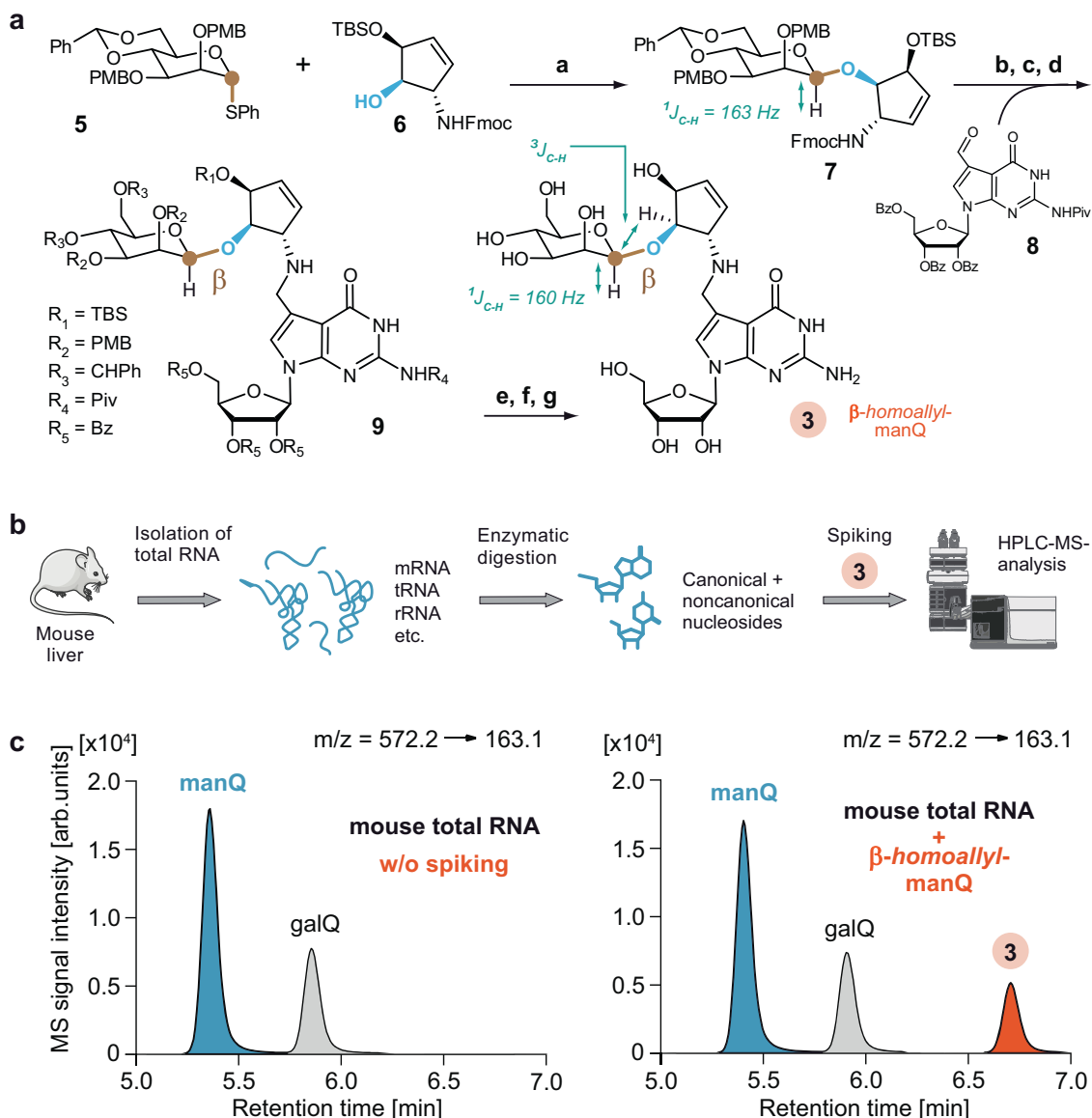


Fig. 2 Attempt to confirm the originally proposed structure of manQ. **a** Synthetic route towards β-homoallyl-manQ featuring a β-selective mannosylation key step; a: AgOTf, PhSCl, DTBMP, DCM, −78 °C, 2 h, 62%; b: HNMe₂, THF, rt, 1 h; c: 8, MeOH, rt, 5 h; d: NaBH₄, MeOH, 0 °C, 1 h; e: NaOMe, MeOH, rt, 5 h; f: TFA, DCM, 0 °C, 20 min; g: HF · pyridine, pyridine, rt, 18 h, 22% (5 steps); **b** Workflow for the comparison of the synthetic β-homoallyl-manQ standard with natural manQ via isolation of total RNA from mouse liver, digestion to the nucleoside level and LC-MS-co-injection experiments; **c** Chromatograms resulting from the co-injection experiments analysed by UHPLC-MS/MS; left: digested total RNA from mouse liver shows two peaks, natural manQ and galQ; right: digested total RNA from mouse liver spiked with the synthetic standard β-homoallyl-manQ 3 shows the appearance of an additional peak, thereby disproving the originally proposed structure for manQ. m/z = 572.2 is both the mass of the protonated manQ or galQ nucleoside, while m/z = 163.1 is the mass of a specific fragment ion formed during the fragmentation of these molecules in the mass spectrometer (see Supplementary Fig. 1). This mass transition was used by us for manQ and galQ detection via MS/MS.

literature-reported synthesis^{31,32}. The mannosylation reaction of the Fmoc- and TBS- protected 1(S)-amino-2(R),3(S)-dihydroxycyclopent-4-ene unit 6 with the mannosyl donor 5 required an activation with Ag-triflate in the presence of phenylthiochloride and 2,6-di-tert-butyl-4-methylpyridine (DTBMP) at −78 °C in dry dichloromethane. The reaction gave the mannoside 7 in 62% yield, and the β-configuration of its anomeric centre was confirmed by NMR-spectroscopy based on the coupling constant of ¹J_{C1-H1} = 163 Hz, which is typical for β-mannosides³³. We next cleaved the Fmoc group of the mannoside 7 with dimethylamine (10% DMA in THF, rt, 1 h) and performed the reductive amination with the benzoyl- and pivaloyl-protected 7-formyl-7-deazaguanosine compound 8 (MeOH, rt, 5 h, then NaBH₄, 0 °C, 1

h) that was prepared as recently described by us¹⁰. This afforded the fully protected manQ compound 9. Cleavage of the benzoyl-protecting groups at the ribose was performed under Zemplén-conditions (0.5 M NaOMe, MeOH, rt, 5 h). The PMB-ethers were deprotected with trifluoro acetic acid in dichloromethane (10%, 0 °C, 20 min). Finally, we removed the TBS-protecting groups with HF in pyridine (rt, 18 h). This furnished the final manQ compound 3 with mannose being β-configured and attached to the homoallylic hydroxyl group. As expected, compound 3 has a ¹J_{C-H}-coupling constant of 160 Hz at the anomeric centre, thereby proving its β-configuration. Furthermore, the observed ³J_{C-H}-HMBC coupling in compound 3 between the mannosyl C1-carbon and the homoallylic hydrogen C4H of the cyclopentene

ring (see Supplementary Information 4) unambiguously proved that the mannosyl residue is indeed connected to the homoallylic hydroxyl group.

In order to compare the synthetic manQ compound **3** with the natural material, we performed an LC-MS co-injection study. To this end, we isolated the total RNA from mouse liver and enzymatically digested this RNA down to the individual nucleosides as recently described by us¹⁰. This procedure afforded a mixture of all nucleosides present in the total RNA pool. Subsequent analysis of the resulting nucleoside mixture was performed via UHPLC-MS/MS with a triple quadrupole mass spectrometer (QQQ) set to monitor a specific molecular fragmentation reaction of the glycosylated Q-derivatives. Using collision-induced dissociation, these nucleosides undergo two heterolytic bond dissociations, leading to a loss of both the ribose sugar and the glycosylated cyclopentene unit. Monitoring the corresponding mass transition of $m/z = 572.2 \rightarrow 163.1$ allows a sensitive detection of these compounds (see Fig. 2b and Supplementary Fig. 1). With an UHPLC separation gradient of 0 \rightarrow 2% (v/v) MeCN/H₂O in 0 \rightarrow 8 min on a Poroshell 120 SB-C8 column, all hexose-modified queuosine derivatives can be separated chromatographically (see Fig. 2c). Indeed, when analysing the mouse liver sample, we detected two clearly separated signals in the RNA nucleoside pool with galQ 2 eluting at 5.9 min, and the natural manQ compound eluting at 5.4 min, respectively. The compound eluting at 5.9 min was unambiguously identified as galQ 2 with the help of a synthetic reference compound (see Supplementary Fig. 2). Upon co-injection of the synthetic material **3**, we were expecting to see again two signals with the manQ signal having gained in intensity. To our surprise, however, we noted that this is not the case. Instead, the co-injection experiment provided a third signal with a retention time of 6.8 min, clearly separated from both natural manQ and galQ 2. This result unequivocally shows that manQ **3** is NOT identical to the natural manQ compound. Therefore, the structure proposal for manQ reported in literature must be incorrect.

Puzzled by this result, we initially reasoned that the compound originally identified as manQ may contain a different sugar than mannose, even though a previous study showed that a mannosyl moiety can enzymatically be transferred to the Q-base from GDP-mannose³⁴. To verify that manQ contains indeed a mannose sugar, we performed a metabolic labelling study (Fig. 3a): We added different isotope-labelled sugars to a HEK293T cell culture and subsequently isolated the total RNA of the cells to see if the natural manQ had incorporated the isotope labels. During these experiments, the cell culture medium was additionally supplemented with high concentrations of unlabelled glucose or mannose as carbon source in order to suppress the metabolic conversion of the labelled sugar into other carbohydrates³⁵. Without these metabolic suppressors, we observed in our experiments an unwanted isotope scrambling process that jeopardised the experiments. The results of our study are depicted in Fig. 3b. It is clearly evident that feeding of ¹³C₆-galactose and ¹³C₆-glucose in the presence of the metabolic suppressors glucose or mannose, respectively, gave little or no incorporation of ¹³C into the isolated natural manQ compound. In contrast, feeding of ¹³C₆-mannose in combination with the metabolic suppressor glucose quickly led to the time-dependent formation of ¹³C₆-manQ, thereby confirming that the sugar connected to the Q-base in manQ is indeed mannose.

We therefore reasoned that natural manQ differs from the reported structure **3** likely regarding the configuration of the anomeric centre and/or the connectivity at the cyclopentene moiety (allyl versus homoallyl mannoside). With **3** proven not to be the natural compound, we were left with the three remaining structures **4** (α -allyl-connectivity), **10** (β -allyl-connectivity) and

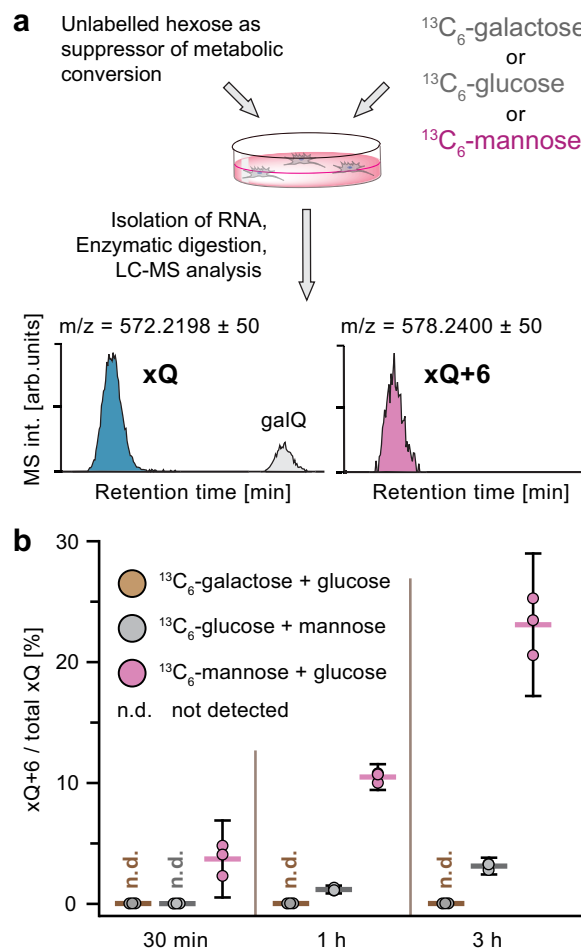


Fig. 3 Confirmation of the incorporated hexose sugar as being mannose.

a Workflow of the metabolic labelling study providing ¹³C₆-galactose, ¹³C₆-glucose, or ¹³C₆-mannose in combination with an unlabelled carbon source (glucose or mannose) that suppresses metabolic interconversion of the carbohydrates and hence isotope scrambling; **b** Results of the LC-MS experiments showing quick incorporation of heavy sugar when feeding ¹³C₆-mannose in presence of glucose, thereby confirming the identity of xQ as manQ; three independent experimental replicates were performed for each condition tested (coloured dots). Mean values are indicated by coloured horizontal lines, while whiskers enclose the 95%-confidence interval.

11 (α -homoallyl-connectivity, see Fig. 4a). For their synthesis, it was necessary to first develop syntheses for the properly protected 1-amino-2,3-dihydrocyclopent-4-enes **13**–**15** (Fig. 4b). To access these compounds, we started with the Fmoc-protected 1-amino-2,3-dihydrocyclopent-4-ene **12**. For the synthesis of the 1-Fmoc-3-PMB-protected cyclopent-4-ene **13**, needed for the synthesis of **11**, we first protected in **12** both OH groups as an anisaldehyde acetal (anisaldehyde dimethyl acetal, CSA, rt, 2 h, 98%), followed by a selective reductive opening of the homoallylic OH group with DIBAL-H. This gave the 1-Fmoc-3-PMB-protected-dihydrocyclopent-4-ene **13** (DCM, -78 °C, 3 h, 85%). For **14**, we used **13** as the starting material. Protection of the homoallylic hydroxyl group in **13** with SEM-Cl (NBu₄I, pyridine, DMF, 70 °C, 18 h, 75%), followed by cleavage of the p-methoxybenzylether (10% TFA in DCM, 0 °C, 5 min, 83%) furnished compound **14**. Reaction of **12** with TBSOTf at -55 °C provided after 15 min predominantly the 1-Fmoc-3-TBS-protected compound **6** as the kinetic product, which we had used before for the synthesis of the literature-reported structure of

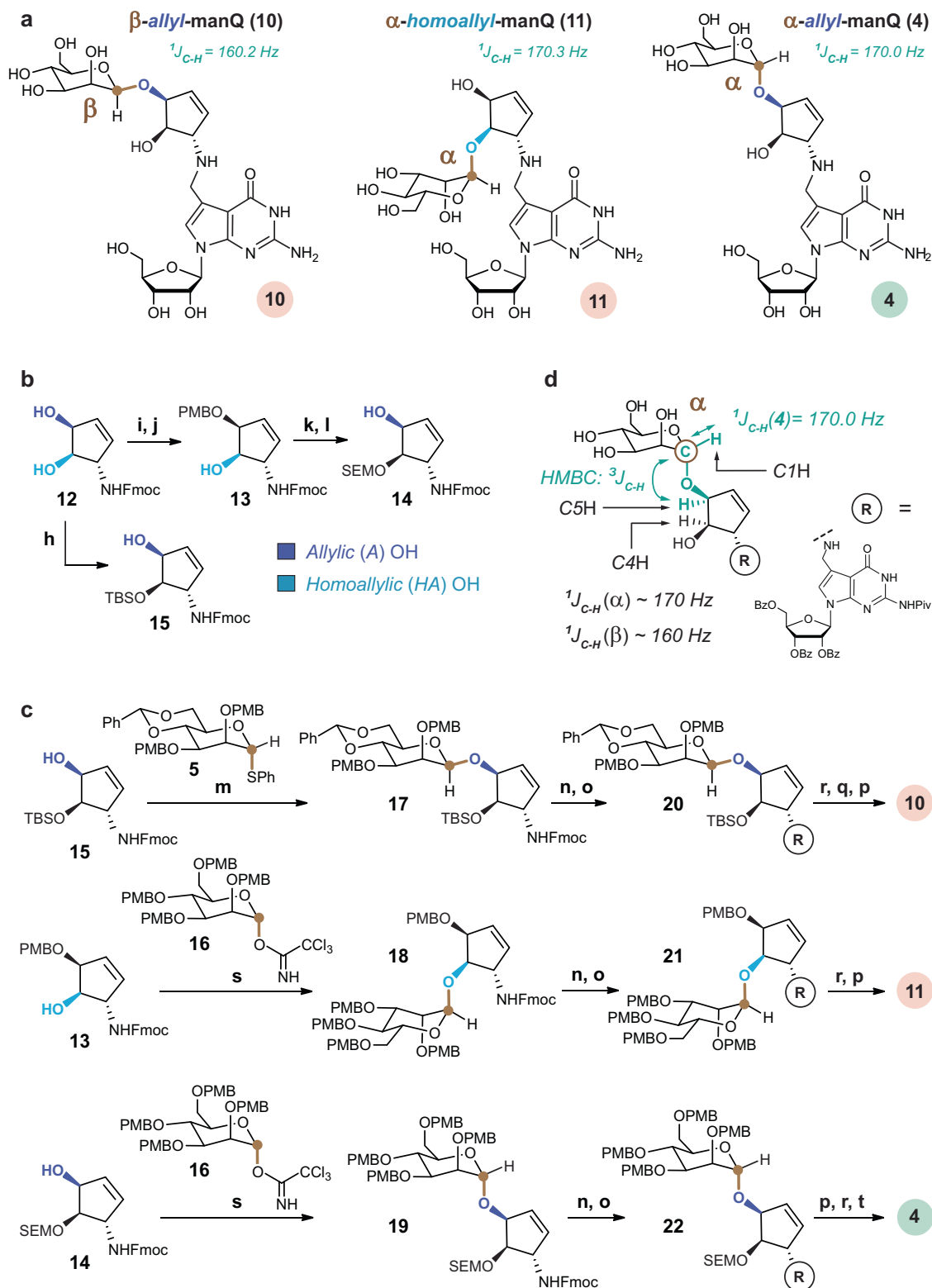


Fig. 4 Alternative manQ structures and their syntheses. **a** manQ target compounds: β -allyl-manQ 10, α -homoallyl-manQ 11 and the correct structure 4 of natural manQ featuring an α -allyl-connectivity; **b** Regioselective protection of cyclopentene 12 for the synthesis of precursors 13–15; h: TBSOTf, DMF, -10 °C, 2 h, 41%; i: anisaldehyde dimethyl acetal, CSA, DMF, rt, 2 h, 98%; j: DIBAL-H, DCM, -78 °C, 3 h, 85%; k: SEM-Cl, NBu_4I , pyridine, DMF, 70 °C, 18 h, 75%; l: TFA, DCM, 0 °C, 5 min, 83%; **c** Synthesis of the manQ compounds 10, 11 and 4 from 13, 14 and 15 via an appropriate stereoselective glycosylation step and subsequent reductive amination; m: AgOTf, PhSCI, DTBMP, DCM, -78 °C, 2 h, 52%; n: DBU, MeCN, rt, 1 h (10) or HNMe_2 , THF, rt, 1 h (4, 11); o: 8, MeOH, 2–5 h, then NaBH_4 , 0 °C, 15–30 min; p: NaOMe, MeOH, rt; q: HF \cdot pyridine, EtOAc, rt, 18 h; r: TFA, DCM, 0 °C; s: TMSOTf, THF, 0 °C; t: HF \cdot pyridine, MeCN, rt, 1 week; **d** Depiction of the $^1J_{C-H}$ -coupling at the anomeric centre of α -allyl-manQ 4, and of the $^3J_{C-H}$ -HMBC-coupling between its anomeric mannose carbon C1 and the C5-hydrogen atom of its cyclopentene moiety. Both couplings were used to confirm the structure of this compound via NMR, and similar couplings were used to confirm the structures of 3, 10 and 11.

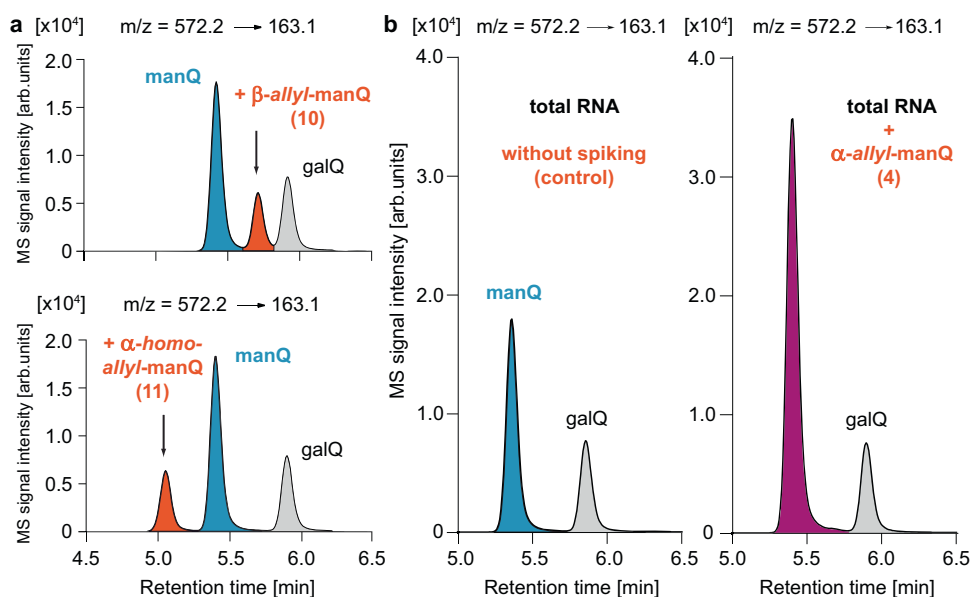


Fig. 5 Chromatograms resulting from the co-injection of the synthetic manQ compounds 10, 11 and 4 with enzymatically digested total RNA from mouse liver analysed by UHPLC-MS/MS. **a** Co-injection of β -allyl-manQ 10 and α -homoallyl-manQ 11 show the appearance of a third peak, these compounds are therefore different from natural manQ; **b** Co-injection of α -allyl-manQ 4 with digested total RNA from mouse liver shows a complete signal overlap of 4 and natural manQ, thereby leading to an increased signal intensity of manQ (right) in comparison to the control sample without synthetic standard (left). This result shows that our synthetic compound 4 is identical to the naturally occurring manQ nucleoside and establishes its α -allyl-connectivity.

manQ 3. If this reaction was, however, performed at -10°C for a longer period of time (2 h), we observed formation of the thermodynamically more stable 1-Fmoc-2-TBS-protected compound 15.

With the differently protected cyclopentenes 13, 14 and 15 in hand, the manQ compounds 10, 11 and 4 were synthesised via the glycosylation and reductive amination approach (Fig. 4c). The first target compound, β -allyl-manQ 10, was prepared from cyclopentene precursor 15 starting with a stereoselective β -mannosylation reaction (AgOTf, PhSCL, 2,6-di-tert-butyl-4-methylpyridine, DCM, -78°C , 2 h, 52%) to give the glycosylated product 17. Fmoc-deprotection (DBU, MeCN, rt, 1 h) and subsequent reductive amination with deazaguanosine precursor 8 gave the fully protected β -allyl-manQ 20. A three-step final deprotection procedure (1: 10% TFA in DCM; 2: HF pyridine, EtOAc, rt, 18 h; 3: NaOMe, MeOH, 2 d) gave β -allyl-manQ 10. For the second target compound, α -homoallyl-manQ 11, we started from cyclopentene precursor 13 and employed Schmidt-Sinaý-glycosylation conditions with the literature-known glycosyl donor 16 (TMSOTf, THF, 0°C , 55%) to obtain glycosylated product 18^{36,37}. The synthesis of α -homoallyl-manQ 11 was completed from there by Fmoc-deprotection, reductive amination with 8, and a two-step final deprotection (1: 10% TFA, DCM, 30 min; 2: NaOMe, MeOH, rt, 2 d). The third target compound, α -allyl-manQ 4, was synthesised again via Schmidt-Sinaý-glycosylation conditions with donor 16^{36,37}. In this case, the SEM-protected cyclopentene precursor 14 was used, because the TBS-protected precursor 15 proved to be sterically too demanding for the glycosylation reaction. Reaction of 14 with 16 however was not fully stereoselective. But after full completion of the synthesis by Fmoc-deprotection, reductive amination and subsequent three-step deprotection (1: NaOMe, MeOH, rt, 18 h; 2: 10% TFA, DCM, 0°C , 15 min; 3: HF·pyridine, MeCN, rt, 1 week), we obtained a mixture of 10 and 4, which was separated by reversed-phase HPLC-chromatography (see Supplementary Information 3.5). This allowed us to obtain α -allyl-manQ 4 in excellent purity.

We next confirmed the structure of the manQ compounds 4, 10 and 11 using NMR spectroscopy (Fig. 4d). For β -allyl-manQ 10, we observed a $^1\text{J}_{\text{C-H}}$ -coupling at the mannose anomeric centre of 160.2 Hz, indicative of the β -configuration. The allylic connectivity of 10 was confirmed by the $^3\text{J}_{\text{C-H}}$ -HMBC-coupling between the anomeric mannose C1 carbon and the allylic hydrogen C5H of the cyclopentene ring. For α -homoallyl-manQ 11, a $^1\text{J}_{\text{C-H}}$ -coupling of 170.3 Hz was observed at the anomeric centre, proving its α -configuration. In addition, with $\delta = 5.04$ ppm, the chemical shift of the anomeric proton C1H of 11 was as expected higher than the shift observed for the corresponding β -anomer 3 ($\delta = 4.72$ ppm). Homoallylic connectivity of 11 was confirmed by observation of an $^3\text{J}_{\text{C-H}}$ -HMBC-coupling of the anomeric carbon C1 and the homoallylic hydrogen C4H of the cyclopentene moiety. The structure of α -allyl-manQ 4 was proven based on an anomeric $^1\text{J}_{\text{C-H}}$ -coupling of 170.0 Hz, indicating its α -configuration. Here, the chemical shift of the anomeric proton C1H ($\delta = 4.97$ ppm) was again higher than that of the corresponding β -anomer 10 ($\delta = 4.70$ ppm), thereby also confirming the α -configuration of 4. The allylic connectivity of 4 was confirmed by an $^3\text{J}_{\text{C-H}}$ -HMBC signal resulting from a coupling of the anomeric mannose carbon C1 with the allylic hydrogen C5H of the cyclopentene ring.

With all four possible manQ isomers now available (α/β -allyl-manQ 4 and 10, and α/β -homoallyl-manQ 3 and 11), we next performed individual co-injection studies using again a digest of total RNA from mouse liver as reference material, and the UHPLC-MS/MS-method described above for analysis (Fig. 5). While for β -allyl-manQ 10 and α -homoallyl-manQ 11 LC-MS signals were obtained that were well-separated both from galQ 2 and natural manQ (Fig. 5a), we discovered to our delight a full signal overlap of our synthetic α -allyl-manQ 4 with the natural manQ compound (Fig. 5b). We finally confirmed the overlap of the two compound signals with a second HPLC-MS-method using a different HPLC separation column and gradient (see Supplementary Fig. 3). Here, too, the synthetic material co-eluted with the natural manQ compound. These co-injection experiments

therefore show that the natural manQ compound present in the anticodon loop of tRNA^{ASP} has the chemical structure 4 (see Figs. 1d and 4a). The configuration of its anomeric centre is in fact α , not β . In addition, the mannosyl moiety of natural manQ is connected to the allylic hydroxyl group of the cyclopentene unit, and not to the homoallylic hydroxyl group as in galQ.

To prove that our RNA isolation and digestion conditions do not cause isomerisation of the manQ compounds 3, 4, 10 and 11, we performed stability tests under these conditions with all four isomers (see Supplementary Figs. 4 and 5). In these experiments we observed no isomerisation processes. Finally, we exposed compounds 3 and 4 to neutral (pH 7), basic (0.1 M KOH, pH 13) and acidic (0.1 M HCl, pH 1) conditions for 24 h at 37 °C (see Supplementary Figs. 6 and 7). Even under these enforced settings we did not observe any pH-dependent isomerization processes, indicating that the manQ isomers 3 and 4 are fairly stable compounds.

Based on these experiments, we showed that the widely accepted β -homoallyl structure reported in literature for the non-canonical RNA nucleoside manQ is not correct. Instead, natural manQ is an α -allyl-mannoside (4, Fig. 1d). Its connectivity is therefore maximally different from the β -homoallyl-compound galQ (2, Fig. 1b). The elucidation of the correct manQ structure and the availability of synthetic material will be the basis for illuminating the biological functions of this hypermodified RNA nucleoside.

Methods

Isolation of total RNA from mouse livers. The murine livers for these experiments were kindly provided by Prof. Dr. Stylianos Michalakis. The frozen (−80 °C) livers were pooled and crushed into smaller pieces. The still-frozen pieces were divided into several samples for isolation of their total RNA. To this reason, 1 mL of TriReagent (Sigma Aldrich) was added per 50 mg of still-frozen liver tissue. Then, samples were homogenised with a tissue lyser (Schwingmühle MM400 from Retsch), first at 20 Hz for 4 min, then at 30 Hz for 2 min. Next, 200 μ L chloroform per 50 mg of liver tissue were added, and the mixture was centrifuged for full phase separation (12,000 \times g; 15 min; 4 °C). Of each sample, the aqueous (clear) upper phase was transferred to a new tube and mixed with 500 μ L isopropanol per 50 mg of liver tissue. After overnight incubation at −20 °C, samples were centrifuged (21,130 \times g; 30 min; 4 °C), and the supernatant was carefully removed from the pellets. 1 mL of ice-cold 75% ethanol was added to the pellets, and the samples were vortexed shortly. Again, samples were centrifuged (21,130 \times g; 20 min; 4 °C), and the supernatant was carefully removed from the pellets. This ethanol washing step was repeated two more times. The resulting total RNA-pellets were first dried at room temperature and then dissolved in nuclease-free water for subsequent enzymatic digestion.

Enzymatic digestion of total RNA to the nucleoside level. 3 μ g of mouse (or HEK 293T) total RNA were digested to the nucleoside level using the Nucleoside Digestion Mix (New England BioLabs). To this reason, a solution of 3 μ g total RNA in 42.5 μ L of nuclease-free water was prepared. 5 μ L of the Nucleoside Digestion Mix Reaction Buffer (10 \times), and 2.5 μ L of the Nucleoside Digestion Mix were added, and the mixture was incubated for 2 h at 37 °C. Samples were subsequently supplemented (spiked) with an appropriate amount (see below) of a synthetic manQ compound dissolved in nuclease-free water, or an equal volume of nuclease-free water (control samples). Finally, nuclease-free water was added to give a total sample volume of 100 μ L, which therefore was independent of a particular compound concentration. Of note, samples can be stored after digestion and/or spiking for several days at −80 °C without altering the results of subsequent LC/MS analyses.

UHPLC-MS/MS-based co-injection experiments. Co-injection experiments were performed by spiking equimolar (with respect to the natural manQ nucleoside present in the digested total RNA) amounts of heavy-atom-labelled standard to the sample. UHPLC-MS/MS analyses of digested RNA samples were performed using an Agilent 1290 UHPLC system equipped with an UV detector and an Agilent 6490 triple quadrupole mass spectrometer. All samples were filtrated directly before measurement using an AcroPrep Advance 96 filter plate 0.2 μ m Supor from Pall Life Sciences. The UHPLC autosampler was cooled to 4 °C. The source-dependent parameters of the MS instrument were as follows: gas temperature 230 °C; gas flow 12 L/min (N₂); nebuliser 40 psi; sheath gas heater 300 °C; sheath gas flow 6 L/min (N₂); capillary voltage 2.500 V in the positive ion mode; capillary voltage −2.250 V in the negative ion mode; nozzle voltage 0 V. The fragmentor voltage was 380 V. Fragmentation was performed with a collision energy of 35 eV and a cell accelerator voltage of 5 V. A specific fragmentation pattern of $m/z = 572.2 \rightarrow 163.1$, as depicted in Supplementary Fig. 1, was observed. Delta EMV was set to 500 (positive mode) and 800 (negative mode). Chromatography was performed using a Poroshell 120 SB-C8 column (Agilent, 2.7 μ m, 2.1 mm \times 150 mm) at 35 °C with a gradient of water and MeCN, each

containing 0.0085% (v/v) formic acid, at a flow rate of 0.35 mL/min. The gradient was as follows: 0 \rightarrow 8 min, 0 \rightarrow 2% MeCN (v/v); 8 \rightarrow 10.9 min, 2 \rightarrow 3.85% MeCN; 10.9 \rightarrow 11.3 min, 3.85 \rightarrow 80% MeCN; 11.3 \rightarrow 12.0 min, 80% MeCN; 12.0 \rightarrow 12.3 min, 80 \rightarrow 0% MeCN; and 12.3 \rightarrow 14.0 min, 0% MeCN. No other peaks besides the expected ones of manQ, galQ and the spiked standard were detected when using the parameters given above. The identity of galQ was identified by spiking with synthetic galQ-standard (see Supplementary Fig. 2).

Cell culture metabolic feeding experiments. To determine which hexose is incorporated into the natural xQ/manQ base as its sugar moiety, HEK 293T cells were cultured in different heavy RPMI media (see Supplementary Table 1). Each heavy RPMI medium was supplemented with two monosaccharides: One of the two monosaccharides was fully ¹³C-isotope-labelled, while the other hexose was non-labelled and used in these experiments as a suppressor of metabolic inter-conversion. Heavy RPMI media with the following hexose combinations were used:

- ¹³C₆-D-mannose, D-glucose
- D-mannose, ¹³C₆-D-glucose
- ¹³C₆-D-galactose, D-Glucose
- D-galactose, ¹³C₆-D-glucose

1.3 million HEK 293T cells were seeded on a p60 cell culture dish. Cultivation was performed for 18–21 h in RPMI medium at 37 °C and 5% CO₂. Subsequently, the medium was removed and replaced with heavy RPMI medium. Incubation continued under the same conditions for 30, 60 and 180 min.

Isolation of total RNA from HEK 293T cells. After incubation, the culture medium was removed. The cells were carefully detached from the cell culture dish using PBS and transferred to a 2 mL reaction tube. This was followed by pelleting for 1 min at 500 \times g and 4 °C. The PBS was removed and the cell pellet immediately resuspended in 1 mL TriReagent (Sigma Aldrich). Samples taken after 30 min in labelled medium were incubated for 40 min, the 60 min- and 180 min-samples were incubated for 5 min. Following incubation, 200 μ L of chloroform were added to the sample, which then was heavily vortexed and subsequently centrifuged for 15 min at 12,000 \times g and 4 °C. The upper clear phase was transferred to a new 2 mL reaction tube. 500 μ L of isopropanol were added to the transferred phase and mixed. Precipitation of the RNA was performed at −20 °C overnight. Following this, samples were directly pelleted for 30 min at 21,130 \times g and 4 °C. The supernatant was carefully removed. Thereafter, 1 mL of 75% (v/v) cold ethanol (−20 °C) was added and the sample was centrifuged for 20 min at 21,130 \times g and 4 °C. The ethanol washing step including the centrifugation was repeated two more times. The supernatant was removed and the pellet was dried at room temperature. Thereafter, the pellet was dissolved in nuclease-free water.

LC-MS-analysis of total RNA from metabolically labelled HEK cells. HPLC-HESI-MS analysis of the enzymatically digested total RNA of HEK cells (see above) was performed on a Dionex Ultimate 3000 HPLC system coupled to a Thermo Fisher LTQ Orbitrap XL mass spectrometer. Samples were filtrated before the measurement using an AcroPrep Advance 96 filter plate 0.2 μ m Supor from Pall Life Sciences. Nucleosides were separated with an Interchim Uptisphere120-3HDO C18 column whose temperature was maintained at 30 °C. Elution buffers were buffer X (2 mM NH₄HCOO in H₂O; pH 5.5) and buffer Y (2 mM NH₄HCOO in H₂O/MeCN 20/80 v/v; pH 5.5) with a flow rate of 0.15 mL/min. The gradient was as follows: 0 \rightarrow 3.5 min, 0% Y; 3.5 \rightarrow 4 min, 0 \rightarrow 0.2% Y; 4 \rightarrow 10 min, 0.2% Y; 10 \rightarrow 50 min, 0.2 \rightarrow 4.7% Y; 50 \rightarrow 55 min, 4.7 \rightarrow 60% Y; 55 \rightarrow 57 min, 60 \rightarrow 100% Y; 57 \rightarrow 62 min, 100% Y. The chromatogram was recorded at 260 nm with a Dionex Ultimate 3000 Diode Array Detector, and the chromatographic eluent was directly injected into the ion source of the mass spectrometer without prior splitting. Ions were scanned in the positive polarity mode over a full-scan range of $m/z = 210$ –800 with a resolution of 60,000. Parameters of the mass spectrometer were tuned with a freshly mixed solution of inosine (5 μ M) in buffer X and set as follows: Capillary temperature 275 °C; APCI vaporizer temperature 100 °C; sheath gas flow 5.00; aux gas flow 21.0; sweep gas flow 1.00; source voltage 4.80 kV; capillary voltage 0 V; tube lens voltage 45.0 V; skimmer offset 0 V. The ion chromatograms of the compounds of interest were extracted from the total ion current (TIC) chromatogram with a mass range set to ± 0.0050 u around the exact mass [M + H]⁺ of a compound. The peak areas in the extracted ion chromatograms of the heavy and corresponding light compound were integrated and the percentual ¹³C₆-labelling of a compound within a sample was calculated.

Synthetic procedures. Synthetic procedures and analytical characterisation of the compounds used in this study are provided in the supporting information.

Reporting summary. Further information on research design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this article.

Data availability

The HPLC/MS and NMR data generated in this study are provided in the Supplementary Information. Raw data files are available from the corresponding author upon request.

Code availability

For data collection with the TripleQuad LC-MS/MS system, MassHunter Workstation Software Version B.07.01/Build 7.1.524.0 was used. For data collection with the Orbitrap LC-MS-system, the programmes Xcalibur Version 2.1.0 SP1.1160, Chromeleon Version 6.80 SR13 Build 3818 (226197) and LTQ Tune Plus Version 2.5.5 SP2 were used. Analysis of raw data from the TripleQuad LC-MS/MS system was performed with the programme MassHunter Workstation Software Version B.07.01/Build 7.1.524.0. Analysis of raw data from the Orbitrap LC-MS-system was performed with Xcalibur Qual Browser Version 2.1.0 SP1.1160. For general data analysis, Origin 2018 64 bit version was used.

Received: 16 June 2021; Accepted: 11 November 2021;

Published online: 08 December 2021

References

- Crick, F. Central dogma of molecular biology. *Nature* **227**, 561–563 (1970).
- Cobb, M. 60 years ago, Francis Crick changed the logic of biology. *PLoS Biol.* **15**, e2003243 (2017).
- Boccaletto, P. et al. MODOCICS: a database of RNA modification pathways. 2017 update. *Nucleic Acids Res.* **46**, D303–D307 (2018).
- Cantara, W. A. et al. The RNA modification database, RNAMDB: 2011 update. *Nucleic Acids Res.* **39**, D195–D201 (2011).
- Sarin, L. P. & Leidel, S. A. Modify or die?—RNA modification defects in metazoans. *RNA Biol.* **11**, 1555–1567 (2014).
- Rozov, A. et al. Novel base-pairing interactions at the tRNA wobble position crucial for accurate reading of the genetic code. *Nat. Commun.* **7**, 10457 (2016).
- Agris, P. Wobble position modified nucleosides evolved to select transfer RNA codon recognition: a modified-wobble hypothesis. *Biochimie* **73**, 1345–1349 (1991).
- Yarian, C. et al. Accurate translation of the genetic code depends on tRNA modified nucleosides. *J. Biol. Chem.* **277**, 16391–16395 (2002).
- Duechler, M., Leszczyńska, G., Sochacka, E. & Nawrot, B. Nucleoside modifications in the regulation of gene expression: focus on tRNA. *Cell. Mol. Life Sci.* **73**, 3075–3095 (2016).
- Thumbs, P. et al. Synthesis of galactosyl-queuosine and distribution of hypermodified Q-nucleosides in mouse tissues. *Angew. Chem. Int. Ed.* **59**, 12352–12356 (2020).
- Klepper, F., Jahn, E. M., Hickmann, V. & Carell, T. Synthesis of the transfer-RNA nucleoside queuosine by using a chiral allyl azide intermediate. *Angew. Chem. Int. Ed.* **46**, 2325–2327 (2007).
- Nishimura, S. Structure, biosynthesis, and function of queuosine in transfer RNA. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **28**, 49–73 (1983).
- Harada, F. & Nishimura, S. Possible anticodon sequences of tRNA^{His}, tRNA^{Asn}, and tRNA^{Asp} from *Escherichia coli*. Universal presence of nucleoside O in the first position of the anticodons of these transfer ribonucleic acid. *Biochemistry* **11**, 301–308 (1972).
- Katze, J. R., Basile, B. & McCloskey, J. A. Queuine, a modified base incorporated posttranscriptionally into eukaryotic transfer RNA: wide distribution in nature. *Science* **216**, 55–56 (1982).
- Salinas-Giegé, T., Giegé, R. & Giegé, P. tRNA biology in mitochondria. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 4518–4559 (2015).
- Kasai, H. et al. Structure of the modified nucleoside Q isolated from *Escherichia coli* transfer ribonucleic acid. 7-(4,5-cis-Dihydroxy-1-cyclopenten-3-ylaminomethyl)-7-deazaguanosine. *Biochemistry* **14**, 4198–4208 (1975).
- Morris, R. C., Brown, K. G. & Elliott, M. S. The effect of queuosine on tRNA structure and function. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **16**, 757–774 (1999).
- Meier, F., Suter, B., Grosjean, H., Keith, G. & Kubli, E. Queuosine modification of the wobble base in tRNA^{His} influences ‘in vivo’ decoding properties. *EMBO J.* **4**, 823–827 (1985).
- Tuorto, F. et al. Queuosine-modified tRNAs confer nutritional control of protein translation. *EMBO J.* **37**, e99777 (2018).
- Zaborske, J. M. et al. A nutrient-driven tRNA modification alters translational fidelity and genome-wide protein coding across an animal genus. *PLoS Biol.* **12**, e1002015 (2014).
- Marks, T. & Farkas, W. R. Effects of a diet deficient in tyrosine and queuine on germfree mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **230**, 233–237 (1997).
- Rakovich, T. et al. Queuosine deficiency in eukaryotes compromises tyrosine production through increased tetrahydrobiopterin oxidation. *J. Biol. Chem.* **286**, 19354–19363 (2011).
- Farkas, W. R. Effect of diet on the queuosine family of tRNAs of germ-free mice. *J. Biol. Chem.* **255**, 6832–6835 (1980).
- Fergus, C., Barnes, D., Alqasem, M. & Kelly, V. The queuine micronutrient: charting a course from microbe to man. *Nutrients* **7**, 2897–2929 (2015).
- Reyniers, J. P., Pleasants, J. R., Wostmann, B. S., Katze, J. R. & Farkas, W. R. Administration of exogenous queuine is essential for the biosynthesis of the queuosine-containing transfer RNAs in the mouse. *J. Biol. Chem.* **256**, 11591–11594 (1981).
- Tuorto, F. & Lyko, F. Genome recoding by tRNA modifications. *Open Biol.* **6**, 160287 (2016).
- Barbieri, I. & Kouzarides, T. Role of RNA modifications in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **20**, 303–322 (2020).
- Suzuki, T. The expanding world of tRNA modifications and their disease relevance. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **22**, 375–392 (2021).
- Kasai, H. et al. Letter: The structure of Q* nucleoside isolated from rabbit liver transfer ribonucleic acid. *J. Am. Chem. Soc.* **98**, 5044–5046 (1976).
- Okada, N., Shindo-Okada, N. & Nishimura, S. Isolation of mammalian tRNA^{Asp} and tRNA^{Tyr} by lectin-Sepharose affinity column chromatography. *Nucleic Acids Res.* **4**, 415–423 (1977).
- Crich, D. & Sun, S. Direct formation of β-mannopyranosides and other hindered glycosides from thioglycosides. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 435–436 (1998).
- Crich, D., de la Mora, M. & C, R. Synthesis of the mannosyl erythritol lipid MEL A; confirmation of the configuration of the meso-erythritol moiety. *Tetrahedron* **58**, 35–44 (2002).
- Tvaroska, I. & Taravel, F. R. Carbon-proton coupling constants in the conformational analysis of sugar molecules. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **51**, 15–61 (1995).
- Okada, N. & Nishimura, S. Enzymatic synthesis of Q nucleoside containing mannose in the anticodon of tRNA: isolation of a novel mannosyltransferase from a cell-free extract of rat liver. *Nucleic Acids Res.* **4**, 2931–2938 (1977).
- Sharma, V., Ichikawa, M. & Freeze, H. H. Mannose metabolism: more than meets the eye. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **453**, 220–228 (2014).
- Schmidt, R. R. & Michel, J. Facile synthesis of α- and β-O-glycosyl imidates; preparation of glycosides and disaccharides. *Angew. Chem. Int. Ed.* **19**, 731–732 (1980).
- Poungny, J.-R. & Sinay, P. Reaction d’imidates de glucopyranosyle avec l’acetonitrile. Applications synthétiques. *Tetrahedron Lett.* **17**, 4073–4076 (1976).

Acknowledgements

This project has received funding from the European Research Council (ERC) under the European Union’s Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement EpiR, No 741912 (T.C.). Further financial support was obtained from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation) via SFB1309 (Project-ID 325871075) and SPP 1784 (Project-ID 277203618) (T.C.). We thank the Volkswagen Foundation for generous support through the EvoRib VW-project (T.C.). We thank Prof. Dr. Stylianos Michalakis for kindly providing us with mouse liver samples.

Author contributions

M.H. and P.T. synthesised the compounds. E.K. and M.W. developed UHPLC-MS/MS methods for detection of the manQ derivatives. M.W., E.K. and M.H. performed the LC-MS co-injection-experiments. T.E. performed the metabolic feeding experiments and did the isolation of total RNA from mouse liver and HEK cells. M.W. developed HPLC-MS methods and performed the LC-MS analyses of the feeding experiments. T.C. and M.M. supervised the experiments and the project. T.C. designed the project. T.C. wrote the paper with contributions from M.H., M.W., T.E., E.K. and M.M.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27371-9>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to Thomas Carell.

Peer review information *Nature Communications* thanks the anonymous reviewers for their contribution to the peer review of this work.

Reprints and permission information is available at <http://www.nature.com/reprints>

Publisher’s note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2021

4 UNVERÖFFENTLICHTE ARBEITEN

4.1 Untersuchung von Queuin-Derivaten im löslichen Nukleosidpool mittels N⁹-methyliertem Queuin

4.1.1 Einleitung

Wie bereits eingangs beschrieben erfolgt der biosynthetische Einbau von Queuosin in eukaryotische tRNA über ein tRNA-modifizierendes Enzym, die sogenannte eukaryotische tRNA-Guanintransglykosylase (eTGT). Im Gegensatz zu den meisten anderen Modifikationen, bei denen die modifizierende chemische Entität direkt auf die kanonischen Basen übertragen wird, erfolgt hier der direkte Einbau der fertigen RNA-Modifikation Queuosin über eine Basenaustauschreaktion mit Guanin. Hierbei ist die Base Queuin als Substrat erforderlich, welches aus bakteriellen Quellen aufgenommen werden muss.^[87] Um zu untersuchen, welche Effekte an diesen Queuin-Derivaten im löslichen Nukleosidpool stattfinden, sollte ein synthetisches Derivat hergestellt werden, welches nicht in tRNA eingebaut werden kann. Insbesondere sollte untersucht werden, ob die Glykosylierung von Queuosin an der modifizierten tRNA oder bereits im löslichen Nukleosidpool stattfindet. In diesem Fall würden die dann bereits glykosylierten Queuinderivate mittels einer Transglykosylierungsreaktion durch die eTGT in die tRNA eingebaut werden. Hierzu wurde als Testmolekül ein Queuin-Derivat verwendet, welches an der N⁹-Position methyliert wurde (N⁹-Methylqueuosin, N⁹-MeQ, **111**). Dadurch sollte eine Transglykosylierung aufgrund der Blockierung der nukleophilen N⁹-Position ausgeschlossen werden (vgl. Abbildung 4.1).

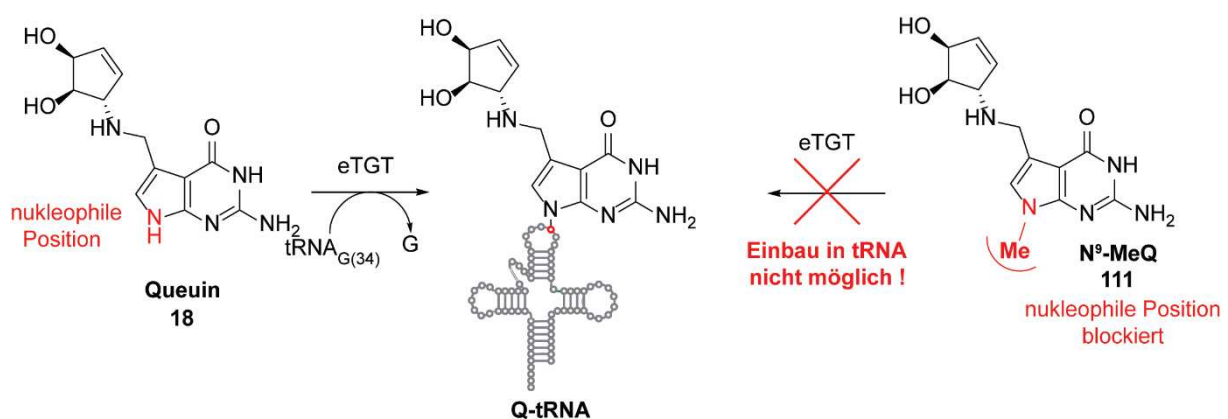
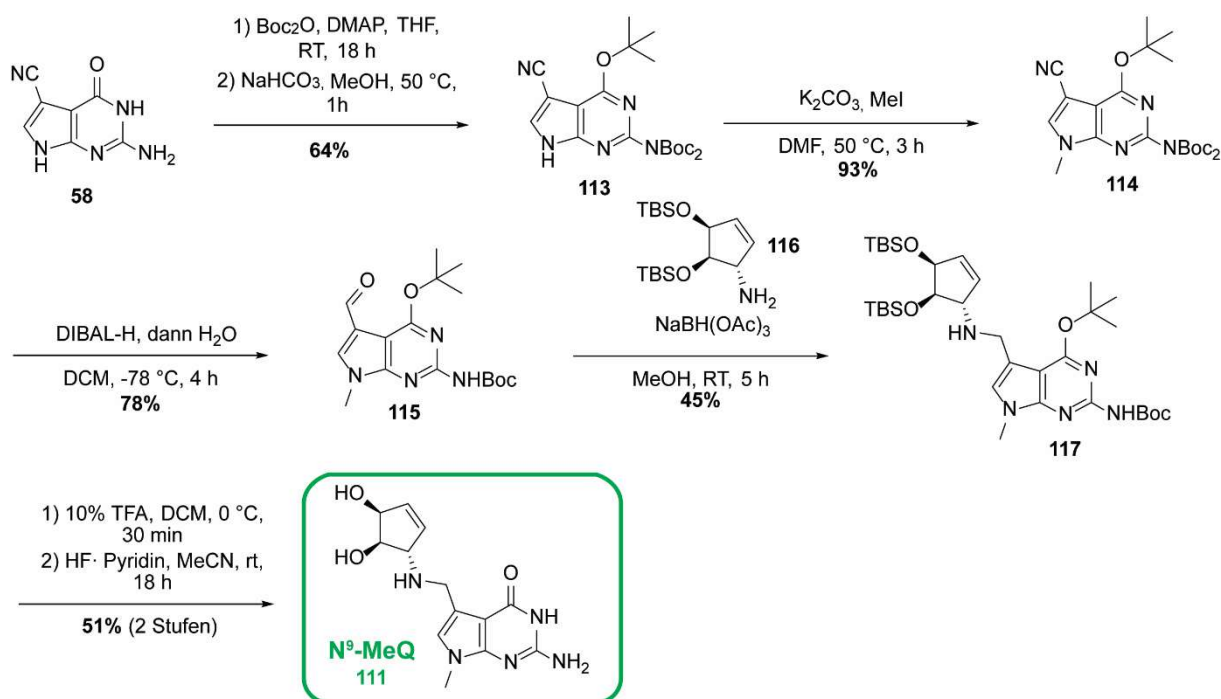


Abbildung 4.1: Der Einbau von Queuin **18** in eukaryotische tRNA erfolgt durch eine Basenaustauschreaktion mit Guanin durch eTGT, wobei die nukleophile N⁹-Position für die Transglykosylierung erforderlich ist. Wenn diese wie bei N⁹-MeQ **111** blockiert ist, kann keine Transglykosylierung durch eTGT erfolgen.

4.1.2 Synthese von N⁹-methyltem Queuin

Schema 4.1: Synthese von N⁹-Methylqueuosin **111** ausgehend von 7-Cyano-7-deazaguanin **58** in 6 Stufen.

Die Synthese dieses Derivats ist in Schema 4.1 dargestellt. Ausgehend von 7-Cyano-7-deazaguanin **58** wurde eine Boc-Schätzung des Heterozyklus durchgeführt. Dabei wurde zum einen die nukleophile exozyklische Aminogruppe als Boc-Derivat geschützt und zum anderen eine Schätzung der nukleophilen N¹-Position durch Einführung einer *tert*-Butylgruppe an O⁶ erreicht.^[189] Eine zusätzliche unerwünschte Schätzung an der N⁹-Position wurde durch Einwirken von NaHCO₃ in Methanol selektiv entfernt, um das dreifachgeschützte Derivat **113** zu erhalten. Anschließend wurde eine Methylierung der N⁹-Position mit K₂CO₃ als Base und Methyljodid durchgeführt. Interessanterweise führte die Verwendung der stärkeren Base NaH zu extrem schlechten Ausbeuten (~20%), während K₂CO₃ exzellente Ausbeuten (>90%) lieferte. Das so an N⁹-methylierte Deazaguaninderivat **93** wurde anschließend durch Reduktion der Cyanofunktionalität mit DIBAL-H und anschließender Hydrolyse zu der für die Kopplung mit der Cyclopenteneinheit erforderlichen formylierten Verbindung **115** umgesetzt. Dabei war aufgrund der lewissauren Bedingungen eine selektive Abspaltung einer Boc-Schutzgruppe des doppelt Boc-geschützten exozyklischen Amins zu beobachten, welche jedoch für den weiteren Syntheseverlauf irrelevant war und sogar aufgrund der größeren Polaritätsänderung des Produkts gegenüber dem Edukt eine bessere Aufreinigung ermöglichte. Die Synthese der Cyclopenteneinheit wurde bereits in Kapitel 3.1 beschrieben. Ausgehend hiervon wurde zunächst eine doppelte TBS-Schätzung durchgeführt und

anschließend die basenlabile Trichloroacetamid-Schutzgruppe mit wässriger NaOH in Ethanol entfernt. Der Baustein **116** wurde über eine reduktive Aminierungsreaktion mit dem Nucleobasenbaustein **115** und dem reduktiven Aminierungsreagenz $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ in Methanol zum geschützten N⁹-Methylqueuinderivat **117** umgesetzt. Eine abschließende Entschützung mit TFA gefolgt von HF · Pyridin lieferte das N⁹-methylierte Queuinderivat **111**, welches für die weitere Untersuchung in zellbiologischen Studien verwendet wurde. Insgesamt konnte **111** in guten Ausbeuten (11% über 7 Stufen ausgehend von Verbindung **58**) erhalten werden.

4.1.3 Untersuchungen zur Glykosylierung von N⁹-Methylqueuin im löslichen Nucleosidpool

Die Enzyme, welche für die Biosynthese der glykosylierten Queuosinderivate ManQ und GalQ verantwortlich sind, sind bisher unbekannt. Da die für den Einbau von Queuin in die tRNA zuständige eTGT jedoch ein relativ breites Spektrum an 7-Deazaguaninderivaten für den Einbau zu akzeptieren scheint, stellt sich die Frage, ob die Glykosylierung bereits im löslichen Nucleosidpool an Queuin stattfinden kann. Die glykosylierten Queuinderivate würden anschließend durch die eTGT in die tRNA eingebaut werden. Da N⁹-MeQ aufgrund der Blockierung der N⁹-Position nicht eingebaut werden kann, wurde untersucht, ob bei Verfütterung dieses Derivats an humane Zellkultur glykosylierte Produkte im löslichen Nucleosidpool zu finden sind (vgl. Abbildung 4.2).

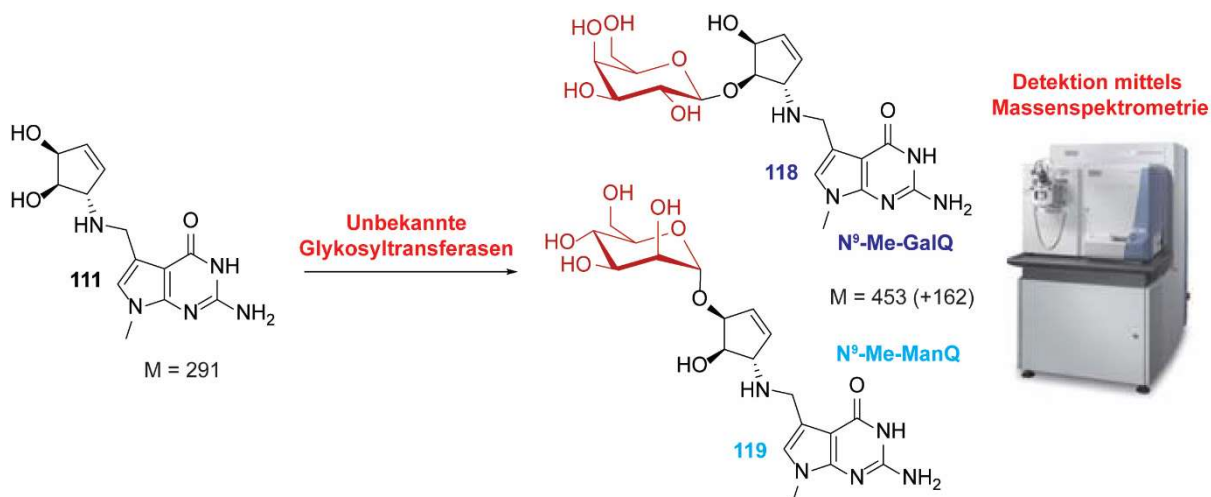


Abbildung 4.2: Mögliche Produkte einer Glykosylierung durch die bisher unbekanntes Mannosyl- und Galactosyltransferasen im löslichen Nucleosidpool wurden mithilfe von LC-MS/MS analysiert. Die möglichen Produkte dieser Glykosylierung sind N⁹-Methyl-Galactosyl-Queuosin (N⁹-Me-GalQ, **118**) und N⁹-Methyl-Mannosyl-Queuosin (N⁹-Me-ManQ, **119**).

Hierzu wurde N⁹-MeQ dem Medium von HEK293-Zellen supplementiert. Anschließend wurde der lösliche Nucleosidpool der behandelten Zellen isoliert und massenspektrometrisch mittels LC-MS/MS untersucht. So sollte mithilfe des für Queuinderivate sehr spezifischen

massenspektrometrischen Fragmentierungsmusters festgestellt werden, ob sich ein Molekül mit zu glykosyliertem N⁹-MeQ passender Masse (M = 453) im löslichen Nucleosidpool wiederfindet. Dies wäre ein Hinweis darauf, dass die Glykosylierung bereits im löslichen Nucleosidpool stattfinden kann. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Abbildung 4.3 dargestellt. Bei Supplementierung physiologischer Konzentrationen des Probenmoleküls konnte kein glykosyliertes N⁹-MeQ-Derivat identifiziert werden.

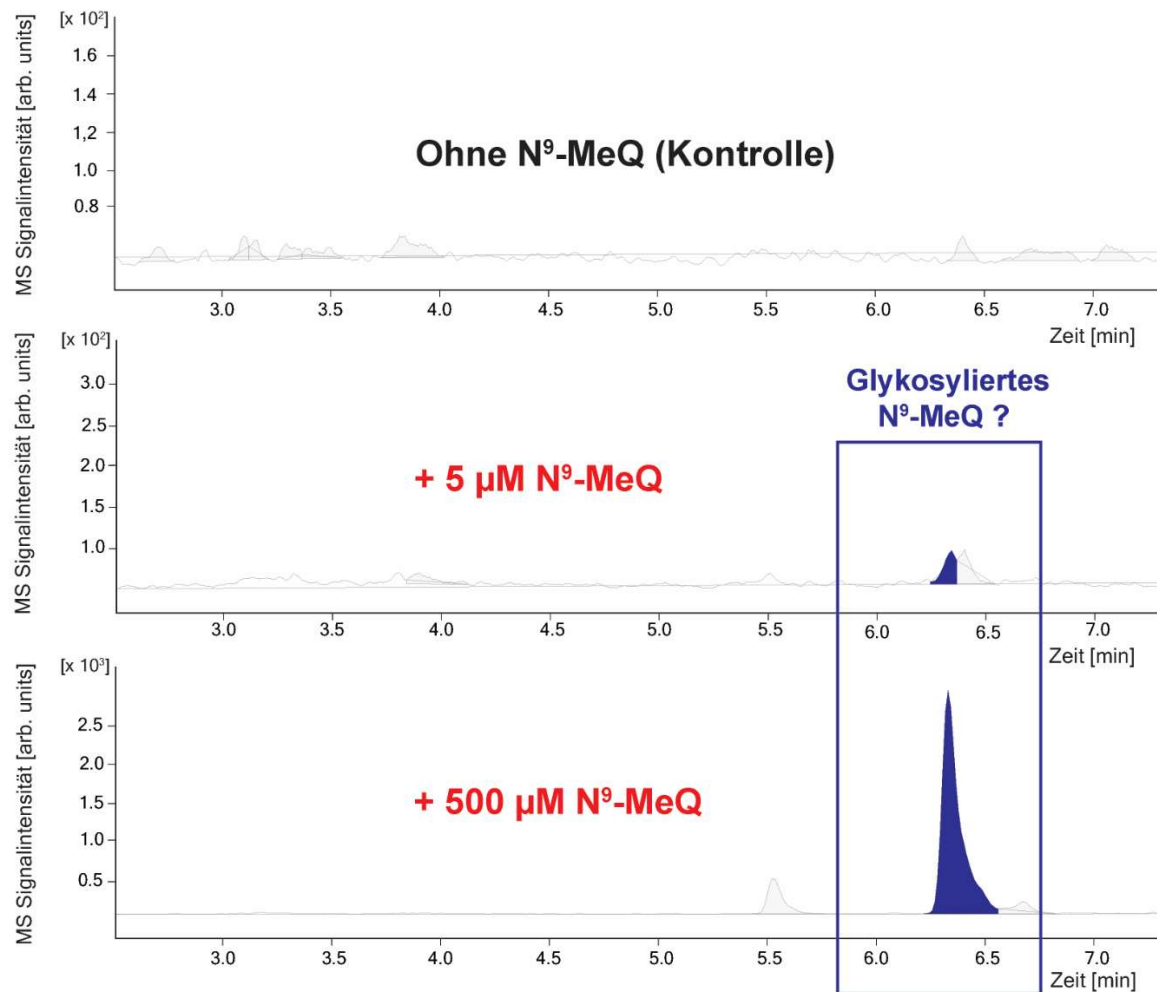


Abbildung 4.3: Ergebnis des Verfütterungsexperiments von N⁹-MeQ zur Identifizierung möglicher Glykosyltransferasen im löslichen Nucleosidpool. Gezeigt sind Chromatogramme, welche aus einer QQQ-MS/MS-Analyse resultieren, beobachtet wird ein Masseübergang, welcher spezifisch für glykosylierte N⁹-MeQ-Derivate ist. Erst bei Verfütterung von 500 µM N⁹-MeQ, was der 10.000-fachen Menge der physiologischen Queuin-Konzentration entspricht, kann das Auftreten eines relativ schwachen Signals eindeutig beobachtet werden.

Bei zunehmender Konzentration des supplementierten Probenmoleküls lässt sich feststellen, dass ein nicht näher identifiziertes Molekül, welches die Masse von glykosyliertem N⁹-MeQ aufweist, in den Zellen auftritt. Dabei sind die beobachteten Mengen jedoch sehr klein, was einen spezifischen physiologischen Prozess eher unwahrscheinlich erscheinen lässt. Dies könnte allerdings auf einen von mehreren Faktoren zurückzuführen sein: Zum Einen könnte

das beobachtete Signal das Produkt einer unspezifischen Glykosylierung sein, welche aufgrund der hohen Konzentration (10^4 -fach im Vergleich zur natürlichen Queuin-Konzentration) des Probemoleküls auftritt. Weiterhin ist vorstellbar, dass eine Glykosylierung von Queuosin während des Einbaus durch eTGT in die tRNA erfolgt. Dabei könnte N⁹-MeQ, da es in der Lage sein sollte, an die Queuinbindungstasche der eTGT zu binden, in kleinen Mengen glykosyliert werden, obwohl queuosinmodifizierte tRNA das Hauptsubstrat der glykosylierenden Enzyme darstellt. Zuletzt ist allerdings auch vorstellbar, dass eine Glykosylierung von Queuin im löslichen Nukleosidpool durch die beteiligten Enzyme erfolgt, N⁹-MeQ jedoch ein schlechtes Substrat darstellt, sodass es nur zu einem geringen Teil glykosyliert wird. Letztere Hypothese macht insofern Sinn, als dass die Zelle im Falle einer Glykosylierung im löslichen Nukleosidpool in der Lage sein muss, zwischen Queuin und dem Nukleosid Queuosin zu unterscheiden, welches wiederverwertet wird und durch eine Glykosylase zu Queuin umgesetzt wird. Insofern könnte das Vorhandensein einer funktionellen Gruppe an N⁹ zu einer deutlich verminderten Akzeptanz des Substrats durch die glykosylierenden Enzyme führen.

Aufgrund der erhaltenen Daten erscheint eine Glykosylierung des natürlichen Queuins im löslichen Nukleosidpool eher unwahrscheinlich. In diesem Zusammenhang ist zunächst insbesondere die Identifikation der glykosylierenden Enzyme erforderlich, um eine genauere Aussage über deren Substrate treffen zu können.

4.1.4 Potentielle Verwendung von N⁹-Methylqueuin als Inhibitor

Obwohl N⁹-MeQ nicht in die tRNA eingebaut werden kann, sollte es aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit jedoch in der Lage sein, an Queuin-Bindungsstellen in Enzymen, wie etwa der eTGT, binden zu können. Deshalb wurde untersucht, ob N⁹-MeQ als kompetitiver Inhibitor für den Einbau von Queuin in tRNA über eine Inhibition der eTGT aktiv sein könnte. Ein potenter eTGT-Inhibitor könnte etwa in Zusammenhang mit Krebserkrankungen interessant sein, da gezeigt werden konnte, dass ein *knockdown* der eTGT zu einem Rückgang von Tumoren in einem Xenograft-Modell führt.^[190-191] Hierzu wurden HEK293-Zellen für 5 Tage ohne Queuin kultiviert, um Zellen mit nahezu Queuosin-freier tRNA zu erhalten. Anschließend wurde N⁹-MeQ in unterschiedlichen Konzentrationen kompetitiv mit physiologischen Konzentrationen an freiem Queuin (50 nM) an diese Q-freien Zellen verfüttert. Danach wurde der lösliche Nukleosidpool auf das Vorhandensein von Queuin und N⁹-MeQ untersucht sowie die Level an Queuosin und GalQ in tRNA bestimmt. Dabei ist zu beobachten, dass mit zunehmender Konzentration an verfüttertem N⁹-MeQ geringere Level an Q in tRNA im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten sind. Nach etwa 24 h wird jedoch das Q-Modifikationsniveau der Kontrolle erreicht (siehe Abbildung 4.4).

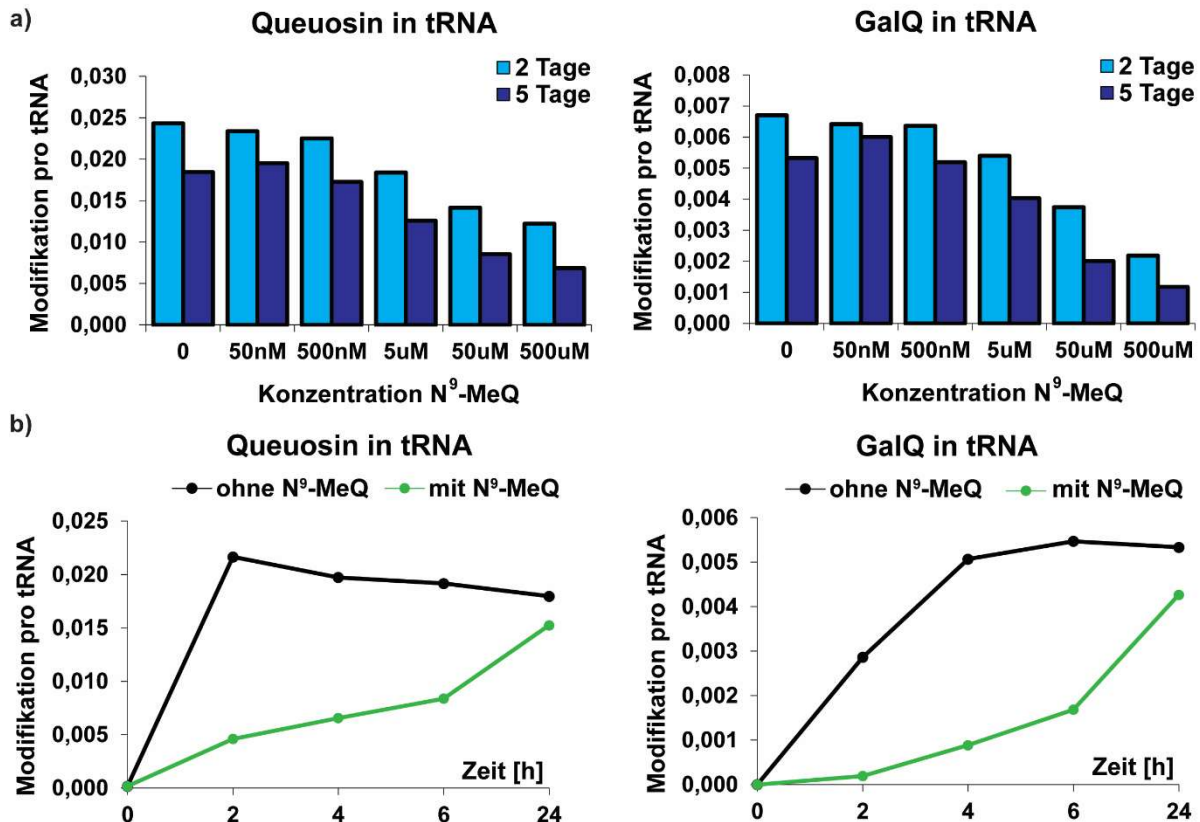


Abbildung 4.4: Daten zur Inhibition von Queuin-Einbau durch N⁹-MeQ; **a:** In Abhängigkeit der zugeführten Konzentration nimmt die Menge an eingebautem Queuin sowie GalQ in tRNA ab. Nach 5 Tagen ist im Vergleich zu 2 Tagen generell aufgrund von entstehendem Q-Mangel durch häufigere Zellteilung ein niedrigeres Q-Level zu beobachten; **b:** In einer zeitaufgelösten Fütterungsstudie wurden gleiche Konzentrationen an Queuin und N⁹-MeQ supplementiert. Obwohl zunächst eine Inhibition zu beobachten ist (geringere Q-Level) gleicht sich dieser Effekt nach etwa 24 h aufgrund der Irreversibilität des Queuin-Einbaus und der hohen Halbwertszeit von tRNA wieder aus.

Es ist also davon auszugehen, dass eine kompetitive Inhibition des an der Aufnahme und dem Einbau beteiligten biologischen Wegs besteht. Betrachtet man die Mengen an Queuin und N⁹-MeQ im löslichen Nukleosidpool der Zellen, ist festzustellen, dass mit zunehmender Konzentration an N⁹-MeQ die Konzentration an Queuin in der Zelle sinkt und auch über einen langen Zeitraum niedrig bleibt (siehe Abbildung 4.5). Es scheint daher wahrscheinlich, dass N⁹-MeQ hauptsächlich die Aufnahme von Queuin über Queuin-Transporter inhibiert, während in der Zelle bereits vorhandenes Queuin relativ schnell und insbesondere irreversibel in die tRNA eingebaut wird. Da dieser Prozess des Einbaus vermutlich deutlich schneller abläuft als die typische Halbwertszeit einer tRNA (etwa 30-40 h)^[192-193], scheint eine kompetitive Hemmung der TGT durch N⁹-MeQ nur kurzfristig eine Rolle für den irreversiblen Einbauprozess von Queuin in die tRNA zu spielen. Es ist bekannt, dass Queuin über einen spezifischen Rezeptor in die Zelle aufgenommen wird.^[87] Die Inhibition der Aufnahme von

Queuin durch N⁹-MeQ deutet darauf hin, dass dieses N⁹-modifizierte Derivat ebenfalls über diesen bisher nicht charakterisierten Queuin-Transporter in die Zelle aufgenommen werden könnte. Insofern könnte ein entsprechend modifiziertes Queuin-Derivat als Probenmolekül dienen, um eine Ermittlung und Charakterisierung des Queuin-Transporters durchzuführen.

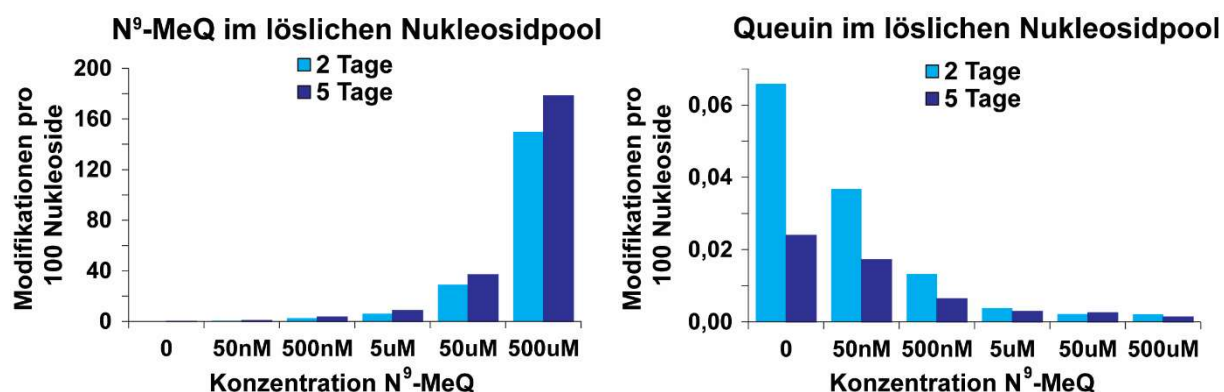


Abbildung 4.5: Gemessene Level an Queuin und N⁹-MeQ im löslichen Nucleosidpool bei Supplementierung verschiedener Konzentrationen (0-500 µM) von N⁹-MeQ. Mit zunehmender supplementierter N⁹-MeQ-Konzentration sind verringerte Level an normalem Queuin zu beobachten.

4.1.5 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Studie wurde erstmals ein N⁹-funktionalisiertes Queuinderivat synthetisiert und als Probenmolekül in Zellkultur-Fütterungsexperimenten eingesetzt. Die Synthese des bisher nicht literaturbekannten Moleküls N⁹-MeQ konnte erfolgreich in 6 Stufen und mit guten Ausbeuten durchgeführt werden. Bei der Verfütterung von N⁹-MeQ an HEK293-Zellen konnte lediglich bei Konzentrationen, welche die physiologischen Bedingungen um das 10⁴-fache überschreiten, eine extrem geringe Menge eines Signals beobachtet werden, welches glykosyliertem N⁹-MeQ entsprechen könnte. In diesem Zusammenhang erscheint es unwahrscheinlich, dass eine Glykosylierung von Queuinderivaten bereits vor dem Einbau in die tRNA im löslichen Nucleosidpool erfolgt, weitere Experimente zur Verifizierung der erhaltenen Daten sind jedoch noch erforderlich. Hinsichtlich der Aktivität von N⁹-MeQ als Inhibitor für den Einbau und die Aufnahme von Queuin konnte eine kompetitive Inhibition beobachtet werden, welche vermutlich hauptsächlich auf die Blockierung der spezifischen Transporter von Queuin in die Zelle zurückzuführen ist. Eine Inhibition der eTGT erscheint wahrscheinlich, insbesondere da vor kurzem durch computerchemische Modellierung der eTGT gezeigt werden konnte, dass die N⁹-Position für die Bindung an die eTGT wenig relevant ist.^[191] Dieser Effekt scheint jedoch aufgrund der schnellen Einbaureaktion gegenüber der hohen Halbwertszeit von Q-tRNA relativ wenig Einfluss aufzuweisen und die insgesamten Q-Level in tRNA liegen nach einer gewissen Latenzzeit (~24 h) nur leicht verringert vor. Weitere Untersuchungen zur Verwendung von N⁹-MeQ als eTGT- oder Queuin-Transporter-Inhibitor,

insbesondere eine Untersuchung der Inhibitionskinetik, wären im Hinblick auf die medizinische Anwendung solcher Inhibitoren durchaus interessant. Eine Untersuchung der Aufnahme- und Einbaukinetik von Queuin-Derivaten könnte hierbei zu einem besseren Verständnis des Inhibitionsmechanismus beitragen. Die hier gezeigten biologischen Experimente stellen jedoch nur Vorversuche dar und eine Verifizierung der Experimente hinsichtlich Reproduzierbarkeit steht noch aus.

4.1.6 Material und Methoden

Synthesvorschriften für die hier gezeigten Verbindungen sind unter Kapitel 5.2.1 (N⁹-MeQ) aufgeführt.

4.1.7 Autorenbeiträge

Im Rahmen dieser Studie war ich für die Synthese des Probemoleküls N⁹-MeQ verantwortlich. Zellbiologische Fütterungsexperimente sowie massenspektrometrische Quantifizierungsexperimente wurden von Dr. Matthias Heiß durchgeführt.

4.2 Experimente zur Ermittlung der an der Glykosylierung von Queuosin beteiligten Enzyme mittels eines 6-Thioqueuin-Derivats

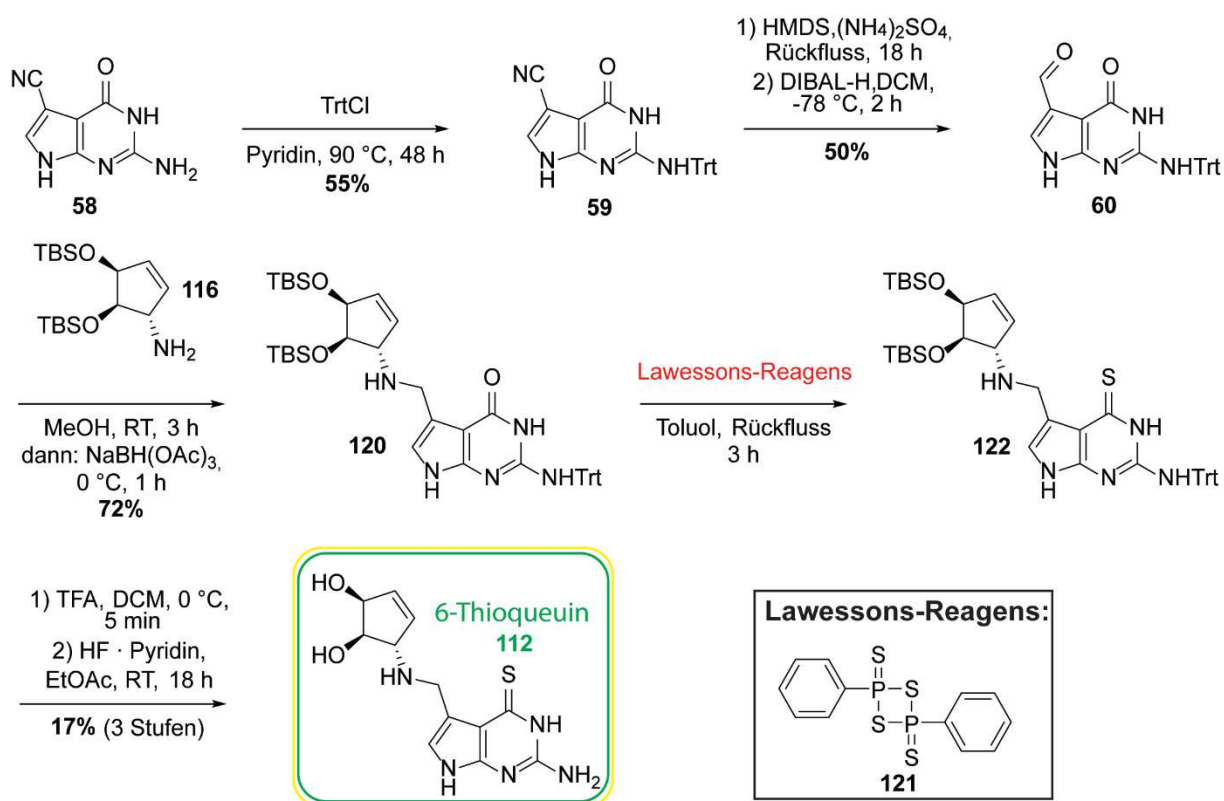
4.2.1 Einleitung

Obwohl die glykosylierten Queuosin-Derivate GalQ und ManQ bereits seit einiger Zeit bekannt sind, konnte bisher der Biosyntheseweg dieser RNA-Modifikationen nicht geklärt werden. Angesichts der Spezifität der Glykosylierung, die jeweils nur in einem tRNA-Isoakzeptor stattfindet und hinsichtlich Stereo- sowie Regiochemie genau definiert ist, ist es äußerst wahrscheinlich, dass definierte Enzyme für die jeweilige Funktionalisierung verantwortlich sind. Die entsprechenden Glykosyltransferasen sind jedoch bis heute unbekannt. In einer Arbeit von Okada *et al.* konnte lediglich spekuliert werden, dass die für ManQ verantwortliche Mannosyltransferase auf die spezifische tRNA wirkt und GDP-Mannose als Substrat verwenden kann.^[185] Zum besseren Verständnis der Funktion dieser komplexen humanen RNA-Modifikationen ist eine Aufklärung von deren Biosyntheseweg sowie eine Ermittlung der beteiligten Enzyme von höchstem Interesse.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden erste Pioniersuche hierzu durchgeführt, welche die Eignung von 6-ThioQ zur Verwendung als chemoproteomischen *photocrosslinker* überprüfen sollten. Es ist bekannt, dass 6-Thioguaninderivate unter Bestrahlung mit kurzwelligem Licht über einen Radikalmechanismus als Photocrosslinker eingesetzt werden können.^[187-188, 194-196] Hierzu wurde im Rahmen dieser Arbeit in Zellkulturexperimenten untersucht, inwieweit 6-ThioQ sich für die geplanten Experimente eignen könnte. Die Ergebnisse dieser vorläufigen Studie werden im Folgenden vorgestellt.

4.2.2 Synthese von 6-Thioqueuin

Der für die Synthese von 6-ThioQ benötigte 7-Deazaguaninbaustein wurde nach Brooks *et al.* in 3 Stufen hergestellt (s. Schema 4.2).^[167] Dabei wurde zunächst das 7-Cyano-7-deazaguanin **58** mittels einer Hantz'schen Pyrrolsynthese aus 2,6-Diaminopyrimidinon hergestellt. Nach einer Schützung der exozyklischen Aminogruppe als Tritylderivat **59** wurde die Cyano-Funktionalität mithilfe von DIBAL-H und anschließender Hydrolyse zum geschützten 7-Formyl-7-deazaguaninderivat **60** umgesetzt. Nach reduktiver Aminierung mit dem doppelt TBS-geschützten Cyclopentenbaustein **116** wurde das geschützte Queuin-Derivat **120** erhalten. Anschließend wurde mithilfe des Lawesson-Reagens **121** an der 6-Position die Thio-Funktionalität eingeführt, um das geschützte 6-ThioQ-Derivat **122** zu erhalten. Abschließende Entschützungen und HPLC-Aufreinigung lieferte 6-ThioQ **112**.



Schema 4.2: Synthese von 6-Thioqueuin **112** mithilfe eines Sauerstoff-Schwefel-Austauschs an der O⁶-Position durch das Lawessons-Reagens **121**.

4.2.3 Zellbiologische Verfütterung von 6-Thioqueuin an HEK293-Zellen

6-ThioQ wurde erstmals in einer Studie von Akimoto *et al.* untersucht. Dabei wurde dieses Queuinderivat an L5178Y Leukämie-Zellen aus Mäusen verfüttert, um zu beobachten, ob diese Modifikation als Substrat der eTGT akzeptiert wird und ob sich so Effekte auf das Zellwachstum beobachten lassen.^[197] Hierbei konnten gute Einbauraten von 6-ThioQ von bis zu 78% sowie eine deutliche Inhibition des Zellwachstums beobachtet werden. Um zu untersuchen, ob 6-ThioQ als Probenmolekül für die Identifizierung der Glykosyltransferasen geeignet ist, wurde zunächst über Fütterungsexperimente überprüft, ob sich diese literaturbekannten Daten reproduzieren lassen und 6-ThioQ in Zellen aufgenommen und anschließend in die tRNA anstelle von Queuin eingebaut werden kann. Dabei wurde insbesondere auch untersucht, in welchem Umfang sich die tRNA mit 6-Thioqueuin modifizieren ließ. Hierzu wurden verschiedene Konzentrationen des Probenmoleküls an HEK293-Zellen verfüttert und anschließend die zelluläre tRNA auf das Vorhandensein von 6-Thioqueuosin untersucht. Der entsprechende experimentelle Ablauf ist in Abbildung 4.6 dargestellt.

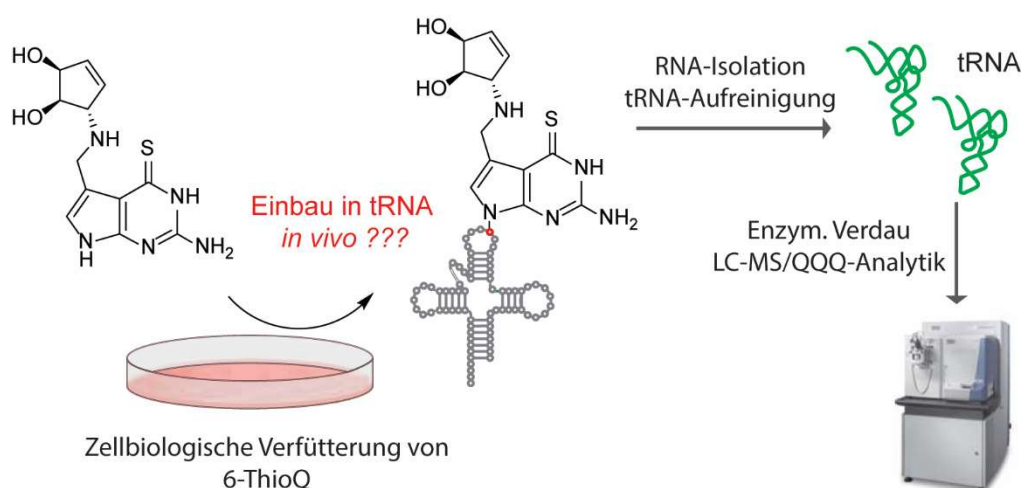


Abbildung 4.6: Experimenteller Aufbau zur Überprüfung des Einbaus von 6-Thioqueuin in tRNA durch die eTGT; 6-ThioQ wurde an Queuin-defiziente HEK293-Zellen verfüttert, in welchen *in vivo* ein Einbau in die zelluläre tRNA erfolgen sollte. Nach Ernten der Zellen und Aufreinigung der tRNA wurde die Menge an eingebautem 6-ThioQ in die tRNA über enzymatischen Verdau und LC-MS/MS-Analytik ermittelt.

Die erhaltenen Level an 6-Thioqueuosin in tRNA sind in Abbildung 4.7 dargestellt. Bei einer Fütterung von 5000 nM 6-ThioQ in Abwesenheit von supplementiertem Queuin wurde eine Einbaurrate von etwa 0.01 Modifikationen pro tRNA bezogen auf alle tRNAs beobachtet. Obwohl 6-ThioQ schlechter als normales Queuin in die tRNA eingebaut wird, scheint diese Menge angesichts der Tatsache, dass 6-ThioQ wie Queuin nur in 4 der insgesamt über 20 tRNAs eingebaut werden kann, für die geplanten *crosslinking*-Experimente ausreichend. Anhand der aus diesem Vorversuch erhaltenen Daten erscheint es plausibel, dass 6-ThioQ wie normales Queuin durch die eTGT erkannt und in die tRNA eingebaut werden kann. Bei einem Vergleich der eingebauten 6-ThioQ-Level in tRNA in An- und Abwesenheit von zusätzlich supplementiertem Queuin lässt sich feststellen, dass 6-ThioQ in Anwesenheit von Queuin deutlich schlechter in tRNA eingebaut wird. Insgesamt sinken in Anwesenheit von 6-ThioQ die Queuosin-Level in tRNA. Dieser Effekt wird bei einer Supplementierung von 5000 nM 6-ThioQ besonders deutlich und die beobachteten Queuosin-Level sinken im Vergleich zur Kontrolle um zwei Drittel ab. Für die Identifizierung der Glykosyltransferasen ist insbesondere die Erkenntnis, dass 6-Thioqueuosin durch diese erkannt und glykosyliert werden kann, besonders relevant, was aus dem beobachteten Signal für glykosyliertes 6-ThioQ deutlich wird. Die Glykosylierung scheint dabei nicht wesentlich durch die Anwesenheit von 6-Thioqueuosin in tRNA beeinflusst zu werden. Insofern scheint 6-ThioQ als *in vivo* crosslinker für die Identifikation der Glykosyltransferasen vielversprechend. Weitere Experimente zur Verifizierung der erhaltenen Daten stehen jedoch noch aus und wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt.

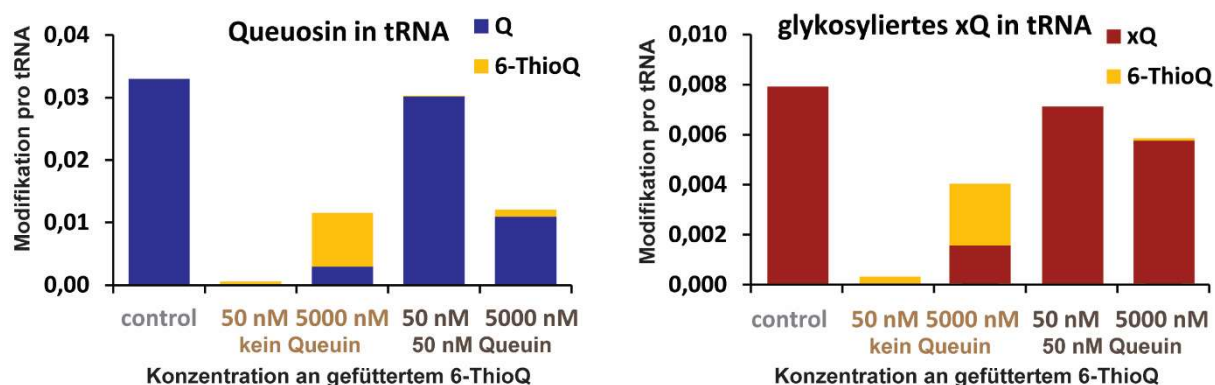


Abbildung 4.7: Ergebnisse eines zellbiologischen Verfütterungsexperiments von 6-ThioQ an HEK293-Zellen. Bei Verfütterung von 5000 nM 6-ThioQ kann in Abwesenheit physiologischer Konzentrationen von Queuin ein deutlicher Einbau von 6-ThioQ in die tRNA beobachtet werden und weiterhin gezeigt werden, dass 6-ThioQ durch die bisher unbekanntes Glykosyltransferasen zu xQ (ManQ, GalQ) glykosyliert werden kann. In Anwesenheit von Queuin erfolgt selbst bei 100-fachem Überschuss kaum Einbau von 6-ThioQ.

4.2.4 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine erfolgreiche Synthese von 6-Thioqueuin ausgehend von 6-Cyano-6-deazaguanin durchgeführt werden. Der Schlüsselschritt der Synthese, ein Sauerstoff-Schwefel-Austausch an der C6-Position des Guanosins, erfolgte dabei mithilfe des Laweson-Reagenzes und lieferte 6-Thioqueuin in hervorragender Reinheit. Dieses Probenmolekül wurde an HEK293-Zellen verfüttert und es konnte gezeigt werden, dass 6-ThioQ bei Verfütterung entsprechender Konzentrationen erfolgreich in die tRNA der Zellen eingebaut und anschließend weiter glykosyliert werden kann. Somit stellt dieses Molekül einen interessanten Startpunkt für die Identifizierung der Glykosyltransferasen dar, welche *in vivo* für die Synthese von ManQ und GalQ verantwortlich sind. 6-ThioQ könnte möglicherweise als Probenmolekül zur Identifizierung der Glykosyltransferasen, etwa mittels *photocrosslinking*, dienen.

4.2.5 Material und Methoden

Synthesevorschriften für die Synthese von 6-Thioqueuin sind in Kapitel 5.2.3 zu finden.

4.2.6 Autorenbeiträge

Im Rahmen dieser Studie war ich für die Synthese von 6-Thioqueuin verantwortlich. Zellbiologische sowie massenspektrometrische Experimente zur Untersuchung von Einbau und Zellpermeabilität der Verbindung wurden von Dr. Matthias Heiß durchgeführt.

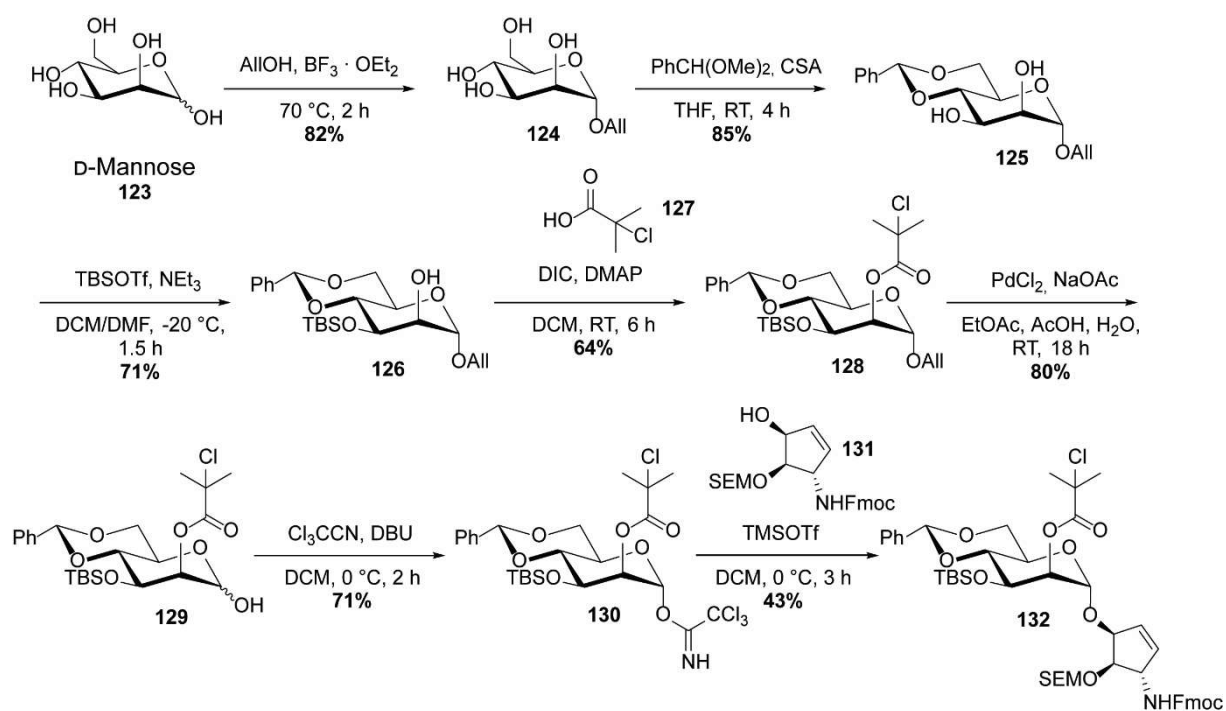
4.3 Verbesserte stereoselektive Synthese von Mannosyl-Queuosin

4.3.1 Einleitung

Die erste bekannte Totalsynthese von ManQ, welche in Kapitel 3.2 gezeigt ist, erfordert eine aufwändige HPLC-Aufreinigung zur Trennung des stereoisomeren Anomerengemischs, wobei eine schlechte Trennung sowie daraus folgend eine geringe Ausbeute problematisch sind. Dieses Gemisch aus α - und β -allyl-ManQ entsteht aufgrund der schlechten Stereoselektivität des Glykosylierungsschritts und stellt einen wichtigen Ansatzpunkt zur Optimierung der Totalsynthese dar. In der hier gezeigten Arbeit sollte eine stereoselektive Glykosylierungsstrategie angewandt werden, um die Synthese eines anomerenreinen Produkts zu ermöglichen, welches keine aufwändige mehrfache HPLC-Aufreinigung benötigt. Weiterhin sollte überprüft werden, ob der in Kapitel 4.5 gezeigte geschützte 7-Formyl-7-deazaguanosinbaustein für die Synthese von ManQ verwendet werden kann. Dies würde eine deutliche Verbesserung der Synthese darstellen, da, insbesondere im Hinblick auf eine Isotopenmarkierung dieses Bausteins, eine deutliche Verkürzung und eine Optimierung der Synthese dieses Bausteins hinsichtlich der Ausbeute vorteilhaft ist. Die Ergebnisse dieser Studien werden im Folgenden vorgestellt.

4.3.2 Synthese des Mannosyldonors stereoselektive Glykosylierung

Für die stereoselektive Glykosylierung wurde eine auf dem Nachbargruppeneffekt basierende Strategie angewandt. Der hierfür verwendete Glykosyldonor wurde dabei in 6 Stufen ausgehend von D-Mannose **123** hergestellt. Die Synthese ist in Schema 4.3 dargestellt. Zuerst erfolgte eine Allyl-Schützung des anomeren Zentrums mit Allylalkohol unter Lewis-Säure-Katalyse, wodurch Verbindung **124** erhalten wurde. Anschließend wurde eine Schützung der Hydroxygruppen an den Positionen 4 und 6 als Benzylidenacetal zu Verbindung **125** durchgeführt. Nach einer selektiven mono-Schützung der zugänglicheren äquatorialen Hydroxygruppe an der 3-Position mit TBSOTf als TBS-Ether zu **126** wurde die für den Nachbargruppeneffekt essentielle 2-Chloroisobutyrylschutzgruppe durch eine EDC und DMAP vermittelte Kopplung mit der freien Säure **127** eingeführt, um **128** zu erhalten. Entschützungen des anomeren Zentrums mit PdCl₂ in Methanol ergab **129**. Die Synthese des Glykosyl-Donors wurde anschließend durch Umsetzung zum Trichloracetimidat **130** komplettiert.



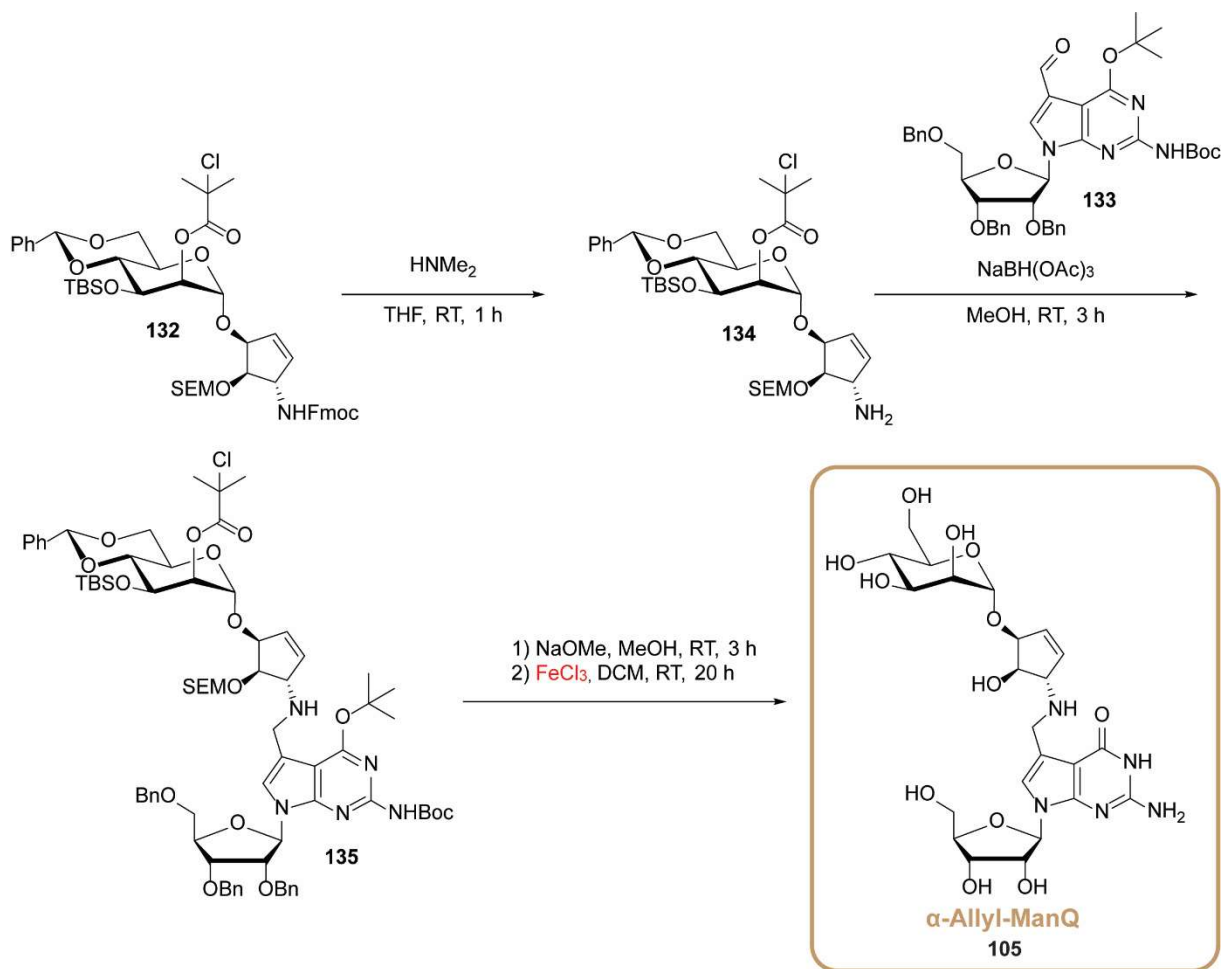
Scheme 4.3: Synthese des stereoselektiv mannosylierten Cyclopentens **132** über den Mannosyldonor **130** ausgehend von D-Mannose **123**.

Der so erhaltene Baustein **130** wurde anschließend in einer Glykosylierungsreaktion mit dem bereits beschriebenen SEM-geschützten Cyclopenten **131** umgesetzt. Dabei erwies sich die Reaktion wie erwartet als äußerst stereoselektiv, es konnte kein β -Produkt beobachtet werden. Insgesamt wurde so der mannosylierte Cyclopentenbaustein **132** in einer Ausbeute von 45% erhalten. Interessanterweise lieferte ein ähnlicher Zuckerbaustein, welcher an der 3-Position eine PMB anstatt einer TBS-Schutzgruppe aufwies und eine Pivaloylgruppe als dirigierende Gruppe an der 2-Position aufwies, extrem schlechte Ausbeuten an Glykosylierungsprodukt. Dieser Effekt ist vermutlich auf die deutlich höhere sterische Hinderung durch die räumlich anspruchsvollere Pivaloylschutzgruppe, sowie auf die schlechte Löslichkeit des Donors in DCM zurückzuführen. Reaktionen in anderen Lösungsmitteln (THF, Toluol) mit Zuckerdonor **130** lieferten ebenfalls kein Produkt, die Wahl eines geeigneten Lösungsmittels erscheint also im Hinblick auf die passende Stabilisierung des intermediären Oxocarbeniumions von entscheidender Bedeutung. Insgesamt konnte so durch die Optimierung des Zuckerdonors sowie die Wahl geeigneter Reaktionsbedingungen α -stereoselektiv der an der allylischen Position glykosylierte Baustein **132** erhalten werden.

4.3.3 Synthese von ManQ aus den Bausteinen

Zuletzt sollte geprüft werden, ob der erhaltene isomerenreine mannosylierte Cyclopenten-Baustein **132** mit dem neuen Deazaguaninbaustein **133**, welcher über eine deutlich effizientere Synthese als bisher literaturbekannt hergestellt wurde, kompatibel ist. Die finalen

Syntheseschritte sind in Schema 4.4 dargestellt. Die Entschützung der Fmoc-Schutzgruppe mit Dimethylamin in THF ergab dabei zunächst das freie Amin **134**. Die reduktive Aminierung zur Kopplung der beiden Bausteine **133** und **134** verlief problemlos und ergab das geschützte ManQ **135**. Die finale Entschützung war insbesondere im Hinblick auf die Benzylschutzgruppen an der Ribose schwierig, da diese in der Regel hydrogenolytische Bedingungen erfordern, welche aufgrund der leicht zu hydrierenden Doppelbindung im Cyclopentenring keine Option darstellten.



Schema 4.4: Finalisierung der Synthese von ManQ **105** ausgehend vom Glykosid **132**. Eine milde finale Entschützung wurde durch die Verwendung von wasserfreiem Eisen-(III)-chlorid in trockenem DCM ermöglicht.

Alternative Entschützungsstrategien mit Lewis-Säuren sind zwar literaturbekannt, erfordern aber in der Regel sehr starke Lewis-Säuren wie etwa Bortrichlorid, was im Hinblick auf die unter sauren Bedingungen leicht zu spaltende glykosidische Bindung zunächst problematisch erschien. Eine Strategie, bei der wasserfreies Eisen-(III)-chlorid in DCM verwendet wird, wurde bereits erfolgreich zur Benzyl-Entschützung von Glykosiden eingesetzt.^[198] In diesem Zusammenhang erschien dieser Ansatz attraktiv, und die Verwendung dieses Reagens

ermöglichte die Entschützung von ManQ **135**. Die beiden hier gezeigten Bausteine sind also für die Synthese von ManQ **105** durchaus geeignet und stellen eine deutliche Verbesserung der Synthese aufgrund einer deutlichen Reduzierung der benötigten Syntheseschritte für die Deazaguanineinheit sowie eine stereoselektive Synthese des mannosylierten Cyclopentenbausteins dar. Die gezeigte Synthese ermöglichte die Aufnahme vollständiger NMR-Spektren inklusive ^{13}C -NMR-Spektren (Abbildung 4.8, Abbildung 4.9), welche in der bisherigen Arbeit aufgrund der erhaltenen geringen Menge nicht gemessen werden konnten. Die Stereochemie der glykosidischen Bindung der Mannose ist anhand Abbildung 4.10 ersichtlich. Aus der erhaltenen $^1\text{J}_{\text{C-H}}$ -Kopplungskonstante von 170.3 Hz lässt sich die α -Konfiguration am anomeren Zentrum bestätigen. Die allyl-Konnektivität ist anhand des HMBC-Spektrums ersichtlich, wovon der relevante Ausschnitt in Abbildung 4.11 gezeigt ist. Es lässt sich sowohl die ^3J -Kopplung zwischen dem anomeren Kohlenstoff (C6) und dem allylischen Proton (H5) als auch die entsprechende Kopplung zwischen dem anomeren Proton (H6) und dem allylischen Kohlenstoff (C5) beobachten. Insgesamt zeigen die NMR-Spektren, dass die gewünschte Zielverbindung α -allyl-ManQ **105** aus der oben beschriebenen stereoselektiven Syntheseroute erhalten werden konnte.

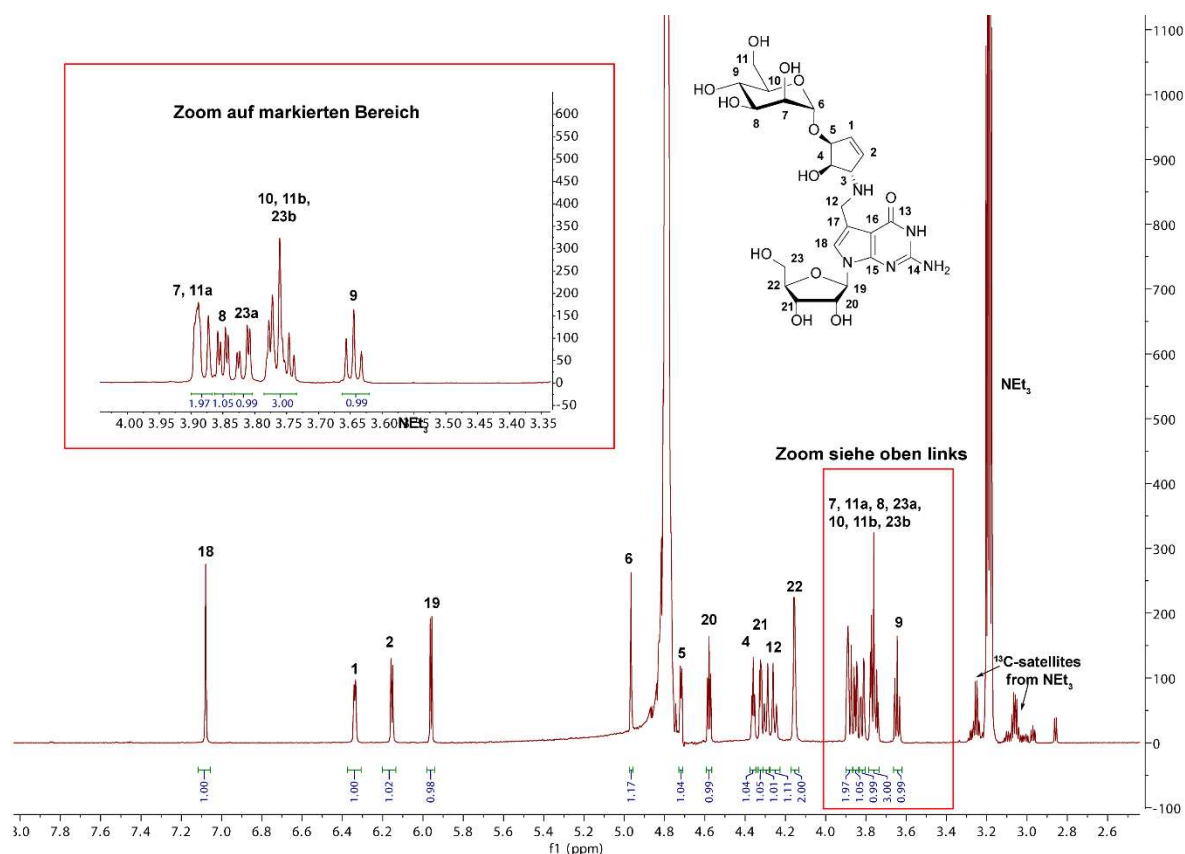


Abbildung 4.8: ^1H -NMR von α -allyl-ManQ, welches durch die beschriebene stereoselektive Syntheseroute erhalten wurde. Der Bereich von 4-3.35 ppm ist zur besseren Übersicht vergrößert dargestellt.

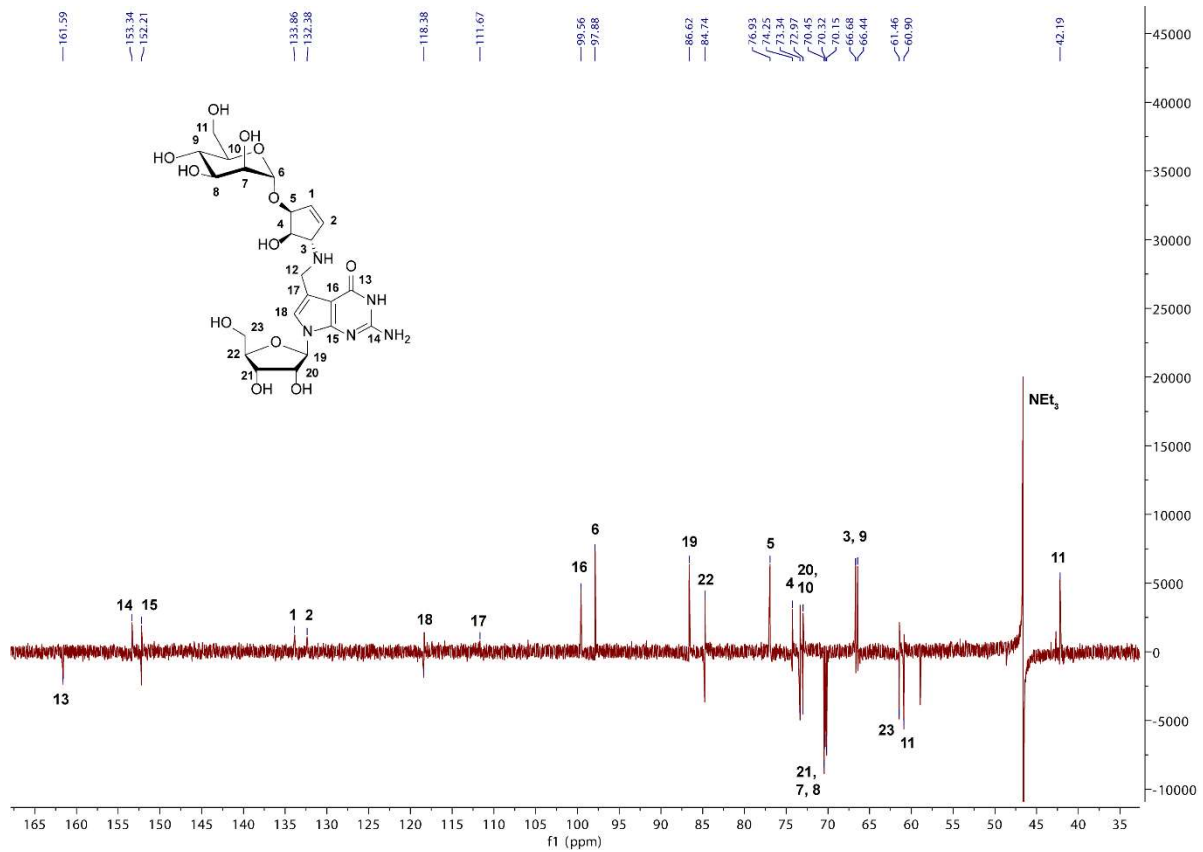


Abbildung 4.9: ^{13}C -NMR α -allyl-ManQ, welches durch die beschriebene stereoselektive Syntheseroute erhalten wurde.

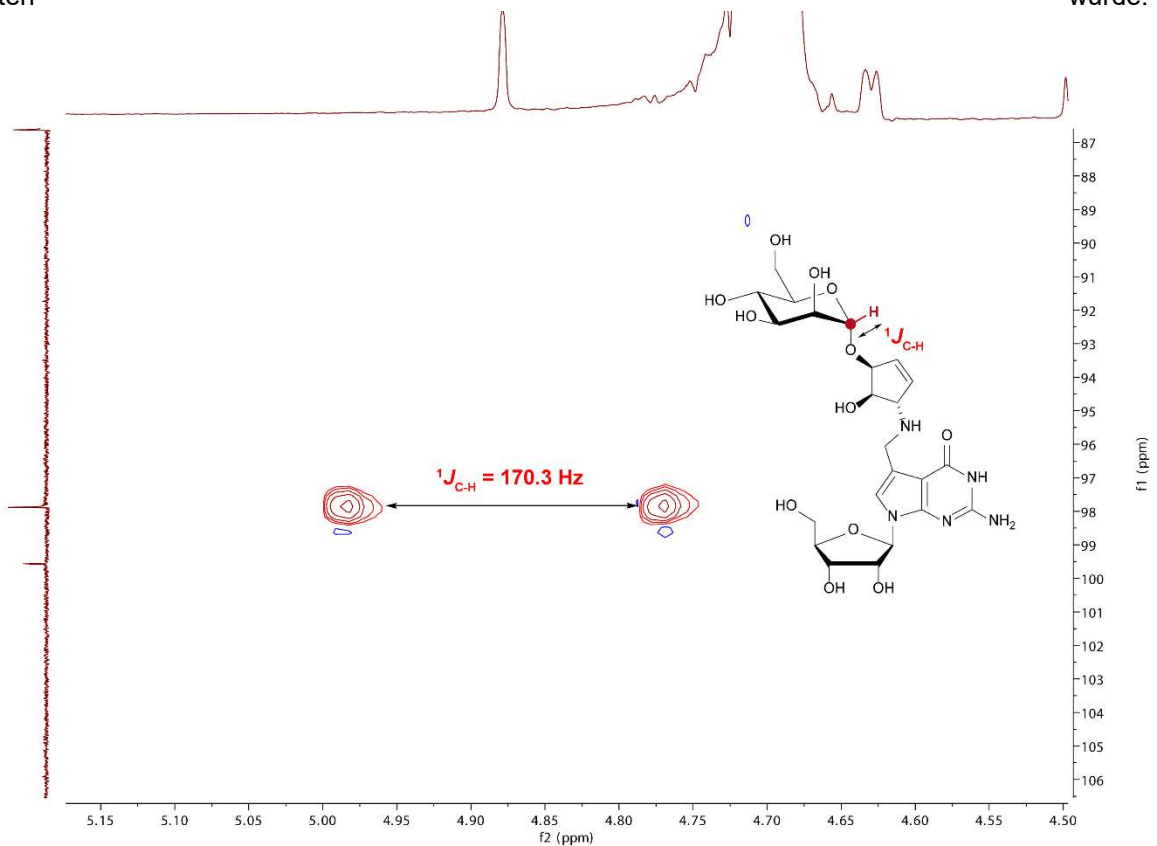


Abbildung 4.10: Ausschnitt aus dem ^1H -gekoppelten HSQC-Spektrum von α -allyl-ManQ. Die erhaltene Kopplungskonstante belegt die α -Konformation des anomeren Zentrums der Mannoseeinheit.

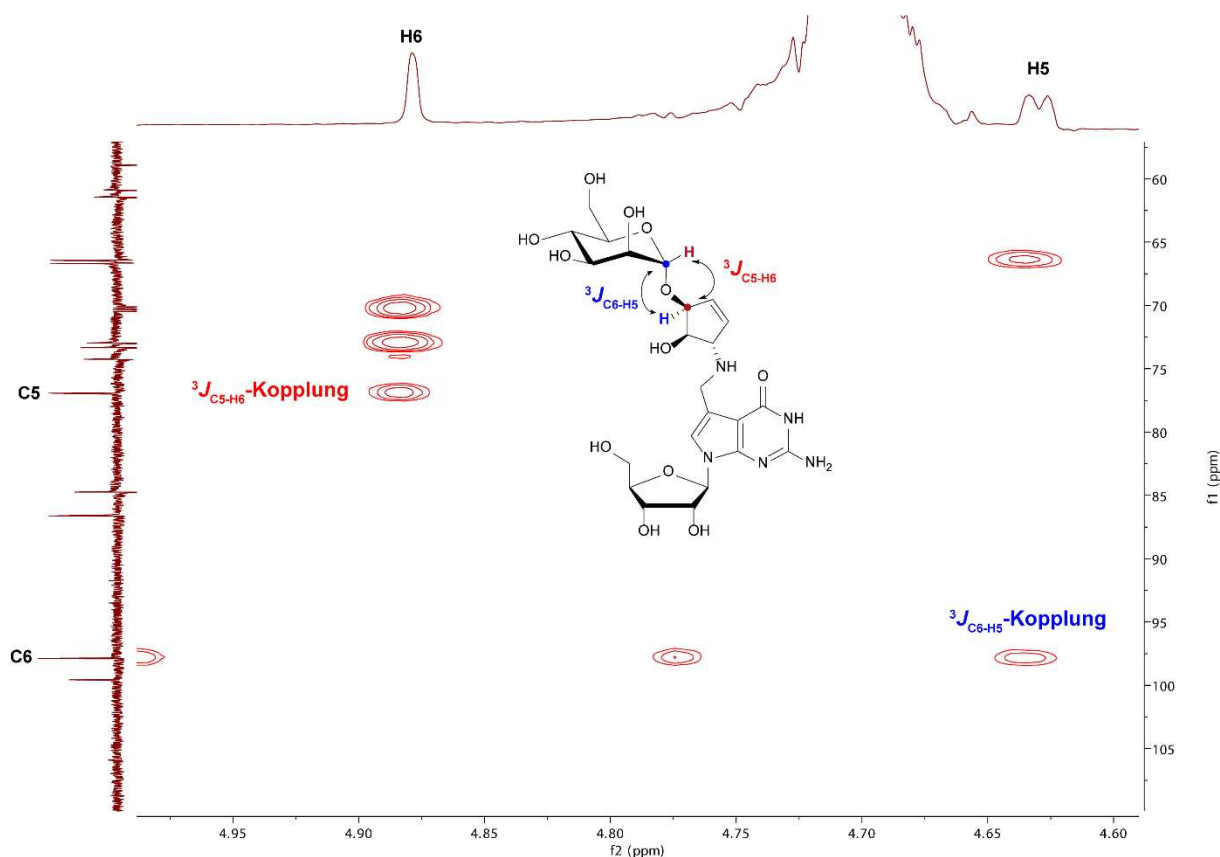


Abbildung 4.11: Ausschnitt aus dem HMBC-Spektrum von α -allyl-ManQ; die allyl-Konnektivität ist eindeutig aus den beiden beobachteten $^3J_{C-H}$ -Kopplungen zwischen C5 und H6 bzw. C6 und H5 ersichtlich.

4.3.4 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals eine stereoselektive Synthese des natürlichen α -allyl-ManQ **105** gezeigt werden. Die Synthese erfolgte dabei ausgehend von einem Mannosyl-Trichloracetimidatdonor (**130**), welcher in 7 Stufen ausgehend von D-Mannose hergestellt werden konnte. Die durch einen Nachbargruppeneffekt vermittelte Schmidt-Glykosylierung, welche durch eine Chloroisobutyryl-Schutzgruppe ermöglicht wurde, mit dem bereits bekannten Cyclopenten-Donor **131** lieferte ausschließlich das gewünschte α -Anomer. Für die Synthese des 7-Formyl-7-deazaguanosinbausteins **133** wurde die in Kapitel 4.5 gezeigte Synthese verwendet, welche eine deutlich effizientere Synthese als die in Kapitel 3.2 gezeigte Synthese darstellt, jedoch ein anderes Schutzgruppenmuster aufweist. Die Synthese von α -allyl-ManQ **105** konnte durch die Wahl geeigneter Reaktions- und Entschützungsbedingungen ausgehend von diesem Baustein durchgeführt werden. Die gezeigte Synthese ermöglichte die Synthese von ausreichenden Mengen des Zielmoleküls, um vollständige NMR-spektroskopische Daten in guter Qualität zu erhalten. Dies wurde insbesondere dadurch ermöglicht, dass der für die in Kapitel 3.2 gezeigte Synthese erforderliche aufwändige HPLC-Aufreinigungsschritt zur Trennung der Anomeren in der hier gezeigten Synthese nicht mehr

erforderlich ist. Insgesamt erlaubt die hier gezeigte Syntheseroute eine zuverlässige und praktikable Gewinnung von synthetischem α -allyl-ManQ und eröffnet so den Weg für die weitere Untersuchung dieser RNA-Modifikation.

4.3.5 Material und Methoden

Synthesevorschriften und Analytik für die stereoselektive Synthese von ManQ sind in Kapitel 5.2.4 aufgeführt.

4.3.6 Autorenbeiträge

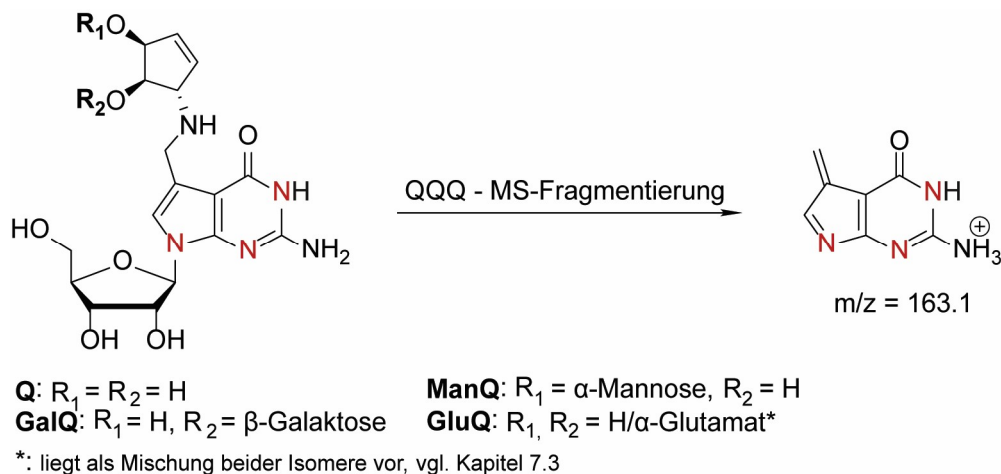
Alle hier gezeigten Synthesen wurden von mir entwickelt und durchgeführt. Die gezeigten NMR-Spektren wurden von der Analytik-Abteilung der Fakultät für Chemie und Pharmazie der LMU München aufgenommen.

4.4 Synthese eines Vorläufers für die Herstellung von $^{15}\text{N}_3$ -markierten Queuin- und Queuosin-Derivaten

4.4.1 Einleitung

Zur genauen Quantifizierung von Nukleosiden und insbesondere RNA-Modifikationen hat sich in den letzten Jahren die sogenannte *isotope dilution method* etabliert.^[199] Hierbei werden bekannte Konzentrationen eines synthetisch hergestellten isotopenmarkierten Standards zu der zu untersuchenden biologischen Probe, die das zu quantifizierende Molekül enthält, zugegeben. Da beide Moleküle chemisch nahezu identisch sind, sich aber aufgrund ihrer Masse unterscheiden, kann man so mithilfe massenspektrometrischer Methoden über eine Analyse der Signalintensitätsverhältnisse von isotopenmarkiertem zu nicht markiertem Material eine genaue Quantifizierung der in der Probe enthaltenen Menge eines natürlichen Nukleosids ermitteln. Die hierfür erforderlichen synthetischen Isotopenstandards sind in der Regel in der Synthese chemisch sehr anspruchsvoll, da nur eine sehr begrenzte Menge einfacher isotopenreiner Ausgangsmaterialien kommerziell erhältlich ist. Insofern erfordert die Planung der Synthese eines solchen Standards Methoden, um aus diesen einfachen Ausgangsmaterialien einen Einbau von Isotopenlabels zu ermöglichen. Über kommerziell erhältliche Ausgangsmaterialien lassen sich in der Regel entweder Deuterium-, ^{13}C oder ^{15}N -Label praktikabel in das zu synthetisierende Molekül einfügen. Deuterium-Label weisen generell das Problem auf, dass sie zum einen bei Funktionalisierung einer polaren Gruppe durch Austauschreaktionen instabil sind, da auch wenig saure Deuterium-Atome in Säure-Base-Reaktionen in wässrigen Lösungen oft langsam gegen Protonen ausgetauscht werden können. Weiterhin können deuteriummarkierte Moleküle aufgrund des relativ hohen

Unterschieds zwischen ^1H -Wasserstoff und Deuterium ein anderes Retentionsverhalten aufweisen, was in HPLC-MS-Experimenten die Quantifizierbarkeit wesentlich verschlechtern kann. ^{13}C -Label sind zwar in der Regel stabil und verändern die Polarität des Moleküls normalerweise nicht, weisen aber eine geringere Genauigkeit für Quantifizierungsexperimente auf, da natürliches ^{13}C in nicht-vernachlässigbaren Mengen ($\sim 1\%$) in natürlichem Material auftritt. Da Deuterium- und ^{13}C -Label die erwähnten Nachteile aufweisen, wurde für die hier entwickelte Synthese eines Isotopenstandards ein ^{15}N -Label gewählt. Als letzten Punkt ist zu beachten, dass bei Verwendung des Standards in QQQ-MS/MS-Quantifizierungsexperimenten die Lage der Isotopenlabel ebenfalls entscheidend ist. Da bei dieser massenspektrometrischen Messmethode eine spezifische Fragmentierung von einem Mutterion zum Tochterion beobachtet wird, ist es erforderlich, dass die Isotopenlabel sowohl im Mutter- als auch im entsprechenden Tochterion auftreten. Für Queuosin-Derivate ist eine spezifische Fragmentierung bekannt, welche in Schema 4.5 dargestellt ist. Da hierbei letztlich das Deazapurin-Fragment detektiert wird, müssen entsprechende Isotopenlabel so eingebaut werden, dass sie in diesem Fragment erhalten bleiben. Insofern erscheint eine Modifikation des Deazaguanin-Heterozyklus mit Isotopenlabels erforderlich. Daher wurden im Folgenden verschiedene Routen zur Einführung der ^{15}N -Markierungen getestet, welche auf *de-novo*-Synthesen von Guanosinderivaten basieren.

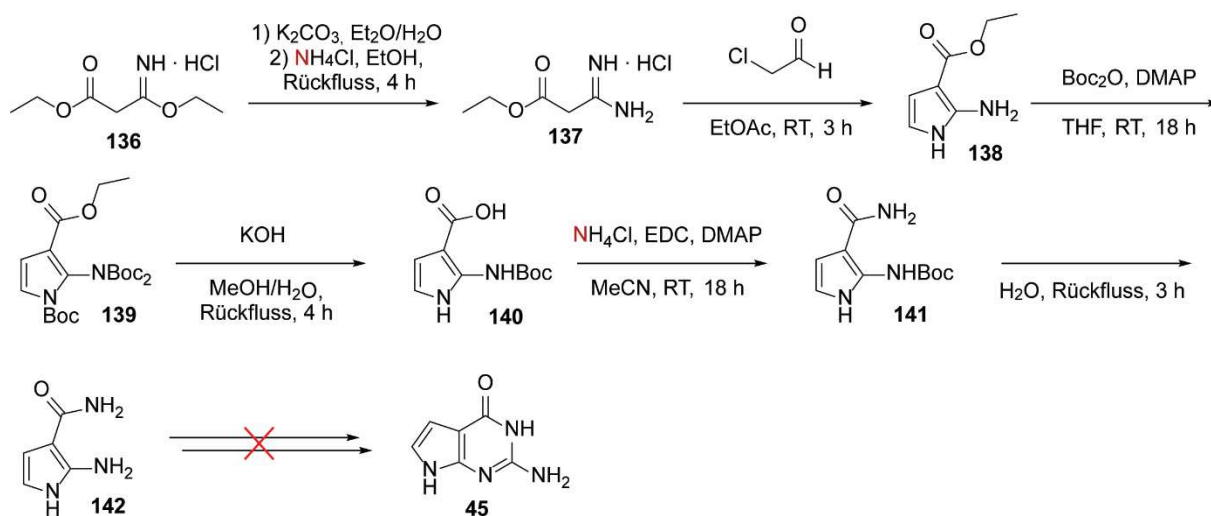


Schema 4.5: Spezifisches MS-Fragmentierungsmuster für Queuosinderivate, welche alle in dasselbe Tochterion zerfallen. Eine wahrscheinliche mögliche Struktur für dieses Tochterion mit $m/z = 163.1$ ist auf der rechten Seite abgebildet.

4.4.2 Erster Syntheseversuch des $^{15}\text{N}_3$ -markierten Nukleosid-Bausteins

Für einen ersten Syntheseversuch des 3-fach ^{15}N -markierten Deazaguanosinbausteins wurde zunächst eine abgewandelte Route der Synthese von $^{15}\text{N}_3$ -Guanosin nach Abad *et al.* verfolgt, wobei die Synthese zunächst nur mit nicht-isotopenmarkierten Reagenzien getestet wurde.^[200] Bei dieser wurde ausgehend von einem funktionalisierten Imidazolbaustein das

Guaningrundgerüst durch Zyklisierung mit Natriummethylxanthat erreicht. Die Synthese ist in Schema 4.6 gezeigt. Hierzu musste zunächst, in Abwandlung zur Literatur, der entsprechende Deazimidazolprecursor, ein Pyrrolderivat, hergestellt werden. Dabei erfolgte ausgehend von Diethyl-3-imino-dipropionathydrochlorid **136** eine Aminierung mit Ammoniumchlorid in Ethanol, wobei Verbindung **137** erhalten wurde. Diese wurde anschließend durch Umsetzung mit frisch destilliertem, wasserfreiem Chloracetaldehyd in Ethylacetat zum 2-Amino-3-ethylcarboxypyrrol **138** umgesetzt. Nach einer dreifachen Boc-Schützung zu **139** erfolgte die Hydrolyse des Ethylesters mit KOH in Methanol/Wasser unter Rückfluss, wobei zusätzlich zwei der drei Boc-Schutzgruppen entfernt werden konnten und **140** erhalten wurde.

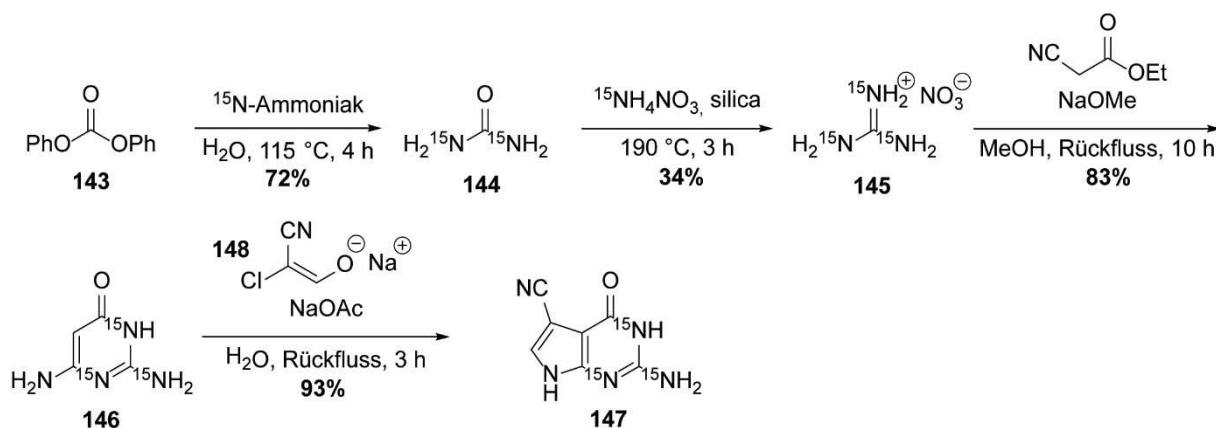


Schema 4.6: Syntheseversuch des $^{15}\text{N}_3$ -markierten Nukleosidbausteins in Anlehnung an Abad *et al.*^[200] Die Synthese wurde mit nicht-isotopenmarkierten Reagenzien getestet, mögliche ^{15}N -markierte Reagenzien sind in rot markiert.

Anschließend folgte die Synthese dem Weg nach Abad *et al.* Hierbei wurde zunächst die Carbonsäure durch Reaktion mit Ammoniumchlorid und EDC sowie DMAP in das entsprechende Amid **141** überführt. Hierbei war die Boc-Schutzgruppe entscheidend, um Selbstaminierung zu verhindern. Die anschließende Boc-Entschützung war problematisch und erforderte eine Optimierung der Reaktionsbedingungen, da für Boc-Entschützungen übliche saure Bedingungen zur Zersetzung des Edukts führten. Eine relativ milde Entschützung konnte durch Refluxieren des Edukts in Wasser erreicht und so das Amin **142** erhalten werden. Eine abschließende Zyklisierung mit Natriummethylxanthat lieferte das 2-Thiomethyldeazaguaninderivat. An dieser Stelle zeigte sich jedoch die Synthese als problematisch, da eine Einführung der 2-Aminofunktionalität analog zu den von Abad *et al.* beschriebenen Bedingungen lediglich zu einem Austausch der Thiomethylgruppe gegen ein Proton führten. Verschiedene Variationen der Bedingungen erbrachten keinen Erfolg. Dies ist wahrscheinlich auf die geringere Eignung der Deazaguanineinheit für nukleophile aromatische Substitutionen zurückzuführen, bereits bei Abad *et al.* erforderte Reaktionszeiten von mehreren Wochen bei

erhöhten Temperaturen (70 °C). Insofern erschien diese Syntheseroute zu aufwändig und ungeeignet und eine andere Alternative musste entwickelt werden.

4.4.3 Synthese des Deazaguanin-Bausteins aus $^{15}\text{N}_3$ -markiertem Guanidin



Schema 4.7: Synthese des $^{15}\text{N}_3$ -isotopenmarkierten 7-Cyano-7-deazaguaninbausteins **147** als Vorläufer für isotopenmarkierte Queuosinderivate.

Für die erfolgreiche Synthese dieses Bausteins wurde eine Strategie ähnlich zu Micura *et al.*^[201] gewählt, bei der das isotopenmarkierte Deazaguanin-Gerüst aus $^{15}\text{N}_3$ -Guanidin aufgebaut wird. Die Synthese dieses Standards ist in Schema 4.7 aufgezeigt. Ausgehend von Diphenylcarbonat **143** wurden zwei ^{15}N -label über eine Reaktion mit ^{15}N -Ammoniak eingeführt, wobei $^{15}\text{N}_2$ -Harnstoff **144** entstand.^[202] Dieser wurde anschließend in einer Schmelze aus $^{15}\text{NH}_4\text{NO}_3$ mit Kieselgel als Trocken- und Bindemittel (ansonsten verläuft die Reaktion explosiv!) zu $^{15}\text{N}_3$ -Guanidiniumnitrat **145** umgesetzt. Über eine Ringschlussreaktion mit Cyanethylacetat mit Natriummethoxid als Base konnte $^{15}\text{N}_3$ -2,6-Diaminopyrimidinon **146** erhalten werden.^[201] Ausgehend hiervon wurde die bereits bekannte Synthese von 7-Cyano-7-deazaguanin über eine Hantzsch-Pyrrolyse mit dem zuvor gebildeten Reagens **148** durchgeführt. Als Produkt wurde der $^{15}\text{N}_3$ -markierte Deazaguaninvorläufer **147** erhalten, welcher essentiell für die Synthese der markierten Queuosin-Derivate ist. Ausgehend hiervon kann etwa markiertes Glutamyl-Queuosin nach der in Kapitel 4.5 beschriebenen Synthese oder Mannosyl-Queuosin nach der in Kapitel 4.3 beschriebenen Synthese dargestellt werden (vgl. Abbildung 4.16). Die NMR-Spektren dieser wichtigen Vorläuferverbindung sind in Abbildungen 4.12 - 4.15 dargestellt und belegen eindeutig die Identität sowie die hohe Reinheit der erhaltenen markierten Verbindung. In Abbildung 4.12a ist das ^{15}N -NMR-Spektrum von **147** gezeigt. Daraus sind die drei eingebauten ^{15}N -label sowie deren Position und die Kopplungen zueinander ersichtlich. Der Peak von N^1 (vgl. Abbildung 4.12b) ist mit -307.8 ppm am weitesten hochfeldverschoben, wie für ein primäres Amin zu erwarten ist. N^2 liegt mit -235.1 ppm in der Mitte beider Signale und in einem für amidähnliche ^{15}N -Atome typischen Bereich (vgl.

Abbildung 4.12c). N^3 ist mit -210.1 ppm am weitesten tieffeldverschoben und weist eine geringere Signalintensität auf (vgl. Abbildung 4.12d), was auf das Fehlen gebundener Wasserstoffatome zurückzuführen ist (Kern-Overhauser-Effekt). Im 1H -NMR-Spektrum sind die 1J -Kopplungen zwischen N^1 und H^3 (89.1 Hz) sichtbar, genauso wie die entsprechenden Kopplungen zwischen N^2 und H^4 (89.2 Hz, vgl. Abbildung 4.13). Im ^{13}C -NMR-Spektrum sind ^{13}C - ^{15}N -Kopplungen zu beobachten, deren Stärke sich aus der Lage der ^{13}C -Atome im aromatischen System sowie der Entfernung zu den entsprechenden ^{15}N -Atomen ergibt. Insbesondere aus dem stark ausgeprägten Aufspaltungsmuster von C^2 und C^3 wird die Anwesenheit von drei ^{15}N -Atomen im Molekül sowie deren Position zusätzlich bestätigt.

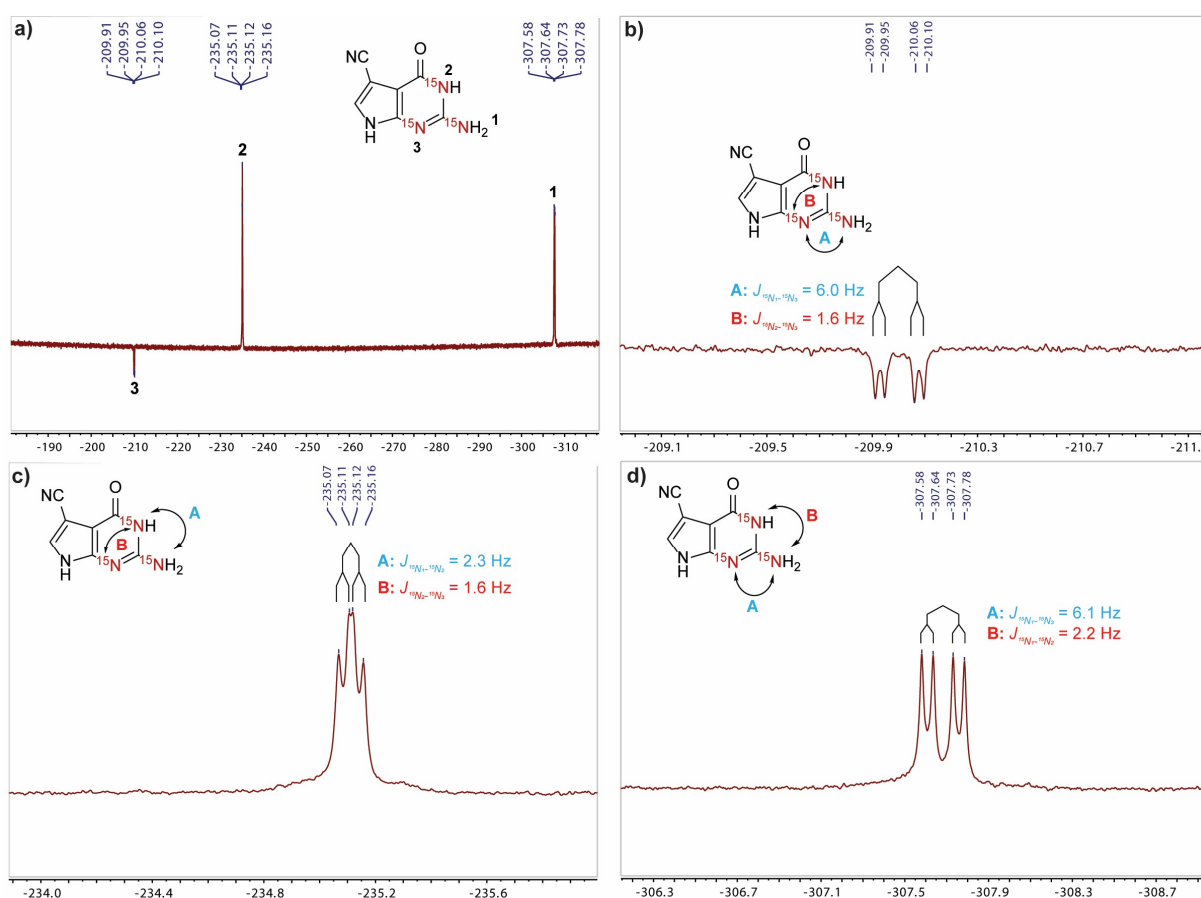


Abbildung 4.12: ^{15}N -NMR Spektrum von Verbindung **147** in d_6 -DMSO; **a)** Überblick über das gesamte Spektrum; **b)** Zoom auf Peak 3; **c)** Zoom auf Peak 2; **d)** Zoom auf Peak 1; als Referenz für das Spektrum wurde $CH_3^{15}NO_2$ als Standard verwendet.

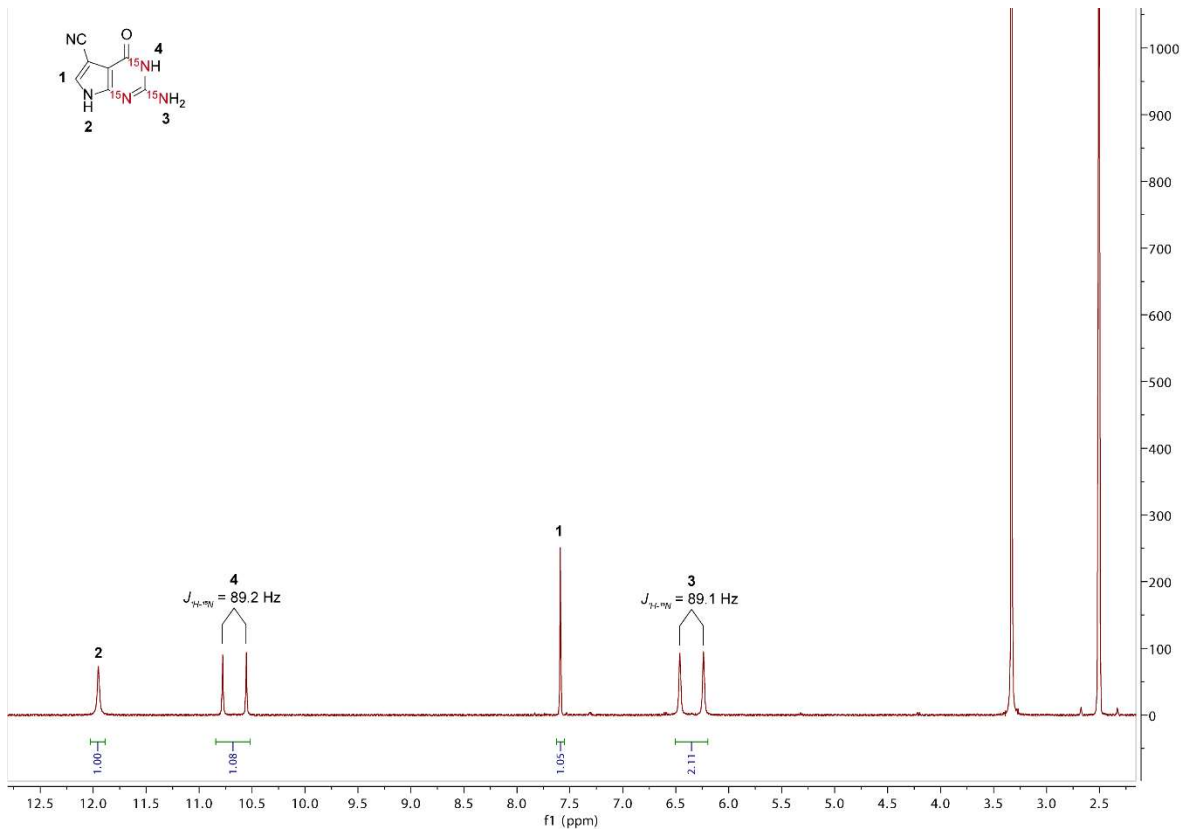


Abbildung 4.13: ¹H-NMR Spektrum von Verbindung 147 in d⁶-DMSO.

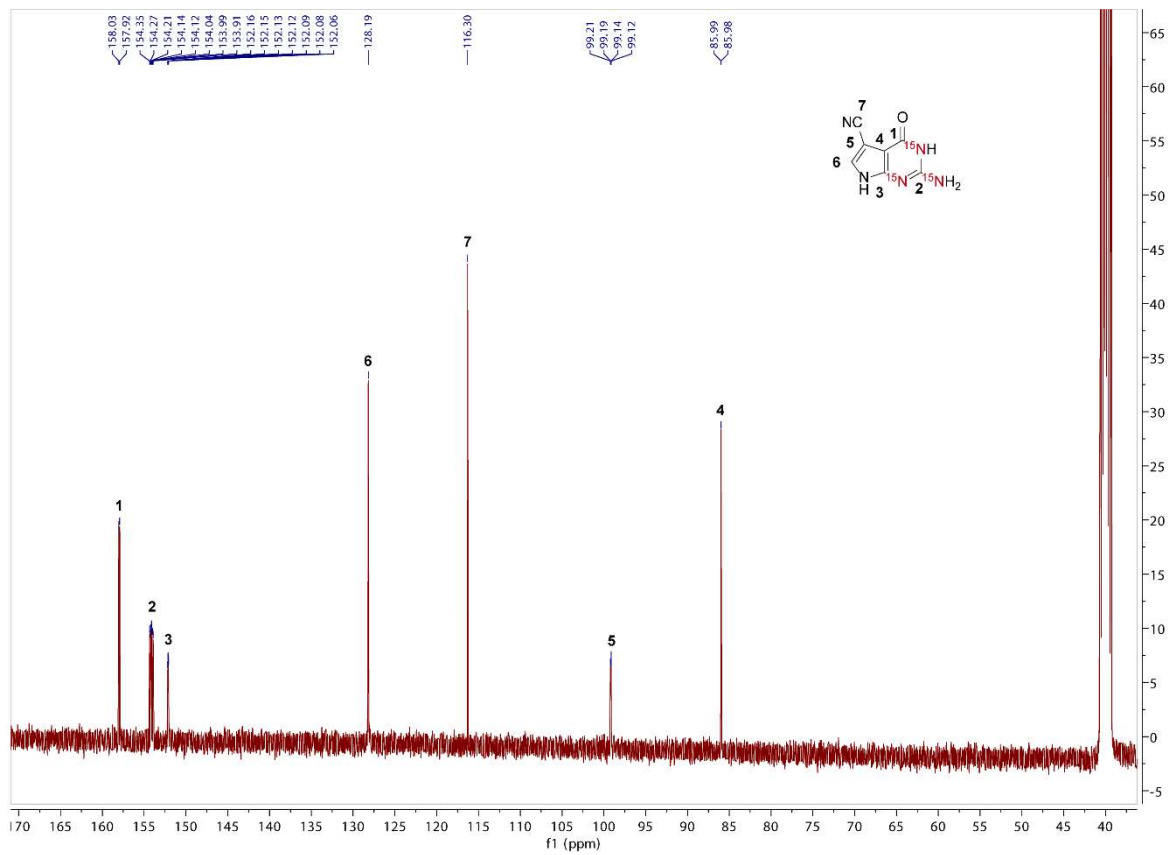


Abbildung 4.14: ¹³C-NMR Spektrum von Verbindung 147 in d⁶-DMSO.

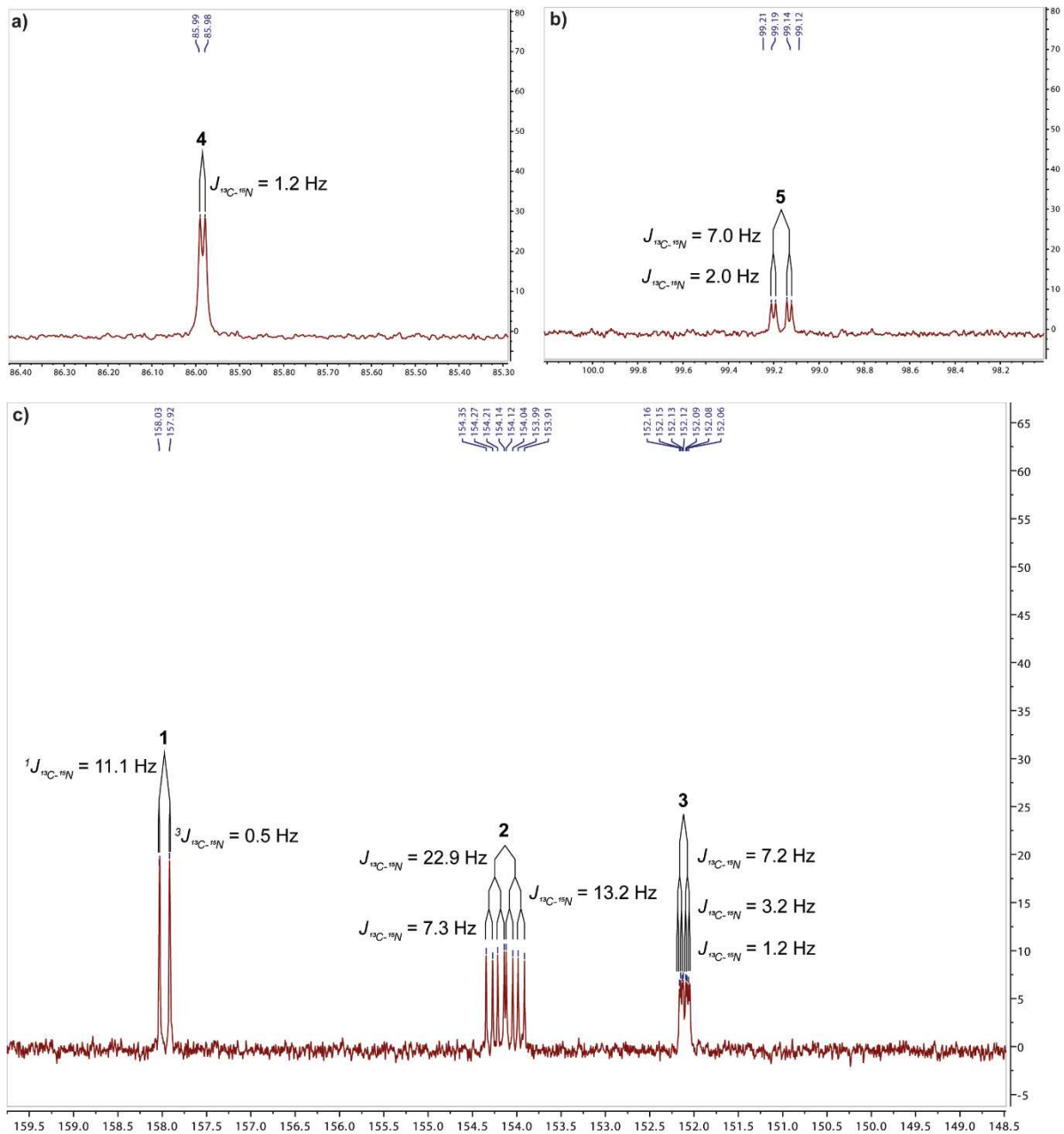


Abbildung 4.15: ^{13}C -NMR Spektrum von Verbindung **147**, Zoom zur Verdeutlichung der Aufspaltungsmuster; **a)** Zoom auf C4; **b)** Zoom auf C5; **c)** Zoom auf C1, C2 und C3

4.4.4 Zusammenfassung und Ausblick

Insgesamt konnte eine einfache Syntheseroute für die Herstellung von $^{15}\text{N}_3$ -markiertem 7-Cyano-7-deazaguanin ausgehend von kommerziell erhältlichem und kostengünstigem $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ entwickelt werden.

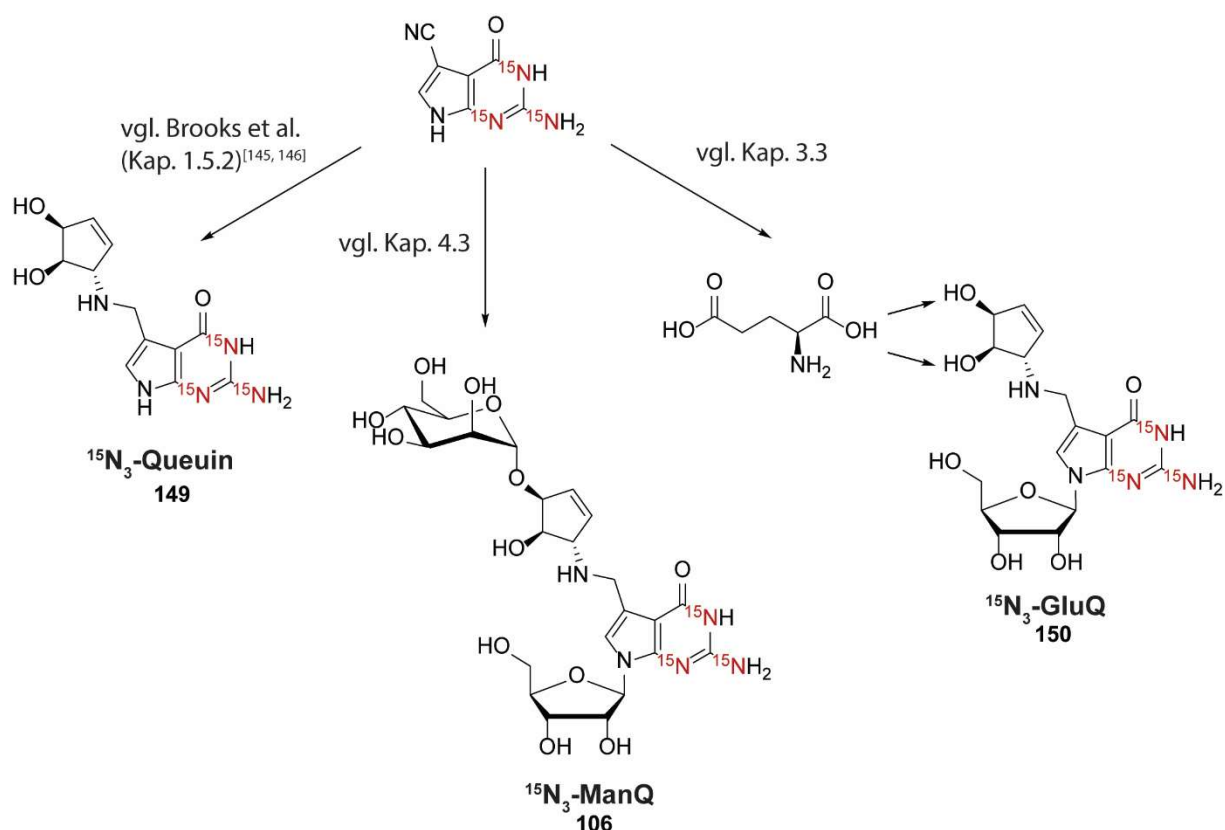


Abbildung 4.16: Mögliche Verwendung des $^{15}\text{N}_3$ -Deazaguaninprecursors für die Synthese verschiedenster isotopenmarkierter Queuin- und Queuosinderivate. Die hier gezeigten Möglichkeiten stellen lediglich Verbindungen dar, bei denen Precursor **147** ohne Isotopenmarkierung bereits erfolgreich für die Synthese der gezeigten Verbindungen verwendet wurde, die Synthesestrategie erscheint jedoch auch für die Synthese anderer isotopenmarkierter Queuosinderivate wie etwa GalQ oder Queuosin vielversprechend.

Dieses Derivat kann, wie in Abbildung 4.16 gezeigt, als Ausgangspunkt für die Synthese verschiedenster $^{15}\text{N}_3$ -isotopenmarkierter Queuin- und Queuosinderivate verwendet werden. Insofern stellt die hier gezeigte Synthese einen wichtigen Ausgangspunkt für die Herstellung $^{15}\text{N}_3$ -isotopenmarkierter Queuosinderivate dar, welche für die genaue Quantifizierung, insbesondere von GalQ und ManQ eine entscheidende Verbesserung darstellen. Die Synthese eines solchen hocheffizienten Standards stellt einen wichtigen Schritt zur weiteren Untersuchung dieser Derivate mittels LC-MS-Methoden dar.

4.4.5 Material und Methoden

Synthesevorschriften für die erfolgreiche Synthese von $^{15}\text{N}_3$ -7-Cyano-7-deazaguanin sowie die zugehörigen analytischen Daten sind in Kapitel 5.2.4 aufgeführt.

4.4.6 Autorenbeiträge

Alle in dieser Studie gezeigten Synthesen wurden von mir durchgeführt. Die Synthese des für die Herstellung von **147** benötigten Natriumsalz-Reagens **148** wurde von A. Pichler durchgeführt.

4.5 Synthese und Strukturaufklärung von natürlichem Glutamyl-Queuosin

4.5.1 Einleitung

Wie bereits in der Einleitung beschrieben (vgl. Kapitel 1.6.1), existiert neben den glykosylierten Queuosin-Derivaten in Bakterien ein glutamiliertes Queuosin-Derivat (GluQ).^[176] Es konnte gezeigt werden, dass GluQ eine weiter modifizierte Variante von Queuosin darstellt, bei der die Aminosäure L-Glutamat über eine Esterbindung an eine der beiden Hydroxygruppen der Cyclopenteneinheit verknüpft vorliegt (vgl. Abbildung 1.8).^[175] Die genaue Art dieser Verknüpfung ist jedoch bisher unbekannt. So kann L-Glutamat entweder über die α -Carbonsäure oder über die Seitenkette an eine der beiden Hydroxygruppen des Cyclopenten-Rings (allyl oder homoallyl) verknüpft vorliegen.

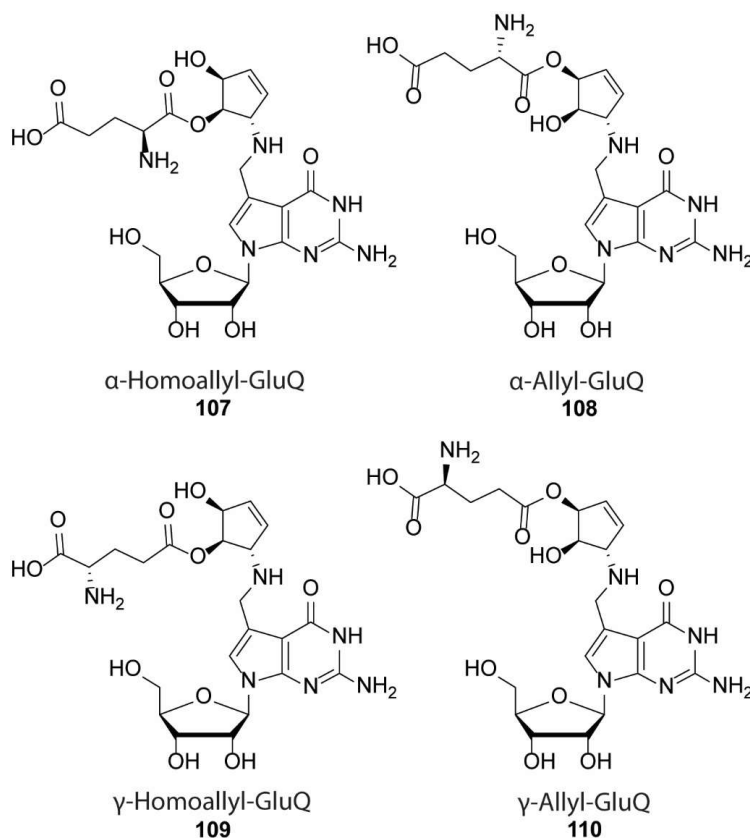
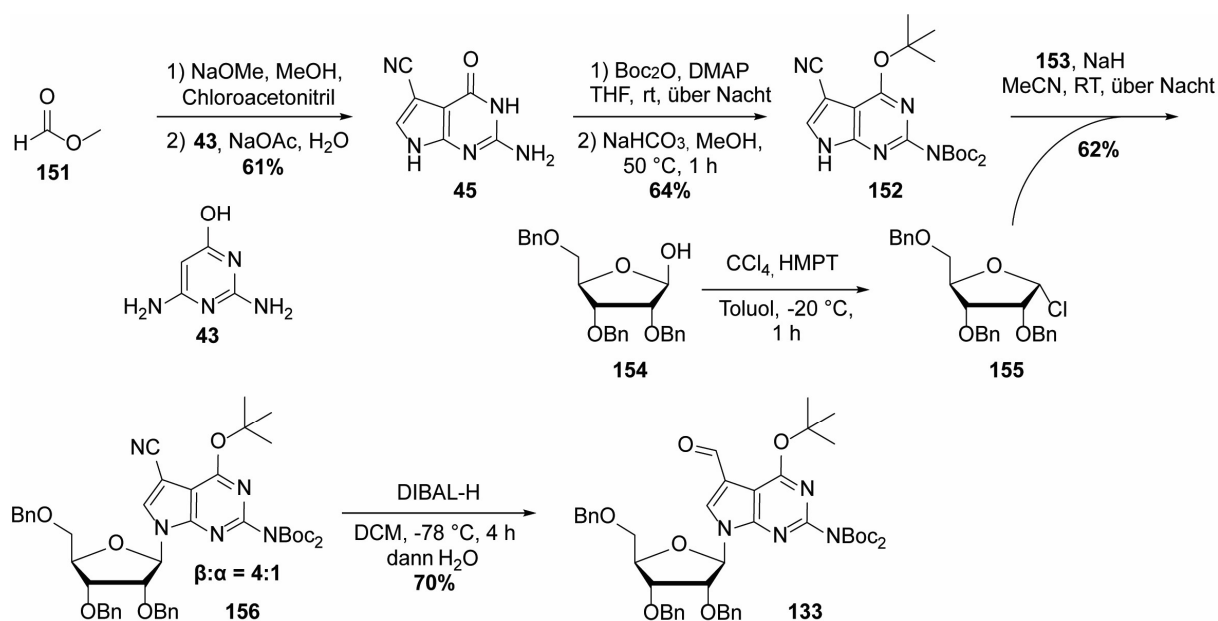


Abbildung 4.17: Strukturformeln aller vier möglichen Isomere **107-110**, welche für die Struktur von natürlichem GluQ in Betracht kommen.

Grundsätzlich sind daher vier verschiedene Regioisomere denkbar, welche in Abbildung 4.17 gezeigt sind. In der vorliegenden Studie sollte eine regioselektive Syntheseroute für alle vier verschiedenen Isomere entwickelt werden. Anschließend sollte die Struktur des natürlichem GluQ über LC-MS-Koinjektionsexperimente mit den synthetischen Standards ermittelt werden. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden im Folgenden vorgestellt.

4.5.2 Synthese der geschützten Nucleobase

Da Glutamy-Queuosin eine labile Esterfunktionalität aufweist, war es zunächst erforderlich, eine geeignete Schutzgruppenstrategie für die erfolgreiche Synthese von GluQ zu entwickeln. Der bereits in Kapitel 3.2 beschriebene Nucleobasenbaustein weist eine Pivaloylschutzgruppe an der exozyklischen Aminofunktionalität des 7-Deazaguanins auf, welche am Ende der Synthese eine Entschützung unter stark basischen Bedingungen zur Spaltung der Amidbindung erfordert. Da diese Bedingungen nicht orthogonal zur labilen Acylfunktionalität der Esterbindung sind, war die Etablierung einer neuen Schutzgruppenstrategie für die Base erforderlich.



Schema 4.8: Synthese des für die Synthese von Glutamy-Queuosin geeigneten Basenbausteins **133**. Die verwendeten Benzyl- und Boc- bzw. *t*-Butylschutzgruppen lassen sich orthogonal zur labilen Esterfunktionalität abspalten.

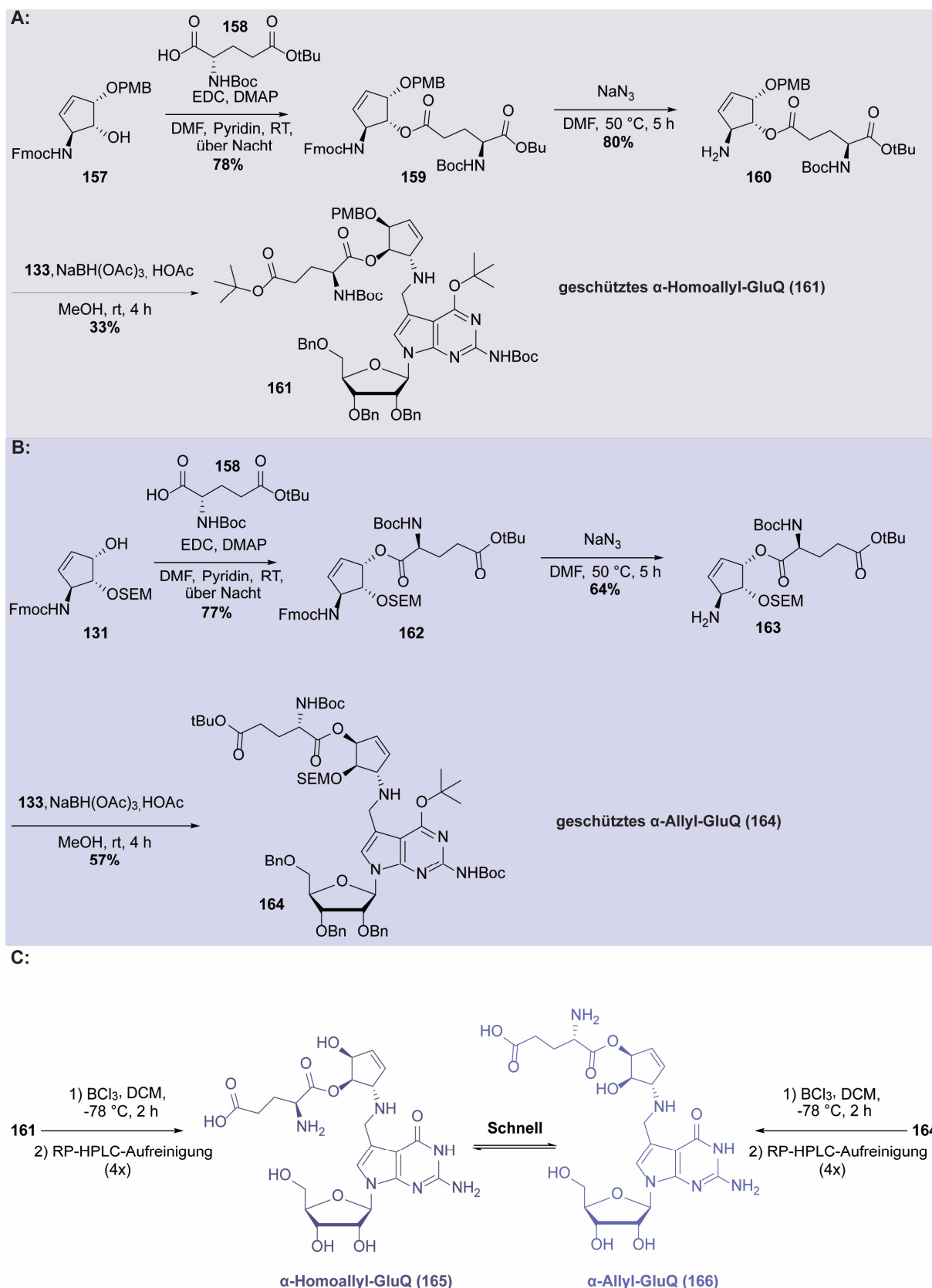
Für die anschließende Synthese des Nucleosids wies die bereits oben (Kapitel 3.2) behandelte Synthese des Nucleosidbausteins die Problematik auf, dass für die Vorbrüggen-Nucleosidierung die Verwendung von Acyl-geschützter Ribose, im speziellen Fall 1-*O*-Acetyl-2,3,5-tri-*O*-benzyl-D-ribose, erforderlich ist. Dies ist notwendig, da der durch die Acyl-Schutzgruppe an der 2-Position der Ribose vermittelte Nachbargruppeneffekt die

Stereoselektivität der Nukleosidierungsreaktion steuert. Daher war es erforderlich eine neue Nukleosidierungsstrategie zu entwickeln, da Acylschutzgruppen nicht mit der Synthesestrategie vereinbar sind. Die Synthese des Nukleosidbausteins ist in Schema 4.8 dargestellt. Ausgehend von 2,6-Diamino-4-pyrimidinon **43** wurde über eine Hantzsch-Pyrrolsynthese mit Cyanochloracetaldehyd, welches in einer Reaktion von Methylformiat **151** und Chloracetonitril gebildet wurde, 7-Cyano-7-deazaguanin **45** hergestellt. Die Schützung der Base erfolgte im Anschluss in Anlehnung an ein Protokoll von Wang *et al.*^[189] Hierzu wurde die Base zunächst mit Boc₂O und DMAP in THF umgesetzt, um das per-Boc-geschützte 7-Deazaguaninderivat zu erhalten. Die labile Boc-Schutzgruppe an der 9-Position wurde anschließend durch Behandlung mit NaHCO₃ in Methanol selektiv abgespalten, wodurch Verbindung **152** erhalten wurde. Dies ermöglichte die weitere Umsetzung zum Nukleosid. Hierzu wurde ein Protokoll ausgehend von 2,3,5-Tri-O-benzyl-D-ribose **154** verwendet. Dabei wurde zuerst die 1-Position des Ribosederivats über eine Appel-Reaktion mit CCl₄ und P(NMe₂)₃ aktiviert und das resultierende Chlorid **155** anschließend in einer Substitutionsreaktion mit der Nukleobase **152** und NaH als Base umgesetzt. Dabei wurde ein Anomerenverhältnis von 4:1 (β : α) zugunsten des erwünschten β -Nukleosidderivats **156** erhalten. Die Stereoselektivität der Reaktion ist dabei wahrscheinlich auf die Präferenz der Bildung des α -Chlorids zurückzuführen, welches im Rahmen der anschließenden S_N2-Typ-Nukleosidierung zum β -Nukleosid umgesetzt wird. Das α -Chlorid ist dabei vermutlich aufgrund des anomeren Effekts begünstigt. Weiterhin liegt die Ausgangsverbindung 2,3,5-Tri-O-benzyl-D-ribose hauptsächlich als β -Anomer vor, sodass eine S_N2-Inversion der Ausgangsverbindung zum α -Chloroanomer führen würde. Insgesamt liefert die Reaktion preferentiell das gewünschte β -Anomer in guter Ausbeute und Stereoselektivität, die beiden Anomere sind dabei säulenchromatographisch voneinander leicht abtrennbar. Im letzten Schritt musste anschließend noch eine Umsetzung der Cyanofunktionalität zum Aldehyd erfolgen, um eine reduktive Aminierung mit dem primären Amin des Cyclopentenbausteins zu ermöglichen. Hierzu wurde **156** mit DIBAL-H in DCM umgesetzt, wodurch der Aldehyd **133** erhalten wurde. Interessanterweise führte die Lewis-Acidität des Aluminiumreagenzes zur selektiven Abspaltung einer der beiden Boc-Schutzgruppen des doppelt geschützten exozyklischen Amins. Dies stellte jedoch für den weiteren Verlauf der Synthese kein Problem dar und erwies sich sogar als Vorteil, da hierdurch eine einfachere säulenchromatographische Aufreinigung des Produkts vom verbleibenden Startmaterial aufgrund der höheren Polaritätsverschiebung ermöglicht wurde. Insgesamt konnte so der für die Synthese von GluQ erforderliche Nukleosidbaustein mit entsprechend geeigneten Schutzgruppen in einer kurzen und effizienten Synthese hergestellt werden. Die hier gezeigte Synthese stellt die bis heute kürzeste und effizienteste Synthese dieses Bausteins dar. Eine entsprechende Verwendung

dieses Bausteins zur Synthese anderer Queuosinderivate (ManQ) wurde bereits in Kapitel 4.3 näher untersucht.

4.5.3 Synthese der regioisomeren geschützten α -Glutamyl-Queuosin-Derivate aus den Bausteinen

Die Synthese der vier möglichen regioisomeren GluQ-Derivate erfolgte ausgehend von den bereits oben (vgl. Kap. 3.2) beschriebenen regioselektiv geschützten Cyclopentenderivaten **131** und **157**. Die Synthese der Derivate, welche über die α -Carbonsäure von L-Glutamat mit der Cyclopenteneinheit verknüpft sind, ist in Schema 4.9 gezeigt. Die Synthese des α -verknüpften homoallyl-Derivats startete ausgehend von der 3-PMB-geschützten Cyclopenteneinheit **157**. Eine EDC- und DMAP-vermittelte Veresterung der freien Hydroxygruppe mit dem N-Boc und γ -COOtBu geschützten L-Glutamatderivat **158** ergab das aminosäureverknüpfte Cyclopentenderivat **159**. Eine Entschützung der Fmoc-Schutzgruppe unter nicht-basischen Bedingungen mit NaN_3 ergab das freie Amin **160**, welches in einer reduktiven Aminierungsreaktion mit dem Nukleosidbaustein **133** umgesetzt wurde, um das geschützte α -homoallyl-GluQ-Derivat **161** zu erhalten. Die Synthese des α -verknüpften allyl-Derivats wurde ausgehend vom 2-SEM-geschützten Cyclopentenderivat **131** realisiert, wobei analog zum α -homoallyl-Derivat eine Abfolge von Veresterung, Fmoc-Entschützung und reduktiver Aminierung das gewünschte geschützte α -allyl-GluQ-Derivat **164** lieferte. Im Anschluss erfolgte eine Entschützung der beiden erhaltenen α -GluQ-Derivate (allyl und homoallyl) unter lewissauren Bedingungen mit BCl_3 . Obwohl die entschützten Derivate HPLC-chromatographisch aufgereinigt werden konnten, lieferten sowohl die Entschützung von α -allyl- als auch α -homoallyl-GluQ ein identisches HPLC-Signal. NMR-Analyse der erhaltenen Verbindungen zeigte, dass bei der Entschützung der jeweils unterschiedlichen Regioisomeren in beiden Fällen ein identisches Gemisch der beiden Verbindungen α -homoallyl-GluQ **165** und α -allyl-GluQ **166** mit einem Regioisomerenverhältnis von 1:3.08 (homoallyl/allyl) erhalten wurde. Ein Ausschnitt aus dem entsprechenden ^1H -NMR-Spektrum ist in Abbildung 4.18 dargestellt.



Schema 4.9: Synthese der beiden geschützten Regioisomere α -homoallyl- (A) und α -allyl-GluQ (B) **161** und **164** aus den Bausteinen. Nach finaler Entschützung und HPLC-Aufreinigung lieferten beide Derivate ein identisches Gemisch aus den beiden Regioisomeren, was auf ein Gleichgewicht zwischen beiden Formen hindeutet (C).

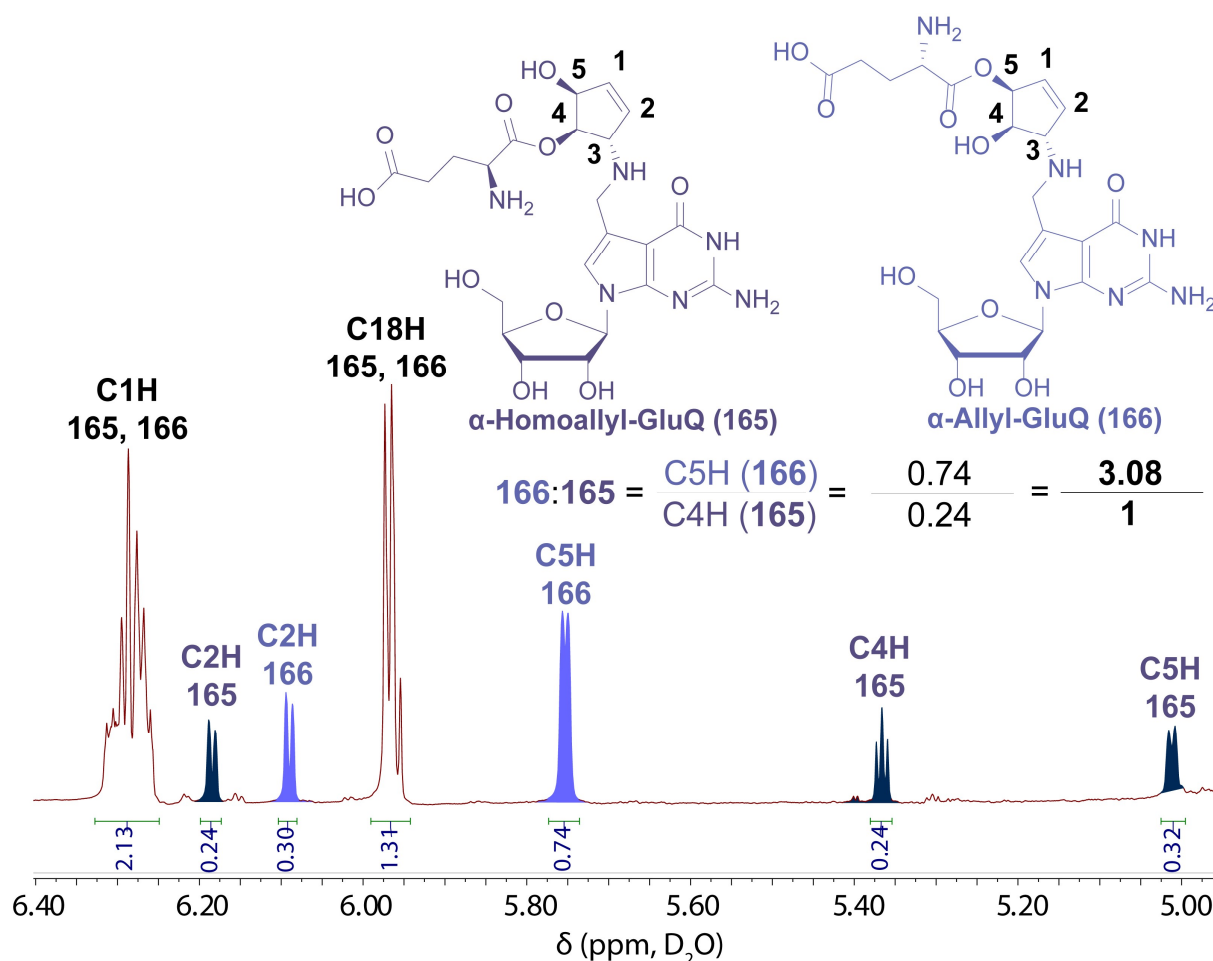


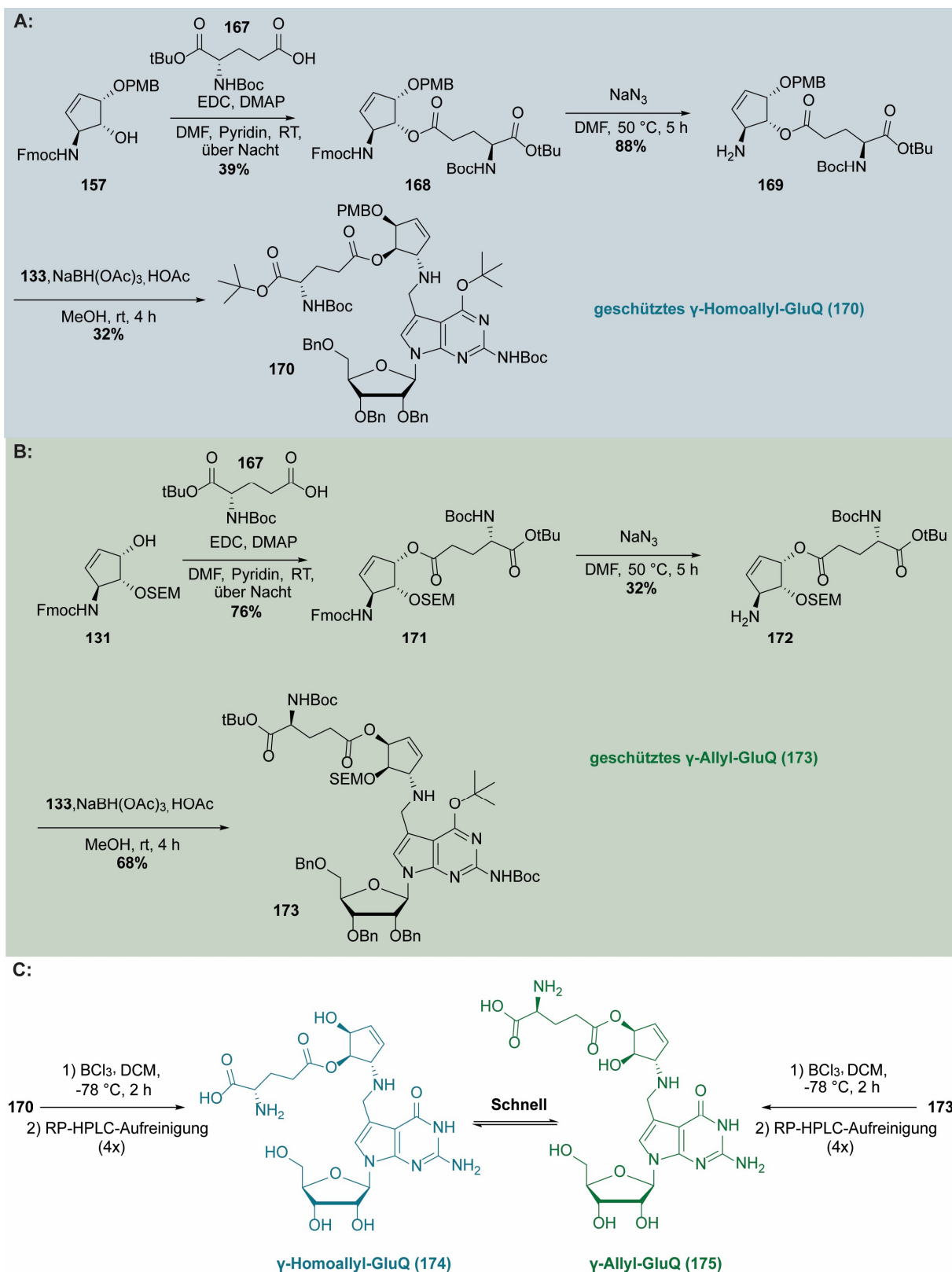
Abbildung 4.18: Ausschnitt aus dem ^1H -NMR-Spektrum von α -GluQ. Das Verhältnis der beiden Isomere von 3.08:1 (allyl/homoallyl) wurde durch die Integration isolierter Signale ermittelt. Das gesamte NMR-Spektrum ist in Kapitel 7.3 zu finden.

Dies deutet darauf hin, dass die beiden Regioisomere in wässriger Lösung in einem Gleichgewicht miteinander vorliegen. Das Vorliegen eines derartigen Gleichgewichts ist dabei u.a. für die sehr ähnliche chemische Umgebung bei Aminoacyl-tRNAs bekannt.^[203-205] Obwohl die für die Beladung der tRNA mit Aminosäuren verantwortliche AaRS in der Regel spezifisch die 3'-Position der Ribose am CCA-Ende belädt, liegt die Aminosäure im Gleichgewicht an die 2'- und 3'-Position gebunden vor, was auf eine rasche Äquilibration über eine intramolekulare Umlagerung zurückzuführen ist. Für Aminoacyl-tRNAs ist bekannt, dass diese Umlagerung sehr schnell verläuft ($k \approx 10^{-3} \text{ s}^{-1}$),^[206-207] sodass die entsprechenden 2'- und 3'-Derivate nicht voneinander abtrennbar sind. Für GluQ ist aufgrund der sehr ähnlichen chemischen Umgebung eines vicinalen *cis*-Diols daher ein ähnliches Verhalten nicht überraschend. Insbesondere im Hinblick auf die bereits bekannte hohe Labilität von GluQ im RNA-Kontext, welches eine Halbwertszeit ($t_{1/2}$) von 7.5 min aufweist,^[208] erscheint diese Interpretation der erhaltenen Ergebnisse schlüssig. Im Folgenden werden zunächst die Synthesen der

entsprechenden γ -GluQ-Derivate vorgestellt, bevor im Anschluss die Ko-Injektion der erhaltenen Verbindungen mit natürlichem GluQ näher beleuchtet wird.

4.5.4 Synthese der regioisomeren geschützten γ -Glutamyl-Queuosin-Derivate aus den Bausteinen

Die Synthese der Derivate, welche über die Seitenketten-Carbonsäure (γ -COOH) von Glutamat mit der Cyclopenteneinheit verknüpft sind, ist in Schema 4.10 gezeigt. Die Synthese des γ -verknüpften Homoallyl-Derivats startete wiederum ausgehend von der 3-PMB-geschützten Cyclopenteneinheit **157**. Eine EDC- und DMAP vermittelte Veresterung, in diesem Fall mit dem N-Boc und α -COOtBu geschützten L-Glutamatderivat, ergab das aminosäureverknüpfte Cyclopentenderivat **168**. Nach Fmoc-Entschützung zu **169** und reduktiver Aminierung mit dem Nukleosidbaustein **133** wurde das geschützte γ -Homoallyl-GluQ **170** erhalten. Die Synthese des geschützten γ -Allyl GluQ **173** erfolgte erneut analog hierzu ausgehend von 2-SEM-geschütztem Cyclopenten **131** über eine Sequenz aus Veresterung, Fmoc-Entschützung und reduktiver Aminierung. Nach Entschützung beider Derivate wurde erneut ein HPL-chromatographisch nicht trennbares Gemisch aus γ -Homoallyl- und γ -Allyl-GluQ **174** und **175** mit identischen HPLC-Signalen erhalten. Wie aus $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopischen Daten (siehe Abbildung 4.19) ersichtlich lagen die beiden Regioisomeren in beiden Fällen in identischen Verhältnissen von 1:1.54 (homoallyl/allyl) vor. Wie bereits bei den α -GluQ-Derivaten beobachtet, scheint auch hier eine rasche Äquilibrierung der beiden Isomere unter den untersuchten Bedingungen vorzuliegen.



Schema 4.10: Synthese der beiden geschützten Regioisomere γ -allyl- (A) und γ -homoallyl-GluQ (B) aus den Bausteinen. Nach finaler Entschützung und HPLC-Aufreinigung lieferten beide Derivate ein identisches Gemisch aus den beiden Regioisomeren, was auf ein Gleichgewicht zwischen beiden Formen hindeutet (C).

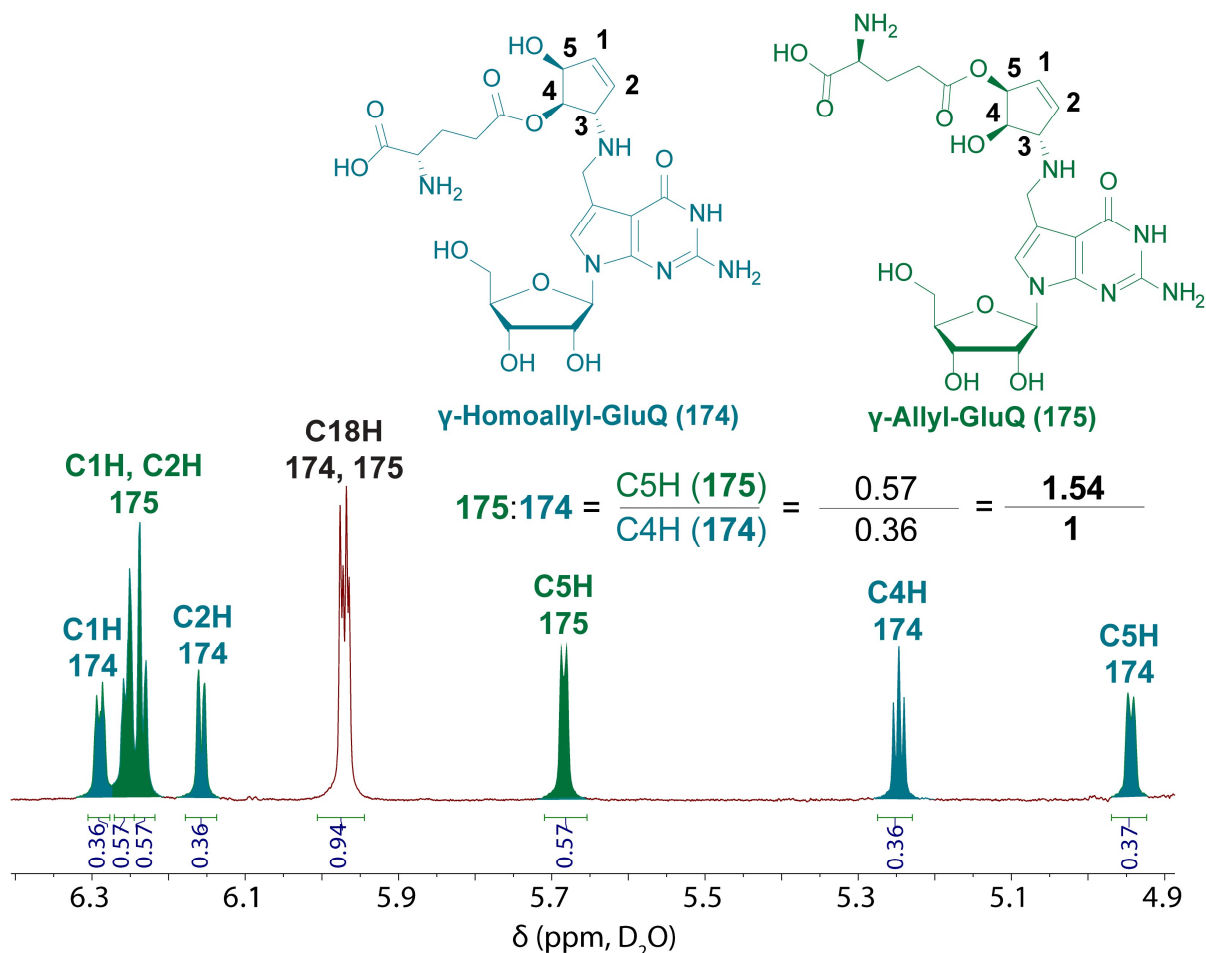


Abbildung 4.19: Ausschnitt aus dem $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von γ -GluQ. Das Verhältnis der beiden Isomere von 1.54:1 (allyl/homoallyl) wurde durch die Integration isolierter Signale ermittelt. Das gesamte NMR-Spektrum ist in Kapitel 7.3 zu finden.

4.5.5 Ergebnisse der LC-MS-Koinjektionsexperimente

Um den erhaltenen synthetischen Standard mit natürlichem GluQ zu vergleichen, wurde Gesamt-RNA aus *E.coli*-Zellen isoliert. Nach enzymatischer Spaltung der RNA auf Nukleosidebene wurden UHPLC-MS-Koinjektionsexperimente mit den synthetisierten Standards durchgeführt. Wenn nur verdaute RNA auf das UHPLC-MS-Gerät injiziert wurde, konnte ein Signal bei 15.37 min gemessen werden, welches natürlichem GluQ entspricht.

Zur Untersuchung der Standards wurden zunächst verschiedene Trenntechnologien getestet, um zu überprüfen, ob das Allyl- und das Homoallyl-Regioisomer unter bestimmten Umständen getrennt werden könnten. Doch selbst umfangreiche Untersuchungen mit verschiedensten Säulenmaterialien (Interchim Uptisphere, Phenomenex FusionRP, Macherey-Nagel Nucleodur, Agilent InfinityLab Poroshell) in Kombination mit einem Flachgradienten ergaben keine Trennung der Allyl-/Homoallyl-Gemische von α -GluQ (**165** und **166**) und γ -GluQ (**174** und **175**). Die entsprechenden Daten des UHPLC-MS-Koinjektionsexperiments sind in

Abbildung 4.20 dargestellt. Auch eine Trennung mittels Kapillarelektrophorese-MS (CE-MS) ergab keine Auftrennung der Regioisomere. Insgesamt unterstützen die beobachteten Daten die Vermutung einer schnellen Interkonversion der Regioisomere ineinander, welche im Laufmittel der jeweiligen mobilen Phase stattfindet und so eine Trennung unmöglich macht.

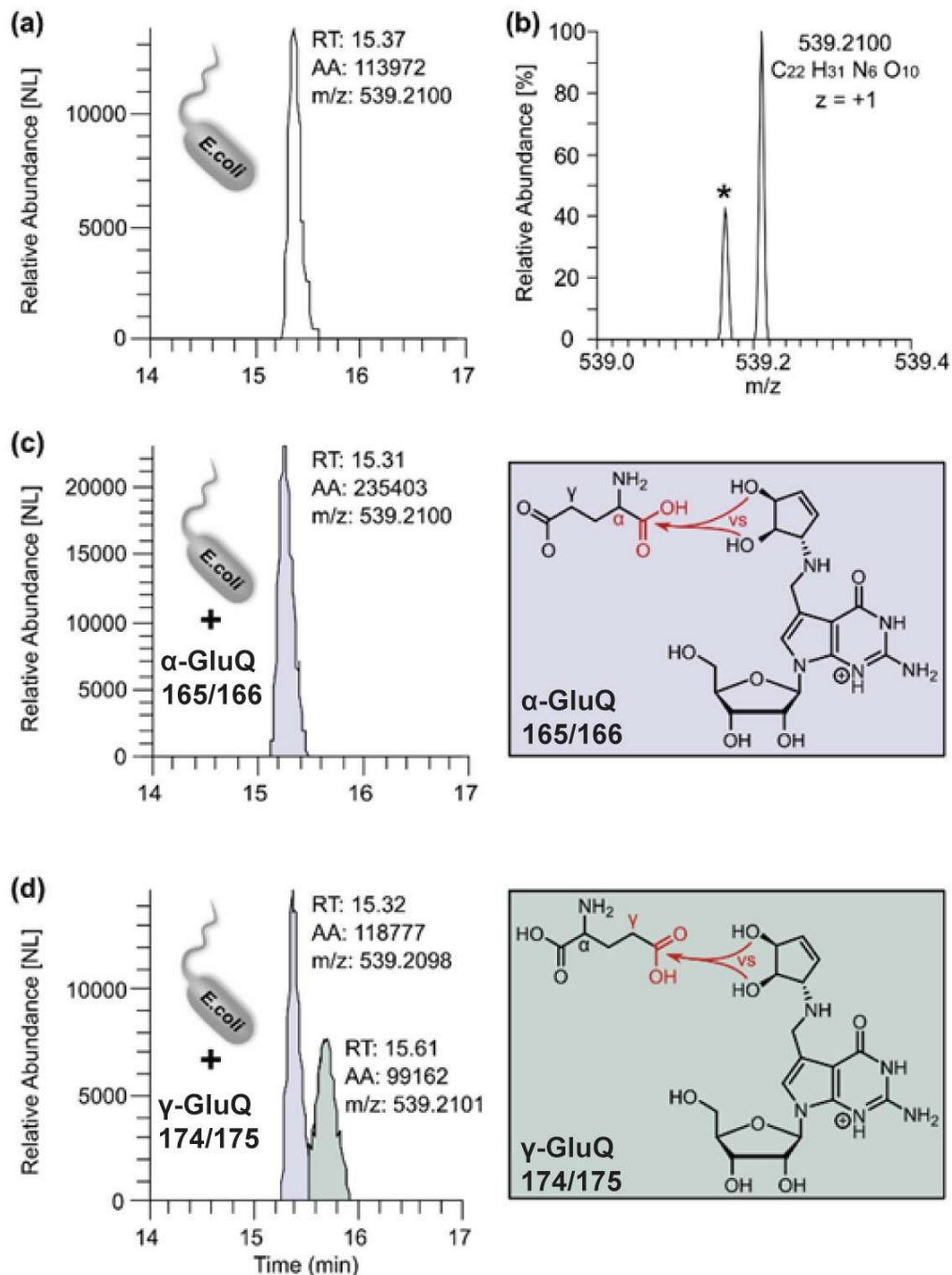


Abbildung 4.20: Ergebnisse der UHPLC-MS-Koinjektionsexperimente der Regioisomeregemische von α -GluQ und γ -GluQ mit natürlichem GluQ, welches aus *E. coli* Gesamt-RNA isoliert wurde; **(a)**: Auf Nucleosidebene verdaute Gesamt-RNA von *E. coli* ohne Standard; **(b)**: Massenspektren der natürlichen GluQ-Verbindung; **(c)** Verdaute Gesamt-RNA von *E. coli* + α -GluQ; **(d)**: Verdaute Gesamt-RNA von *E. coli* + γ -GluQ

Da die beiden Regioisomeregemische unter den untersuchten Bedingungen chromatographisch nicht trennbar waren, wurde zuerst untersucht, welche Carboxylgruppe an der Bildung von GluQ beteiligt sein könnte. Bei der Koinjektion von Allyl-/Homoallyl- α -GluQ und der verdauten RNA aus *E. coli* war ein deutlicher Anstieg der Intensität des Signals für natürliches GluQ bei 15.31 min feststellbar. Dies deutet darauf hin, dass natürliches GluQ die Struktur der α -GluQ-Isomere aufweist (Abbildung 4c). Im Gegensatz dazu konnte bei der Koinjektion von Allyl-/Homoallyl- γ -GluQ und der verdauten RNA zwei deutlich unterschiedliche Peaks bei 15.32 und 15.61 Minuten beobachtet werden. Diese Daten zeigen, dass α -GluQ tatsächlich die natürliche Verbindung ist (Abbildung 4d).

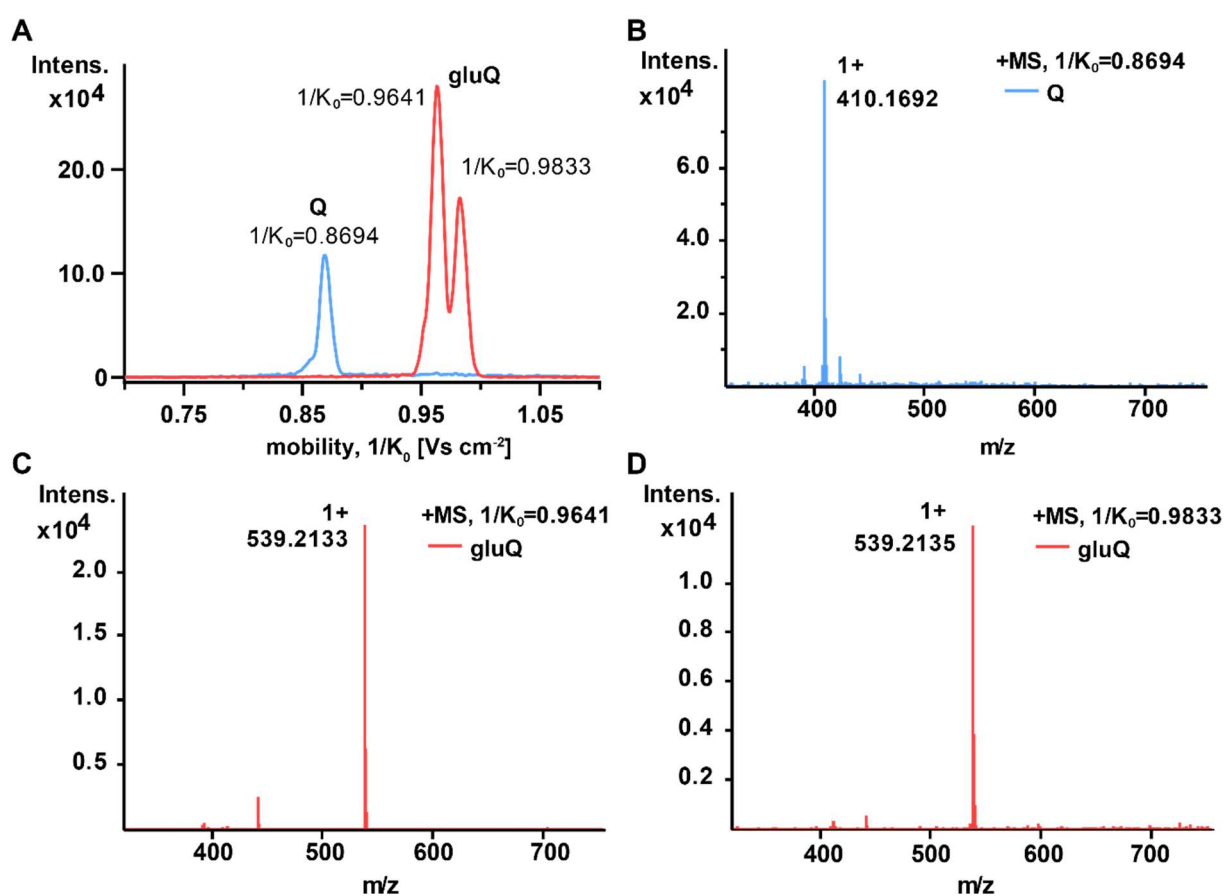


Abbildung 4.21: Ergebnisse der TIMS-TOF-Experimente zur Trennung der α -GluQ-Regioisomeren. **A:** Mobilogramm, welches die Signalintensität bei 410.17 Da (Q) und 539.21 Da (GluQ) gegen die Ionenmobilität aufträgt ($1/k_0$); **B-D:** Beobachtete Massenspektren an den Ionenmobilitätswerten von Q und der GluQ-Isomere, welche in **A** zugeordnet sind.

Ausgehend von der Annahme, dass die Umwandlung in der Gasphase langsamer vonstatten gehen könnte, wurde zur Trennung der Regioisomeren die Methode der *trapped ion mobility time of flight mass spectrometry* (TIMS-TOF) untersucht, welche bereits erfolgreich zur Auftrennung schwer trennbarer Regioisomeregemische verwendet wurde. Hierbei erfolgt eine Auftrennung des zu untersuchenden Gemisches nach der Ionisation der Probe in der

Gasphase, sodass eine möglicherweise lösungsmittelabhängige Umlagerung der Isomeren nicht stattfinden könnte. Unter diesen Bedingungen wurden zwei verschiedene Peaks mit derselben monoisotopischen Masse von GluQ nachgewiesen, während Queuosin als Referenzprobe als eine einzige Spezies detektiert wurde. Dies belegt erneut die Koexistenz der beiden GluQ-Regioisomere.

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass natürliches GluQ Glutamat enthält, welches über die α -Carbonsäure an Queuosin gebunden vorliegt. Das isolierte Material liegt als Gemisch der Allyl- und der Homoallyl-Regioisomere in einem Verhältnis von etwa 3:1 vor. Aufgrund der möglichen Isomerisierung während der Aufreinigung und des Aufschlusses der RNA ist bisher unklar, ob ein Gleichgewicht auch dann vorliegt, wenn die GluQ-haltige tRNA im produktiven Translationsprozess an das Ribosom und ihre zugehörige mRNA gebunden ist. Um dies zu klären, sind detaillierte Strukturuntersuchungen des intakten Komplexes erforderlich.

4.5.6 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmalig eine Totalsynthese für natürliches Glutamyl-Queuosin gezeigt werden. Hierbei konnte insbesondere auch eine kurze und effiziente Synthese für den Nukleosidbaustein **133** mit einer geeigneten Schutzgruppenstrategie entwickelt werden, welche auch im Hinblick auf eine effizientere Synthese anderer Queuosinderivate nützlich sein könnte (siehe Kapitel 4.3). Für natürliches GluQ konnte gezeigt werden, dass dieses als in einem Verhältnis von 3:1 von α -allyl-GluQ **166** zu α -homoallyl-GluQ **165** vorliegt, wobei beide Isomere vermutlich im Gleichgewicht miteinander auftreten. Die hier gezeigten Synthesen ermöglichen weitere Studien zur Untersuchung der Funktion von GluQ. Der synthetische Standard von GluQ könnte etwa in verschiedensten Fütterungsexperimenten zur genauen Quantifizierung von GluQ verwendet werden. Hierbei könnte etwa der Einfluss von äußeren Stressfaktoren auf die Glutamylierungsrate beobachtet werden, um die biologische Funktion dieser Hypermodifikation aufzuklären. In weiteren Experimenten könnte aufbauend auf diesen Resultaten ermittelt werden, ob der beobachtete Äquilibrierungseffekt so auch *in vivo* auf RNA-Ebene stattfindet. Hierzu könnten etwa *in vivo* Acylierungsexperimente (z.B. SHAPE) Aufschluss geben. Hierbei würde das *in vivo* vorliegende Regioisomerenverhältnis durch chemische Acylierung der jeweiligen Nachbarposition fixiert, wodurch eine genaue Analyse der vorliegenden Verteilung möglich wäre.^[209] Insgesamt legen die hier gezeigten Ergebnisse den Grundstein für ein tieferes Verständnis dieser RNA-Hypermodifikation.

4.5.7 Material und Methoden

Synthesevorschriften für die Synthese des geschützten Nukleosidbausteins und der regioisomeren GluQ-Derivate sowie die zugehörigen analytischen Daten sind in Kapitel 5.2.5 aufgeführt.

4.5.8 Autorenbeiträge

Bei dieser Studie war ich für die Synthese und NMR-spektroskopische Charakterisierung der erhaltenen GluQ-Derivate verantwortlich. Ich führte die Auswertung der NMR-Spektren im Hinblick auf die Bestimmung des Regioisomerenverhältnisses durch. Weiterhin war ich für die Züchtung der untersuchten *E. Coli*-Bakterien sowie die Isolation der Gesamt-RNA aus diesen zuständig. Der enzymatische Verdau der RNA sowie die UHPLC-MS-Ko-Injektionsexperimente wurden von Dr. Matthias Heiß durchgeführt. Dr. Mirko Wagner entwickelte die im Ko-Injektionsexperiment verwendeten LC-MS-Methoden. Prof. Dr. Thomas Carell war für die Planung und Koordination des Projektes verantwortlich. Barbara Steigenberger führte die TIMS-TOF-MS-Experimente durch. Marco Borsó und Axel Imhof führten die CE-MS-Experimente durch. Ines Thoma führte erste Syntheserversuche für Glutamy-Queuosin durch. Prof. Dr. Thomas Carell war für die Koordination des Projekts und die Planung der Experimente verantwortlich. Die Abbildungen der MS-Experimente wurden in Zusammenarbeit mit M. Heiß erstellt.

5 EXPERIMENTELLER TEIL

5.1 Material und Methoden chemische Synthese

Chemische Synthese

Reaktionen unter Schutzgas wurden unter Verwendung der Schlenk-Technik durchgeführt. Hierzu wurde Argon als Schutzgas verwendet. Reaktionsgefäße wurden vor Verwendung mit einer Heissluftpistole bei 650 °C unter Vakuum ausgeheizt und anschließend unter Argon auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Zugabe von Feststoffen erfolgte nach dem Argon-Gegenstrom-Prinzip.

Lösungsmittel

Für chemische Synthesen wurden über Molsieb getrocknete Lösemittel der Firma Acros verwendet. Für Extraktionen und Aufreinigungen mittels Säulenchromatographie wurden technische Lösemittel verwendet, welche vor Benutzung destilliert wurden.

Verwendete Chemikalien

Chemikalien wurden von den Firmen *Merck*, *Carbosynth*, *Carbolution*, *TCI*, *Fluka*, *Acros* und *ABCR* in Qualitätsstufen *puriss*, *p.a.* und *purum* bezogen und ohne weitere Aufreinigung verwendet.

Reaktionen mit einem Druckautoklav (CO-Insertion)

Für die Durchführung der carbonylativen Stille-Kreuzkupplung zur Herstellung formylierter Deazaguanine wurde ein Druckautoklav mit einer CO-Atmosphäre von 3.5 bar verwendet. Bei dem Reaktor handelt es sich um ein *Miniclav*-Glas-Druckreaktor mit einem Borosilikas-Glas der Firma *Büchi*. Der Reaktor wurde vor der Reaktion im Ofen bei 100 °C ausgeheizt und unter einem leichten Argon-Strom abgekühlt. Für die kontrollierte Zugabe von Lösungen während der Reaktion wurde eine Spritzenpumpe der Firma *KD Scientific* verwendet.

Dünnschichtchromatographie

Zur Kontrolle des Reaktionsfortschrittes, sowie zur Trennkontrolle bei säulenchromatographischen Aufreinigungen wurden DC-Platten F254 (Kieselgel auf

Aluminium) der Firma *Merck* verwendet. Aromatische, UV- und fluoreszenzaktive Substanzen wurden unter einer UV-Lampe ($\lambda = 254 \text{ nm}$, 356 nm) beobachtet.

Für die Anfärbung der Substanzen auf der DC-Platte wurden folgende Lösungen verwendet:

- Ninhydrin (0.3 g), Eisessig (3.0 mL) und n-Butanol.
- KMnO_4 (3.0 g), K_2CO_3 (20 g) und KOH (0.30 g) in destilliertem H_2O (300 mL).
- Cer(IV)-ammoniummolybdat-Lösung, 120 g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 24\text{H}_2\text{O}$ und 5.0 g $\text{Ce}(\text{NH}_4)_4(\text{NO}_3)_6$ in 800 mL H_2SO_4 , 10%-ig.

Normalphasen-Säulenchromatographie

Die säulenchromatographische Aufreinigung von Rohprodukten wurde in geeigneten Glassäulen unter variablen leichten Stickstoffüberdrücken nach der *Flash*-Technik durchgeführt. Als stationäre Phase wurde *Kieselgel 60* der Firma *Merck* (Korngröße: 0.063 nm–0.200 nm) verwendet. Angemessene Elutionsmittel wurden über Dünnschichtchromatographie (DC) ermittelt. Fraktionen wurden in Regenzgläsern gesammelt und mit Hilfe von DC oder LC-MS analysiert.

Rotationsverdampfer

Zur Destillation der Lösemittel unter vermindertem Druck wurde ein Rotationsverdampfer *Laborota 4000* der Firma *Heidolph* verwendet. Sofern nicht abweichend angegeben, wurden Lösemittel bei $40 \text{ }^\circ\text{C}$ entfernt. DMF wurde bei $55 \text{ }^\circ\text{C}$ entfernt.

Bidestilliertes Wasser

Für HPLC-Aufreinigungen und für biochemische Experimente wurde Wasser aufgereinigt mit einer MiliQ-Anlage der Firma *Sartorius* verwendet.

High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Zur Aufreinigung von Endverbindungen wurde ein semipräparativen HPLC-Trennverfahren an einem *Breeze-System* der Firma *Waters*, das aus einer *1525 Binary HPLC Pump* und einem *2487 UV/Vis Detektor* besteht, oder an einem *Agilent 1260 Infinity II 400 bar*-Pumpensystem mit einem *Agilent 1260 Infinity II VWD* bei 260 nm , durchgeführt. Als stationäre Phase wurden *VP 250/10 Nucleosil 100-7 C18* oder *Nucleodur (250/10 mm, C18ec, 5 μm) reversed-phase* Chromatographiesäulen der Firma *Macherey & Nagel* bei einer Flussrate von 5.0 mL/min verwendet. Für analytische Untersuchungen wurde ein *Waters Separationsmodul e2695* in Kombination mit einem *2487 UV/Vis Detektor (Waters)* oder einem *Agilent 1260 Infinity II 800*

bar Flexible Prime-Pumpensystem mit einem Agilent 1260 Infinity II MWD bei 260 nm verwendet. Als stationäre Phase dienten 120/3 Nucleosil C18-Chromatographiesäulen der Firma *Marcherey & Nagel* bei einer Flussrate von 0.5 mL/min oder 1.0 mL/min verwendet. Das für die HPLC-Auftrennungen eingesetzten Laufmittelsystem bestanden aus doppelt destilliertem Wasser (ddH₂O) und Acetonitril (*HPLC-grade*). Falls gepufferte Laufmittelsysteme verwendet wurden, sind diese bei den jeweiligen Vorschriften genau angegeben. Für präparative Aufreinigungen wurde eine präparative HPLC-Anlage von *Shimadzu* verwendet.

pH-Meter

Ein pH-Meter *MP 220* der Firma *Mettler Toledo* wurde für pH-Messungen verwendet. Dabei wurde vor jeder Messung das Gerät mit einer pH = 4.0 und pH = 7.0 Standardlösung kalibriert.

Lyophilisation

Zum Entfernen der Lösemittel mittels Gefriertrocknung wurden die Lyophille *2-4 LD plus* der Firma *Christ* verwendet. Die zu entfernenden Lösemittel wurden dabei zuvor mit flüssigem Stickstoff eingefroren.

Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Eindimensionale ¹H-NMR-Spektren wurden größtenteils an einem *Bruker Ascend 400* oder einem *Bruker Ascend 500* NMR-Spektrometer aufgenommen. Eindimensionale ¹H-, ¹³C-, ¹⁹F- sowie ¹⁵N-NMR-Spektren sowie zweidimensionale ¹H- und ¹³C-Spektren (COSY, HSQC und HMBC) zur genauen Charakterisierung der hergestellten Verbindungen wurden von der Abteilung für NMR-Spektroskopie des Hauses F des Departments Chemie und Pharmazie der LMU München, namentlich von *Dr. David Stephenson* und *Claudia Dubler*, durchgeführt. Bei diesen Messungen wurden als Spektrometer die Geräte *Bruker Avance III HD 400*, *Varian NMR-System 600* und *Bruker Avance III HD* mit *Cryo-Kopf 800* verwendet. Die chemischen Verschiebungen sind in ppm (*parts per million*) angegeben, welche sich auf die Mitte des jeweiligen Kopplungsmusters beziehungsweise auf die Ausdehnung des Multipletts beziehen. Als interner Standard relativ zu den chemischen Verschiebungen dienten die verwendeten deuterierten Lösemittel. Die Multiplizitäten der Signale werden als s (Singulet), d (Duplet), t (Triplet), q (Quartet), m (Multiplet) bzw. deren Kombinationen angegeben. Außerdem ist zu beachten, dass die Angaben der Multiplizitäten phänomenologisch sind. Das heißt, dass die Daten entsprechend ihrer Erscheinung und nicht ihrer theoretisch zu erwartenden Multiplizität angegeben wurden. Kopplungskonstanten sind in Hertz (Hz) angegeben und beziehen sich,

sofern nicht anders angegeben, auf H-H-Nah- und Fernkopplungen. NMR-Spektren wurden mit der Software *MestReNova* ausgewertet. Die angegebene Nummerierung der Atome folgt nicht entsprechenden IUPAC Regeln.

Massenspektrometrie (LC-MS, HR-ESI, HR-EI, Orbitrap, QQQ-MS, MALDI)

Niederaufgelöste ESI-Massenspektrometrie zur Reaktionskontrolle wurde über Direkteinspritzung bzw. mit Flüssigchromatographie-Kopplung (LC-MS) an einem Massenspektrometer *MSQ Plus* der Firma *Thermo Scientific* durchgeführt. Dem genannten Massenspektrometer ist ein Flüssigchromatographie- sowie Einspritzsystem *Dionex Ultimate3000* des gleichen Herstellers vorgeschaltet. Hochaufgelöste Massenspektrometrie (HR-ESI/HR-EI-MS) wurde von der Abteilung für Massenspektrometrie des Departments für Chemie und Pharmazie der LMU München, namentlich von *Dr. W. Spahl* und *S. Kosak* durchgeführt. Die Spektren wurden mit einem *LTQ-FTI-CR* der Firma *Finnigan* aufgenommen. EI Spektren wurden mit einer *QExactive* der Firma *Thermo Fisher* angefertigt.

Infrarotspektroskopie (IR)

Aufnahme von IR-Spektren erfolgte mit einem *BX FT-IR* System von *Perkin-Elmer* mit einer Diamant-ATR (*attenuated total reflection*) Einheit oder an einem *IRSpirit* Fourier-Transformations-Infrarot-Spektrophotometer mit QATR-S Aufsatz von *Shimadzu*. Feststoffe wurden dabei entweder zuvor in wenig Dichlormethan gelöst, ein Tropfen der Lösung auf die ATR-Einheit gegeben und das Lösemittel verdampft, oder wurden die Feststoffe direkt auf die ATR-Einheit gegeben und mit einem Stempel auf der ATR-Einheit verdichtet. Öle und flüssige Verbindungen wurden als Filme aufgetragen. Die Wellenzahlen sind in cm^{-1} angegeben und die Intensitäten der erhaltenen Signale mit vs (sehr stark), s (stark), m (mittel), w (schwach), vw (sehr schwach) oder b (breit) beschrieben.

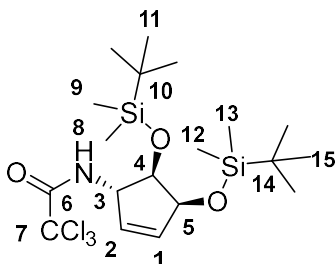
Schmelzpunktanalyse

Für die Schmelzpunktbestimmung kristalliner Feststoffe wurde ein *Büchi Melting Point B-540* Schmelzpunktmessgerät verwendet.

5.2 Synthesevorschriften und Analytik

5.2.1 Vorschriften für die Synthese von N⁹-Methylqueuin

N-((1S,4S,5R)-4,5-Bis((tert-butyldimethylsilyl)oxy)cyclopent-2-en-1-yl)-2,2,2-trichloroacetamid **151**



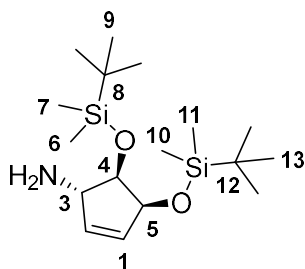
Trichloroacetamid-geschütztes Cyclopenten **152** (500 mg, 1.93 mmol, 1.00 Äq.) wurde in DMF (4 mL) gelöst und TBSCl (873 mg, 5.79 mmol, 3.00 Äq.) und Imidazol (592 mg, 8.69 mmol, 4.50 Äq.) wurden zugegeben. Die Reaktion wurde für 17 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend auf gesättigte wässrige NaHCO₃-Lösung (100 mL) gegossen. Nach Trennung der Phasen wurde die wässrige Phase mit DCM (2 x 100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet, filtriert und *in vacuo* vom Lösungsmittel befreit. Säulenchromatographische Aufreinigung (*i*-Hexan/EtOAc 99:1 → 9:1) ergab das Produkt **151** (766 mg, 1.57 mmol, 81%) als farblosen Feststoff.

R_f (*i*-Hexan/EtOAc 1:1) = 0.9

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 6.59 (d, J = 8.2 Hz, 1H, NH), 6.01 (dt, J_1 = 6.3 Hz, J_2 = 2.3 Hz, 1H, C1H), 5.88 (d, J = 1.7 Hz, 1H, C2H), 4.85 (m, 1H, C5H), 4.50 (ddd, J_1 = 5.1 Hz, J_2 = 2.6 Hz, J_3 = 0.8 Hz, 1H, C3H), 3.97 (dd, J_1 = 5.9 Hz, J_2 = 5.1 Hz, 1H, C4H), 0.91 (s, 9H, C11H/C15H), 0.89 (s, 9H, C11H/C15H), 0.11 (s, 3H, C8H/C9H/C12H/C13H), 0.09 (s, 3H, C8H/C9H/C12H/C13H), 0.08 (s, 3H, C8H/C9H/C12H/C13H), 0.06 (s, 3H, C8H/C9H/C12H/C13H) ppm.

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃): δ = 161.8 (C6), 135.4 (C2), 133.4 (C1), 92.7 (C7), 78.7 (C4), 74.4 (C5), 61.9 (C3), 26.0 (C11/C15), 26.0 (C11/C15), 18.3 (C10/C14), 18.3 (C10/C14), -3.9 (C8/C9/C12/C13), -4.1 (C8/C9/C12/C13), -4.2 (C8/C9/C12/C13), -4.8 (C8/C9/C12/C13) ppm.

HRMS (ESI⁺): ber. für C₁₉H₃₈Cl₃O₂N₂Si₂ (M + H)⁺: 488.1372; Gefunden: 488.1394.

(1S,4S,5R)-4,5-Bis((tert-butylidimethylsilyl)oxy)cyclopent-2-en-1-amin 116

151 (451 mg, 0.922 mmol) wurde in EtOH (30 mL) gelöst und wässrige NaOH (2 M, 7.5 mL) wurde zugegeben. Die Reaktion wurde für 18 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit gesättigter wässriger NH₄Cl-Lösung (30 mL) versetzt. Die wässrige Phase wurde mit DCM (3 x 150 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und anschließend *in vacuo* vom Lösungsmittel befreit. Das Produkt **116** (285 mg, 0.829 mmol, 90%) wurde als farbloses Öl erhalten.

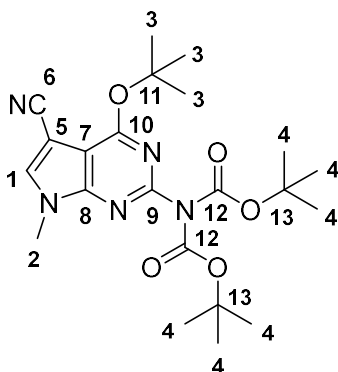
R_f (DCM/MeOH 20:1) = 0.32.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 5.83 (m, 2H, C1H, C2H), 4.46 (ddd, *J*₁ = 5.1 Hz, *J*₂ = 2.3 Hz, *J*₃ = 1.0 Hz, 1H, C5H), 3.90 (ddd, *J*₁ = 5.4 Hz, *J*₂ = *J*₃ = 1.3 Hz, 1H, C3H), 3.58 (t, *J* = 5.3 Hz, 1H, C3H), 0.93 (s, 9H, C9H/C13H), 0.87 (s, 9H, C9H/C13H), 0.12 (s, 3H, C6H/C7H, C10H/C11H), 0.10 (s, 3H, C6H/C7H, C10H/C11H), 0.06 (s, 3H, C6H/C7H, C10H/C11H), 0.04 (s, 3H, C6H/C7H, C10H/C11H) ppm.

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃): δ = 138.2 (C2), 132.6 (C1), 83.3 (C4), 75.3 (C5), 61.5 (C3), 26.2 (C9/C13), 26.1 (C9/C13), 18.5 (C8/C12), 18.4 (C8/C12), -3.9 (C6/C7/C10/C11), -4.1 (C6/C7/C10/C11), -4.2 (C6/C7/C10/C11), -4.5 (C6/C7/C10/C11) ppm.

HRMS (ESI⁺): ber. für C₁₇H₃₈NO₂Si₂ (M + H)⁺: 344.2436; Gefunden: 344.2436.

IR: 2953 (m), 2929 (m), 2894 (w), 2857 (m), 1473 (m), 1462 (M), 1361 (m), 1250 (s), 1148 (s), 1115 (s), 1062 (m), 1006 (w), 877 (s), 832 (vs), 771 (vs), 671 (s) cm⁻¹.

O⁶-tert-Butyl-N²-di-tert-butylcarbamoyl-N⁹-methyl-7-cyano-7-deazaguanin 114

O⁶-tert-Butyl-N²-di-tert-butylcarbamoyl-7-cyano-7-deazaguanin **113** (500 mg, 1.16 mmol, 1.00 Äq.) wurde in DMF (5 mL) gelöst und K₂CO₃ (320 mg, 2.32 mmol, 2.00 Äq.) wurde zugegeben. Anschließend wurde langsam Methyljodid (0.150 mL, 330 mg, 2.32 mmol,) zuge tropft. Die Reaktion wurde für 4 h auf 50 °C erwärmt. Anschließend wurde wässrige Natronlauge (20 mL, 2 M) und DCM (50 mL) zugegeben und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde mit DCM (2 x 50 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet. Nach Abfiltrieren des Trockenmittels wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung (*i*-Hexan/EtOAc 3:1) lieferte das Produkt **114** (481 mg, 0.938 mmol, 93%) als gelblichen Feststoff.

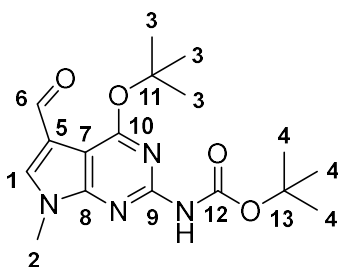
R_f (*i*-Hexan/EtOAc 1:3) = 0.15.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 7.51 (s, 1H, C1H), 3.83 (s, 3H, C2H), 1.70 (s, 9H, C3H), 1.43 (s, 18H, C4H) ppm.

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃): δ = 163.3 (C10), 152.7 (C12), 152.20 (C8), 151.0 (C9), 134.5 (C1), 114.6 (C6), 104.4 (C7), 84.8 (C5), 84.2 (C11), 83.2 (C13), 32.3 (C2), 28.3 (C3), 28.0 (C4) ppm.

HRMS (ESI⁺): ber. für C₂₂H₃₁N₅O₅Na [M + Na]⁺: 468.2217; Gefunden: 468.2220.

IR: 2298 (m), 2223 (m), 1788 (w), 1654 (s), 1601 (s), 1571 (m), 1533 (w), 1507 (m), 1476 (m), 1459 (s), 1441 (s); 1392 (s), 1368 (s), 1289 (m), 1257 (s), 1197 (vs), 1155 (m), 1106 (m), 1088 (w), 1036 (vs), 986 (s), 869 (vs), 848 (s), 812 (s), 790 (s), 760 (vs), 682 (vs), 667 (vs), 615 (s), 506 (s) cm⁻¹.

O⁶-tert-Butyl-N²-tert-butylcarbamoyl-N⁹-methyl-7-formyl-7-deazaguanin **115**

O⁶-tert-Butyl-N²-di-tert-butylcarbamoyl-N⁹-methyl-7-cyano-7-deazaguanin **114** (418 mg, 0.940 mmol, 1.00 Äq.) wurde in DCM (24 mL) gelöst und auf -78 °C gekühlt. Anschließend wurde DIBAL-H (3.76 mL, 3.76 mmol, 4.00 Äq., 1 M Lösung in Hexan) langsam zugetropft. Die Lösung wurde für 2 h bei -78 °C gerührt. Anschließend wurde gesättigte Rochelle-Salz-Lösung (30 mL) zugegeben und die Mischung auf Raumtemperatur erwärmt. Nach weiterer Zugabe von gesättigter Rochelle-Salz-Lösung (150 mL) und DCM (50 mL) wurden die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde mit DCM (2 x 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet. Nach Abfiltrieren des Trockenmittels wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung (*i*-Hexan/EtOAc 2:1) lieferte das Produkt **115** (254 mg, 0.729 mmol, 78%) als leicht gelbliche Kristalle.

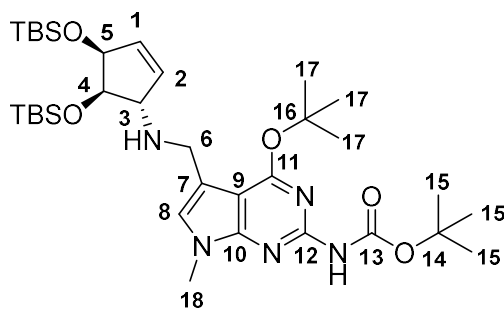
R_f (*i*-Hexan/EtOAc 1:2) = 0.23.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 10.20 (s, 1H, C6H), 7.62 (s, 1H, C1H), 3.83 (s, 3H, C2H), 1.71 (s, 9H, C3H), 1.56 (s, 9H, C4H) ppm.

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃): δ = 186.2 (C6), 163.7 (C10), 154.0 (C8), 152.3 (C9), 150.7 (C13), 129.9 (C1), 116.5 (C5), 101.2 (C7), 83.4 (C11), 81.3 (C13), 32.1 (C2), 28.7 (C3), 28.5 (C4) ppm.

HRMS (ESI): ber. für C₁₇H₂₃N₄O₄ [M - H]⁻: 347.1725; Gefunden: 347.1724.

IR: 3367 (m), 1780 (m), 1746 (s), 1666 (s), 1589 (s), 1536 (s), 1510 (m), 1481 (m), 1456 (s), 1433 (s), 1368 (s), 1357 (m), 1319 (s), 1211 (s), 1167 (s), 1141 (vs), 1125 (vs), 1042 (m), 1010 (m), 953 (m), 885 (m), 846 (m), 793 (s), 766 (m), 731 (m), 707 (m), 680 (s), 648 (m), 606 (m), 599 (m), 579 (m), 548 (w) cm⁻¹.

4',5'-Di-O-(tert-butylidimethylsilyl)-O⁶-tert-butyl-N²-tert-butylloxycarbamoyl-N⁹-methylqueuin 117

O⁶-tert-Butyl-N²-tert-butylcarbamoyl-N⁹-methyl-7-formyl-7-deazaguanin **115** (395 mg, 1.13 mmol, 1.00 Äq.) und (1S,4S,5R)-3-Amino-4,5-bis((tert-butylidimethylsilyl)oxy)-cyclopenten **116** (390 mg, 1.13 mmol, 1.00 Äq.) wurden in Methanol (5 mL) gelöst und Essigsäure (5 µL) wurde zugegeben. Die Reaktion wurde für 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde auf 0 °C gekühlt und NaBH(OAc)₃ (544 mg, 2.57 mmol, 3.00 Äq.) wurde zugegeben und die Reaktion wurde für 2 h bei 0 °C gerührt. Es wurde eine weitere Portion NaBH(OAc₃) (181 mg, 0.855 mmol, 1.00 Äq.) zugegeben und für 1 h weiter bei 0 °C gerührt. Im Anschluss wurde die Reaktion mit MeOH (20 mL) verdünnt und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung (DCM/MeOH 150:1 → 100:1 → 30:1) lieferte das Produkt **117** (346 mg, 0.511 mmol, 45%) als leicht gelblichen Sirup.

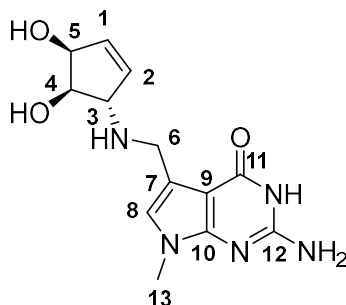
R_f (DCM/MeOH 50:1) = 0.37.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 6.84 (s, 1H, C8H), 5.94 (d, *J* = 6.2 Hz, 1H, C2H), 5.88 (dd, *J*₁ = 6.3 Hz, *J*₂ = 1.8 Hz, 1H, C1H), 4.63 (dd, *J*₁ = 5.4 Hz, *J*₂ = 2.2 Hz, 1H, C5H), 4.06 (m, 2H, C3H, C6Ha, C6Hb), 3.88 (s, 1H, C4H) 3.71 (s, 3H, C18H), 1.69 (s, 9H, C17H), 1.55 (s, 9H, C15H), 0.87 (s, 9H, Si(C(CH₃)₃), 0.87 (s, 9H, Si(C(CH₃)₃), 0.11 (s, 3H, SiCH₃), 0.09 (s, 3H, SiCH₃), 0.06 (s, 3H, SiCH₃), 0.05 (s, 3H, SiCH₃) ppm.

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃): δ = 175.3 (C13) 163.0 (C11), 153.4 (C12), 151.6 (C10), 150.9 (C7) 136.0 (C2), 132.7 (C1), 124.5 (C8), 101.5 (C9) 83.2 (C16), 80.9 (C14), 78.5 (C3), 75.5 (C5), 67.0 (C4), 43.6 (C6), 31.3 (C18), 28.9 (C17), 28.5 (C15), 26.4 (SiC(CH₃)₃), 26.3 (SiC(CH₃)₃) 18.4 (SiC(CH₃)₃), 18.3 (SiC(CH₃)₃), -3.88 (SiCH₃), -3.94 (SiCH₃), -4.03 (SiCH₃), -4.63 (SiCH₃), ppm.

HRMS (ESI⁺): ber. für C₃₄H₆₂N₅O₅Si₂ [M + H]⁺: 676.4284; Gefunden: 676.4293.

IR: 2930 (m), 2557 (w), 1741(/m), 1604 (s), 1518 (s), 1365 (s), 1308 (m), 1249 (s), 1145 (vs), 1083 (s), 1043 (m), 1006 (m), 835 (vs), 775 (vs), 744 (s), 615 (m) cm⁻¹.

N⁹-Methylqueuin 111

4',5'-Di-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-*O*⁶-*tert*-butyl-*N*²-*tert*-butyloxycarbamoyl-*N*⁹-methylqueuosin (42.3 mg, 62.7 μ mol) **117** wurde in EtOAc (5 mL) gelöst und HF \cdot Pyridin (100 μ L, 2.26 mmol, 36.0 Äq.) wurde zugegeben. Die Reaktion wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde TMSOMe (621 μ L, 470 mg, 4.51 mmol., 72.0 Äq.) zugegeben und für 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* wurde der Rückstand in MeOH (3 mL) aufgenommen und es wurde wässrige HCl (2 M, 3 mL) zugegeben. Die Reaktion wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit gesättigter wässriger NaHCO₃-Lösung neutralisiert. Präparative HPL-chromatographische Aufreinigung (Puffer System C, Gradient: 0-10% Puffer B in 45 min, R_t = 29.2 min) lieferte das Produkt **111** (9.24 mg, 31.8 μ mol, 51%) als leicht gelblichen Schaum.

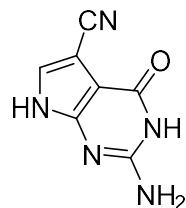
R_t (Puffer System C, Gradient: 0-10% Puffer B in 45 min) = 29.2 min.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 6.91 (s, 1H, C8H), 6.27 (m, 1H, C1H), 6.09 (dd, J_1 = 6.3 Hz, J_2 = 1.8 Hz, 1H, C2H), 4.68 (m, 1H, C5H), 4.46 (d, J = 13.8 Hz, 1H, C6Ha), 4.40 (d, J = 13.8 Hz, 1H, C6Hb), 4.38 (t, J = 5.4 Hz, 1H, C4H), 4.27 (dq, 4.46 (d, J_1 = 5.5 Hz, 4.46 (d, J_2 = 1.8 Hz, 1H, C3H), 3.57 (s, 3H, C13H) ppm.

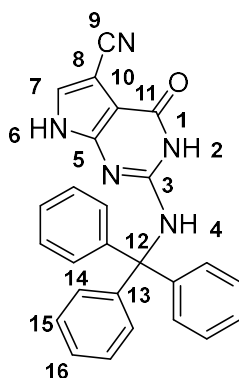
¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃): δ = 161.3 (C11), 152.8 (C12), 151.2 (C10), 137.7 (C1), 129.0 (C2), 123.9 (C8), 107.0 (C7), 98.5 (C9), 73.6 (C4), 73.0 (C5), 66.4 (C3), 42.0 (C6), 31.1 (C13) ppm.

HRMS (ESI⁺): ber. für C₁₃H₁₈N₅O₃ (M + H)⁺: 292.1404; Gefunden: 292.1403.

IR: 3026 (s, br), 1638 (s), 1543 (vs), 1401 (vs), 1269 (s), 1188 (m), 1117 (m), 1071 (m), 1048 (m), 1013 (m), 782 (m), 746 (m), 651 (s), 536 (m), 453 (m) cm⁻¹.

5.2.2 Vorschriften für die Synthese von 6-Thioqueuin**7-Cyano-7-deazaguanin 58**

Synthesevorschrift und Analytik siehe Kapitel 5.2.5.

N²-Trityl-7-cyano-7-deazaguanin 59

7-Cyano-7-deazaguanin **58** (1.00 g, 5.70 mmol, 1.00 Äq.) wurde in Pyridin (58 mL) suspendiert und Tritylchlorid (2.38 g, 8.55 mmol, 1.50 Äq.) wurde zugegeben. Die Reaktion wurde für 48 h auf 90 °C erhitzt. Nach Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* lieferte säulenchromatographische Aufreinigung (DCM/MeOH 100:1) das Produkt **59** (1.30 g, 3.11 mmol, 55%) als dunklen Feststoff.

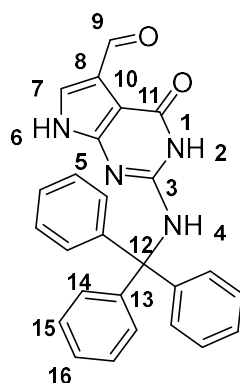
R_f (DCM/MeOH 100:1) = 0.15.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 11.86 (s, 1H, N6H), 10.68 (s, 1H, N2H), 7.62 (s, 1H, N4H), 7.46 (s, 1H, C7H), 7.32 (m, 12H, C14H, C14H), 7.23 (m, 3H, C15H), ppm.

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃): δ = 157.5 (C1), 151.6 (C5), 150.3 (C7), 145.1 (C13), 129.1 (C14), 128.5 (C8), 128.2 (C15), 127.2 (C16), 116.1 (C8), 100.1 (C10), 85.9 (C11), 70.6 (C12), ppm.

HRMS (ESI⁺): Ber. für C₂₆H₂₀N₅O [M + H]⁺: 418.1662; Gefunden: 418.1665;

IR: 2227 (m), 1663 (s), 1614 (s), 1576 (s), 1552 (s), 1489 (s), 1446 (s), 1416 (s), 1374 (m), 1260 (m), 1153 (s), 1085 (m), 901 (m), 835 (m), 782 (m), 740 (s), 696 (vs), 667 (m), 517 (m) cm⁻¹.

N²-Tribyl-7-formyl-7-deazaguanin 60

N²-Tribyl-7-cyano-7-deazaguanin **59** (1.30 g, 3.00 mmol, 1.00 Äq.) wurde in Toluol (8 mL) gelöst und (NH₄)₄SO₄ (39.6 mg, 0.300 mmol, 0.100 Äq.) und HMDS (1.24 mL, 968 mg, 6.00 mmol, 2.00 Äq.) wurden zugegeben. Die Reaktion wurde für 18 h zum Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde in DCM (8 mL) aufgenommen und DIBAL-H (1 M in Hexan, 6.00 mL, 6.00 mmol, 2.00 Äq.) wurde bei -78 °C zugegeben. Die Reaktion wurde für 1 h bei -78 °C gerührt, bevor erneut DCM (8 mL) und DIBAL-H (1 M in Hexan, 6.00 mL, 6.00 mmol, 2.00 Äq.) zugegeben wurde. Danach wurde für 1 h bei -78 °C gerührt. Eine Mischung aus H₂O und AcOH (9:1, 3.5 mL) wurde zugegeben und die Reaktion wurde auf Raumtemperatur erwärmen gelassen. Anschließend wurde EtOAc (150 mL) und gesättigte wässrige Kaliumnatriumtartratlösung (150 mL) zugegeben. Nach Trennung der Phasen wurde die wässrige Phase mit EtOAc (3 x 150 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert, und das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung (EtOAc) lieferte das Produkt **60** (631 mg, 1.50 mmol, 50%) als gelben Feststoff.

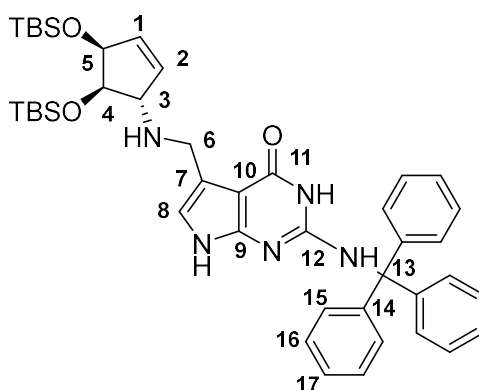
R_f (EtOAc) = 0.32.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 11.85 (s, 1H, N6H), 10.66 (s, 1H, N2H), 10.00 (s, 1H, C9H), 7.59 (s, 1H, C7H), 7.43 (s, 1H, N4H), 7.30 (m, 12H, C14H, C15H), 7.21 (m, 3H, C16H) ppm.

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃): δ = 185.5 (C9), 158.6 (C3), 151.6 (C5), 151.3 (C3), 145.3 (C13), 129.1 (C14), 128.3 (C15), 127.2 (C16), 124.4 (C7), 120.2 (C8), 100.8 (C10), 85.9 (C11), 70.6 (C12) ppm.

HRMS (ESI⁺): Ber. für C₂₆H₂₁N₄O₂ [M + H]⁺: 421.1659; Gefunden: 421.1661.

IR: 2227 (m), 1642 (s), 1611 (s), 1572 (vs), 1487 (vs), 1446 (s), 1418 (s), 1358 (m), 1260 (s), 1187 (m), 1147 (m), 1085 (m), 1033 (m), 1020 (m), 1002 (m), 900 (m), 836 (s), 782 (s), 696 (vs), 628 (s) cm⁻¹.

4',5'-Di-O-*tert*-butyldimethylsilyl-2-N-tritylqueuin 120

N²-Trityl-7-formyl-7-deazaguanin **60** (100 mg, 238 μmol , 1.00 Äq.) und (1*S*,4*S*,5*R*)-4,5-bis((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)cyclopent-2-en-1-amin **116** (82.0 mg, 238 μmol , 1.00 Äq.) wurden in MeOH (3 mL) gelöst und AcOH (3 μL) wurde zugegeben. Die Reaktion wurde für 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde auf 0 °C gekühlt und NaBH(OAc)₃ (151 mg, 714 μmol , 3.00 Äq.) wurde zugegeben. Die Reaktion wurde für 1 h bei 0 °C gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* ergab eine säulenchromatographische Aufreinigung (DCM/MeOH 50:1 \rightarrow 4:1) das Produkt **120** (128 mg, 171 μmol , 72%) als gelblichen Feststoff.

R_f (DCM/MeOH 4:1) = 0.12.

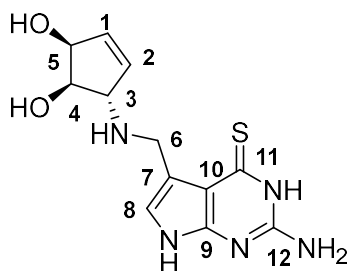
¹H-NMR (800 MHz, CDCl₃): δ = 7.36 (m, 6H, C15H), 7.21 (t, J = 7.6 Hz, 6H, C16H), 7.16 (t, J = 7.3 Hz, 3H, C17H), 6.48 (s, 1H, C8H), 6.12 (m, 2H, C1H, C2H), 4.74 (s, 1H, C5H), 4.56 (s, 1H, C4H), 4.24 (d, J = 13.0 Hz, 1H, C6Ha), 4.15 (m, 2H, C3H, C6Hb), 0.87 (s, 18H, SiC(CH₃)₃), 0.17 (SiCH₃), 0.12 (SiCH₃), 0.07 (SiCH₃), 0.06 (SiCH₃) ppm.

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃): δ = 181.4 (C11), 172.8 (C12), 149.2 (C9), 137.3 (C1), 129.3 (C2), 123.9 (C8), 111.8 (C10), 108.8 (C7), 73.5 (C4), 73.0 (C5), 66.4 (C3), 42.0 (C6), ppm.

HRMS (ESI⁺): Ber. für. C₄₃H₅₈O₃N₅Si₂ (M + H)⁺: 748.4073; Gefunden: 748.4088.

IR: 2929 (m), 2855 (m), 1612 (s), 1491 (m), 1447 (m), 1407 (m), 1253 (s), 1151 (s), 1088 (m), 895 (m), 835 (vs), 776 (vs), 740 (s), 689 (vs), 658 (m), 631 (m) cm⁻¹.

6-Thioqueuin 112



Geschütztes Queuin **120** (53.0 mg, 70.8 μmol , 1.00 Äq.) wurde in Toluol (2.5 mL) gelöst und Lawesons-Reagens **121** (86.0 mg, 213 μmol , 3.00 Äq.) wurde zugegeben. Die Lösung wurde für 3 h am Rückfluss erhitzt und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Anschließend wurde DCM (10 mL) zugegeben und die organische Phase mit gesättigter wässriger NaHCO_3 -Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und anschließend *in vacuo* vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde in EtOAc (3mL) gelöst und $\text{HF} \cdot \text{Pyridin}$ (47.0 μL , 1.06 mmol, 15.0 Äq.) wurde zugegeben. Die Reaktion wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde TMSOMe (292 μL , 221mg, 2.12 mmol, 30.0 Äq.) zugegeben und die Reaktion für 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* wurde der Rückstand in H_2O gelöst, filtriert und anschließend mittels präparativer HPL-Chromatographie (0-10% Puffer B in 45 min, $R_t = 22.9$ min) aufgereinigt. Das Produkt **112** (3.58 mg, 12.2 μmol , 17%) wurde als leicht gelblicher Schaum erhalten.

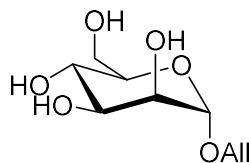
R_t (HPLC, 0-10% Puffer B, 45 min) = 22.9 min.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.14$ (s, 1H, C8H), 6.26 (m, 1H, C1H), 6.14 (m, 1H, C2H), 4.68 (m, 1H, C5H), 4.58 (d, $J = 13.3$ Hz, 1H, C6Ha), 4.48 (m, 2H, C4H, C6Hb), 4.30 (m, 1H, C3H) ppm.

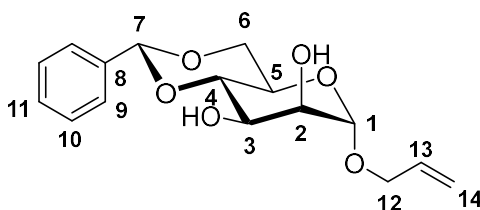
$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3): $\delta = 181.4$ (C11), 172.8 (C12), 149.2 (C9), 137.3 (C1), 129.3 (C2), 123.9 (C8), 111.8 (C10), 108.8 (C7), 73.5 (C4), 73.0 (C5), 66.4 (C3), 42.0 (C6), ppm.

HRMS (ESI⁺): Ber. für $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{O}_2\text{Si}$ (M + H)⁺: 294.1019; Gefunden: 294.1017.

5.2.3 Vorschriften für die stereoselektive Synthese von ManQ

1-O-Allyl- α -D-mannopyranose **124**

Synthesevorschrift und Analytik: Siehe Kapitel 7.2.

1-O-Allyl-4,6-O-benzyliden- α -D-mannopyranose **125**

1-O-Allyl- α -D-mannopyranose **124** (4.56 g, 20.7 mmol, 1.00 Äq.) wurde in MeCN (90 mL) gelöst und $\text{PhCH}(\text{OMe})_2$ (3.42 mL, 3.47 g, 22.8 mmol, 1.10 Äq.) und CSA (961 mg, 4.14 mmol, 20 mol%) wurden zugegeben. Die Reaktion wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit NEt_3 neutralisiert. Nach Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* und säulenchromatographischer Aufreinigung (*i*-Hexan/EtOAc 1:1) wurde das Produkt **125** (5.40 g, 17.5 mmol, 85%) als farbloser Feststoff erhalten.

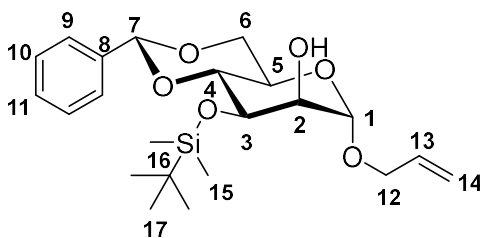
R_f (*i*-Hexan/EtOAc 1:1) = 0.2.

$^1\text{H-NMR}$ (800 MHz, d_6 -DMSO): δ = 7.50 (m, 2H, C10H), 7.34 (m, 3H, C9H, C11H), 5.96 (dddd, $J_1 = 17.2$ Hz, $J_2 = 10.4$ Hz, $J_3 = 6.0$ Hz, $J_4 = 5.1$ Hz, 1H, C13H), 5.60 (s, 1H, C7H), 5.32 (m, 1H, C14Ha), 5.21 (m, 1H, C14Hb), 4.83 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H, C1H), 4.21 (ddt, $J_1 = 13.0$ Hz, $J_2 = 5.2$ Hz, $J_3 = 1.6$ Hz, 1H, C12Ha), 4.19 (dd, $J_1 = 10.0$ Hz, $J_2 = 4.8$ Hz, 1H, C6Ha), 4.03 (ddt, $J_1 = 13.1$ Hz, $J_2 = 6.0$ Hz, $J_3 = 1.4$ Hz, 1H, C6Hb), 3.93 (m, 2H, C4H, C5H), 3.90 (m, 1H, C2H), 3.81 (t, $J = 10.2$ Hz, 1H, C6Hb), 3.75 (m, 1H, C3H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): δ = 139.3 (C8), 135.3 (C13), 129.9 (C11), 129.0 (C9), 127.5 (C10), 117.5 (C14), 103.4 (C7), 101.8 (C1), 80.2 (C5), 72.7 (C2), 69.8 (C6), 69.6 (C4), 69.2 (C12), 65.4 (C3) ppm.

HRMS (ESI $^+$): ber. für $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{O}_6\text{Na}$ ($M + \text{Na}$) $^+$: 331.1152; Gefunden: 331.1152.

IR: 3216 (br, m), 2904 (m), 1454 (m), 1378 (m), 1285 (m), 1132 (s), 1096 (s), 1068 (vs), 1028 (vs), 923 (s), 861 (s), 798 (s), 754 (s), 698 (vs), 667 (s), 639 (s), 510 (m) cm^{-1} .

1-O-Allyl-4,6-O-benzyliden-3-O-tert-butylidimethylsilyl- α -D-mannopyranose **126**

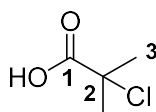
1-O-Allyl-4,6-O-benzyliden- α -mannopyranose **125** (3.77 g, 12.3 mmol, 1.00 Äq.) wurde in DCM (22.5 mL) und DMF (2.5 mL) gelöst. Anschließend wurden NEt_3 (1.85 mL, 1.37 g, 13.5 mmol, 1.10 Äq.) und TBSOTf (3.10 mL, 3.57 g, 13.5 mmol, 1.10 Äq.) zugegeben und die Reaktion wurde für 1.5 h bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gerührt. Im Anschluss wurde gesättigte wässrige NaHCO_3 -Lösung (50 mL) zugegeben und die Phasen wurden getrennt. Die wässrige Phase wurde mit DCM (2 x 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert, und das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung (*i*-Hexan \rightarrow *i*-Hexan/EtOAc 85:15) lieferte das Produkt **126** (3.67 g, 8.74 mmol, 71%) als farblosen Sirup.

$^1\text{H-NMR}$ (800 MHz, d_6 -DMSO): δ = 7.48 (m, 2H, C10H), 7.36 (m, 3H, C9H, C11H), 5.91 (m 1H, C12H), 5.55 (s, 1H, C7H), 5.31 (m, 1H, C14Ha), 5.23 (m, 1H, C14Hb), 4.95 (d, J = 1.4 Hz, 1H, C1H), 4.26 (m, 1H, C6Ha), 4.20 (m, 1H, C12Ha), 4.11 (m, 1H, C3H), 4.02 (m, 1H, C12Hb), 3.91 (dd, J_1 = 3.7 Hz, J_2 = 1.4 Hz, 1H, C2H), 3.84 (m, 3H, C3H, C4H, C6Hb), 0.88 (s, 9H, C17H), 0.11 (s, 3H, C15Ha/b), 0.06 (s, 3H, C15Ha/b) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): δ = 137.6 (C8), 133.7 (C13), 129.0 (C11), 128.2 (C9), 126.2 (C10), 118.0 (C14), 102.0 (C7), 99.0 (C1), 79.2 (C5), 72.1 (C2), 69.9 (C3), 69.0 (C6), 68.3 (C12), 63.3 (C4), 25.9 (C17), 18.2 (C16), -4.2 (C15a), -4.9 (C15b) ppm.

HRMS (ESI⁺): Ber. für $\text{C}_{22}\text{H}_{35}\text{O}_6\text{Si}$ ($\text{M} + \text{H}^+$): 423.2197; Gefunden: 423.2198.

IR: 2929 (m), 2857 (m), 1378 (m), 1253 (m), 1213 (s), 1119 (vs), 1098 (vs), 1072 (s), 1030 (vs), 977 (s), 920 (m), 859 (vs), 836 (vs), 800 (m), 780 (vs), 749 (s), 697 (vs), 670 (m) cm^{-1} .

2-Chlorisobuttersäure **127**

1,1,1-Trichloro-2-methyl-2-propanol hemihydrat (2.00 g, 10.7 mmol) wurde mit konz. H_2SO_4 (2.5 mL) vermischt und für 1 h gerührt. Dabei löste sich das Produkt nach und nach unter

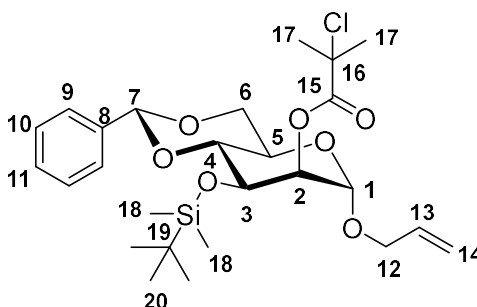
starker Gasentwicklung (HCl). Im Anschluss wurde die Reaktion auf Eis gegossen und die wässrige Phase mit Et₂O (3 x 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit wässriger Na₂CO₃-Lösung (50 mL) extrahiert. Die so resultierende wässrige Phase wurde mit Et₂O (3 x 50 mL) gewaschen und anschließend mit konz. HCl angesäuert (pH ≤ 1). Im Anschluss wurde mit Et₂O (3 x 50 mL) extrahiert. Die so erhaltenen organischen Phasen wurden vereinigt, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Das Produkt **127** (777 mg, 6.34 mmol, 59%) als farbloses Öl erhalten

¹H-NMR (800 MHz, d₆-DMSO): δ = 1.81 (s) ppm.

¹³C-NMR (200 MHz, d₆-DMSO): δ = 177.1 (C1), 66.0 (C2), 29.8 (C3) ppm.

IR: 2986 (m), 2914 (w), 2669 (w), 2562 (w), 1716 (vs), 1654 (m), 1559 (m), 1459 (s), 1418 (m), 1372 (m), 1289 (s), 1181 (s), 1121 (vs), 930 (s), 816 (m), 658 (s) cm⁻¹.

1-O-Allyl-4,6-O-benzyliden-3-O-*tert*-butyldimethylsilyl-2-(α-chloroisobutyryl)-α-D-mannopyranose **128**



126 (2.27 g, 5.37 mmol, 1.00 Äq.) und 2-Chlorisobuttersäure **127** (757 mg, 6.18 mmol, 1.15 Äq.) wurden in DCM (44 mL) gelöst und DIC (1.00 ml, 813 mg, 6.44 mmol, 1.20 Äq.) und DMAP (66.0 mg, 0.540 mmol, 10 mol%) wurden bei 0 °C zugegeben. Die Reaktion wurde für 6 h bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss wurde die entstandene Suspension über Celite filtriert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung (*i*-Hex/EtOAc 14:1) ergab das Produkt **128** (1.81 g, 3.43 mmol, 64%) als farblosen Sirup.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 7.49 (m, 2H, C10H), 7.36 (m, 3H, C9H, C11H), 5.92 (dddd, $J_1 = 16.9$ Hz, $J_2 = 10.3$ Hz, $J_3 = 6.2$ Hz, $J_4 = 5.2$ Hz, 1H, C13H), 5.59 (s, 1H, C7H), 5.32 (m, 1H, C14Ha), 5.25 (m, 1H, C14Hb), 5.20 (dd, $J_1 = 3.1$ Hz, $J_2 = 1.4$ Hz, 1H, C2H), 4.81 (d, , $J = 1.4$ Hz, 1H, C1H), 4.26 (m, 2H, C3H, C6Ha), 4.20 (ddt, $J_1 = 12.9$ Hz, $J_2 = 6.2$ Hz, $J_3 = 1.4$ Hz, 1H, C12Ha), 4.02 (ddt, $J_1 = 12.9$ Hz, $J_2 = 5.3$ Hz, $J_3 = 1.5$ Hz, 1H, C12Hb), 3.84 (m, 3H, C4H, C5H,

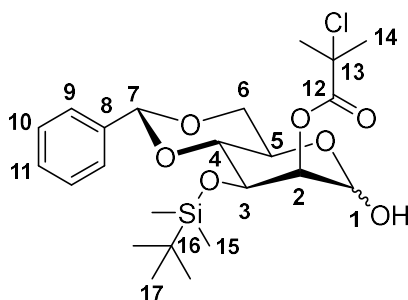
C6Hb), 1.84 (s, 3H, C17H), 1.82 (s, 3H, C17H), 0.83 (s, 9H, C20H), 0.06 (s, 3H, C18H), 0.02 (s, 3H, C18H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ = 170.9 (C15), 137.5 (C8), 133.4 (C13), 129.0 (C11), 128.2 (C9), 126.3 (C10), 118.3 (C14), 102.0 (C7), 97.7 (C1), 79.7 (C4), 74.0 (C2), 68.9 (C3), 68.6 (C12), 68.3 (C6), 64.7 (C16), 64.0 (C5), 30.1 (C17), 30.0 (C17), 25.8 (C20), 18.3 (C19), -4.5 (C18), -5.0 (C18) ppm.

HRMS (ESI⁺): ber. für $\text{C}_{26}\text{H}_{40}\text{O}_7\text{ClSi}$ ($\text{M} + \text{H}$)⁺: 527.2226; Gefunden: 527.2229.

IR: 3275 (m), 2976 (m), 2930 (m), 2229 (m), 1783 (vs), 1598 (s), 1569 (s), 1512 (m), 1479 (m), 1459 (m), 1434 (s), 1393 (s), 1367 (s), 1286 (vs), 1144 (vs), 1091 (vs), 1053 (s), 1036 (m), 923 (m), 881 (s), 849 (s), 828 (s), 783 (s), 754 (s), 709 (m), 660 (m), 615 (s), 536 (m) cm^{-1} .

4,6-O-Benzyliden-3-O-*tert*-butyldimethylsilyl-2-(α -chloroisobutyryl)-D-mannopyranose 129



128 (1.81 g, 3.43 mmol, 1.00 Äq.) wurde in einer Mischung aus EtOAc (23 mL), HOAc (50 mL) und H_2O (5 mL) gelöst und NaOAc (1.69 g, 20.6 mmol, 6.00 Äq.) und PdCl_2 (912 mg, 5.15 mmol, 1.50 Äq.) wurden zugegeben. Die Reaktion wurde für 18 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend über Celite filtriert. Nach Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* wurde der Rückstand in EtOAc (100 mL) und gesättigter wässriger NaHCO_3 -Lösung (100 mL) aufgenommen. Nach Trennung der Phasen wurde die wässrige Phase mit EtOAc (2 x 100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert, und *in vacuo* vom Lösungsmittel befreit. Säulenchromatographische Aufreinigung (*i*-Hexan/EtOAc 1:5) lieferte das Produkt **129** (1.34 g, 2.76 mmol, 80%, $\alpha/\beta \sim 9:1$) als gelblichen Schaum.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ = 7.48 (m, 2H, C9H), 7.36 (m, 3H, C10H, C11H), 5.59 (s, 1H, C7H), 5.23 (dd, $J_1 = 3.6$ Hz, $J_2 = 1.6$ Hz, 1H, C2H), 5.19 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H, C1H), 4.31 (dd, $J_1 = 9.6$ Hz, $J_2 = 3.6$ Hz, 1H, C3H), 4.25 (dd, $J_1 = 10.2$ Hz, $J_2 = 4.8$ Hz, 1H, C6Ha), 4.08 (m, 1H, C5H), 3.83 (m, 2H, C4H, C6Hb), 1.84 (s, 3H, C14H), 1.82 (s, 3H, C14H), 0.83 (s, 9H, C17H), 0.06 (s, 3H, C15H), 0.03 (s, 3H, C15H) ppm.

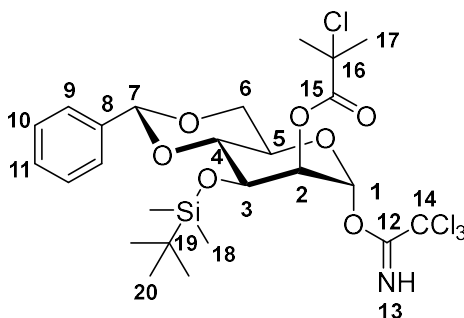
$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ = 170.9 (C12), 137.5 (C8), 129.1 (C11), 128.3 (C10), 126.3 (C9), 102.1 (C7), 93.5 (C1), 79.7 (C4), 74.2 (C2), 69.0 (C6), 67.9 (C3), 64.7 (C13), 64.1 (C5), 30.1 (C14), 30.0 (C14), 25.8 (C17), 18.3 (C16), -4.5 (C15), -5.0 (C15) ppm.

HRMS (ESI⁺): ber. für $\text{C}_{23}\text{H}_{34}\text{O}_6\text{ClSi}$ (M - OH)⁺: 469.1813; Gefunden: 469.1811.

IR: 2930 (m), 2857 (m), 1746 (s), 1462 (m), 1388 (s), 1253 (s), 1216 (vs), 1168 (vs), 1107 (s), 1088 (s), 1058 (s), 1028 (s), 1006 (s), 969 (m), 940 (m), 897 (m), 858 (vs), 836 (vs), 780 (vs), 749 (s), 697 (vs) cm^{-1} .

Anmerkung: β -Anomer wurde aufgrund des geringen Produktanteils nicht NMR-spektroskopisch zugewiesen, beide Produkte sind unter den verwendeten Aufreinigungsbedingungen kopolar und nicht auftrennbar.

4,6-O-Benzyliden-3-O-*tert*-butyldimethylsilyl-2-(α -chloroisobutyryl)-D-mannopyranosyl- α -trichloroacetimidat **130**



129 (1.35 g, 2.76 mmol, 1.00 Äq.) wurde in DCM (30 mL) gelöst und Trichloroacetonitril (2.77 mL, 3.98 g, 27.6 mmol, 10.0 Äq.) und DBU (82.0 μL , 83.7 mg, 550 μmol , 20 mol%) wurden bei 0 °C zugegeben. Die Reaktion wurde für 2 h bei 0 °C gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* wurde der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (*i*-Hexan/EtOAc 1:10). Das Produkt **130** (1.24 g, 1.96 mmol, 71%) wurde als farbloser Schaum erhalten.

Anmerkung: Eine leichte Gelbfärbung des Produkts deutet auf Verunreinigungen (vermutlich Pd oder DBU) hin, welche die Glykosylierung stark beeinträchtigen können. Zur Verwendung als Glykosyldonor ist daher oft eine mehrfache Aufreinigung erforderlich, bis das Produkt komplett farblos erscheint.

$^1\text{H-NMR}$ (800 MHz, d_6 -DMSO): δ = 8.75 (s, 1H, N13H), 7.50 (m, 2H, C10H), 7.36 (m, 3H, C9H, C11H), 6.22 (d, J = 1.8 Hz, 1H, C1H), 5.62 (s, 1H, C7H), 5.35 (dd, J_1 = 5.6 Hz, J_2 = 1.8 Hz, 1H, C2H), 4.36 (dd, J_1 = 9.6 Hz, J_2 = 3.6 Hz, 1H, C3H), 4.32 (dd, J_1 = 10.4 Hz, J_2 = 4.8 Hz, 1H, C6Ha), 4.02 (m, C5H), 3.84 (t, J = 9.6 Hz, 1H, C4H), 3.69 (t, J = 9.6 Hz, 1H, C6Hb), 1.86 (s,

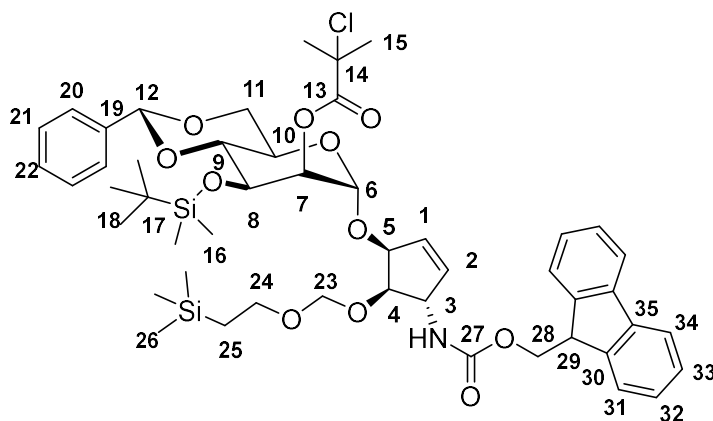
3H, C17H), 1.84 (s, 3H, C17H), 0.85 (s, 9H, C20H), 0.07 (s, 3H, C18H), 0.06 (s, 3H, C18H) ppm.

¹³C-NMR (200 MHz, d₆-DMSO): δ = 170.7 (C15), 160.2 (C12), 137.2 (C8), 129.1 (C11), 128.3 (C10), 126.2 (C9), 102.0 (C7), 95.5 (C1), 90.8 (C14), 78.9 (C4), 72.4 (C2), 68.6 (C6), 68.3 (C3), 66.7 (C5), 64.4 (C16), 30.1 (C17), 30.0 (C17), 25.8 (C20), 18.4 (C19), -4.7 (C18), -5.0 (C18) ppm.

HRMS (ESI⁺): ber. für C₂₃H₃₄O₆ClSi (M - C₂HCl₃NO)⁺: 469.1813; Gefunden: 469.1810.

IR: 3305 (m), 2930 (m), 2858 (m), 1749 (s), 1681 (s), 1472 (m), 1459 (m), 1387 (s), 1321 (m), 1272 (s), 1217 (m), 1167 (s), 1142 (vs), 1115 (vs), 1095 (vs), 1066 (vs), 1028 (s), 1017 (s), 986 (vs), 971 (vs), 938 (m), 923 (m), 913 (s), 897 (s), 859 (s), 836 (vs), 800 (vs), 780 (vs), 760 (vs), 700 (s); 668 (s) 648 (s), 592 (s), 570 (s), 529 (m), 504 (m) cm⁻¹.

(2R,4aR,6S,7S,8S,8aR)-6-(((1S,4S,5R)-4-(((9H-Fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-5-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methoxy)cyclopent-2-en-1-yl)oxy)-8-((tert-butylidimethylsilyl)oxy)-2-phenylhexahydropyrano[3,2-d][1,3]dioxin-7-yl 2-chloro-2-methylpropanoat **132**



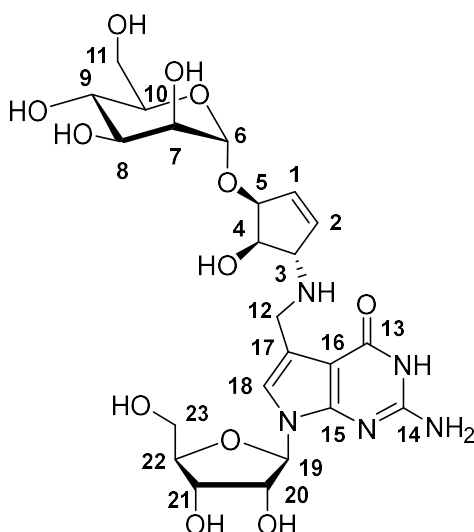
SEM-geschütztes Cyclopenten **131** (98.0 mg, 210 µmol, 1.00 Äq., Synthese vgl. Kapitel 7.2) und Glykosyldonor **130** (133 mg, 210 µmol, 1.00 Äq.) wurden in DCM (4 mL) gelöst und getrocknetes 3-Å-Molsieb (20 Gew.%) wurde zugegeben. Die Lösung wurde für 15 min bei 0 °C gerührt. Im Anschluss wurde eine bereits über 3Å-Molsieb vorgetrocknete und frisch hergestellte Lösung von TMSOTf in DCM (0.1 M, 210 µL, 21.0 µmol) zugegeben und die Reaktion wurde für 1 h bei 0 °C gerührt. Im Anschluss wurde die Reaktion für weitere 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde gesättigte wässrige NaHCO₃-Lösung (20 mL) zugegeben und die wässrige Phase wurde mit DCM (3 x 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung (*i*-Hexan/EtOAc 1:4) ergab das Produkt **132** (84.0 mg, 89.8 µmol, 43%) als farblosen Feststoff.

¹H-NMR (800 MHz, CDCl₃): δ = 7.76 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, C31H), 7.59 (m, 2H, C34H), 7.49 (m, 2H, C20H), 7.40 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, C32H), 7.36 (m, 3H, C21H, C22H), 7.31 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H, C33H), 6.09 (m, 1H, C2H), 6.05 (m, 1H, C1H), 5.58 (s, 1H, C12H), 5.14 (dd, *J*₁ = 3.6 Hz, *J*₂ = 1.7 Hz, 1H, C7H), 4.85 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H, C23Ha), 4.83 (m, 1H, C6H), 4.76 (m, 2H, C3H, C23Hb), 4.67 (s, 1H, C5H), 4.46 (t, *J* = 3.1 Hz, 1H, C28Ha), 4.37 (m, 1H, C28Hb), 4.24 (dd, *J*₁ = 9.6 Hz, *J*₂ = 3.5 Hz, 1H, C8H), 4.22 (m, 2H, C11Ha, C29H), 4.03 (m, 2H, C4H, C10H), 3.81 (m, 3H, C9H, C11Hb, C24Ha), 3.61 (m, 1H, C24Hb), 1.84 (s, 3H, C15H), 1.81 (s, 3H, C15H), 0.93 (m, 2H, C25H), 0.82 (s, 9H, C18H), 0.05 (s, 3H, C16H), 0.01 (s, 3H, C16H), -0.03 (s, 9H, C26H) ppm.

¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃): δ = 170.8 (C13), 156.1 (C27), 144.0 (C30), 141.5 (C35), 138.0 (C2), 137.6 (C19), 130.1 (C1), 128.2 (C21), 127.9 (C32), 127.2 (C33), 125.2 (C34), 120.1 (C31), 126.4 (C22), 126.4 (C20), 102.1 (C12), 97.2 (C6), 94.2 (C23), 80.4 (C4), 79.7 (C9), 77.6 (C5), 74.4 (C7), 69.0 (C11), 68.3 (C8), 67.0 (C28), 65.8 (C24), 64.7 (C11), 64.3 (C10), 60.2 (C3), 47.4 (C29), 30.1 (C15a), 30.0 (C15b), 25.8 (C26), 18.1 (C25), 1.17 (C17), -1.26 (C26), -4.45 (C16a), -4.93 (C16b) ppm.

HRMS (ESI⁺): ber. für C₄₉H₇₀ClN₂O₁₁Si₂ (M + NH₄)⁺: 953.4201; Gefunden: 953.4220.

Mannosyl-Queuosin 105



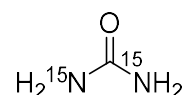
Das mannosylierte Cyclopenten **132** (40.0 mg, 42.7 μmol) wurde in 10% Dimethylamin in THF (5 mL) gelöst und für 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* wurde der Fmoc- und Chloroisobutyryl-entschützte Baustein **134** erhalten, welcher massenspektrometrisch nachgewiesen und anschließend ohne weitere Aufreinigung in MeOH (2 mL) gelöst wurde. Zu der Lösung wurde 2',3',5'-Tri-O-Benzyl-*N*²-*tert*-butoxycarbonyl-6-O-*tert*-butyl-7-formyl-7-deazaguanosin **133** (32.0 mg, 42.7 μmol , 1.00 Äq.) zugegeben und die Reaktion wurde für 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde bei 0 °C $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ (27.0 mg, 128 μmol , 3.00 Äq.) zugegeben und die Reaktion wurde für 1 h bei 0 °C gerührt. Im Anschluss wurde MeOH (10 mL) zugegeben und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde in DCM (3 mL) aufgenommen und bei 0 °C mit wasserfreiem FeCl_3 (100 mg, 0.616 mmol) versetzt. Die Reaktion wurde zunächst für 2 h bei 0 °C und anschließend über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* wurde der Rückstand in H_2O aufgenommen, filtriert und HPL-chromatographisch aufgereinigt (0-10% Puffer B, 45 min). α -allyl-ManQ **105** (3.65 mg, 1.22 μmol , 5% über 4 Stufen) wurde als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (800 MHz, D_2O): δ = 7.08 (s, 1H, C18H), 6.34 (m, 1H, C1H), 6.15 (m, 1H, C2H), 5.96 (d, J = 6.5 Hz, 1H, C19H), 4.97 (m, 1H, $^1J_{\text{C-H}}$ = 170.3 Hz, C6H), 4.72 (m, 1H, C5H), 4.58 (t, J = 6.0 Hz, 1H, C20H), 4.36 (t, J = 5.4 Hz, 1H, C4H), 4.32 (dd, J_1 = 5.4 Hz, J_2 = 3.4 Hz, 1H, C21H), 4.30 (d, J = 13.9 Hz, 1H, C12Ha), 4.25 (d, J = 13.8 Hz, 1H, C12Hb), 4.16 (m, 2H, C3H, C22H), 3.89 (m, 2H, C7H, C11Ha), 3.85 (dd, J_1 = 9.6 Hz, J_2 = 3.4 Hz, 1H, C8H), 3.82 (dd, J_1 = 12.6 Hz, J_2 = 3.3 Hz, 1H, C23Ha), 3.76 (m, 3H, C10H, C11Hb, C23Hb), 3.64 (t, J = 9.5 Hz, 1H, C9H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (200 MHz, D_2O): $\delta = 161.6$ (C13), 153.3 (C14), 152.2 (C15), 133.9 (C1), 132.4 (C2), 118.4 (C18), 111.7 (C17), 99.6 (C16), 97.9 (C6), 86.6 (C19), 84.7 (C22), 76.9 (C5), 74.3 (C4), 73.3 (C20), 73.0 (C10), 70.5 (C21), 70.3 (C8), 70.2 (C7), 66.7 (C9), 66.4 (C3), 61.5 (C23), 60.9 (C11), 42.2 (C12) ppm.

5.2.4 Vorschriften für die Synthese des $^{15}\text{N}_3$ -Deazaguanosin-Vorläufers

$^{15}\text{N}_2$ -Harnstoff **144**



^{15}N -Ammoniumchlorid (1.50 g, 27.5 mmol, 1.00 Äq., >99% ^{15}N) und NaOH (3.00 g, 75 mmol, 2.73 Äq.) wurden vermischt und anschließend mithilfe einer *Heatgun* für 20 min auf 650 °C geheizt, wobei die entstehenden Gase (H_2O und $^{15}\text{NH}_3$) in einen Empfängerkolben geleitet wurden. Der Empfängerkolben wurde auf -78 °C gekühlt, wodurch die übergeleiteten Gase einkondensiert wurden. Zu dem einkondensierten Ammoniak wurde Wasser (2.5 mL) und Diphenylcarbonat **143** (3.27 g, 15.4 mmol, 0.560 Äq.) gegeben und die Reaktion in einem Druckkolben verschlossen. Anschließend wurde die Reaktion für 4 h bei 115 °C gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Reaktion mit Wasser (30 mL) verdünnt und anschließend mit Et_2O (3 x 30 mL) extrahiert. Die wässrige Phase wurde anschließend *in vacuo* vom Lösungsmittel befreit. Das Produkt **144** (653 mg, 10.9 mmol, 71%) wurde als farbloser Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (800 MHz, d_6 -DMSO): $\delta = 5.40$ (d, $J = 88.4$ Hz) ppm.

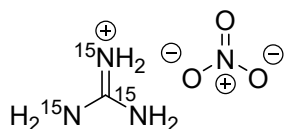
$^{13}\text{C-NMR}$ (200 MHz, d_6 -DMSO): $\delta = 159.5$ ppm.

$^{15}\text{N-NMR}$ (81 MHz, d_6 -DMSO): $\delta = -303.9$ ppm.

HRMS (EI): ber. für $\text{CH}_4^{15}\text{N}_2$: 62.0264; Gefunden: 62.0260.

IR: 3416 (s), 3325 (s), 1670 (s), 1588 (vs), 1456 (vs), 1144 (s), 786 (w), 706 (br, w), 414 (br, vs) cm^{-1} .

$^{15}\text{N}_3$ -Guanidinium Nitrat **145**



$^{15}\text{N}_2$ -Harnstoff **144** (653 mg, 10.5 mmol, 1.00 Äq.) wurde mit $^{15}\text{NH}_4\text{NO}_3$ (1.19 g, 14.7 mmol, 1.40 Äq.) und Silica (415 mg, vorgetrocknet durch Heizen auf 120 °C über Nacht) vermischt und die Reaktion wurde für 3 h bei 190 °C erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde

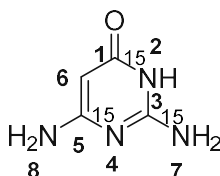
der Feststoff in Wasser (50 mL) aufgenommen und filtriert. Nach Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* wurde das Produkt **145** (446 mg, 3.57 mmol, 34%, ber. aus NMR) im Gemisch mit verbleibendem $^{15}\text{NH}_4\text{NO}_3$ erhalten und ohne weitere Aufreinigung in der nächsten Stufe eingesetzt.

$^1\text{H-NMR}$ (800 MHz, d_6 -DMSO): $\delta = 6.90$ (d, $J = 99.8$ Hz) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (200 MHz, d_6 -DMSO): $\delta = 159.7$ ppm.

$^{15}\text{N-NMR}$ (81 MHz, d_6 -DMSO): $\delta = -257.7$ ppm.

$^{15}\text{N}_3$ -2,6-Diamino-4-pyrimidinon **146**



$^{15}\text{N}_3$ -Guanidiniumnitrat **145** (122mg, 0.976 mmol, 1.00 Äq.) wurde in MeOH (10 mL) gelöst und Cyanoethylacetat (90.0 μL , 0.976 mmol, 1.00 Äq.) und NaOMe (530 mg, 9.76 mmol, 10.0 Äq.) wurden zugegeben. Die Reaktion wurde für 10 h am Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde das Gemisch filtriert und das Filtrat *in vacuo* vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde in H_2O (2 mL) aufgenommen und mit AcOH auf pH 7 eingestellt. HPL-chromatographische Aufreinigung (0-16% MeCN, 45 min, $R_t = 5.6$ min) lieferte das Produkt **146** (105 mg, 0.810 mmol, 83%) als farblosen Feststoff.

R_t (HPLC, 0-16% MeCN, 45 min) = 5.6 min.

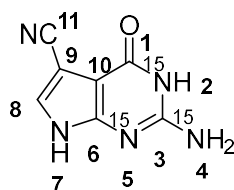
$^1\text{H-NMR}$ (800 MHz, d_6 -DMSO): $\delta = 9.62$ (d, $J = 77.1$ Hz, 1H, N2H), 6.10 (d, $J = 89.1$ Hz, 2H, N7H), 5.89 (s, 2H, N8H), 4.44 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H, C6H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (200 MHz, d_6 -DMSO): $\delta = 172.0$ (C1), 165.4 (C3), 162.9 (C5), 76.4 (C6) ppm.

$^{15}\text{N-NMR}$ (81 MHz, d_6 -DMSO): $\delta = -200.9$ (N2), -239.7 (N4), -307.5 (N7) ppm.

HRMS (ESI $^+$): ber. für $\text{CH}_7^{15}\text{N}_3\text{NO}$ ($\text{M}^+ \text{H}^+$): 130.0525 Gefunden: 130.0525.

IR: 3335 (m), 3226 (m), 3164 (m), 2909 (m), 2829 (m), 2717 (w), 1604 (vs), 1489 (s), 1460 (s), 1367 (vs), 1293 (vs), 1245 (s), 1017 (m), 959 (m), 773 (vs), 650 (s), 608 (s), 535 (s) cm^{-1} .

$^{15}\text{N}_3$ -7-Cyano-7-deazaguanin 147

146 (96.0 mg, 0.740 mmol, 1.00 Äq.) und das Natriumenolat von Chloroformylacetonitril **148** (230 mg, 1.85 mmol, 2.00 Äq.) sowie NaOAc (63.0 mg, 1.56 mmol, 2.10 Äq.) wurden in H_2O (3.1 mL) gelöst und AcOH (119 μL) wurde zugegeben. Die Reaktion wurde für 20 h bei 50 °C erwärmt und anschließend für 1 h zum Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der ausgefallene Feststoff abfiltriert und mit H_2O und Aceton gewaschen. Das Produkt **147** (122 mg, 0.685 mmol, 93%) wurde als dunkelgrauer Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (800 MHz, d_6 -DMSO): δ = 11.95 (s, 1H, N7H), 10.67 (d, J = 89.2 Hz, 1H, N2H), 7.59 (s, 1H, C8H), 6.35 (d, J = 89.3 Hz, 2H, N4H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (200 MHz, d_6 -DMSO): δ = 158.0 (d, J = 11.6 Hz, C1), 154.1 (ddd, J_1 = 22.9 Hz, J_2 = 13.2 Hz, J_3 = 7.3 Hz, C3), 152.1 (m, C6), 128.2 (s, C8), 116.3 (s, C11), 99.2 (dd, J_1 = 7.0 Hz, J_2 = 2.0 Hz, C10), 86.0 (d, J = 1.1 Hz, C9) ppm.

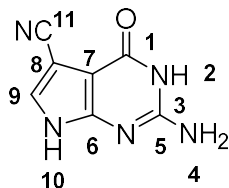
$^{15}\text{N-NMR}$ (81 MHz, d_6 -DMSO): δ = -210.1 (N3), -235.1 (N2), -307.8 (N4) ppm.

HRMS (ESI⁺): ber. für $\text{C}_7\text{H}_6^{15}\text{N}_3\text{N}_2\text{O}$ (M + H)⁺: 179.0477; Gefunden: 179.0477.

IR: 3416 (s), 3325 (s), 1670 (s), 1588 (vs), 1456 (vs), 1144 (s), 786 (w), 706 (br, w), 414 (br, vs) cm^{-1} .

5.2.5 Vorschriften für die Synthese der Regioisomeren GluQ-Derivate

7-Cyano-7-deazaguanin 45^[210]



Methylformiat (12.0 mL, 194 mmol, 1.00 Äq.) in Toluol (5 mL) wurde bei 0 °C zu einer gerührten Suspension von NaOMe (9.53 g, 176 mmol, 0.910 Äq.) in Toluol (100 mL) gegeben. Anschließend wurde Chloroacetonitril (11.2 mL, 176 mmol, 0.910 Äq.) in Toluol (30 mL) tropfenweise über 1 h zugegeben. Die Reaktion wurde für 3 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit H_2O (100 mL) versetzt. Nach Trennung der Phasen wurde die wässrige Phase mit HCl (6 M) auf pH 5 eingestellt und anschließend mit EtOAc (3 x 100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet, vom Trockenmittel

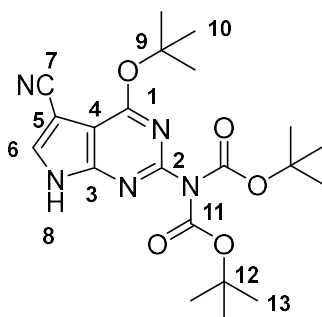
abfiltriert und das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Der dunkle Rückstand wurde in H₂O (40 mL) suspendiert und zu einer Lösung von NaOAc (10.9 g, 134 mmol, 0.690 Äq.) und 2,4-Diamino-6-hydroxypyrimidin (8.00 g, 64.0 mmol, 0.330 Äq.), welche zuvor unter Rühren auf 100 °C bis zur vollständigen Auflösung der Edukte erhitzt wurde, gegeben. Die Reaktion wurde für 16 h am Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der erhaltene Feststoff abfiltriert und mit H₂O (20 mL), Aceton (20 mL) und Et₂O (40 mL) gewaschen. Nach Trocknung des Feststoffs am Hochvakuum wurde die Verbindung **45** (6.74 g, 38.5 mmol, 61%) als dunkler Feststoff erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d⁶) δ = 11.97 (s, 1H, N10H), 10.70 (s, 1H, N2H), 7.60 (s, 1H, C9H), 6.37 (s, 2H, N4H) ppm.

¹³C-NMR (101 MHz, DMSO) δ 157.6 (C1), 153.8 (C3), 151.7 (C6), 127.8 (C9), 115.9 (C11), 98.7 (C7), 85.5 (C8) ppm.

HRMS (ESI+) m/z ber. für: C₇H₆N₅O (M+ H)⁺ : 176.0572; Gefunden: 176.0568

N²-Bis-tert-butoxycarbonyl-6-O-tert-butyl-7-cyano-7-deazaguanin **152** ^[189]



Verbindung **45** (6.74 g, 38.5 mmol, 1.00 Äq.) wurde in THF (70 mL) suspendiert und Boc₂O (75.6 g, 346 mmol, 9.00 Äq.) und DMAP (235 mg, 1.92 mmol, 4 mol%) wurden zugegeben. Die Reaktion wurde über Nacht bei 50 °C gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand in DCM (200 mL) aufgenommen und mit ges. wässr. NaHCO₃-Lösung (100 mL) und ges. wässr. NaCl-Lösung (100 mL) gewaschen. Nachdem die organische Phase über MgSO₄ getrocknet wurde, wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand in MeOH (60 mL) und ges. wässr. NaHCO₃-Lösung (20 mL) gelöst. Das Reaktionsgemisch wurde 1 h lang refluxiert, bevor das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt wurde. Der Rückstand wurde erneut in DCM (200 mL) gelöst und mit H₂O (100 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung (*i*-Hexan/EtOAc 2:1) ergab die Verbindung **152** (10.6 g, 24.6 mmol, 64%) als braun-gelben Feststoff.

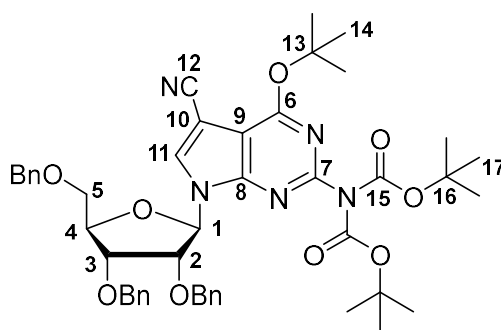
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 10.85 (s, 1H, NH), 7.68 (d, 3 J = 2.6 Hz, 1H, C6H), 1.71 (s, 9H, C10H), 1.49 (s, 18H, C13H) ppm.

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ = 163.6 (C6), 156.2 (C1), 149.3 (C2), 148.2 (C3), 147.0 (C11), 127.3 (C8), 110.5 (C10), 93.6 (C5), 88.6 (C7), 85.2 (C12), 84.0 (C18), 28.2 (C13), 28.0 (C13'), 27.9 (C19), 27.7 (C19') ppm.

HRMS (ESI⁺): ber. für: C₂₁H₃₀N₅O₅ (M + H)⁺: 432.2247; Gefunden: 432.2250.

IR: 3235 (w), 2977 (w), 2935 (w), 2228 (w), 1786 (s), 1601 (m), 1576 (m), 1369 (s), 1298 (s), 1155 (s), 1111 (s), 849 (s), 790 (m), 754 (m) cm⁻¹.

2',3',5'-Tri-O-benzyl-N²-bis-tert-butoxycarbonyl-6-O-tert-butyl-7-cyano-7-deaza-guanosin **156**



2,3,5-Tri-O-Benzylribose (500 mg, 1.19 mmol, 2.00 Äq.) wurde in Toluol (2.5 mL) gelöst und die Lösung wurde auf -20 °C gekühlt. CCl₄ (138.4 µL, 220 mg, 1.43 mmol, 2.40 Äq.) und Tris-(dimethylamino)-phosphin (248.2 µL, 223.4 mg, 1.37 mmol, 2.30 Äq.) wurden zugegeben und die Reaktion 1 h bei -20 °C gerührt. Anschließend wurden gesättigte wässrige NaCl-Lösung (5 mL) und DCM (10 mL) zugegeben und die Phasen getrennt. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt um Verbindung **155** zu erhalten. Boc-geschütztes Guanin **152** (257 mg, 0.600 mmol, 1.00 Äq.) wurde in MeCN (2.5 mL) gelöst und NaH (30 mg, 0.75 mmol, 1.25 Äq., 60 % Dispersion auf Mineralöl) wurde bei 0 °C zugegeben. Die Reaktion wurde 1 h lang bei 0 °C gerührt, bevor die chlorierte Ribose **155** als Lösung in MeCN (5 mL) bei 0 °C zugegeben wurde. Die Reaktion wurde auf Raumtemperatur erwärmt und 24 h lang gerührt. Nach Verdampfen des Lösungsmittels ergab die säulenchromatographische Aufreinigung (*i*-Hexan/EtOAc 5:1) das gewünschte β-Nukleosid **156** (308 mg, 62 %) als farblosen Sirup.

R_f (*i*-Hexan/EtOAc 6:1): R_f = 0.14.

¹H-NMR (800 MHz, CDCl₃) δ = 7.95 (s, 1H, C11H), 7.29 (m, 12H, arom. CH), 6.40 (d, J = 2.4 Hz, 1H, C1H), 4.75 (d, J = 12.1 Hz, 1H, OCH₂Ph), 4.67 (d, J = 12.1 Hz, 1H, OCH₂Ph), 4.60 (d, J = 11.4 Hz, 1H, OCH₂Ph), 4.50 (d, J = 11.3 Hz, 1H, OCH₂Ph), 4.48 (d, J = 11.8 Hz, 1H, OCH₂Ph), 4.38 (dt, d, J₁ = 6.3 Hz, J₂ = 2.3 Hz, 1H, C4H), 4.32 (d, J = 11.8 Hz, 1H, OCH₂Ph),

4.13 (m, 2H, C2H, C3H), 3.91 (dd, $J_1 = 10.9$ Hz, $J_2 = 2.3$ Hz, 1H, C5Ha), 3.65 (dd, $J_1 = 10.9$ Hz, $J_2 = 2.3$ Hz, 1H, C5Hb), 1.69 (s, 9H, C14H), 1.43 (s, 18H, C17H) ppm.

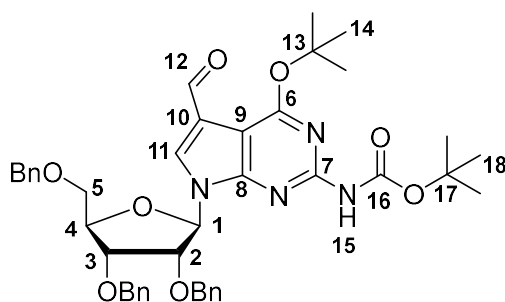
$^{13}\text{C-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) $\delta = 163.1$ (C6), 152.2 (C8), 151.3 (C7), 151.2 (C15), 137.5 (arom. C), 137.3 (arom. C), 137.2 (arom. C), 131.8 (C11), 129.0 (arom. C), 128.6 (arom. C), 128.5 (arom. C), 128.5 (arom. C), 128.4 (arom. C), 128.2 (arom. C), 128.1 (arom. C), 128.1 (arom. C), 127.9 (arom. C), 114.4 (C12), 104.7 (C10), 87.7 (C1), 86.5 (C9), 85.5 (C13), 84.2 (C16), 81.7 (C4), 80.2 (C2), 75.3 (C3), 73.9 (OCH_2Ph), 72.4 (OCH_2Ph), 72.3 (OCH_2Ph), 68.5 (C5), 28.4 (C14), 28.0 (C17) ppm.

HRMS (ESI+) m/z ber. für: $\text{C}_{47}\text{H}_{56}\text{N}_5\text{O}_9$ ($M + H$) $^+$: 834.4073; Gefunden: 834.4084

IR: 2980 (vs), 2932 (vs), 1735 (s), 1597 (s), 1574 (m), 1528 (vs), 1497 (vs), 1394 (s), 1368 (m), 1295 (m), 1255 (m), 1209 (s), 1150 (w), 1115 (vw), 1052 (m), 915 (s), 849 (m), 793 (s), 736 (m), 697 (w), 617 (s), cm^{-1} .

2',3',5'-Tri-O-benzyl-*N*²-tert-butoxycarbonyl-6-O-tert-butyl-7-formyl-7-deazaguanosin

133



156 (772 mg, 0.930 mmol, 1.00 Äq.) wurde in DCM (20 mL) gelöst und auf -78 °C gekühlt. DIBAL-H (1 M in Hexan, 3.70 mL, 3.70 mmol, 4.00 Äq) wurde zugegeben und die Lösung wurde für 3 h bei -78 °C gerührt. Die Reaktion wurde mit DCM verdünnt und anschließend wurde eine gesättigte wässrige Lösung von Rochelle-Salz (400 mL) zugegeben. Nach Trennung der Phasen wurde die wässrige Phase mit DCM (3 x 150 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet, vom Trockenmittel abfiltriert und das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung (*i*-Hexan/EtOAc 3:1) lieferte das Produkt **133** (480 mg, 0.650 mmol, 70%) als farblosen Schaum.

R_f (*i*-Hexan/EtOAc 3:1): $R_f = 0.39$.

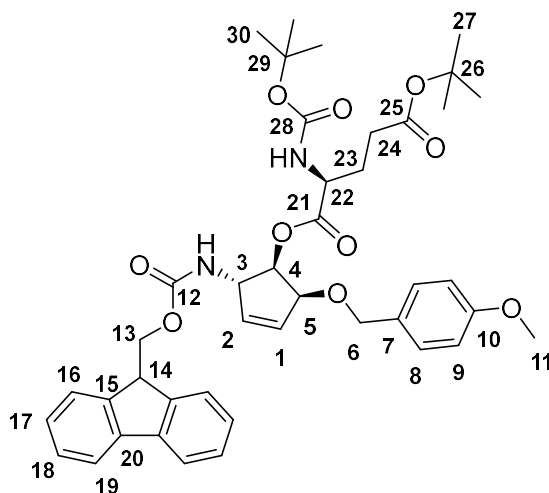
$^1\text{H-NMR}$ (800 MHz, CDCl_3) $\delta = 9.92$ (s, 1H, C12H), 8.04 (s, 1H, C11H), 7.28 (m, 12H, arom. CH), 7.10 (s, 1H, N15H), 6.35 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, C1H), 4.88 (s, 2H, OCH_2Ph), 4.64 (d, $J = 11.8$ Hz, 1H, OCH_2Ph), 4.52 (m, 2H, OCH_2Ph), 4.41 (dt, $J_1 = 7.1$ Hz, $J_2 = 3.0$ Hz, 1H, C4H), 4.39 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H, OCH_2Ph), 4.30 (dd, $J_1 = 4.9$ Hz, $J_2 = 2.5$ Hz, 1H, C2H), 4.26 (dd, J_1

= 7.1 Hz, $J_2 = 4.9$ Hz, 1H, C3H), 3.90 (dd, $J_1 = 10.9$ Hz, $J_2 = 2.8$ Hz, 1H, C5Ha), 3.69 (dd, $J_1 = 10.9$ Hz, $J_2 = 3.3$ Hz, 1H, C5Hb), 1.72 (s, 9H, C14H), 1.52 (s, 9H, C18H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) $\delta = 185.8$ (C12), 163.6 (C6), 153.1 (C8), 152.1 (C7), 150.2 (C16), 138.0 (arom. C), 137.8 (arom. C), 137.8 (arom. C), 128.7 (arom. C), 128.6 (arom. C), 128.5 (arom. C), 128.4 (arom. C), 128.3 (C11), 128.2 (arom. C), 128.0 (arom. C), 128.0 (arom. C), 127.9 (arom. C), 127.9 (arom. C), 117.1 (C10), 101.5 (C9), 88.4 (C1), 83.4 (C13), 81.5 (C4), 81.0 (C17), 79.8 (C2), 75.5 (C3), 68.5 (C5), 73.7 (OCH_2Ph), 72.4 (OCH_2Ph), 72.1 (OCH_2Ph), 28.7 (C14), 28.4 (C18) ppm.

HRMS (ESI+) m/z ber. für: $\text{C}_{42}\text{H}_{49}\text{N}_4\text{O}_8$ (M + H) $^+$: 737.3545; Gefunden: 737.3559

1-((1R,2S,5S)-2-(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-5-((4-methoxybenzyl)-oxy)cyclopent-3-en-1-yl) 5-(tert-butyl) (tert-butoxycarbonyl)-L-glutamat 159



157 (100 mg, 219 μmol , 1.00 Äq). und N-Boc-L-glutamat- γ -tert-butylester **13** (199 mg, 656 μmol , 3.00 Äq.) wurden in einer Mischung aus DMF (4 mL) und Pyridin (2 mL) gelöst. Anschließend wurden EDC \cdot HCl (126 mg, 656 μmol , 3.00 Äq.) und DMAP (2.70 mg, 21.9 μmol , 10 mol%) zugegeben und die Reaktion über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach Abschluss der Reaktion wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand in DCM (30 mL) aufgenommen und mit wässriger HCl (2 M, 2 x 30 mL) und gesättigter wässriger NaHCO_3 -Lösung (30 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung (Hexan/EtOAc 3:1) ergab das Produkt **159** (127 mg, 171 μmol , 78%) als farblosen Sirup.

R_f (*i*-Hex/EtOAc 3:1) = 0.2.

$^1\text{H-NMR}$ (800 MHz, Aceton- d_6): $\delta = 7.85$ (d, $J = 7.6$ Hz, 2H, C16H), 7.69 (m, 2H, C19H), 7.41 (tt, $J_1 = 7.5$ Hz, $J_2 = 0.8$ Hz, 2H, C17H), 7.32 (m, 2H, C18H), 7.29 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, C8H), 6.89 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, C9H), 6.80 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, NH), 6.21 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, NH), 6.02

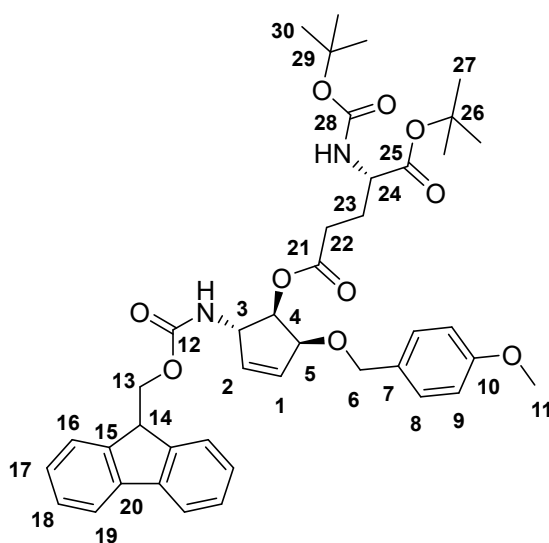
(m, 1H, C1H), 5.97 (m, 1H, C2H), 5.05 (m, 1H, C4H), 4.91 (m, 1H, C3H), 4.61 (m, 1H, C5H), 4.54 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H, C6Ha), 4.44 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H, C6Hb), 4.34 (m, 3H, C13H, C22H), 4.22 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H, C14H), 3.78 (s, 3H, C11H), 2.37 (m, 2H, C24H), 2.16 (m, 1H, C23Ha), 1.91 (m, 1H, C23Hb), 1.40 (s, 18H, C27H, C30H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (200 MHz, Aceton- d_6): $\delta = 173.1$ (C21), 172.6 (C25), 160.2 (C10), 157.0 (C28), 156.5 (C12), 145.3 (C20), 145.1 (C15), 136.4 (C2), 132.6 (C1), 131.8 (C7), 130.3 (C8), 128.6 (C17), 128.0 (C18), 126.2 (C19), 120.9 (C16), 114.5 (C9), 80.6 (2C, C26, C29), 79.4 (C4), 79.3 (C5), 72.1 (C6), 67.1 (C13), 60.6 (C3), 55.5 (C11), 54.1 (C22), 48.1 (C14), 32.3 (C24), 28.7 (C30), 28.3 (C27), 27.9 (C23) ppm.

HRMS (ESI $^+$): ber. für $\text{C}_{42}\text{H}_{54}\text{N}_3\text{O}_{13}$ ($\text{M} + \text{NH}_4^+$): 760.3804; Gefunden: 760.3803.

IR (ATR): 3339 (m), 2929 (m), 1726 (s), 1687 (vs), 1612 (m), 1537 (s), 1513 (vs), 1450 (s), 1389 (m), 1365 (s), 1321 (s), 1299 (m), 1280 (vs), 1206 (s), 1167 (vs), 1105 (m), 1082 (s), 1034 (s), 979 (m), 899 (m), 850 (m), 819 (s), 778 (m), 758 (vs), 734 (vs), 704 (m) cm^{-1} .

5-((1*R*,2*S*,5*S*)-2-(((9*H*-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-5-((4-methoxybenzyl)-oxy)cyclopent-3-en-1-yl) 1-(*tert*-butyl) (*tert*-butoxycarbonyl)-L-glutamat **168**



157 (100 mg, 219 μmol , 1.00 Äq.) und N-Boc-L-glutamat- α -*tert*-butylester (199 mg, 656 μmol , 3.00 Äq.) wurden in einer Mischung aus DMF (4 mL) und Pyridin (2 mL) gelöst. Anschließend wurden EDC \cdot HCl (126 mg, 656 μmol , 3.00 Äq.) und DMAP (2.70 mg, 21.9 μmol , 10 mol%) zugegeben und die Reaktion über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach Abschluss der Reaktion wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand in DCM (30 mL) aufgenommen und mit wässriger HCl (2 M, 2 x 30 mL) und gesättigter wässriger NaHCO_3 -Lösung (30 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung (Hexan/EtOAc 3:1) ergab das Produkt **168** (64.0 mg, 86.2 μmol , 39%) als farblosen Sirup.

R_f (*i*-Hex/EtOAc 3:1) = 0.2.

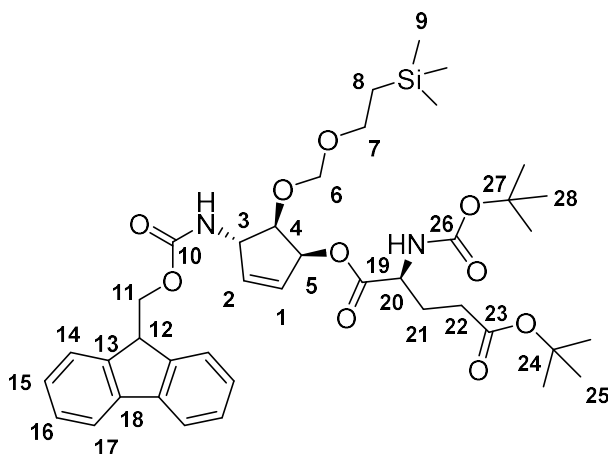
$^1\text{H-NMR}$ (800 MHz, Aceton- d_6): δ = 7.86 (dt, $J_1 = 7.5$ Hz, $J_2 = 0.9$ Hz, 2H, C16H), 7.69 (m, 2H, C19H), 7.41 (tt, $J_1 = 7.5$ Hz, $J_2 = 0.9$ Hz ppm, 2H, C17H), 7.32 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, C18H), 7.25 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, C8H), 6.90 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, C9H), 6.78 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, NH), 6.16 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, NH), 6.03 (m, 1H, C1H), 5.95 (m, 1H, C2H), 5.04 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H, C4H), 4.88 (t, $J = 7.1$ Hz, 1H, C3H), 4.64 (m, 1H, C5H), 4.47 (d, $J = 11.3$ Hz, 1H, C6Ha), 4.43 (d, $J = 11.3$ Hz, 1H, C6Hb), 4.35 (m, 2H, C13H), 4.22 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H, C14H), 4.09 (m, 1H, C24H), 3.79 (s, 3H, C11H), 2.49 (m, 2H, C22H), 2.12 (m, 1H, C23Ha), 1.97 (m, 1H, C23Hb), 1.43 (s, 9H, C27H), 1.39 (s, 9H, C30H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (200 MHz, Aceton- d_6): δ = 173.2 (C21), 172.3 (C28), 160.3 (C10), 157.0 (C12), 156.6 (C25), 145.3 (C15), 145.2 (C20), 136.4 (C2), 132.7 (C1), 131.9 (C7), 130.2 (C8), 128.6 (C18), 128.0 (C17), 126.2 (C19), 120.9 (C16), 114.6 (C9), 81.7 (C26), 79.8 (C5), 78.8 (C4), 78.3 (C29), 72.1 (C6), 67.1 (C13), 60.4 (C3), 55.6 (C11), 54.8 (C24), 48.2 (C14), 31.2 (C22), 28.7 (C30), 28.3 (C26), 27.9 (C23) ppm.

HRMS (ESI $^+$): ber. für $\text{C}_{42}\text{H}_{51}\text{N}_2\text{O}_{13}$ ($M + H^+$): 743.3538; Gefunden: 743.3533.

IR (ATR): 3340 (m), 2982 (w), 2934 (w), 1792 (w), 1729 (s), 1682 (vs), 1613 (m), 1586 (w), 1538 (s), 1512 (vs), 1449 (m), 1390 (m), 1367 (s), 1343 (m), 1320 (s), 1298 (s), 1281 (s), 1244 (vs), 1195 (s), 1178 (vs), 1104 (m), 1084 (vs), 1048 (s), 1026 (s), 981 (m), 963 (m), 918 (w), 897 (w), 865 (w), 852 (m), 820 (m), 789 (w), 778 (m), 758 (vs), 735 (vs), 704 (w), 658 (m) cm^{-1} .

1-((1*S*,4*S*,5*R*)-4-(((9*H*-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-5-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methoxy)cyclopent-2-en-1-yl) 5-(*tert*-butyl) (*tert*-butoxycarbonyl)-L-glutamat 162



131 (54.0 mg, 116 μmol , 1.00 Äq.) und N-Boc-L-glutamat- γ -*tert*-butylester (105 mg, 347 μmol , 3.00 Äq.) wurden in einer Mischung aus DMF (2 mL) und Pyridin (1 mL) gelöst. Anschließend wurden EDC \cdot HCl (66.4 mg, 347 μmol , 3.00 Äq.) und DMAP (1.40 mg, 11.5 μmol , 10 mol%) zugegeben und die Reaktion über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach Abschluss der

Reaktion wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand in DCM (30 mL) aufgenommen und mit wässriger HCl (2 M, 2 x 30 mL) und gesättigter wässriger NaHCO₃-Lösung (30 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung (Hexan/EtOAc 3:1) ergab das Produkt **162** (67,0 mg, 89,0 μmol, 77%) als farblosen Sirup.

R_f (*i*-Hex/EtOAc 3:1) = 0.3.

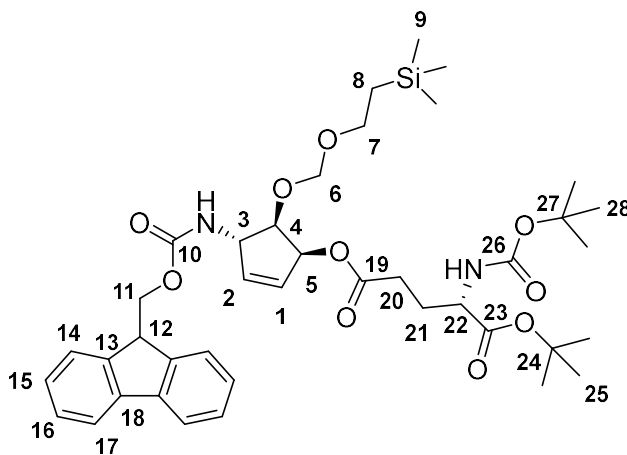
¹H-NMR (800 MHz, Aceton-d⁶): δ = 7.87 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, C14H), 7.70 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, C17H), 7.42 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, C15H), 7.33 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, C16H), 6.81 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, NH), 6.18 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, NH), 6.08 (m, 1H, C2H), 5.95 (m, 1H, C1H), 5.72 (m, 1H, C5H), 4.80 (m, 1H, C3H), 4.68 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H, C6Ha), 4.63 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H, C6Hb), 4.32 (dd, *J*₁ = 10.7 Hz, *J*₂ = 7.4 Hz, 1H, C11Ha), 4.33 (dd, *J*₁ = 10.6 Hz, *J*₂ = 7.1 Hz, 1H, C11Hb), 4.23 (m, 3H, C4H, C12H, C20H), 3.70 (td, *J*₁ = 9.9 Hz, *J*₂ = 6.3 Hz, 1H, C7Ha), 3.57 (td, *J*₁ = 9.9 Hz, *J*₂ = 6.7 Hz, 1H, C7Hb), 2.41 (m, 2H, C22H), 2.14 (m, 1H, C21Ha), 1.91 (m, 1H, C21Hb), 1.44 (s, 9H, C25H), 1.41 (s, 9H, C28H), 0.89 (m, 2H, C8H), -0.02 (s, 9H, C9H) ppm.

¹³C-NMR (200 MHz, Aceton-d⁶): δ = 173.1 (C19), 172.7 (C23), 157.0 (C26), 156.5 (C10), 145.3 (C13), 145.2 (C18), 140.5 (C2), 129.6 (C1), 128.7 (C15), 128.0 (C16), 126.2 (C17), 121.0 (C14), 94.9 (C6), 80.6 (C24), 80.3 (C4), 79.4 (C27), 75.7 (C5), 67.2 (C11), 65.9 (C7), 61.3 (C3), 54.2 (C20), 48.2 (C12), 32.2 (C22), 28.7 (C28), 28.4 (C25), 28.2 (C21), 18.6 (C8), -1.08 (C9) ppm.

HRMS (ESI⁺): ber. für C₄₀H₆₀N₃O₁₀Si (M + H⁺): 770.4042; Gefunden: 770.4038.

IR (ATR): 3306 (m), 2979 (m), 2359 (vw), 1792 (w), 1729 (vs), 1688 (vs), 1613 (w), 1526 (s), 1479 (m), 1451 (m), 1417 (w), 1391 (m), 1366 (s), 1347 (m), 1322 (m), 1272 (s), 1246 (vs), 1222 (s), 1208 (s), 1156 (vs), 1122 (s), 1106 (s), 1067 (s), 1046 (vs), 1009 (s), 982 (m), 966 (m), 915 (w), 894 (w), 834 (s), 777 (m), 757 (s), 732 (vs), 660 (m) cm⁻¹.

5-((1S,4S,5R)-4-(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-5-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)-methoxy)cyclopent-2-en-1-yl) 1-(tert-butyl) (tert-butoxycarbonyl)-L-glutamat
171



131 (46.0 mg, 98.4 μmol , 1.00 Äq.) und N-Boc-L-glutamat- α -tert-butylester (89.5 mg, 295 μmol , 3.00 eq) wurden in einer Mischung aus DMF (2 mL) und Pyridin (1 mL) gelöst. Anschließend wurden EDC \cdot HCl (56.6 mg, 295 μmol , 3.00 Äq.) und DMAP (1.20 mg, 9.84 μmol , 10 mol%) zugegeben und die Reaktion über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach Abschluss der Reaktion wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand in DCM (30 mL) aufgenommen und mit wässriger HCl (2 M, 2 x 30 mL) und gesättigter wässriger NaHCO_3 -Lösung (30 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung (Hexan/EtOAc 3:1) ergab das Produkt **171** (56.0 mg, 74.4 μmol , 76%) als farblosen Sirup.

R_f (*i*-Hex/EtOAc 3:1) = 0.3.

$^1\text{H-NMR}$ (800 MHz, Aceton- d_6): δ = 7.88 (d, J = 7.5 Hz, 2H, C14H), 7.72 (t, J = 6.9 Hz, 2H, 17H), 7.43 (t, J = 7.4 Hz, 2H, C15H), 7.34 (t, J = 7.4 Hz, 2H, 16H), 6.81 (d, J = 9.0 Hz, NH), 6.15 (d, J = 7.88 Hz, 1H, NH), 6.06 (d, J = 6.2 Hz, 1H, C2H), 5.96 (m, 1H, C1H), 5.69 (m, 1H, C5H), 4.80 (t, J = 7.6 Hz, 1H, C3H), 4.71 (d, J = 6.8 Hz, 1H, C6Ha), 4.66 (d, J = 6.8 Hz, 1H, C6Hb), 4.39 (dd, J_1 = 10.6 Hz, J_2 = 7.4 Hz, 1H, C11Ha), 4.34 (dd, J_1 = 10.6 Hz, J_2 = 7.1 Hz, 1H, C11Hb), 4.25 (t, J = 7.3 Hz, 1H, C12H), 4.19 (m, 1H, C4H), 4.12 (m, 1H, C22H), 3.70 (td, J_1 = 9.9 Hz, J_2 = 6.4 Hz, 1H, C7Ha), 3.60 (td, J_1 = 9.8 Hz, J_2 = 6.9 Hz, 1H, C7Hb), 2.40 (m, 2H, C20H), 2.15 (m, 1H, C21Ha), 1.94 (m, 1H, C21Hb), 1.50 (s, 9H, C25H), 1.49 (s, 9H, C28H), 0.91 (m, 2H, C8H), 0.00 (s, 9H, C9H) ppm.

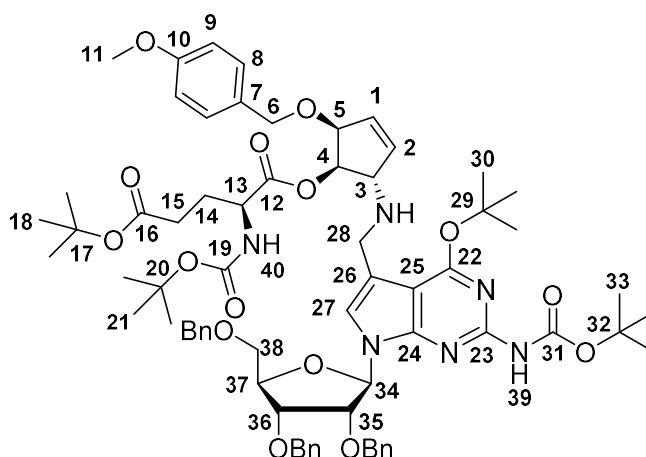
$^{13}\text{C-NMR}$ (200 MHz, Aceton- d_6): δ = 173.0 (C19), 172.3 (C23), 156.5 (C10), 156.2 (C26), 145.2 (C13), 145.1 (C18), 139.8 (C2), 129.3 (C1), 128.6 (C15), 128.0 (C16), 126.2 (C17), 120.9 (C14), 95.0 (C6), 82.7 (C27), 82.3 (C24), 80.6 (C4), 75.2 (C5), 67.1 (C11), 65.7 (C7), 61.2

(C3), 54.7 (C22), 48.1 (C12), 31.2 (C20), 28.6 (C28), 28.1 (C25), 22.1 (C20), 18.5 (C8), -1.2 (C9) ppm.

HRMS (ESI⁺): ber. für C₄₀H₆₀N₃O₁₀Si (M + H⁺): 770.4042; Gefunden: 770.4034.

IR (ATR): 3354 (m), 2980 (m), 2935 (m), 2357 (vw), 2172 (vw), 1793 (s), 1727 (s), 1670 (vs), 1538 (s), 1520 (m), 1478 (m), 1454 (m), 1436 (w), 1418 (m), 1392 (m), 1368 (s), 1311 (s), 1286 (s), 1275 (m), 1250 (s), 1224 (s), 1149 (vs), 1105 (s), 1082 (m), 1048 (s), 1024 (m), 1004 (w), 961 (m), 932 (vw), 915 (w), 879 (vw), 860 (w), 838 (s), 775 (m), 759 (m), 736 (s), 690 (w) cm⁻¹.

2',3',5'-Tri-O-Benzyl-4''-O-(1-(*N*-*tert*-butoxycarbonyl)-5-*O*-*tert*-butyl)-L-glutamyl-5''-O-(*para*-methoxy)benzyl-O⁶-*tert*-butyl-N²-*tert*-butylcarbamoylqueuosin **161**



Verbindung **159** (64.5 mg, 86.8 μ mol, 1.00 Äq.) wurde in DMF (1 mL) gelöst und NaN₃ (6.80 mg, 104 μ mol, 1.20 Äq.) zugegeben. Die Reaktion wurde 5 Stunden lang bei 50 °C gerührt, bevor das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt wurde. Säulenchromatographische Aufreinigung (DCM/MeOH 100:1 \rightarrow 5:1) ergab die Fmoc-entschützte Verbindung **160** (36.0 mg, 69.2 μ mol, 80 %) als farblosen Feststoff, welcher mittels Massenspektrometrie identifiziert und direkt für den nächsten Schritt verwendet wurde. Die Verbindung **160** und 2',3',5'-Tri-O-benzyl-N²-*tert*-butoxycarbonyl-6-*O*-*tert*-butyl-7-formyl-7-deazaguanosin **133** (51.0 mg, 69.2 μ mol, 1.00 Äq.) wurden in MeOH (1 mL) gelöst und AcOH (5 μ L) wurde zugegeben. Die Reaktion wurde 3 h lang bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurde die Reaktion auf 0 °C abgekühlt und NaBH(OAc)₃ (37.0 mg, 173 μ mol, 2.50 Äq.) wurde zugegeben. Die Reaktion wurde 1 h lang bei 0 °C gerührt. Die resultierende Lösung wurde mit nicht-trockenem MeOH (5 mL) verdünnt und weitere 10 min gerührt, bevor das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt wurde. Säulenchromatographische Aufreinigung (DCM/MeOH 50:1 \rightarrow 20:1) ergab das Produkt **161** (28.0 mg, 22.5 μ mol, 33%) als farblosen Feststoff.

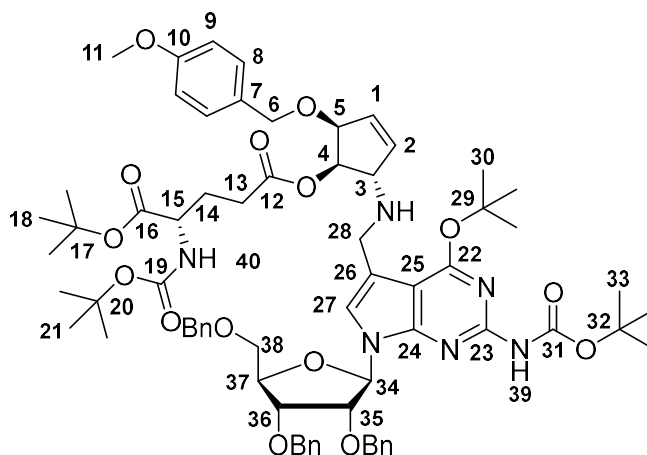
¹H-NMR (800 MHz, Aceton-d⁶): δ = 8.68 (s, 1H, N39H), 7.31 (m, 14 H, arom.CH Benzyl Gruppen, C8H), 7.15 (s, 1H, C27H), 6.87 (d, J = 8.6 Hz, 2H, C9H), 6.31 (d, J = 4.6 Hz, 1H, C34H), 6.13 (d, J = 8.6 Hz, 1H, N40H), 5.89 (d, J = 5.8 Hz, 1H, C1H), 5.82 (d, J = 6.3 Hz, 1H, C2H), 4.94 (m, 1H, C4H), 4.73 (d, J = 12.0 Hz, 1H, OCH₂Ph), 4.71 (d, J = 11.7 Hz, 1H, OCH₂Ph), 4.68 (d, J = 12.2 Hz, 1H, OCH₂Ph), 4.66 (d, J = 11.7 Hz, 1H, OCH₂Ph), 4.64 (m, 2H, C5H, C35H), 4.60 (d, J = 11.8 Hz, 1H, OCH₂Ph), 4.57 (d, J = 11.8 Hz, 1H, OCH₂Ph), 4.49 (m, 2H, C6Ha, C36H), 4.39 (d, J = 11.4 Hz, 1H, C6Hb), 4.32 (m, 2H, C13H, C37H), 3.94 (br, s, 1H, C3H), 3.85 (dd, J_1 = 10.7 Hz, J_2 = 3.6 Hz, 1H, C38Ha), 3.78 (m, 1H, C28Ha), 3.76 (s, 3H, C11H), 3.73 (m, 2H, C28Hb, C38Hb), 2.35 (m, 2H, C15H), 2.12 (m, 1H, C14Ha), 1.86 (m, 1H, C14Hb), 1.71 (s, 9H, C30H), 1.49 (s, 9H, C33H), 1.40 (s, 9H, C18H), 1.39 (s, 9H, C21H) ppm.

¹³C-NMR (200 MHz, Aceton-d⁶): δ = 173.2 (C16), 172.6 (C12), 163.8 (C22), 160.3 (C10), 156.5 (C19), 154.3 (C23), 152.8 (C31), 151.7 (C24), 139.7 (arom. C Benzyl Gruppen), 139.6 (arom. C Benzyl Gruppen), 139.4 (arom. C Benzyl Gruppen), 137.1 (C2), 132.1 (C1), 131.9 (C7), 130.4 (C8), 129.4 (arom. C Benzyl Gruppen), 129.2 (arom. C Benzyl Gruppen), 129.1 (arom. C Benzyl Gruppen), 128.9 (arom. C Benzyl Gruppen), 128.8 (arom. C Benzyl Gruppen), 128.6 (arom. C Benzyl Gruppen), 128.5 (arom. C Benzyl Gruppen), 128.5 (arom. C Benzyl Gruppen), 128.4 (arom. Benzyl Gruppen), 121.5 (C27), 116.0 (C25), 114.5 (C9), 103.0 (C26), 88.1 (C34), 83.0 (C29), 82.4 (C37), 81.1 (C35), 80.7 (C5), 80.2 (C17), 80.0 (2C, C4, C32), 79.5 (C20), 77.9 (C36), 74.0 (OCH₂Ph), 72.8 (OCH₂Ph), 72.8 (OCH₂Ph), 72.1 (C6), 71.0 (C38), 67.3 (C3), 55.6 (C11), 54.2 (C13), 44.9 (C28), 32.2 (C15), 29.0 (C30), 28.7 (C21), 28.6 (C33), 28.4 (C18), 28.0 (C14) ppm.

HRMS (ESI⁺): ber. für C₆₉H₈₉N₆O₁₅ (M + H⁺): 1241.6308; Gefunden: 1241.6335.

IR (ATR): 3330 (br, w), 2960 (m), 2926 (m), 2856 (m), 2360 (vw), 1718 (s), 1586 (m), 1512 (s), 1454 (s), 1430 (s), 1392 (m), 1365 (s), 1247 (s), 1211 (s), 1154 (vs), 1077 (vs), 1040 (s), 1028 (s), 888 (m), 848 (m), 795 (w), 735 (s), 697 (s) cm⁻¹.

2',3',5'-Tri-O-Benzyl-4''-O-(5-(*N*-*tert*-butoxycarbonyl)-1-O-*tert*-butyl)-L-glutamyl-5''-O-(*para*-methoxy)benzyl-O⁶-*tert*-butyl-N²-*tert*-butylcarbonylqueuosin 170



Verbindung **168** (57.0 mg, 76.7 μmol , 1.00 Äq.) wurde in DMF (1 mL) gelöst und NaN_3 (5.99 mg, 92.1 μmol , 1.20 Äq.) wurde zugegeben. Die Reaktion wurde für 5 h bei 50 °C gerührt, bevor das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt wurde. Säulenchromatographische Aufreinigung (DCM/MeOH 100:1 \rightarrow 5:1) ergab die Fmoc-entschützte Verbindung **169** (35.0 mg, 67.2 μmol , 88%) als gelben Sirup, welcher mittels Massenspektrometrie identifiziert und direkt für den nächsten Schritt verwendet wurde. Die Verbindung **169** und 2',3',5'-Tri-O-benzyl-N²-*tert*-butoxycarbonyl-6-O-*tert*-butyl-7-formyl-7-deazaguanosin **133** (49.5 mg, 67.2 μmol , 1.00 Äq.) wurden in MeOH (1 mL) gelöst und AcOH (1 μL) wurde zugegeben. Die Reaktion wurde 3 h lang bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurde die Reaktion auf 0 °C abgekühlt und $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ (35.6 mg, 168 μmol , 2.50 Äq.) wurde zugegeben. Die Reaktion wurde für 1 h bei 0 °C gerührt. Die resultierende Lösung wurde mit nicht-trockenem MeOH (5 mL) verdünnt und weitere 10 min gerührt, bevor das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt wurde. Säulenchromatographische Aufreinigung (DCM/MeOH 50:1 \rightarrow 20:1) ergab das Produkt **170** (27.0 mg, 21.7 μmol , 32%) als farblosen Feststoff.

¹H-NMR (800 MHz, Aceton-d⁶): δ = 8.68 (s, 1H, N39H), 7.31 (m, 17H, arom.CH Benzyl-Gruppen, C8H), 7.15 (s, 1H, C27H), 6.88 (d, , J = 8.7 Hz, 2H, C9H), 6.34 (d, J = 4.6 Hz, 1H, C34H), 6.11 (d, J = 8.4 Hz, 1H, N40H), 5.90 (dt, J_1 = 6.2 Hz, J_2 = 2.0 Hz, 1H, C1H), 5.85 (dd, J_1 = 6.2 Hz, J_2 = 1.9 Hz, 1H, C2H), 4.87 (dd, J_1 = 5.9 Hz, J_2 = 4.4 Hz, 1H, C4H), 4.74 (d, J = 12.1 Hz, 1H, OCH₂Ph), 4.71 (d, J = 11.7 Hz, 1H, OCH₂Ph), 4.68 (d, J = 12.1 Hz, 1H, OCH₂Ph), 4.66 (d, J = 11.7 Hz, 1H, OCH₂Ph), 4.63 (dd, J_1 = 5.9 Hz, J_2 = 2.0 Hz, 1H, C5H), 4.59 (m, 2H, OCH₂Ph), 4.58 (t, J = 4.7 Hz, 1H, C35H), 4.46 (t, J = 4.6 Hz, 1H, C36H), 4.42 (d, J = 11.3 Hz, 1H, C6Ha), 4.39 (d, J = 11.4 Hz, 1H, C6Hb), 4.33 (dt, J_1 = 5.1 Hz, J_2 = 3.5 Hz, 1H, C37H), 4.07 (m, 1H, C15H), 3.92 (m, 1H, C3H), 3.85 (dd, J_1 = 10.7 Hz, J_2 = 3.4 Hz, 1H, C38Ha), 3.78 (s,

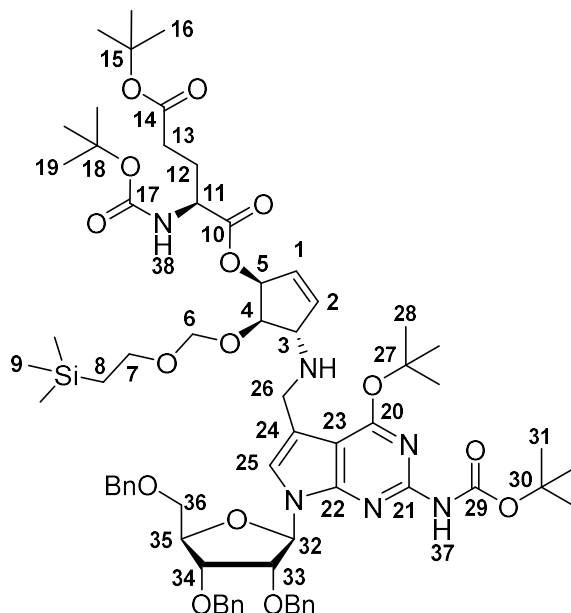
3H, C11H), 3.74 (m, 2H, C28H, C38Hb), 2.44 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H, C13H), 2.10 (m, 1H, C14Ha), 1.91 (m, 1H, C14Hb), 1.71 (s, 9H, C30H), 1.49 (s, 9H, C33H), 1.43 (s, 9H, C18H), 1.39 (s, 9H, C21H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (200 MHz, Aceton- d_6): $\delta = 173.2$ (C12), 172.3 (C16), 163.7 (C22), 160.2 (C10), 156.6 (C19), 154.3 (C23), 152.8 (C31), 151.7 (C24), 139.6 (arom. C Benzyl-Gruppen), 139.5 (arom. C Benzyl-Gruppen), 139.4 (arom. C Benzyl-Gruppen), 137.1 (C2), 131.9 (C7), 131.8 (C1), 130.1 (C8), 129.3 (arom. C Benzyl-Gruppen), 129.2 (arom. C Benzyl-Gruppen), 129.0 (arom. C Benzyl-Gruppen), 128.8 (arom. C Benzyl-Gruppen), 128.8 (arom. C Benzyl-Gruppen), 128.6 (arom. C Benzyl-Gruppen), 128.5 (arom. C Benzyl-Gruppen), 128.5 (arom. C Benzyl-Gruppen), 128.4 (arom. C Benzyl-Gruppen), 121.1 (C27), 116.0 (C26), 114.5 (C9), 102.9 (C25), 87.8 (C34), 82.9 (C29), 81.6 (C17), 82.4 (C37), 81.2 (C35), 80.7 (C5), 80.0 (C32), 79.8 (C4), 79.3 (C20), 77.8 (C36), 74.0 (OCH₂Ph), 72.7 (OCH₂Ph), 72.7 (OCH₂Ph), 72.0 (C6), 70.9 (C38), 67.1 (C3), 55.6 (C11), 54.9 (C15), 44.8 (C28), 31.3 (C13), 29.0 (C30), 28.7 (C21), 28.6 (C33), 28.3 (C18), 27.9 (C14) ppm.

HRMS (ESI⁺): ber. für: C₆₉H₈₉N₆O₁₅ (M + H⁺): 1241.6308; Gefunden: 1241.6336.

IR (ATR): 3340 (w, br), 2973 (m), 2928 (m), 2862 (m), 2360 (vw), 1734 (s), 1716 (s), 1586 (s), 1513 (s), 1454 (s), 1429 (s), 1392 (s), 1365 (s), 1302 (m), 1248 (s), 1215 (m), 1142 (vs), 1078 (s), 1041 (s), 1028 (s), 967 (m), 889 (m), 848 (m), 795 (m), 753 (s), 697 (s) cm⁻¹.

2',3',5'-Tri-O-Benzyl-5''-O-(1-(*N*-tert-butoxycarbonyl)-5-O-tert-butyl)-L-glutamyl-4''-O-(2-trimethylsilylethylmethoxy)methyl -O⁶-tert-butyl-N²-tert-butylcarbamoylqueuosin 164



162 (67.0 mg, 89.0 μmol , 1.00 Äq.) wurde in DMF (1 mL) gelöst und NaN₃ (6.94 mg, 107 μmol , 1.20 Äq.) wurde zugegeben. Die Reaktion wurde für 5 h bei 50 °C gerührt, bevor das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt wurde. Säulenchromatographische Reinigung (DCM/MeOH

100:1 → 5:1) ergab die Fmoc-enzgeschützte Verbindung **163** (30.0 mg, 56.5 μmol , 64 %) als gelben Sirup, welcher mittels Massenspektrometrie identifiziert und direkt für den nächsten Schritt verwendet wurde. Die Verbindung **163** und 2',3',5'-Tri-O-benzyl-N²-*tert*-butoxycarbonyl-6-O-*tert*-butyl-7-formyl-7-deazaguanosin **133** (41,0 mg, 56,5 μmol , 1,00 Äq.) wurden in MeOH (1 mL) gelöst und AcOH (5 μL) wurde zugegeben. Die Reaktion wurde für 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurde die Reaktion auf 0 °C abgekühlt und NaBH(OAc)₃ (30.0 mg, 141 μmol , 2.50 Äq.) wurde zugegeben. Die Reaktion wurde für 1 h bei 0 °C gerührt. Die resultierende Lösung wurde mit nicht-trockenem MeOH (5 mL) verdünnt und weitere 10 min gerührt, bevor das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt wurde. Säulenchromatographische Aufreinigung (DCM/MeOH 50:1 → 20:1) ergab das Produkt **164** (40.0 mg, 32.0 μmol , 57%) als farblosen Feststoff.

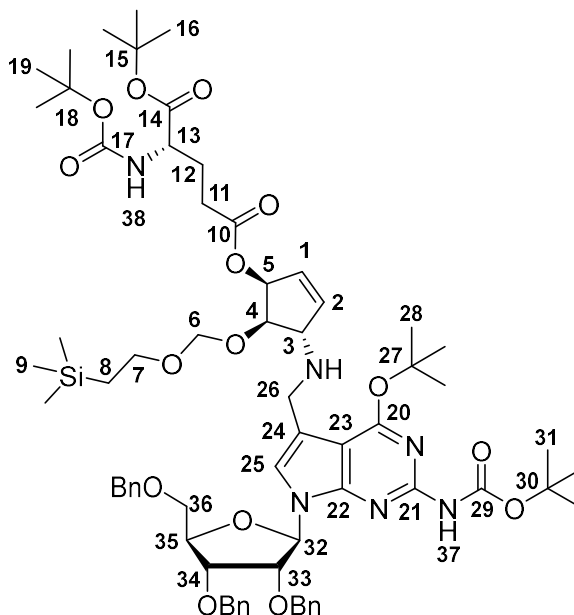
¹H-NMR (800 MHz, Aceton-d⁶): δ = 8.69 (s, 1H, N37H), 7.33 (m, 12H, arom.CH Benzyl Gruppen), 7.17 (s, 1H, C25H), 6.34 (d, J = 4.4 Hz, 1H, C32H), 6.12 (d, J = 8.6 Hz, 1H, N38H), 6.01 (m, C2H), 5.82 (m, C1H), 5.67 (m, C5H), 4.76 (d, J = 12.1 Hz, 1H, OCH₂Ph), 4.71 (m, 2H, OCH₂Ph, C6Ha), 4.70 (m, OCH₂Ph), 4.66 (d, J = 11.7 Hz, 1H, OCH₂Ph), 4.63 (m, 1H, C6Hb), 4.61 (m, 2H, OCH₂Ph), 4.58 (m, 1H, C33H), 4.47 (t, J = 5.0 Hz, 1H, C34H), 4.33 (td, J_1 = 5.2 Hz, J_2 = 3.5 Hz, 1H, C35H), 4.21 (dt, J_1 = 8.8 Hz, J_2 = 5.4 Hz, 1H, C11H), 4.02 (t, J = 5.5 Hz, 1H, C4H), 3.86 (m, 2H, C3H, C36Ha), 3.81 (s, 2H, C26H), 3.75 (dd, J_1 = 10.7 Hz, J_2 = 3.6 Hz, 1H, C36Hb), 3.70 (ddd, J_1 = 10.5 Hz, J_2 = 9.6 Hz, J_3 = 5.9 Hz, 1H, C7Ha), 3.55 (td, J_1 = 10.0 Hz, J_2 = 6.2 Hz, 1H, C7Hb), 2.38 (m, 2H, C13H), 2.13 (m, 1H, C12Ha), 1.89 (m, 1H, C12Hb), 1.73 (s, 9H, C28H), 1.49 (s, 9H, C31H), 1.42 (s, 9H, C16H), 1.39 (s, 9H, C19H), 0.86 (m, 2H, C8H), -0.06 (s, 9H, C9H) ppm.

¹³C-NMR (200 MHz, Aceton-d⁶): δ = 173.1 (C10), 172.7 (C14), 163.8 (C20), 156.4 (C17), 154.3 (C21), 152.8 (C29), 151.7 (C22), 140.9 (C2), 139.6 (arom. C Benzyl Gruppen), 139.6 (arom. C Benzyl Gruppen), 139.4 (arom. C Benzyl Gruppen), 129.4 (arom. C Benzyl Gruppen), 129.2 (arom. C Benzyl Gruppen), 129.1 (arom. C Benzyl Gruppen), 128.9 (arom. C Benzyl Gruppen), 128.8 (arom. C Benzyl Gruppen), 128.6 (arom. C Benzyl Gruppen), 128.6 (C1), 128.6 (arom. C Benzyl Gruppen), 128.5 (arom. C Benzyl Gruppen), 128.4 (arom. C Benzyl Gruppen), 121.1 (C25), 116.2 (C23), 103.0 (C24), 95.1 (C6), 87.9 (C32), 83.0 (C27), 82.4 (C35), 81.6 (C4), 81.2 (C33), 80.6 (C15), 80.0 (C30), 79.4 (C18), 77.8 (C34), 76.3 (C5), 74.0 (OCH₂Ph), 72.7 (OCH₂Ph), 72.7 (OCH₂Ph) 70.9 (C36), 67.4 (C3), 66.0 (C7), 54.1 (C11), 44.9 (C26), 32.2 (C13), 29.0 (C28), 28.7 (C19), 28.6 (C31), 28.4 (C16), 28.2 (C12), 18.7 (C8), -1.1 (C9) ppm.

HRMS (ESI⁺): ber. für C₆₇H₉₅N₆O₁₅Si (M + H⁺): 1251.6619; Gefunden: 1251.6590.

IR (ATR): 3352 (br, w), 2957 (m), 2927 (m), 2360 (vw), 1748 (s), 1723 (s), 1590 (s), 1509 (s), 1455 (s), 1430 (m), 1408 (m), 1392 (m), 1366 (s), 1289 (s), 1213 (s), 1147 (vs), 1049 (vs), 1027 (s), 967 (m), 917 (w), 854 (s), 835 (s), 796 (m), 733 (s), 696 (vs) cm^{-1} .

2',3',5'-Tri-O-Benzyl-5''-O-(5-(*N*-*tert*-butoxycarbonyl)-1-O-*tert*-butyl)-L-glutamyl-4''-O-(2-trimethylsilylethylmethoxy)methyl -O⁶-*tert*-butyl-*N*²-*tert*-butylcarbamoylqueuosin **173**



171 (56.0 mg, 74.7 μmol , 1.00 Äq.) wurde in DMF (1 mL) gelöst und NaN_3 (4.83 mg, 89.3 μmol , 1.20 Äq.) wurde zugegeben. Die Reaktion wurde für 5 h bei 50 °C gerührt, bevor das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt wurde. Säulenchromatographische Aufreinigung (DCM/MeOH 100:1 \rightarrow 5:1) ergab die Fmoc-entschützte Verbindung **172** (15.0 mg, 28.3 μmol , 32 %) als gelben Feststoff, welcher mittels Massenspektrometrie identifiziert und direkt für den nächsten Schritt verwendet wurde. Die Verbindung **172** und 2',3',5'-Tri-O-benzyl-*N*²-*tert*-butoxycarbonyl-6-O-*tert*-butyl-7-formyl-7-deazaguanosin **133** (21.0 mg, 28.3 μmol , 1.00 Äq.) wurden in MeOH (1 mL) gelöst und AcOH (5 μL) wurde zugegeben. Die Reaktion wurde für 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurde die Reaktion auf 0 °C abgekühlt und $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ (15.0 mg, 70.8 μmol , 2.50 Äq.) wurde zugegeben. Die Reaktion wurde für 1 h bei 0 °C gerührt. Die resultierende Lösung wurde mit nicht-trockenem MeOH (5 mL) verdünnt und weitere 10 min gerührt, bevor das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt wurde. Säulenchromatographische Aufreinigung (DCM/MeOH 50:1 \rightarrow 20:1) ergab das Produkt **173** (24.0 mg, 19.2 μmol , 68%) als farblosen Feststoff.

¹H-NMR (800 MHz, Aceton- d_6): δ = 8.69 (s, 1H, N37H), 7.39 (m, 12H, arom.CH Benzyl Gruppen), 7.17 (s, 1H, C25H), 6.34 (d, J = 4.6 Hz, 1H, C32H), 6.09 (d, J = 8.5 Hz, 1H, N38H),

5.96 (m, 1H, C2H), 5.82 (dt, $J_1 = 6.4$ Hz, $J_2 = 2.1$ Hz, 1H, C1H), 5.61 (m, 1H, C5H), 4.75 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H, OCH₂Ph), 4.70 (m 3H, OCH₂Ph, C6Ha), 4.65 (m, 2H, OCH₂Ph, C6Hb), 4.59 (m, 3H, OCH₂Ph, C33H), 4.46 (t, $J = 5.0$ Hz, 1H, C34H), 4.33 (dt, $J_1 = 5.1$ Hz, $J_2 = 3.5$ Hz, 1H, C35H), 4.08 (m, 1H, C11H), 3.98 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H, C4H), 3.85 (m, 2H, C3H, C36Ha), 3.81 (s, 2H, C26H), 3.74 (dd, $J_1 = 10.7$ Hz, $J_2 = 3.6$ Hz, 1H, C36Hb), 3.68 (m, 1H, C7Ha), 3.58 (m, 1H, C7Hb), 2.41 (m, 2H, C13H), 2.13 (m, 1H, C12Ha), 1.90 (m, 1H, C12Hb), 1.73 (s, 9H, C28H), 1.49 (s, 9H, C31H), 1.44 (s, 9H, C19H), 1.40 (s, 9H, C16H), 0.84 (m, 2H, C8H), -0.05 (s, 9H, C9H) ppm.

¹³C-NMR (200 MHz, Aceton-d₆): $\delta = 173.1$ (C10), 172.7 (C14), 163.8 (C20), 156.4 (C17), 154.3 (C21), 152.8 (C29), 151.7 (C22), 140.9 (C2), 139.6 (arom. C Benzyl Gruppen), 139.6 (arom. C Benzyl Gruppen), 139.4 (arom. C Benzyl Gruppen), 129.4 (arom. C Benzyl Gruppen), 129.2 (arom. C Benzyl Gruppen), 129.1 (arom. C Benzyl Gruppen), 128.9 (arom. C Benzyl Gruppen), 128.8 (arom. C Benzyl Gruppen), 128.6 (arom. C Benzyl Gruppen), 128.6 (C1), 128.6 (arom. C Benzyl Gruppen), 128.5 (arom. C Benzyl Gruppen), 128.4 (arom. C Benzyl Gruppen), 121.1 (C25), 116.2 (C23), 103.0 (C24), 95.1 (C6), 87.9 (C32), 83.0 (C27), 82.4 (C35), 81.6 (C4), 81.2 (C33), 80.6 (C15), 80.0 (C30), 79.4 (C18), 77.8 (C34), 76.3 (C5), 74.0 (OCH₂Ph), 72.7 (OCH₂Ph), 72.7 (OCH₂Ph), 70.9 (C36), 67.4 (C3), 66.0 (C7), 54.1 (C11), 44.9 (C26), 32.2 (C13), 29.0 (C28), 28.7 (C19), 28.6 (C31), 28.2 (C12), 18.7 (C8), -1.1 (C9) ppm.

HRMS (ESI⁺): ber. für: C₆₇H₉₅N₆O₁₅Si (M + H⁺): 1251.6619; Gefunden: 1251.6596.

IR (ATR): 3339 (br, w), 2955 (m), 2926 (m), 2360 (vw), 1733 (s), 1717 (s), 1598 (s), 1506 (s), 1454 (s), 1430 (m), 1391 (m), 1366 (s), 1310 (w), 1249 (s), 1214 (m), 1149 (vs), 1048 (vs), 1027 (s), 855 (s), 835 (s), 796 (m), 735 (s), 697 (vs) cm⁻¹.

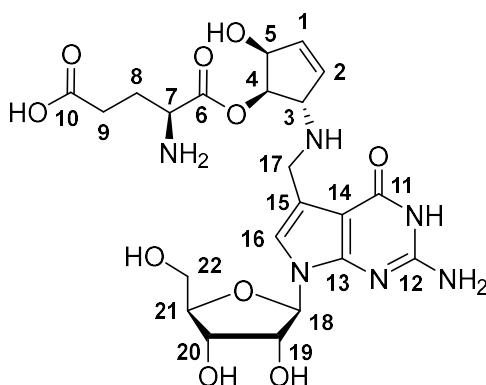
Entschützung von 2',3',5'-Tri-O-Benzyl-4''-O-(1-(*N*-tert-butoxycarbonyl)-5-O-tert-butyl)-L-glutamyl-5''-O-(*para*-methoxy)benzyl-O⁶-tert-butyl-N²-tert-butylcarbamoylqueuosin 161

161 (28.0 mg, 22.6 μ mol, 1.00 Äq.) wurde in DCM (2 mL) gelöst und auf -78 °C gekühlt. Eine Lösung von BCl₃ in DCM (1 M, 226 μ L, 226 μ mol, 10.0 Äq.) wurde zugegeben und die Reaktion wurde für 2 h bei -78 °C gerührt. Die Reaktion wurde mit DCM (5 mL) verdünnt und mit NEt₃ neutralisiert, bevor sie auf Raumtemperatur erwärmt und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt wurde. Der Rückstand wurde in H₂O gelöst und durch HPL-Chromatographie (0-10% Puffer B, 45 min, 4 x) aufgereinigt, um eine Mischung des Ameisensäuresalzes von α -Allyl- und α -Homoallyl-L-glutamylqueuosin (3:1 Allyl vs. Homoallyl, 1.24 mg, 2.30 μ mol, 10%) als farblosen Schaum zu erhalten. Die Analytik ist unten aufgeführt.

Entschützung von 2',3',5'-Tri-O-Benzyl-5''-O-(1-(*N*-*tert*-butoxycarbonyl)-5-O-*tert*-butyl)-L-glutamyl-4''-O-(2-trimethylsilyylethylmethoxy)methyl -O⁶-*tert*-butyl-N²-*tert*-butylcarbamoylqueuosin 164

164 (40.0 mg, 32.0 μmol , 1.00 Äq.) wurde in DCM (2 mL) gelöst und auf $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt. Eine Lösung von BCl_3 in DCM (1 M, 320 μL , 320 μmol , 10.0 Äq.) wurde zugegeben und die Reaktion wurde für 2 h bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt. Die Reaktion wurde mit DCM (5 mL) verdünnt und mit NEt_3 neutralisiert, bevor sie auf Raumtemperatur erwärmt und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt wurde. Der Rückstand wurde in H_2O gelöst und durch HPL-Chromatographie (0-10% Puffer B, 45 min, 4 x) aufgereinigt, um eine Mischung des Ameisensäuresalzes von α -Allyl- und α -Homoallyl-L-glutamylqueuosin (3:1 Allyl vs. Homoallyl, 1.58 mg, 2.93 μmol , 9%) als farblosen Schaum zu erhalten. Die Analytik ist unten aufgeführt.

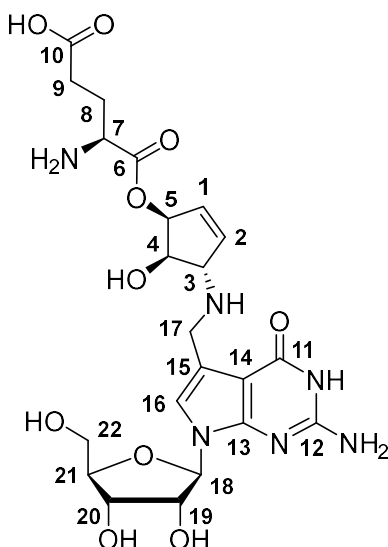
4''-O-(1-L-Glutamyl)-queuosin (α -Homoallyl-GluQ) 165



¹H-NMR (800 MHz, D_2O): δ = 8.44 (s, 1H, NH), 7.15 (s, 1H, C16H), 6.28 (m, 1H, C1H), 6.18 (m, 1H, C2H), 5.97 (m, 1H, C18H), 5.37 (t, J = 5.5 Hz, 1H, C4H), 4.68 (m, 1H, C3H), 5.01 (d, J = 6.2 Hz, 1H, C5H), 4.58 (m, 1H, C19H), 4.44 (m, 2H, C17H), 4.17 (m, 1H, C21H), 3.82 (m, 1H, C22Ha), 3.78 (m, 1H, C22Hb), 3.74 (dd, J_1 = 7.2 Hz, J_2 = 4.8 Hz, 1H, C7H), 2.37 (m, 2H, C9H), 2.20 (m, 1H, C8Ha), 2.05 (m, 1H, C8Hb) ppm.

¹³C-NMR (200 MHz, D_2O): δ = 180.3 (C10), 169.5 (C6), 161.4 (C11), 153.2 (C12), 152.2 (C13), 138.0 (C1), 127.5 (C2), 119.2 (C16), 109.0 (C15), 99.9 (C14), 86.8 (C18), 84.8 (C21), 76.3 (C4), 73.4 (C19), 71.8 (C5), 70.4 (C20), 64.8 (C3), 61.4 (C22), 54.5 (C7), 42.0 (C17), 32.8 (C9), 26.7 (C8) ppm.

HRMS (ESI⁺): ber. für $\text{C}_{22}\text{H}_{31}\text{N}_6\text{O}_{10}$ ($\text{M} + \text{H}^+$): 539.2096; Gefunde: 539.2097.

5''-O-(1-L-Glutamyl)-queuosin (α -Allyl-GluQ) 166

¹H-NMR (800 MHz, D₂O): δ = 8.44 (s, 1H, NH), 7.16 (s, 1H, C16H), 6.28 (m, 1H, C1H), 6.09 (m, 1H, C2H), 5.97 (m, 1H, C18H), 5.75 (dt, J_1 = 6.3 Hz, J_2 = 1.9 Hz, 1H, C5H), 4.65 (t, J = 5.6 Hz, 1H, C4H), 4.58 (m, 1H, C19H), 4.44 (m, 3H, C3H, C17H), 4.33 (t, J = 4.6 Hz, 1H, C20H), 4.17 (m, 2H, C7H, C21H), 3.82 (dd, J_1 = 12.6 Hz, J_2 = 3.3 Hz, 1H, C22Ha), 3.78 (dd, J_1 = 12.6 Hz, J_2 = 4.2 Hz, 1H, C22Hb), 2.41 (m, 2H, C9H), 2.20 (m, 2H, C20H) ppm.

¹³C-NMR (200 MHz, D₂O): δ = 180.0 (C10), 169.5 (C6), 161.4 (C11), 153.2 (C12), 152.2 (C13), 133.3 (C1), 129.0 (C2), 119.2 (C16), 109.1 (C15), 99.4 (C14), 86.7 (C18), 84.4 (C21), 77.9 (C5), 73.4 (C19), 72.3 (C4), 70.4 (C20), 66.2 (C3), 61.4 (C22), 52.6 (C7), 42.0 (C17), 32.7 (C9), 26.3 (C8) ppm.

HRMS (ESI⁺): ber. für C₂₂H₃₁N₆O₁₀ (M + H⁺): 539.2096; Gefunden: 539.2097.

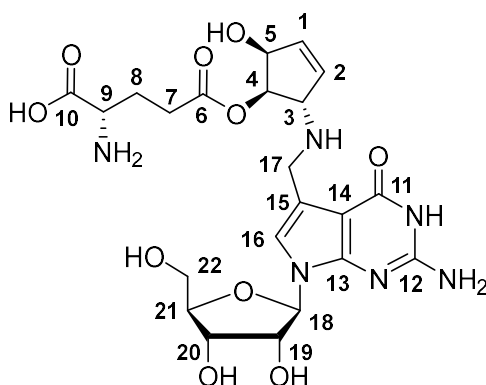
Entschützung von 2',3',5'-Tri-O-Benzyl-5''-O-(1-(*N*-*tert*-butoxycarbamoyl)-5-O-*tert*-butyl)-L-glutamyl-4''-O-(2-trimethylsilylethylmethoxy)methyl -O⁶-*tert*-butyl-N²-*tert*-butylcarbamoylqueuosin 170

170 (25.0 mg, 20.2 μ mol, 1.00 Äq.) wurde in DCM (2 mL) gelöst und auf -78 °C gekühlt. Eine Lösung von BCl₃ in DCM (1 M, 202 μ L, 202 μ mol, 10.0 Äq.) wurde zugegeben und die Reaktion wurde für 2 h bei -78 °C gerührt. Die Reaktion wurde mit DCM (5 mL) verdünnt und mit NEt₃ neutralisiert, bevor sie auf Raumtemperatur erwärmt und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt wurde. Der Rückstand wurde in H₂O gelöst und durch HPL-Chromatographie (0-10% Puffer B, 45 min, 4 x) aufgereinigt, um ein Gemisch des Ameisensäuresalzes von ϵ -Allyl- und ϵ -Homoallyl-L-glutamylqueuosin (3:1 Allyl vs. Homoallyl, 1.02 mg, 1.89 μ mol, 9%) als farblosen Schaum zu erhalten. Die Analytik ist unten aufgeführt.

Entschützung von 2',3',5'-Tri-O-Benzyl-5''-O-(5-(*N*-*tert*-butoxycarbonyl)-1-O-*tert*-butyl)-L-glutamyl-4''-O-(2-trimethylsilyylethylmethoxy)methyl -O⁶-*tert*-butyl-N²-*tert*-butylcarbamoylqueuosin 173

173 (24.0 mg, 19.2 μmol , 1.00 Äq.) wurde in DCM (2 mL) gelöst und auf $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt. Eine Lösung von BCl_3 in DCM (1 M, 192 μL , 192 μmol , 10.0 Äq.) wurde zugegeben und die Reaktion wurde für 2 h bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt. Die Reaktion wurde mit DCM (5 mL) verdünnt und mit NEt_3 neutralisiert, bevor sie auf Raumtemperatur erwärmt und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt wurde. Der Rückstand wurde in H_2O gelöst und durch HPL-Chromatographie (0-10% Puffer B, 45 min, 4 x) aufgereinigt, um ein Gemisch des Ameisensäuresalzes von ϵ -Allyl- und ϵ -Homoallyl-L-glutamylqueuosin (3:1 Allyl vs. Homoallyl, 0.84 mg, 1.46 μmol , 8%) als farblosen Schaum zu erhalten. Die Analytik ist unten aufgeführt.

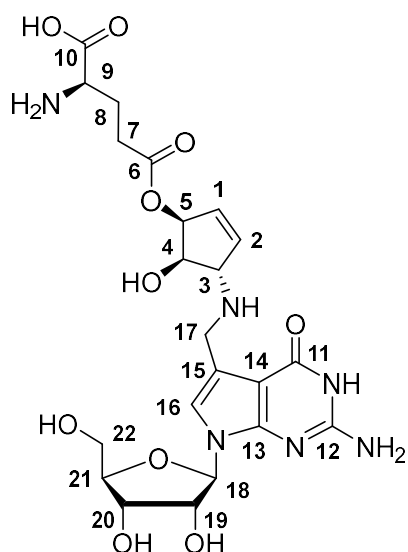
4''-O-(5-L-Glutamyl)-queuosin (γ -Homoallyl-GluQ) 174



¹H-NMR (800 MHz, D_2O): δ = 8.40 (s, 1H, NH), 7.16 (s, 1H, C16H), 6.29 (dt, J_1 = 6.3 Hz, J_2 = 2.3 Hz, 1H, C1H), 6.16 (m, 1H, C2H), 5.97 (d, J = 6.4 Hz, 1H, C18H), 5.25 (t, J = 5.5 Hz, 1H, C4H), 4.94 (d, J = 6.2 Hz, 1H, C5H), 4.58 (m, 2H, C3H, C19H), 4.44 (m, 1H, C17H), 4.33 (dd, J_1 = 5.3 Hz, J_2 = 3.4 Hz, 1H, C20H), 4.17 (q, J = 3.7 Hz, 1H, C21H), 3.79 (m, 3H, C9H, C22H), 2.65 (m, 2H, C7H), 2.16 (m, 2H, C8H) ppm.

¹³C-NMR (200 MHz, D_2O): δ = 173.8 (C10), 173.5 (C6), 161.4 (C11), 153.3 (C12), 152.2 (C13), 137.9 (C1), 127.9 (C2), 119.3 (C16), 109.0 (C15), 99.4 (C14), 86.7 (C8), 84.8 (C21), 74.9 (C4), 73.4 (C19), 71.8 (C5), 70.4 (C20), 64.8 (C3), 61.4 (C22), 53.8 (C7), 41.8 (C17), 29.3 (C9), 25.3 (C8) ppm.

HRMS (ESI⁺): ber. für: $\text{C}_{22}\text{H}_{31}\text{N}_6\text{O}_{10}$ ($\text{M} + \text{H}^+$): 539.2096; Gefunden: 539.2098.

5''-O-(5-L-Glutamyl)-queuosin (γ -Allyl-GluQ) 175

¹H-NMR (800 MHz, D₂O): δ = 8.40 (s, 1H, NH), 7.16 (s, 1H, C16H), 6.25 (m, 1H, C1H), 6.23 (m, 1H, C2H), 5.97 (d, J = 6.5 Hz, 1H, C18H), 5.68 (m, 1H, C5H), 4.58 (m, 2H, C4H, C19H), 4.44 (m, 2H, C17H), 4.35 (m, 1H, C3H), 4.33 (dd, J_1 = 5.3 Hz, J_2 = 3.4 Hz, 1H, C20H), 4.17 (q, J = 3.7 Hz, 1H, C21H), 3.79 (m, 3H, C9H, C22H), 2.60 (ddd, J_1 = 8.4 Hz, J_2 = 7.0 Hz, J_3 = 2.1 Hz, 2H, C7H), 2.16 (m, 2H, C8H) ppm.

¹³C-NMR (200 MHz, D₂O): δ = 173.8 (C10), 173.8 (C6), 161.4 (C11), 153.2 (C12), 152.3 (C13), 134.3 (C1), 131.3 (C2), 119.3 (C16), 109.1 (C15), 99.4 (C14), 86.7 (C18), 84.4 (C21), 76.3 (C5), 73.4 (C19), 72.4 (C4), 70.4 (C20), 66.5 (C3), 61.4 (C22), 53.8 (C7), 42.0 (C17), 29.7 (C9), 25.4 (C8) ppm.

HRMS (ESI⁺): ber. für: C₂₂H₃₁N₆O₁₀ (M + H⁺): 539.2096; Gefunden: 539.2098.

6 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenosin
AaRS	Aminoacyl-tRNA-Synthetase
APB	N-Acryloyl-3-aminophenylboronsäure
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
BH ₄	Tetrahydrobiopterin
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
C	Cytidin
CE	<i>capillary electrophoresis</i> (Kapillarelektrophorese)
CPH ₄	6-Carboxy-5,6,7,8-tetrahydropterin
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
DCM	Dichlormethan
DIBAL-H	Diisobutylaluminiumhydrid
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DMF	Dimethylformamid
Dnmt2	tRNA-(Cytosin38-C5)-methyltransferase
DUF2419	<i>queosine salvage proteins</i>
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
G	Guanosin
GalQ	Galactosyl-Queuosin
GCH ₁	Guanosintriphosphatcyclohydrolase 1
GDP	Guanosindiphosphat
GluQ	Glutamylogueosin
Gm	2'-O-Methylguanosin
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
HEK	<i>human embryonic kidney cells</i> (humane embryonale Stammzellen)
His	Histidin
H ₂ NTP	Dihydroneopterintriphosphat

6 Abkürzungsverzeichnis

(U)HPLC	(Ultra)-Hochleistungsflüssigphasenchromatographie
HWE	Horner-Wadsworth-Emmons
LC	<i>liquid chromatography</i> (Flüssigphasenchromatographie)
L-DOPA	L-Dopamin
lncRNA	<i>long noncoding RNA</i>
m ¹ A	1-Methyladenosin
ManQ	Mannosyl-Queuosin
m ⁵ C	5-Methylcytidin
m ¹ G	1-Methylguanosin
miRNA	micro RNA
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MS	<i>mass spectrometry</i> (Massenspektrometrie)
ms ² io ⁶ A	2-Thiomethyl-6-(2-hydroxyisopentenyl)-Adenosin
mt	mitochondrial
NADPH	reduziertes Nicotin-Adenin-dinukleotidphosphat
N ⁹ -MeQ	N ⁹ -Methylqueuin
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> (Kernresonanz)
NBS	N-Bromsuccinimid
oQ	Epoxyqueuosin
PCC	Pyridiniumchlorochromat
PD	<i>Parkinson's disease, Morbus Parkinson</i>
PDC	Pyridiniumdichromat
PMB	<i>para</i> -Methoxybenzyl
preQ ₀	7-Cyano-7-deazaguanin
preQ ₁	7-Aminomethyl-7-deazaguanin
Q	Queuosin
3'-QMP	Queuosin-3'-monophosphat
5'-QMP	Queuosin-5'-monophosphat
QQQ	Triple-Quadrupol

6 Abkürzungsverzeichnis

QTRT1	Queuine tRNA-Ribosyltransferase <i>Catalytic Subunit 1</i>
QTRTD1	Queuine tRNA-Ribosyltransferase <i>Accessory Subunit 2</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
SAM	S-Adenosylmethionin
SEM	2-Trimethylsilylethoxymethyl
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
TBS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
TEMPO	Tetramethylpiperidin- <i>N</i> -oxid
TFA	Trifluoressigsäure
e/bTGT	eukaryotische/bakterielle tRNA-Guanin-Transglykosylase
THF	Tetrahydrofuran
TIMS-TOF	<i>trapped ion mobility time of flight</i>
6-ThioQ	6-Thioqueuin
TMS	Trimethylsilyl
tRNA	<i>transfer RNA</i>
Tyr	Tyrosin
U	Uridin
UPR	<i>unfolded protein response</i>
YadB	Glutaryl-Queuosin-tRNA ^{Asp} -Synthetase
yW	Wybutosin
Ψ	Pseudouridin

7 ANHANG

7.1 Supporting Information: Synthesis of Galactosyl-Queuosine and Distribution of Hypermodified Q-Nucleosides in Mouse Tissues

Dr. Peter Thumbs*, M. Sc. Timm Ensfelder*, M. Sc. Markus Hillmeier*, Dr. Mirko Wagner*, M. Sc. Matthias Heiss, M. Sc. Constanze Scheel, M. Sc. Alexander Schön, Dr. Markus Müller, Prof. Dr. Stylianos Michalakis, Dr. Stefanie Kellner, Prof. Dr. Thomas Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 12352 –12356.

*: Diese Autoren haben zu gleichen Teilen beigetragen

Supporting Information

Synthesis of Galactosyl-Queuosine and Distribution of Hypermodified Q-Nucleosides in Mouse Tissues

*Peter Thumbs⁺, Timm T. Ensfelder⁺, Markus Hillmeier⁺, Mirko Wagner⁺, Matthias Heiss, Constanze Scheel, Alexander Schön, Markus Müller, Stylianos Michalakis, Stefanie Kellner, and Thomas Carell**

anie_202002295_sm_miscellaneous_information.pdf

Supporting Information

Co-injection of synthetic and natural galQ to confirm its structure	1
Quantification of galQ, manQ, and Q in mouse organs	1
RNA isolation from mouse organs.....	1
Enzymatic digestion of mouse totalRNA for LC-MS analysis.....	1
Mass-spectrometry-based quantification of queuosine-family nucleosides in mouse tissues	2
Quantification of galQ, manQ, and Q in human tRNA-isoacceptors.....	3
Cell culture.....	3
Cell lysis and tRNA purification	3
Isoacceptor purification	3
Digestion of tRNA isoacceptors for mass spectrometry	4
QQQ mass spectrometry for tRNA isoacceptor analysis.....	4
Calibration	4
Synthesis of homoallyl- β -GalQ	5
Synthesis of precursor 4	5
3,4,6-Tri- <i>O</i> - <i>tert</i> -butyldimethylsilyl-D-galactal ^[4] [18].....	6
3,4,6-Tri- <i>O</i> - <i>tert</i> -butyldimethylsilyl-D-galactopyranose ^[5] [8]	7
2-Chloroisobutyric acid ^[6] [19]	8
3,4,6-Tri- <i>O</i> - <i>tert</i> -butyldimethylsilyl-1,2-di- <i>O</i> -(2-chlorisobutyryl)- α -D-galactopyranose [9]	9
3,4,6-Tri- <i>O</i> - <i>tert</i> -butyldimethylsilyl-2- <i>O</i> -(2-chlorisobutyryl)-D-galactopyranose [20].....	10
3,4,6-Tri- <i>O</i> - <i>tert</i> -butyldimethylsilyl-2- <i>O</i> -(2-chlorisobutyryl)- α -D-galactopyranosyl-1- <i>O</i> -trichloroacetimidate [4]	12
Synthesis of precursor 5	13
2,3:5,6-Di- <i>O</i> -isopropylidene- α -D-mannofuranose ^[7] [21]	14
1- <i>O</i> -Acetyl-2,3:5,6-Diisopropylidene- α -D-mannofuranose ^[7] [11]	15
1- <i>O</i> -Acetyl-2,3-isopropylidene- α -D-mannofuranose ^[7] [22]	16
1- <i>O</i> -Acetyl-5,6- <i>O</i> -methoxymethylen-2,3- <i>O</i> -isopropylidene- α -D-mannofuranose ^[7] [23].....	17
(2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-1- <i>O</i> -Acetyl-2,3- <i>O</i> -isopropylidene-4-vinyl- α -D-erythrofuranose ^[7] [12]	18
(2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-2,3- <i>O</i> -Isopropylidene-4-vinylerythrofuranose ^[7] [24].....	19
(3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-4,5- <i>O</i> -Isopropylidenehepta-1,6-dien-3,4,5-triol ^[7] [13].....	20
(3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-4,5- <i>O</i> -Isopropylidenecyclopent-1-en-3,4,5-triol ^[7] [14]	21
(3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-3- <i>O</i> -Trichloroacetimidoyl-4,5- <i>O</i> -isopropylidenecyclopent-1-en-3,4,5-triol ^[8] [25]	22
(3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)-3-Trichloroacetyl-amino-4,5- <i>O</i> -isopropylidenecyclopent-1-en-4,5-diol ^[8] [15].....	23

(3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)-(N-(9 <i>H</i> -Fluoren-9-yl)methoxycarbonyl)-4,5- <i>O</i> -isopropylidencyclopent-1-en-4,5-diol [26]	24
(3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)-((N-(9 <i>H</i> -Fluoren-9-yl)methoxycarbonyl))-cyclopent-1-ene-4,5-diol [27].....	25
(3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)-(N-(9 <i>H</i> -Fluoren-9-yl)methoxycarbonyl)-5- <i>O</i> - <i>tert</i> -butyldimethylsilylcyclopent-1-en-4,5-diol [5]	26
Synthesis of precursor 6	27
7-Desazaguanine ^[9] [27]	28
6-Desoxy-6-chloro-7-desazaguanin ^[9] [28].....	29
6-Desoxy-6-chloro-2-pivaloylamino-7-desazaguanine ^[9] [29].....	30
6-Desoxy-6-chloro-7-iodo-2-pivaloylamino-7-desazaguanine ^[9] [30].....	31
2',3',5'-Tri- <i>O</i> -benzoyl-2- <i>N</i> -pivaloyl-6-desoxy-6-chloro-7-iodo-7-desazaguanosine ^[9] [31]	32
2',3',5'-Tri- <i>O</i> -benzoyl-2- <i>N</i> -pivaloyl-7-iodo-7-desazaguanosin ^[9] [32]	33
2',3',5'-Tri- <i>O</i> -benzoyl-2- <i>N</i> -pivaloyl-7-formyl-7-desazaguanosine ^[9] [6]	34
Assembly of GalQ 2 from precursors 4,5 and 6.....	35
1- <i>O</i> -((3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)-((N-(9 <i>H</i> -Fluoren-9-yl)methoxycarbonyl)-5- <i>O</i> -(<i>tert</i> -butyldimethylsilyl)-cyclopent-1-en-4-yl))-3,4,6-tri- <i>O</i> - <i>tert</i> -butyldimethylsilyl-2- <i>O</i> -(2-chloroiso-butryl)-β- <i>D</i> -galactopyranose [33]	36
1- <i>O</i> -((3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)-(3-Amino-5- <i>O</i> -(<i>tert</i> -butyldimethylsilyl)cyclopent-1-en-4-yl))-3,4,6-tri- <i>O</i> - <i>tert</i> -butyldimethylsilyl-2- <i>O</i> -(2-chlorisobutyryl)-β- <i>D</i> -galactopyranose [16]	37
7-Desaza-7-(((3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)-4- <i>O</i> -(3,4,6-tri- <i>O</i> - <i>tert</i> -butyldimethylsilyl-2- <i>O</i> -(2-chlorisobutyryl)-β- <i>D</i> -galactopyranosyl)-5- <i>O</i> -(<i>tert</i> -butyldimethylsilyl)cyclopent-1-en-3-yl)amino)-methyl)-2-pivaloylamino-2',3',5'-tri- <i>O</i> -benzoylguanosin [17].....	38
7-Desaza-7-(((3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)-4- <i>O</i> -(β- <i>D</i> -galactopyranosyl)-5-hydroxy-cyclopent-1-en-3-yl)-amino)methyl)guanosin (galQ) [2]	40
¹ H-NMR of GalQ (2)	42
¹³ C-NMR of GalQ (2)	44
References.....	46

Co-injection of synthetic and natural galQ to confirm its structure

For this experiment, 5 µg of totalRNA from the livers of two adult mice (postnatal month 3) were digested to the nucleoside level using the *Nucleoside Digestion Mix* from *New England BioLabs* (for details, see *RNA isolation from mouse organs* and *Enzymatic digestion of mouse totalRNA for LC-MS analysis* in this document). 0.5 pmol of our synthetic galactosyl-queuosine (2) were added to the sample which then was analyzed by LC-MS using the same method as described below (see *Mass-spectrometry-based quantification of queuosine-family nucleosides in mouse tissues*).

Quantification of galQ, manQ, and Q in mouse organs

C57BL6/J (Charles River, Sulzfeld, Germany) wildtype mice were used. All procedures concerning animals conform to the German animal protection laws and were approved by the local authority (Regierung von Oberbayern).

RNA isolation from mouse organs

The organs of mice (3 male siblings, 1 day and 3 male siblings, 3 months old) were removed and immediately snap-frozen in liquid nitrogen. For subsequent isolation of totalRNA, 1 mL *TriReagent* (*Sigma Aldrich*) was used *per* 50 mg organ sample. The tissue was homogenized with a tissue lyzer (*Schwingmühle MM400* from *Retsch*) first at 20 Hz for 4 min, then at 30 Hz for 2 min. The homogenized tissue was transferred into a new 2 mL-tube and mixed with 200 µl chloroform. The phases were separated by centrifugation (12000 g, 15 min, 4°C). The upper clear phase was transferred to a new 2 mL-tube and mixed with 500 µl isopropanol. The RNA was precipitated at -20°C overnight. The precipitated RNA was pelletized by centrifugation (21130 g, 30 min, 4°C). The supernatant was carefully removed and 1 mL of ice-cold 75 % ethanol was added, followed by another centrifugation step (21130 g, 20 min, 4°C). The last three steps were repeated two more times. The supernatant was removed, and the RNA pellet was first dried at room temperature and then dissolved in milliQ-water.

Enzymatic digestion of mouse totalRNA for LC-MS analysis

For each LC-MS-measurement (technical replicate), 3 µg of mouse totalRNA were digested to the nucleoside level using the *Nucleoside Digestion Mix* from *New England BioLabs*. To this reason, a solution of 3 µg totalRNA in 42.5 µL of milliQ-water was prepared. 5 µL of the *Nucleoside Digestion Mix Reaction Buffer (10x)*, and 2.5 µL of the *Nucleoside Digestion Mix* were added, and the mixture was incubated for 2 h at 37 °C. A solution of 0.5 pmol β-allyl-mannosyl-queuosine (internal reference compound) and 1.43 pmol of ¹³CD₂-queuosine (heavy-isotope-labeled standard) in 25 µL of milliQ was

added to the sample. The sample was filtered using an *AcroPrep Advance 96 filter plate 0.2 μm Supor* from *Pall Life Sciences* and subsequently analyzed by LC-MS.

Mass-spectrometry-based quantification of queuosine-family nucleosides in mouse tissues

The levels of galactosyl-queuosine (galQ) and mannosyl-queuosine (manQ) in mouse tissues were quantified using a mass spectrometry-based method with synthetic (non-natural) β-allyl-mannosyl-queuosine (amQ) as internal reference compound. To this reason, calibration curves were established, relying on our galQ-compound **2**, but also on synthetic manQ. A detailed manuscript reporting the synthesis of the natural product manQ and of the internal standard β-allyl-mannosyl-Q is currently under preparation. Six calibration solutions were prepared for galQ and manQ (xQ), containing 5.73 to 0.179 pmol galQ and 4.23 to 0.132 pmol manQ in milliQ-water [n(xQ)]. To each of the calibration solutions, 0.80 pmol of β-allyl-mannosyl-Q were added [n(amQ)]. The samples were analyzed by LC-MS, using the same conditions as described below. Ion chromatograms of the compounds of interest were extracted from the total ion current (TIC) chromatograms, and the areas under the curves were integrated. The ratios n(xQ) / n(amQ) were then plotted against the corresponding average peak area ratios A(xQ) / A(amQ) from three independent measurements, and a linear fit was calculated. The resulting linear equations $n(xQ) / n(amQ) = m * [A(xQ) / A(amQ)] + b$, with $m = 1.8635$ and $b = 0.0286$ for galQ, and $m = 1.7328$ and $b = 0.0234$ for manQ, have R²-values of 0.99 and give backfit-values between 94-102 % (galQ) and 99-105 % (manQ). The equations can be transformed to $n(xQ) = (m * [A(xQ) / A(amQ)] + b) * n(amQ)$ and were used as calibration curves to calculate the amounts of galQ and manQ [n(xQ)] the mouse tissue samples.

Levels of queuosine and adenosine were quantified in parallel with galQ and manQ. For queuosine quantification, ¹³CD₂-Q was used as heavy-atom-labeled internal standard, while adenosine was quantified based on its UV-absorption. The corresponding calibration curves were published by us before.

Quantitative HPLC-HESI-MS analysis of the enzymatically digested RNA samples was performed on a *Dionex Ultimate 3000 HPLC system* coupled to a *Thermo Fisher LTQ Orbitrap XL* mass spectrometer with an injection volume of 65 μL (of 75 μL total sample volume) per measurement. Nucleosides were separated on an *Interchim Uptisphere120-3HDO C18* column whose temperature was maintained at 30 °C. Elution buffers were buffer A (2 mM NH₄HCOO in H₂O; pH 5.5) and buffer B (2 mM NH₄HCOO in H₂O/MeCN 20/80 v/v; pH 5.5) with a flow rate of 0.15 mL/min. The gradient was as follows: 0→10 min, 0% B; 10→50 min, 0→5 % B; 50→75 min, 5→60 % B; 75→80 min, 60→100 % B. The chromatogram was recorded at 260 nm with a *Dionex Ultimate 3000 Diode Array Detector*, and the chromatographic eluent was directly injected into the ion source of the mass spectrometer without prior splitting. Ions were scanned in the positive polarity mode over a full-scan range of m/z = 225-800 with a resolution of 60,000. Parameters of the mass spectrometer were tuned with a freshly mixed solution of inosine (5 μM) in buffer A and set as follows: Capillary temperature 275.00 °C; source voltage 4.80 kV; vaporizer temperature 100 °C, capillary voltage 0 V; tube lens voltage 45.00 V. The ion chromatograms of the compounds of interest were extracted from the total ion current (TIC)

chromatogram, and the areas under the curves were integrated. The amount of galQ, manQ, and Q in a sample was calculated using the respective calibration curves. For each of the three biological replicates per tissue and age, two independent measurements (technical replicates) were performed. Resulting values are presented as $n(X) / n(A)$.

Quantification of galQ, manQ, and Q in human tRNA-isoacceptors

Cell culture

Cell culture media and supplements were obtained from *Sigma-Aldrich* (Munich, Germany) unless stated otherwise. Queuine base was obtained from *TRC* (North York, Canada). Standard Basal medium for HEK-293T culture was DMEM D6546 high glucose supplemented with 10 % FBS and 0.584 g/L L-glutamine. Queuine base was supplemented at a concentration of 20 nM. Cells were split 1:7 using standard procedures every 2-3 days to counter overgrowth. Cells were kept at 10 % CO₂ for proper pH-adjustment. For biological replicates, one culture was split into several flasks prior to harvesting.

Cell lysis and tRNA purification

Cells were directly harvested on T25 flasks (*TPP*, Trasadingen, Swiss) using 1 mL TRI reagent. totalRNA was isolated according to the supplier's manual. tRNA was purified by size exclusion chromatography (SEC) and ethanol precipitation according to published procedures.^{[1] [2]} The tRNA was resuspended in water (35 µL).

Isoacceptor purification

The procedure was adapted from Hauenschild *et al.*^[3] For isoacceptor purification, 1 µg pre-purified total tRNA was used. The sequences of the biotinylated 2'-deoxyoligonucleotides are:

tRNA^{Asp}_{GUC}:

5'-[Biotin]TGGCTCCCCGTCGGGGAATTGAACCCCGGTCTCCCGCGTGACAGGCGGGGATACTAACCCTATACTAACGAGG
AAAA-3'

tRNA^{His}_{GUG}:

5'-[Biotin]TGCCGTCCTCGGATTCGAACCGAGGTTGCTG-3'

tRNA^{Asn}_{GUU}:

5'-[Biotin]AAATGGCGTCCCTGGGTGGGCTCGAACCAACCTTTTCGGTTAACAGCC-3'

tRNA^{Tyr}_{GUA}:

5'-[Biotin]AAATGGTCCTTCGAGCCGGAATCGATCCAGCGA-3'

Digestion of tRNA isoacceptors for mass spectrometry

tRNA isoacceptors in aqueous digestion mix (20 μ L) were digested to single nucleosides by using 2 U alkaline phosphatase, 0.2 U phosphodiesterase I (VWR, Radnor, Pennsylvania, USA), and 2 U benzonase in Tris (pH 8, 5 mM) and $MgCl_2$ (1 mM) containing buffer. Furthermore, 0.5 μ g tetrahydrouridine (Merck, Darmstadt, Germany), 1 μ M butylated hydroxytoluene, and 0.1 μ g pentostatin were added to avoid deamination and oxidation of the nucleosides. After incubation for 2 h at 37 $^{\circ}C$, 10 μ L of LC-MS running buffer was added to the mixture and then filtered through 96-well filter plates (AcroPrep Advance 350 10K Omega, PALL Corporation, New York, USA) at 3000 g and 4 $^{\circ}C$ for 30 min. 1/10 vol. of SILIS (stable isotope labeled internal standard), as prepared in Heiss *et al.*, was added to each filtrate before analysis by QQQ-mass spectrometry.^[2] For each sample 10 μ L were injected.

QQQ mass spectrometry for tRNA isoacceptor analysis

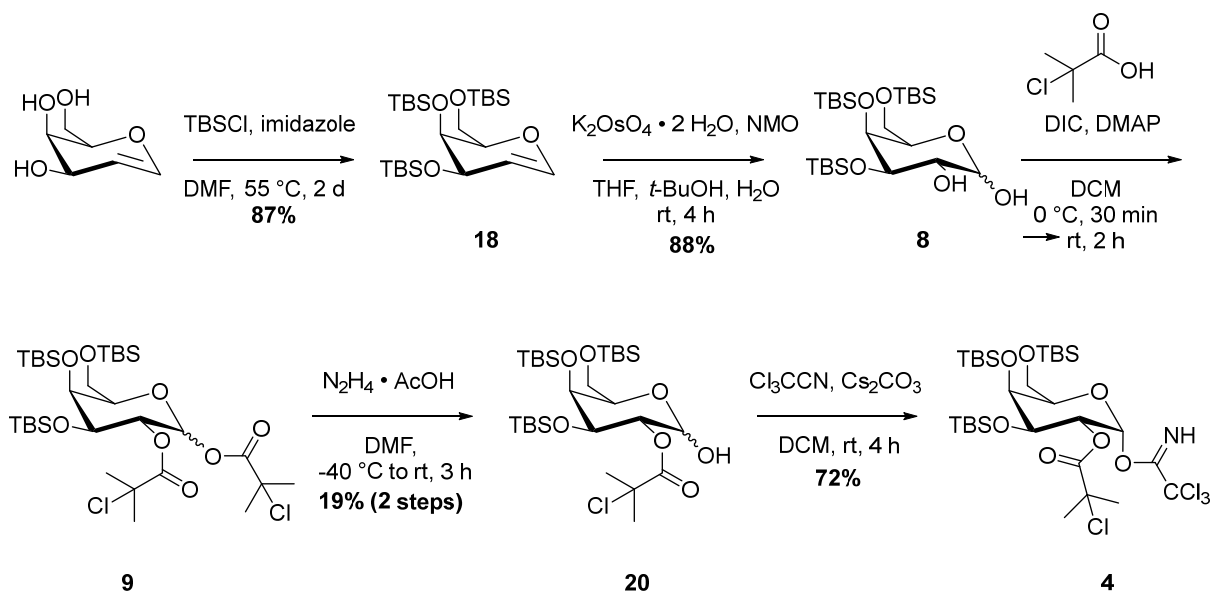
For quantitative mass spectrometry, an Agilent 1290 Infinity II equipped with a diode-array detector (DAD) combined with an Agilent Technologies G6470A Triple Quad system and electrospray ionization (ESI-MS, Agilent Jetstream) was used. Operating parameters: positive-ion mode, skimmer voltage of 15 V, cell accelerator voltage of 5 V, N_2 gas temperature of 230 $^{\circ}C$ and N_2 gas flow of 6 L/min, sheath gas (N_2) temperature of 400 $^{\circ}C$ with a flow of 12 L/min, capillary voltage of 2500 V, nozzle voltage of 0 V, and nebulizer at 40 psi. The instrument was operated in dynamic MRM mode. For separation a Synergi, 2.5 μ m Fusion-RP C₁₈, 100 Å , 100 x 2 mm column (Phenomenex®, Torrance, California, USA) at 35 $^{\circ}C$ and a flow rate of 0.35 mL/min was used in combination with a binary mobile phase of 5 mM NH_4OAc aqueous buffer A, brought to pH 5.6 with glacial acetic acid (65 μ L / L buffer), and an organic buffer B of pure acetonitrile (Roth, Ultra LC-MS grade, purity ≥ 99.98). The gradient started at 100 % solvent A, followed by an increase to 10 % over 6 min. From 10 to 15 min, solvent B was increased to 45 % and was maintained for 3 min before returning to 10 % solvent A and a 3 min re-equilibration period.

Calibration

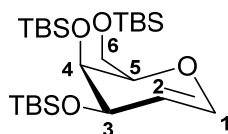
For calibration, synthetic nucleosides were weighed and dissolved in water to a stock concentration of 1-10 mM. The nucleosides adenosine (A), cytidine (C), guanosine (G) and uridine (U), were obtained from Sigma-Aldrich. Queuosine (Q) was a generous gift from the Dedon lab, manQ and galQ were provided by the Carell lab. The calibration solutions range from 0.025 to 100 pmol for each canonical nucleoside and from 0.25 fmol to 1 pmol for Q-modifications. Each calibration was spiked with 10 % SILIS. The sample data were analyzed by the Quantitative MassHunter Software from Agilent. The absolute amounts of the modifications were referenced to the absolute amounts of injected tRNA (based on expected and calculated amount of canonical nucleosides).

Synthesis of homoallyl- β -GalQ

Synthesis of precursor 4



3,4,6-Tri-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-D-galactal ^[4] [18]



D-(+)-Galactal **6** (1.47 g, 10.1 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in DMF (28 mL) and imidazole (4.82 g, 70.8 mmol, 7.00 eq.) and TBSCl (5.23 g, 34.7 mmol, 3.5 eq.) were added. The solution was stirred for 2 d at 55 °C and then poured into water (300 mL). The aqueous phase was extracted with diethyl ether (3 x 150 mL). The combined organic phases were washed with water (300 mL), dried over MgSO₄ and the solvent was removed *in vacuo*. Column chromatographic purification (Isohexane/EtOAc 200:1 → 150:1) gave the product (4.29 g, 8.77 mmol, 87%) as colorless oil.

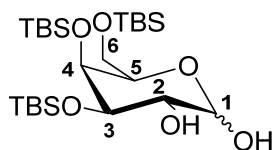
TLC [Isohexane/EtOAc (8:1)]: R_f = 0.75.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, 27 °C): δ = 6.21 (dd, ³J_{H1,H2} = 6.1 Hz, ⁴J_{H1,H3} = 0.8 Hz, 1H; C1H), 4.68 – 4.62 (m, 1H; C2H), 4.16 – 3.98 (m, 4H; C3H, C4H, C5H, C6Ha), 3.90 – 3.85 (m, 1H; C6Hb), 0.91 (s, 9H; SiC(CH₃)₃), 0.90 (2s, 18H; SiC(CH₃)₃), 0.10 (2s, 6H; SiCH₃), 0.07 (2s, 6H; SiCH₃), 0.07 (s, 3H; SiCH₃), 0.06 (s, 3H; SiCH₃) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, 27 °C): δ = 142.7 (C1), 102.6 (C2), 79.6 (C5), 68.7 (C4), 65.0 (C3), 60.9 (C6), 26.0 (2 × 3C; SiC(CH₃)₃), 25.9 (3C; SiC(CH₃)₃), 18.5 (SiC(CH₃)₃), 18.3 (SiC(CH₃)₃), 18.2 (SiC(CH₃)₃), -4.2 (SiCH₃), -4.4 (SiCH₃), -4.8 (SiCH₃), -4.9 (SiCH₃), -5.1 (SiCH₃), -5.3 (SiCH₃) ppm.

HRMS (ESI+) *m/z*: calc. for [C₂₄H₅₂O₄Si₃ + NH₄]⁺: 506.3512, found: 506.3515.

3,4,6-Tri-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-D-galactopyranose ^[5] [8]



3,4,6-Tri-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-D-galactal (2.09 g, 4.27 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in a mixture of THF (14 mL), *tert*-butanol (6 mL) and water (2 mL). NMO (1.51 g, 12.9 mmol, 3.0 eq.) and $K_2OsO_4 \cdot 2 H_2O$ (70.0 mg, 200 μ mol, 0.05 eq.) were added and the reaction mixture was stirred for 48 h at room temperature. The solution was diluted with water (40 mL) and Na_2SO_3 (2.69 g, 21.4 mmol, 5.00 eq) was added and the mixture was stirred for 2 h at room temperature. Water (40 mL) was added and the aqueous suspension was extracted with EtOAc (3 x 100 mL). The combined organic phases were washed with brine, dried over $MgSO_4$, filtered and the solvent was removed in vacuo. Column chromatographic purification (Isohexane/EtOAc 9:1) gave an anomeric mixture of the product (1.96 g, 3.75 mmol, 88%, α/β ca. 2.5:1)

TLC [Isohexane/EtOAc (8:1)]: $R_f = 0.12$ (α), $R_f = 0.14$ (β).

α -Anomer:

1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$, 27 °C): $\delta = 5.29$ (d, $^3J_{H1,H2} = 3.6$ Hz, 1H; C1H), 4.01 – 3.98 (m, 1H; C4H), 3.92 (dd, $^3J_{H2,H3} = 9.5$ Hz, $^3J_{H2,H1} = 3.6$ Hz, 1H; C2H), 3.88 (t, $^3J_{H5,H6a} = ^3J_{H5,H6b} = 6.7$ Hz, 1H; C5H), 3.87 (dd, $^3J_{H3,H2} = 9.6$ Hz, $^3J_{H3,H4} = 2.3$ Hz, 1H; C3H), 3.69 – 3.63 (m, 2H; C6Ha, C6Hb), 0.94 (s, 9H; $SiC(CH_3)_3$), 0.90 (s, 9H; $SiC(CH_3)_3$), 0.89 (s, 9H; $SiC(CH_3)_3$), 0.14 (s, 3H; SiCH₃), 0.13 (s, 3H; SiCH₃), 0.12 (s, 3H; SiCH₃), 0.08 (s, 3H; SiCH₃), 0.06 (2s, 6H; SiCH₃) ppm.

^{13}C -NMR (150 MHz, $CDCl_3$, 27 °C): $\delta = 93.0$ (C1), 72.7 (C2; C3, C5), 71.5 (C4), 69.5 (C2), 61.7 (C6), 26.3 (3C; $SiC(CH_3)_3$), 26.1 (3C; $SiC(CH_3)_3$), 25.9 (3C; $SiC(CH_3)_3$), 18.6 ($SiC(CH_3)_3$), 18.5 ($SiC(CH_3)_3$), 18.2 ($SiC(CH_3)_3$), -3.9 (2C; SiCH₃), -4.4 (SiCH₃), -4.8 (SiCH₃), -5.3 (2C; SiCH₃) ppm.

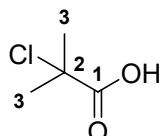
β -Anomer:

1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$, 27 °C): $\delta = 4.53$ (d, $^3J_{H1,H2} = 7.3$ Hz, 1H; C1H), 3.95 (d, $^3J_{H4,H3} = 2.1$ Hz, 1H; C4H), 3.72 (dd, $^2J_{H6a,H6b} = 10.0$ Hz, $^3J_{H6a,H5} = 7.8$ Hz, 1H; C6Ha), 3.69 – 3.63 (m, 2H; C6Hb, C2H), 3.53 (dd, $^3J_{H3,H2} = 9.6$ Hz, $^3J_{H3,H4} = 2.4$ Hz, 1H; C3H), 3.41 (ddd, $^3J_{H5,H6a} = 7.7$ Hz, $^3J_{H5,H6b} = 5.8$ Hz, $^3J_{H5,H4} = 0.6$ Hz, 1H; C5H), 0.94 (s, 9H; $SiC(CH_3)_3$), 0.90 (s, 9H; $SiC(CH_3)_3$), 0.89 (s, 9H; $SiC(CH_3)_3$), 0.14 (2s, 6H; SiCH₃), 0.13 (s, 3H; SiCH₃), 0.09 (s, 3H; SiCH₃), 0.06 (2s, 6H; SiCH₃) ppm.

^{13}C -NMR (150 MHz, $CDCl_3$, 27 °C): $\delta = 97.6$ (C1), 76.2 (C5), 75.9 (C3), 72.9 (C2), 70.7 (C4), 61.3 (C6), 26.3 (3C; $SiC(CH_3)_3$), 26.1 (3C; $SiC(CH_3)_3$), 25.8 (3C; $SiC(CH_3)_3$), 18.6 (2C; $SiC(CH_3)_3$), 18.2 ($SiC(CH_3)_3$), -3.9 (2C; SiCH₃), -4.4 (SiCH₃), -4.7 (SiCH₃), -5.3 (2C; SiCH₃) ppm.

HRMS (ESI+) m/z : calc. for $[C_{24}H_{54}O_6Si_3 + Na]^+$: 545.3120, found: 545.3122.

2-Chloroisobutyric acid ^[6] [19]



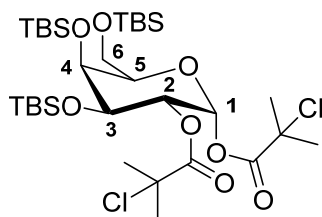
Isobutyric acid (9.30 mL, 100 mmol), *N*-Chlorosuccinimide (10.0 g, 74.9 mmol, 0.75 eq.) and concentrated sulfuric acid (2.51 g) were dissolved in TFA (50 mL) and stirred at 100 °C for 2 d. Another portion of *N*-Chlorosuccinimide (10.0 g, 74.9 mmol, 0.75 eq.) was added and stirring continued at 100 °C for 2 d. Addition of more *N*-Chlorosuccinimide (10.1 g, 75.4 mmol, 0.75 eq.) led to completion of the reaction after stirring for another 24 h at 100 °C. The product was purified by fractionated vacuum distillation (130 °C, 10 – 15 Pa), which gave a crude product. Another distillation step (60 °C, 10 – 15 Pa) gave the product (5.22 g 42.6 mmol, 42%) as colorless oil, which crystallized after cooling to colorless needles.

¹H-NMR (400 MHz, D₂O, 27 °C): δ = 1.80 (s, 6H; C3H) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O, 27 °C): δ = 175.8 (C1), 66.0 (C2), 29.0 (C3) ppm.

HRMS (EI) m/z : calc. for $[C_4H_7O_2]$: 122.0135, found: 122.0116.

3,4,6-Tri-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-1,2-di-*O*-(2-chloroisobutyryl)- α -D-galactopyranose [9]



3,4,6-Tri-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-D-galactopyranose (5.03 g, 9.62 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in DCM (68 mL) and a solution of 2-chloroisobutyric acid (2.85 g, 23.3 mmol, 2.40 eq.) in DCM (20 mL) and DMAP (70.0 mg, 600 μ mol, 0.05 eq.) were added. Subsequently DIC (3.75 mL, 24.1 mmol, 2.50 eq.) was added at 0 °C and the solution was stirred for 30 min at 0 °C and then for 2 h at room temperature. The precipitate was filtered off and the organic phase was washed with saturated aqueous NaHCO₃-solution. The aqueous phase was re-extracted with diethyl ether (3 x 60 mL) and the combined organic phases were dried over MgSO₄, filtered and the solvent was removed *in vacuo*. Column chromatographic purification (Isohexane/EtOAc 100:1) gave a mixture of the product (4.17 g) with the resulting urea derivative as colorless oil.

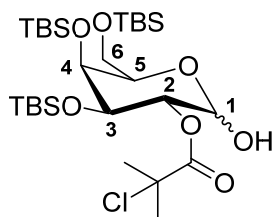
TLC [Isohexane/EtOAc (8:1)]: R_f = 0.56.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃, 27 °C): δ = 6.29 (d, ³J_{H1,H2} = 3.4 Hz, 1H; C1H), 5.46 (dd, ³J_{H2,H3} = 10.3 Hz, ³J_{H2,H1} = 3.4 Hz, 1H; C2H), 4.21 (dd, ³J_{H3,H2} = 10.3 Hz, ³J_{H3,H4} = 2.2 Hz, 1H; C3H), 4.14 (d, ³J_{H4,H3} = 2.3 Hz, 1H; C4H), 3.88 (t, ³J_{H5,H6a} = ³J_{H5,H6b} = 6.8 Hz, 1H; C5H), 3.70 (dd, ³J_{H6a,H6b} = 10.3 Hz, ³J_{H6a,H5} = 7.6 Hz, 1H; C6Ha), 3.64 (dd, ³J_{H6b,H6a} = 10.3 Hz, ³J_{H6b,H5} = 6.1 Hz, 1H; C6H), 1.81 (s, 3H; CCl(CH₃)₂), 1.79 (s, 3H; CCl(CH₃)₂), 1.76 (s, 3H; CCl(CH₃)₂), 1.73 (s, 3H; CCl(CH₃)₂), 0.93 (s, 9H; SiC(CH₃)₃), 0.92 (s, 9H; SiC(CH₃)₃), 0.87 (s, 9H; SiC(CH₃)₃), 0.17 (s, 3H; SiCH₃), 0.16 (s, 6H; SiCH₃), 0.11 (s, 3H; SiCH₃), 0.04 (s, 3H; SiCH₃), 0.03 (s, 3H; SiCH₃) ppm.

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃, 27 °C): δ = 171.3 (COCCl(CH₃)₂), 169.8 (COCCl(CH₃)₂), 91.7 (C1), 75.3 (C5), 71.8 (C4), 71.5 (C2), 70.0 (C3), 64.5 (CCl(CH₃)₂), 64.3 (CCl(CH₃)₂), 61.0 (C6), 30.0 (2C; CCl(CH₃)₂), 29.7 (CCl(CH₃)₂), 29.6 (CCl(CH₃)₂), 26.2 (3C; SiC(CH₃)₃), 26.0 (3C; SiC(CH₃)₃), 25.7 (3C; SiC(CH₃)₃), 18.6 (SiC(CH₃)₃), 18.3 (SiC(CH₃)₃), 18.1 (SiC(CH₃)₃), -3.8 (SiCH₃), -3.9 (SiCH₃), -4.7 (SiCH₃), -4.9 (SiCH₃), -5.3 (SiCH₃), -5.4 (SiCH₃) ppm.

HRMS (ESI+) m/z: calc. for [C₃₂H₆₄O₈Cl₂Si₃ + NH₄]⁺: 748.3624, found: 748.3630.

3,4,6-Tri-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-2-*O*-(2-chlorisobutyryl)- α -D-galactopyranose [20]



A mixture of 3,4,6-Tri-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-1,2-di-*O*-(2-chlorisobutyryl)- α -D-galactopyranose and the urea derivative (4.14 g) was dissolved in DMF (40 mL) and cooled to -40 °C. $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{AcOH}$ (0.42 g, 4.56 mmol) was added at that temperature and the solution was allowed to warm to room temperature over a period of 30 min. Subsequently the solution was stirred for 3 h at room temperature. The solution was poured into water (400 mL) and the suspension was extracted with diethyl ether (3 x 120 mL). The combined organic phases were washed with water (100 mL), dried over MgSO_4 , filtered and the solvent was removed in vacuo. Column chromatographic purification (Isohexane/EtOAc 50:1 \rightarrow 9:1) gave an anomeric mixture of the product (1.14 g, 1.82 mmol, 19% over 2 steps) as colorless foam.

TLC [Isohexane/EtOAc (8:1)]: $R_f = 0.27$ (α und β).

α -Anomer:

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , 27 °C): $\delta = 5.38$ (d, $^3J_{\text{H}_1, \text{H}_2} = 3.3$ Hz, 1H; C1H), 5.20 – 5.12 (m, 1H; C2H), 4.15 (dd, $^3J_{\text{H}_3, \text{H}_4} = 9.4$ Hz, $^3J_{\text{H}_3, \text{H}_2} = 2.3$ Hz, 1H; C3H), 4.10 – 4.05 (m, 1H; C4H), 3.94 (td, $^3J_{\text{H}_5, \text{H}_6\text{a}} = ^3J_{\text{H}_5, \text{H}_6\text{b}} = 6.7$ Hz, $^3J_{\text{H}_5, \text{H}_4} = 1.1$ Hz, 1H; C5H), 3.80 – 3.65 (m, 2H; C6Ha, C6Hb), 2.65 (bs, 1H; C1-OH), 1.81 (2s, 6H; $\text{CCl}(\text{CH}_3)_2$), 0.93 (s, 9H; $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 0.91 (s, 9H; $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 0.89 (s, 9H; $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 0.18 (s, 3H; SiCH_3), 0.16 (s, 3H; SiCH_3), 0.14 (s, 3H; SiCH_3), 0.12 (s, 3H; SiCH_3), 0.06 (s, 6H; SiCH_3) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3 , 27 °C): $\delta = 171.4$ ($\text{COCCl}(\text{CH}_3)_2$), 96.2 (C1), 73.7 (C2), 73.3 (C5), 71.5 (C4), 69.6 (C3), 64.6 ($\text{CCl}(\text{CH}_3)_2$), 60.9 (C6), 29.9 (2C; $\text{CCl}(\text{CH}_3)_2$), 26.2 (2 x 3C; $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 25.8 (3C; $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 18.5 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 18.2 (2C; $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), -3.8 (2C; SiCH_3), -4.6 (SiCH_3), -4.8 (SiCH_3), -5.3 (2C; SiCH_3) ppm.

β -Anomer:

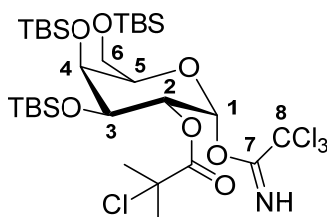
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , 27 °C): $\delta = 5.20$ – 5.12 (m, 1H; C2H), 4.58 (bs, 1H; C1H), 4.10 – 4.05 (m, 1H; C4H), 3.80 – 3.65 (m, 3H; C3H, C6Ha, C6Hb), 3.49 – 3.43 (m, 1H; C5H), 3.05 (bs, 1H; C1-OH), 1.80 (2s, 6H; $\text{CCl}(\text{CH}_3)_2$), 0.92 (2s, 18H; $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 0.89 (s, 9H; $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 0.15 (s, 3H; SiCH_3), 0.14 (s, 3H; SiCH_3), 0.13 (s, 3H; SiCH_3), 0.10 (s, 3H; SiCH_3), 0.06 (s, 6H; SiCH_3) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3 , 27 °C): $\delta = 172.2$ ($\text{COCCl}(\text{CH}_3)_2$), 90.2 (C1), 76.5 (C2), 76.2 (C5), 73.3 (C3), 70.8 (C4), 64.5 ($\text{CCl}(\text{CH}_3)_2$), 61.0 (C6), 30.2 ($\text{CCl}(\text{CH}_3)_2$), 30.1 ($\text{CCl}(\text{CH}_3)_2$), 26.2 (3C; $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 26.1

(3C; SiC(CH₃)₃), 25.8 (3C; SiC(CH₃)₃), 18.6 (SiC(CH₃)₃), 18.2 (SiC(CH₃)₃), 18.1 (SiC(CH₃)₃), -3.8 (SiCH₃), -4.0 (SiCH₃), -4.6 (2C; SiCH₃), -5.2 (SiCH₃), -5.3 (SiCH₃) ppm.

HRMS (ESI+) *m/z*: calc. for [C₂₈H₅₉O₇ClSi₃ + Na]⁺: 649.3149, found: 649.3151.

3,4,6-Tri-O-*tert*-butyldimethylsilyl-2-O-(2-chlorisobutyryl)- α -D-galactopyranosyl-1-O-trichloroacetimidate [4]



To a solution of 3,4,6-Tri-O-*tert*-butyldimethylsilyl-2-O-(2-chlorisobutyryl)-D-galactopyranose (2.50 g, 3.98 mmol, 1.0 eq.) in DCM (125 mL) Cs₂CO₃ (780 mg, 2.40 mmol, 0.60 eq.) and Cl₃CCN (4.00 mL, 39.9 mmol, 10.0 eq.) were added. The solution was stirred at room temperature for 4 h. Subsequently saturated aqueous NaHCO₃-solution (100 mL) was added and the mixture was stirred for 5 min at room temperature. The phases were separated and the organic phase was extracted with DCM (4 x 100 mL). The combined organic phases were dried over MgSO₄ and the solvent was removed *in vacuo*. Column chromatographic purification (Isohexane/EtOAc 100:1) gave the product (2.21 g, 2.86 mmol, 72%, only α) as colorless oil.

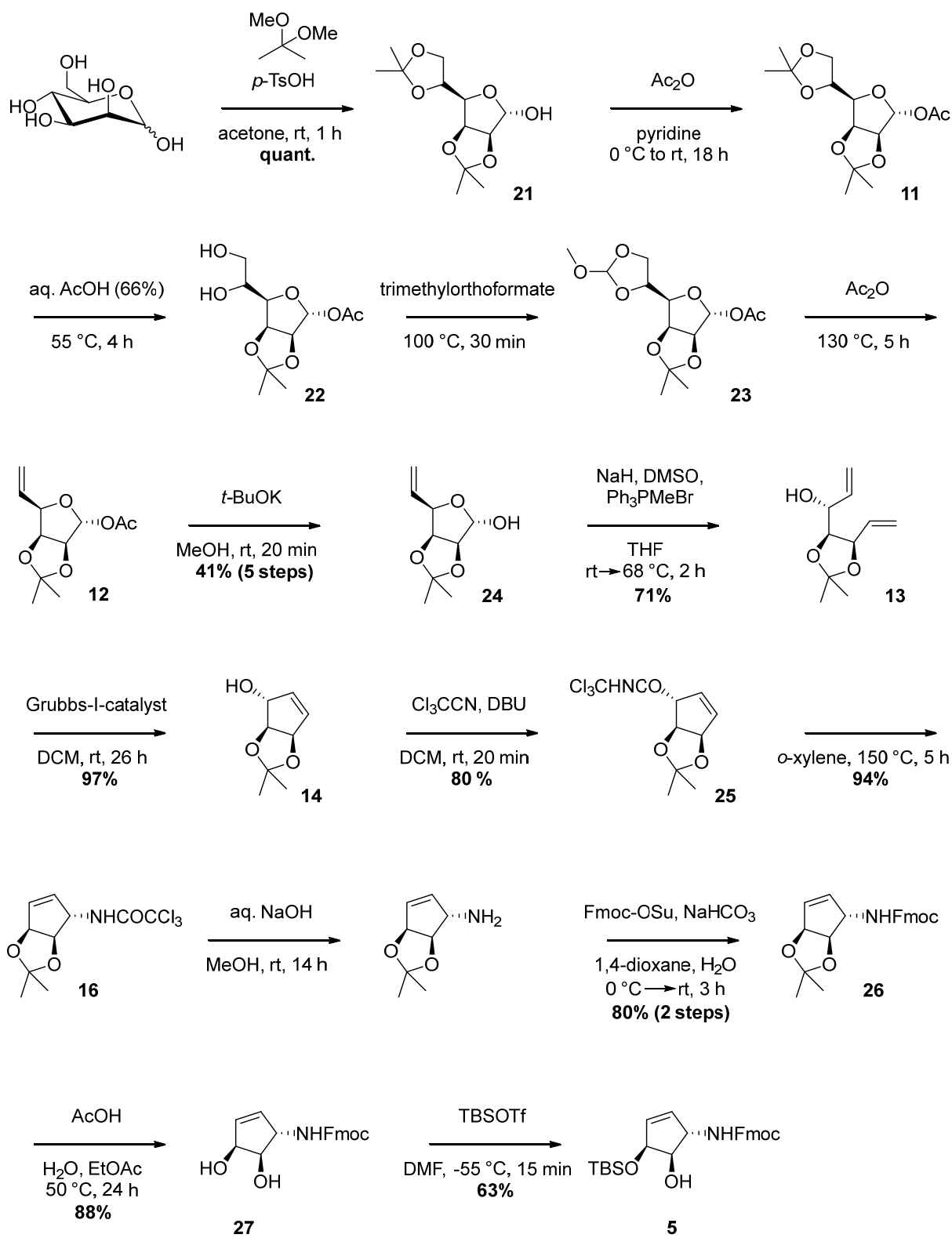
TLC [Isohexane/EtOAc (8:1)]: R_f = 0.50.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃, 27 °C): δ = 8.54 (s, 1H; NHCOC₃), 6.48 (d, ³J_{H1,H2} = 3.4 Hz, 1H; C1H), 5.49 (dd, ³J_{H2,H3} = 10.4 Hz, ³J_{H2,H1} = 3.4 Hz, 1H; C2H), 4.30 (dd, ³J_{H3,H2} = 10.4 Hz, ³J_{H3,H4} = 2.2 Hz, 1H; C3H), 4.16 (d, ³J_{H4,H3} = 1.9 Hz, 1H; C4H), 3.94 (dd, ³J_{H5,H6a} = 7.8 Hz, ³J_{H5,H6b} = 6.1 Hz, 1H; C5H), 3.72 (dd, ²J_{H6a,H6b} = 10.2 Hz, ³J_{H6a,H5} = 8.0 Hz, 1H; C6Ha), 3.64 (dd, ²J_{H6b,H6a} = 10.2 Hz, ³J_{H6b,H5} = 5.9 Hz, 1H; C6Hb), 1.76 (s, 3H; CCl(CH₃)₂), 1.74 (s, 3H; CCl(CH₃)₂), 0.93 (s, 9H; SiC(CH₃)₃), 0.92 (s, 9H; SiC(CH₃)₃), 0.86 (s, 9H; SiC(CH₃)₃), 0.18 (s, 3H; SiCH₃), 0.16 (s, 3H; SiCH₃), 0.15 (s, 3H; SiCH₃), 0.12 (s, 3H; SiCH₃), 0.02 (s, 3H; SiCH₃), 0.01 (s, 3H; SiCH₃) ppm.

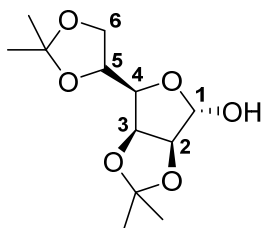
¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃, 27 °C): δ = 171.4 (COC₃), 160.9 (NHCOC₃), 94.3 (C1), 91.4 (CCl₃), 75.1 (C5), 71.7 (C2; C4), 69.9 (C3), 64.2 (CCl(CH₃)₂), 60.8 (C6), 30.0 (C2; CCl(CH₃)₂), 26.2 (3C; SiC(CH₃)₃), 26.0 (3C; SiC(CH₃)₃), 25.7 (3C; SiC(CH₃)₃), 18.6 (SiC(CH₃)₃), 18.3 (SiC(CH₃)₃), 18.1 (SiC(CH₃)₃), -3.8 (SiCH₃), -4.0 (SiCH₃), -4.7 (SiCH₃), -4.9 (SiCH₃), -5.3 (SiCH₃), -5.4 (SiCH₃) ppm.

HRMS (ESI⁻) *m/z*: calc. for [C₃₀H₅₉NO₇Cl₄Si₃ + Cl]: 804.2047, found: 804.2064.

Synthesis of precursor 5



2,3:5,6-Di-O-isopropylidene- α -D-mannofuranose [7] [21]



D-Mannose (54.0 g, 300 mmol, 1.0 eq.) was suspended in 2,2-dimethoxypropane (160 mL, 887 mmol, 4.4 eq.) and acetone (160 mL) and a catalytic amount of *p*-toluene sulfonic acid (5.70 g, 30 mmol, 0.1 eq) was added. The Suspension was stirred for 1 h at room temperature. The resulting clear solution was neutralized with saturated aqueous NaHCO₃-solution and then concentrated to half volume. The residue was taken up in EtOAc (150 mL) and washed with brine. Subsequently, the organic phase was dried over Na₂SO₄, filtered and the solvent was removed *in vacuo* to deliver the product (78.0 g, 300 mmol, quant.) as colorless solid.

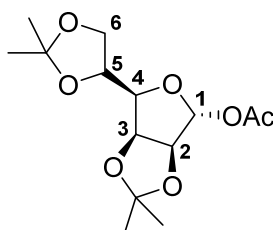
TLC (Isohexane/EtOAc 1:4): R_f = 0.57.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, 27°C): δ = 5.35 (d, ³J_{H1,C1OH} = 2.6 Hz, 1H; C1H), 4.78 (dd, ³J_{H3,H2} = 5.9 Hz, ³J_{H3,H4} = 3.7 Hz, 1H; C3H), 4.58 (d, ³J_{H2,H3} = 5.9 Hz, 1H; C2H), 4.42 – 4.34 (m, 1H; C5H), 4.15 (dd, ³J_{H4,H5} = 7.1 Hz, ³J_{H4,H3} = 3.6 Hz, 1H; C4H), 4.04 (d, ³J_{H6a,H5} = 3.7 Hz, 1H; C6Ha), 4.03 (d, ³J_{H6b,H5} = 2.8 Hz Hz, 1H; C6Hb), 3.58 (d, ³J_{C1OH,H1} = 2.6 Hz, 1H; C1OH), 1.44 (s, 3H; CH₃), 1.43 (s, 3H; CH₃), 1.35 (s, 3H; CH₃), 1.30 (s, 3H; CH₃) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃, 27°C): δ = 112.5 (C1), 109.1 (C(CH₃)₂), 101.1 (C(CH₃)₂), 85.5 (C2), 80.0 (C4), 79.6 (C3), 73.2 (C5), 66.4 (C6), 26.7 (CH₃), 25.8 (CH₃), 25.1 (CH₃), 24.4 (CH₃) ppm.

HRMS (ESI⁺): calc. for [C₁₂H₂₀O₆ + NH₄]⁺: 278.1598, found.: 278.1603.

1-O-Acetyl-2,3:5,6-Diisopropylidene- α -D-mannofuranose [7] [11]



2,3:5,6-Di-O-isopropylidene- α -D-mannofuranose (78.0 g, 300 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in pyridine (60 mL) and Ac_2O was added at 0 °C (55.0 mL, 582 mmol, 1.9 eq.). The solution was stirred for 1 h at 0 °C and then at room temperature overnight. Subsequently the mixture was cooled to 0 °C again and EtOH (150 mL) was added. After removing the solvent *in vacuo*, the residue was taken up in EtOAc (200 mL) and washed with HCl (1 M, 200 mL) and saturated aqueous NaHCO_3 -solution (100 mL). After drying the organic phase over Na_2SO_4 and filtration, the solvent was removed *in vacuo* to give the product as colorless oil.

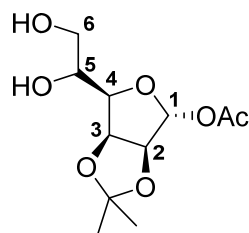
TLC [Isohexane/EtOAc (1:4)]: $R_f = 0.65$.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): $\delta = 6.12$ (s, 1H, C1H), 4.85 (dd, $^3J_{\text{C3H-C2H}} = 5.9$ Hz, $^3J_{\text{C3H-C4H}} = 3.6$ Hz, 1H, C3H), 4.70 (d, $^3J_{\text{C2H-C3H}} = 5.9$ Hz, 1H, C2H), 4.40 (ddd, $^3J_{\text{C5H-C4H}} = 8.0$ Hz, $^3J_{\text{C5H-C6Ha}} = 6.1$ Hz, $^3J_{\text{C5H-C6Hb}} = 4.2$ Hz, 1H, C5H), 4.12 (dd, $^3J_{\text{C6Ha-C6Hb}} = 8.8$ Hz, $^3J_{\text{C6Ha-C5H}} = 6.1$ Hz, 1H, C6Ha), 4.07 (dd, $^3J_{\text{C6Hb-C6Ha}} = 8.8$ Hz, $^3J_{\text{C6Hb-C5H}} = 4.2$ Hz, 1H, C6Hb), 4.06 (dd, $^3J_{\text{C4H-C5H}} = 8.0$ Hz, $^3J_{\text{C4H-C3H}} = 3.6$ Hz, 1H, C4H), 2.07 (s, 3H, O_2CCH_3) 1.49 (s, 3H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 1.46 (s, 3H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 1.38 (s, 3H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 1.34 (s, 3H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3): $\delta = 169.59$ (O_2CCH_3), 113.76 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 109.84 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 109.52 (C1), 100.96 (C2), 82.70 (C4), 79.46 (C3), 73.04 (C5), 67.30 (C6), 27.16 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 26.10 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 25.29 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 24.83 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 21.24 (O_2CCH_3) ppm.

HRMS (ESI+) m/z : calc. for $[\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}_7 + \text{NH}_4]^+$: 320.1704, found: 320.1706.

1-O-Acetyl-2,3-isopropylidene- α -D-mannofuranose [7] [22]



1-O-Acetyl-2,3:5,6-Diisopropylidene- α -D-mannofuranose was dissolved in aqueous acetic acid (64%, 500 mL) and stirred for 4 h at 55 °C. The solvent was then removed in vacuo to give the product as yellow oil.

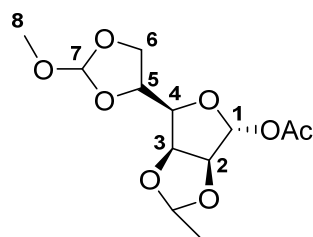
TLC [Isohexane/EtOAc (1:4)]: R_f = 0.16.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3 , 27 °C): δ = 6.15 (s, 1H; C1H), 4.91 (dd, $^3J_{\text{H3,H2}} = 5.9$ Hz, $^3J_{\text{H3,H4}} = 3.8$ Hz, 1H; C3H), 4.69 (d, $^3J_{\text{H2,H3}} = 5.9$ Hz, 1H; C2H), 4.09 (dd, $^3J_{\text{H4,H5}} = 8.2$ Hz, $^3J_{\text{H4,H3}} = 3.8$ Hz, 1H; C4H), 4.02 – 3.99 (m, 1H; C5H), 3.85 (dd, $^2J_{\text{H6a,H6b}} = 11.5$ Hz, $^3J_{\text{H6a,H5}} = 3.3$ Hz, 1H; C6Ha), 3.71 (dd, $^2J_{\text{H6b,H6a}} = 11.5$ Hz, $^3J_{\text{H6b,H5}} = 5.5$ Hz, 1H; C6Hb), 2.06 (s, 3H; O_2CCH_3), 1.49 (s, 3H; $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 1.34 (s, 3H; $\text{C}(\text{CH}_3)_2$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3 , 27 °C): δ = 169.4 (O_2CCH_3), 113.3 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 100.6 (C1), 84.8 (C2), 81.2 (C4), 79.8 (C3), 70.1 (C5), 64.1 (C6), 25.9 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 24.7 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 21.0 (O_2CCH_3) ppm.

HRMS (ESI+) m/z : calc. for $[\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{O}_7 + \text{NH}_4]^+$: 280.1391, found: 280.1391.

1-O-Acetyl-5,6-O-methoxymethylen-2,3-O-isopropylidene- α -D-mannofuranose [7] [23]



1-O-Acetyl-2,3-isopropylidene- α -D-mannofuranose was dissolved in trimethylorthoformate (165 mL) and stirred at 100 °C for 30 min. After cooling to room temperature and removing the solvent *in vacuo*, the two diastereomeric products were obtained as viscous colorless oil.

TLC [Isohexane/EtOAc (1:4)]: $R_f = 0.66$.

Isomer A:

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3 , 27 °C): $\delta = 6.12$ (s, 1H; C7H), 5.74 (s, 1H; C1H), 4.87 (dd, $^3J_{\text{H}_3,\text{H}_2} = 5.9$ Hz, $^3J_{\text{H}_3,\text{H}_4} = 3.7$ Hz, 1H; C3H), 4.69 (d, $^3J_{\text{H}_2,\text{H}_3} = 5.9$ Hz, 1H; C2H), 4.42 (dt, $^3J_{\text{H}_5,\text{H}_4} = 8.2$ Hz, $^3J_{\text{H}_5,\text{H}_6a} = ^3J_{\text{H}_5,\text{H}_6b} = 6.6$ Hz, 1H; C5H), 4.17 (dd, $^3J_{\text{H}_4,\text{H}_5} = 8.3$ Hz, $^3J_{\text{H}_4,\text{H}_3} = 3.5$ Hz, 1H; C4H), 4.16 – 4.12 (m, 1H; C6Ha), 4.06 – 4.02 (m, 1H; C6Hb), 3.34 (s, 3H; C8H), 2.05 (s, 3H; O_2CCH_3), 1.47 (s, 3H; $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 1.33 (s, 3H; $\text{C}(\text{CH}_3)_2$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3 , 27 °C): $\delta = 169.3$ (O_2CCH_3), 116.4 (C1), 113.2 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 100.8 (C7), 84.9 (C2), 82.6 (C4), 79.5 (C3), 72.8 (C5), 67.1 (C6), 52.1 (C8), 25.9 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 24.6 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 21.0 (O_2CCH_3) ppm.

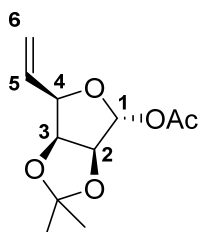
Isomer B:

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3 , 27 °C): $\delta = 6.13$ (s, 1H; C7H), 5.76 (s, 1H; C1H), 4.82 (dd, $^3J_{\text{H}_3,\text{H}_2} = 5.9$ Hz, $^3J_{\text{H}_3,\text{H}_4} = 3.7$ Hz, 1H; C3H), 4.68 (d, $^3J_{\text{H}_2,\text{H}_3} = 5.9$ Hz, 1H; C2H), 4.58 (td, $^3J_{\text{H}_5,\text{H}_6a} = ^3J_{\text{H}_5,\text{H}_6b} = 6.6$ Hz, $^3J_{\text{H}_5,\text{H}_4} = 4.9$ Hz, 1H; C5H), 4.16 – 4.12 (m, 2H; C4H, C6Ha), 4.06 – 4.02 (m, 1H; C6Hb), 3.31 (s, 3H; C8H), 2.05 (s, 3H; O_2CCH_3), 1.45 (s, 3H; $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 1.30 (s, 3H; $\text{C}(\text{CH}_3)_2$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3 , 27 °C): $\delta = 169.3$ (O_2CCH_3), 115.5 (C1), 113.3 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 100.6 (C7), 84.9 (C2), 81.4 (C4), 79.0 (C3), 72.7 (C5), 65.6 (C6), 51.7 (C8), 25.7 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 24.4 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 21.0 (O_2CCH_3) ppm.

HRMS (ESI+) m/z : calc. for $[\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{O}_8 + \text{NH}_4]^+$: 322.1496, found: 322.1499.

(2S,3S,4R)-1-O-Acetyl-2,3-O-isopropylidene-4-vinyl- α -D-erythrofuranose ^[7] [12]



1-O-Acetyl-5,6-O-methoxymethylen-2,3-O-isopropylidene- α -D-mannofuranose was dissolved in Ac₂O (210 mL) and stirred at 130 °C for 5 h. Subsequently the reaction was cooled to 0 °C and EtOH (100 mL) was added. The mixture was stirred at 0 °C for 5 min and then for 15 min at room temperature. After removing the solvent *in vacuo*, the residue was taken up in EtOAc (200 mL) and washed with saturated aqueous NaHCO₃-solution. The organic phase was dried over Na₂SO₄, filtered and the solvent was removed *in vacuo* to give the product as brown oil.

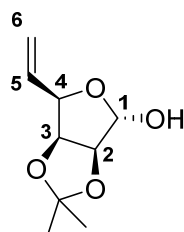
TLC [Isohexane/EtOAc (3:1)]: R_f = 0.44.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃, 27 °C): δ = 6.18 (bs, 1H; C1H), 5.97 (ddd, ³J_{H5,H6a} = 17.5, ³J_{H5,H6b} = 10.5 Hz, ³J_{H5,H4} = 7.3 Hz, 1H; C5H), 5.43 (dt, ³J_{H6a,H5} = 17.4 Hz, ²J_{H6a,H6b} = ⁴J_{H6a,H4} = 1.3 Hz, 1H; C6Ha), 5.35 (ddd, ³J_{H6b,H5} = 10.5 Hz, ²J_{H6b,H6a} = 1.4 Hz, ⁴J_{H6b,H4} = 0.9 Hz, 1H; C6Hb), 4.76 (dd, ³J_{H3,H2} = 5.8 Hz, ³J_{H3,H4} = 3.7 Hz, 1H; C3H), 4.71 (d, ³J_{H2,H3} = 5.8 Hz, 1H; C2H), 4.53 (dd, ³J_{H4,H5} = 7.3 Hz, ³J_{H4,H3} = 3.7 Hz, 1H; C4H), 2.07 (s, 3H; O₂CCH₃), 1.49 (s, 3H; C(CH₃)₂), 1.33 (s, 3H; C(CH₃)₂) ppm.

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃, 27°C): δ = 169.5 (O₂CCH₃), 131.5 (C5), 119.7 (C6), 113.2 (C(CH₃)₂), 100.6 (C1), 85.3 (C2), 83.3 (C4), 81.2 (C3), 26.1 (C(CH₃)₂), 25.0 (C(CH₃)₂), 21.1 (O₂CCH₃) ppm.

HRMS (ESI+) m/z: calc. for [C₁₁H₁₆O₅ + NH₄]⁺: 246.1336, found: 246.1337.

(2S,3S,4R)-2,3-O-Isopropylidene-4-vinylerythrofuranose [7] [24]



(2S,3S,4R)-1-O-Acetyl-2,3-O-isopropylidene-4-vinyl- α -D-erythrofuranose was dissolved in MeOH (250 mL) and potassium *tert*-butanolate (6.01 g, 53.6 mmol) was added at 0 °C. The mixture was stirred for 20 min at room temperature and then neutralized with HCl (2 M). The solution was then concentrated *in vacuo* and taken up in DCM and water. The aqueous phase was re-extracted with DCM (3 x 100 mL) and the combined organic phases were dried over Na₂SO₄, filtered and the solvent was removed *in vacuo*. The crude product was purified by column chromatography (Isohexane/EtOAc 6:1) to give the product (23.0 g, 124 mmol, 41% over 5 steps) as colorless solid.

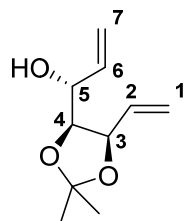
TLC [Isohexane/EtOAc (4:1)]: R_f = 0.20.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃, 27 °C): δ = 5.99 (ddd, ³J_{H5,H6b} = 17.5 Hz, ³J_{H5,H6a} = 10.4 Hz, ³J_{H5,H4} = 7.5 Hz, 1H; C5H), 5.41 (d, ³J_{H1,H2} = 2.4 Hz, 1H; C1H), 5.43 – 5.39 (m, 1H; C6Ha), 5.34 (ddd, ³J_{H6b,H5} = 10.4 Hz, ²J_{H6b,H6a} = 1.6 Hz, ⁴J_{H6b,H4} = 0.8 Hz, 1H; C6Hb), 4.73 (dd, ³J_{H3,H2} = 5.8 Hz, ³J_{H3,H4} = 3.7 Hz, 1H; C3H), 4.64 (d, ³J_{H2,H3} = 5.8 Hz, 1H; C2H), 4.61 (ddd, ³J_{H4,H5} = 7.4 Hz, ³J_{H4,H3} = 3.7 Hz, ⁴J_{H4,H6b} = 0.7 Hz, 1H; C4H), 2.70 (d, ³J_{C1-OH,H1} = 2.2 Hz, 1H; C1-OH), 1.47 (s, 3H; C(CH₃)₂), 1.32 (s, 3H; C(CH₃)₂) ppm.

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃, 27 °C): δ = 132.2 (C5), 119.2 (C6), 112.6 (C(CH₃)₂), 101.1 (C1), 85.8 (C2), 81.5 (2C; C4, C3), 26.0 (C(CH₃)₂), 24.8 (C(CH₃)₂) ppm.

HRMS (EI) m/z: calc. for [C₉H₁₄O₄]: 186.0892, found.: 186.0869.

(3R,4S,5R)-4,5-O-Isopropylidenehepta-1,6-dien-3,4,5-triol ^[7] [13]



Sodium hydride (14.9 g, 371 mmol, 2.00 eq., 60% dispersed on mineral oil) was suspended in THF (900 mL) and cooled to 0 °C. Subsequently DMSO (46.0 mL, 647 mmol, 3.00 eq.) was added dropwise and the mixture was stirred for 5 min at 0 °C and then for 1 h at room temperature. Methyl triphenylphosphonium bromide (155 g, 435 mmol, 2.00 eq.) was added at 0 °C and the suspension was stirred for 2 h at room temperature. A solution of (2S,3S,4R)-2,3-O-isopropylidene-4-vinyl- α -D-erythrofuranoose (40.3 g, 217 mmol, 1.00 eq) in THF (100 mL) was added at 0 °C. Subsequently the reaction mixture was stirred at 65 °C for 3 h. After cooling to room temperature the suspension was diluted with hexane and filtered over celite. The filter residue was washed with hexane (500 mL) and THF (300 mL) and the filtrate was concentrated *in vacuo*. The residue was taken up in water and *tert*-butyl methyl ether and the aqueous phase was extracted with *tert*-butyl methyl ether (3 x 150 mL). The combined organic phases were washed with saturated aqueous NaHCO₃-solution and brine. After drying over Na₂SO₄ and filtration the solvent was removed *in vacuo*. Column chromatographic purification (Isohexane/EtOAc 6:1 → 4:1) gave the product (28.4 g, 154 mmol, 71%) as light yellow oil.

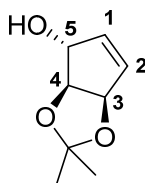
TLC [Isohexane/EtOAc (6:1)]: R_f = 0.22.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃, 27 °C): δ = 6.00 (ddd, ³J_{H6,H7a} = 17.2 Hz, ³J_{H6,H7b} = 10.3 Hz, ³J_{H6,H5} = 7.9 Hz, 1H; C6H), 5.84 (ddd, ³J_{H2,H1a} = 17.2 Hz, ³J_{H2,H1b} = 10.5 Hz, ³J_{H2,H3} = 5.4 Hz, 1H; C2H), 5.37 (dt, ³J_{H1a,H2} = 17.2 Hz, ²J_{H1a,H1b} = ⁴J_{H1a,H3} = 1.5 Hz, 1H; C1Ha), 5.35 (ddd, ³J_{H7a,H6} = 17.2 Hz, ²J_{H7a,H7b} = 1.5 Hz, ⁴J_{H7a,H5} = 1.1 Hz, 1H; C7Ha), 5.28 (ddd, ³J_{H7b,H6} = 10.3 Hz, ⁴J_{H7b,H7a} = 1.5 Hz, ⁴J_{H7b,H5} = 0.9 Hz, 1H; C7Hb), 5.22 (dt, ³J_{H1b,H2} = 10.6 Hz, ²J_{H1b,H1a} = ⁴J_{H1b,H3} = 1.5 Hz, 1H; C1Hb), 4.59 (ddt, ³J_{H5,H6} = 7.7 Hz, ³J_{H5,H4} = 6.7 Hz, ⁴J_{H5,H7a} = ⁴J_{H5,H7b} = 0.9 Hz, 1H; C5H), 4.13 – 4.09 (m, 1H; C3H), 4.07 (dd, ³J_{H4,H5} = 6.5 Hz, ³J_{H4,H3} = 5.5 Hz, 1H; C4H), 2.37 (d, ³J_{C3-OH,H3} = 5.2 Hz, 1H; C3-OH), 1.52 (s, 3H; C(CH₃)₂), 1.38 (s, 3H; C(CH₃)₂) ppm.

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃, 27 °C): δ = 136.7 (C2), 133.9 (C6), 119.4 (C7), 117.0 (C1), 108.8 (C(CH₃)₂), 80.6 (C4), 78.9 (C5), 70.5 (C3), 27.4 (C(CH₃)₂), 25.0 (C(CH₃)₂) ppm.

HRMS (ESI+) m/z: calc. for [C₁₀H₁₆O₃ + NH₄]⁺: 202.1438 found: 202.1439.

(3R,4S,5R)-4,5-O-Isopropylidene-cyclopent-1-en-3,4,5-triol [7] [14]



(3R,4S,5R)-4,5-O-Isopropylidenehepta-1,6-dien-3,4,5-triol (5.00 g, 27.1 mmol, 1.00 eq.) was dissolved in DCM (85 mL) and Grubbs-I-catalyst (115 mg, 0.140 mmol, 0.005 eq.) was added. The solution was stirred at room temperature for 26 h and the solvent was removed *in vacuo*. Column chromatographic purification (Isohexane/EtOAc 3:1 → 2:1) gave the product (4.12 g, 26.3 mmol, 97%) as colorless oil.

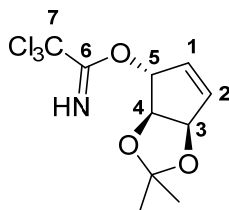
TLC [Isohexane/EtOAc (3:1)]: $R_f = 0.10$.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3 , 27 °C): $\delta = 6.01 - 5.99$ (m, 1H; C2H), 5.89 – 5.86 (m, 1H; C1H), 5.27 (dtd, $^3J_{\text{H3,H4}} = 5.7$ Hz, $^3J_{\text{H3,H2}} = ^4J_{\text{H3,H1}} = 1.7$ Hz, $^5J_{\text{H3,H5}} = 1.0$ Hz, 1H; C3H), 4.76 (bs, 1H; C5H), 4.49 (d, $^3J_{\text{H4,H5}} = 5.7$ Hz, 1H; C4H), 2.58 (bs, 1H; C5-OH), 1.38 (s, 3H; C(CH₃)₂), 1.33 (s, 3H; C(CH₃)₂) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3 , 27 °C): $\delta = 135.4$ (C2), 134.7 (C1), 111.7 (C(CH₃)₂), 85.9 (C4), 84.2 (C3), 80.9 (C5), 27.3 (C(CH₃)₂), 25.7 (C(CH₃)₂) ppm.

HRMS (ESI⁻) m/z : calc. for [C₈H₁₁O₁₃ + HCO₂]⁻: 201.0768, found: 201.0771.

(3R,4S,5R)-3-O-Trichloacetimidoyl-4,5-O-isopropylidencyclopent-1-en-3,4,5-triol ^[8] [25]



(3R,4S,5R)-4,5-O-Isopropylidencyclopent-1-en-3,4,5-triol (3.50 g, 19.2 mmol, 1.00 eq.) was dissolved in DCM (60 mL) and DBU (4.73 mL, 25.0 mmol, 1.30 eq.) and trichloroacetonitrile (2.89 mL, 28.8 mmol, 1.50 eq.) were added at 0 °C. The solution was stirred for 5 min at 0 °C and then for 15 min at room temperature. The reaction was stopped by adding saturated aqueous NaHCO₃-solution. The aqueous phase was extracted with DCM (4 x 150 mL) and the combined organic phases were dried over Na₂SO₄, filtered and the solvent was removed *in vacuo*. Column chromatographic purification (Isohexane/EtOAc 10:1) gave the product (4.67 g, 15.4 mmol, 80%) as colorless solid.

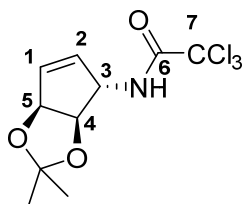
TLC [Isohexane/EtOAc (10:1)]: R_f = 0.38.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃, 27 °C): δ = 8.47 (bs, 1H; NH), 6.22 – 6.19 (m, 1H; C2H), 6.03 (dtd, ³J_{H1,H2} = 5.9 Hz, ³J_{H1,H5} = ⁴J_{H1,H3} = 1.8 Hz, ⁴J_{H1,H4} = 0.8 Hz, 1H; C1H), 5.76 (bs, 1H; C5H), 5.32 (ddd, ³J_{H3,H4} = 5.8 Hz, ³J_{H3,H1} = 2.6 Hz, ⁴J_{H3,H2} = 1.7 Hz, 1H; C3H), 4.69 (d, ³J_{H4,H5} = 5.8 Hz, 1H; C4H), 1.44 (s, 3H; C(CH₃)₂), 1.37 (s, 3H; C(CH₃)₂) ppm.

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃, 27 °C): δ = 162.0 (C6), 138.4 (C2), 130.7 (C1), 112.4 (C(CH₃)₂), 91.1 (C7), 87.6 (C5), 84.0 (C3), 82.8 (C4), 27.3 (C(CH₃)₂), 25.7 (C(CH₃)₂) ppm.

HRMS (ESI+) m/z: calc. for [C₁₀H₁₂NO₃Cl₃ + H]⁺: 299.9956, found: 299.9959.

(3S,4R,5S)-3-Trichloroacetyl-amino-4,5-O-isopropylidencyclopent-1-en-4,5-diol ^[8] [15]



(3R,4S,5R)-3-O-Trichloacetimidoyl-4,5-O-isopropylidencyclopent-1-en-3,4,5-triol (4.63 g, 15.4 mmol) was dissolved in *o*-xylene (140 mL). The solution was degassed by freeze-pump-thaw (3x) and was then stirred for 3.5 h at 150 °C. After removing the solvent *in vacuo* and column chromatographic purification (Isohexane/EtOAc 1:7 → 1:3) the product (4.34 g, 14.4 mmol, 94%) was received as a colorless solid.

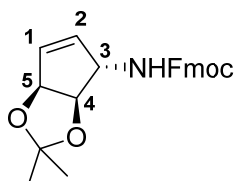
TLC [Isohexane/EtOAc (7:1)]: $R_f = 0.15$.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, 27 °C): $\delta = 6.68 - 6.57$ (m, 1H; NH), 6.13 (dtd, $^3J_{H1,H2} = 5.7$ Hz, $^4J_{H1,H3} = ^3J_{H1,H5} = 1.1$ Hz, $^4J_{H1,H4} = 0.5$ Hz, 1H; C1H), 5.82 (ddt, $^3J_{H2,H1} = 5.7$ Hz, $^3J_{H2,H3} = 2.5$ Hz, $^4J_{H2,H4} = ^4J_{H2,H5} = 0.9$ Hz, 1H; C2H), 5.32 (dtd, $^3J_{H5,H4} = 5.7$ Hz, $^3J_{H5,H1} = ^4J_{H5,H2} = 1.7$ Hz, $^5J_{H5,H3} = 1.0$ Hz, 1H; C5H), 4.83 (ddtd, $^3J_{H3,NH} = 7.6$ Hz, $^3J_{H3,H2} = 2.5$ Hz, $^3J_{H3,H4} = ^4J_{H3,H1} = 1.6$ Hz, $^5J_{H5,H3} = 0.9$ Hz, 1H; C3H), 4.58 – 4.54 (m, 1H; C4H), 1.43 (s, 3H; C(CH₃)₂), 1.35 (s, 3H; C(CH₃)₂) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃, 27 °C): $\delta = 161.5$ (C6), 137.1 (C1), 130.5 (C2), 112.0 (C(CH₃)₂), 92.2 (C6), 84.4 (C5), 83.7 (C4), 63.1 (C3), 27.3 (C(CH₃)₂), 25.7 (C(CH₃)₂) ppm.

HRMS (ESI+) m/z : calc. for [C₁₀H₁₂NO₃Cl₃ + NH₄]⁺: 317.0216, found.: 317.0224.

(3S,4R,5S)-(N-(9H-Fluoren-9-yl)methoxycarbonyl)-4,5-O-isopropylidencyclopent-1-en-4,5-diol
[26]



To a solution of (3S,4R,5S)-3-Trichloroacetyl-amino-4,5-O-isopropylidencyclopent-1-en-4,5-diol (6.03 g, 20.1 mmol, 1.0 eq.) in methanol (200 mL) aqueous NaOH (2M, 135 mL) was added and the solution was stirred at room temperature for 14 h. Subsequently the solution was neutralized with HCl (2M) and the solvent was removed *in vacuo*. The residue was taken up in 1,4-dioxane (150 mL), saturated aqueous NaHCO₃-solution (30 mL) and water (20 mL) and Fmoc-OSu (8.88 g, 26.3 mmol, 1.30 eq.) was added at 0 °C. The suspension was stirred for 30 min at 0 °C and then for 2.5 h at room temperature. The suspension was then diluted with water (200 mL) and the aqueous phase was extracted with EtOAc (3 x 150 mL). After drying the combined organic phases over Na₂SO₄ and filtration the solvent was removed *in vacuo*. Column chromatographic purification (Isohexane/EtOAc 3:1) gave the product (6.04 g, 16.0 mmol, 80%) as colorless solid.

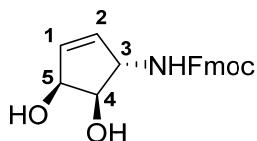
TLC [Isohexane/EtOAc (3:1)]: R_f = 0.17.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, 27 °C): δ = 7.79 – 7.74 (m, 2H; C4''H), 7.64 – 7.55 (m, 2H; C1''H), 7.40 (t, ³J_{H3'',H2''} = ³J_{H3'',H4''} = 7.2 Hz, 2H; C3''H), 7.32 (td, ³J_{H2'',H1''} = ³J_{H2'',H3''} = 7.4 Hz, ⁴J_{H2'',H4''} = 1.2 Hz, 2H; C2''H), 6.02 – 5.97 (m, 1H; C1'H), 5.79 – 5.73 (m, 1H; C2'H), 5.26 – 5.19 (m, 1H; C5'H), 4.83 – 4.74 (m, 1H; NH), 4.69 – 4.63 (m, 1H; C3'H), 4.50 – 4.43 (m, 3H; OCH₂CH, C4'H), 4.26 – 4.18 (m, 1H; OCH₂CH), 1.43 (s, 3H; CH₃), 1.35 (s, 3H; CH₃) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃, 27 °C): δ = 155.6 (NHCO), 143.8 (2C; C4''b), 141.3 (2C; C4''a), 135.5 (C1'), 132.0 (C2'), 127.7 (2C; C3''), 127.0 (2C; C2''), 124.9 (2C; C1''), 120.0 (C4''), 119.9 (C4''), 111.6 (C(CH₃)₂), 84.7 (C4'), 84.3 (C5'), 66.6 (OCH₂CH), 62.7 (C3'), 47.2 (OCH₂CH), 27.3 (CH₃), 25.7 (CH₃) ppm.

HRMS (ESI+) m/z: calc. for [C₂₃H₂₃O₄N + Na]⁺: 400.1519, found: 400.1519.

(3S,4R,5S)-((N-(9H-Fluoren-9-yl)methoxycarbonyl))-cyclopent-1-ene-4,5-diol [27]



(3S,4R,5S)-((N-(9H-Fluoren-9-yl)methoxycarbonyl))-4,5-O-isopropylidene-cyclopent-1-en-4,5-diol (3.56 g, 9.44 mmol) was dissolved in glacial acetic acid (60 mL), water (12 mL) and EtOAc (21 mL). The solution was stirred at 50 °C for 24 h. After removing the solvent *in vacuo*, column chromatographic purification (DCM → DCM/MeOH 10:1) gave the product (2.81 g, 8.33 mmol, 88%) as colorless solid.

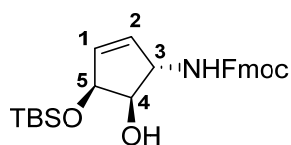
TLC [DCM/MeOH (10:1)]: $R_f = 0.47$.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6 , 27 °C): $\delta = 7.89$ (d, $^3J_{\text{H}4'',\text{H}3''} = 7.5$ Hz, 2H; C4''H), 7.71 (d, $^3J_{\text{H}1'',\text{H}2''} = 7.4$ Hz, 2H; C1''H), 7.47 – 7.39 (m, 3H; NH, C3''H), 7.37 – 7.30 (m, 2H; C2''H), 5.87– 5.82 (m, 1H; C1'H), 5.72 (dd, $^3J_{\text{H}2',\text{H}1'} = 6.1$ Hz, $^4J_{\text{H}2',\text{H}5'} = 1.4$ Hz, 1H; C2'H), 4.65 (d, $^3J_{\text{C}5'-\text{OH},\text{H}5} = 6.0$ Hz, 1H; C5'-OH), 4.60 (d, $^3J_{\text{C}4'-\text{OH},\text{H}4'} = 6.9$ Hz, 1H; C4'-OH), 4.40 – 4.28 (m, 4H; C3'H, C5'H, OCH₂CH), 4.26 – 4.19 (m, 1H; OCH₂CH), 3.77 (dt, $^3J_{\text{H}4',\text{C}4'-\text{OH}} = 6.5$ Hz, $^3J_{\text{H}4',\text{H}5'} = ^3J_{\text{H}4',\text{H}3'} = 5.6$ Hz, 1H; C4'H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6 , 27 °C): $\delta = 156.0$ (NHCO), 143.9 (2C; C4''b), 140.7 (2C; C4''a), 134.9 (C2'), 133.7 (C1'), 127.6 (2C; C3''), 127.0 (2C; C2''), 125.2 (2C; C1''), 120.1 (2C; C4''), 75.7 (C4'), 72.5 (C5'), 65.3 (OCH₂CH), 61.4 (C3'), 46.7 (OCH₂CH) ppm.

HRMS (ESI+) m/z : calc. for [C₂₀H₁₉O₄N + Na]⁺: 360.1206, found: 360.1206.

(3S,4R,5S)-(N-(9H-Fluoren-9-yl)methoxycarbonyl)-5-O-tert-butylidimethylsilylcyclopent-1-en-4,5-diol [5]



(3S,4R,5S)-((N-(9H-Fluoren-9-yl)methoxycarbonyl))-cyclopent-1-ene-4,5-diol (2.81 g, 8.34 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in DMF (50 mL) and cooled to $-55\text{ }^{\circ}\text{C}$. TBS-OTf (2.30 mL, 9.81 mmol, 1.2 eq.) was added and the solution was stirred at $-55\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 15 min. Subsequently the solution was poured into saturated aqueous NaHCO_3 -solution (500 mL) and the resulting suspension was extracted with DCM (4 x 100 mL). The combined organic phases were dried over Na_2SO_4 , filtered and the solvent was removed *in vacuo*. Column chromatographic purification (Isohexane/EtOAc 7:1) gave the product (2.37 g, 5.25 mmol, 63%) as colorless foam.

TLC [Isohexane/EtOAc (1:1)]: $R_f = 0.67$.

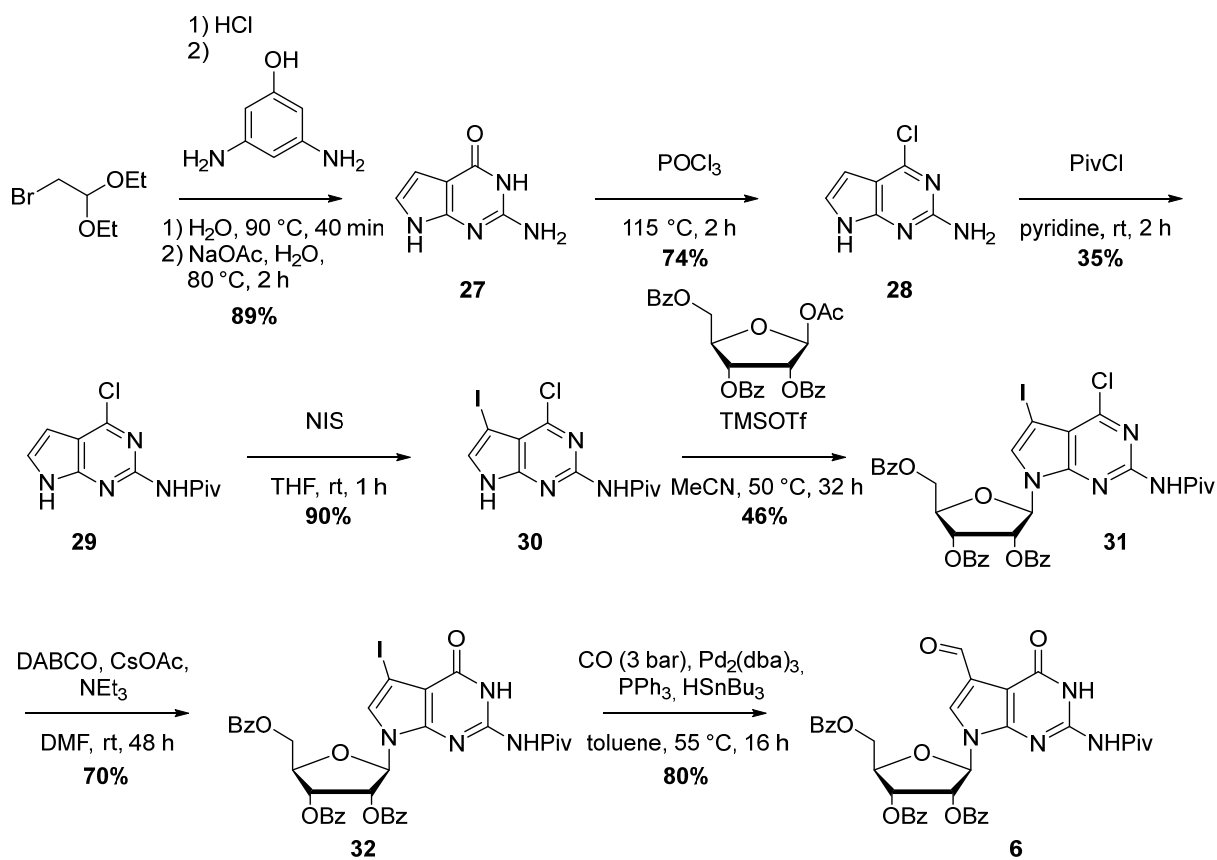
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO-d_6 , $27\text{ }^{\circ}\text{C}$): $\delta = 7.89$ (d, $^3J_{\text{H}4'',\text{H}3''} = 7.5$ Hz, 2H; C4''H), 7.71 (d, $^3J_{\text{H}1'',\text{H}2''} = 7.5$ Hz, 2H; C1''H), 7.45 (d, $^3J_{\text{NH},\text{H}3'} = 8.4$ Hz, 1H; NH), 7.42 (t, $^3J_{\text{H}3'',\text{H}2''} = ^3J_{\text{H}3'',\text{H}4''} = 7.4$ Hz, 2H; C3''H), 7.33 (t, $^3J_{\text{H}2'',\text{H}1''} = ^3J_{\text{H}2',\text{H}3'} = 7.4$ Hz, 2H; C2''H), 5.85 (dt, $^3J_{\text{H}1',\text{H}2'} = 6.0$ Hz, $^3J_{\text{H}1',\text{H}5'} = ^4J_{\text{H}1,\text{H}3} = 2.2$ Hz, 1H; C1'H), 5.76 (dd, $^3J_{\text{H}2',\text{H}1'} = 6.1$ Hz, $^4J_{\text{H}2',\text{H}5'} = 1.5$ Hz, 1H; C2'H), 4.49 (dd, $^3J_{\text{H}5',\text{H}4'} = 5.0$ Hz, $^4J_{\text{H}5',\text{H}2'} = 2.0$ Hz, 1H; C5'H), 4.36 (m, 1H; C3'H), 4.31 (m, 3H; OCH_2CH , C4'-OH), 4.22 (t, $^3J_{\text{OCH}_2\text{CH},\text{OCH}_2\text{CH}} = 6.9$ Hz, 1H; OCH_2CH), 3.75 (m, 1H; C4'H), 0.87 (s, 9H; $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 0.08 (s, 3H; SiCH_3), 0.06 (s, 3H; SiCH_3) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, DMSO-d_6 , $27\text{ }^{\circ}\text{C}$): $\delta = 156.1$ (NHCO), 143.9 (C4''b), 143.8 (C4''b), 140.7 (2C; C4''a), 135.9 (C2'), 132.9 (C1'), 127.6 (2C; C3''), 127.0 (2C; C2''), 125.1 (2C; C1''), 120.1 (2C; C4''), 75.8 (C4'), 74.3 (C5'), 65.3 (OCH_2CH), 60.8 (C3'), 46.7 (OCH_2CH), 25.9 (3C; $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 18.1 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), -4.6 (SiCH_3), -4.6 (SiCH_3) ppm.

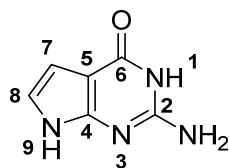
$^{29}\text{Si-NMR}$ (80 MHz, CDCl_3 , $27\text{ }^{\circ}\text{C}$): $\delta = 22.49$ ppm.

HRMS (ESI+) m/z : calc. for $[\text{C}_{26}\text{H}_{33}\text{NO}_4\text{Si} + \text{Na}]^+$: 474.2071, found: 474.2070.

Synthesis of precursor 6



7-Desazaguanine ^[9] [27]

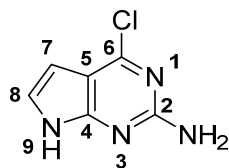


Bromacetaldehyde diethylacetal (64.2 mL, 427 mmol, 1.0 eq.) was suspended in water (210 mL) and concentrated aqueous HCl (9 mL) was added. After stirring for 40 min at 90 °C a colorless solution was obtained to which sodium acetate (40.8 g, 497 mmol, 1.20 eq.) was added after cooling to room temperature. The solution was then added to a suspension of 2,6-Diamino-4-pyrimidinone (60.2 g, 477 mmol, 1.10 eq.) and sodium acetate (21.1 g, 257 mmol, 0.60 eq.) in water (450 mL). The resulting solution was stirred for 2 h at 80 °C. The product precipitated as light red solid, which was filtered off and washed with cold water and acetone. After drying the product at 55 °C on high vacuum the product (56.8 g, 378 mmol, 89%) was obtained as light red solid.

¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 10.81 (s, 1H, NH), 10.11 (s, 1H, NH), 6.45 (dd, ³*J*_{C7H-C8H} = 3.4 Hz, *J*₂ = 2.2 Hz, 1H, C7H), 6.03 (dd, ³*J*_{C7H-C8H} = 3.4 Hz, *J*₂ = 2.2 Hz, 1H, C8H), 5.90 (s, 2H, NH₂) ppm.

HRMS (EI+) *m/z*: calc. for [C₆H₆N₄O]⁺: 150.0542, found: 150.0544.

6-Desoxy-6-chloro-7-desazaguanin ^[9] [28]



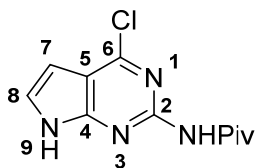
7-Desazaguanine (15.92 g, 106 mmol, 1.0 eq.) was suspended in POCl₃ (130 mL) and heated to 115 °C for 2 h. The Suspension was cooled to room temperature and POCl₃ was removed *in vacuo*. Ice and ice water were added slowly to the residue and the pH was adjusted to pH = 4 with concentrated aqueous ammonia. After stirring for 30 min at 0 °C the precipitate was filtered off, washed with ice-cold water and diethyl ether and dried at 55 °C on high vacuum. The product (13.3 g, 78.7 mmol, 74%) was obtained as yellow-beige solid.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆, 27 °C): δ = 11.48 (bs, 1H; NH), 7.08 (d, ³J_{H8,H7} = 3.6 Hz, 1H; C8H), 6.47 (bs, 2H; NH₂), 6.24 (d, ³J_{H7,H8} = 3.6 Hz, 1H; C7H) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆, 27 °C): δ = 159.3 (C2), 154.6 (C4), 150.9 (C6), 123.2 (C8), 108.6 (C5), 98.6 (C7) ppm.

HRMS (ESI+) *m/z*: calc. for [C₆H₅N₄Cl + H]⁺: 169.0276, found: 169.0276.

6-Desoxy-6-chloro-2-pivaloylamino-7-desazaguanine ^[9] [29]



6-Desoxy-6-chloro-7-desazaguanine (11.9 g, 70.3 mmol, 1.0 eq.) was suspended in pyridine (167 mL) and Pivaloylchloride (30.3 mL, 246 mmol, 3.5 eq.) was added dropwise. The reaction mixture was stirred for 2 h at room temperature. Subsequently the solvent was removed *in vacuo* and the residue was taken up in DCM (1 L) and washed with HCl (0.1M, 2 × 500 mL). The combined organic phases were dried over MgSO₄, filtered and the solvent was removed *in vacuo*. Column chromatographic purification (DCM/MeOH 98:2) gave the product (6.22 g, 24.6 mmol, 35%) as yellow solid.

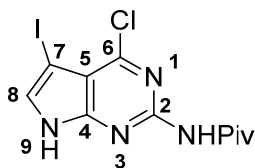
TLC [DCM/MeOH (15:1)]: R_f = 0.45.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆, 27 °C): δ = 12.32 (bs, 1H; NH), 10.02 (s, 1H; NHCO), 7.53 (dd, ³J_{H₈,H₇} = 3.3 Hz, ³J_{H₈,NH} = 2.5 Hz, 1H; C8H), 6.52 (dd, ³J_{H₇,H₈} = 3.5 Hz, ⁴J_{H₇,NH} = 1.8 Hz, 1H; C7H), 1.23 (s, 9H; C(CH₃)₃) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆, 27 °C): δ = 175.8 (NHCO), 152.7 (C6), 151.3 (C2), 150.2 (C4), 127.3 (C8), 113.2 (C5), 98.8 (C7), 39.3 (C(CH₃)₃), 26.9 (3C; C(CH₃)₃) ppm.

HRMS (ESI+) m/z: calc. for [C₁₁H₁₃N₄ClO + Na]⁺: 275.0670, found: 275.0670.

6-Desoxy-6-chloro-7-iodo-2-pivaloylamino-7-desazaguanine ^[9] [30]



6-Desoxy-6-chloro-2-pivaloylamino-7-desazaguanine (3.68 g, 14.6 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in THF (70 mL) and the flask was covered with aluminum foil. *N*-Iodosuccinimide (3.61 g, 16.1 mmol, 1.10 eq.) was added and the solution was stirred for 1 h at room temperature. After removing the solvent *in vacuo* the residue was taken up in DCM (300 mL) and washed with water (2 x 150 mL). The combined organic phases were dried over MgSO₄ and the solvent was removed *in vacuo*. Column chromatographic purification (DCM/MeOH 99:1) gave the product (4.98 g, 13.2 mmol, 90%) as yellow solid.

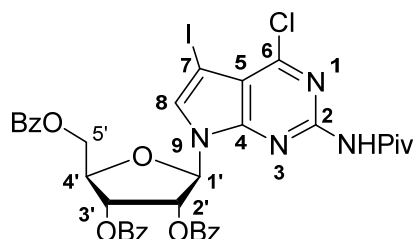
TLC [DCM/MeOH (15:1)]: R_f = 0.56.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, 27 °C): δ = 12.69 (d, ³J_{NH,H8} = 1.7 Hz, 1H; NHCH), 10.09 (s, 1H; NHCO), 7.76 (d, ³J_{H8,NH} = 2.4 Hz, 1H; C8H), 1.22 (s, 9H; C(CH₃)₃) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆, 27 °C): δ = 175.8 (NHCO), 152.5 (C6), 151.4 (C2), 150.7 (C4), 132.7 (C8), 112.3 (C5), 51.6 (C7), 39.4 (C(CH₃)₃), 26.8 (3C; C(CH₃)₃) ppm.

HRMS (ESI+) m/z: calc. for [C₁₁H₁₂N₄OCII + H]⁺: 378.9817, found: 378.9816.

2',3',5'-Tri-*O*-benzoyl-2-*N*-pivaloyl-6-desoxy-6-chloro-7-iodo-7-desazaguanosine ^[9] [31]



6-Desoxy-6-chloro-7-iodo-2-pivaloylamino-7-desazaguanine (4.45 g, 11.8 mmol, 1.0 eq.) was suspended in acetonitrile (82 mL) and *N,O*-Bistrimethylsilylacetamide (3.45 mL, 14.1 mmol, 1.2 eq.) was added. After stirring for 10 min at room temperature TMSOTf (2.77 mL, 15.3 mmol, 1.30 eq) was added and the mixture was stirred at 50 °C. 1-*O*-Acetyl-2,3,5-tri-*O*-benzoyl- β -D-ribofuranose (11.9 g, 23.6 mmol, 2.00 eq.) was added over a course of 24 h in three portions and the mixture was left stirring for another 8 h at 50 °C. The solution was diluted with DCM (1 L) and washed with saturated aqueous NaHCO₃-solution and brine. The organic phase was dried over MgSO₄, filtered and the solvent was removed in vacuo. Column chromatographic purification (Isohexane/EtOAc 4:1) gave the product (4.46 g, 5.42 mmol, 46%) as yellow foam.

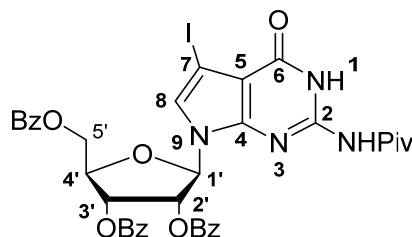
TLC [Isohexane/EtOAc (3:1)]: R_f = 0.24.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃, 27 °C): δ = 8.25 (s, 1H; NHCO), 8.01 – 7.94 (m, 6H; ArH), 7.58 – 7.52 (m, 3H; ArH), 7.44 – 7.34 (m, 6H; ArH), 7.38 (s, 1H; C8H), 6.50 (t, ³J_{H3',H2'} = 3J_{H3',H4'} = 6.0 Hz, 1H; C3'H), 6.41 (d, ³J_{H1',H2'} = 3.9 Hz, 1H; C1'H), 6.25 (dd, ³J_{H2',H3'} = 5.8 Hz, ³J_{H2',H1'} = 3.9 Hz, 1H; C2'H), 4.88 (dd, ²J_{H5'a,H5'b} = 12.2 Hz, ³J_{H5'a,H4'} = 3.4 Hz, 1H; C5'Ha), 4.82 – 4.79 (m, 1H; C4'H), 4.69 (dd, ²J_{H5'b,H5'a} = 12.2 Hz, ³J_{H5'b,H4'} = 4.4 Hz, 1H; C5'Hb), 1.31 (s, 9H; C(CH₃)₃) ppm.

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃, 27 °C): δ = 175.1 (COC(CH₃)₃), 166.1 (ArCO), 165.4 (ArCO), 165.2 (ArCO), 153.3 (C6), 151.5 (C4), 151.4 (C2), 133.6 (Ar), 133.5 (Ar), 133.3 (Ar), 132.0 (C8), 129.9 (2C; Ar), 129.8 (2C; Ar), 129.7 (2C; Ar), 129.5 (2C; Ar), 129.3 (Ar), 128.8 (Ar), 128.6 (2C, Ar), 128.4 (3C; Ar), 114.1 (C5), 88.3 (C1'), 80.0 (C4'), 74.5 (C2'), 71.3 (C3'), 63.4 (C5'), 53.5 (C7), 40.2 (C(CH₃)₃), 27.3 (3C; C(CH₃)₃) ppm.

HRMS (ESI+) *m/z*: calc. for [C₃₇H₃₂O₈N₄ClI + H]⁺: 823.1026, found: 823.1028.

2',3',5'-Tri-O-benzoyl-2-N-pivaloyl-7-iodo-7-desazaguanosin ^[9] [32]



2',3',5'-Tri-O-benzoyl-2-N-pivaloyl-6-desoxy-6-chloro-7-iodo-7-desazaguanosine (4.35 g, 5.28 mmol, 1.00 eq.) was dissolved in DMF (16 mL) and the flask was covered with aluminum foil. CsOAc (3.04 g, 15.9 mmol, 3.00 eq.), 1,4-Diaza[2.2.2]bicyclooctane (600 mg, 5.34 mmol, 1.00 eq.) and triethylamine (2.23 mL, 16.0 mmol, 3.00 eq.) were added and the solution was stirred for 48 h at room temperature. Water (20 mL) was added and stirring continued for another 30 min at room temperature. EtOAc and brine were added and the phases were separated. The aqueous phase was re-extracted with EtOAc (200 mL). The combined organic phases were washed with brine, dried over MgSO₄, filtered and the solvent was removed *in vacuo*. Column chromatographic purification (Isohexane/EtOAc 2:1) gave the product (3.00 g, 3.73 mmol, 70%) as colorless foam.

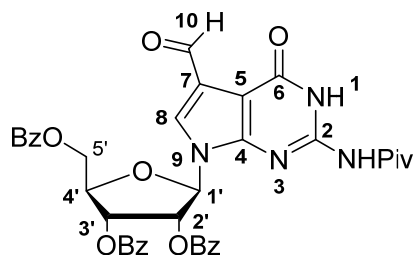
TLC [Isohexane/EtOAc (1:1)]: R_f = 0.40.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃, 27 °C): δ = 11.56 (s, 1H; NHCO), 8.76 (s, 1H; NHCO(CH₃)₃), 8.00 – 7.97 (m, 2H; ArH), 7.92 – 7.89 (m, 2H; ArH), 7.78 – 7.75 (m, 2H; ArH), 7.62 – 7.53 (m, 3H; ArH), 7.46 – 7.42 (m, 2H; ArH), 7.40 – 7.32 (m, 4H; ArH), 6.96 (s, 1H; C8H), 6.85 (dd, ³J_{H3',H4'} = 8.4 Hz, ³J_{H3',H2'} = 5.0 Hz, 1H; C3'H), 6.46 (dd, ³J_{H2',H3'} = 5.0 Hz, ³J_{H2',H1'} = 1.7 Hz, 1H; C2'H), 6.01 (d, ³J_{H1',H2'} = 1.7 Hz, 1H; C1'H), 4.77 (dt, ³J_{H4',H3'} = 8.4 Hz, ³J_{H4',H5'a} = ³J_{H4',H5'b} = 3.0 Hz, 1H; C4'H), 4.72 (dd, ²J_{H5'a,H5'b} = 12.5 Hz, ³J_{H5'a,H4'} = 2.9 Hz, 1H; C5'Ha), 4.64 (dd, ²J_{H5'b,H5'a} = 12.5 Hz, ³J_{H5'b,H4'} = 3.2 Hz, 1H; C5'Hb), 1.35 (s, 9H; C(CH₃)₃) ppm.

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃, 27 °C): δ = 180.1 (COC(CH₃)₃), 166.0 (2C; ArCO), 165.1 (ArCO), 156.6 (C6), 146.4 (C2), 146.2 (C4), 133.7 (2C; Ar), 133.5 (Ar), 129.8 (2C; Ar), 129.7 (2C; Ar), 129.2 (2C; Ar), 128.9 (Ar), 128.7 (Ar), 128.6 (3C; Ar), 128.5 (2C; Ar), 128.4 (2C; Ar), 127.1 (C8), 106.5 (C5), 89.3 (C1'), 78.5 (C4'), 74.4 (C2), 70.5 (C3'), 61.4 (C5'), 56.0 (C7), 40.2 (COC(CH₃)₃), 26.8 (3C; C(CH₃)₃) ppm.

HRMS (ESI+) *m/z*: calc. for [C₃₇H₃₃O₉N₄ + H]⁺: 805.1365, found: 805.1375.

2',3',5'-Tri-O-benzoyl-2-N-pivaloyl-7-formyl-7-desazaguanosine [9] [6]



2',3',5'-Tri-O-benzoyl-2-N-pivaloyl-7-iodo-7-desazaguanosine (810 mg, 1.00 mmol, 1.00 eq.), triphenylphosphine (160 mg, 600 μmol , 0.60 eq.) and $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (94.0 mg, 100 μmol , 0.10 eq.) were dissolved in toluene (12.5 mL). The flask was flushed three times with CO gas and a CO-atmosphere of 3.5 bar was maintained in the flask. The solution was stirred at 55 °C and tributyltin hydride (330 μL , 1.20 mmol, 1.2 eq) in toluene (0.33 mL) was added over a course of 16 h with a syringe pump. The crude reaction mixture was filtered through a flash column (EtOAc) and the solvent was removed *in vacuo*. Column chromatographic purification (Isohexane/EtOAc 2:1) gave the product (570 mg, 810 μmol , 80%) as brown foam.

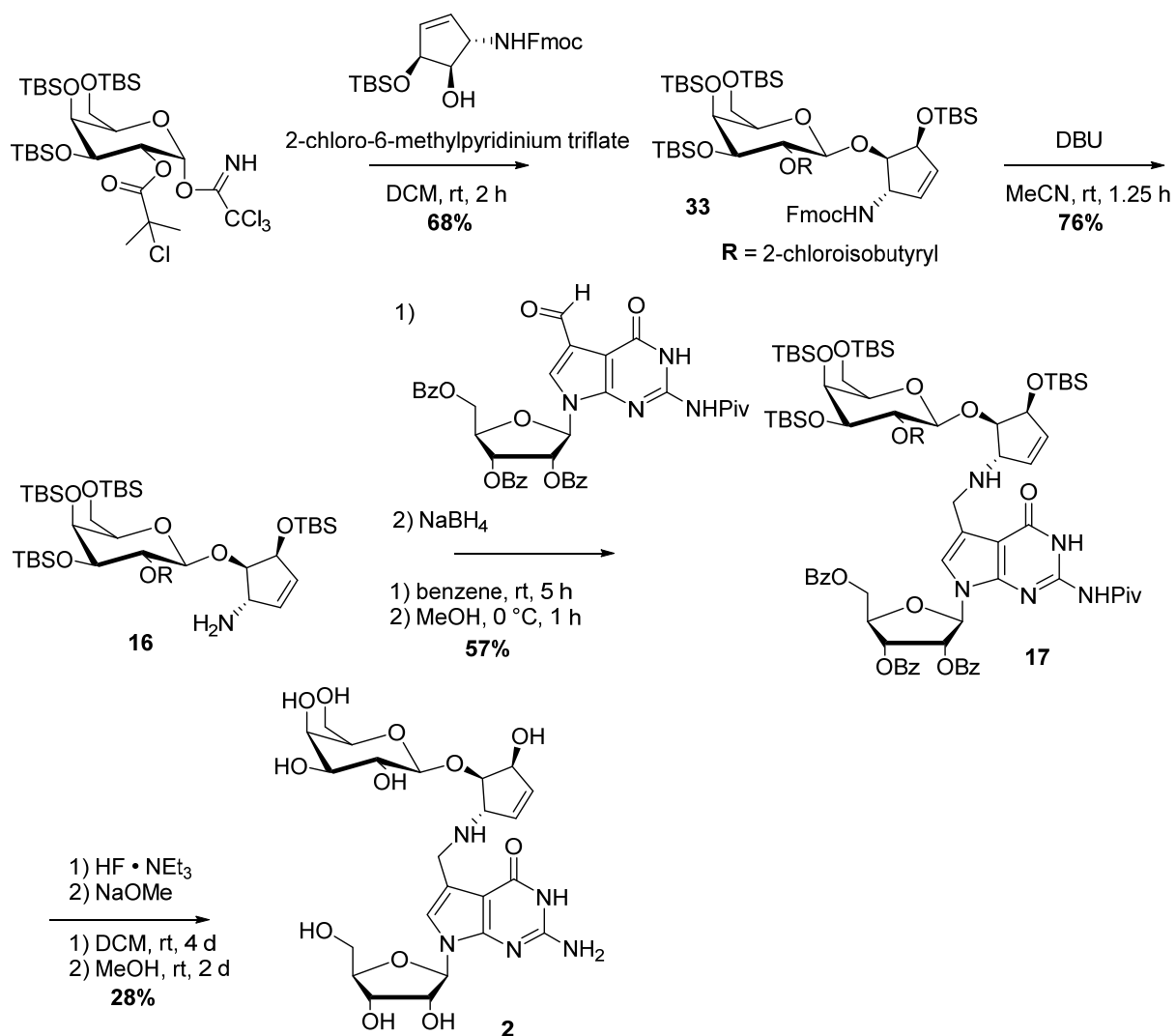
TLC [Isohexane/EtOAc (1:1)]: $R_f = 0.28$.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3 , 27 °C): $\delta = 11.79$ (s, 1H; NHCO), 10.37 (s, 1H; CHO), 8.84 (s, 1H; NHCO $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 8.00 – 7.97 (m, 2H; ArH), 7.93 – 7.89 (m, 2H; ArH), 7.78 – 7.74 (m, 2H; ArH), 7.65 – 7.52 (m, 3H; ArH), 7.61 (s, 1H; C8H), 7.47 – 7.43 (m, 2H; ArH), 7.41 – 7.35 (m, 2H; ArH), 7.36 – 7.31 (m, 2H; ArH), 6.89 (dd, $^3J_{\text{H}3,\text{H}4'} = 8.4$ Hz, $^3J_{\text{H}3',\text{H}2'} = 5.0$ Hz, 1H; C3'H), 6.50 (dd, $^3J_{\text{H}2',\text{H}3'} = 5.0$ Hz, $^3J_{\text{H}2',\text{H}1'} = 1.7$ Hz, 1H; C2'H), 6.07 (d, $^3J_{\text{H}1',\text{H}2'} = 1.7$ Hz, 1H; C1'H), 4.82 (dt, $^3J_{\text{H}4',\text{H}3'} = 8.4$ Hz, $^3J_{\text{H}4',\text{H}5'a} = ^3J_{\text{H}4',\text{H}5'b} = 3.3$ Hz, 1H; C4'H), 4.76 (dd, $^2J_{\text{H}5'a,\text{H}5'b} = 12.5$ Hz, $^3J_{\text{H}5'a,\text{H}4'} = 3.2$ Hz, 1H; C5'Ha), 4.67 (dd, $^2J_{\text{H}5'b,\text{H}5'a} = 12.5$ Hz, $^3J_{\text{H}5'b,\text{H}4'} = 3.4$ Hz, 1H; C5'Hb), 1.38 (s, 9H; C(CH $_3$) $_3$) ppm.

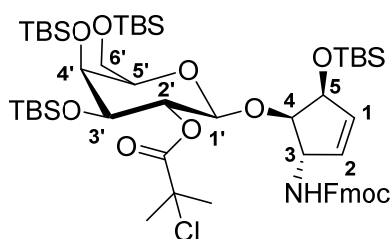
$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3 , 27 °C): $\delta = 186.0$ (CHO), 180.3 (COC(CH $_3$) $_3$), 166.1 (ArCO), 166.0 (ArCO), 165.1 (ArCO), 156.7 (C6), 147.3 (C4), 147.2 (C2), 133.9 (Ar), 133.8 (Ar), 133.6 (Ar), 129.8 (4C; Ar), 129.2 (2C; Ar), 128.9 (Ar), 128.6 (6C; Ar), 128.4 (2C; Ar), 126.6 (C8), 121.0 (C7), 104.7 (C5), 90.4 (C1'), 78.8 (C4'), 74.4 (C2'), 70.6 (C3'), 61.4 (C5'), 40.3 (C(CH $_3$) $_3$), 26.9 (C(CH $_3$) $_3$) ppm.

HRMS (ESI+) m/z : calc. for $[\text{C}_{38}\text{H}_{34}\text{O}_{10}\text{N}_4 + \text{H}]^+$: 707.2348, found: 707.2350.

Assembly of GalQ 2 from precursors 4,5 and 6



1-O-((3S,4R,5S)-((N-(9H-Fluoren-9-yl)methoxycarbonyl)-5-O-(tert-butylidimethyl-silyl)-cyclopent-1-en-4-yl))-3,4,6-tri-O-tert-butylidimethylsilyl-2-O-(2-chloroisobutyryl)-β-D-galactopyranose [33]



To a solution of 3,4,6-Tri-O-tert-butylidimethylsilyl-2-O-(2-chlorisobutyryl)-D-galactopyranosyl-1-O-trichloroacetimidate (2.20 g, 2.85 mmol, 1.00 eq.) in *n*-hexane (150 mL) (3S,4R,5S)-(*N*-(9H-Fluoren-9-yl)methoxycarbonyl)-5-O-tert-butylidimethyl-silylcyclopent-1-en-4,5-diol (2.18 g, 4.83 mmol, 1.70 eq.) dissolved in DCM (12 mL) and 3Å molecular sieve was added and the solution was stirred for 2 h at room temperature. Subsequently 2-Chlor-6-methylpyridinium triflate (0.08 g, 0.29 mmol, 0.10 eq.) was added and the solution was stirred for another 2 h at room temperature. The resulting suspension was filtered through a micro filter into saturated aqueous NaHCO₃-solution. After separation of the phases, the aqueous phase was extracted with EtOAc (3 x 60 mL). The combined organic phases were dried over MgSO₄, filtered and the solvent was removed *in vacuo*. Column chromatographic purification (Isohexane/EtOAc 30:1 → 10:1) gave the product (2.06 g, 1.94 mmol, 68%) as colorless foam.

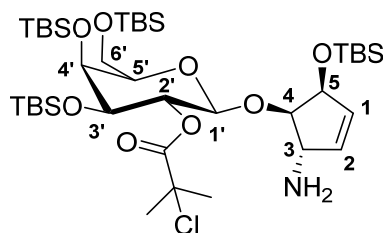
TLC [Isohexane/EtOAc (8:1)]: R_f = 0.31.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, 27 °C): δ = 7.79 – 7.75 (m, 2H; C4''H), 7.62 – 7.58 (m, 2H; C1''H), 7.43 – 7.38 (m, 2H; C3''H), 7.35 – 7.29 (m, 2H; C2''H), 5.91 – 5.86 (m, 1H; C1'H), 5.80 – 5.75 (m, 1H; C2'H), 5.29 (dd, ³J_{H2,H3} = 9.7, ³J_{H2,H1} = 8.0 Hz, 1H; C2H), 4.86 (d, ³J_{NH,H3'} = 7.4 Hz, 1H; NH), 4.73 (d, ³J_{H1,H2} = 8.0 Hz, 1H; C1H), 4.69 – 4.60 (m, 2H; C3'H, C5'H), 4.42 (d, ³J_{OCH₂CH, OCH₂CH} = 6.6 Hz, 2H; OCH₂CH), 4.24 (t, ³J_{OCH₂CH, OCH₂CH} = 6.9 Hz, 1H; OCH₂CH), 4.07 – 4.01 (m, 1H; C4'H), 3.98 (d, ³J_{H4,H3} = 2.1 Hz, 1H; C4H), 3.73 (dd, ²J_{H6a,H6b} = 9.9 Hz, ³J_{H6a,H5} = 7.5 Hz, 1H; C6Ha), 3.71 – 3.68 (m, 1H; C6Hb), 3.66 (dd, ³J_{H3,H2} = 10.0 Hz, ³J_{H3,H4} = 2.3 Hz, 1H; C3H), 3.44 – 3.38 (m, 1H; C5H), 1.77 (s, 6H; CCl(CH₃)₂), 0.93 (s, 9H; SiC(CH₃)₃), 0.89 (s, 9H; SiC(CH₃)₃), 0.88 (s, 9H; SiC(CH₃)₃), 0.86 (s, 9H; SiC(CH₃)₃), 0.20 (s, 3H; SiCH₃), 0.10 (s, 3H; SiCH₃), 0.08 (s, 3H; SiCH₃), 0.07 (3s, 9H; SiCH₃), 0.06 (s, 3H; SiCH₃), 0.05 (s, 3H; SiCH₃) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, 27 °C): δ = 170.5 (COCCl(CH₃)₂), 155.7 (NHCO), 144.0 (C4''b), 143.8 (C4''b), 141.4 (C4''a), 141.3 (C4''a), 134.7 (C1'), 133.4 (C2'), 127.7 (2C; C3''), 127.0 (2C; C2''), 125.0 (C1''), 124.9 (C1''), 120.0 (2C; C4''), 100.5 (C1), 81.0 (C4'), 75.8 (C5), 74.3 (C2), 74.0 (C3), 73.7 (C5'), 71.4 (C4), 66.6 (OCH₂CH), 65.2 (CCl(CH₃)₂), 61.4 (C6), 59.8 (C3'), 47.2 (OCH₂CH), 30.5 (CCl(CH₃)₃), 26.2 (2 × 3C; SiC(CH₃)₃), 26.0 (3C; SiC(CH₃)₃), 25.8 (3C; SiC(CH₃)₃), 18.6 (SiC(CH₃)₃), 18.4 (SiC(CH₃)₃), 18.1 (2C; SiC(CH₃)₃), -3.6 (SiCH₃), -3.8 (SiCH₃), -4.2 (SiCH₃), -4.6 (SiCH₃), -4.7 (SiCH₃), -5.0 (SiCH₃), -5.2 (SiCH₃), -5.3 (SiCH₃) ppm.

HRMS (ESI+) m/z : calc. for $[C_{54}H_{90}O_{10}NCISi_4 + NH_4]^+$: 1077.5669, found: 1077.5672.

1-O-((3S,4R,5S)-(3-Amino-5-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)cyclopent-1-en-4-yl))-3,4,6-tri-O-*tert*-butyldimethylsilyl-2-O-(2-chlorisobutyryl)- β -D-galactopyranose [16]



1-O-((3S,4R,5S)-((*N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)methoxycarbonyl)-5-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-cyclopent-1-en-4-yl))-3,4,6-tri-O-*tert*-butyldimethylsilyl-2-O-(2-chlorisobutyryl)- β -D-galactopyranose (144 mg, 136 μ mol, 1.0 eq.) was dissolved in acetonitrile (6 mL) and DBU (0.9 mL, 6.02 mmol) was added. The reaction mixture was stirred for 1.25 h at room temperature. Removal of the solvent *in vacuo* and subsequent column chromatographic purification (Isohexane/EtOAc 5:1 \rightarrow 4:1) gave the product (87 mg, 104 μ mol, 76%) as colorless foam.

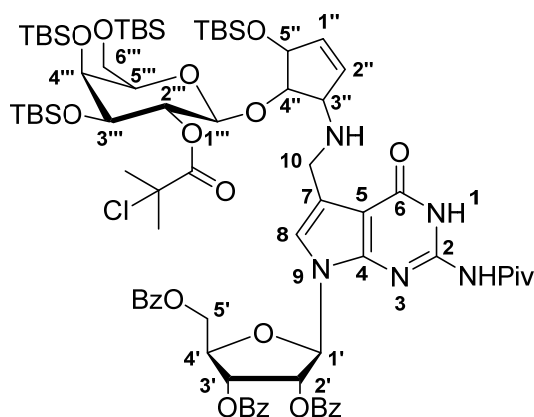
TLC [Isohexane/EtOAc (4:1)]: R_f = 0.05.

1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$, 27 $^\circ C$): δ = 5.80 (dt, $^3J_{H1',H2'} = 6.0$ Hz, $^3J_{H1',H5'} = ^4J_{H1',H3'} = 2.4$ Hz, 1H; C1'H), 5.73 (d, $^3J_{H2',H1'} = 6.0$ Hz, 1H; C2'H), 5.31 (t, $^3J_{H2,H1} = ^3J_{H2,H3} = 8.3$ Hz, 1H; C2H), 4.82 (d, $^3J_{H1,H2} = 7.9$ Hz, 1H; C1H), 4.51 (ddd, $^3J_{H5',H4'} = 5.3$ Hz, $^3J_{H5',H1'} = 2.7$ Hz, $^4J_{H5',H2'} = 0.9$ Hz, 1H; C5'H), 4.02 – 3.98 (m, 2H; C4H, C3'H), 3.75 – 3.67 (m, 3H; C3H, C6Ha, C6Hb), 3.65 (t, $^3J_{H4',H5'} = ^3J_{H4',H3'} = 5.6$ Hz, 1H; C4'H), 3.40 (t, $^3J_{H5,H6a} = ^3J_{H5,H6b} = 6.6$ Hz, 1H; C5H), 1.80 (s, 3H; CCl(CH₃)₂), 1.79 (s, 3H; CCl(CH₃)₂), 0.93 (s, 9H; SiC(CH₃)₃), 0.90 (s, 9H; SiC(CH₃)₃), 0.89 (s, 9H; SiC(CH₃)₃), 0.84 (s, 9H; SiC(CH₃)₃), 0.20 (s, 3H; SiCH₃), 0.13 (s, 3H; SiCH₃), 0.11 (s, 3H; SiCH₃), 0.10 (s, 3H; SiCH₃), 0.06 (4s, 12H; SiCH₃) ppm.

^{13}C -NMR (150 MHz, $CDCl_3$, 27 $^\circ C$): δ = 170.6 (COCCI(CH₃)₂), 138.4 (C2'), 132.0 (C1'), 101.5 (C1), 86.4 (C4'), 75.9 (C5), 74.9 (C5'), 74.1 (C3), 73.9 (C2), 71.5 (C4), 65.1 (CCI(CH₃)₂), 61.6 (C6), 59.8 (C3'), 30.8 (CCI(CH₃)₂), 30.5 (CCI(CH₃)₂), 26.2 (6C; SiC(CH₃)₃), 26.0 (3C; SiC(CH₃)₃), 25.8 (3C; SiC(CH₃)₃), 18.6 (SiC(CH₃)₃), 18.4 (SiC(CH₃)₃), 18.1 (2C; SiC(CH₃)₃), -3.6 (SiCH₃), -3.9 (SiCH₃), -4.2 (SiCH₃), -4.6 (2C; SiCH₃), -4.9 (SiCH₃), -5.2 (SiCH₃), -5.3 (SiCH₃) ppm.

HRMS (ESI+) m/z : calc. for $[C_{39}H_{80}O_8NCISi_4 + H]^+$: 838.4722, found: 838.4724.

7-Desaza-7-(((3S,4R,5S)-4-O-(3,4,6-tri-O-*tert*-butyldimethylsilyl)-2-O-(2-chlorisobutyryl)- β -D-galactopyranosyl)-5-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)cyclopent-1-en-3-yl)amino)-methyl)-2-pivaloylamino-2',3',5'-tri-O-benzoylguanosin [17]



1-O-((3S,4R,5S)-(3-Amino-5-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)cyclopent-1-en-4-yl))-3,4,6-tri-O-*tert*-butyldimethylsilyl-2-O-(2-chlorisobutyryl)- β -D-galactopyranose (150 mg, 179 μ mol, 1.20 eq.) and 2',3',5'-Tri-O-benzoyl-2-*N*-pivaloyl-7-formyl-7-desazaguanosine (105 mg, 145 μ mol, 1.00 eq.) were dissolved in benzene (2 mL) and the solution was stirred at room temperature for 5 h. After removing the solvent *in vacuo* the residue was taken up in methanol (2 mL). The solution was cooled to 0 °C and NaBH₄ (20 mg, 0.53 mmol, 3.60 eq) was added. After stirring the solution for 1 h at 0 °C water (0.15 mL) was added. The reaction mixture was stirred for another 10 min at 0 °C before the solvent was removed *in vacuo*. Column chromatographic purification (Isohexane/EtOAc 5:1 \rightarrow 2:1) gave the product (129 mg, 83 μ mol, 57%) as colorless foam.

TLC [Isohexane/EtOAc (1:1)]: R_f = 0.53.

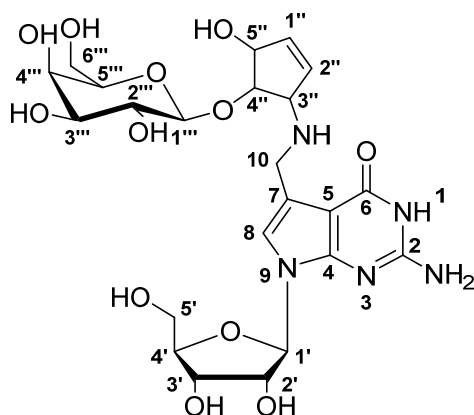
¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃, 27 °C): δ = 11.60 (s, 1H; NHCO), 8.72 (s, 1H; NHCOC(CH₃)₃), 8.02 – 7.98 (m, 2H; ArH), 7.92 – 7.89 (m, 2H; ArH), 7.80 – 7.77 (m, 2H; ArH), 7.63 – 7.51 (m, 3H; ArH), 7.47 – 7.43 (m, 2H; ArH), 7.39 – 7.35 (m, 2H; ArH), 7.34 – 7.30 (m, 2H; ArH), 6.93 (dd, ³J_{H3',H4'} = 8.3 Hz, ³J_{H3',H2'} = 5.0 Hz, 1H; C3'H), 6.76 (s, 1H; C8H), 6.49 (dd, ³J_{H2',H3'} = 5.0 Hz, ³J_{H2',H1'} = 1.8 Hz, 1H; C2'H), 6.01 (d, ³J_{H1',H2'} = 1.8 Hz, 1H; C1'H), 5.89 (dd, ³J_{H2'',H1''} = 6.2 Hz, ⁴J_{H2'',H5''} = 1.4 Hz, 1H; C2''H), 5.80 – 5.77 (m, 1H; C1''H), 5.27 (dd, ³J_{H2''',H3'''} = 10.0 Hz, ³J_{H2''',H1'''} = 7.9 Hz, 1H; C2'''H), 4.93 (d, ³J_{H1''',H2'''} = 7.8 Hz, 1H; C1'''H), 4.77 (dt, ³J_{H4',H3'} = 8.3 Hz, ³J_{H4',H5'a} = ³J_{H4',H5'b} = 3.2 Hz, 1H; C4'H), 4.71 (dd, ²J_{H5'a,H5'b} = 12.4 Hz, ³J_{H5'a,H4'} = 3.2 Hz, 1H; C5'Ha), 4.64 (dd, ²J_{H5'b,H5'a} = 12.4 Hz, ³J_{H5'b,H4'} = 3.3 Hz, 1H; C5'Hb), 4.59 (dd, ³J_{H5'',H4''} = 5.2 Hz, ⁴J_{H5'',H2''} = 1.9 Hz, 1H; C5''H), 4.04 – 4.00 (m, 2H; C4''H, C4'''H), 3.95 – 3.89 (m, 2H; NHCH₂, C3''H), 3.81 – 3.76 (m, 2H; NHCH₂, C3'''H), 3.73 (dd, ²J_{H6''a,H6''b} = 9.9 Hz, ³J_{H6''a,H5''} = 7.8 Hz, 1H; C6''Ha), 3.70 (dd, ²J_{H6''b,H6''a} = 9.9 Hz, ³J_{H6''b,H5''} = 6.0 Hz, 1H; C6''Hb), 3.51 – 3.46 (m, 1H; C5'''H), 1.72 (s, 3H; CCl(CH₃)₂), 1.68 (s, 3H; CCl(CH₃)₂), 1.35 (s, 9H; COC(CH₃)₃), 0.93 (s, 9H; SiC(CH₃)₃), 0.88 (s, 9H; SiC(CH₃)₃), 0.88 (s, 9H; SiC(CH₃)₃), 0.84 (s, 9H; SiC(CH₃)₃), 0.20 (s, 3H; SiCH₃), 0.13 (s, 3H; SiCH₃),

0.11 (s, 3H; SiCH₃), 0.10 (s, 3H; SiCH₃), 0.08 (s, 3H; SiCH₃), 0.07 (s, 3H; SiCH₃), 0.06 (s, 3H; SiCH₃), 0.05 (s, 3H; SiCH₃) ppm.

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃, 27 °C): δ = 179.9 (COC(CH₃)₃), 170.6 (COCCl(CH₃)₂), 166.1 (ArCO), 166.0 (ArCO), 165.1 (ArCO), 157.7 (C6), 146.9 (C4), 145.2 (C2), 135.0 (C2''), 133.7 (2C; Ar), 133.4 (Ar), 132.9 (C1''), 129.8 (2C; Ar), 129.7 (2C; Ar), 129.3 (2C; Ar), 129.1 (Ar), 128.9 (Ar), 128.8 (Ar), 128.6 (2C; Ar), 128.5 (2C; Ar), 128.3 (2C; Ar), 120.2 (C8), 120.0 (C7), 105.3 (C5), 100.3 (C1'''), 89.4 (C1'), 80.9 (C4''), 78.2 (C4'), 75.4 (C5'''), 74.8 (C5''), 74.6 (C2'), 74.1 (C2'''), 74.0 (C3'''), 71.5 (C4'''), 70.7 (C3'), 65.9 (C3''), 65.1 (CCl(CH₃)₂), 61.8 (C5'), 61.4 (C6'''), 43.2 (NHCH₂), 40.2 (CO(CH₃)₃), 30.5 (CCl(CH₃)₂), 30.4 (CCl(CH₃)₂), 26.9 (3C; COC(CH₃)₃), 26.2 (6C; SiC(CH₃)₃), 26.1 (3C; SiC(CH₃)₃), 25.8 (3C; SiC(CH₃)₃), 18.6 (SiC(CH₃)₃), 18.5 (SiC(CH₃)₃), 18.1 (2C; SiC(CH₃)₃), -3.6 (SiCH₃), -3.8 (SiCH₃), -4.2 (SiCH₃), -4.5 (SiCH₃), -4.8 (SiCH₃), -5.1 (SiCH₃), -5.2 (SiCH₃), -5.3 (SiCH₃) ppm.

HRMS (ESI+) *m/z*: calc. for [C₇₇H₁₁₄O₁₇N₅ClSi₄ + H]⁺: 1528.7048, found: 1528.7044.

7-Desaza-7-((((3S,4R,5S)-4-O-(β-D-galactopyranosyl)-5-hydroxy-cyclopent-1-en-3-yl)-amino)methyl)guanosin (galQ) [2]



To a solution of 7-Desaza-7-((((3S,4R,5S)-4-O-(3,4,6-tri-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl)-2-*O*-(2-chlorisobutyryl)-β-D-galactopyranosyl)-5-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)cyclopent-1-en-3-yl)amino)-methyl)-2-pivaloylamino-2',3',5'-tri-*O*-benzoylguanosine (85.0 mg, 55.0 μmol, 1.0 eq.) in DCM (2 mL) Triethylamine trihydrofluoride (0.3 mL) was added and the solution was stirred at room temperature for 4 d. Methoxytrimethylsilane (1 mL) was added and the solution was stirred for 1 h before the solvent was removed *in vacuo*. The residue was taken up in a solution of NaOMe in methanol (0.5M, 3 mL) and the resulting solution was stirred for 2 d at room temperature. After neutralization with HCl (2M) the solvent was removed in *vacuo*. HPLC-purification of the crude product gave 15 mg of a 2.5:1 mixture of the galQ hydroacetate (28%) and triethylammonium acetate.

HPLC-Purification Preparative HPLC column (250/10 *Nucleosil*): Buffer system: buffer A (0.1 M HNEt₃OAc in H₂O), buffer B (0.1 M HNEt₃OAc in H₂O/MeCN 20/80), gradient: 0% buffer B → 8% buffer B, 45 min, flow 5 mL/min;

Analytical HPLC column (250/4 *Nucleodur*): buffer system buffer A (0.1 M HNEt₃OAc in H₂O), buffer B (0.1 M HNEt₃OAc in H₂O/MeCN 20/80), gradient: 0% buffer B → 8% buffer B, 45 min, flow:0.5 mL/min, **R_t** = 25.2 min.

¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD, 27 °C): δ = 7.13 (s, 1H; C8H), 6.17 (ddd, ³J_{H1'',H2''} = 6.3, ³J_{H1'',H5''} = 2.6 Hz, ⁴J_{H1'',H3''} = 2.2 Hz, 1H; C1''H), 6.11 (dd, ³J_{H2'',H1''} = 6.4 Hz, ⁴J_{H2'',H5''} = 1.5 Hz, 1H;C2''H), 5.93 (d, ³J_{H1',H2'} = 5.9 Hz, 1H; C1'H), 4.69 (ddd, ³J_{H5',H4'} = 5.2 Hz, ³J_{H5',H1'} = 2.8 Hz, ⁴J_{H5',H2'} = 1.3 Hz, 1H; C5''H), 4.49 (d, ³J_{H1''',H2'''} = 7.7 Hz, 1H; C1'''H), 4.43 (t, ³J_{H2',H1'} = 5.6 Hz, 1H;C2'H), 4.31 (s, 2H; NHCH₂), 4.31 – 4.29 (m, 1H; C3''H), 4.23 (dd, ³J_{H3',H2'} = 5.3 Hz, ³J_{H3',H4'} = 3.6 Hz, 1H; C3'H), 4.19 (dd, ³J_{H4',H3'} = 6.2 Hz, ³J_{H4',H5'} = 5.4 Hz, 1H; C4''H), 4.03 (q, ³J_{H4',H3'} = ³J_{H4',H5'a} = ³J_{H4',H5'b} = 3.4 Hz, 1H; C4'H), 3.85 (dd, ³J_{H4''',H3'''} = 3.3 Hz, ³J_{H4''',H5'''} = 0.6 Hz, 1H; C4'''H), 3.81 (dd, ²J_{H5'a,H5'b} = 12.2 Hz, ³J_{H5'a,H4'} = 3.1 Hz, 1H; C5'Ha), 3.76 (dd, ²J_{H6''a,H6''b} = 11.2 Hz, ³J_{H6''a,H5''} = 7.0 Hz, 1H; C6'''Ha), 3.73 (dd, ²J_{H6''b,H6''a} = 11.2 Hz, ³J_{H6''b,H5''} = 5.1 Hz, 1H; C6'''Hb), 3.72 (dd, ²J_{H5'b,H5'a} = 12.2 Hz, ³J_{H5'b,H4'} = 3.6 Hz, 1H; C5'Hb), 3.64 (dd, ³J_{H2''',H3'''} = 9.7 Hz,

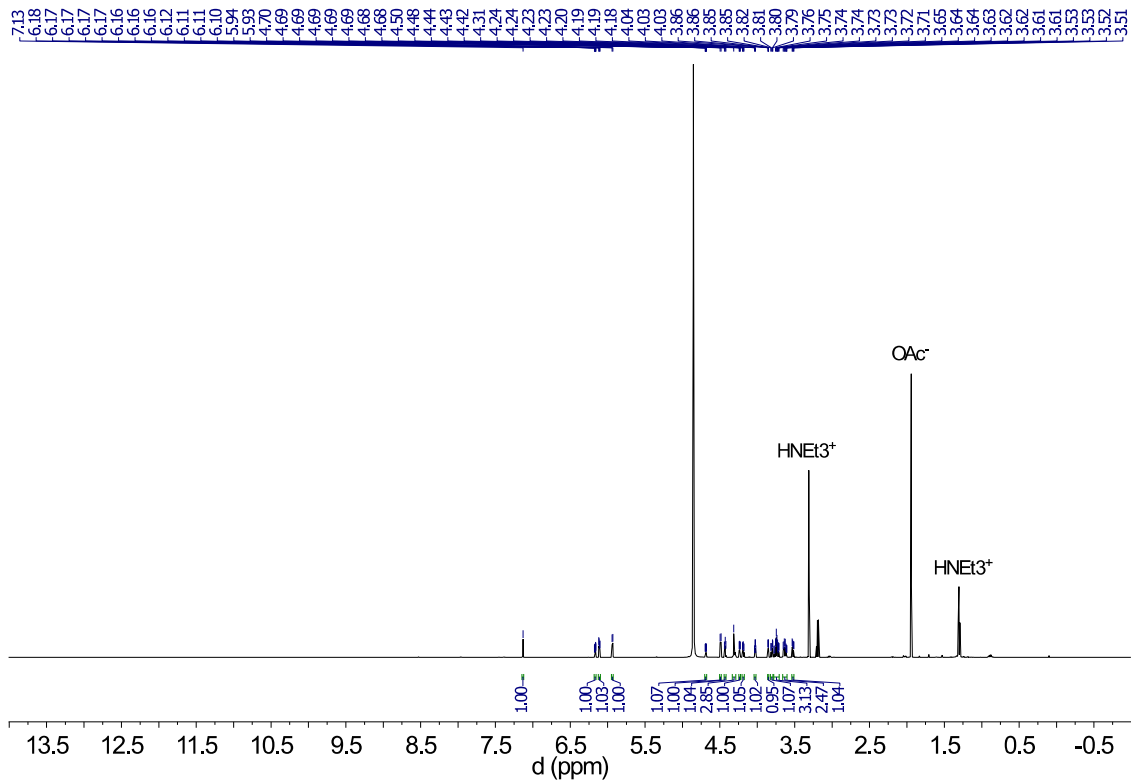
$^3J_{H2'',H1''} = 7.6$ Hz, 1H; C2''H), 3.62 (ddd, $^3J_{H5'',H6''a} = 6.9$ Hz, $^3J_{H5'',H6''b} = 5.2$ Hz, $^3J_{H5'',H4''} = 1.2$ Hz, 1H; C5''H), 3.52 (dd, $^3J_{H3'',H2''} = 9.7$ Hz, $^3J_{H3'',H4''} = 3.3$ Hz, 1H; C3''H), 1.94 (s, 3H, CO₂CH₃) ppm.

¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD, 27 °C): $\delta = 162.4$ (C6), 154.4 (C2), 153.8 (C4), 136.9 (C1''), 131.5 (C2''), 120.2 (C8), 111.9 (C7), 105.5 (C1'''), 100.6 (C5), 89.7 (C1'), 86.6 (C4'), 84.8 (C4''), 77.0 (C5'''), 75.8 (C2'), 74.8 (C5''), 74.6 (C3'''), 72.4 (C2'''), 72.2 (C3'), 70.3 (C4'''), 65.8 (C3''), 63.3 (C5'), 62.4 (C6'''), 43.7 (NCH₂), 22.3 (CO₂CH₃) ppm.

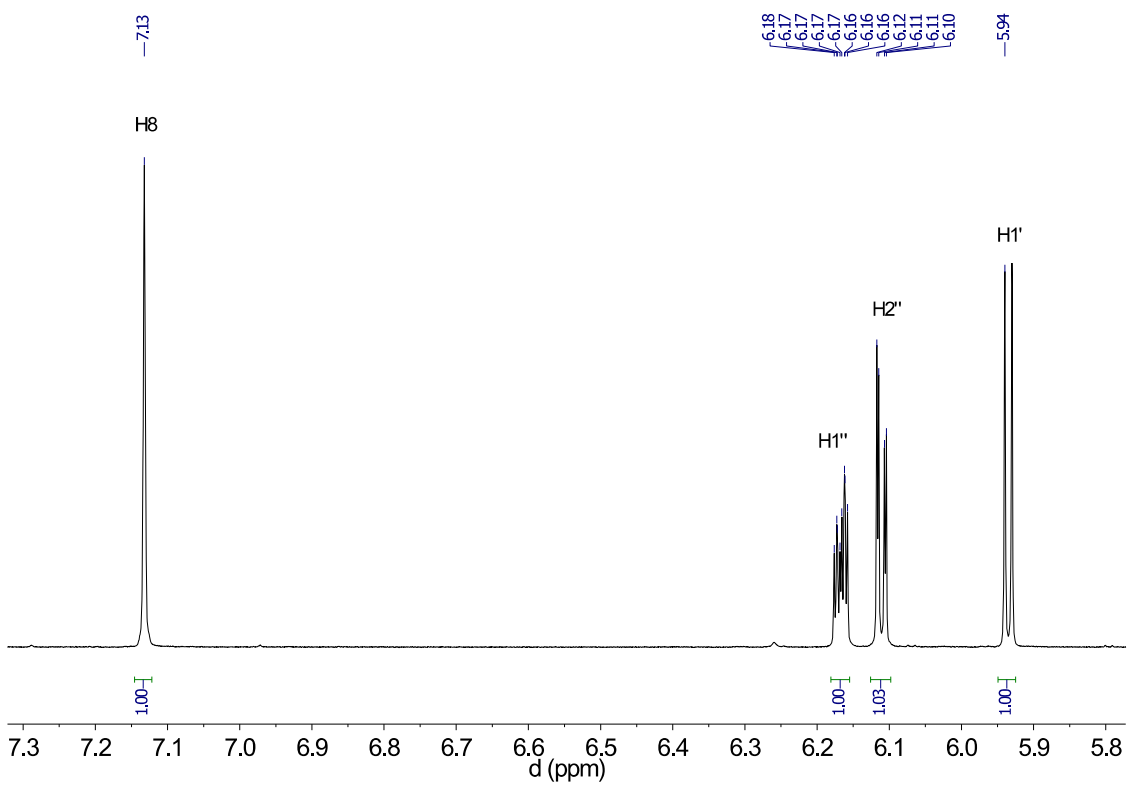
HRMS (ESI⁻) *m/z*: calc. for [C₂₃H₃₃O₁₂N₅ + Cl]⁻: 606.1820, found: 606.1820.

1H-NMR of GalQ (2)

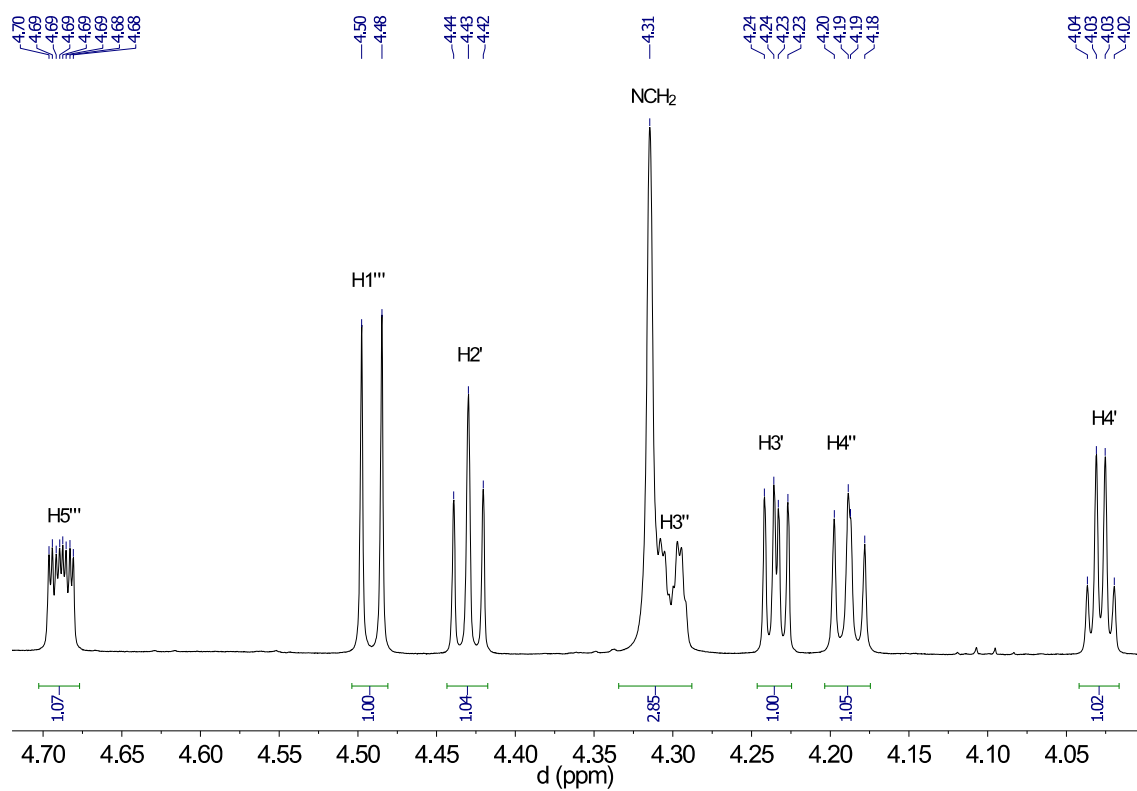
a) Full spectrum



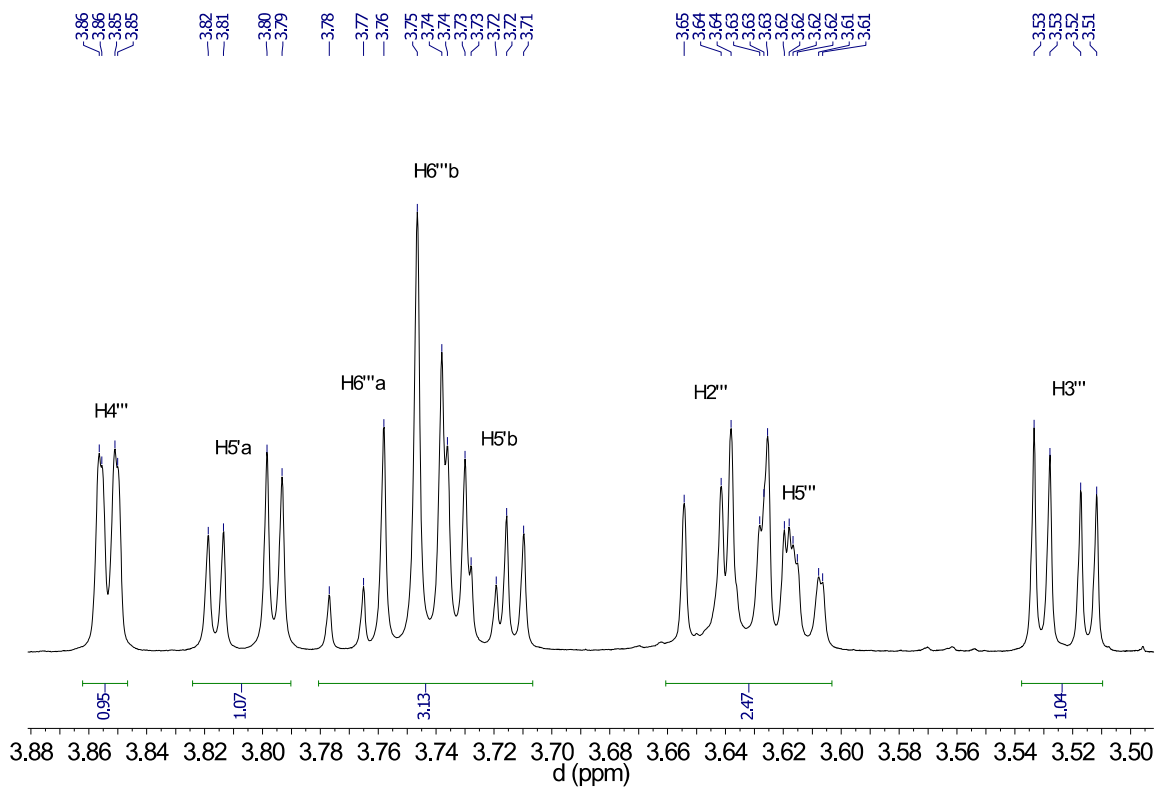
b) Part A zoomed in



b) Part B zoomed in

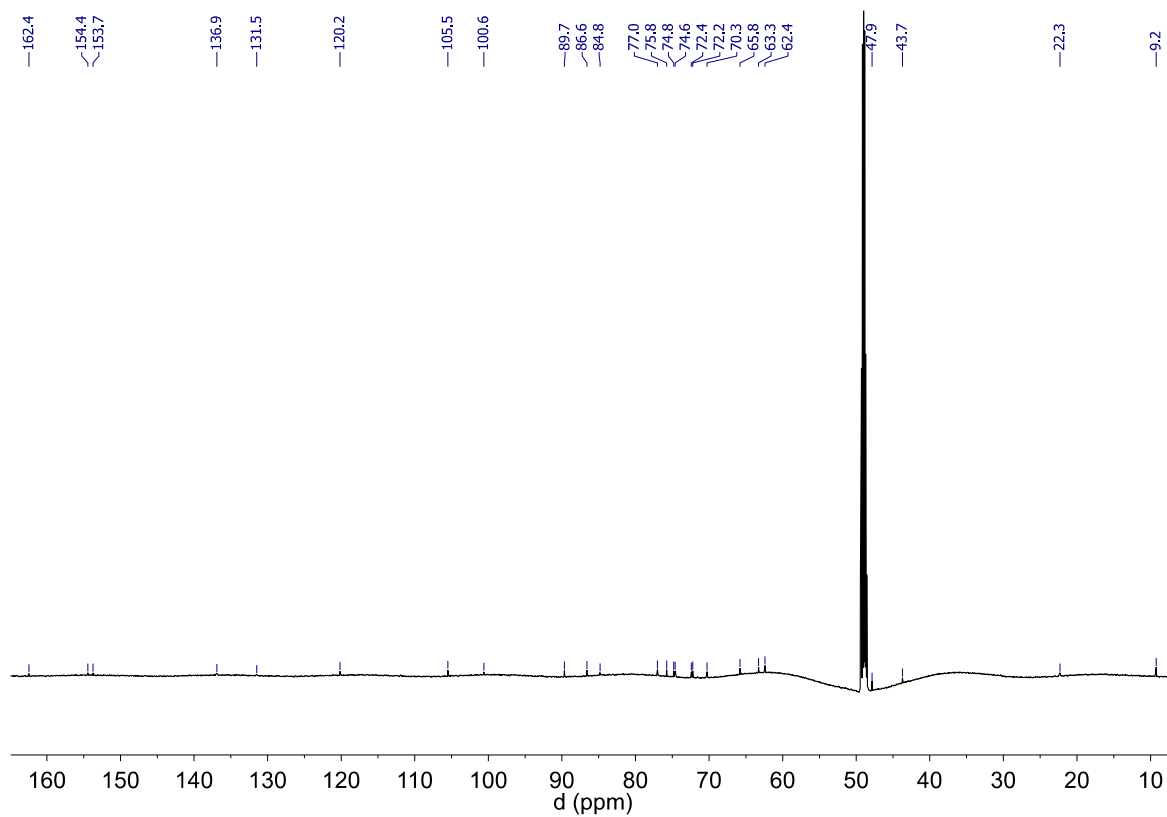


c) Part C zoomed in

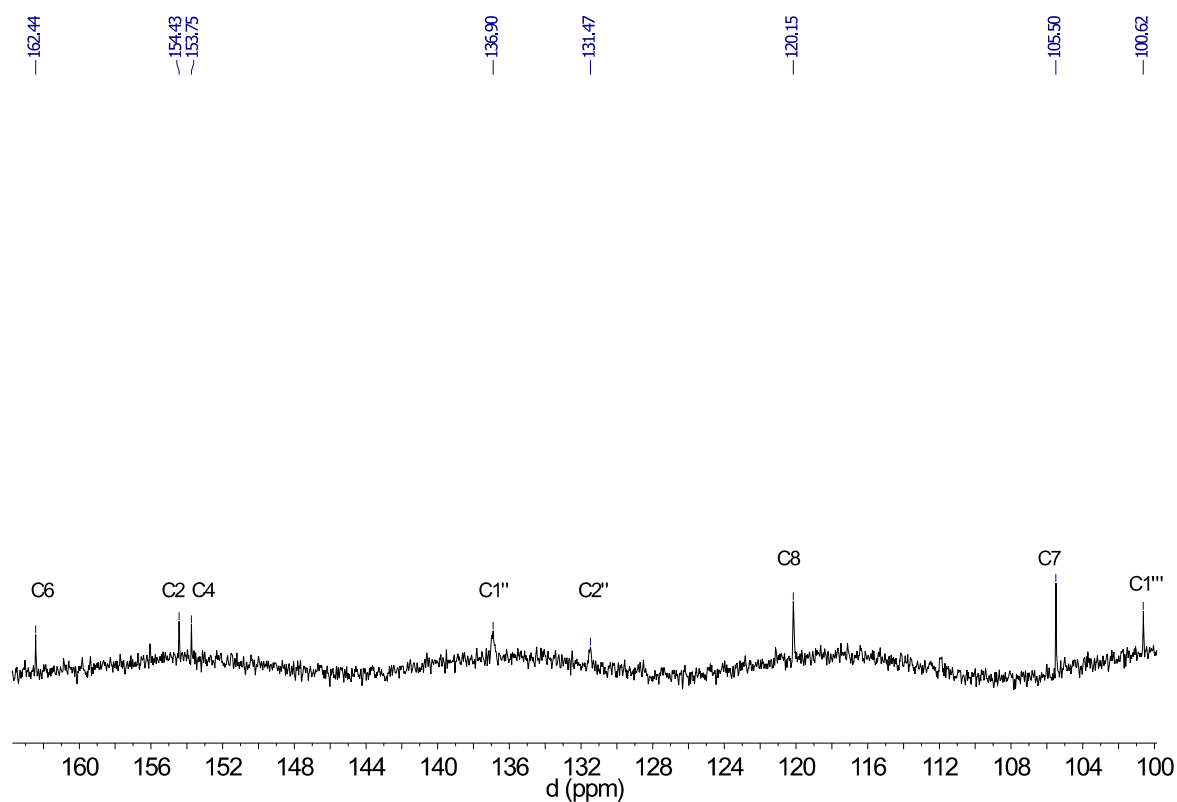


¹³C-NMR of GalQ (2)

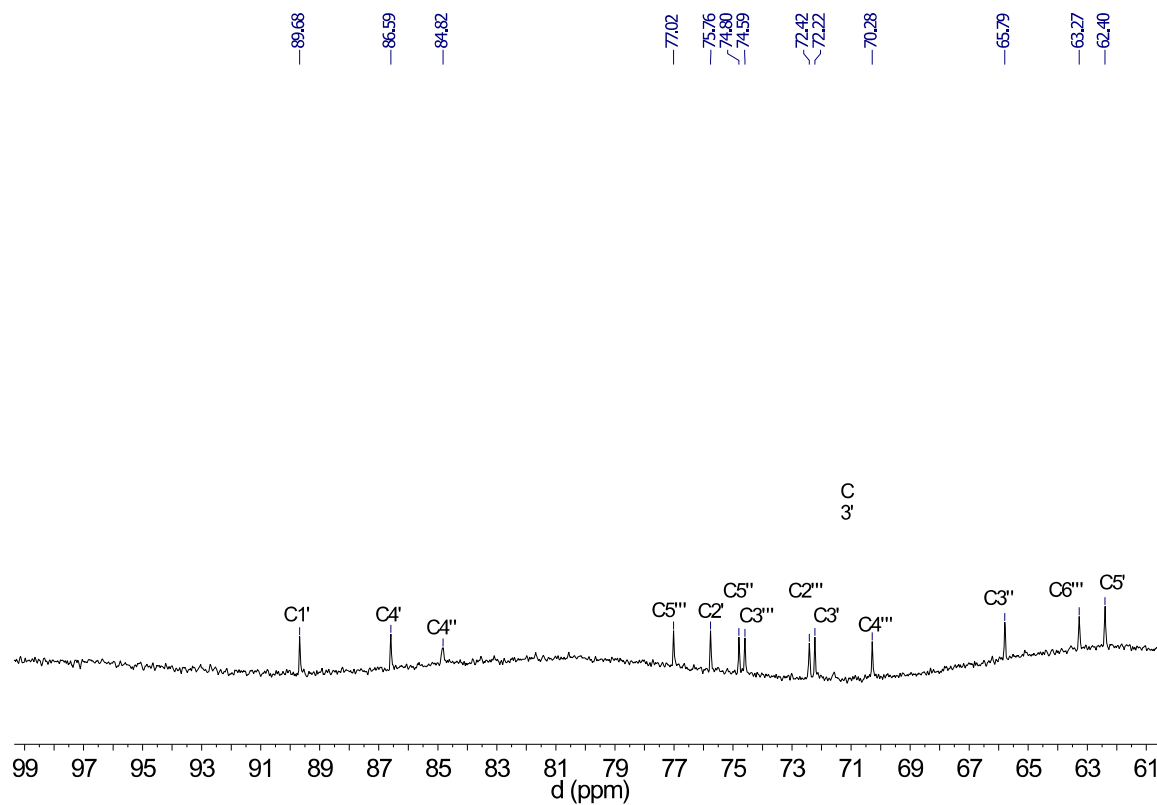
a) Full spectrum



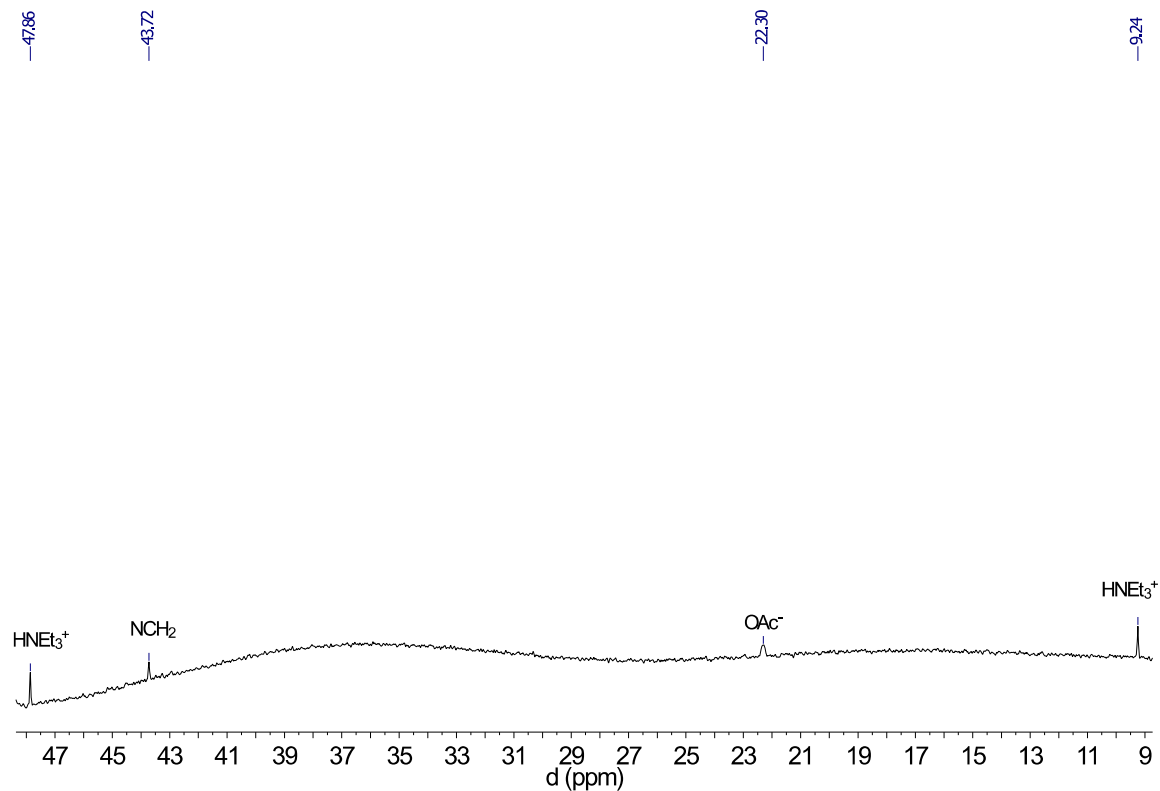
b) Part A zoomed in



b) Part B zoomed in



c) Part C zoomed in



References

- [1] Y. H. Chionh, C.-H. Ho, D. a. Pruksakorn, *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, e168--e168.
- [2] M. Heiss, V. F. Reichle, S. Kellner, *RNA Biol.* **2017**, *14*, 1260--1268.
- [3] R. Hauenschild, L. Tserovski, K. Schmid, K. Thring, M.-L. Winz, S. Sharma, K.-D. Entian, L. Wacheul, D. L. J. Lafontaine, J. Anderson, J. Alfonzo, A. Hildebrandt, A. Jschke, Y. Motorin, M. Helm, *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, gkv895.
- [4] D. Crich, T. J. Ritchie, *Carbohydr. Res.* **1989**, *190*, C3.
- [5] K. C. Nicolaou, S. A. Snyder, D. A. Longbottom, A. Z. Nalbandian, X. Huang, *Chem. - A Eur. J.* **2004**, *10*, 5581--5606.
- [6] L. H. Zhang, J. Duan, Y. Xu, W. R. Dolbier, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 9621--9622.
- [7] D. Vonlanthen, C. J. Leumann, *Synthesis (Stuttg.)* **2003**, 1087--1090.
- [8] H. Ovaa, B. Lastdrager, J. D. C. a. Code, *J. Chem. Soc. Perkin 1* **2002**, *2*, 2370--2377.
- [9] F. Klepper, E.-M. Jahn, V. Hickmann, T. Carell, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2007**, *46*, 2325--2327.

7.2 Supporting Information: Synthesis and Structure Elucidation of the human tRNA Nucleoside Mannosyl-Queuosine

Markus Hillmeier, Dr. Mirko Wagner, Dr. Timm Ensfelder, E. Korytiaková, Dr. Peter Thumbs, Dr. Markus Müller, Prof. Dr. Thomas Carell *Nat. Comm.* **2021**, 12, 7132.

Synthesis and Structure Elucidation of the Human tRNA Nucleoside Mannosyl-Queuosine

Supplementary Information

Markus Hillmeier^a, Mirko Wagner^a, Timm Ensfelder^a, Eva Korytiakova^a, Peter Thumbs^a, Markus Müller^a, and Thomas Carell^{a,#}

a) Department Chemie, Ludwig-Maximilians-Universität München, Butenandtstraße 5-13, 81377 München

Correspondence should be addressed to:

Thomas Carell

E-Mail: thomas.carell@lmu.de

Telephone: +49 (0)89 218077755

Fax: +49 (0)89 218077756

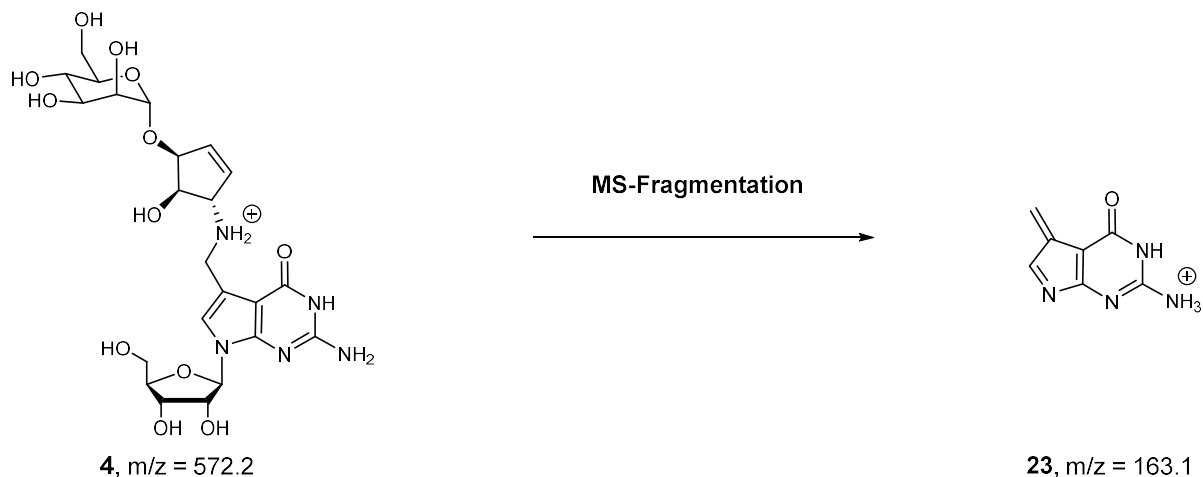
Webpage: www.carellgroup.de

Supplementary Information - Table of Contents

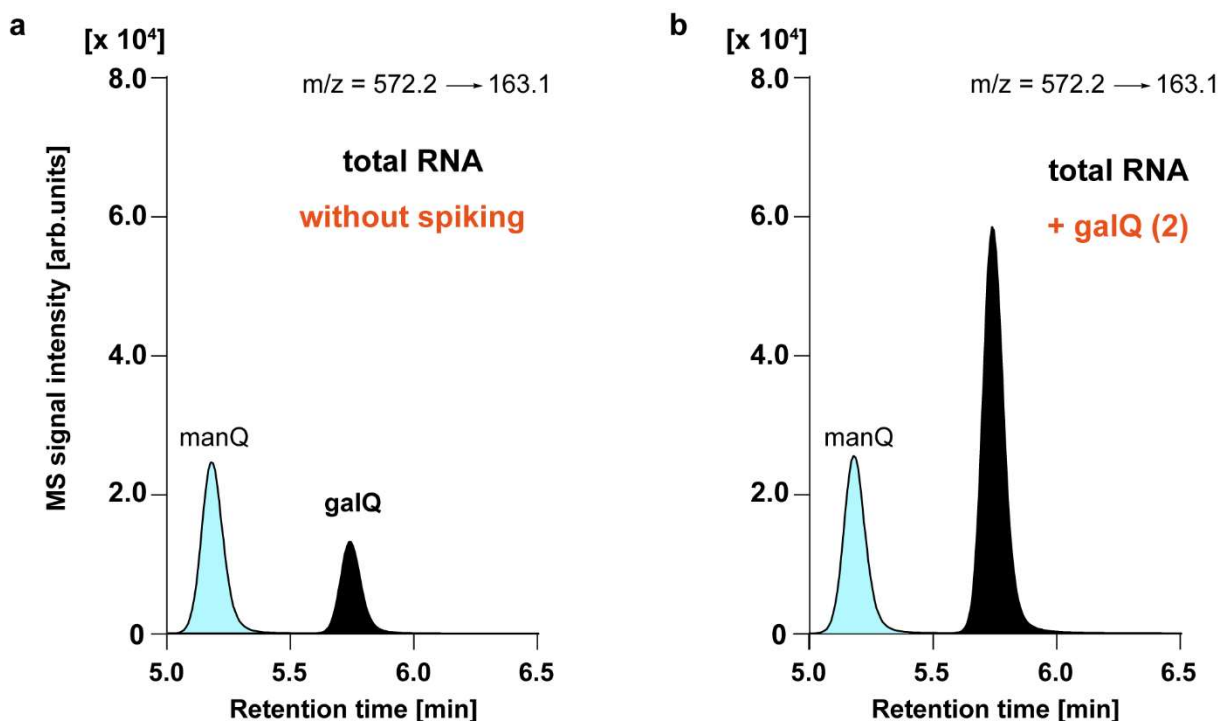
1. LC-MS-based comparison of natural manQ from mouse liver with our synthetic manQ-compounds for structure elucidation	3
1.1 UHPLC-MS/MS (QQQ) based co-injection experiments for manQ structure elucidation.....	3
1.2 HPLC-MS (Orbitrap)-based repetition of co-injection experiments for manQ structure confirmation.....	4
1.3 Investigation of manQ stability towards isomerization	6
2. Metabolic feeding study to confirm mannose as the hexose-part of natural manQ.....	10
3. Chemical synthesis	11
3.1. Synthesis of glycosyl donor 5	11
3.2 Synthesis of β - <i>homoallyl</i> -manQ (3).....	17
3.3 Regioselective protection of 12 towards cyclopentene precursors 13-15.....	21
3.4 Synthesis of glycosyl donor 16	26
3.5 Synthesis of β - <i>allyl</i> -manQ (10), α - <i>homoallyl</i> -manQ (11), and of α - <i>allyl</i> -manQ (4).....	31
4. NMR-spectra of important compounds	40
5. UHPLC-MS/MS chromatograms of co-injection experiments.....	74
6. Supplementary References	75

1. LC-MS-based comparison of natural manQ from mouse liver with our synthetic manQ-compounds for structure elucidation

1.1 UHPLC-MS/MS (QQQ) based co-injection experiments for manQ structure elucidation



Supplementary Figure 1. Fragmentation pattern used for specific detection of manQ and galQ on the QQQ mass spectrometer. The fragmentation is depicted for natural manQ **4**, but occurs in a similar way for the precursor ions **2**, **3**, **10**, and **11**, giving the same daughter ion **23** with $m/z = 163.1$ and the likely structure depicted here.

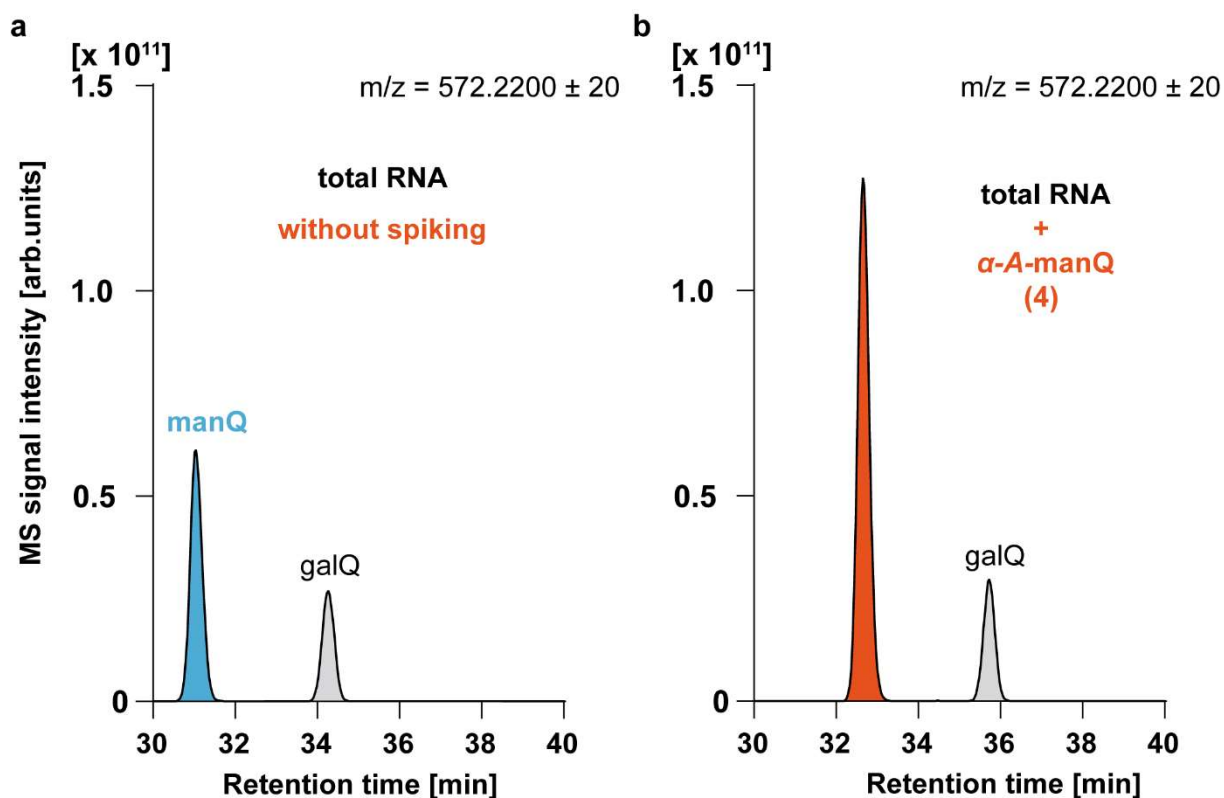


Supplementary Figure 2. UHPLC-MS/MS-based identification of the galQ-peak by co-injection. **a**, Digested total RNA from mouse tissue only (control); **b**, Digested total RNA from mouse tissue spiked with synthetic galQ as recently prepared by us¹ showed a complete signal overlap with the peak appearing at higher retention time, therefore identifying this peak as natural galQ.

1.2 HPLC-MS (Orbitrap)-based repetition of co-injection experiments for manQ structure confirmation

To double-check our results from the UHPLC-MS/MS experiments, we repeated the co-injection experiments on a second LC-MS system using a different HPLC separation column. To take into account the lower sensitivity of the Orbitrap system in comparison to the QQQ-system, the samples, containing the digested RNA (see Supplementary Information **1.2**) and the spiked synthetic material, were scaled accordingly. The ratios of digested RNA vs. amount of spiked material, however, were again about equimolar and therefore the same as for the UHPLC-MS/MS analyses. All samples were filtrated before measurement using an *AcroPrep Advance 96 filter plate 0.2 μ m Supor* from *Pall Life Sciences*. The HPLC-HESI-MS analyses were performed on a *Dionex Ultimate 3000* HPLC system coupled to a *Thermo Fisher LTQ Orbitrap XL* mass spectrometer. Nucleosides were separated with an *Interchim Uptisphere120-3HDO C18* column whose temperature was maintained at 30 °C. Elution buffers were buffer X (2 mM NH_4HCOO in H_2O ; pH 5.5) and buffer Y (2 mM NH_4HCOO in $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ 20/80 v/v; pH 5.5) and the gradient was as follows: 0→10 min, 0 % Y, 0.15 mL/min; 10→50 min, 0→5 % Y, 0.15 mL/min; 50→52 min, 5→75 % Y, 0.15 mL/min→0.20 mL/min; 52→55 min, 75 % Y, 0.20 mL/min. The chromatogram was recorded at 260 nm with a *Dionex Ultimate 3000 Diode Array Detector*, and the chromatographic eluent was directly injected into the ion source of the mass spectrometer without prior splitting. Ions were scanned in the positive polarity mode over a full-scan range of $m/z = 225\text{-}2000$ with a resolution of 100,000. Parameters of the mass spectrometer were tuned with a freshly mixed solution of inosine (5 μM) in buffer X and set as follows: Capillary temperature 275 °C; APCI vaporizer temperature 100 °C; sheath gas flow 5.00; aux gas flow 21.0; sweep gas flow 1.00; source voltage 4.80 kV; capillary voltage 0 V; tube lens voltage 45.0 V; skimmer offset 0 V. The ion chromatograms of the compounds of interest were extracted from the total ion current (TIC) chromatogram with a mass range set to ± 0.0020 u around the exact mass $[\text{M}+\text{H}]^+$ of the compounds of interest.

As shown in **Supplementary Fig. 3**, these experiments again did NOT result in the appearance of a new peak, but resulted in a full signal overlap of the natural manQ compound from mouse liver and our synthetic α -allyl-manQ **4**. As expected from our UHPLC-MS/MS co-injection experiments, these results thereby confirm the identity of the natural manQ compound as α -allyl-manQ **4**.

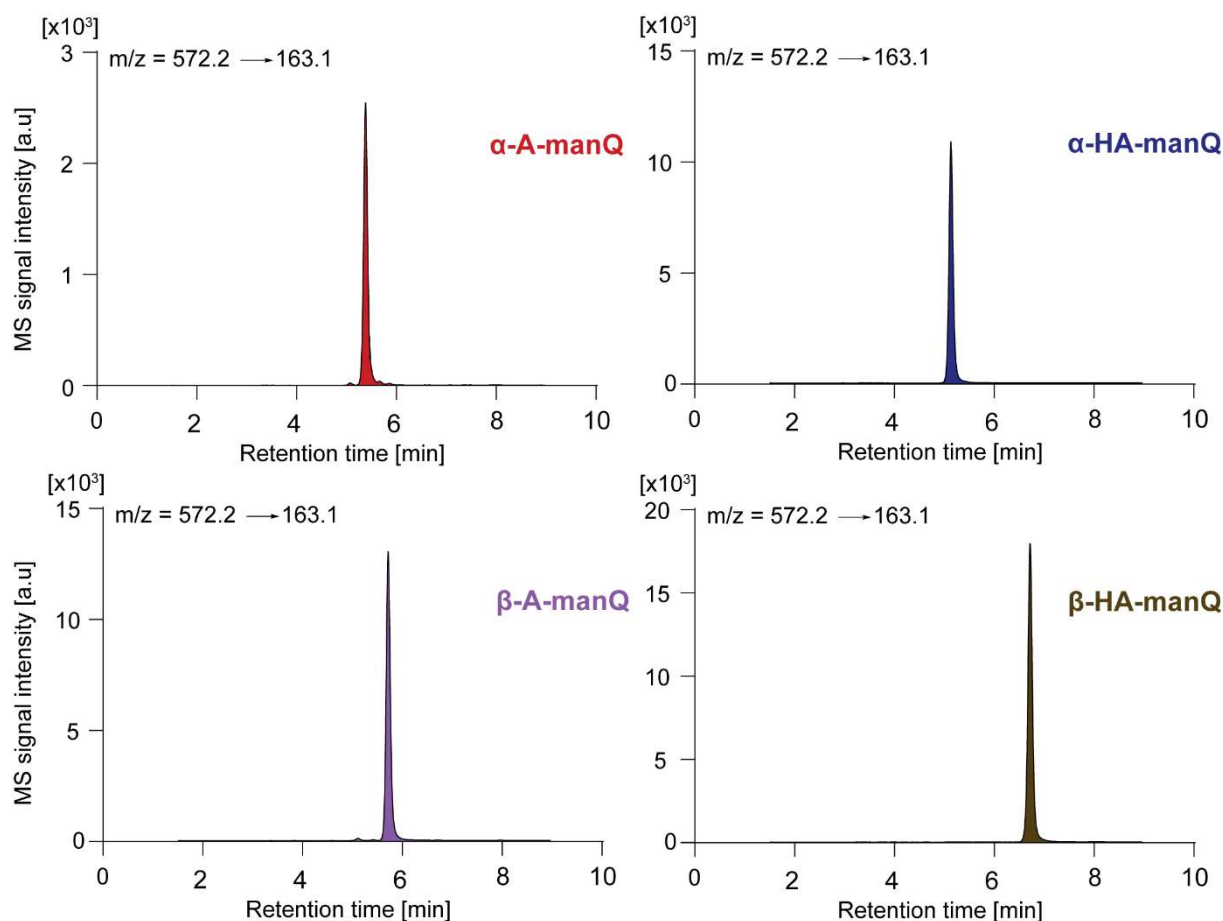


Supplementary Figure 3. Extracted ion chromatograms resulting from the co-injection of the synthetic manQ compound **4** with enzymatically digested total RNA from mouse liver analyzed by HPLC-MS: Co-injection of α -allyl-manQ **4** with digested total RNA from mouse liver shows a complete signal overlap of **4** and natural manQ, thereby leading to an increased signal intensity of manQ (**b**) in comparison to the control sample (**a**) without synthetic standard. This result confirms the findings from the UHPLC-MS/MS-experiments and shows again that our synthetic α -allyl-manQ **4** is identical to the naturally occurring manQ compound. Of note, the calculated mass of α -allyl-manQ **4** and of galQ **2** is 572.2199 for $[xQ + H]^+$. Shown here are extracted ion chromatograms with $m/z = 572.2200 \pm 20$, allowing for a maximal mass deviation of $\delta = 3.7$ ppm only.

Of note, the proper HPLC-separation of the manQ-compounds on this system was more sensitive towards changes of gradient and column age than in case of the UHPLC-based separation with a *Poroshell 120 SB-C8* column. In rare cases, when the column had been used for a prolonged period of time, the peaks of synthetic α -homoallyl-manQ **11** and of the natural manQ compound α -allyl-manQ **4** were not properly separable any more.

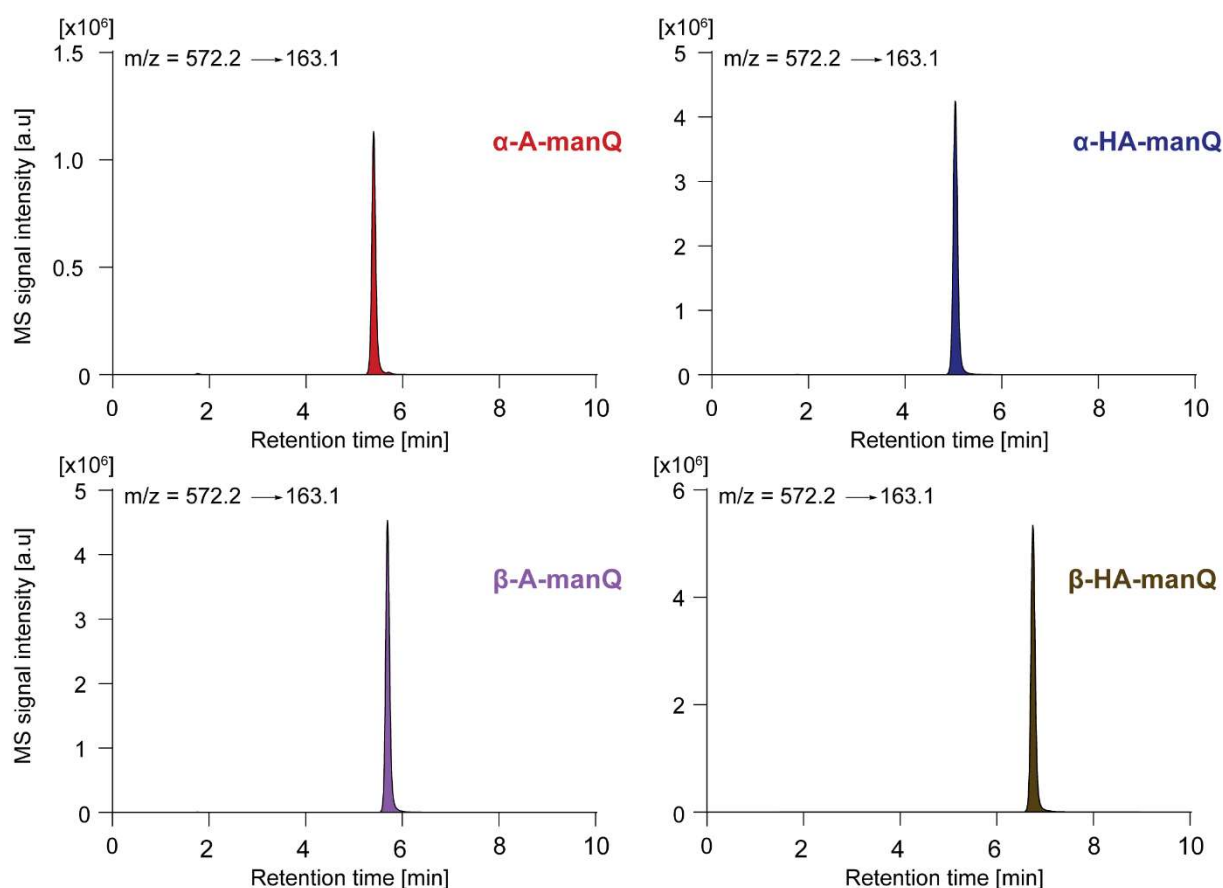
1.3 Investigation of manQ stability towards isomerization

To investigate whether our RNA isolation conditions could lead to isomerization of the manQ-isomers, we subjected compounds **3**, **4**, **10**, and **11** to the *TriReagent*-isolation conditions described above. For this, *TriReagent* (1 mL, *Sigma Aldrich*) was added to a solution of each standard and vortexed for 5 min. Chloroform (200 μ L) was added, the mixture was vortexed for 5 min and then kept at room temperature for 10 min. After centrifugation (12,000 g, 15 min, 4 $^{\circ}$ C), the aqueous phase was separated and isopropanol (500 μ L) was added. The solution was stored at -20 $^{\circ}$ C overnight. The solvent was evaporated and the residue was dissolved in H₂O (500 μ L). The aqueous phase was extracted with chloroform (3 x 200 μ L) and the solvent was removed by lyophilization. The residue was taken up in H₂O and analyzed by UHPLC-MS/MS. The resulting chromatograms are shown in **Supplementary Figure 4**. None of the isomers did undergo isomerization under these conditions.



Supplementary Figure 4. Investigation of manQ stability towards isomerization under our RNA isolation conditions. Depicted are the UHPLC-MS/MS chromatograms of the stability tests. After *TriReagent*-treatment, all four isomers still give the expected signal at their characteristic retention time with no additional peaks of an isomerization product appearing.

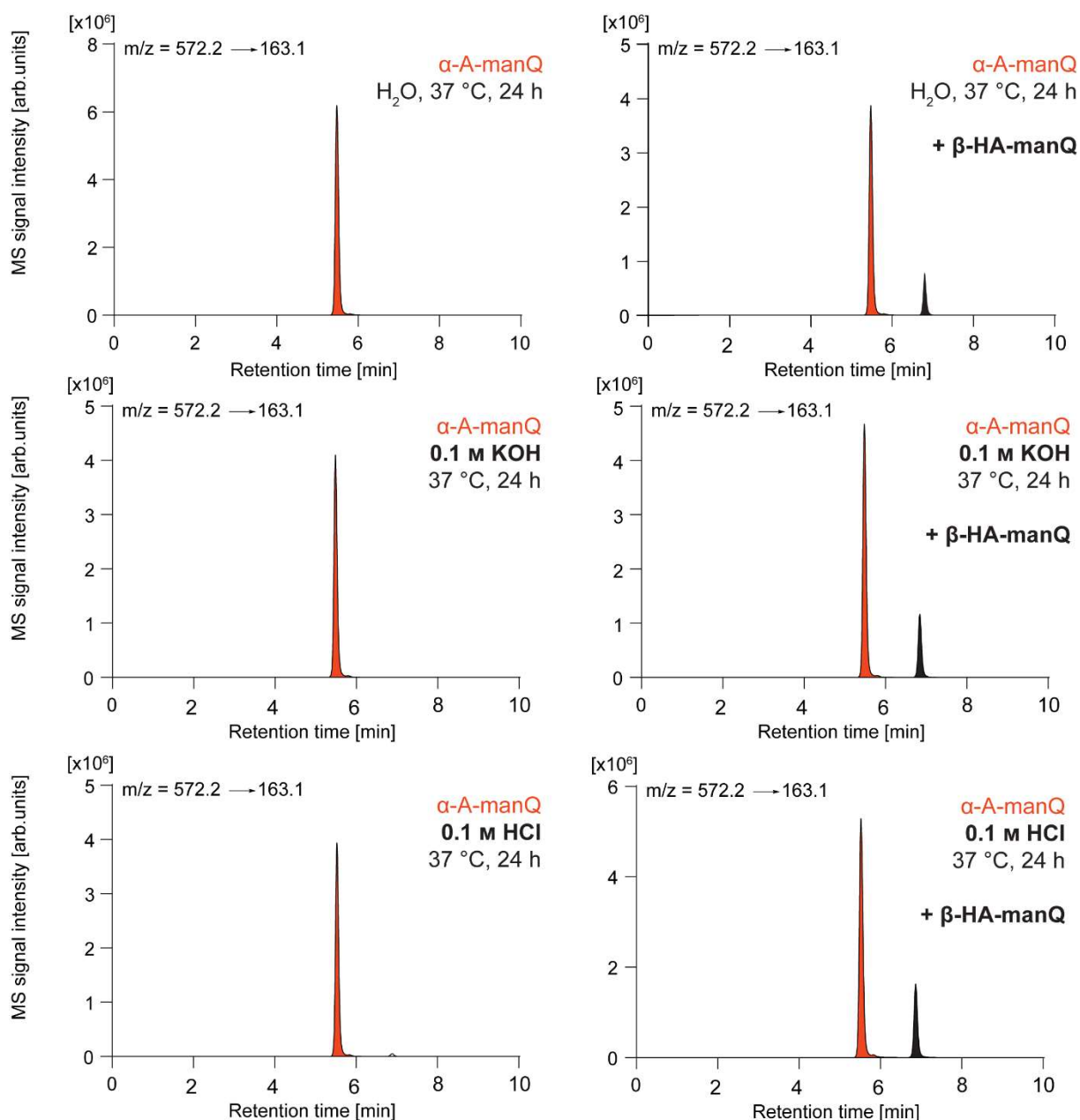
Next, we checked whether our RNA digestion conditions could lead to isomerization of the manQ compounds. To this reason, a solution of the manQ nucleoside standard **3**, **4**, **10**, or **11** in nuclease-free water (42.5 μ L) was prepared. 5 μ L of *Nucleoside Digestion Mix Reaction Buffer (10x, New England BioLabs)* and 2.5 μ L of *Nucleoside Digestion Mix (New England BioLabs)* were added, and the mixture was incubated for 2 h at 37 $^{\circ}$ C. The sample was then analyzed by UHPLC-MS/MS. The results for all manQ isomers are shown in **Supplementary Figure 5**. Under the conditions tested, no isomerization of any of the compounds **3**, **4**, **10** or **11** occurred.



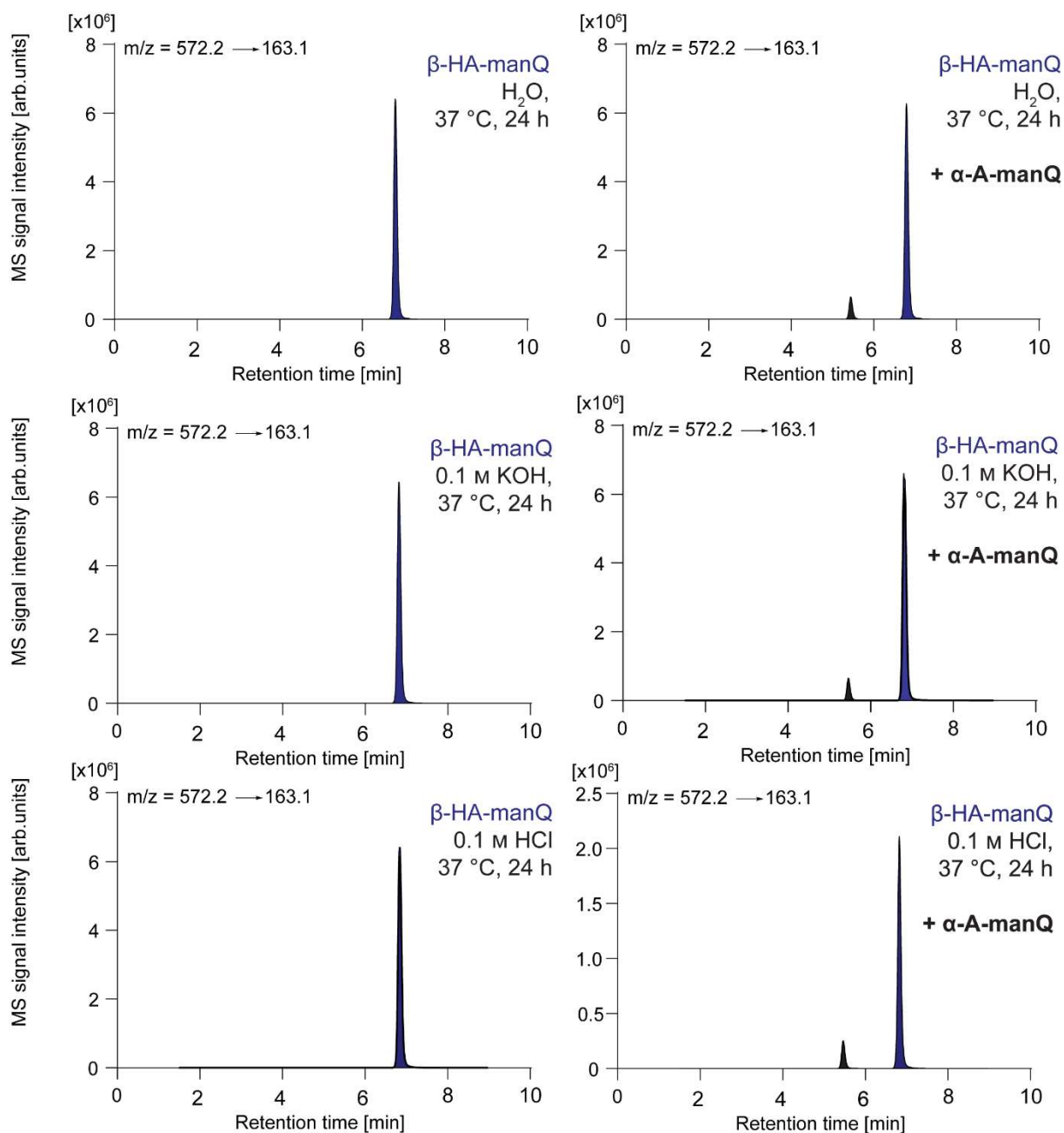
Supplementary Figure 5. Investigation of manQ stability towards isomerization under our RNA digestion conditions. Depicted are the UHPLC-MS/MS chromatograms of the stability tests. After treatment, all four isomers still give the expected signal at their characteristic retention time with no additional peaks of an isomerization product appearing.

We additionally tested whether α -allyl-manQ **4** and β -homoallyl-manQ **3** could isomerize into each other under certain pH-conditions. Theoretically, this isomerization might occur by an attack of the neighboring hydroxyl group at the cyclopentene unit, leading to a S_N2 -type rearrangement reaction. To investigate this possibility, we subjected compounds **3** and **4** to neutral (H_2O , pH 7), acidic (0.1 M HCl, pH 1) and basic conditions (0.1 M KOH, pH 13) and kept the solutions for 24 h at 37 $^{\circ}$ C. We then neutralized the solutions with KOH or HCl,

respectively, and analyzed the samples by UHPLC-MS/MS. To ensure similar conditions, 0.1 M KCl was added to the neutral samples. The results are depicted in **Supplementary Figures 6** (α -allyl-manQ) and **7** (β -homoallyl-manQ). In no case any formation of an isomerization product was detectable.



Supplementary Figure 6. Stability of α -allyl-manQ **4** (α -A-manQ) towards isomerization into β -homoallyl-manQ **3** (β -HA-manQ) under neutral, basic, and acidic conditions. Left side: UHPLC-MS/MS chromatograms obtained after the pH-treatment show no additional signals next to the expected one of manQ **4**; right side: chromatograms of treated samples spiked with compound **3** to indicate the retention time of this putative isomerization product. The data show no sign of an isomerization of compound **4** towards **3**.



Supplementary Figure 7. Stability of β -*homoallyl*-manQ **3** (β -HA-manQ) towards isomerization into α -*allyl*-manQ **4** (α -A-manQ) under neutral, basic and acidic conditions. Left side: UHPLC-MS/MS chromatograms obtained after the pH-treatment show no additional signals next to the expected one of manQ **3**; right side: chromatograms of treated samples spiked with compound **4** to indicate the retention time of this putative isomerization product. The data show no sign of an isomerization of compound **3** towards **4**.

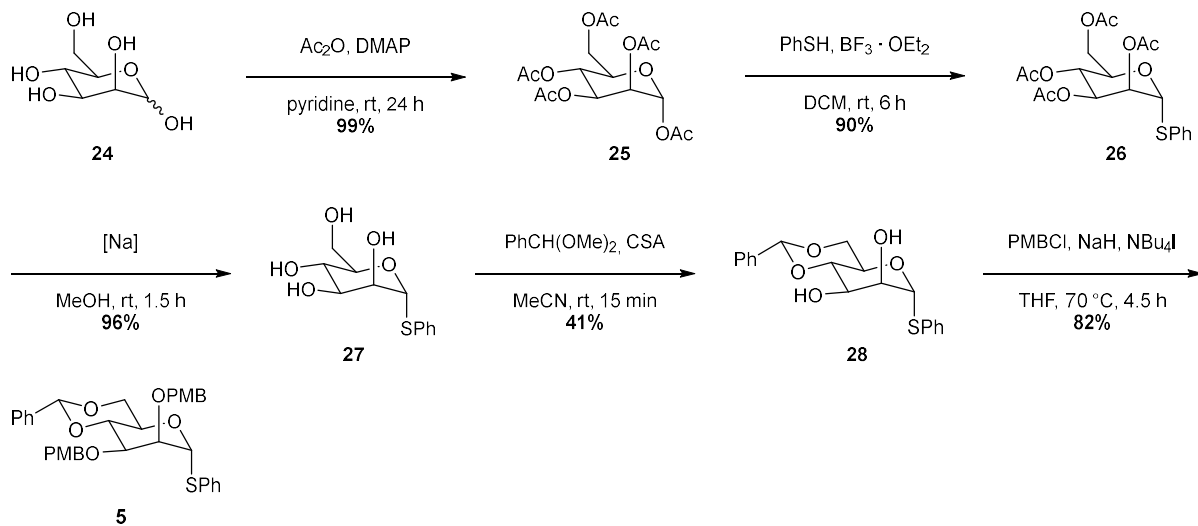
2. Metabolic feeding study to confirm mannose as the hexose-part of natural manQ

Supplementary Table 1: Composition of the used media. Light RPMI medium corresponds to regular RPMI medium. For Heavy RPMI medium, a glucose free RPMI mixture was used (w/o g.: without glucose). A combination of either mannose and glucose or galactose and glucose was added to 11 mM final concentration each. One of the two hexoses was fully ¹³C-labelled in each mixture.

Medium	Composition
Light RPMI medium	88 % (v/v) RPMI; 10 % (v/v) FBS; 1 % (v/v) Pen-Strep; 1 % Ala-Gln
Heavy RPMI medium gal/glc	88 % (v/v) RPMI (w/o g.); 10 % (v/v) FBS; 1 % (v/v) Pen-Strep; 1 % Ala-Gln; 11 mM D-galactose(- ¹³ C ₆); 11 mM D-glucose(- ¹³ C ₆)
Heavy RPMI medium man/glc	88 % (v/v) RPMI (w/o g.); 10 % (v/v) FBS; 1 % (v/v) Pen-Strep; 1 % Ala-Gln; 11 mM D-mannose(- ¹³ C ₆); 11 mM D-glucose(- ¹³ C ₆)

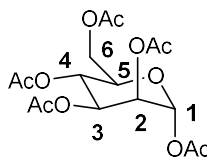
3. Chemical synthesis

3.1. Synthesis of glycosyl donor 5



Supplementary Figure 8: Synthesis of glycosyl donor 5 in 5 steps starting from D-mannose (29 % overall yield)

1,2,3,4,6-penta-O-acetyl- α -D-mannopyranose (25)²



D-Mannose (5.00 g, 27.8 mmol, 1.00 eq) was dissolved in pyridine (104 mL). Ac₂O (78.0 mL, 416 mmol, 30.0 eq) and DMAP (339 mg, 2.78 mmol, 0.10 eq) were added at 0 °C. The reaction was stirred at room temperature for 24 h, which resulted in an orange solution. After evaporation of the solvent *in vacuo* the residue was taken up in EtOAc (100 mL) and washed with aqueous HCl (1 M, 100 mL), H₂O (2 x 100 mL) and brine (100 mL). After evaporation of the solvent *in vacuo* the product (10.8 g, 27.7 mmol, 99%) was obtained as yellow viscous syrup. (only α -anomer).

R_f (EtOAc/*iso*-hexane 1:1) = 0.50.

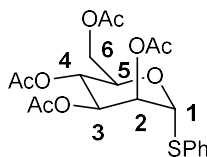
¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ = 6.08 (d, J = 1.9 Hz, 1H, C1H), 5.35 (m, 2H, C3H, C4H), 5.26 (td, J_1 = 2.2 Hz, J_2 = 0.7 Hz, 1H, C2H), 4.28 (dd, J_1 = 12.4, J_2 = 4.9 Hz, 1H, C6Ha), 4.13-4.02 (m, 2H, C5H, C6Hb) 2.18 (s, 3 H, CO₂CH₃), 2.17 (s, 3 H, CO₂CH₃), 2.09 (s, 3 H, CO₂CH₃), 2.05 (s, 3 H, CO₂CH₃), 2.01 (s, 3 H, CO₂CH₃) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ = 170.8 (CO₂CH₃), 170.2 (CO₂CH₃), 169.9 (CO₂CH₃), 169.7 (CO₂CH₃), 168.2 (CO₂CH₃), 90.7 (C1), 70.7 (C5), 68.8 (C3), 68.4 (C2), 65.6 (C4), 62.2 (C6), 21.0 (CO₂CH₃), 20.9 (CO₂CH₃), 20.9 (CO₂CH₃), 20.8 (CO₂CH₃), 20.8 (CO₂CH₃) ppm.

HRMS (ESI⁺) m/z calc. for C₁₆H₂₂O₁₁Na, [M+Na]⁺: 413.1060; found: 413.1056.

NMR-spectra in accordance with literature.

2,3,4,6-penta-O-acetyl-1-thiophenyl- α -D-mannopyranoside (26)³



25 (5.00 g, 12.8 mmol, 1.00 eq) was dissolved in DCM (25 mL). Thiophenol (2.65 mL, 2.82 g, 25.6 mmol, 2.00 eq) and $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (4.80 mL, 5.45 g 34.8 mmol, 3.00 eq) were added at 0 °C. The reaction was stirred at room temperature for 6 h. Saturated aqueous NaHCO_3 -solution (20 mL) was added and the reaction mixture was stirred for 15 min (until no more gas evolution was observable). The phases were separated and the aqueous phase was re-extracted with DCM (2 x 30 mL). The combined organic phases were washed with brine (20 mL), dried over Na_2SO_4 , filtered and the solvent was removed *in vacuo*. Column chromatographic purification (EtOAc/*iso*-hexane 1:3) afforded the product (5.09 g, 11.6 mmol, 90%) as yellow syrup.

R_f (EtOAc/*iso*-hexane 1:1) = 0.76.

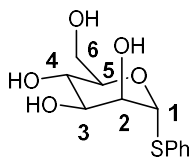
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz): δ = 7.44 (m, 2H, arom. CH), 7.26 (m with solvent peak, 3H, arom. CH), 5.46 (m, 2H, C1H, C2H), 5.28 (m, 2H, C3H, C4H), 4.50 (m, 1H, C5H), 4.26 (dd, $J_1 = 12.2$, $J_2 = 5.9$ Hz, 1H, C6Ha), 4.07 (m, 1H, C6Hb), 2.11 (s, 3H, CO_2CH_3), 2.03 (s, 3H, CO_2CH_3), 2.01 (s, 3H, CO_2CH_3), 1.97 (s, 3H, CO_2CH_3) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz): δ = 170.7 (CO_2CH_3), 170.0 (CO_2CH_3), 169.9 (CO_2CH_3), 169.9 (CO_2CH_3), 132.7 (arom. C), 132.2 (arom. C), 129.3 (arom. C), 128.2 (arom. C), 85.5 (C1), 71.0 (C2), 69.6 (C5), 69.5 (C3/C4), 66.5 (C3/C4), 62.6 (C6), 21.0 (CO_2CH_3), 20.8 (CO_2CH_3), 20.8 (CO_2CH_3), 20.8 (CO_2CH_3) ppm.

HRMS (ESI⁺) m/z calc. for $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{NaO}_9\text{S}$, $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 463.1039; found: 463.1037.

Analytical data in accordance with literature.

1-thiophenyl- α -D-mannopyranoside (27)³



26 (5.09 g, 11.6 mmol) was dissolved in MeOH (50 mL). A catalytic amount of sodium was added and the reaction mixture was stirred for 1.5 h at room temperature resulting in a suspension. The reaction was neutralized with AcOH, upon which the precipitate redissolved. Evaporation of the solvent gave the product (2.69 g, 11.1 mmol, 96%) as colorless foam.

R_f (EtOAc/*iso*-hexane 1:1) = 0.03.

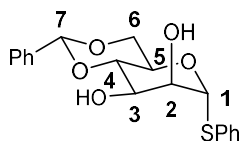
¹H-NMR (methanol- D_4 , 600 MHz): δ = 7.55-7.52 (m, 2H, aromatic CH), 7.34-7.26 (m, 3H, aromatic CH), 5.43 (d, J = 1.6 Hz, 1H, C1H), 4.09 (dd, J_1 = 3.2 Hz, J_2 = 1.6 Hz, 1H, C2H), 4.04 (ddd, J = 9.4, 5.4, 2.5 Hz, 1H, C5H), 3.83 (dd, J_1 = 12.0, J_2 = 2.5 Hz, 1H, C6Ha), 3.77 (dd, J = 12.0, 5.5 Hz, 1H, C6Hb), 3.73 (t, J_1 = J_2 = 9.4 Hz, 1H, C4H), 3.69 (dd, J_1 = 9.4 Hz, J_2 = 3.1 Hz, 1H, C3H) ppm.

¹³C-NMR (methanol- D_4 , 125 MHz): δ = 135.9 (aromatic C), 133.0 (aromatic C), 130.0 (aromatic C), 128.5 (aromatic C), 90.5 (C1), 75.7 (C5), 73.8 (C2), 73.2 (C3), 68.7 (C4), 62.6 (C6) ppm.

HRMS (ESI⁻) m/z calc. for $C_{12}H_{15}O_5S$, [M-H]⁻: 271.0646; found: 271.0644.

Analytical data in accordance with literature.

4,6-O-benzylidene-1-thiophenyl- α -D-mannopyranoside (28)⁴



27 (1.00 g, 3.67 mmol, 1.00 eq) was dissolved in MeCN (15 mL). CSA (213 mg, 0.918 mmol, 0.25 eq) and PhCH(OMe)₂ (0.61 mL, 615 mg, 4.04 mmol, 1.10 eq) were added. The reaction was stirred at room temperature for 15 min, after which a solid precipitated. DCM (50 mL) and H₂O (50 mL) were added and the phases were separated. The aqueous phase was reextracted with DCM (2 x 30 mL) and the combined organic phases were dried over Na₂SO₄, filtered and the solvent was evaporated. Column chromatographic purification (MeOH/DCM 1:200) gave the product (540 mg, 1.50 mmol, 41%) as colorless solid.

R_f (MeOH/DCM 1:100) = 0.24.

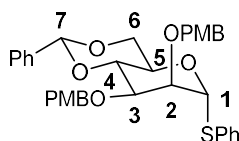
¹H-NMR (methanol-D₄, 600 MHz): δ = 7.53 (m, 4H, arom. CH), 7.34 (m, 6H, arom. CH), 5.64 (s, 1H, C7H), 5.50 (d, J = 1.2 Hz, 1H, C1H), 4.25 (td, J_1 = 9.7 Hz, J_2 = 4.9 Hz, 1H, C5H), 4.19 (dd, J_1 = 3.3 Hz, J_2 = 1.4 Hz, 1H, C2H), 4.14 (dd, J_1 = 10.2 Hz, J_2 = 4.9 Hz, 1H, C6Ha), 4.04 (t, J = 9.5 Hz, 1H, C4H), 3.96 (dd, J_1 = 9.9 Hz, J_2 = 3.3 Hz, 1H, C3Hw), 3.85 (t, J = 10.4 Hz, 1H, C6Hb) ppm.

¹³C-NMR (methanol-D₄, 600 MHz): δ = 137.4, 132.9, 130.2, 130.1, 129.1, 128.7, 127.5, 125.8 (all aromatic C), 103.4 (C7), 89.4 (C1), 72.9 (C2), 72.8 (C4), 68.6 (C3), 68.2 (C6), 65.1 (C5) ppm.

HRMS (ESI⁺) m/z calc. for C₁₉H₂₁O₅S, [M+H]⁺: 361.1104 ; found: 361.1106.

Analytical data in accordance with literature.

4,6-O-Benzylidene-2,3-di-O-(*para*-methoxybenzyl)-1-thiophenyl- α -D-mannopyranoside (5)⁵



28 (540 mg, 1.50 mmol, 1.00 eq) was dissolved in THF (11 mL). NaH (240 mg, 6.00 mmol, 4.00 eq) was added at 0 °C. Next, PMB-Cl (0.81 mL, 940 mg, 6.00 mmol, 4.00 eq) and NBu₄I (28.0 mg, 0.075 mmol, 0.05 eq) were added. The reaction was stirred at 70 °C for 4.5 h before being cooled to room temperature. Saturated aqueous NaHCO₃-solution (20 mL) was added and the phases were separated. The aqueous phase was re-extracted with EtOAc (3 x 50 mL). The combined organic phases were dried over Na₂SO₄, filtered and the solvent was removed *in vacuo*. Column chromatographic purification (EtOAc/*iso*-hexane 1:2) afforded the product (739 mg, 1.23 mmol, 82%) as colorless syrup.

R_f (MeOH/DCM 1:100) = 0.24.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ = 7.33 (m, 14H, arom. CH), 6.85 (m, 4H, arom. CH), 5.62 (s, 1H, C7H), 5.43 (d, J = 1.4 Hz, 1H, C1H), 5.62 (s, 1H, C1H), 5.43 (d, J = 1.4 Hz, 1H), 4.72 (d, J = 11.8 Hz, 1H, CH₂), 4.63 (s, 2H, CH₂), 4.56 (d, J = 11.8 Hz, 1H, CH₂), 4.23 (m, 3H, C3H, C5H, C6Ha), 3.97 (dd, J_1 = 3.3 Hz, J_2 = 1.4 Hz, 1H, C2H), 3.89 (m, 2H, C4H, C6Hb), 3.80 (OCH₃), 3.79 (OCH₃) ppm.

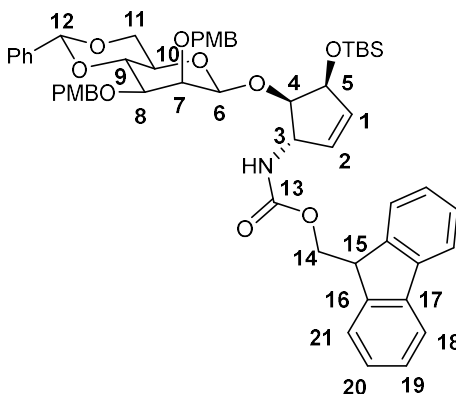
¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ = 159.4, 159.3, 137.7, 134.0, 131.7, 130.6, 130.0, 129.9, 129.5, 129.2, 129.0, 128.3, 127.7, 126.2, 114.0, 113.9 (all aromatic C), 101.6 (C7), 87.3 (C1), 79.1 (C3), 77.6 (C2), 75.9 (C4), 72.8 (CH₂), 72.8 (CH₂), 68.6 (C6), 65.6 (C5), 55.4 (2C, OCH₃) ppm.

HRMS (ESI⁺) m/z calc. for C₃₅H₃₆O₇SNa, [M+Na]⁺: 623.2079; found: 623.2076.

Analytical data in accordance with literature.

3.2 Synthesis of β -homoallyl-manQ (3)

(9H-fluoren-9-yl)methyl((1S,4S,5R)-5-(((2R,4aR,6R,7S,8S,8aR)-7,8-bis((4-methoxybenzyl)oxy)-2-phenylhexahydro-pyrano[3,2-d][1,3]dioxin-6-yl)oxy)-4-((tert-butyl-dimethylsilyl)oxy)cyclopent-2-en-1-yl)carbamate (7)



Cyclopentene **6** (100 mg, 219 μ mol, 1.00 eq) was dissolved in DCM (2.5 mL) and stirred with 3 Å molsieves for 15 min (solution **A**). Glycosyl donor **5** (131 mg, 219 μ mol, 1.00 eq) and DTBMP (135 mg, 656 μ mol, 3.00 eq) were dissolved in DCM (2.5 mL) and stirred with 3 Å molsieves for 15 min (solution **B**). AgOTf (168 mg, 656 μ mol, 3.00 eq) was dissolved in DCM (2.5 mL) and 3 Å molsieves were added. The reaction was cooled to -78 °C and stirred at that temperature for 15 min. A solution of PhSCl (546 μ mol, 2.50 eq) in DCM (2.7 mL) was added and the reaction mixture was stirred at -78 °C for 5 min. Next, solution **B** was added and the reaction was stirred at -78 °C for 10 min. Then solution **A** was added and the reaction was stirred at -78 °C for 2 h. Saturated aqueous NaHCO₃-solution (20 mL) was added and the mixture was warmed to room temperature. After filtration, the phases were separated and the aqueous phase was re-extracted with DCM (3 x 20 mL). The combined organic phases were dried over Na₂SO₄, filtered and the solvent was removed *in vacuo*. Column chromatographic purification (EtOAc/*iso*-hexane 1:5 \rightarrow 1:3) gave the product (136 mg, 142 μ mol, 62%) as colorless solid.

R_f (EtOAc/*iso*-hexane 1:3) = 0.12.

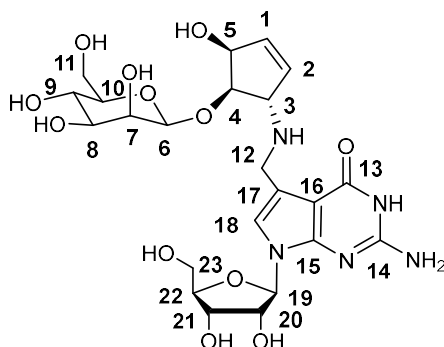
¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃, depicted in section 4 below): δ = 7.75 (d, J = 7.7 Hz, 2H, C21H), 7.56 (d, J = 7.4 Hz, 1H, C18H), 7.49 (m, 2H, C120H), 7.36 (m, 7H, arom. CH), 7.29 (m, 2H, C19H), 7.14 (d, J = 8.2 Hz, 2H, arom. CH), 6.83 (m, 2H, arom. CH), 6.79 (d, J = 8.4 Hz, 2H, arom. CH), 5.93 (m, 1H, C1H), 5.82 (d, J = 6.2 Hz, 1H, C2H), 5.59 (s, 1H, C12H), 4.83 (m, 4H, C3H, C6H (¹J_{C-H} = **158** Hz), CH₂), 4.51 (m, 6H, C13H, C5H, 2 x CH₂), 4.25 (dd, J_1 = 10.3 Hz, J_2 = 4.8 Hz, 1H, C11Ha), 4.20 (t, J = 6.7 Hz, 1H, C14H), 4.11 (m, 1H, C9H), 3.96 (m, 2H, C4H, C7H), 3.86 (t, J = 10.3 Hz, 1H, C11Hb), 3.78 (s, 3H, OCH₃), 3.77 (s, 3H, OCH₃), 3.53 (d, J = 9.8 Hz, 1H, C8H), 3.24 (m, 1H, C10H), 0.87 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 0.07 (s, 6H, SiCH₃) ppm.

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃, depicted in section 4 below): δ = 159.2 (arom. C), 155.8 (C13), 143.9 (C17), 141.5 (C16), 134.6 (C2), 134.3 (C1), 130.41 (arom. C), 129.2 (arom. C), 128.9 (arom. C), 128.3 (arom. C), 127.9 (arom. C), 127.2 (C19), 126.2 (C20), 125.0 (C18), 120.1 (C21), 113.8

(arom. C), 113.6 (arom. C), 101.5 (C12), 101.1 (C6), 82.8 (C4), 78.7 (C9), 77.6 (C8), 75.3 (C7), 74.4 (OCH₂), 74.3 (C5), 71.9 (OCH₂), 68.8 (C11), 67.8 (C10), 66.7 (C14), 59.0 (C3), 55.4 (OCH₃), 55.4 (OCH₃), 47.4 (C15), 26.1 (SiC(CH₃)₃), -4.2 (SiCH₃), -4.4 (SiCH₃) ppm.

HRMS (ESI⁺) m/z calc. for C₅₅H₆₇N₂O₁₁Si, [M+NH₄]⁺: 959.4509; found: 959.4524.

β -*homoallyl*-mannosyl-queuosine (3)



12 (23 mg, 24.0 μmol) was dissolved in 10% HNMe_2 in THF (1 mL). The reaction was stirred for 1 h at room temperature before the solvent was removed *in vacuo*. The resulting yellow solid was washed with hexane to afford the product as colorless solid. The resulting Fmoc-deprotected derivative (14.9 mg, 20.6 μmol , 1.00 eq) was dissolved in MeOH (0.5 mL) and **13** (14.6 mg, 20.6 μmol , 1.00 eq) and AcOH (1 μL) were added. The reaction was stirred at rt for 5 h before it was cooled to 0 $^\circ\text{C}$ and NaBH_4 (2.02 mg, 53.6 μmol , 2.60 eq) was added. The reaction was stirred at 0 $^\circ\text{C}$ for 1 h. Then H_2O was added and the solvent was evaporated. The residue was dissolved in MeOH (1 mL) and NaOMe (27.0 mg, 0.5 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 5 h, after which LC-MS indicated deprotection of all ester type protecting groups. The solution was neutralized with DOWEX- H^+ -resin, then filtered and the solvent was evaporated. The residue was taken up in DCM (0.9 mL) and TFA (0.1 mL) was added at 0 $^\circ\text{C}$. The reaction was stirred at 0 $^\circ\text{C}$ for 20 min, then saturated aqueous NaHCO_3 -solution was added (1 mL). The mixture was evaporated and the residue was taken up in pyridine (1.5 mL) and $\text{HF} \cdot \text{pyridine}$ (7.5 eq) was added in a plastic falcon. The reaction was stirred for 18 h at room temperature before TMSOMe (15.0 eq) was added at 0 $^\circ\text{C}$. After stirring the reaction for 1 h at 0 $^\circ\text{C}$, the solvent was evaporated *in vacuo*. The residue was dissolved in H_2O (5 mL), filtered and subjected to preparative HPLC-purification (0-8% buffer B, 45 min, $R_t = 29.2$ min) to afford β -*homoallyl*-manQ as a colorless solid (2.99 mg, 5.24 μmol , 22% over 5 steps).

RP-HPLC: R_t (C18-column, 0-8% buffer B, 45 min) = 29.2 min.

$^1\text{H-NMR}$ (methanol- D_4 , 600 MHz, depicted in section 4 below): $\delta = 7.04$ (s, 1H, C18H), 6.11 (ddd, $J_1 = 6.3$ Hz, $J_2 = 2.6$ Hz, $J_3 = 1.9$ Hz, 1H, C1H), 6.07 (dd, $J_1 = 6.3$ Hz, $J_2 = 1.9$ Hz, 1H, C2H), 5.93 (d, $J = 5.9$ Hz, 1H, C19H), 4.72 (d, $J = 0.7$ Hz, $^1J_{\text{C-H}} = 160$ Hz, 1H, C6H), 4.68 (ddd, $J_1 = 5.1$ Hz, $J_2 = 2.6$ Hz, $J_3 = 1.5$ Hz, 1H, C5H), 4.43 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H, C20H), 4.23 (dd, $J_1 = 5.4$ Hz, $J_2 = 3.6$ Hz, 1H, C21H), 4.16 (m, 4H, C3H, C4H, C12H), 4.02 (q, $J = 3.4$ Hz, 1H, C22H), 3.98 (dd, $J_1 = 3.2$ Hz, $J_2 = 0.4$ Hz, 1H, C7H), 3.87 (dd, $J_1 = 11.8$ Hz, $J_2 = 2.3$ Hz, 1H, C11Ha), 3.81 (dd, $J_1 = 12.2$ Hz, $J_2 = 3.1$ Hz, 1H, C23Ha), 3.75 (dd, $J_1 = 12.0$ Hz, $J_2 = 5.6$ Hz, C11Hb), 3.72 (dd, $J_1 = 12.2$ Hz, $J_2 = 3.6$ Hz, 1H, C23Hb), 3.62 (t, $J = 9.6$ Hz, 1H, C9H), 3.49 (dd, $J_1 = 9.4$ Hz, $J_2 = 3.2$ Hz, 1H, C8H), 3.28 (ddd, $J_1 = 9.8$ Hz, $J_2 = 5.5$ Hz, $J_3 = 2.3$ Hz, C10H), 1.93 (s, 3H, OAc $^-$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (methanol- D_4 , 150 MHz, depicted in section 4 below): $\delta = 162.3$ (C12), 154.4 (C14), 153.6 (C15), 136.3 (C1), 132.9 (C2), 130.9 (arom. C), 130.6 (arom C), 119.4 (C18), 113.9 (C17),

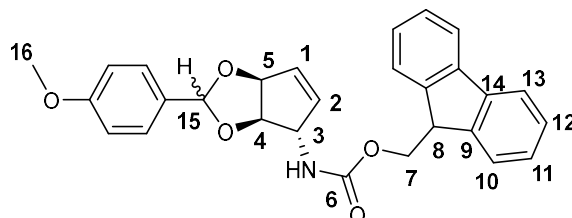
102.5 (C6), 100.8 (C16), 89.7 (C19), 86.5 (C22), 84.9 (C4), 78.5 (C10), 75.7 (C20), 75.1 (C8), 75.0 (C5), 72.3 (C7), 72.2 (C21), 68.2 (C9), 65.9 (C3), 63.3 (C23), 62.6 (C11), 43.9 (C12), 22.0 (CH₃CO₂⁻) ppm.

Note: A ¹H-¹³C-⁻HMBC spectrum of this compound is shown in section 4 below.

HRMS (ESI⁺) m/z calc. for C₂₃H₃₃N₅O₁₂, [M+H]⁺: 572.2199; found: 572.2200.

3.3 Regioselective protection of 12 towards cyclopentene precursors 13-15

(9H-fluoren-9-yl)methyl((1S,4S,5R)-4,5-*para*-methoxybenzylidene-2-en-1-yl)carbamate (29)



12 (1.50 g, 4.50 mmol, 1.00 eq) was dissolved in DMF (75 mL) and anisaldehyde dimethyl acetal (0.92 mL, 984 mg, 5.40 mmol, 1.20 eq) and racemic camphor-10-sulfonic acid (105 mg, 0.45 mmol, 0.10 eq) were added subsequently. The reaction was stirred at room temperature for 2 h. Saturated aqueous NaHCO₃-solution was added and the phases were separated. After extracting the aqueous phase with DCM (3 x 200 mL), the organic phases were dried over Na₂SO₄, filtered and the solvent was evaporated *in vacuo*. Column chromatographic purification (EtOAc/*iso*-hexane 1:5 → EtOAc) gave the product (2.00 g, 4.39 mmol, 98%, 2 Isomers, A:B = 1:0.35) as colorless solid.

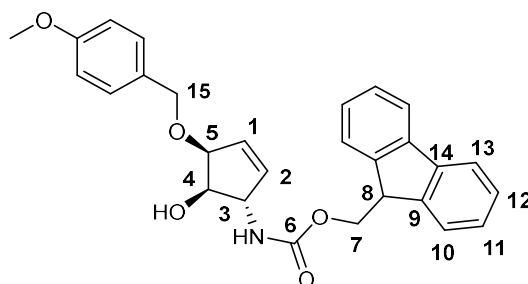
R_f (EtOAc/*iso*-hexane 1:3) = 0.30 (A+B, copolar).

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃, depicted in section 4 below): δ = 7.77 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, C13H), 7.58 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H, C10H), 7.39 (m, 4H, C12H, arom. CH), 7.32 (m, 2H, C11H), 6.88 (m, 2H, arom. CH), 6.07 (m, 1 H, C1H (Isomer A + Isomer B)), 5.99 (m, 1H, C2H (Isomer B)), 5.81 (m, 1H, C2H (Isomer B)), 5.85 (s, 1H, C15H (Isomer A)), 5.65 (s, 1H, C15H (Isomer B)), 5.49 (m, 1H, C5H), 4.76 (m, 2H, C3H), 4.59 (m, 1H, C4H), 4.46 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H, C7H), 4.22 (m, 1H, C8H), 3.81 (s, 3H, OCH₃ (Isomer B)), 3.80 (s, 3H, OCH₃ (Isomer A)) ppm.

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃, depicted in section 4 below): δ = 160.7 (arom. C), 155.8 (C6), 144.0 (C9), 141.5 (C14), 132.6 (C2 (Isomer A)), 135.6 (C1, Isomer A + B), 134.8 (C1, Isomer A), 129.0 (arom. C), 128.4 (arom. C), 127.9 (C12), 127.2 (C11), 125.1 (C10), 120.2 (C13), 113.9 (arom. C), 105.6 (C15, Isomer A), 101.8 (C15, Isomer B), 85.4 (C4 Isomer A), 84.8 (C5), 84.0 (C4 Isomer B), 66.8 (C7), 62.4 (C3), 55.5 (OCH₃), 47.4 (C8) ppm.

HRMS (ESI⁺) *m/z* calc. for C₂₈H₂₅NO₅Na, [M+Na]⁺: 478.1630; found: 478.1629.

(9H-fluoren-9-yl)methyl((1S,4S,5R)-5-hydroxy-4-(*para*-methoxybenzyl)oxycyclopent-2-en-1-yl)carbamate (13)



29 (2.00 g, 4.39 mmol, 1.00 eq) was dissolved in DCM (60 mL) and cooled to $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ (dry ice/acetone). To ensure temperature equilibration, the mixture was stirred for 30 min. Then DIBAL-H (35.1 mL, 1 M solution in hexane, 35.1 mmol, 8.00 eq) was added slowly over 1.5 h ensuring that the temperature stays constant. After complete addition, the reaction mixture was stirred for another 1.5 h at $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$. Next, saturated aqueous Rochelle salt solution (30 mL) was added and the mixture was warmed to room temperature. Then, more DCM (150 mL) and Rochelle salt solution (500 mL) was added and the phases were separated. The aqueous phase was extracted with DCM (3 x 150 mL) and the organic phases were dried over Na_2SO_4 , filtered and the solvent was evaporated. Column chromatographic purification (EtOAc/*iso*-hexane 3:1) gave the product (1.71 g, 3.73 mmol, 85%) as colorless solid.

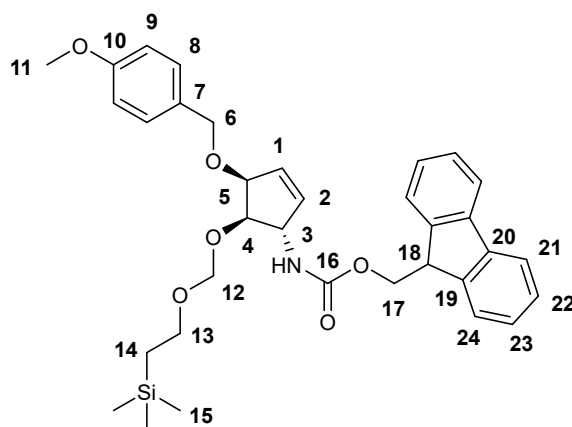
R_f (EtOAc/*iso*-hexane 1:3) = 0.22.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3 , depicted in section 4 below): δ = 7.76 (d, J = 7.7 Hz, 2H, C13H), 7.59 (m, 2H, C10H), 7.40 (t, J = 7.4 Hz, 2H, C12H), 7.31 (tt, J_1 = 7.4 Hz, J_2 = 1.1 Hz, 2H, C11H), 7.26 (m, 2H (overlapping with solvent peak), arom. CH), 6.89 (d, J = 8.3 Hz, arom. CH), 5.97 (m, 1H, C1H), 5.93 (m, 1H, C2H), 4.81 (d, J = 7.7 Hz, 1H, C4OH), 4.61 (m, 1H, C3H), 4.56 (m, 2H, C15H), 4.43 (m, 3H, C5H, C7H), 4.22 (m, 1H, C8H), 3.99 (m, 1H, C4H), 3.81 (s, 3H, OCH_3) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3 , depicted in section 4 below): δ = 159.5 (arom. C), 156.2 (C6), 144.0 (C9), 141.5 (C14), 136.0 (C2), 132.0 (C1), 125.2 (C10), 120.1 (C13), 127.8 (C12), 127.2 (C11), 129.6 (arom. C), 129.0 (arom. C), 114.1 (arom. C), 80.02 (C5), 77.3 (C4), 71.8 (C15), 66.8 (C7), 62.8 (C3), 55.3 (OCH_3), 47.2 (C8) ppm.

HRMS (ESI⁺) m/z calc. for $\text{C}_{28}\text{H}_{27}\text{NO}_5\text{Na}$, $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 480.1787; found: 480.1785.

(9H-fluoren-9-yl)methyl((1S,4S,5R)-4-(*para*-methoxybenzyl)oxy-5-((2-trimethylsilylethoxy)-methyl)oxy-cyclopent-2-en-1-yl)carbamate (30)



13 (800 mg, 1.75 mmol, 1.00 eq) was dissolved in DMF (16 mL) and SEM-Cl (1.55 mL, 1.46 g, 8.74 mmol, 5.00 eq), pyridine (2.11 mL, 26.2 mmol, 15.0 eq) and NBu_4I (64.6 mg, 0.175 mmol, 0.10 eq) were added subsequently. The reaction was stirred at 70 °C for 18 h before the solvent was evaporated *in vacuo*. Column chromatographic purification (EtOAc/*iso*-hexane 5:1 → 4:1) gave the product (767 mg, 1.30 mmol, 75%) as colorless solid.

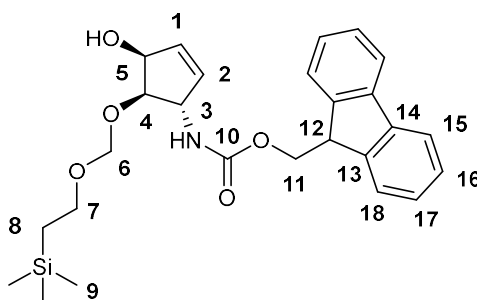
R_f (EtOAc/*iso*-hexane 1:4) = 0.15.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3 , depicted in section 4 below): δ = 7.76 (d, J = 7.5 Hz, 1H, C21H), 7.59 (t, J = 6.0 Hz, 1H, C24H), 7.40 (t, J = 7.5 Hz, 1H, C22H), 7.31 (tt, J_1 = 7.5 Hz, J_2 = 1.3 Hz, 2H, C23H), 7.26 (m, 2H, arom. CH (PMB)), 6.87 (d, J = 8.4 Hz, 2H, arom. CH (PMB)), 6.01 (s, 1H, C2H), 5.95 (s, 1H, C1H), 4.88 (d, J = 4.8 Hz, 1H, C12Ha), 4.78 (m, 2H, C12Hb, C3H), 4.60 (d, J = 11.6 Hz, 1H, C6Ha), 4.51 (d, J = 11.6 Hz, 1H, C6Hb), 4.45 (m, 2H, C5H, C17Ha), 4.36 (m, 1H, C17Hb), 4.21 (m, 1H, C18H), 3.98 (m, 1H, C4H), 3.80 (s, 3H, C11H), 3.71 (m, 2H, C13H), 0.94 (t, J = 8.6 Hz, 2H, C14H), -0.02 (s, 9H, $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3 , depicted in section 4 below): δ = 159.2 (C10), 155.8 (C16), 143.9 (C19), 141.3 (C20), 135.9 (C2), 131.7 (C1), 130.5 (C7), 129.3 (C8), 127.7 (C22), 127.0 (C23), 125.0 (C24), 120.0 (C21), 113.7 (C9), 94.3 (C12), 81.3 (C4), 78.6 (C5), 70.7 (C6), 66.7 (C17), 65.7 (C13), 60.6 (C3), 55.2 (C11), 47.2 (C18), 18.1 (C14), -1.50 (C15) ppm.

HRMS (ESI⁺) m/z calc. for $\text{C}_{34}\text{H}_{41}\text{NO}_6\text{SiNa}$, $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 610.2601; found: 610.2599.

(9H-fluoren-9-yl)methyl((1S,4S,5R)-4-hydroxy-5-((2-trimethylsilyloxy)-methyl)oxy-cyclopent-2-en-1-yl)carbamate (14)



30 (506 mg, 0.86 mmol) was dissolved in DCM (22.5 mL) and cooled to 0 °C. The mixture was stirred at 0 °C for 30 min to ensure temperature equilibration. Next, TFA (2.5 mL) was added and the reaction was stirred at 0 °C for 5 min. The reaction was stopped by first addition of HNEt₃OAc (1 M in DCM, 20 mL) and then saturated aqueous NaHCO₃-solution in quick succession. The phases were separated and the aqueous phase was extracted with DCM (3 x 50 mL). The organic phases were dried over MgSO₄, filtered and the solvent was evaporated *in vacuo*. Column chromatographic purification (EtOAc/*iso*-hexane 2:1) gave the product (335 mg, 0.71 mmol, 83%) as colorless solid.

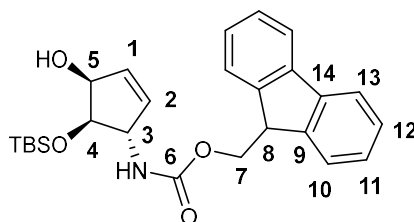
R_f (EtOAc/*iso*-hexane 1:2) = 0.20

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃, depicted in section 4 below): δ = 7.77 (dt, *J*₁ = 7.5 Hz, *J*₂ = 0.9 Hz, 2H, C15H), 7.59 (m, 2H, C18H), 7.40 (m, 2H, C16H), 7.32 (td, *J*₁ = 7.4 Hz, *J*₂ = 1.1 Hz, 2H, C17H), 6.03 (m, 1H, C1H), 5.92 (m, 1H, C2H), 4.85 (m, 2H, C5H, C6Ha), 4.71 (m, 2H, C3H, C6Hb), 4.43 (m, 2H, C11H), 4.22 (m, 1H, C12H), 3.95 (m, 1H, C4H), 3.68 (m, 2H, C7H), 0.96 (t, *J* = 8.6 Hz, 2H, C8H), 0.01 (s, 9H, (SiCH₃)₃) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃, depicted in section 4 below): δ = 144.2 (C13), 141.6 (C14), 135.2 (C2), 134.2 (C1), 128.0 (C16), 127.4 (C17), 125.3 (C18), 120.3 (C15), 95.1 (C6), 82.2 (C4), 73.6 (C5), 67.0 (C11), 66.4 (C7), 60.9 (C3), 47.5 (C12), 18.4 (C8), -1.15 (SiCH₃)₃ ppm.

HRMS (ESI⁺) *m/z* calc. for C₂₆H₃₃NO₅SiNa, [M+Na]⁺: 490.2026; found: 490.2024.

(9H-fluoren-9-yl)methyl((1S,4S,5R)-5-((tert-butyldimethylsilyl)oxy)-4-hydroxycyclopent-2-en-1-yl)carbamate (15)



12 (200 mg, 0.59 mmol, 1.00 eq) was dissolved in DMF (6 mL) and cooled to -10 °C (NaCl/ice bath). Next, TBSOTf (163 μ L, 188 mg, 0.71 mmol, 1.20 eq) was added and the reaction was stirred for 2 h at -10 °C. Saturated aqueous NaHCO₃-solution was added and the phases were separated. After extracting the aqueous phase with DCM (3 x 50 mL), the organic phases were dried over Na₂SO₄, filtered and the solvent was evaporated *in vacuo*. Column chromatographic purification (EtOAc/*iso*-hexane 1:5) gave the product (110 mg, 0.24 mmol, 41%) as colorless solid.

R_f (EtOAc/*iso*-hexane 1:3) = 0.12.

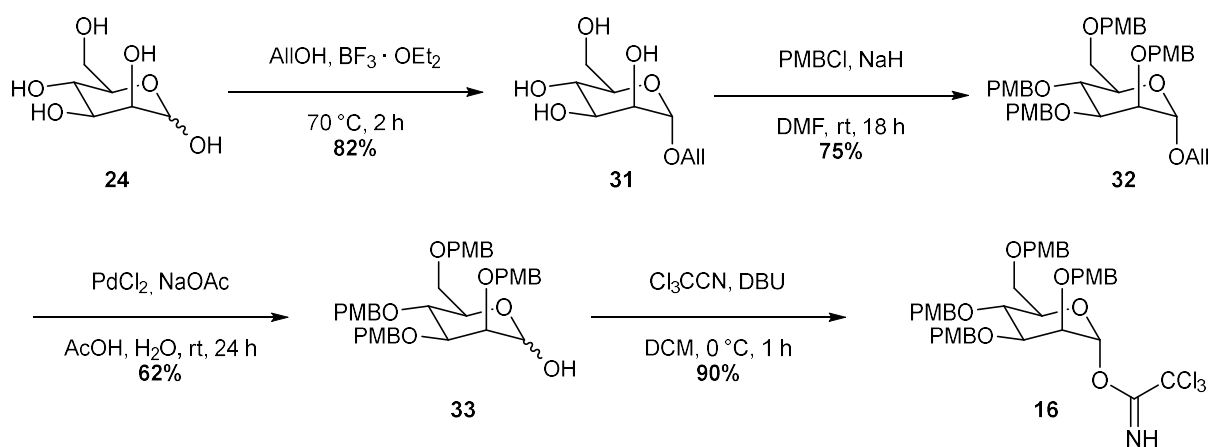
¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃, depicted in section 4 below): δ = 7.77 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, C13H), 7.58 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, C10H), 7.40 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, C12H), 7.31 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, C11H), 6.00 (d, *J* = 5.7 Hz, 1H, C1H), 5.83 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H, C2H), 4.56 (m, 2H, C3H, C5H), 4.43 (m, 2H, C6H), 4.21 (t, *J* = 6.8 Hz, 1H, C7H), 4.04 (m, 1H, C4H), 0.92 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 0.17 (s, 3H, SiCH₃), 0.14 (s, 3H, SiCH₃) ppm.

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃, depicted in section 4 below): δ = 155.8 (C6), 144.0 (C9), 141.5 (C14), 135.8 (C1), 133.5 (C2), 127.8 (C12), 127.2 (C11), 125.1 (C10), 120.1 (C13), 77.5 (C4), 74.2 (C5), 66.7 (C7), 62.6 (C3), 47.4 (C8), 25.9 (SiC(CH₃)₃), 18.2 (SiC(CH₃)₃), -4.5 (SiCH₃), -5.0 (SiCH₃) ppm.

²⁹Si-NMR (80 MHz, CDCl₃, depicted in section 4 below): δ = 23.2 ppm.

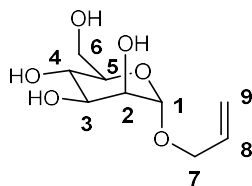
HRMS (ESI⁺) *m/z* calc. for C₂₆H₃₇N₂O₄Si, [M+NH₄]⁺: 469.2517; found: 469.2520.

3.4 Synthesis of glycosyl donor 16



Supplementary Figure 9: Synthesis of glycosyl donor 16 in 4 steps starting from D-mannose (overall yield: 34 %)

1-O-allyl-D-mannopyranose (31)⁶



D-Mannose (5.00 g, 27.8 mmol, 1.00 eq) was suspended in AlIOH (25 mL) and $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (343 μL , 2.78 mmol, 0.10 eq) was added. The reaction was heated to 70 °C for 2 h. After cooling to room temperature, the mixture was neutralized with NEt_3 and the solvent was evaporated *in vacuo*. Column chromatographic purification (MeOH/DCM 1:10) gave the product (5.02 g, 22.8 mmol, 82%) as colorless gum.

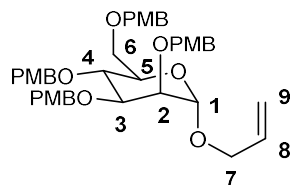
R_f (MeOH/DCM 1:5) = 0.46.

¹H-NMR (600 MHz, methanol- D_4): δ = 5.98 (m, 1H, C8H), 5.34 (dq, J_1 = 17.2 Hz, J_2 = 1.7 Hz, 1H, C9Ha), 5.21 (m, 1H, C9Hb), 4.83 (d, J = 1.7 Hz, 1H, C1H), 4.26 (ddt, J_1 = 13.1 Hz, J_2 = 5.1 Hz, J_3 = 1.5 Hz, 1H, C7Ha), 4.05 (ddt, J_1 = 13.1 Hz, J_2 = 6.0 Hz, J_3 = 1.4 Hz, 1H, C7Hb), 3.87 (dd, J_1 = 11.8 Hz, J_2 = 2.4 Hz, 1H, C6Ha), 3.85 (dd, J_1 = 3.4 Hz, J_2 = 1.7 Hz, 1H, C2H), 3.75 (m, 2H, C3H, C6Hb), 3.65 (t, J = 9.5 Hz, 1H, C4H), 3.58 (m, 1H, C5H) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, methanol- D_4): δ = 135.5 (C8), 117.2 (C9), 100.8 (C1), 74.8 (C5), 72.7 (C3), 72.6 (C2), 68.8 (C7), 68.7 (C4), 63.4 (C6) ppm.

HRMS (ESI⁺) m/z calc. for $\text{C}_9\text{H}_{16}\text{O}_6\text{Na}$, $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 243.0845; found: 243.0838.

1-O-allyl-2,3,4,6-O-(*para*-methoxybenzyl)-D-mannopyranose (32)



31 (1.84 g, 8.36 mmol, 1.00 eq) was dissolved in DMF (19 mL). NaH (2.00 g, 50.1 mmol, 6.00 eq) was added at 0 °C and the reaction was stirred for 30 min before PMB-Cl (6.80 mL, 7.85 g, 50.1 mmol, 6.00 eq) was added dropwise. The mixture was stirred at room temperature for 18 h and the poured into saturated aqueous NaHCO₃-solution. The solution was extracted with DCM (3 x 200 mL), the combined organic phases were dried over Na₂SO₄, filtered, and the solvent was evaporated *in vacuo*. Column chromatographic purification (EtOAc/*iso*-hexane 1:4 → 1:3) yielded the product (4.39 g, 6.27 mmol, 75%) as colorless syrup.

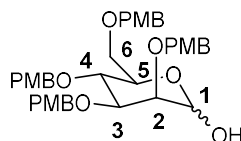
R_f (EtOAc/*iso*-hexane 1:3) = 0.15.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.28 (m, 6H, arom. CH), 7.04 (m, 2H, arom. CH), 6.83 (m, 8H, arom. CH), 5.83 (m, 1H, C8H), 5.20 (dd, *J*₁ = 10.4 Hz, *J*₂ = 1.4 Hz, 1H, C9Ha), 5.13 (dd, *J*₁ = 10.4 Hz, *J*₂ = 1.4 Hz, 1H, C9Hb), 4.87 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, C1H), 4.77 (d, *J* = 10.3 Hz, 1H, CH₂), 4.63 (m, 3H, CH₂), 4.51 (m, 3H, CH₂), 4.38 (d, *J* = 10.2 Hz, 1H, CH₂), 4.15 (m, 1H, C7Ha), 3.90 (m, 3H, C4H, C5H, C7Hb), 3.81(s, 3H, OCH₃), 3.80(s, 3H, OCH₃), 3.79 (s, 3H, OCH₃), 3.79 (s, 3H, OCH₃), 3.75 (dd, *J*₁ = 2.7 Hz, *J*₂ = 1.9 Hz, 1H, C2H), 3.69 (m, 3H, C3H, C6H) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ = 159.3 (2C, arom. C), 159.1 (2C, arom. C), 134.0 (C8), 130.9 (arom. C), 130.8 (arom. C), 130.6 (arom. C), 130.6 (arom. C), 129.8 (arom. C), 129.6 (2C, arom. C), 129.3 (arom. C), 117.2 (C9), 113.8 (arom. C), 113.8 (arom. C), 113.8 (2C, arom. C), 97.2 (C1), 80.1 (C5), 74.9 (CH₂), 74.8 (2C, C4, CH₂), 74.2 (C2), 72.2 (CH₂), 72.0 (CH₂), 71.9 (C3), 68.9 (C6), 67.8 (C7), 55.4 (OCH₃), 55.4 (OCH₃), 55.4 (OCH₃), 55.4 (OCH₃) ppm.

HRMS (ESI⁺) *m/z* calc. for C₅₁H₄₂NO₁₀, [M+NH₄]⁺: 718.3586; found: 718.3584.

2,3,4,6-O-(*para*-methoxybenzyl)-D-mannopyranose (33)⁷



32 (2.70 g, 3.85 mmol, 1.00 eq) was dissolved in AcOH (20 mL) and H₂O (0.65 mL). NaOAc (886 mg, 10.8 mmol, 2.80 eq) and PdCl₂ (887 mg, 5.00 mmol, 1.30 eq) were added and the reaction was stirred at room temperature for 24 h. The resulting mixture was diluted with DCM and filtered over celite. The filtrate was washed with saturated aqueous NaHCO₃-solution (50 mL) and brine (50 mL), dried over MgSO₄, filtered and the solvent was evaporated *in vacuo*. Column chromatographic purification (EtOAc/*iso*-hexane 1:1.5) gave the product (1.57 g, 2.38 mmol, 62%, α : β = 1:0.26) as colorless syrup.

R_f (EtOAc/*iso*-hexane 1:1) = 0.36.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 7.26 (m, 6H, arom. CH), 7.05 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, arom. CH), 6.84 (m, 8H, arom. CH), 5.20 (m, 1H, C1H α), 5.00 (d, 2H, *J* = 11.5 Hz, CH₂ α), 4.88 (s, 1H, C1H β), 4.58 (m, 8H, CH₂), 3.97 (ddd, *J*₁ = 9.8 Hz, *J*₂ = 6.5 Hz, *J*₃ = 2.0 Hz, 1H, C5H α), 3.90 (dd, *J*₁ = 9.3 Hz, *J*₂ = 3.0 Hz, 1H, C3H α), 3.86 (m, 1H, C4H α), 3.80 (s, 3H, OCH₃), 3.79 (m, 7H, C4H α , 2 x OCH₃), 3.78 (s, 3H, OCH₃), 3.75 (t, *J* = 2.5 Hz, 1H, C2H α), 3.66 (m, C6H α _a, CH₂), 3.61 (dd, *J*₁ = 10.4 Hz, *J*₂ = 6.5 Hz, 1H, C6H α _b) ppm.

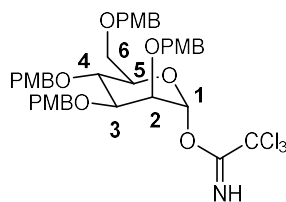
¹³C-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 159.3, 159.3, 159.3, 159.3, 159.3, 113.9, 113.9, 113.9, 113.9, 113.8, 130.9, 130.8, 130.6, 130.4, 130.4, 130.3, 130.0, 129.8, 129.8, 129.8, 129.7, 129.6, 129.4, 129.4 (arom. C), 97.9 (C1 β), 93.0 (C1 α), 79.5 (C3 α), 75.8, 75.4, 75.0 (C4 α), 74.8 (CH₂), 74.8, 74.4, 74.4 (C2 α), 73.1, 73.1 (CH₂), 72.5, 72.4, 72.4 (CH₂), 72.0 (CH₂), 71.9, 71.9 (C5 α), 71.6, 69.3 (C6 α), 68.7, 55.4, 55.4 (OCH₃) ppm.

NOTE: Signals for β -Anomer cannot be assigned unambiguously due to the low abundance in the mixture and overlapping signals.

HRMS (ESI⁺) *m/z* calc. for C₃₈H₄₄O₁₀Na, [M+Na]⁺: 683.3832; found: 683.2831.

Analytical data in accordance with literature.

2,3,4,6-*O*-(*para*-methoxybenzyl)- α -D-mannopyranosyltrichloroacetimidate (16)



33 (720 mg, 1.09 mmol, 1.00 eq) was dissolved in DCM (12 mL). Cl₃CCN (1.09 mL, 1.57 g, 10.9 mmol, 10.0 eq) and DBU (33.0 μ L, 33.5 mg, 0.22 mmol, 0.20 eq) were added at 0 °C and the reaction was stirred at the same temperature for 1 h. The solvent was evaporated *in vacuo*. Column chromatographic purification (EtOAc/*iso*-hexane 1:3) gave the product (789 mg, 0.98 mmol, 90%) as colorless syrup. (NOTE: a slight yellow color indicates amine impurities, which hamper glycosylation)

R_f (EtOAc/*iso*-hexane 1:3) = 0.32.

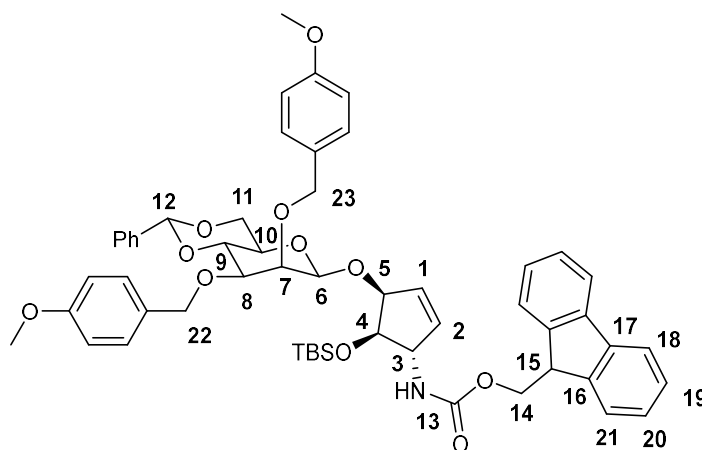
¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 8.51 (s, 1H, NH), 7.33 (d, J = 8.6 Hz, 2H, arom. CH), 7.25 (m with solvent peak, 2H, arom. CH), 7.22 (d, J = 8.5 Hz, 2H, arom. CH), 7.09 (d, J = 8.5 Hz, 2H, arom. CH), 6.83 (m, 8H, arom. CH), 6.33 (d, J = 2.0 Hz, 1H, C1H), 4.79 (d, J = 10.2 Hz, 1H, CH₂), 4.69 (m, 2H, CH₂), 4.61 (d, J = 11.7 Hz, 1H, CH₂), 4.52 (m, 2H, CH₂), 4.44 (m, 2H, CH₂), 4.06 (t, J = 9.7 Hz, 1H, C4H), 3.92 (ddd, J_1 = 9.8 Hz, J_2 = 4.5 Hz, J_3 = 1.7 Hz, 1H, C5H), 3.87 (dd, J_1 = 9.5 Hz, J_2 = 3.2 Hz, 1H, C3H), 3.81 (m, 1H, C2H), 3.80 (s, 3H, OCH₃), 3.79 (s, 3H, OCH₃), 3.79 (s, 3H, OCH₃), 3.78 (s, 3H, OCH₃), 3.76 (m, 1H, C6Ha), 3.67 (dd, J_1 = 11.2 Hz, J_2 = 1.9 Hz, 1H, C6Hb) ppm.

¹³C-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 160.6 (OCNH), 159.4, 159.4, 159.4, 159.3, 130.6, 130.6, 130.4, 130.2, 130.0, 129.8, 129.7, 129.6, 113.9, 113.9, 113.9, 133.8 (all aromatic C), 96.3 (C1), 91.3 (CCl₃), 75.1 (CH₂), 75.0 (C5), 74.0 (C4), 73.1 (CH₂), 73.1 (C2), 78.6 (C3), 72.3 (CH₂), 72.0 (CH₂), 68.5 (C6), 55.4, 55.4, 55.4, 55.4 (all OCH₃) ppm.

HRMS (ESI⁺) m/z calc. for C₄₀H₄₄NO₁₀Cl₃Na, [M+Na]⁺: 826.1928; found: 826.1922.

3.5 Synthesis of β -allyl-manQ (10), α -homoallyl-manQ (11), and of α -allyl-manQ (4)

(9H-fluoren-9-yl)methyl((1S,4S,5R)-4-(((2R,4aR,6R,7S,8S,8aR)-7,8-bis((4-methoxybenzyl)oxy)-2-phenylhexahydropyrano[3,2-d][1,3]dioxin-6-yl)oxy)-5-((tert-butylidimethylsilyl)oxy)cyclopent-2-en-1-yl)carbamate (17)



AgOTf (68.3 mg, 266 μ mol, 3.00 eq) was dissolved in DCM (1 mL) and pulverized 3 Å molsieves (20 w% of the solvent volume) were added. The mixture was cooled to -78 °C before a solution of PhSCl (32.1 mg, 222 μ mol, 2.50 eq) in DCM (1 mL) was added. The reaction was stirred for 5 min at -78 °C. Next, a solution of sugar donor **5** (53.2 mg, 88.6 μ mol, 1.00 eq) and 2,6-di-*tert*-butyl-4-methylpyridine (54.6 mg, 266 μ mol, 3.00 eq) in DCM (1 mL) was added dropwise and the reaction was stirred for 15 min at -78 °C. Then, a solution of glycosyl acceptor **15** (40.0 mg, 88.6 μ mol, 1.00 eq) in DCM (1 mL) was added and the reaction was kept stirring at -78 °C for 2 h. A saturated aqueous NaHCO₃-solution (5 mL) and DCM (10 mL) were added and the reaction was warmed to room temperature before it was filtered over celite. The phases were separated and the organic phase was washed with brine and dried over Na₂SO₄. After filtration, the solvent was removed *in vacuo* and the residue was purified by column chromatography (EtOAc/*iso*-hexane 1:10 \rightarrow 1:5 \rightarrow 1:3) to yield the product (43.4 mg, 46.1 μ mol, 52%) as colorless solid.

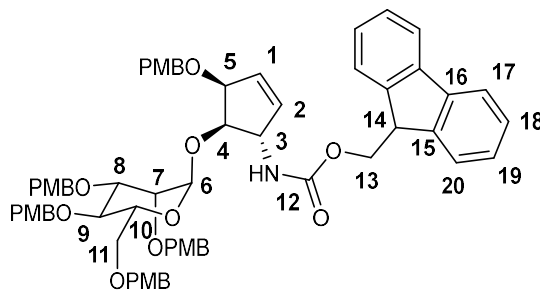
R_f (EtOAc/*iso*-hexane 1:3) = 0.12.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃, depicted in section 4 below): δ = 7.78 (d, J = 7.6 Hz, 2H, C18H), 7.60 (t, J = 6.9 Hz, 2H, C21H), 7.51 (d, J = 7.0 Hz, 2H, arom. CH), 7.38 (m, xH, C19H, arom. CH), 7.32 (t, J = 7.4 Hz, 2H, C20H), 7.15 (d, J = 7.2 Hz, 2H, arom. CH), 6.88 (d, J = 8.2 Hz, 2H, arom. CH), 6.81 (d, J = 8.3 Hz, 2H, arom. CH), 6.00 (m, 1H, C1H), 5.88 (d, J = 6.2 Hz, 1H, C2H), 5.61 (s, 1H, C12H), 4.88 (d, J = 12.0 Hz, 1H, C23Ha), 4.79 (d, J = 12.0 Hz, 1H, C23Hb), 4.71 (m, 3H, C3H, C6H), 4.46 (m, 5H, C5H, C14H, C21H), 4.31 (dd, J_1 = 10.4 Hz J_2 = 4.8 Hz, C11Ha), 4.22 (t, J = 6.6 Hz, 1H, C15H), 4.17 (t, J = 9.6 Hz, C9H), 3.96 (m, 3H, C4H, C7H, C11Hb), 3.81 (s, 3H, OCH₃), 3.79 (s, 3H, OCH₃), 3.48 (dd, J_1 = 9.9 Hz, J_2 = 3.2 Hz, 1H, C8H), 3.27 (td, J_1 = 9.7 Hz, J_2 = 4.8 Hz, 1H, C10H), 0.81 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 0.04 (s, 3H, SiCH₃), 0.00 (s, 3H, SiCH₃) ppm.

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃, depicted in section 4 below): δ = 159.2 (2C, arom. C), 155.9 (C13), 144.0 (C15), 141.5 (C16), 137.0 (C1), 131.3 (C2), 130.7 (arom. C), 130.6 (arom. C), 130.5 (arom. C), 130.4 (arom. C), 129.3 (arom. C), 128.9 (arom. C), 128.3 (arom. C), 127.8 (C19), 127.2 (C20), 126.2 (arom C), 125.1 (C21), 120.1 (C18), 113.8 (arom. C), 113.7 (arom. C), 102.1 (C6), 101.4 (C12), 80.1 (C5), 78.7 (C7), 78.5 (C9), 77.5 (C8), 74.6 (C4), 74.4 (C23), 71.9 (C22), 67.8 (C10), 68.7 (C11), 66.8 (C14), 61.0 (C3), 55.4 (OCH₃), 55.3 (OCH₃), 47.4 (C15), 25.8 (SiC(CH₃)₃), 18.1 (SiC(CH₃)₃), -4.5 (SiCH₃), -4.7 (SiCH₃) ppm.

HRMS (ESI⁺) m/z calc. for C₅₅H₆₇N₂O₁₁Si, [M+NH₄]⁺: 959.4509; found: 959.4522.

(9H-fluoren-9-yl)methyl((1S,4S,5R)-4-((4-methoxybenzyl)oxy)-5-(((2R,3R,4R,5S,6S)-3,4,5-tris((4-methoxybenzyl)oxy)-6-(((4-methoxybenzyl)oxy)methyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)cyclopent-2-en-1-yl)carbamate (18)



13 (20.0 mg, 43.7 μmol , 1.00 eq) and **16** (42.2 mg, 62.5 μmol , 1.20 eq) were dissolved in THF (3 mL) and activated 3 Å molsieves (20 w%) were added. The solution was stirred at 0 °C for 30 min. TMSOTf (0.1 M in THF, 87.4 μL , 8.74 μmol , 0.20 eq, pre-dried over 3 Å molsieves for 30 min) was added dropwise and the reaction was stirred at 0 °C for 1 h. Saturated aqueous NaHCO_3 -solution (3 mL) was added and the mixture was warmed to room temperature, diluted with DCM (20 mL) and H_2O (20 mL), filtered and the phases were separated. The aqueous phase was re-extracted with DCM (3 x 20 mL), the combined organic phases were dried over Na_2SO_4 , filtered and the solvent was evaporated *in vacuo*. Column Chromatographic purification (EtOAc/Hexane 1:4 \rightarrow 1:2) gave the product (26.4 mg, 24.0 μmol , 55%) as colorless solid.

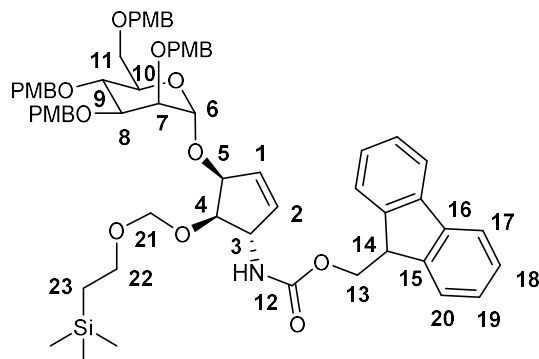
R_f (EtOAc/*iso*-hexane 1:3) = 0.12.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3 , depicted in section 4 below): δ = 7.73 (d, J = 7.8 Hz, 2H, C17H), 7.57 (d, J = 7.6 Hz, 2H, C20H), 7.35 (t, J = 7.4 Hz, 2H, C18H), 7.22 (m, 10H, C19H, arom. CH), 7.04 (m, 2H, arom. CH), 6.80 (m, 10H, arom. CH), 6.01 (m, 1H, C1H), 5.90 (m, 1H, C2H), 4.96 (m, 1H), 4.94 (m, $^1J_{\text{C-H}}$ = 170.3 Hz, 1H, C6H), 4.77 (t, J = 9.9 Hz, 1H), 4.61 (d, J = 3.7 Hz, 1H), 4.47 (m), 4.16 (m), 3.92 (m), 3.77 (m, OCH_3) ppm.

NOTE: Signals cannot be assigned unambiguously. $^{13}\text{C-NMR}$ -data are not assigned, the ^{13}C -spectrum is depicted in section 4 below.

HRMS (ESI $^+$) m/z calc. for $\text{C}_{66}\text{H}_{77}\text{N}_3\text{O}_{14}$, $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$: 1117.5056; found: 1117.5084.

(9H-fluoren-9-yl)methyl((1S,4S,5R)-5-((2-(trimethylsilyl)ethoxy)methoxy)-4-(((2R,3R,4R,5S,6S)-3,4,5-tris((4-methoxybenzyl)oxy)-6-(((4-methoxybenzyl)oxy)methyl)-tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)cyclopent-2-en-1-yl)carbamate (19)



14 and **16** were dissolved in THF (2 mL) and 3 Å molsieves (20 w% of solvent) were added. The mixture was stirred at 0 °C for 20 min before a solution of TMSOTf (231 μ L, 0.1 M in THF) was added. The reaction was stirred at 0 °C for 1.5 h before saturated aqueous NaHCO₃-solution (5 mL) was added. DCM (20 mL) was added and the phases were separated. The aqueous phase was re-extracted with DCM (3 x 20 mL). The combined organic phases were dried over Na₂SO₄, filtered and the solvent was evaporated *in vacuo*. Column chromatographic purification (EtOAc/*iso*-hexane 1:4 \rightarrow 1:3) gave an anomeric mixture of the product as colorless solid.

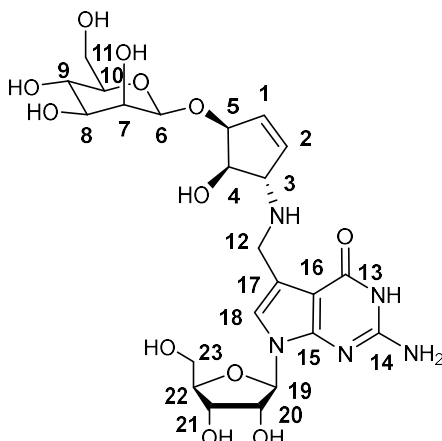
R_f (EtOAc/*iso*-hexane 1:3) = 0.14.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃, depicted in section 4 below): δ = 7.79 (dd, J_1 = 7.6 Hz J_2 = 3.8 Hz, 2H, C17H), 7.61 (m, 2H, C20H), 7.42 (m, 2H, C18H), 7.33 (t, J = 7.6 Hz, 1H, C19H), 7.28 (m with solvent peak, arom. CH), 7.07 (m, 2H, arom. CH), 6.85 (m, arom. CH), 6.03 (m, 1H, C1H), 5.99 (m, 1H, C2H), 5.01 (m, 1H), 4.87 (m, 1H, C6H), 4.62 (m, 18H), 4.25 (m, 1H), 3.79 (m, OCH₃), 3.54 (m, 1H), 3.43 (m, 1H), 0.95 (t, J = 7.3 Hz, 1H, C23H), -0.01 (s, 3H, SiCH₃), -0.02 (s, 6H, SiCH₃) ppm.

NOTE: Due to the inseparable anomeric mixture received, ¹H-NMR data refer to the most important features proving the formation of the glycosylation adduct from the starting materials. The anomeric mixture was separated *via* HPLC after completing the synthesis. ¹³C-NMR-data are not assigned, but the ¹³C-spectrum is depicted in section 4 below.

HRMS (ESI⁺) *m/z* calc. for C₆₄H₇₆NO₁₄Si, [M+H]⁺: 1110.5030; found: 1110.5033.

β -allyl-mannosyl-queuosine (10)



17 (40 mg, 42.4 μ mol) was dissolved in MeCN (1.5 mL) and DBU (224 μ L) was added. The reaction was stirred for 1 h at room temperature and then neutralized with AcOH. The solvent was evaporated *in vacuo* and the crude residue purified by column chromatography (MeOH/DCM 1:20). The resulting product (21 mg) was identified by LC-MS and subsequently used for the next step. For that, it was dissolved in MeOH (0.25 mL) and **8** (21 mg, 1.00 eq) was added. AcOH (1.00 μ L) was added and the reaction was stirred for 2 h at room temperature. Next the reaction was cooled to 0 $^{\circ}$ C and NaBH₄ (2.87 mg, 75.9 μ mol, 2.60 eq) was added. The reaction was stirred at 0 $^{\circ}$ C for 15 min before the solvent was evaporated. Product formation was confirmed by LC-MS. The residue was dissolved in DCM (0.9 mL) and TFA (0.1 mL) was added at 0 $^{\circ}$ C. The reaction was stirred at 0 $^{\circ}$ C for 20 min before it was neutralized with NEt₃. After evaporation of the solvent, the product was detected by LC-MS and then re-dissolved in EtOAc (0.5 mL). HF \cdot pyridine (15 μ L) was added and the solution was stirred for 1 d before the reaction was stopped by addition of TMSOMe (46 μ L). The solvent was evaporated, the crude product was identified by LC-MS and dissolved in MeOH (1 mL). NaOMe (27.0 mg, 0.5 mmol) was added and the reaction was stirred for 2 d until LC-MS indicated completion. The mixture was neutralized with NEt₃ and the solvent was evaporated *in vacuo*. The residue was dissolved in water, filtered and purified by reversed phase HPLC (0-10 % buffer B, 45 min) to afford the product **10** (1.30 mg, 2.33 μ mol, 5% over 6 steps) as colorless solid.

RP-HPLC: R_t (C18-column, 0-10% buffer B, 45 min) = 21.7 min.

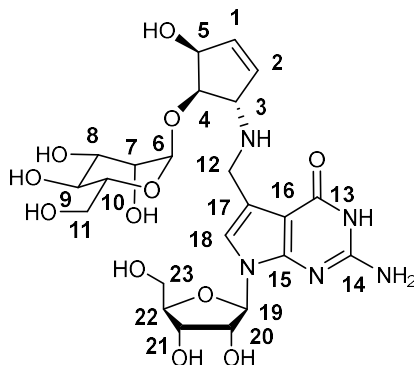
¹H-NMR (800 MHz, D₂O, depicted in section 4 below): δ = 7.13 (s, 1H, C18H), 6.25 (m, 1H, C1H), 6.10 (dd, J_1 = 6.3 Hz, J_2 = 1.7 Hz, 1H, C2H), 5.97 (d, J = 6.5 Hz, 1H, C19H), 4.70 (m, covered by solvent peak, 2H, C5H, C6H ($^1J_{C-H}$ = **160.2 Hz**)), 4.58 (dd, J_1 = 6.5 Hz, J_2 = 5.4 Hz, 1H, C20H), 4.41 (m, 3H, C4H, C12H), 4.32 (dd, J_1 = 5.4 Hz, J_2 = 3.3 Hz, 1H, C21H), 4.27 (m, 1H, C3H), 4.16 (q, J = 3.6 Hz, 1H, C22H), 4.04 (d, J = 3.1 Hz, 1H, C7H), 3.88 (dd, J_1 = 12.3 Hz, J_2 = 2.3 Hz, 1H, C11Ha), 3.82 (dd, J_1 = 12.6 Hz, J_2 = 3.3 Hz, 1H, C23Ha), 3.77 (dd, J_1 = 12.6 Hz, J_2 = 4.3 Hz, 1H, C23Hb), 3.70 (dd, J_1 = 12.3 Hz, J_2 = 6.6 Hz, 1H, C11Hb), 3.62 (dd, J_1 = 9.6 Hz, J_2 = 3.3 Hz, 1H, C8H), 3.54 (t, J = 9.7 Hz, 1H, C9H), 3.36 (ddd, J_1 = 9.3 Hz, J_2 = 6.5 Hz, J_3 = 2.3 Hz, 1H, C10H) ppm.

¹³C-NMR (HSQC, HMBC, D₂O): δ = 151.7 (C14/C15), 152.7 (C14/C15), 136.1 (C1), 130.0 (C2), 118.9 (C18), 100.2 (C16/17), 98.8 (C16/17), 99.8 (C6), 86.6 (C19), 84.8 (C22), 80.7 (C5), 76.3 (C10), 73.7 (C4), 73.4 (C20), 72.8 (C11), 70.4 (C21), 70.3 (C7), 66.7 (C9), 66.4 (C3), 61.4 (C23), 60.9 (C11), 42.0 (C12) ppm.

Note: ¹H-¹³C-HSQC and -HMBC spectra of this compound are shown in section 4 below.

HRMS (ESI⁺) m/z calc. for C₂₃H₃₄N₅O₁₂, [M+H]⁺: 572.2199; found: 572.2197.

α -homoallyl-mannosyl-queuosine (11)



18 (19.0 mg, 17.2 μ mol) was dissolved in MeCN (1 mL) and DBU (149 μ L, 1.00 mmol) was added. The reaction was stirred at room temperature for 1 h and then neutralized with AcOH. The solvent was evaporated *in vacuo* to give the free amine, which was detected by LC-MS. The product was dissolved in MeOH and **8** (12.0 mg, 13.7 μ mol) was added together with AcOH (1.00 μ L). The reaction was stirred for 5 h before it was cooled to 0 $^{\circ}$ C and NaBH₄ (1.34 mg, 35.6 μ mol) was added. The reaction was stirred at 0 $^{\circ}$ C for 20 min, then H₂O (0.5 mL) was added and the reaction was stirred for another 5 min before the solvent was evaporated. The crude product was detected by LC-MS and next dissolved in DCM (0.9 mL) and TFA (0.1 mL) was added at 0 $^{\circ}$ C. The reaction was stirred for 30 min and then neutralized with NEt₃. After evaporation of the solvent, the crude PMB-deprotected product was detected by LC-MS and then dissolved in MeOH (1 mL). NaOMe (27.0 mg, 0.5 mmol) was added and the reaction was stirred at room temperature for 2 d. After neutralization with HCl (2 M), the solvent was evaporated *in vacuo*. The residue was dissolved in water, filtered and purified by reversed phase HPLC (0-10 % buffer B, 45 min) to afford the product **11** (1.51 mg, 2.64 μ mol, 15% over 5 steps) as colorless solid.

RP-HPLC: R_t (C18-column, 0-10% buffer B, 45 min) = 21.3 min.

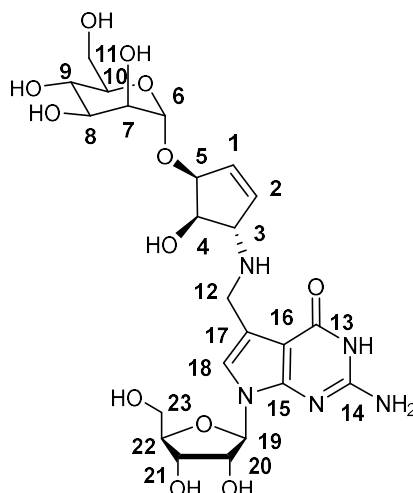
¹H-NMR (600 MHz, methanol-D₄, depicted in section 4 below): δ = 7.04 (s, 1H, C18H), 6.11 (ddd, J_1 = 6.2 Hz, J_2 = 2.4 Hz, J_3 = 1.9 Hz, 1H, C1H), 6.05 (dd, J_1 = 6.2 Hz, J_2 = 1.5 Hz, 1H, C2H), 5.93 (d, J = 6.0 Hz, 1H, C19H), 5.04 (d, J = 1.8 Hz, $^1J_{C-H}$ = **170.3 Hz**, 1H, C6H), 4.76 (m, 1H, C5H), 4.43 (t, J = 5.7 Hz, 1H, C20H), 4.26 (t, J = 5.4 Hz, 1H, C4H), 4.23 (dd, J_1 = 5.3 Hz, J_2 = 3.6 Hz, 1H, C21H), 4.16 (m, 3H, C3H, C12H), 4.02 (q, J = 3.5 Hz, 1H, C22H), 3.93 (dd, J_1 = 3.4 Hz, J_2 = 1.8 Hz, 1H, C7H), 3.91 (m, 1H, C11Ha), 3.80 (dd, J_1 = 12.2 Hz, J_2 = 3.2 Hz, C23Ha), 3.78 (dd, J_1 = 9.4 Hz, J_2 = 3.4 Hz, 1H, C8H), 3.73 (m, 3H, C10H, C11Hb, C23Hb), 3.62 (t, J = 9.4 Hz, 1H, C9H), 1.92 (AcO⁻) ppm.

¹³C-NMR (150 MHz, methanol-D₄, depicted in section 4 below): δ = 162.3 (C13), 154.3 (C14), 153.7 (C15), 137.2 (C1), 132.2 (C2), 119.4 (C18), 114.0 (C17), 100.8 (C16), 100.5 (C6), 89.5 (C19), 86.5 (C22), 79.0 (C4), 75.6 (C20), 75.6 (C10), 73.3 (C5), 72.4 (C8), 72.2 (C21), 71.8 (C7), 68.9 (C9), 66.4 (C3), 63.3 (C23), 63.1 (C11), 43.9 (C12), 23.1 (CO₂CH₃⁻) ppm.

Note: ¹H-¹³C-HMBC spectra of this compound are shown in section 4 below.

HRMS (ESI⁻) m/z calc. for C₂₃H₃₂NO₁₂, [M - H]⁻: 570.2053; found: 570.2052.

α -allyl-mannosyl-queuosine (4)



19 (16.0 mg, 14.4 μ mol) was dissolved in 10% HNMe₂ in THF (1 mL) and the reaction was stirred for 1 h. The solvent was evaporated *in vacuo* to give the free amine, which was detected by LC-MS. The amine was dissolved in MeOH (0.5 mL) and **8** (10.2 mg, 14.4 μ mol) was added together with AcOH (2.00 μ L). The reaction was stirred for 5 h before it was cooled to 0 °C and NaBH₄ (1.42 mg, 37.4 μ mol) was added. The reaction was stirred at 0 °C for 30 min before H₂O (0.3 mL) was added and the reaction was stirred for another 5 min. The solvent was evaporated *in vacuo* and the crude product was detected by LC-MS. The residue was dissolved in MeOH (2 mL) and NaOMe (24.1 mg, 1.00 mmol) was added. The reaction was stirred at room temperature for 18 h and then neutralized with DOWEX-H⁺resin. The resin was filtered off and the solvent was evaporated. The residue was dissolved in DCM (1.8 mL) and TFA (0.2 mL) was added at 0 °C. The reaction was stirred at 0 °C for 5 min before the reaction was stopped by addition of a solution of HNEt₃OAc in DCM (1 M, 3 mL). Saturated aqueous NaHCO₃-solution was added and the phases were separated. The aqueous phase containing the product was evaporated *in vacuo*. The sample was desalted using a SepPak-C18-cartridge. The sample was loaded with 100% water and the product was eluted from the column with a mixture of MeCN and water (50/50 v/v). The solvent was evaporated by lyophilization. The residue was dissolved in MeCN (1 mL) and HF · pyridine (100 μ L) was added. The mixture was stirred for 1 week at room temperature before TMSOMe (1.5 mL) were added. The mixture was stirred for 1 h at room temperature before the solvent was evaporated *in vacuo*. The residue was dissolved in water, filtered and purified by reversed phase HPLC (0-10 % buffer B, 45 min) to afford the product **4** (0.24 mg, 0.42 μ mol, 2.9% over 6 steps) as colorless solid.

RP-HPLC: R_t (C18-column, 0-10% buffer B, 45 min) = 21.4 min.

¹H-NMR (800 MHz, D₂O, depicted in section 4 below): δ = 6.95 (s, 1H, C18H), 6.16 (d, J = 6.3 Hz, 1H, C1H), 6.10 (dd, J_1 = 6.3 Hz, J_2 = 1.8 Hz, 1H, C2H), 5.96 (d, J = 6.6 Hz, 1H, C19H), 4.96 (d, J = 1.8 Hz, $^1J_{C-H}$ = **170.0 Hz**, 1H, C6H), 4.68 (m, 1H, C5H), 4.58 (dd, J_1 = 5.4 Hz, J_2 = 3.2 Hz, 1H, C20H), 4.32 (dd, J_1 = 5.4 Hz, J_2 = 3.2 Hz, 1H, C21H), 4.15 (q, J = 3.8 Hz, 1H, C22H), 4.13 (t, J = 5.2 Hz, 1H, C4H), 3.97 (d, J = 13.9 Hz, 1H, C12Ha), 3.94 (d, J = 13.9 Hz, 1H, C12Hb), 3.90 (dd, J_1

= 3.4 Hz, $J_2 = 1.8$ Hz, 1H, C7H), 3.84 (m, 3H, C3H, C8H, C11Ha), 3.81 (dd, $J_1 = 12.5$ Hz, $J_2 = 3.4$ Hz, 1H, C23Ha), 3.76 (m, 3H, C10H, C11Hb, C23Hb), 3.65 (t, $J = 9.7$ Hz, 1H, C9H) ppm.

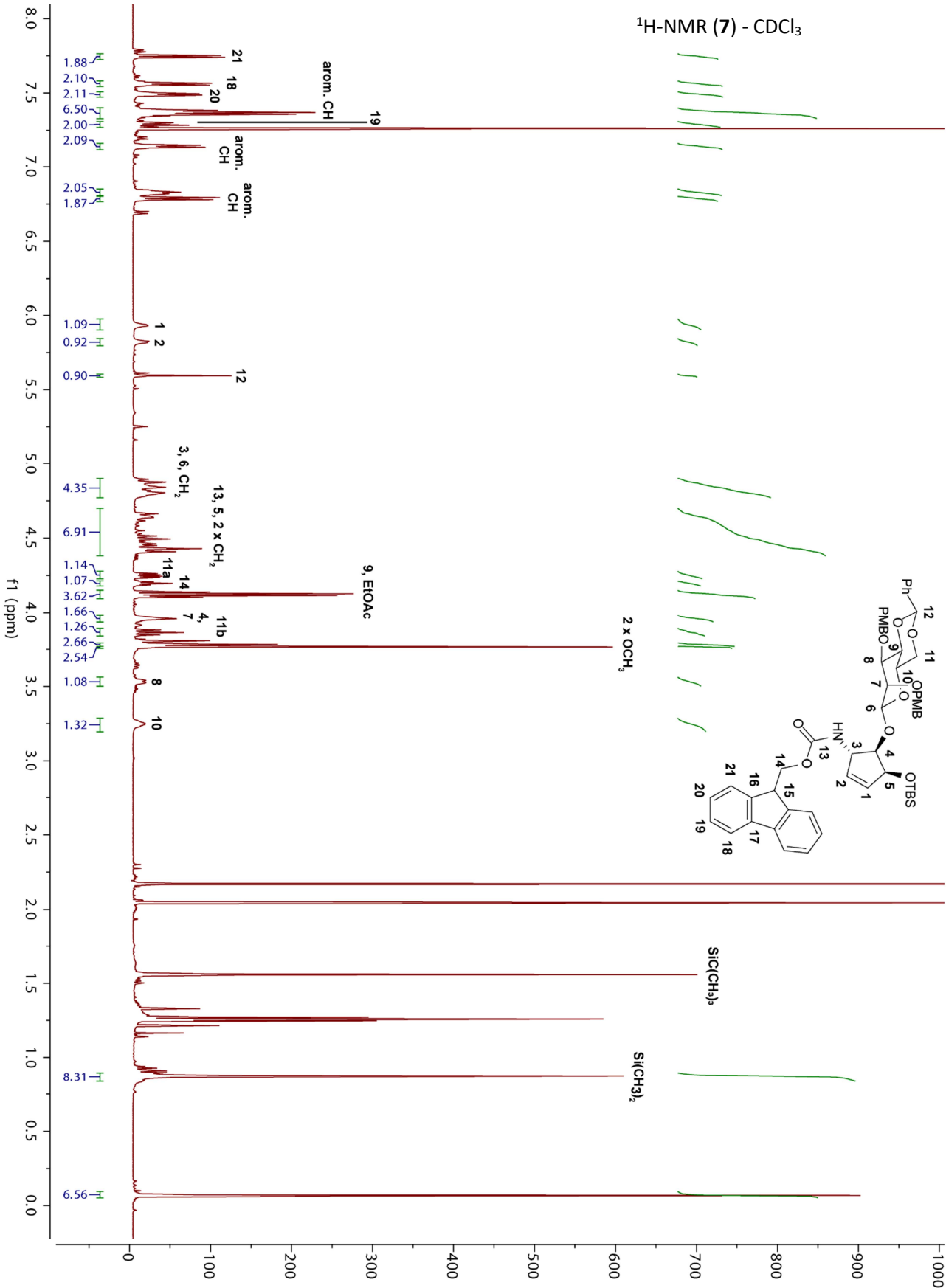
Note: A ^1H -NMR spectrum (800 MHz) of this compound in **methanol- D_4** is depicted at the end of section 4 below.

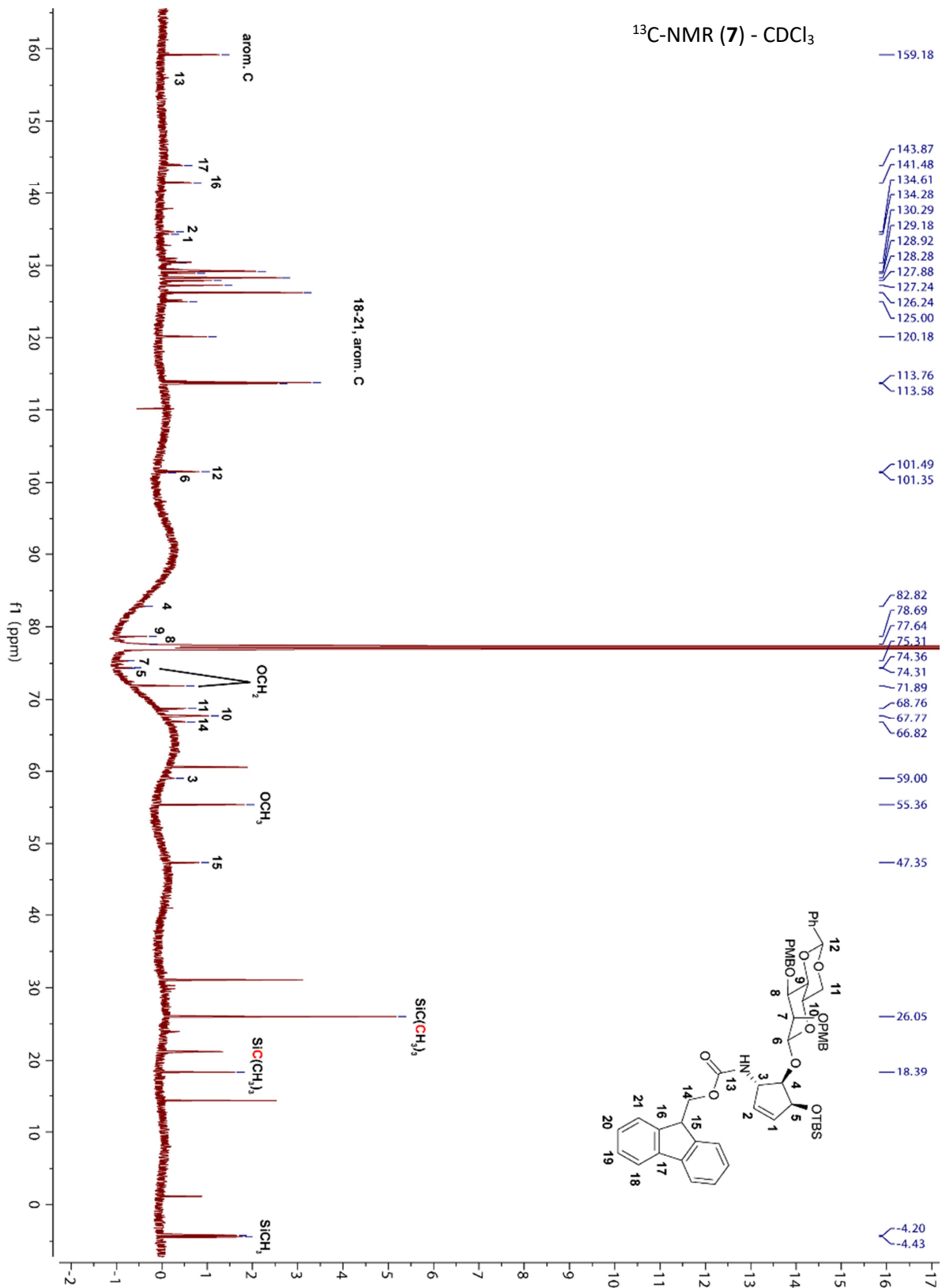
^{13}C -NMR (HSQC, HMBC, D_2O): $\delta = 153.2$ (C14/C15), 151.7 (C14/C15), 136.1 (C2), 130.8 (C1), 116.8 (C18), 115.5 (C17), 100.8 (C16), 97.9 (C6), 86.5 (C19), 84.6 (C22), 77.7 (C5), 75.7 (C4), 73.1 (C20), 72.9 (C10), 70.5 (C21), 70.4 (C8), 70.2 (C7), 66.8 (C9), 66.5 (C3), 61.5 (C23), 60.8 (C11), ppm.

Note: ^1H - ^{13}C -HSQC and -HMBC spectra of this compound are shown in section 4 below.

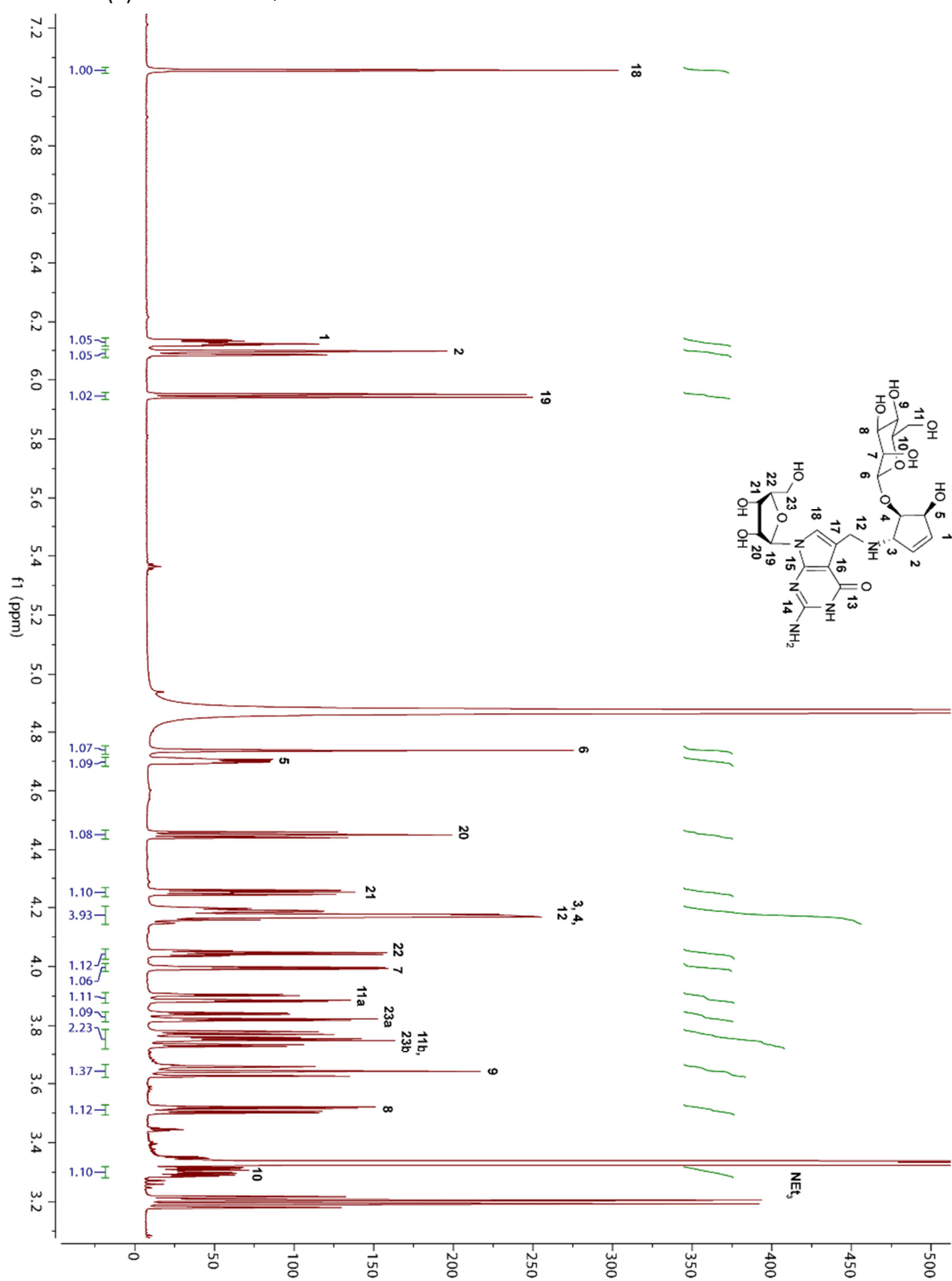
HRMS (ESI $^+$) m/z calc. for $\text{C}_{23}\text{H}_{34}\text{N}_5\text{O}_{12}$, $[\text{M}+\text{H}]^+$: 572.2199; found: 572.2195.

4. NMR-spectra of important compounds

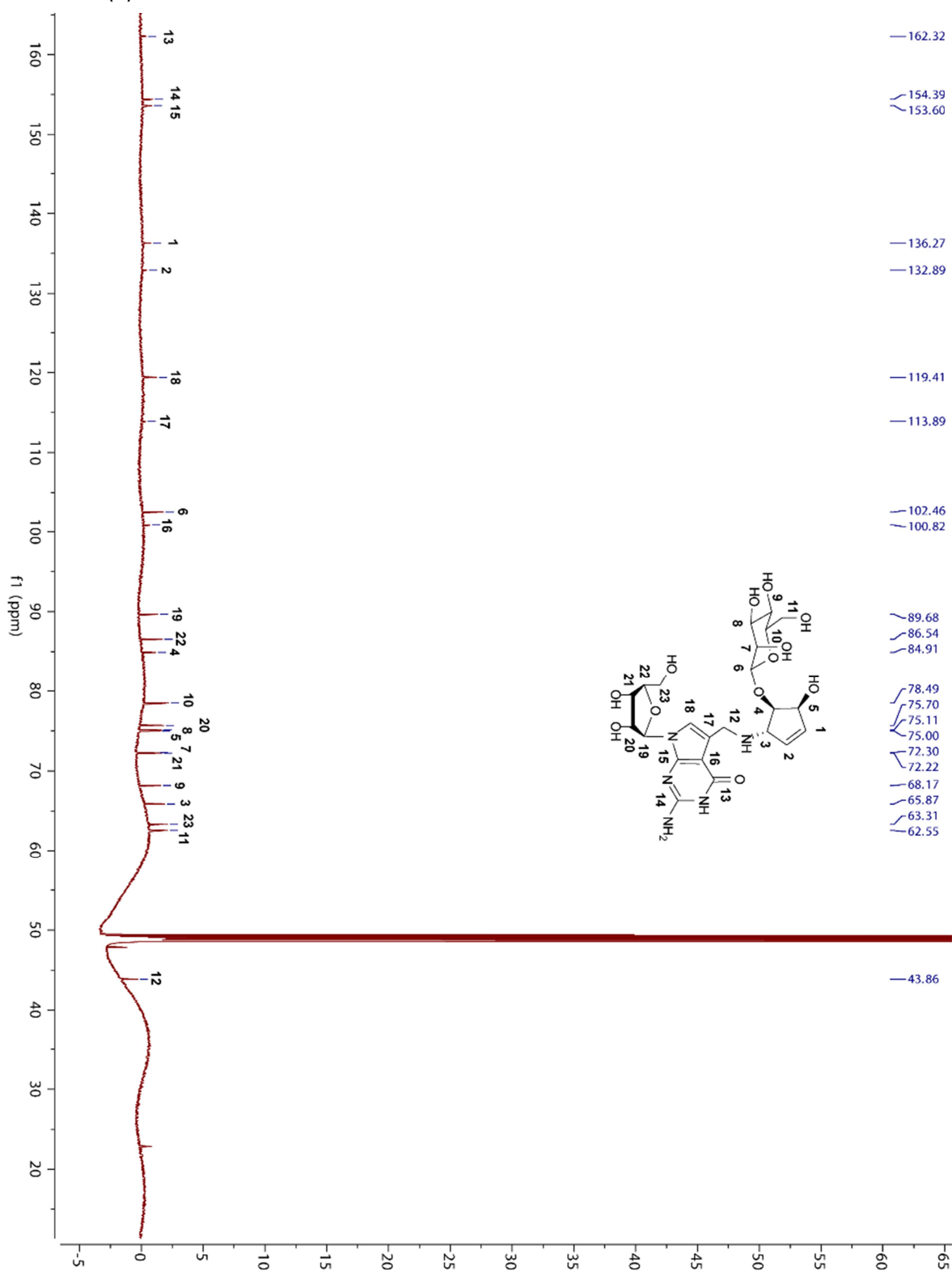


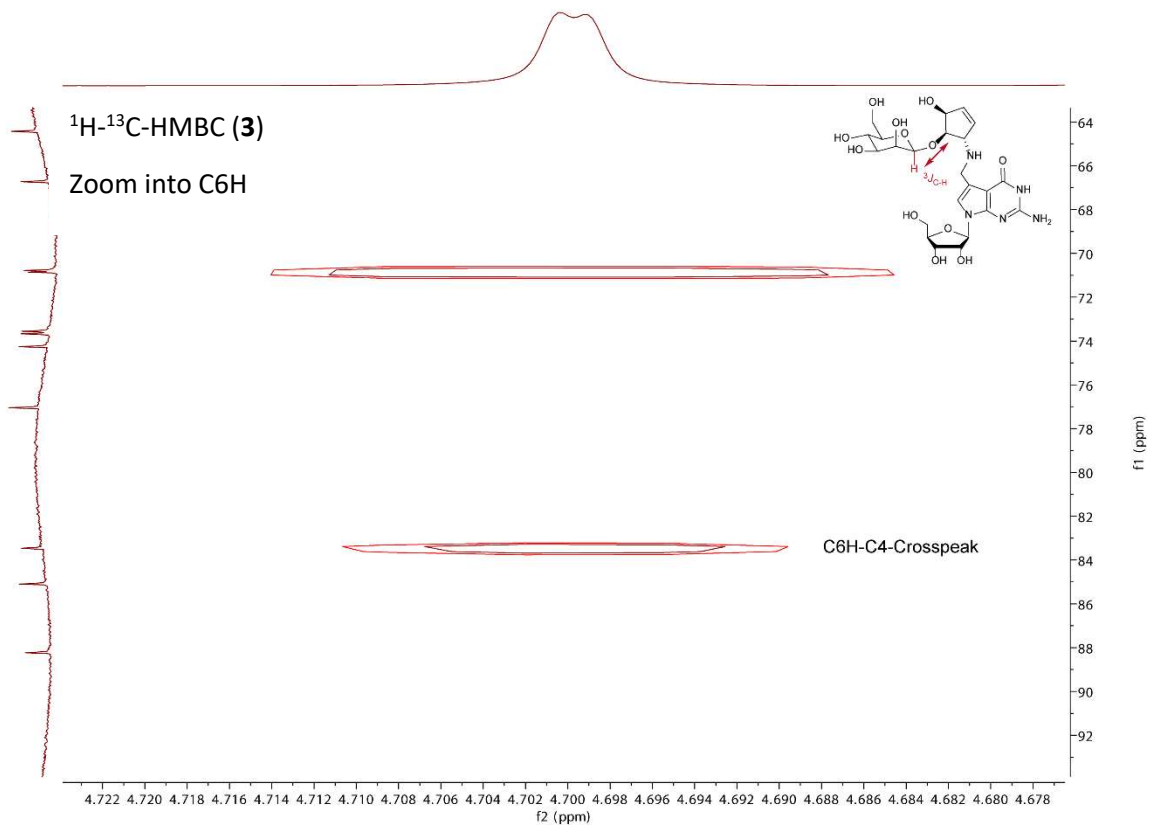
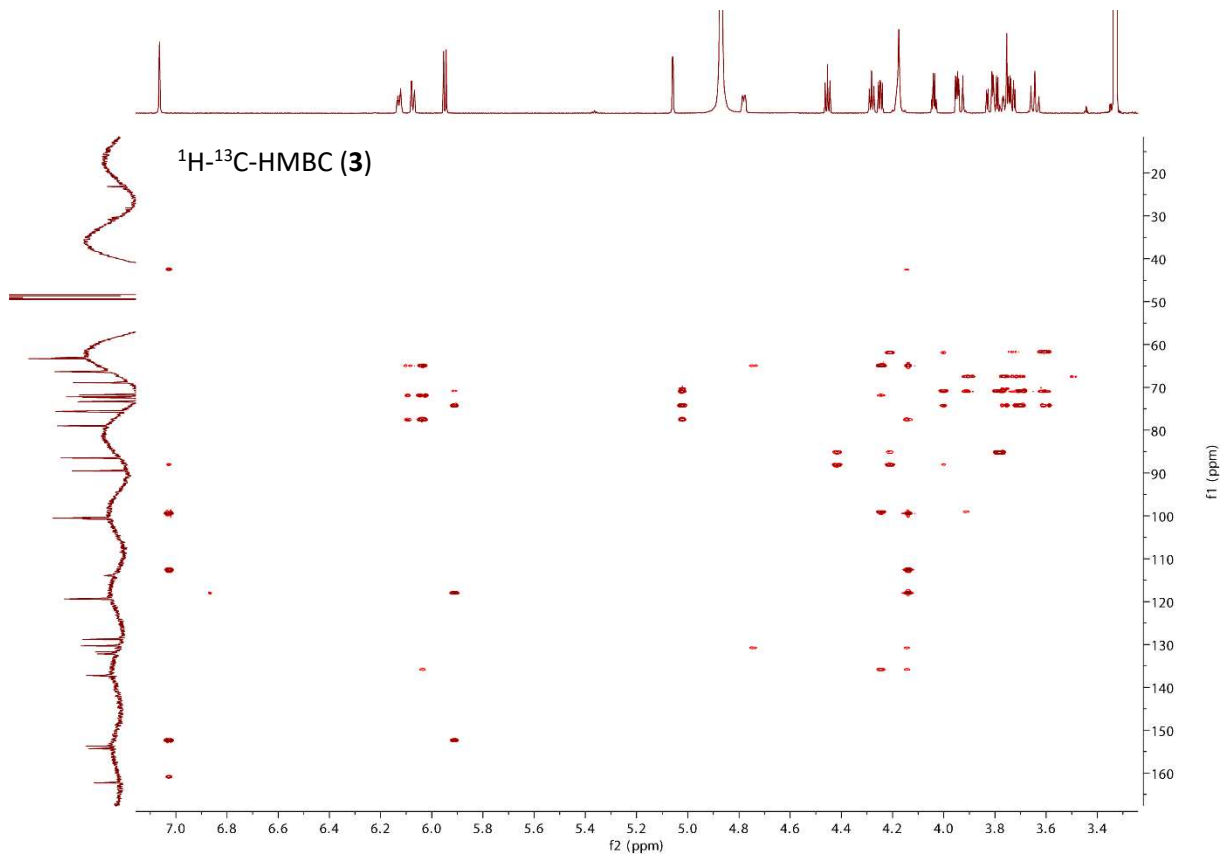


¹H-NMR (3) – methanol-D₄

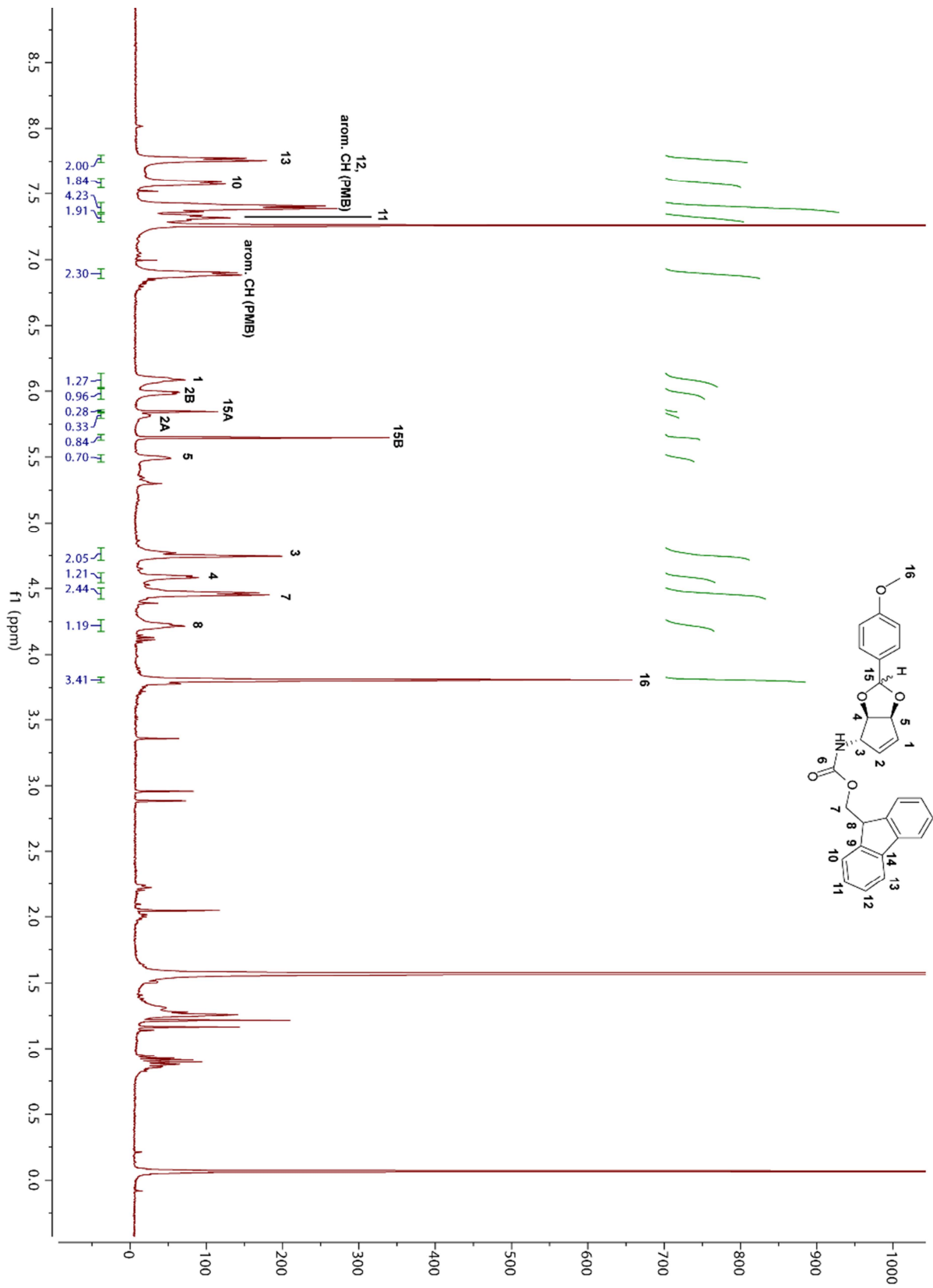


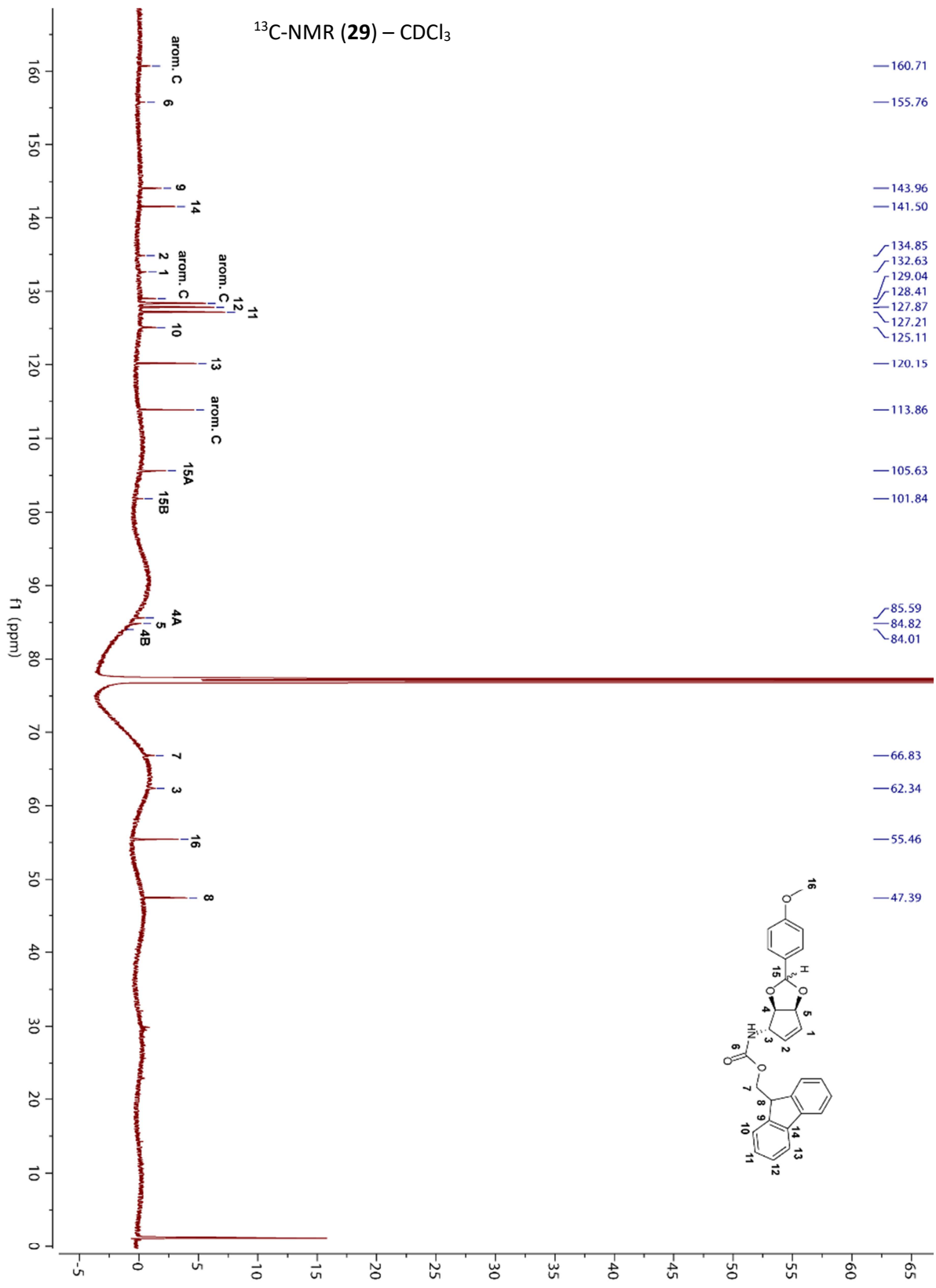
¹³C-NMR (3) - methanol-D₄

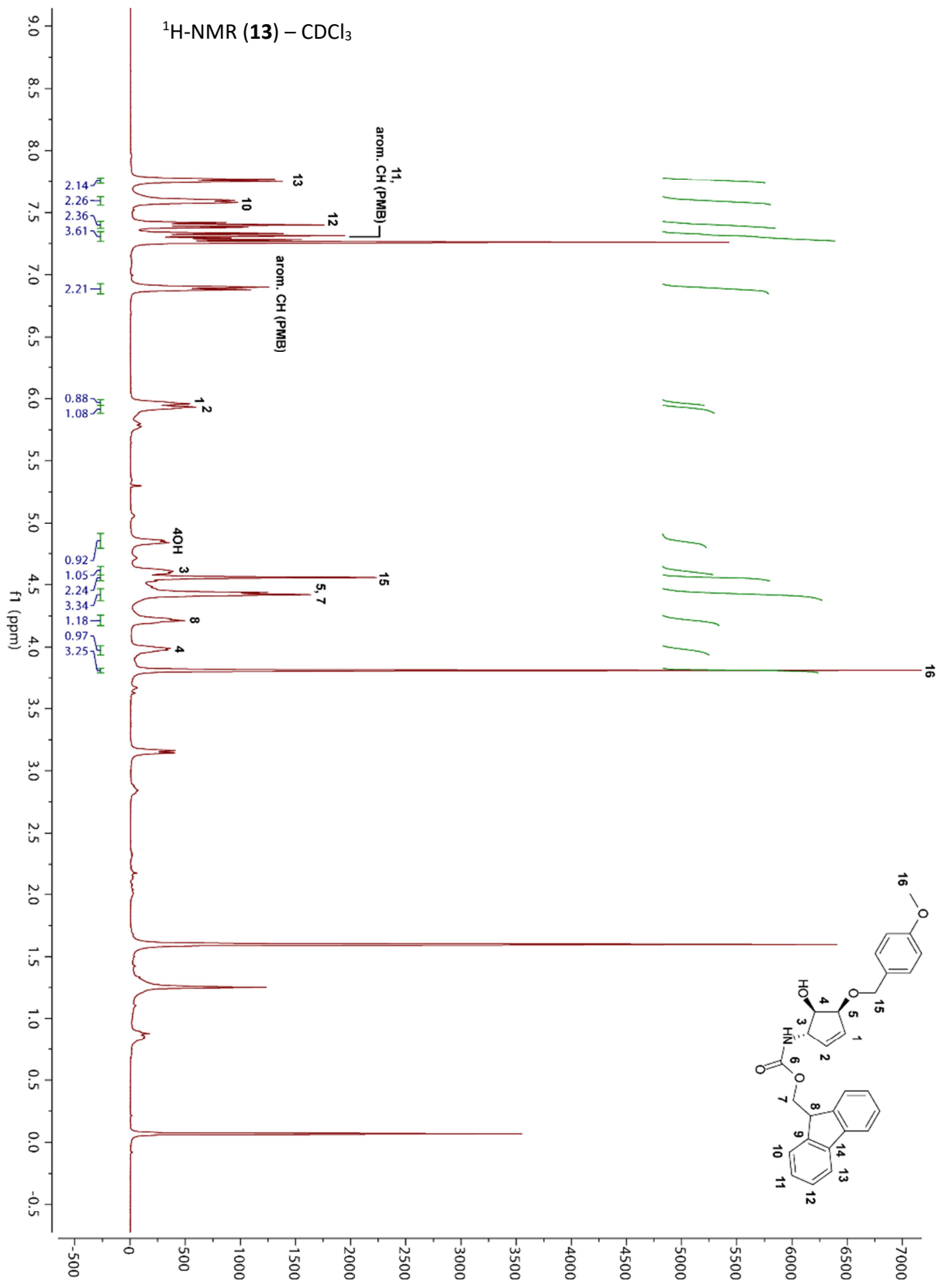


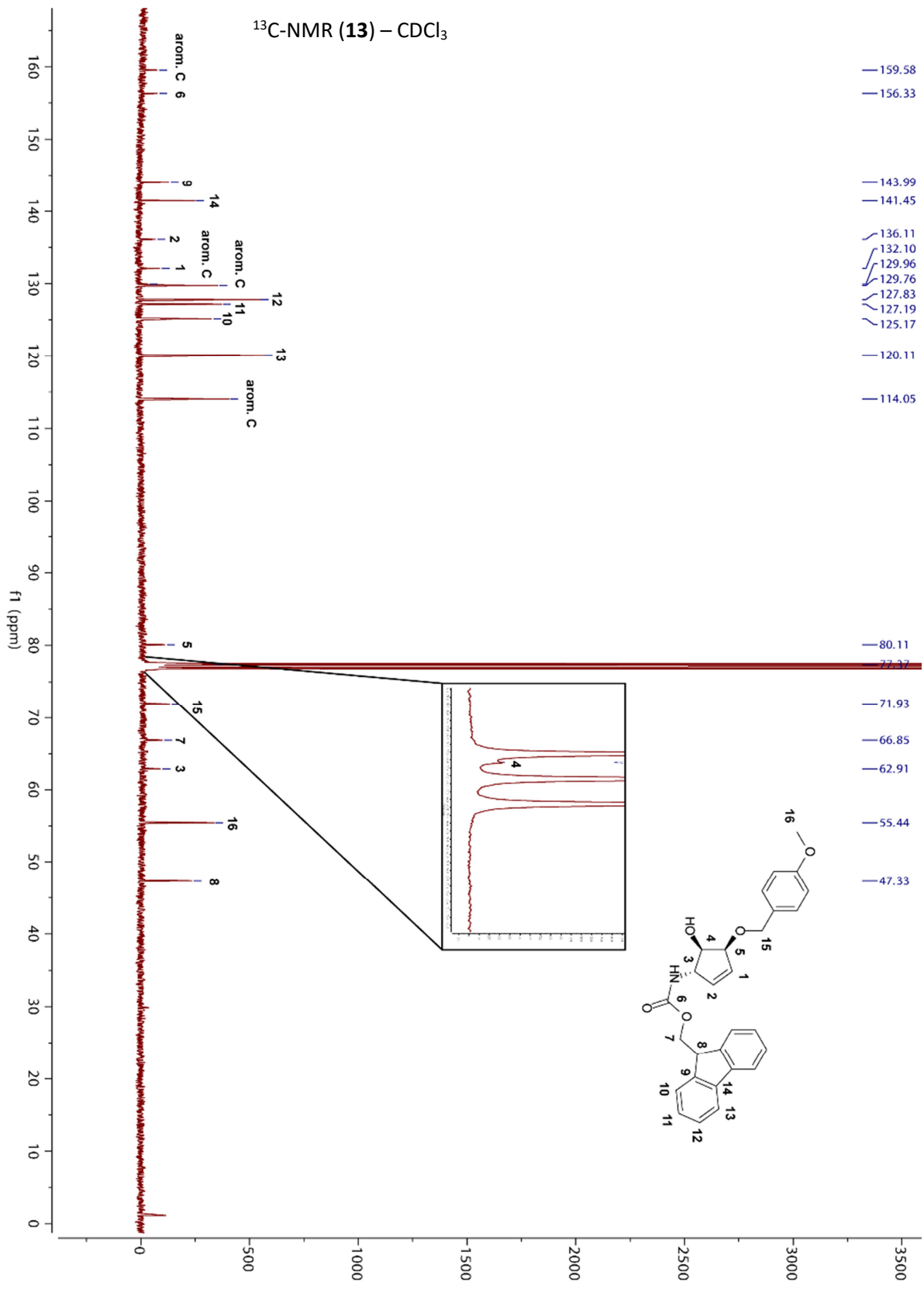


$^1\text{H-NMR}$ (29) – CDCl_3

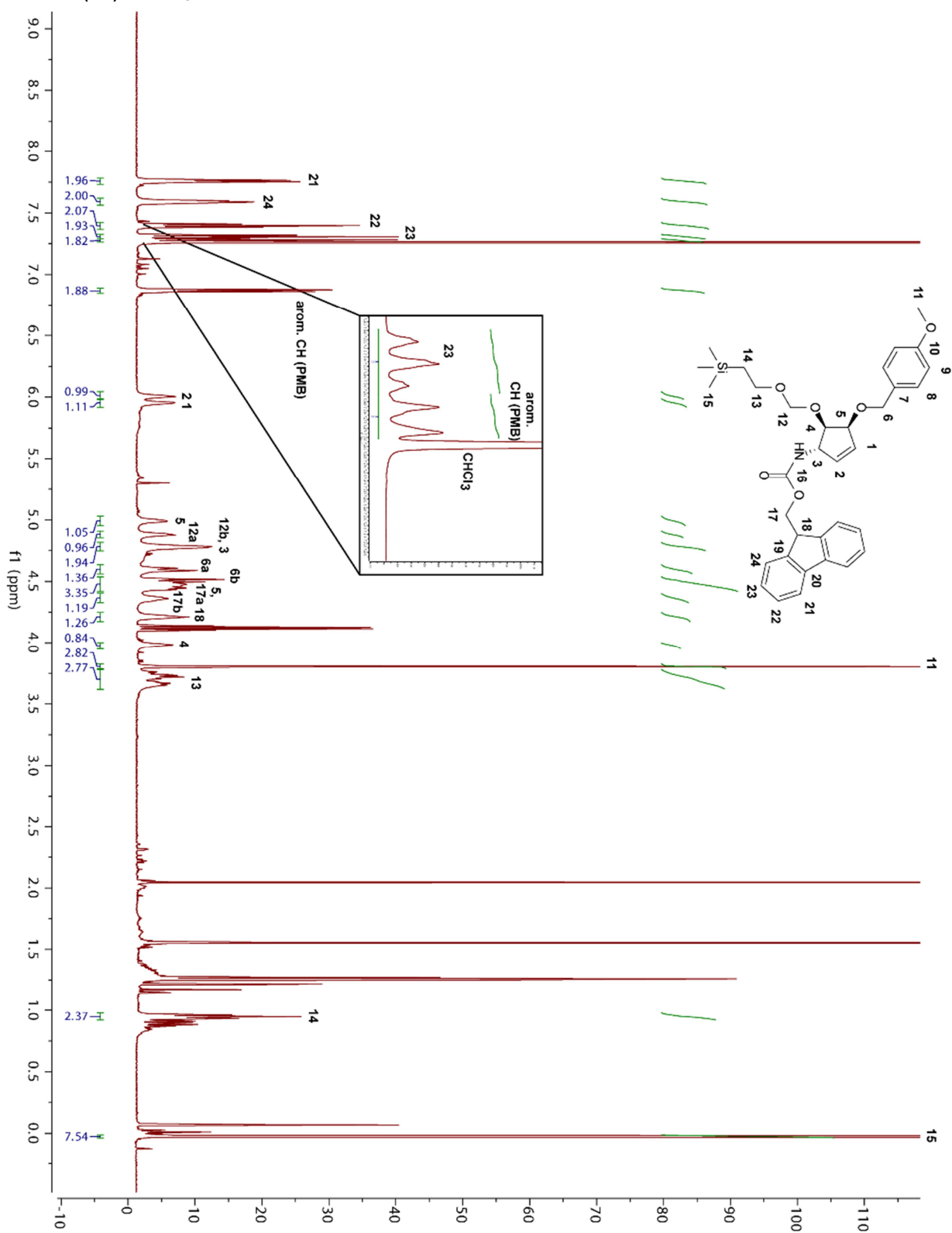


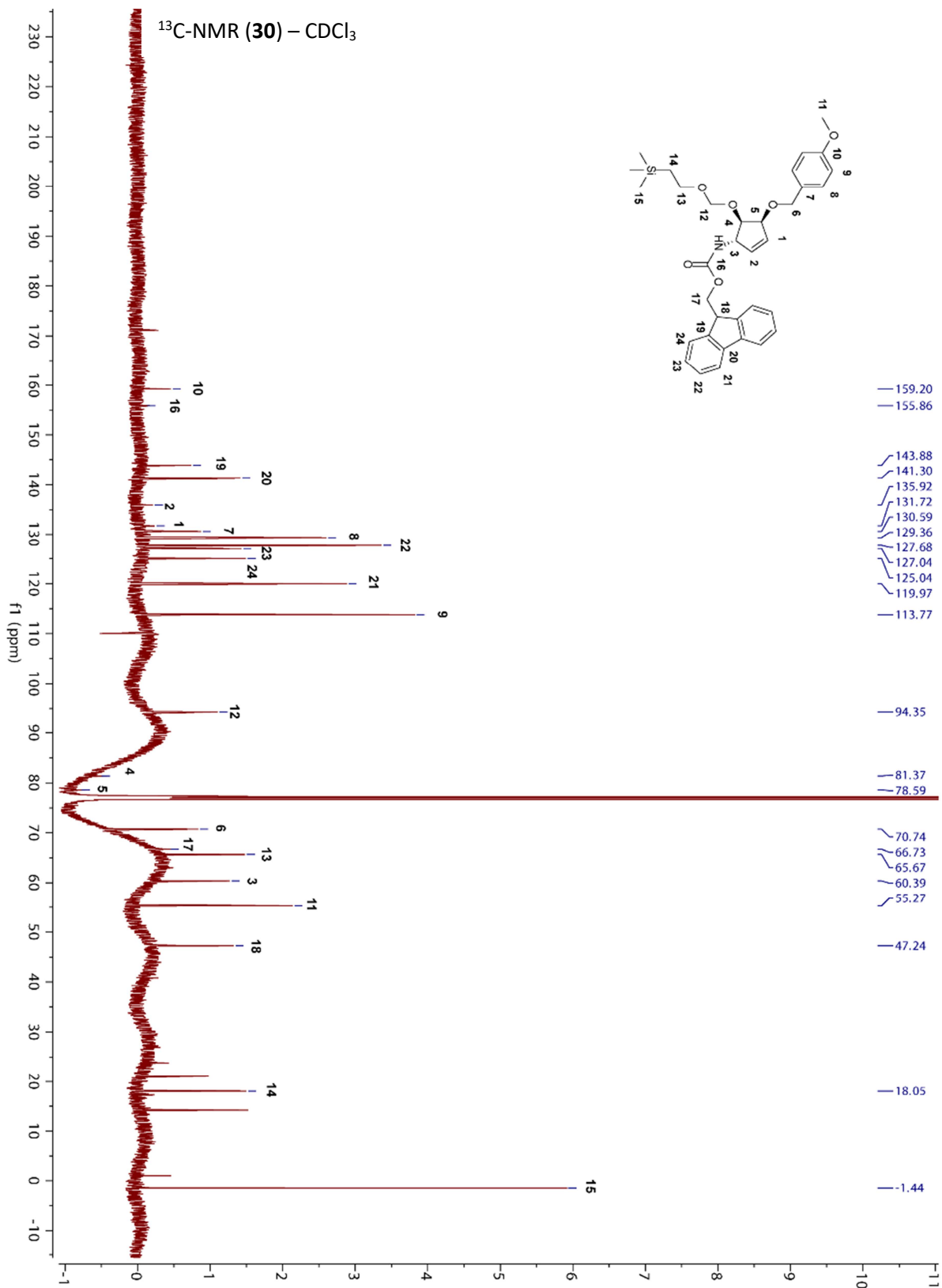


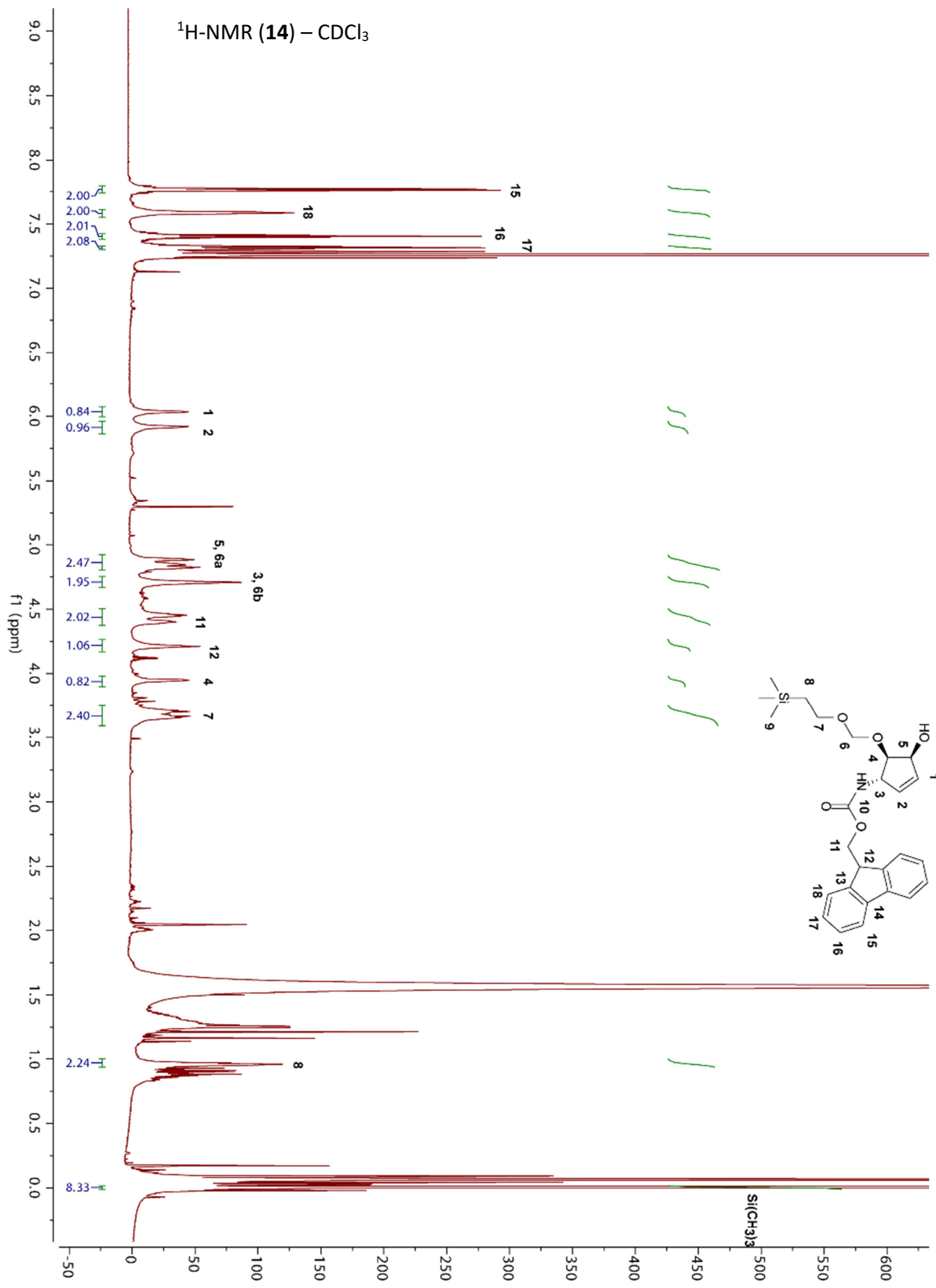


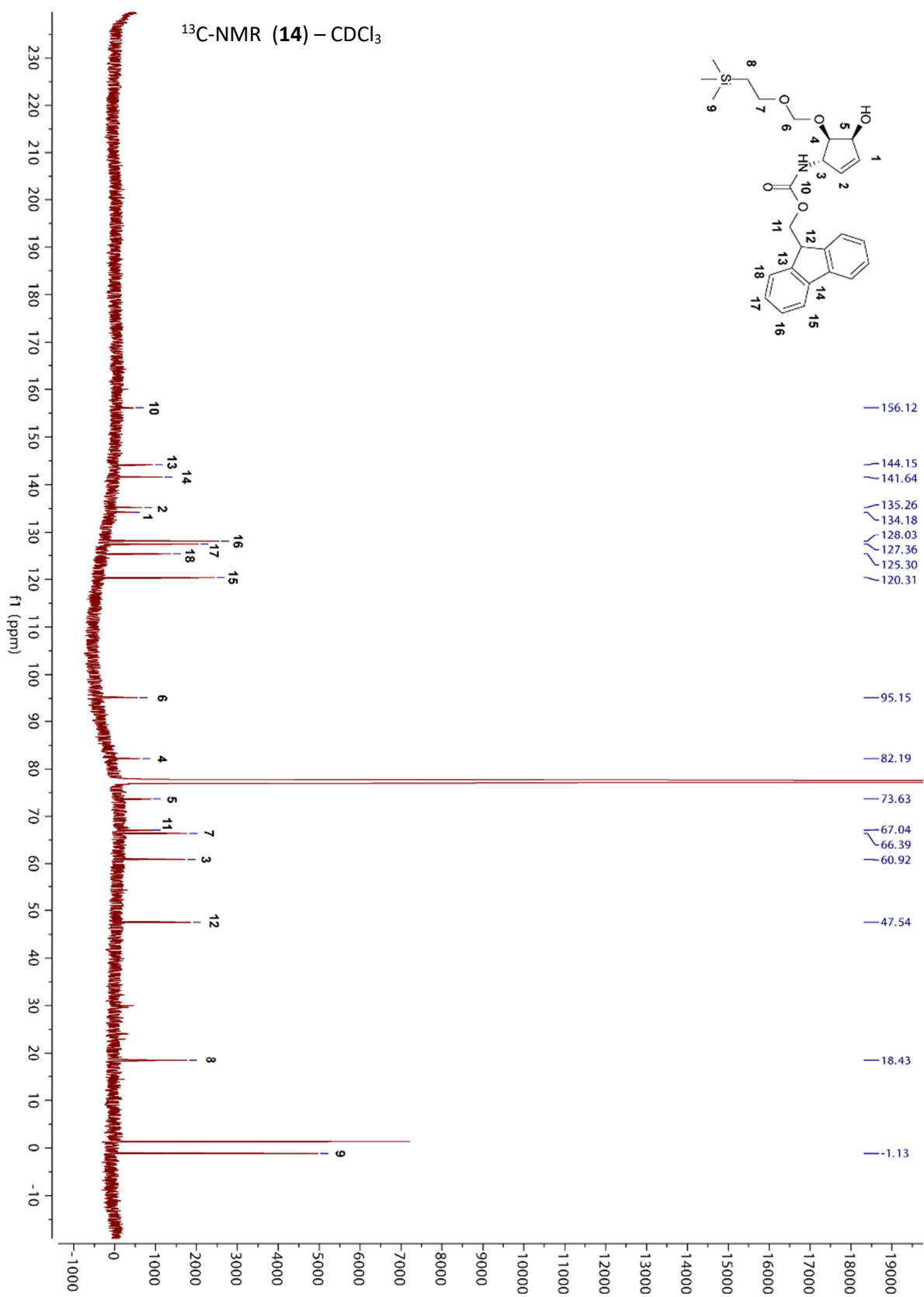


¹H-NMR (30) – CDCl₃

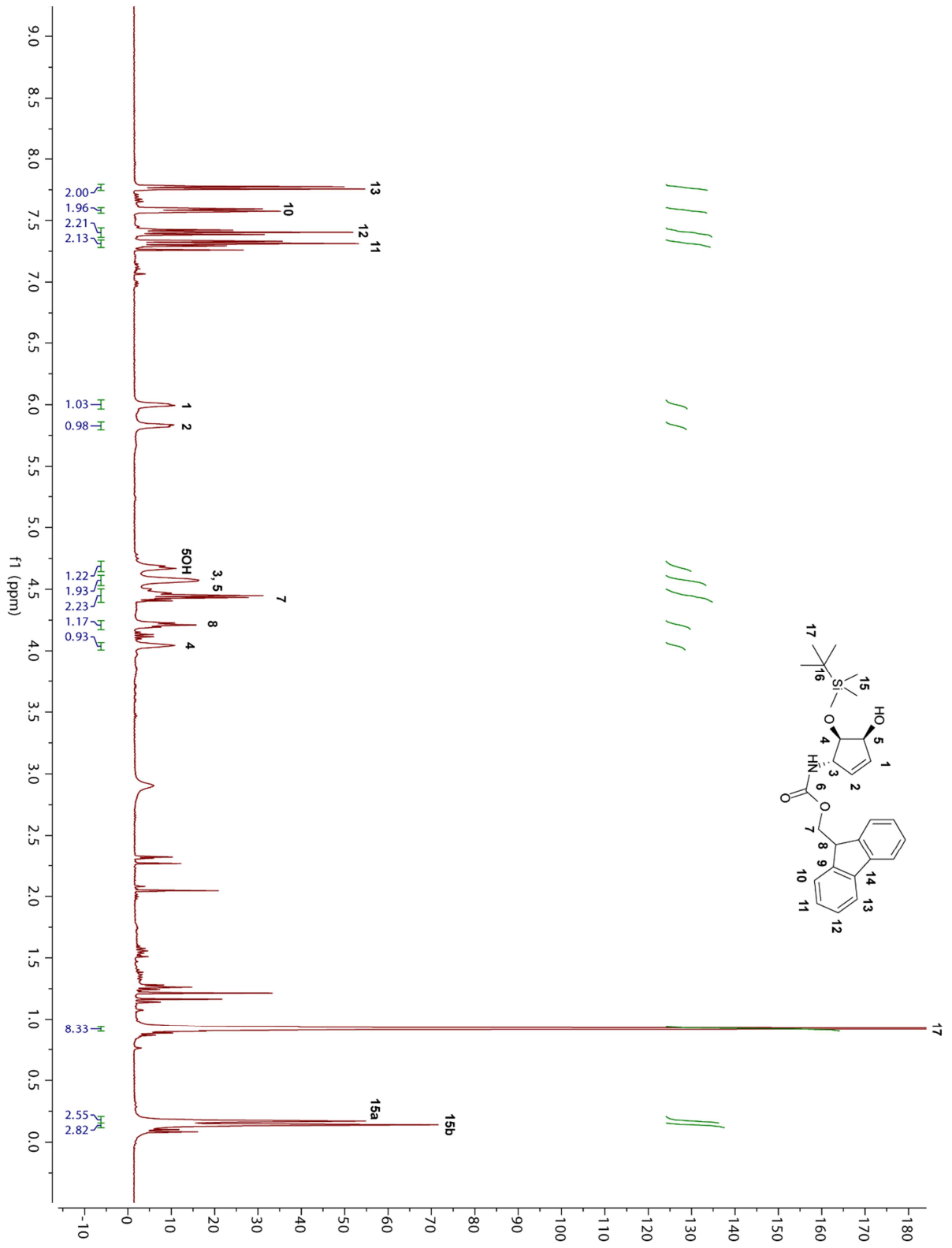


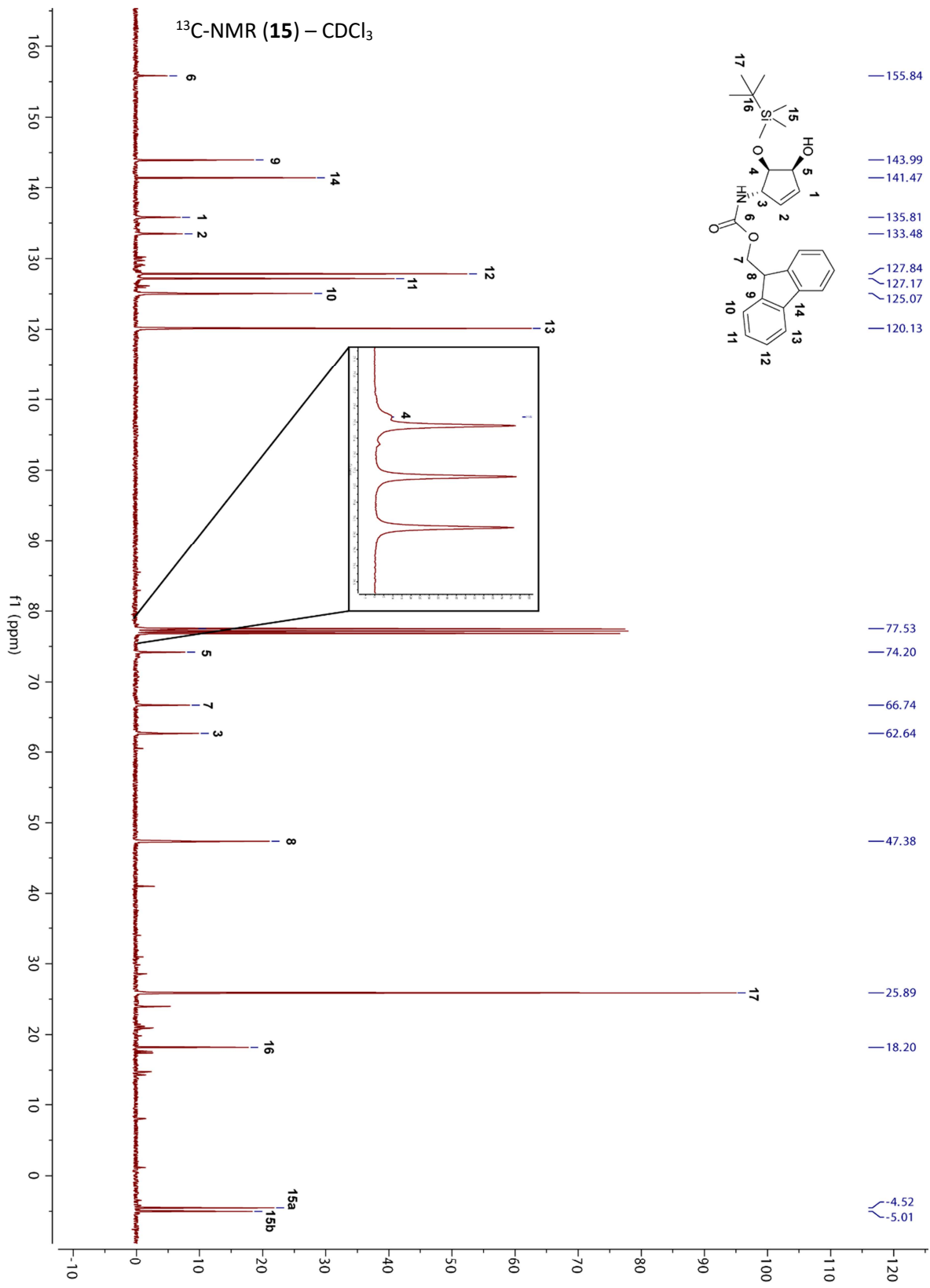


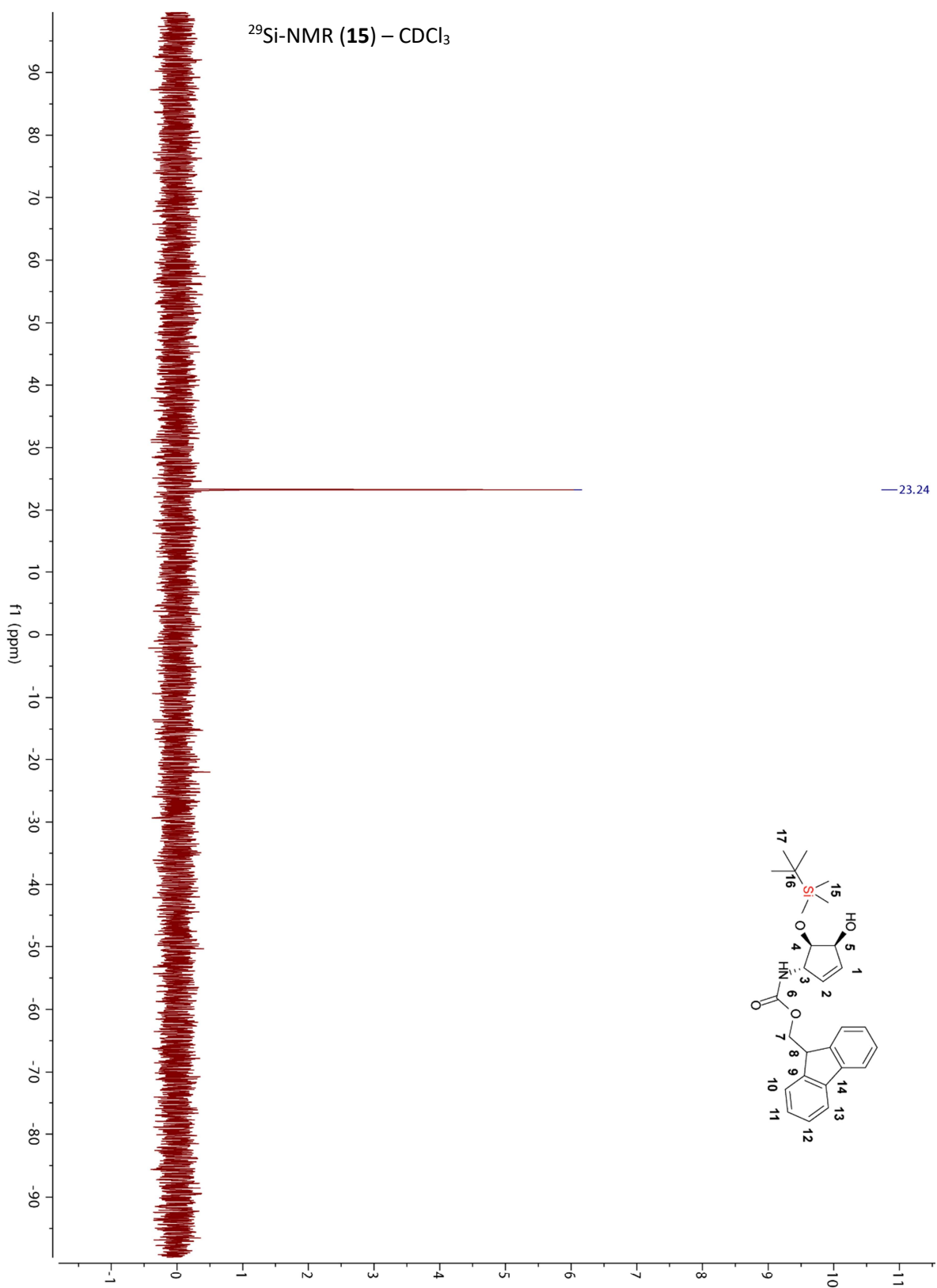


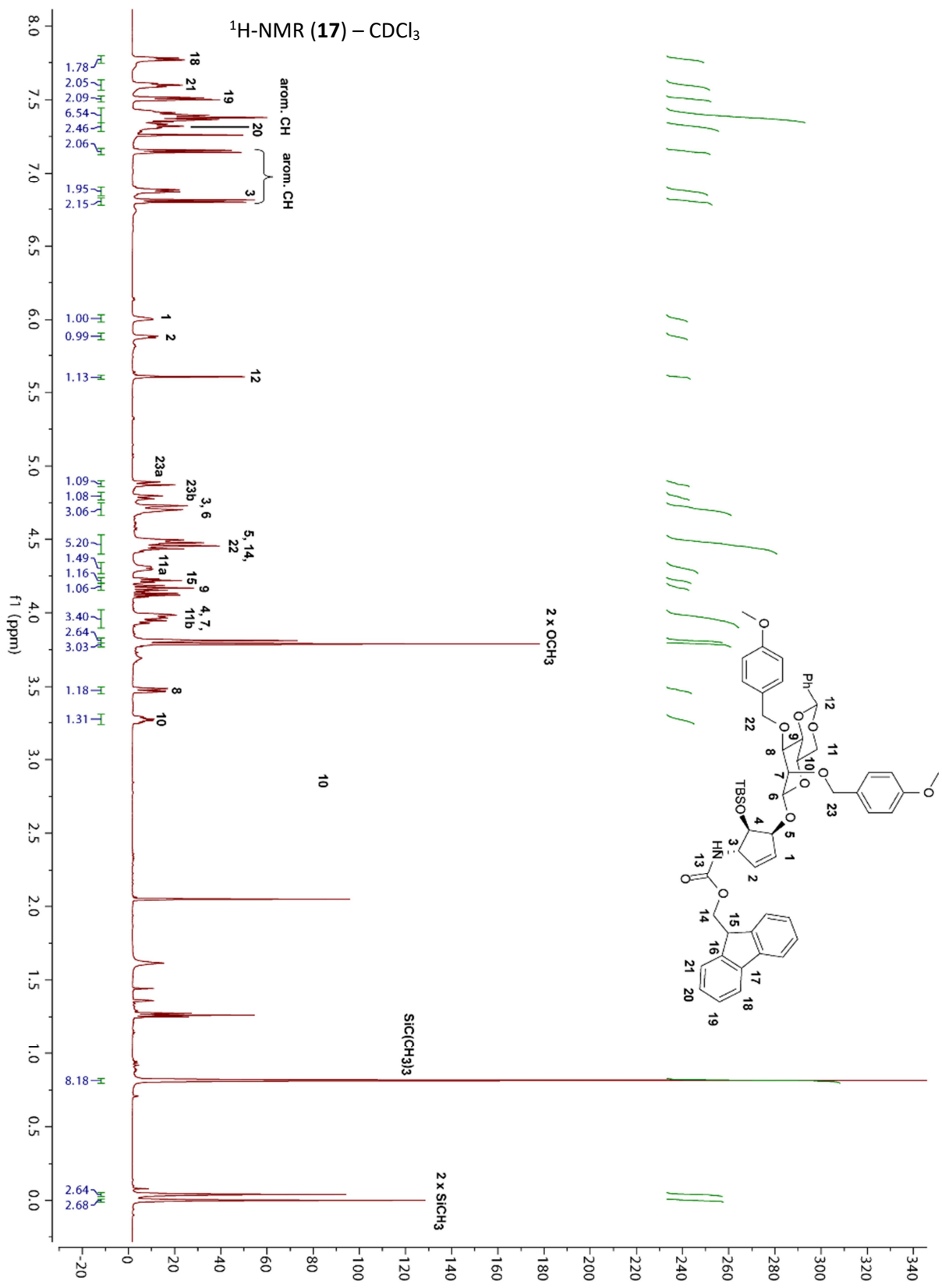


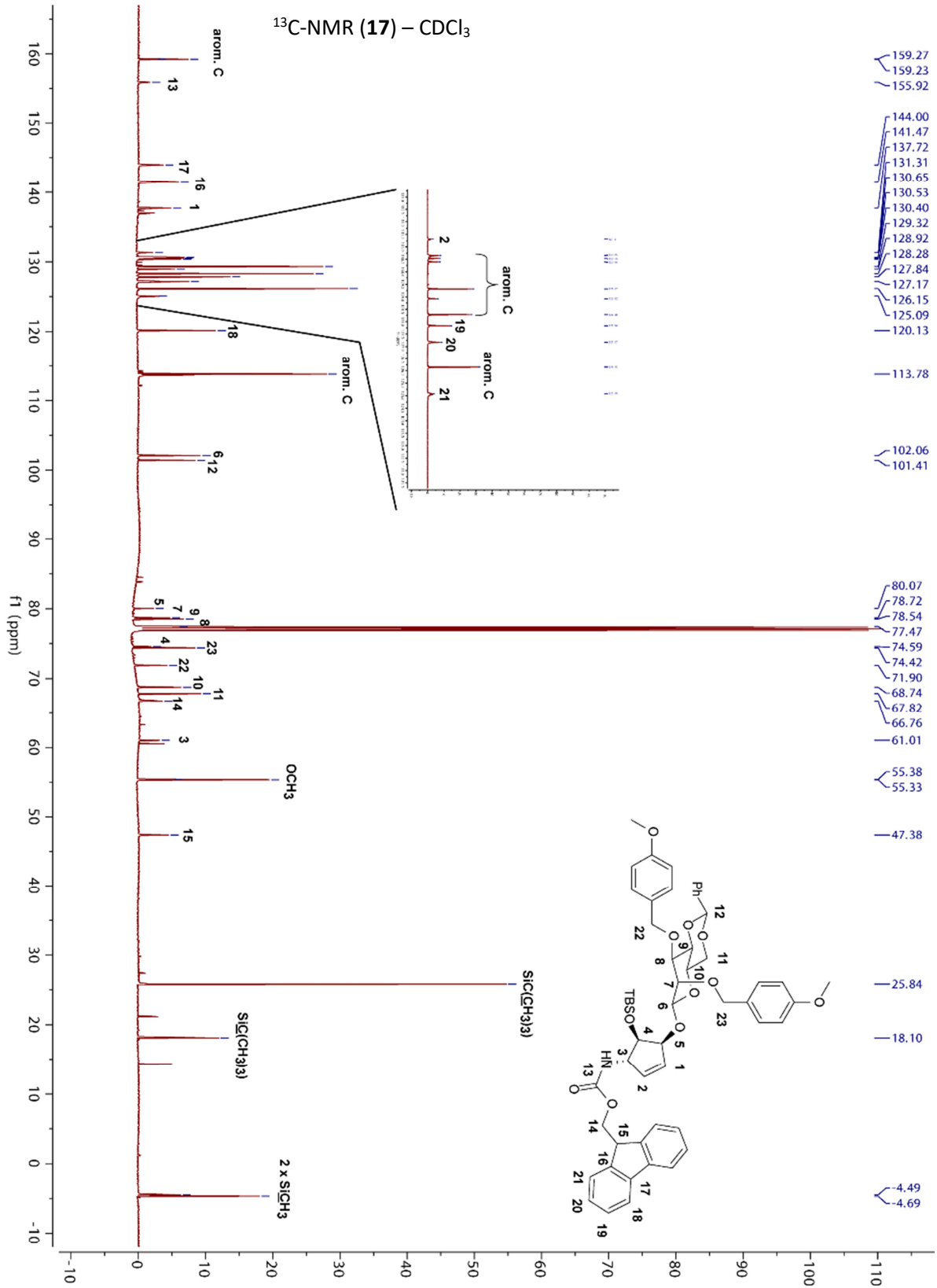
¹H-NMR (15) – CDCl₃

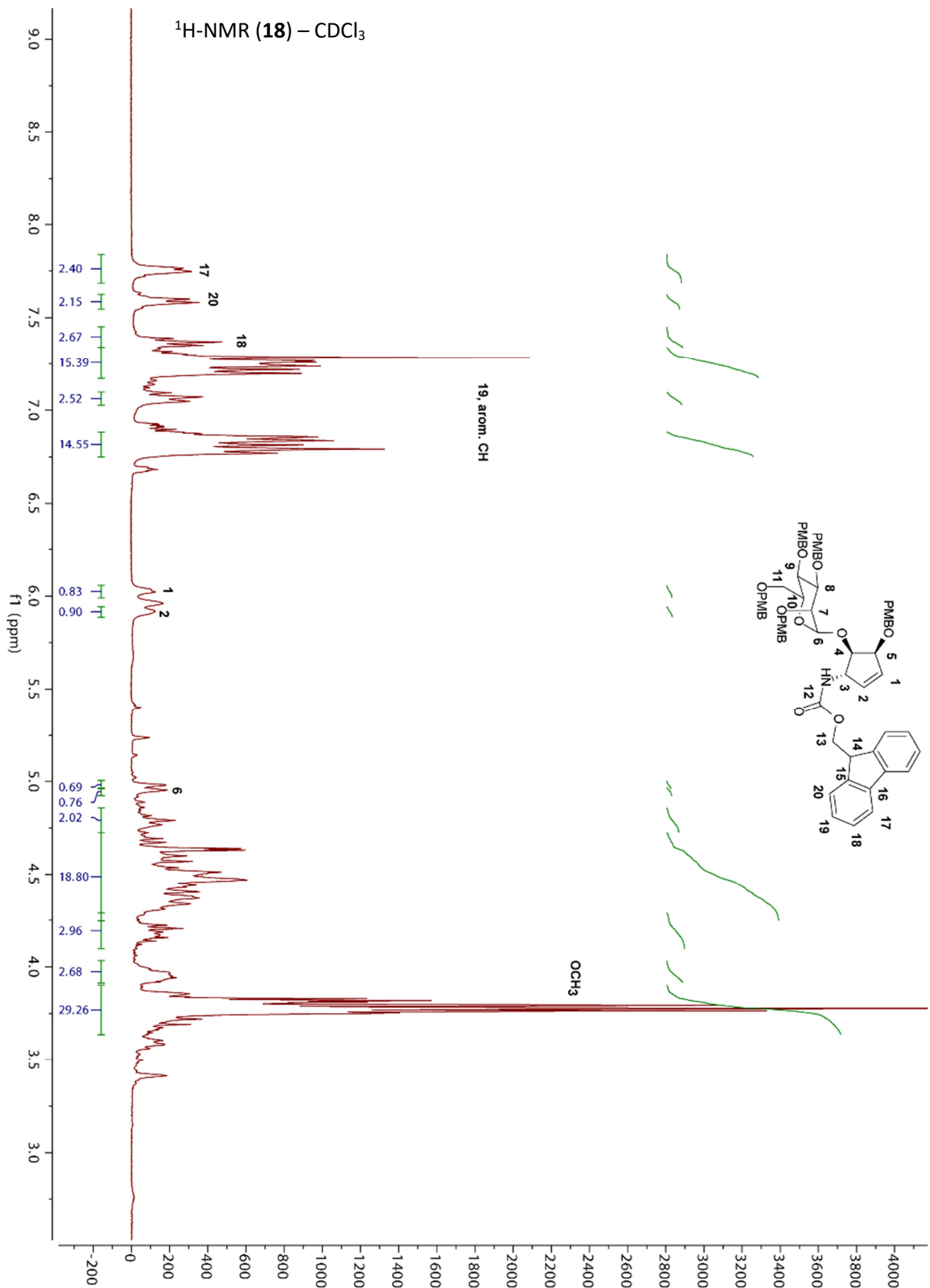


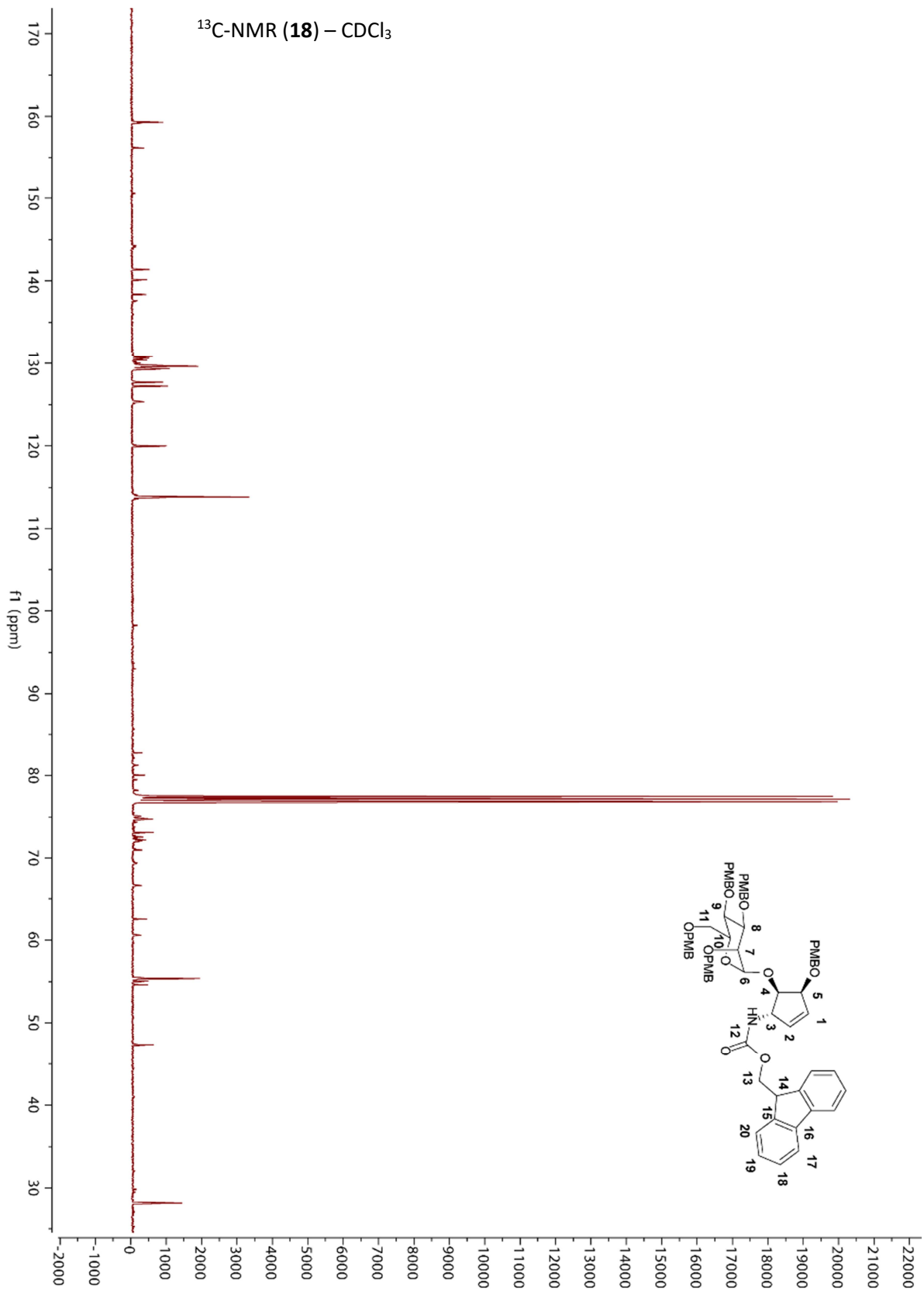


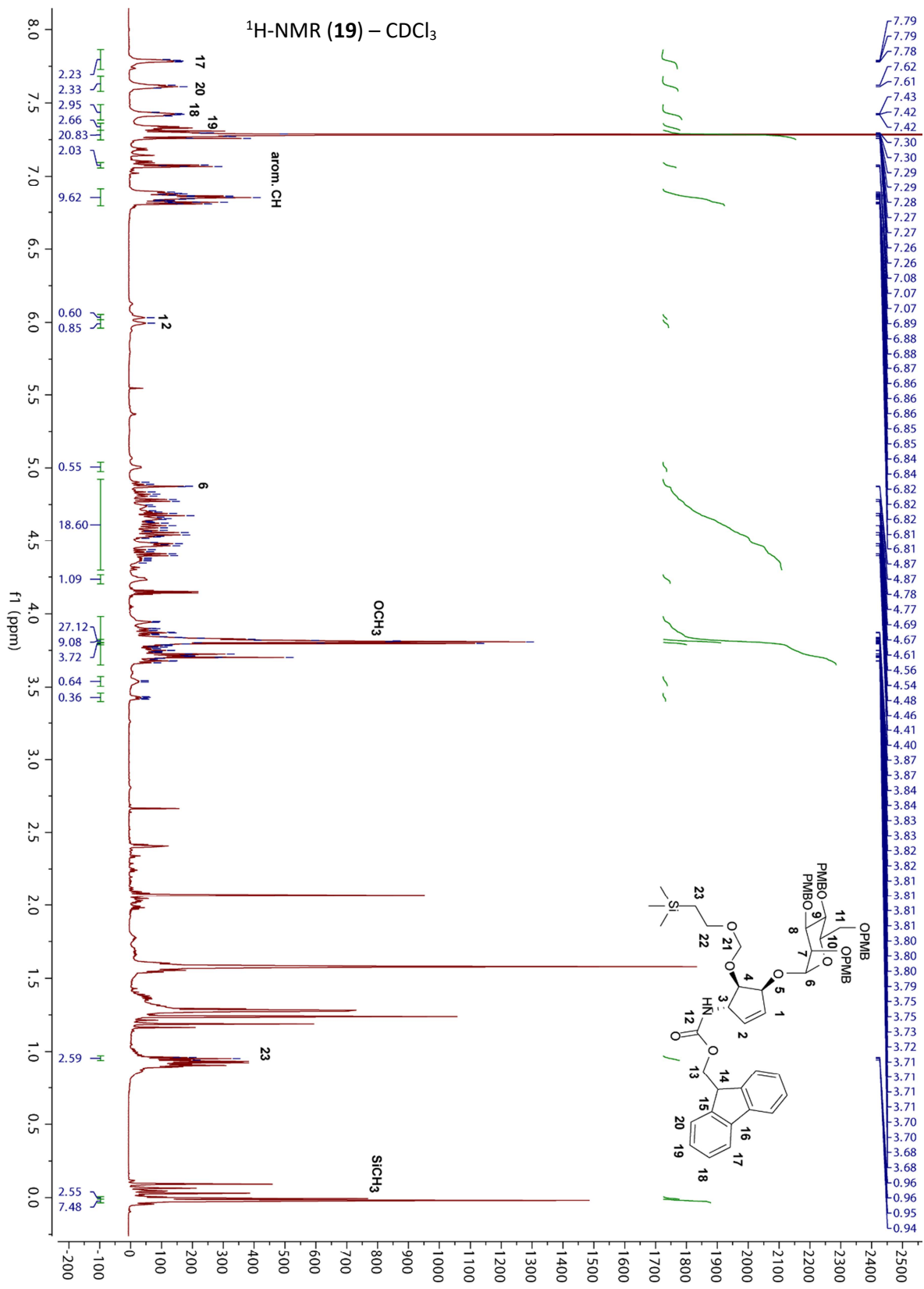


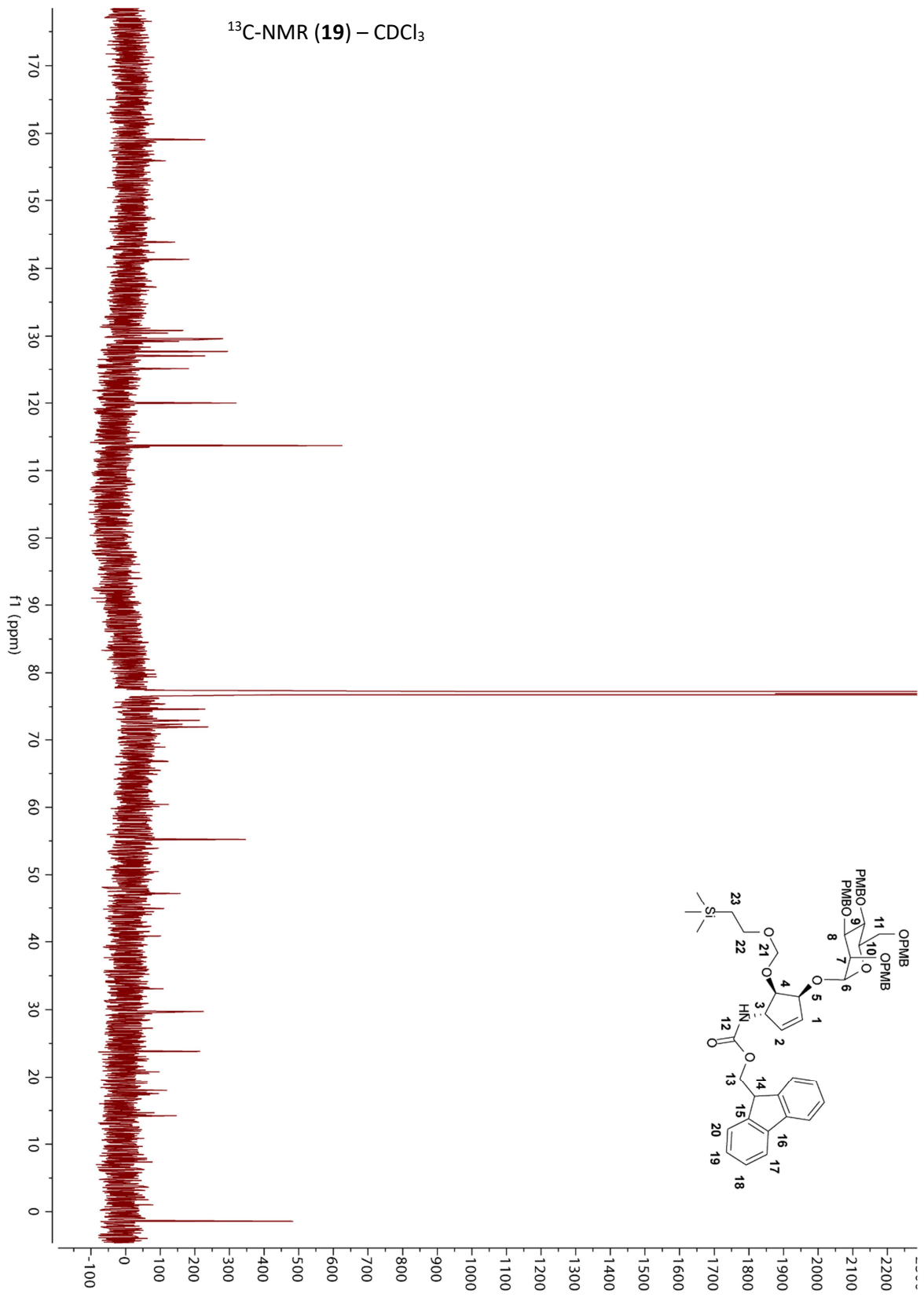


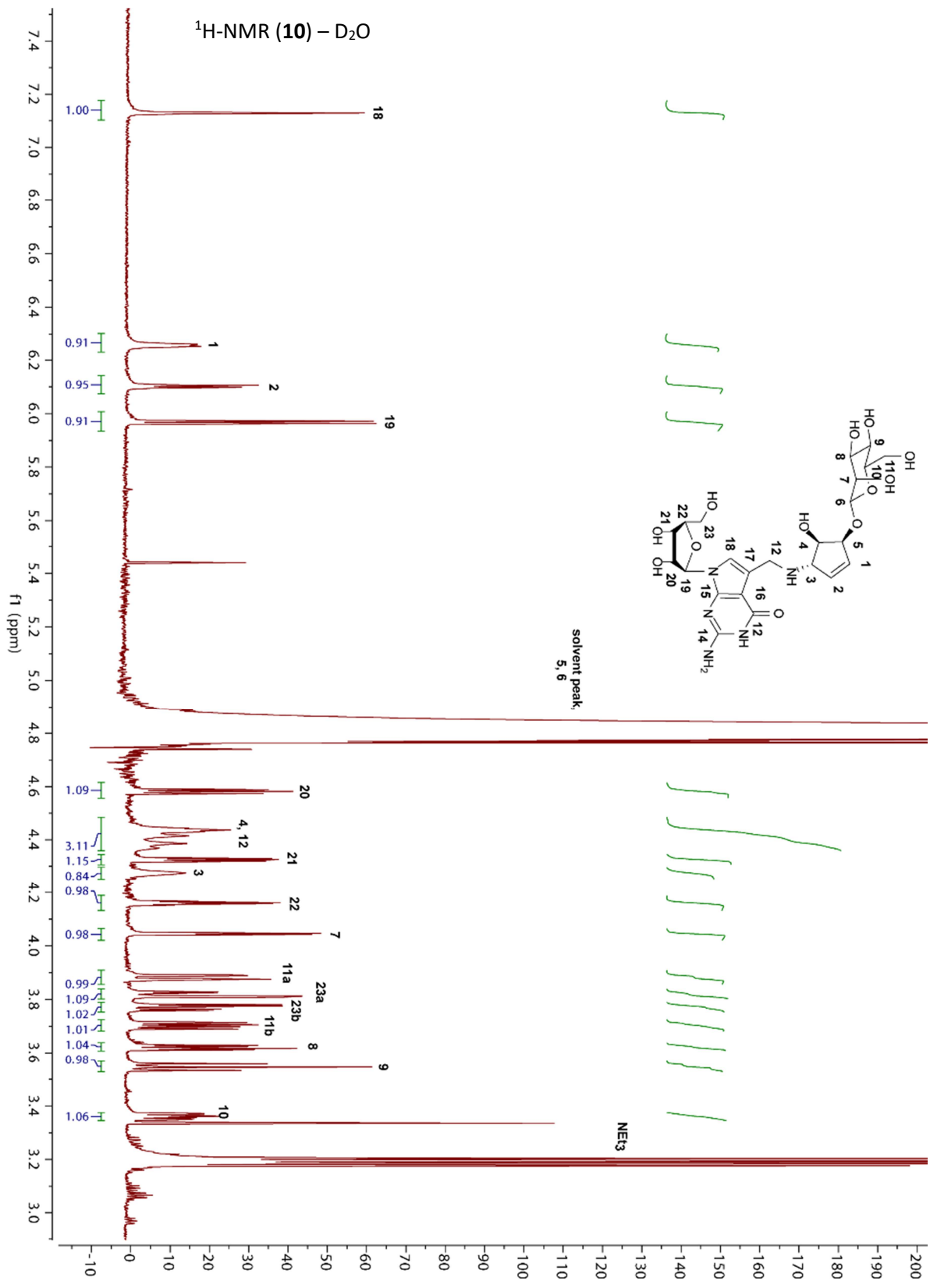


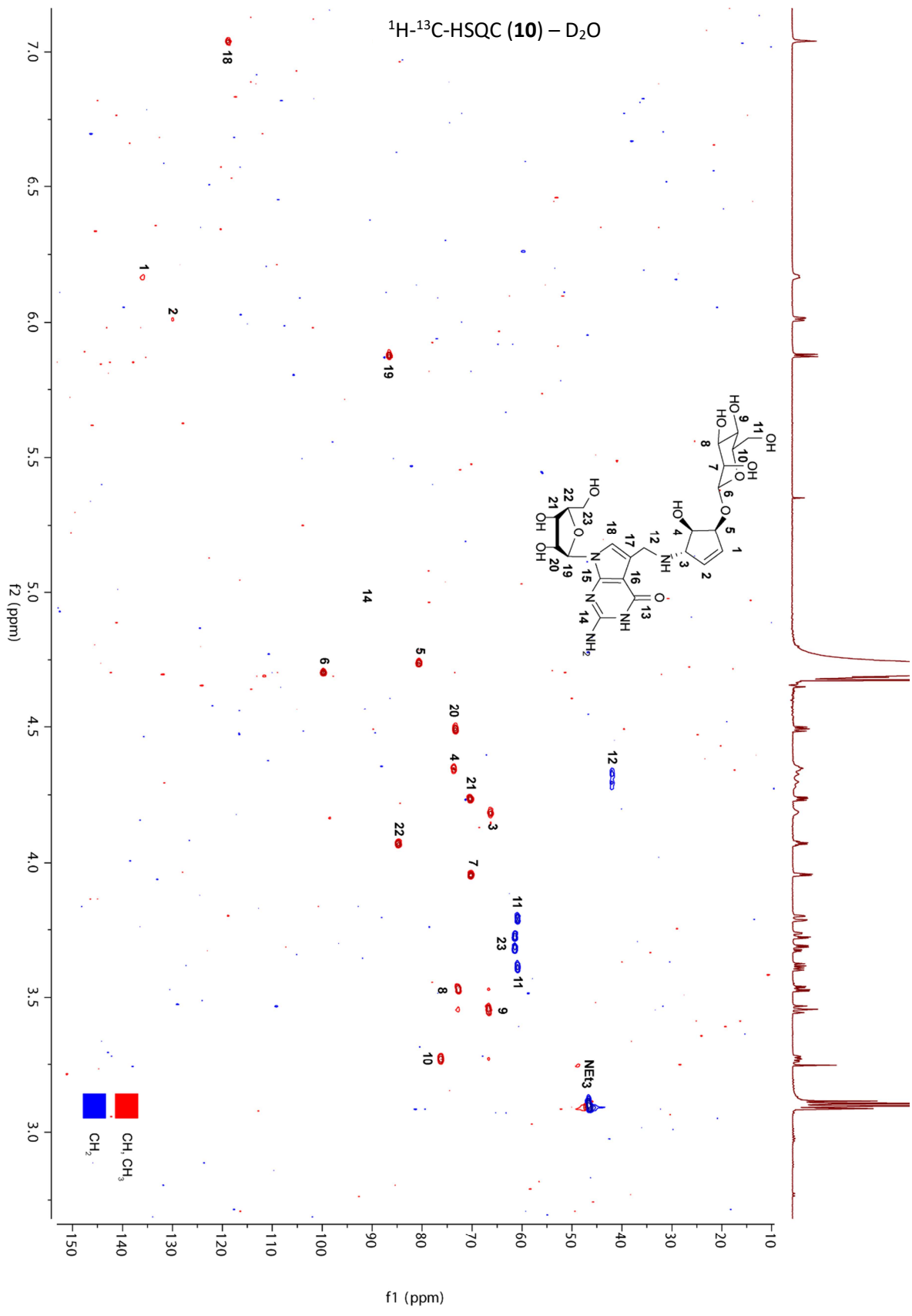


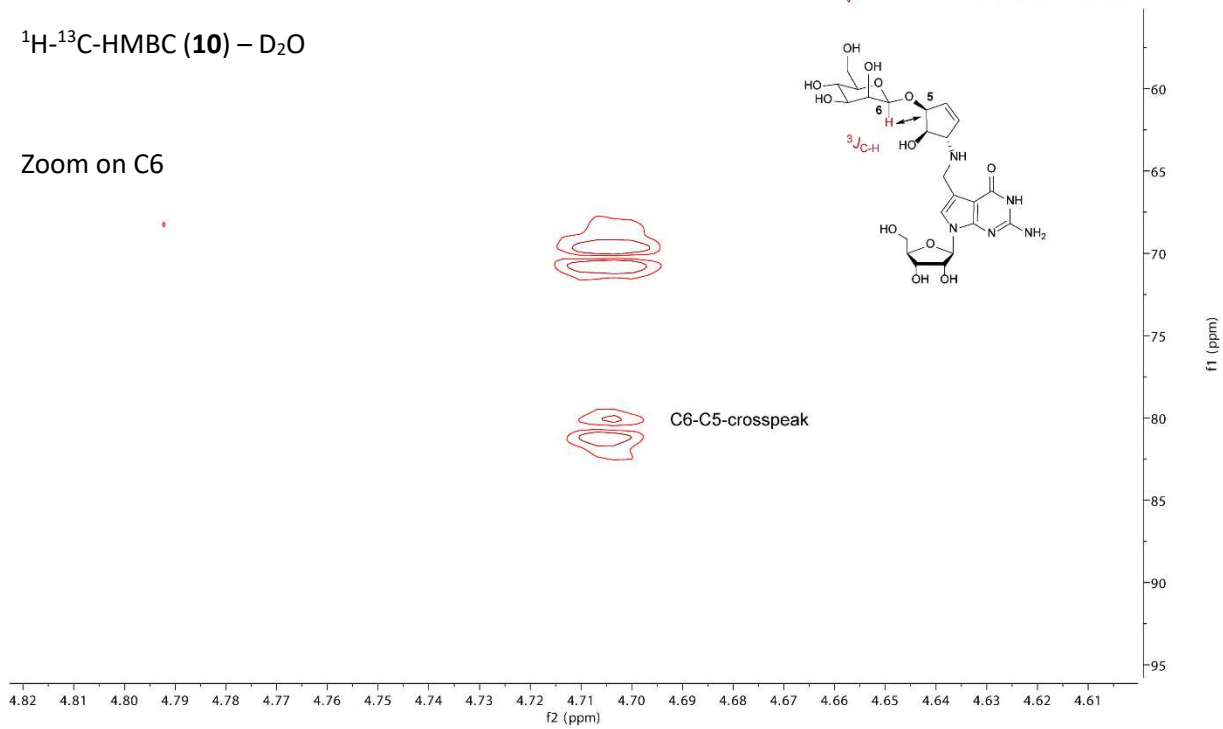
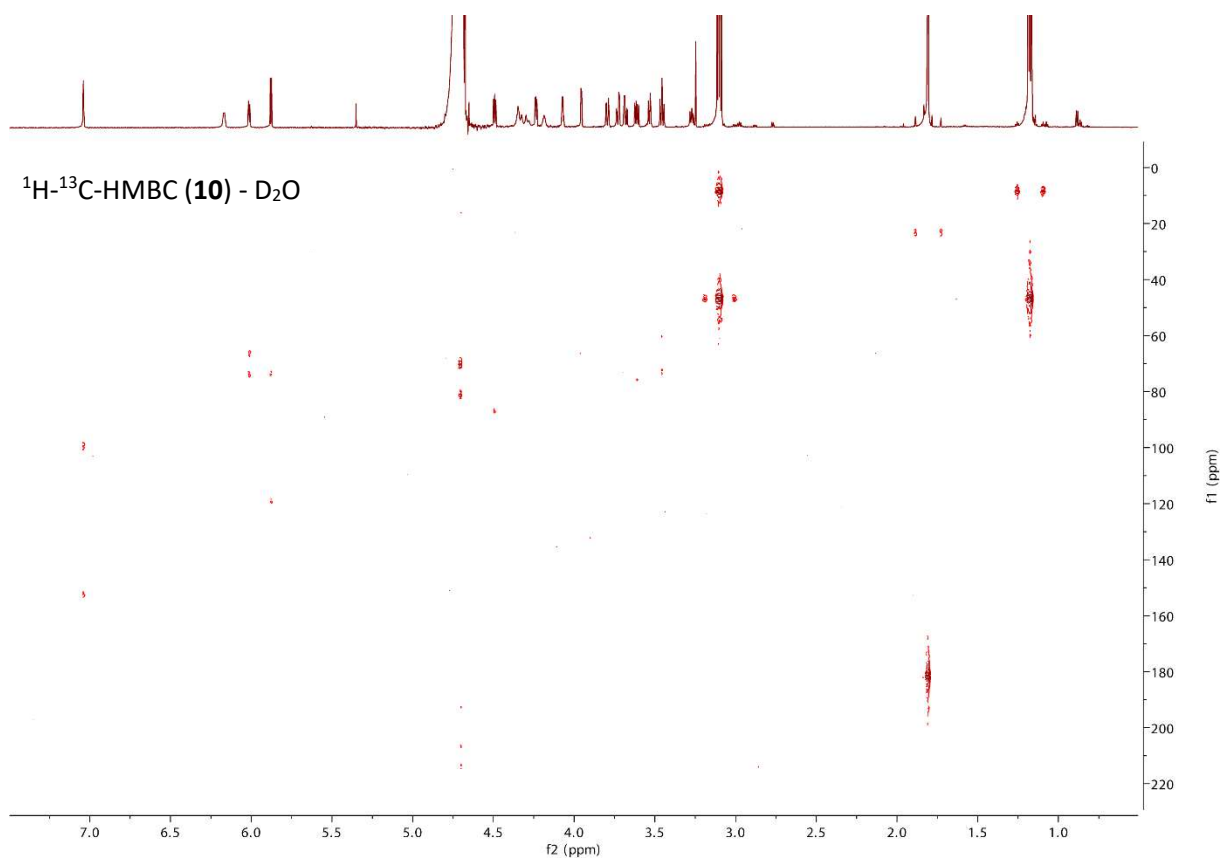


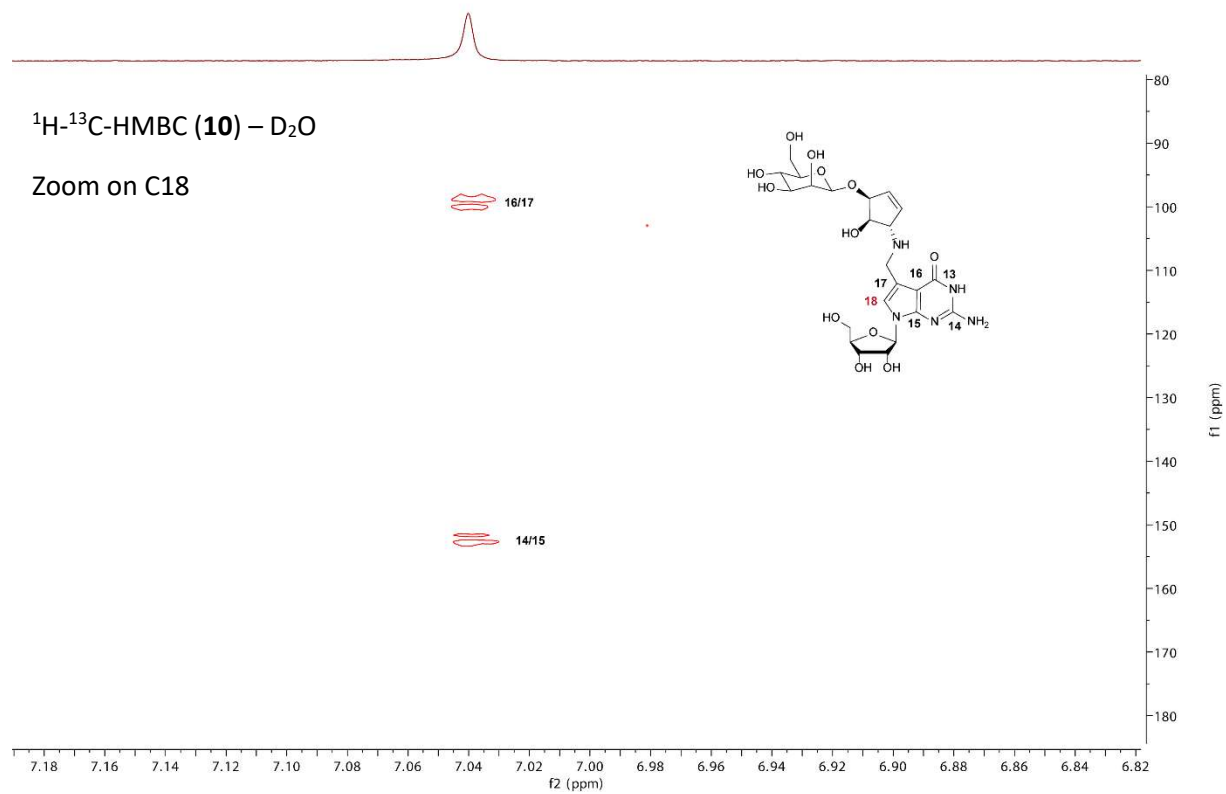


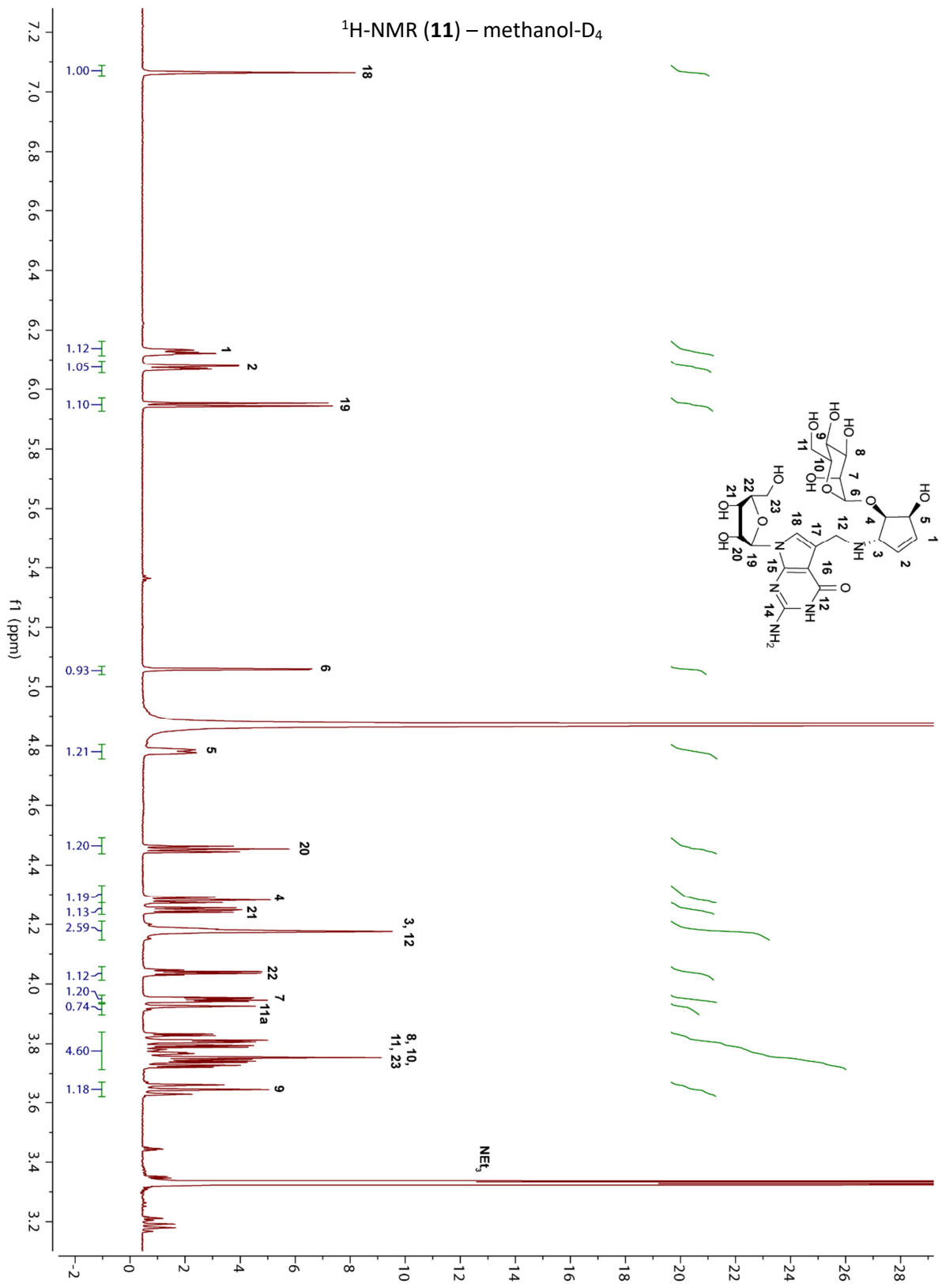


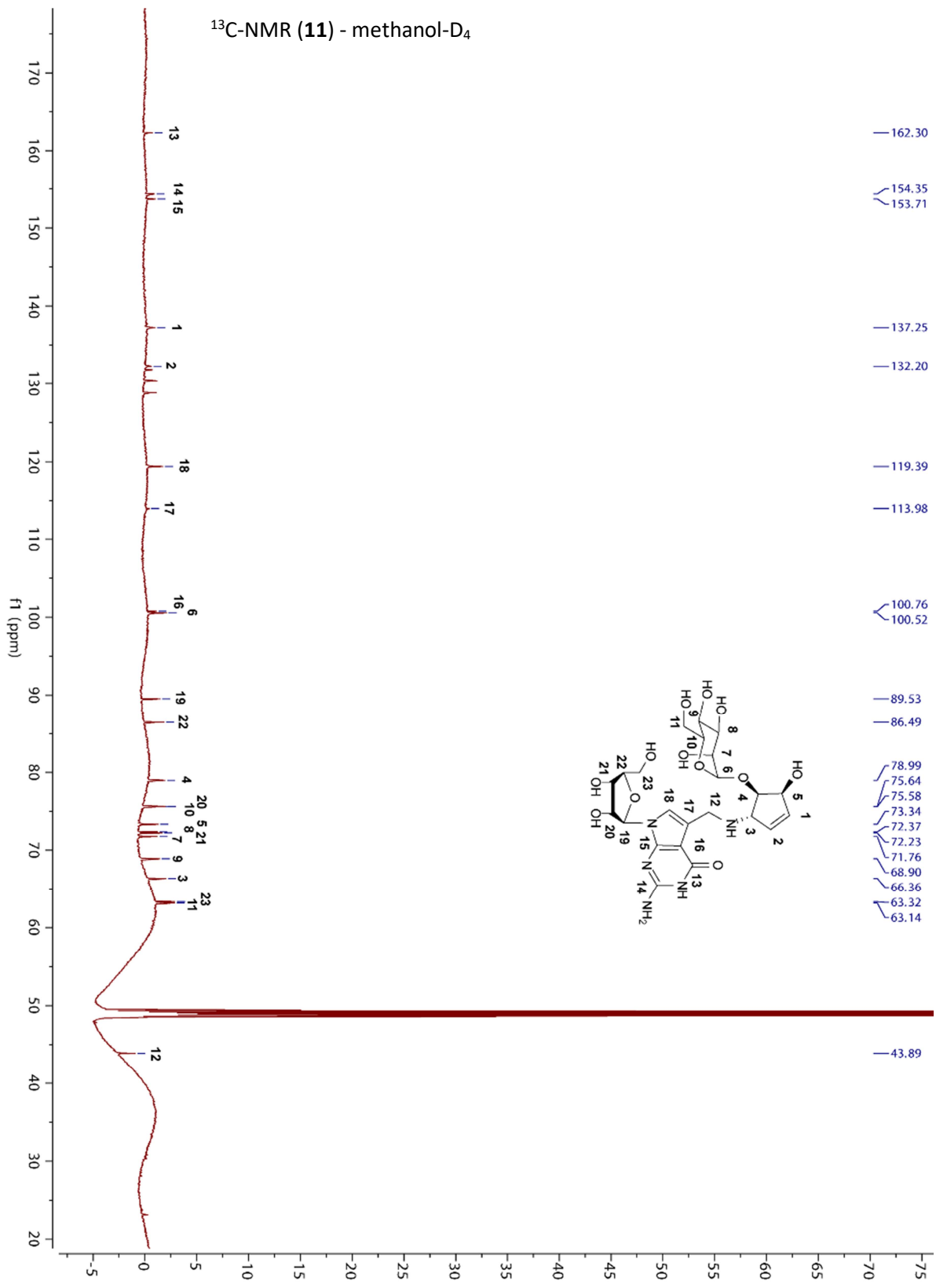


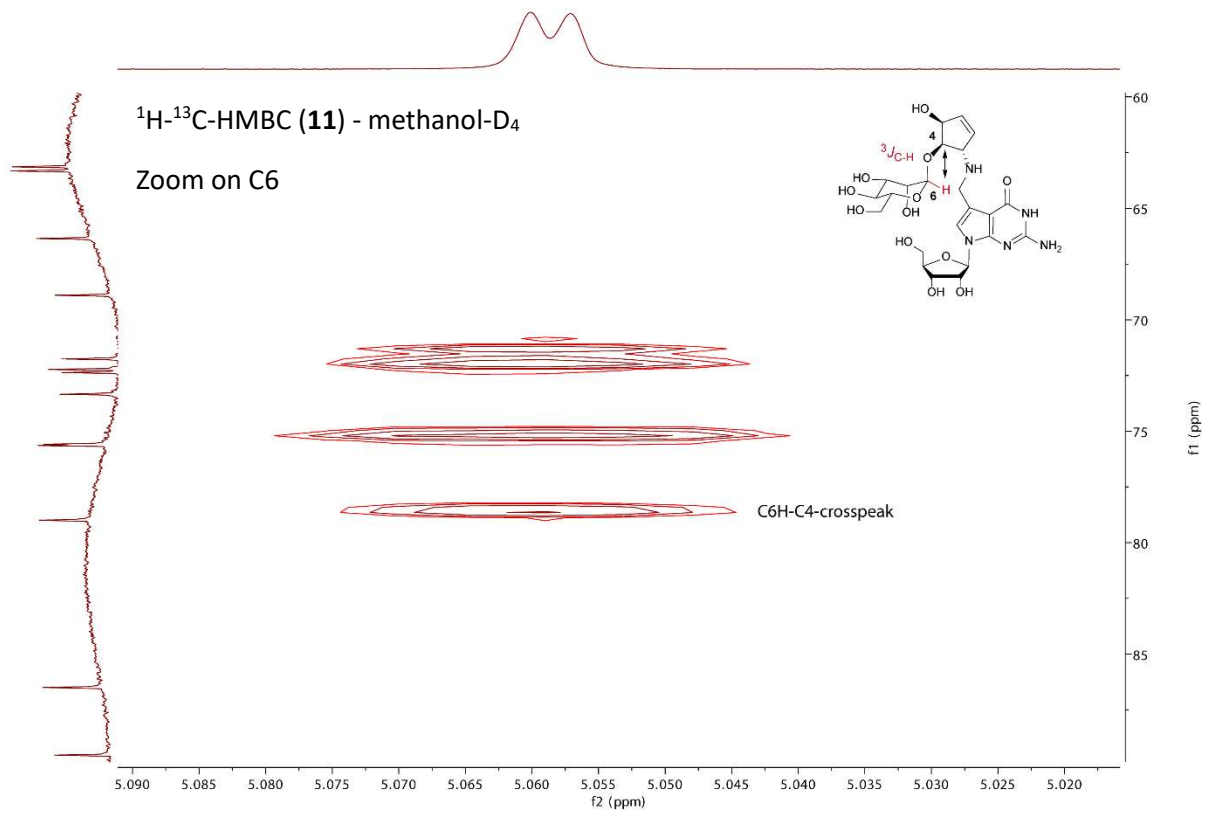
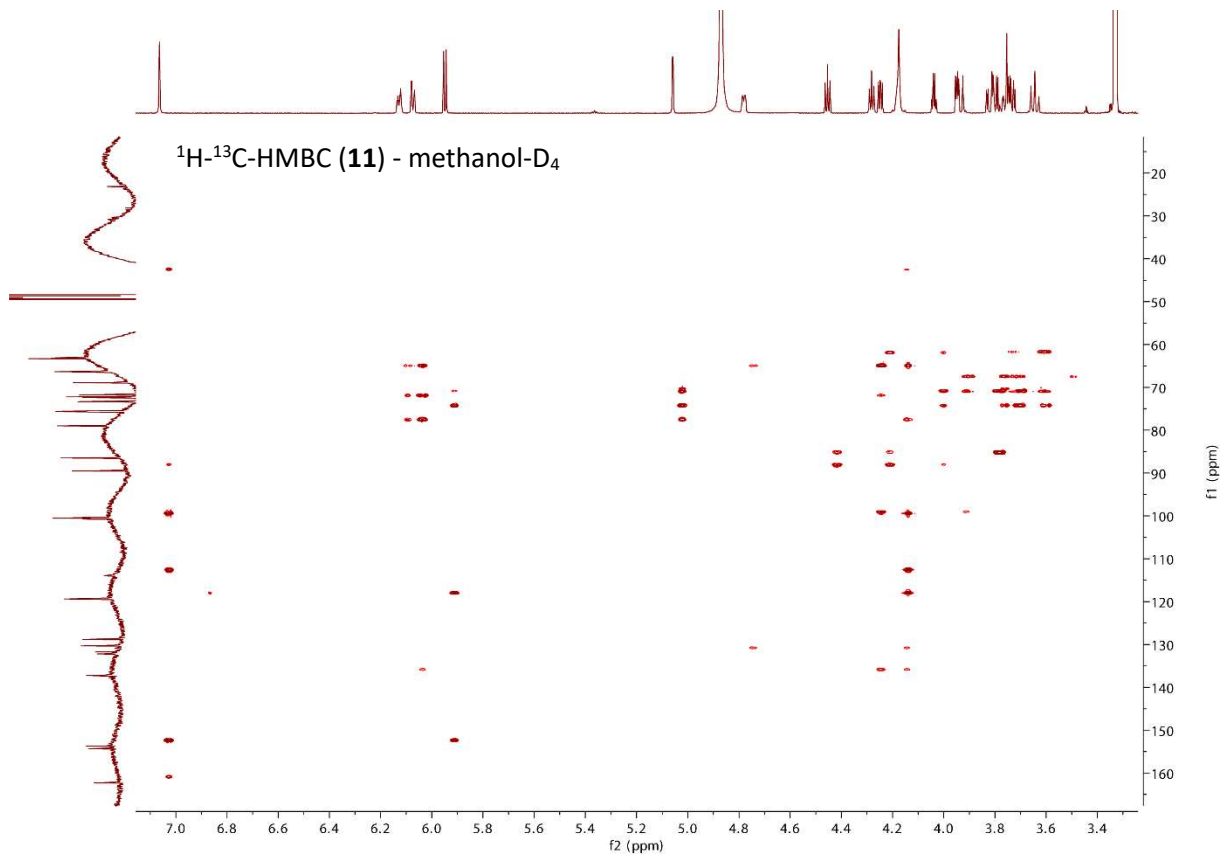


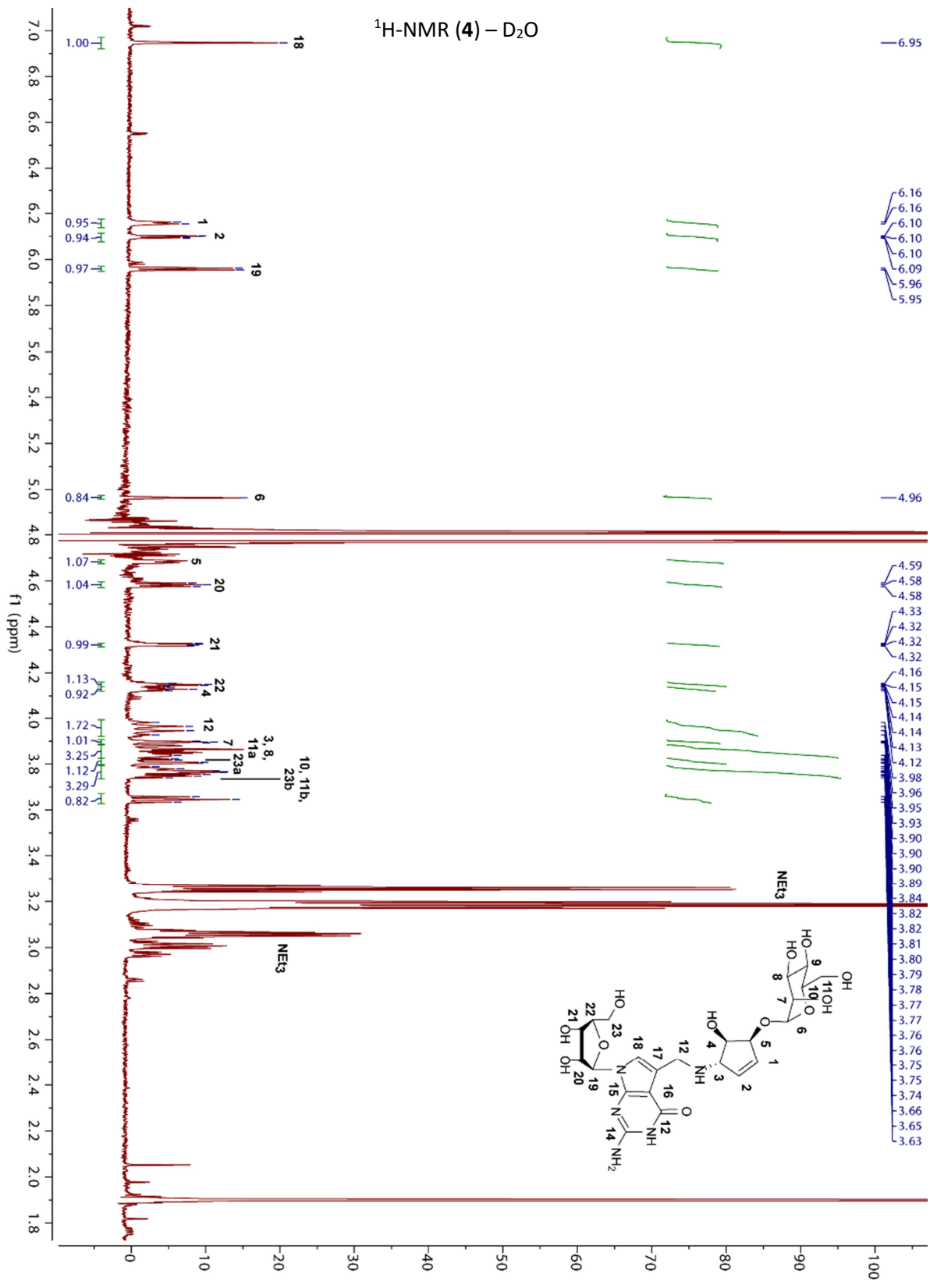


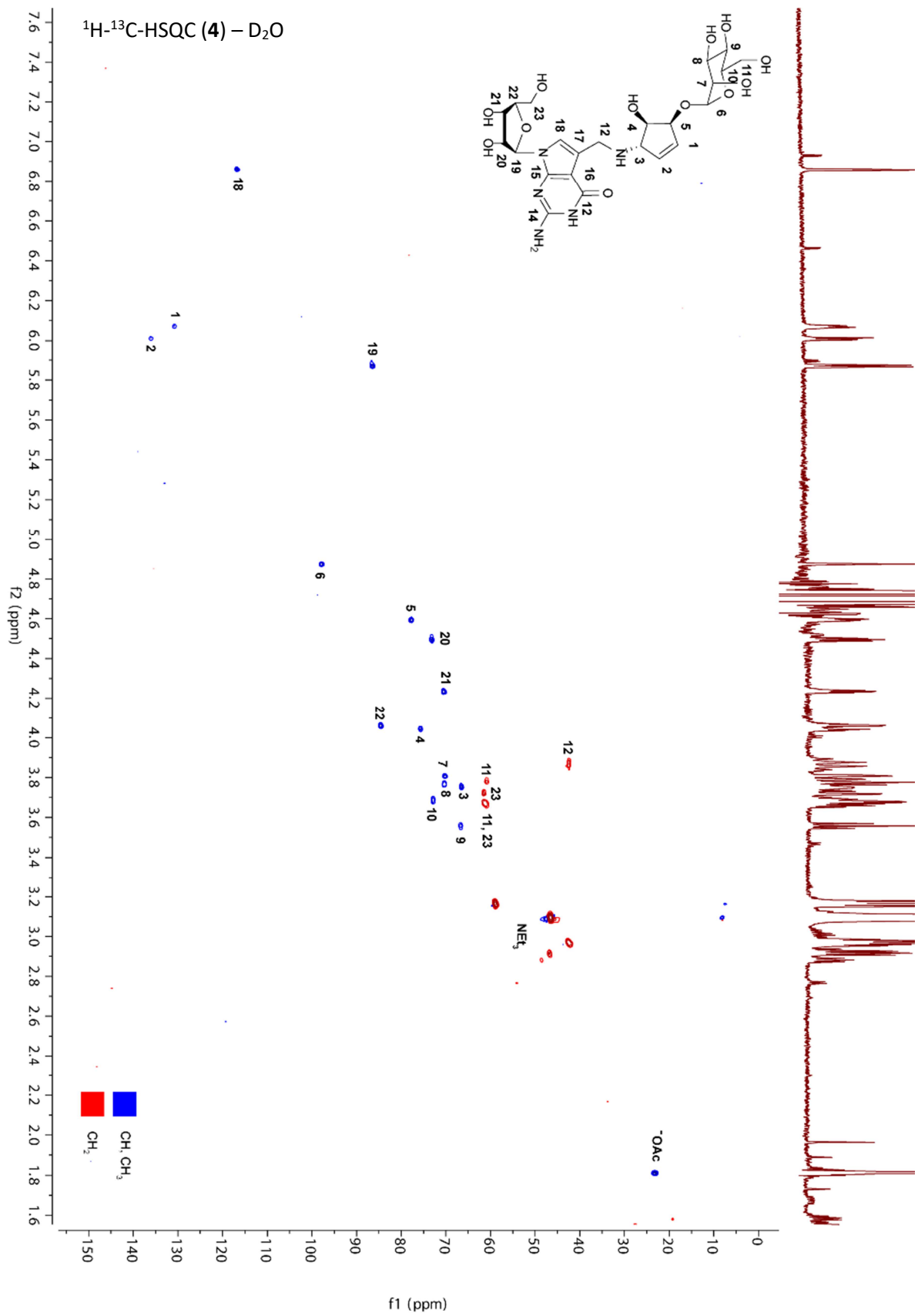


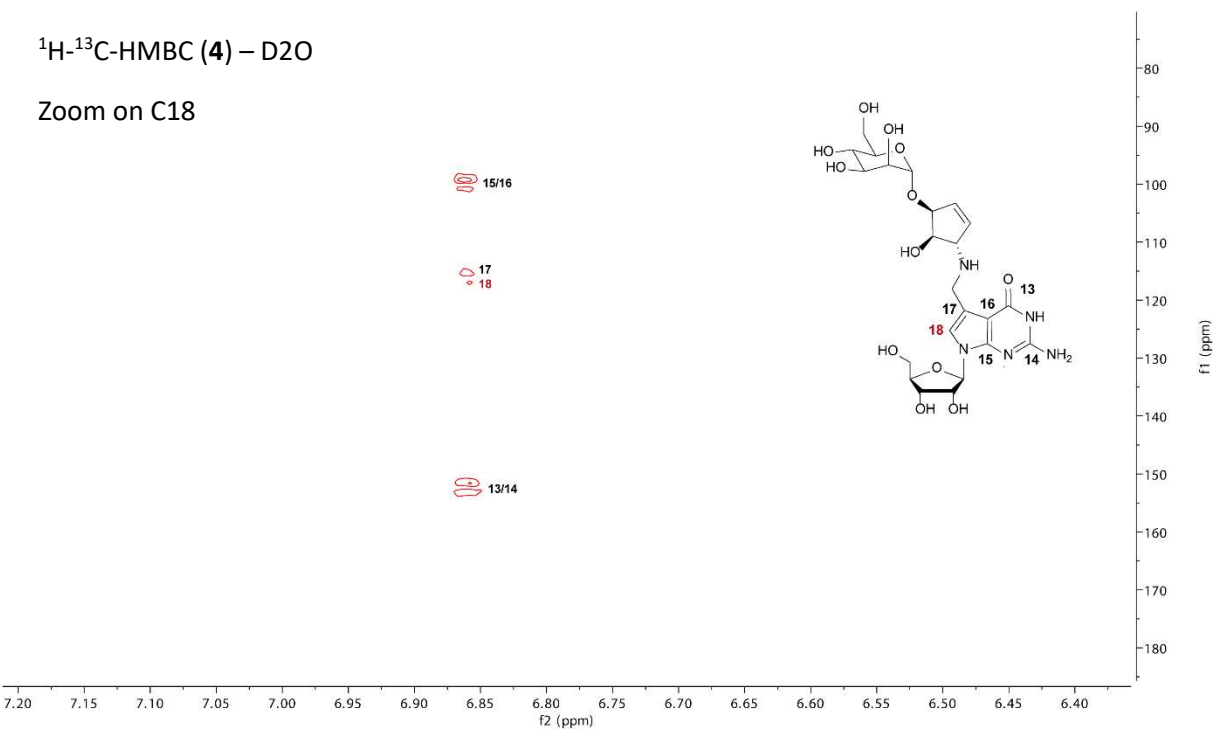
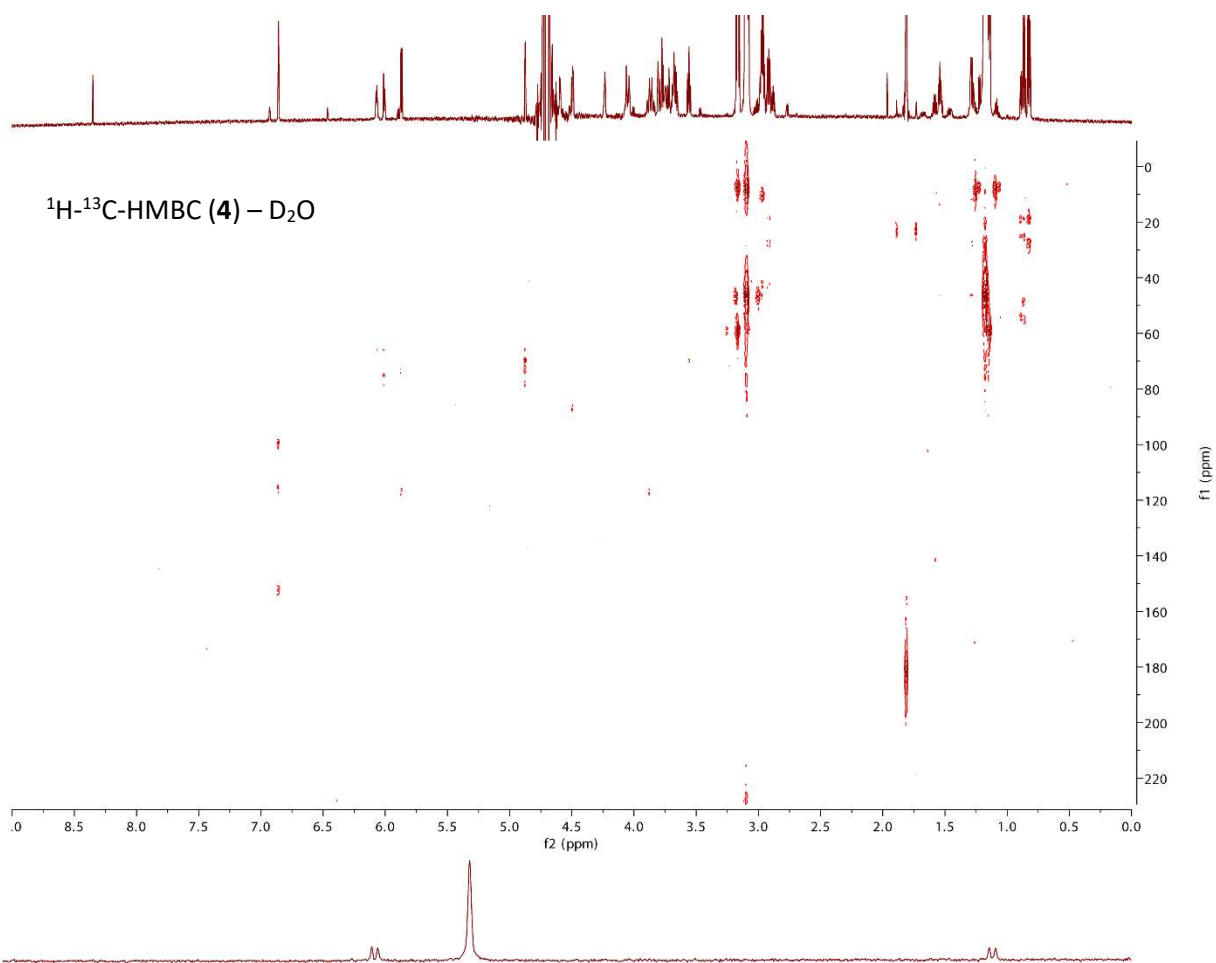


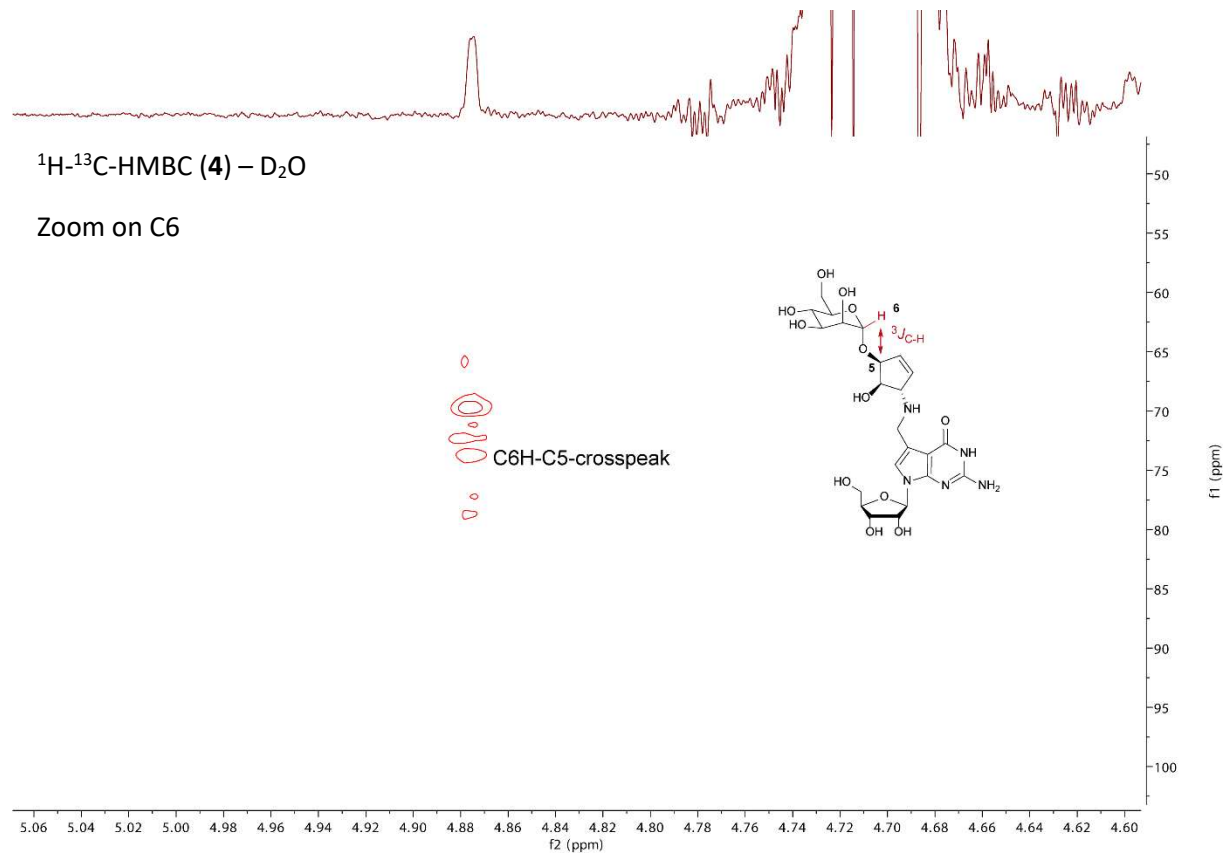


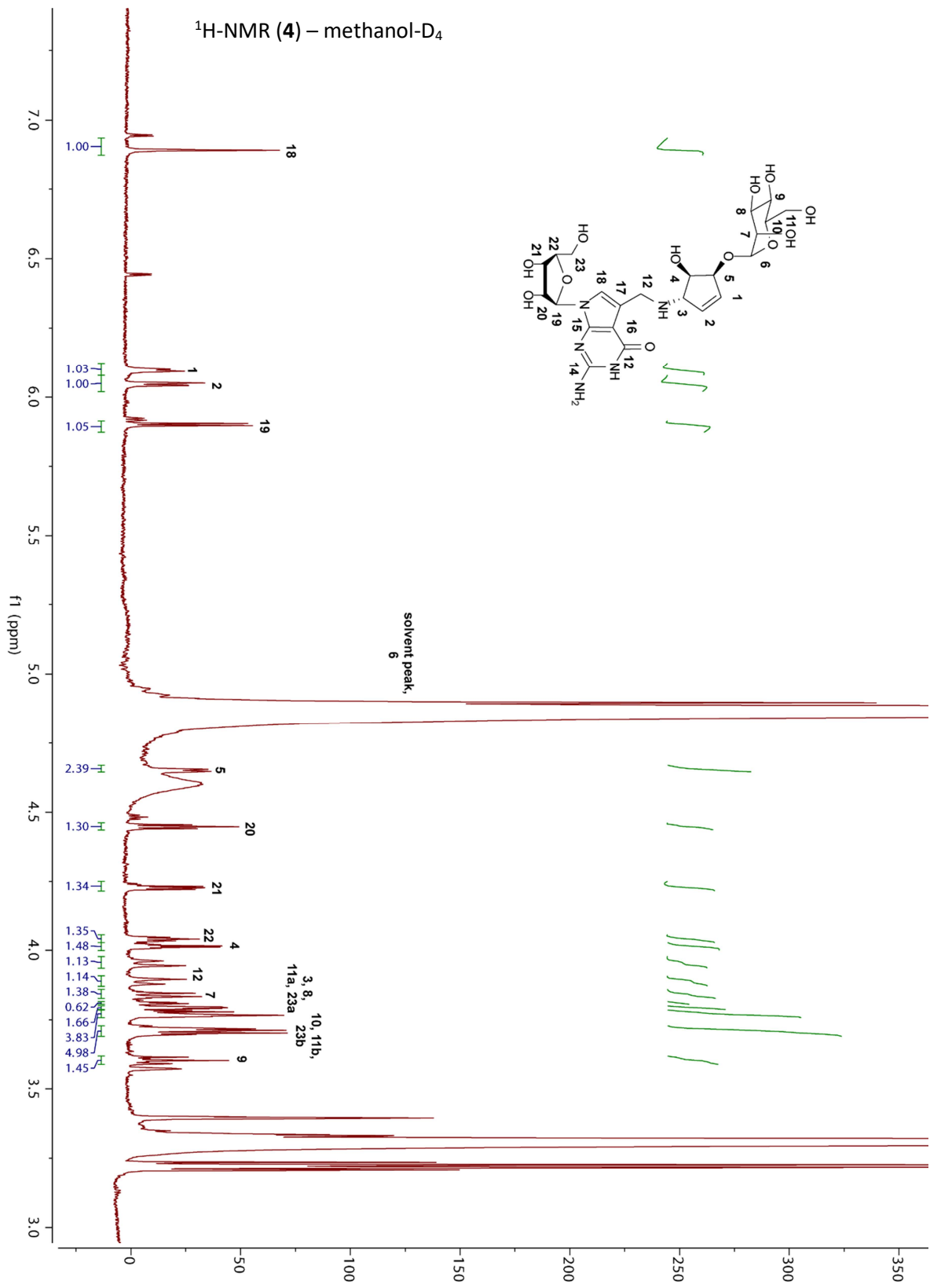




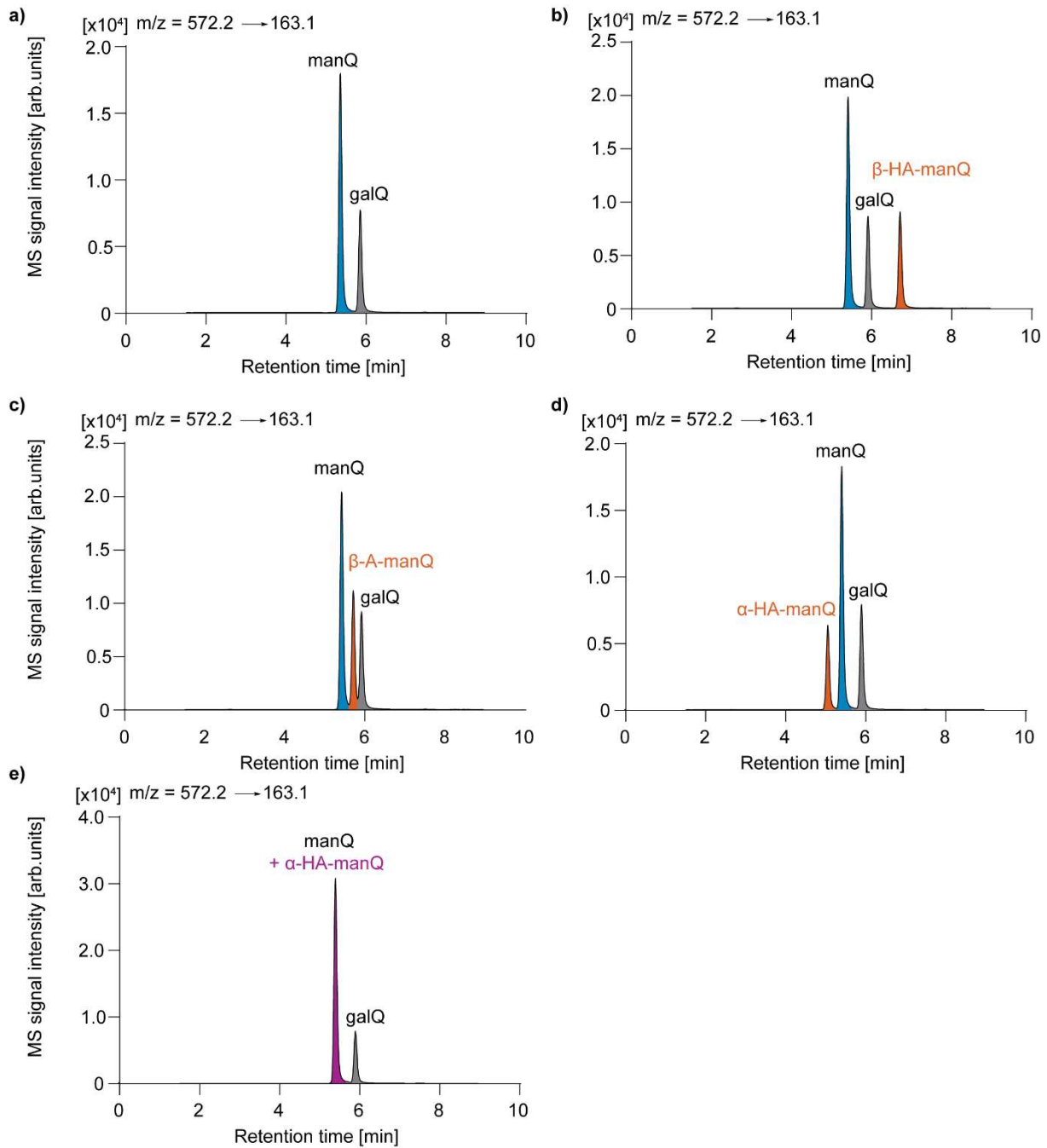








5. UHPLC-MS/MS chromatograms of co-injection experiments



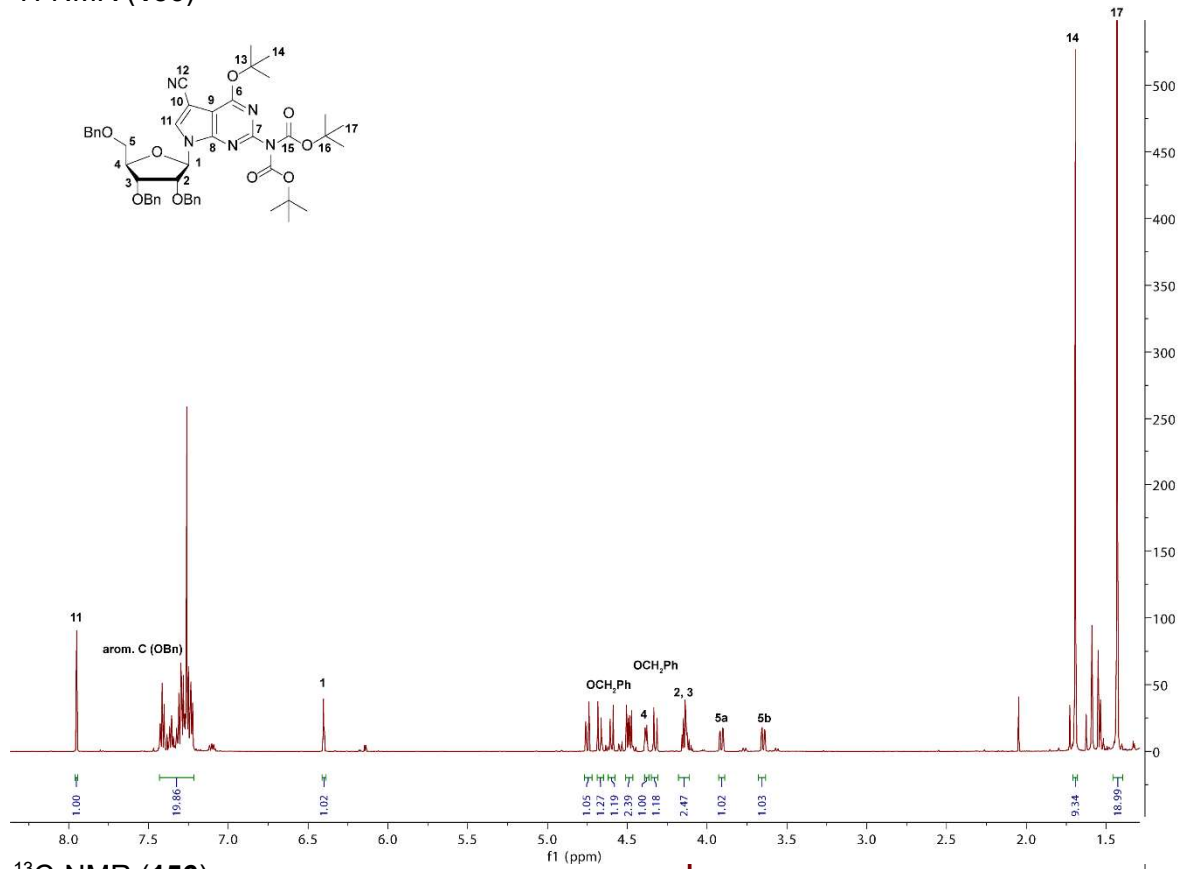
Supplementary Figure 10. Full HPLC-MS/MS-chromatograms of the coinjection experiments performed in this study (corresponding to the chromatograms shown in **Fig. 2** and **5** of the main text). **a**, digested mouse total RNA only; **b**, digested mouse total RNA + β -homoallyl-manQ **3**; **c**, digested mouse total RNA + β -allyl-manQ **10**; **d**, digested total mouse RNA + α -homoallyl-manQ **11**; **e**, digested mouse total RNA + α -allyl-manQ **4**.

6. Supplementary References

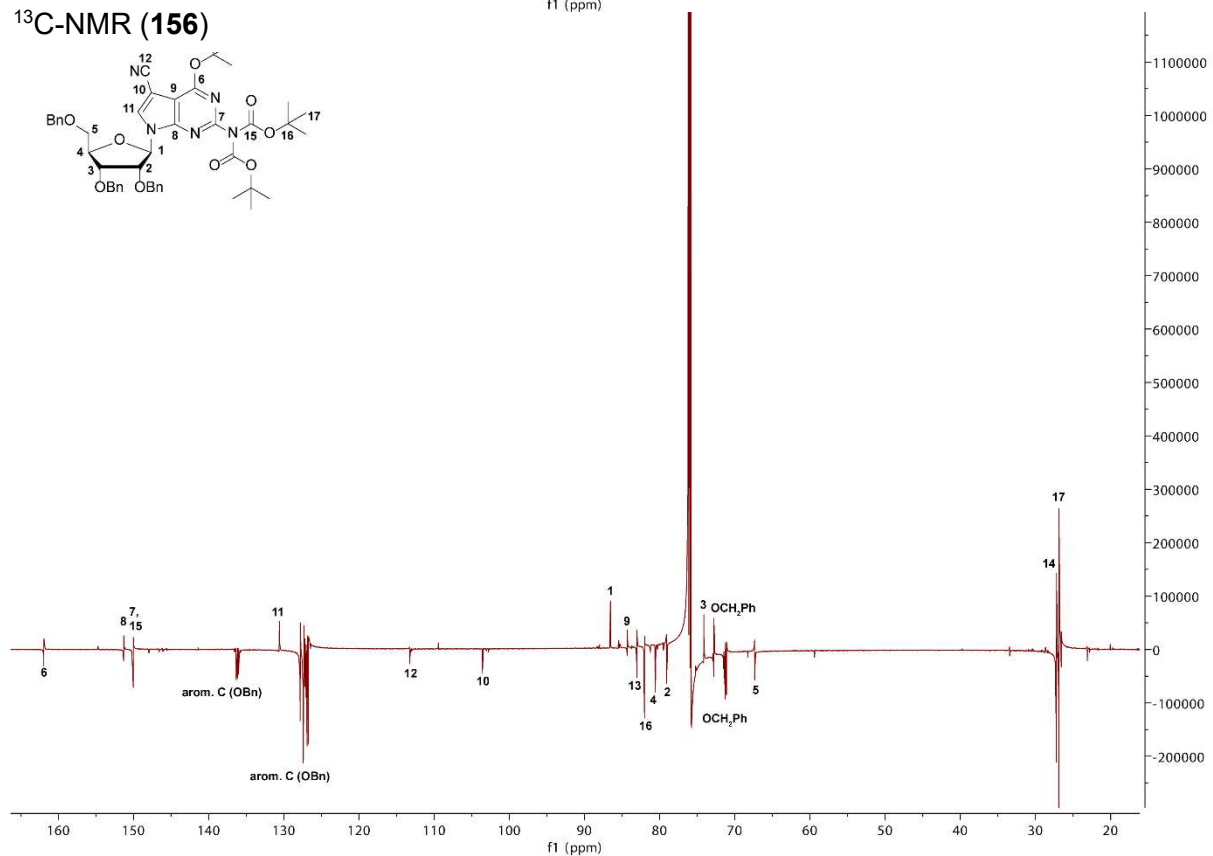
- 1 Thumbs, P. *et al.* Synthesis of Galactosyl-Queuosine and Distribution of Hypermodified Q-Nucleosides in Mouse Tissues. *Angew. Chem. Int. Ed.* **59**, 12352-12356, (2020).
- 2 Kang, B. *et al.* Carbohydrate-Based Nanocarriers Exhibiting Specific Cell Targeting with Minimum Influence from the Protein Corona. *Angew. Chem. Int. Ed.* **54**, 7436-7440, (2015).
- 3 Krumb, M., Lucas, T. & Opatz, T. Visible Light Enables Aerobic Iodine Catalyzed Glycosylation. *Eur. J. Org. Chem.* **2019**, 4517-4521, (2019).
- 4 Chevalier, R. *et al.* Synthetic yeast oligomannosides as biological probes: α -d-Manp (1 \rightarrow 3) α -d-Manp (1 \rightarrow 2) α -d-Manp and α -d-Manp (1 \rightarrow 3) α -d-Manp (1 \rightarrow 2) α -d-Manp (1 \rightarrow 2) α -d-Manp as Crohn's disease markers. *Tetrahedron* **61**, 7669-7677, (2005).
- 5 Crich, D. & Li, H. Synthesis of the Salmonella Type E1Core Trisaccharide as a Probe for the Generality of 1-(Benzenesulfinyl)piperidine/Triflic Anhydride Combination for Glycosidic Bond Formation from Thioglycosides. *J. Am. Chem. Soc.* **67**, 4640-4646, (2002).
- 6 Montenegro, J., Reina, J. & Rioboo, A. Glycosyl Aldehydes: New Scaffolds for the Synthesis of Neoglycoconjugates via Bioorthogonal Oxime Bond Formation. *Synthesis* **50**, 831-845, (2018).
- 7 Burgula, S., Swarts, B. M. & Guo, Z. Total Synthesis of a Glycosylphosphatidylinositol Anchor of the Human Lymphocyte CD52 Antigen. *Chem. Eur. J.* **18**, 1194-1201, (2012).

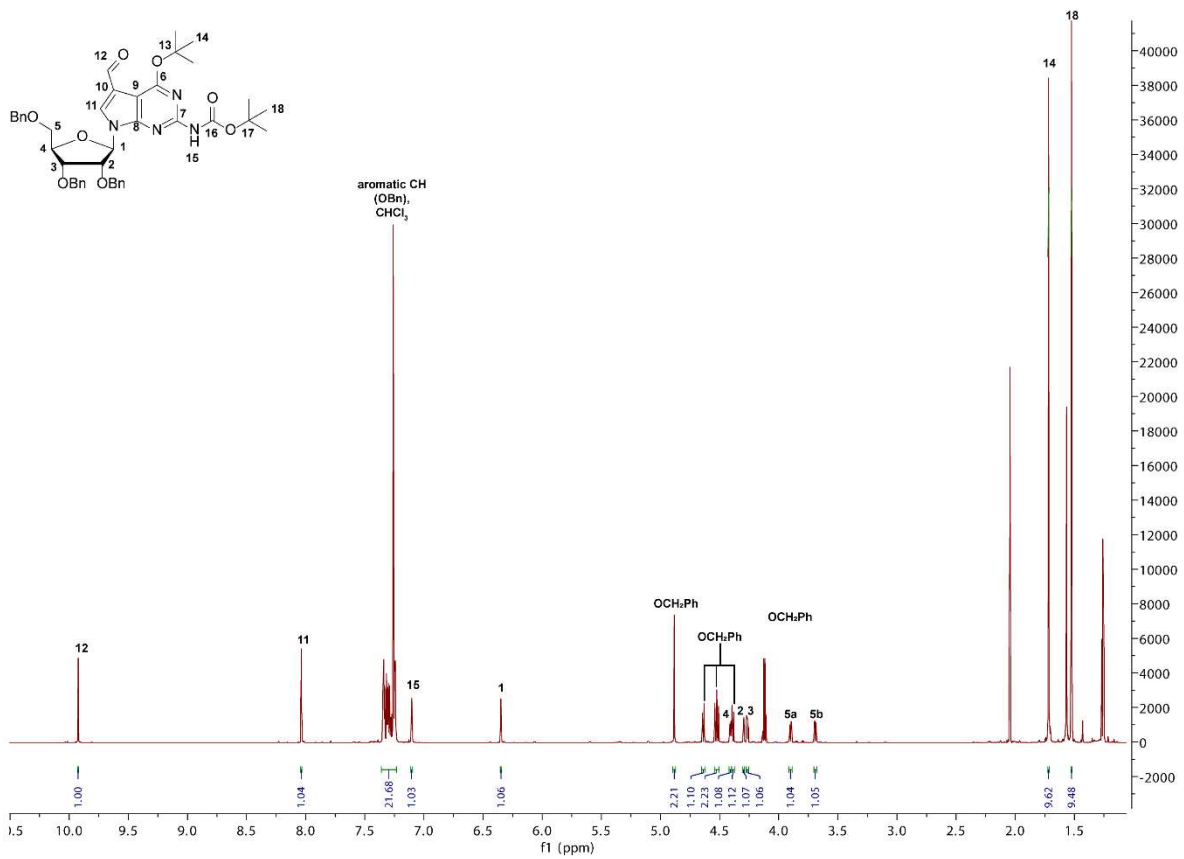
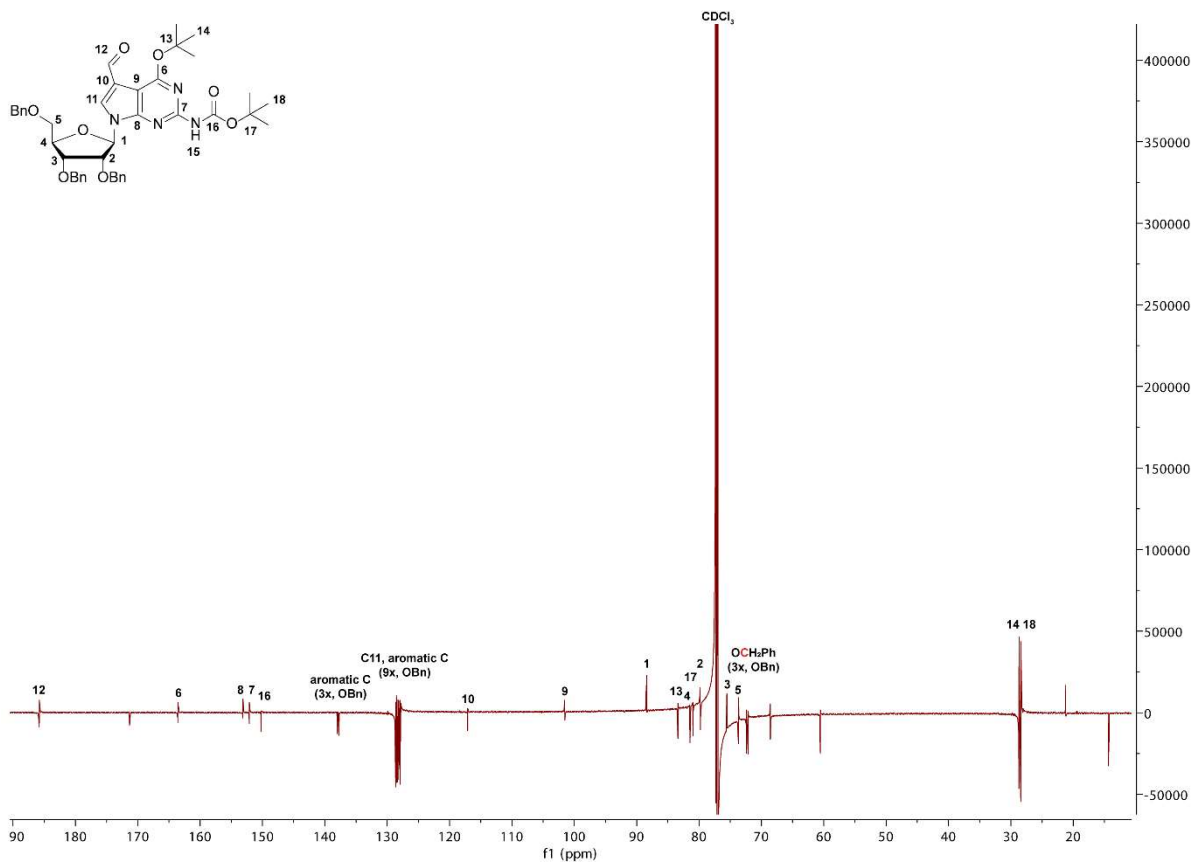
7.3 NMR-Spektren von Glutamy-Queuosin-Derivaten und Vorläufern

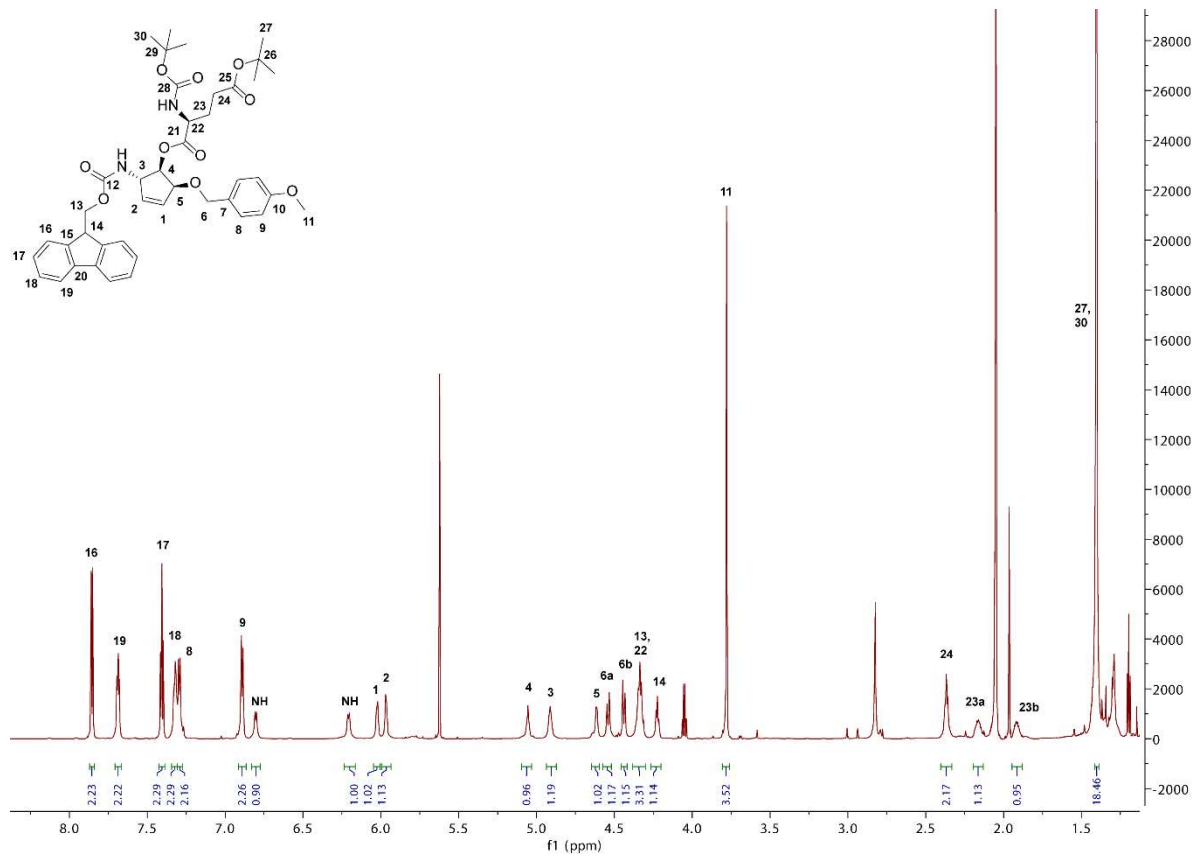
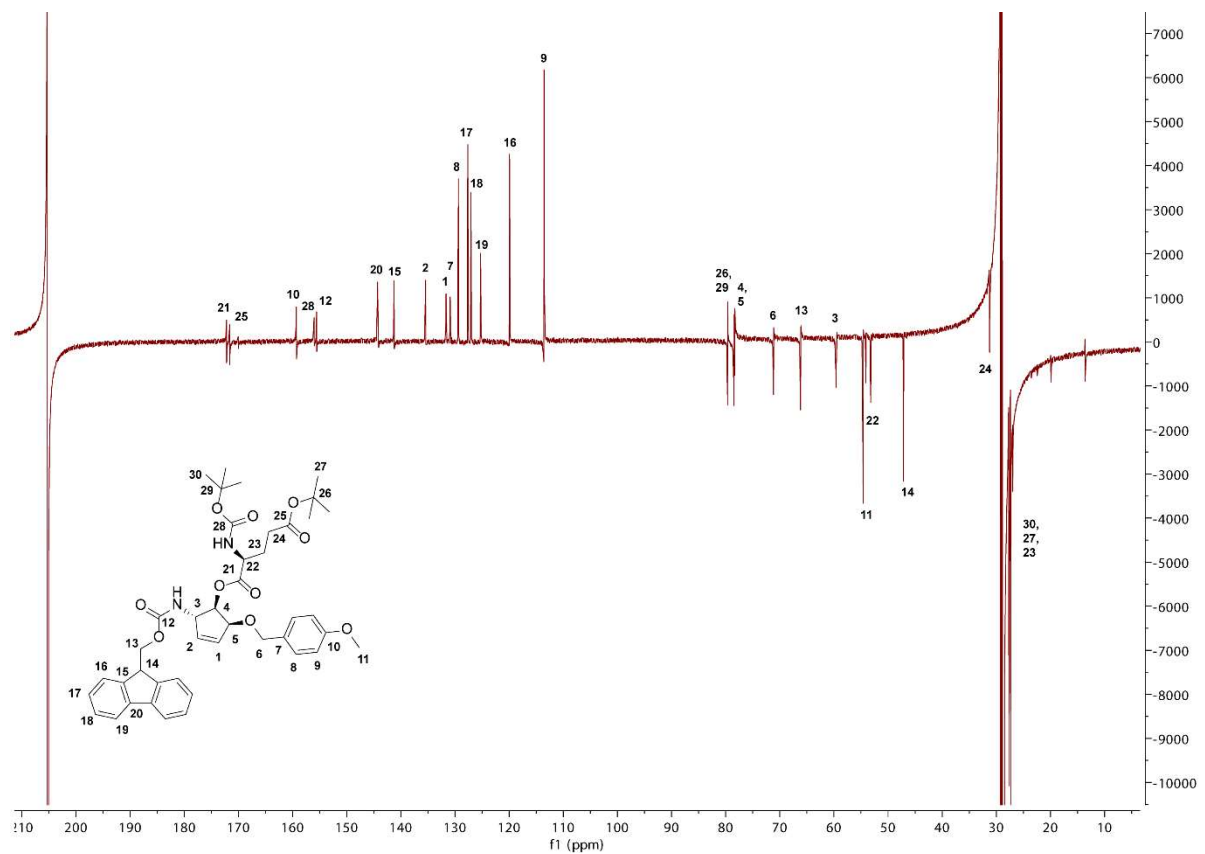
$^1\text{H-NMR}$ (156)



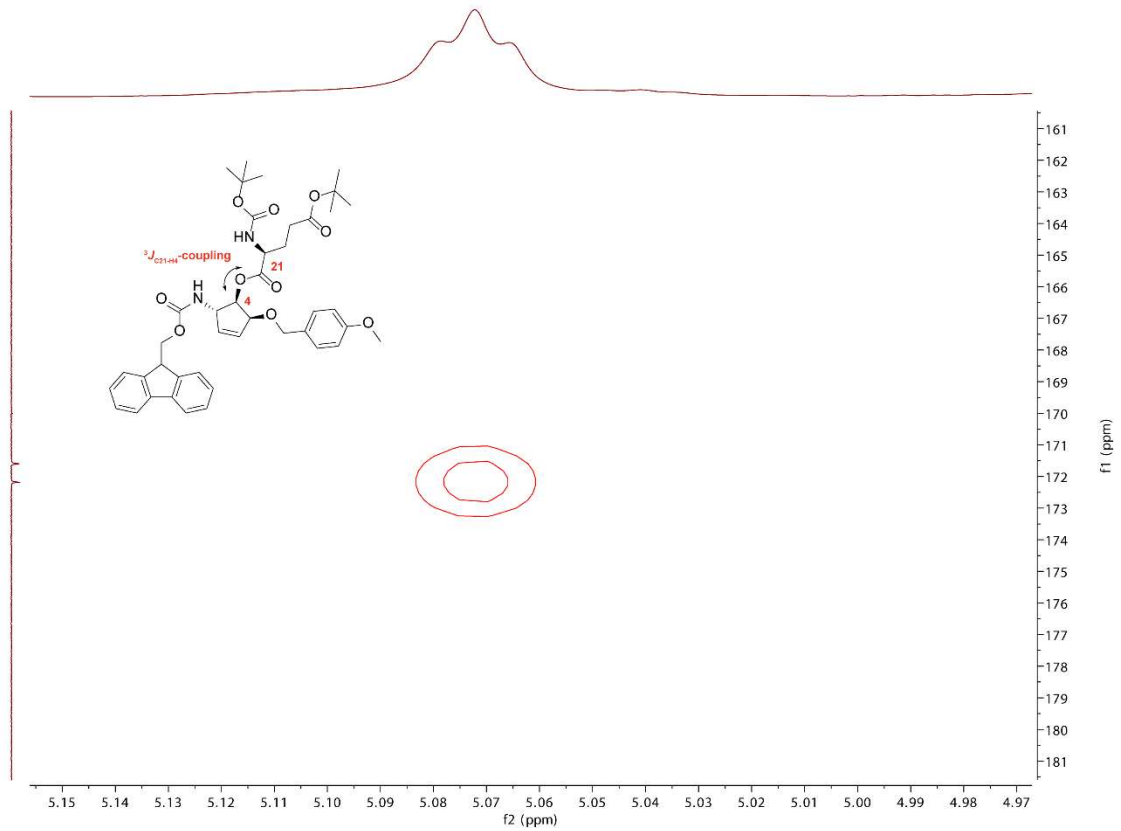
$^{13}\text{C-NMR}$ (156)



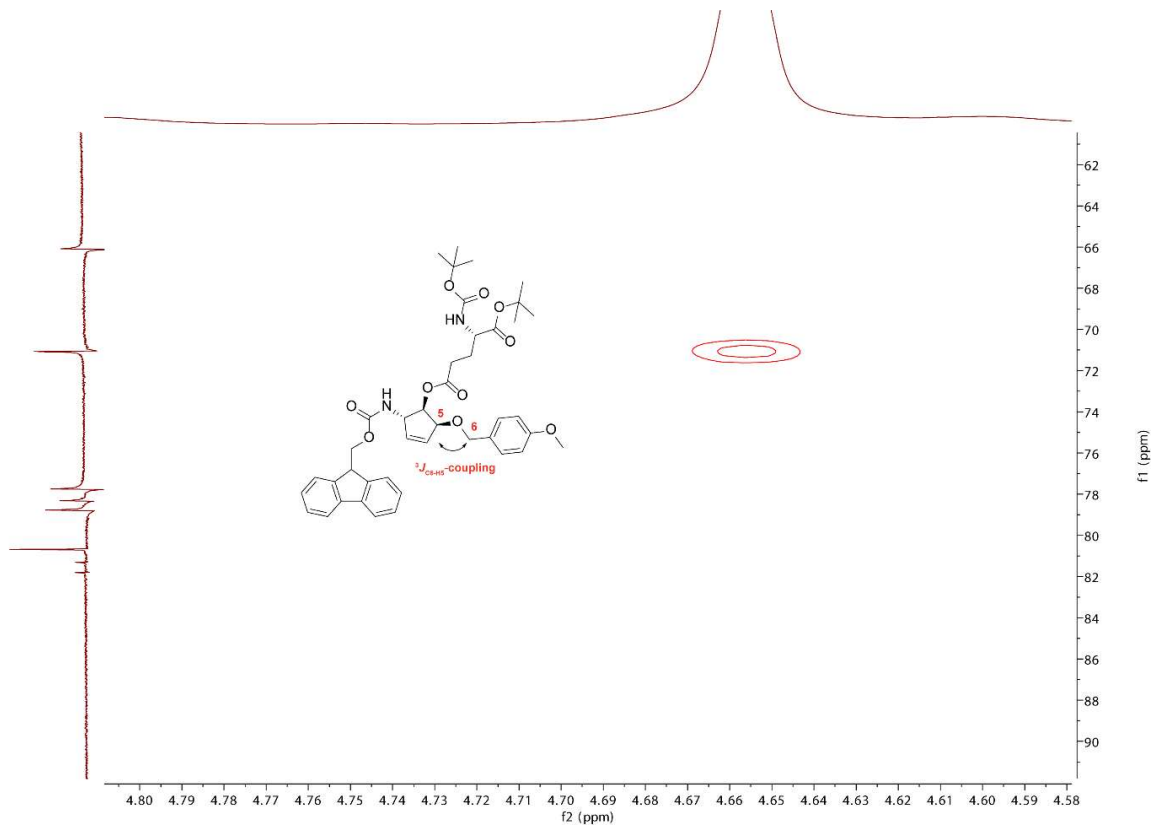
¹H-NMR (133)¹³C-NMR (13)

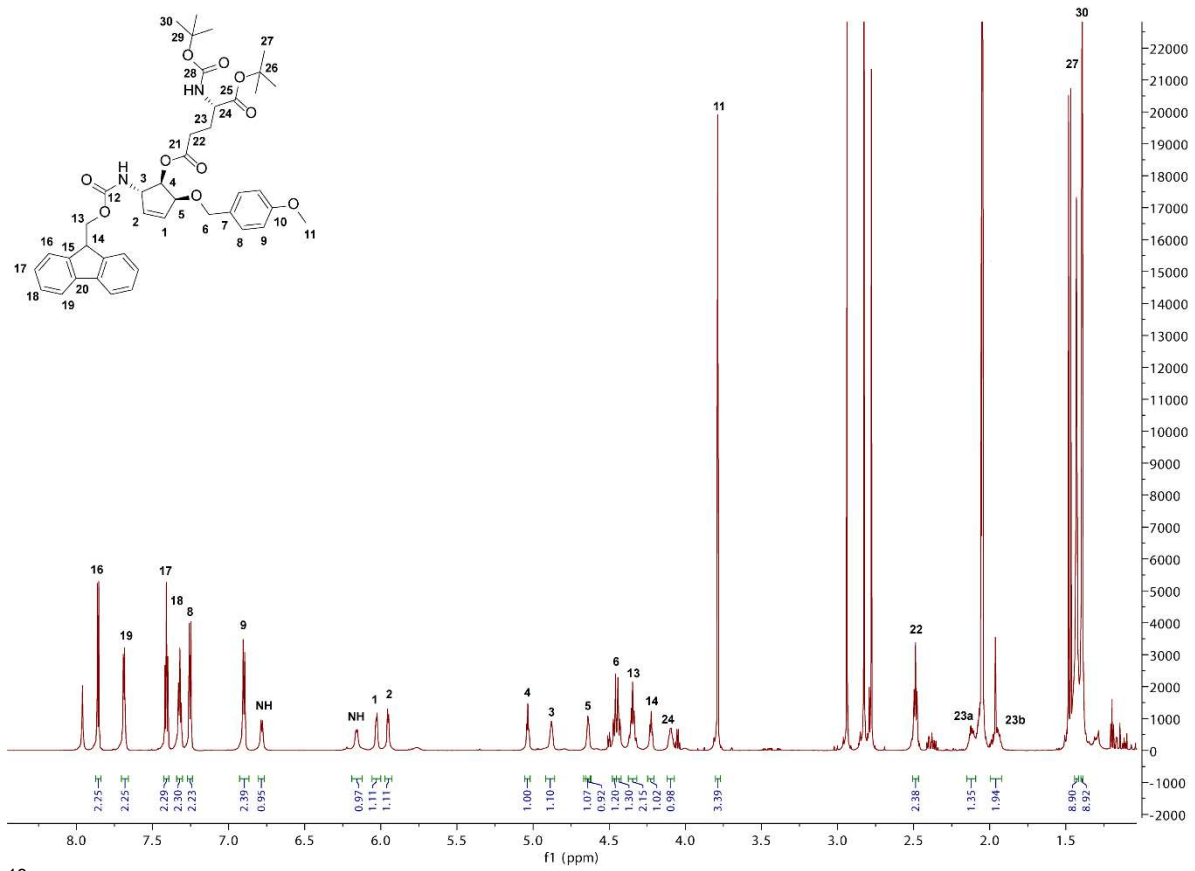
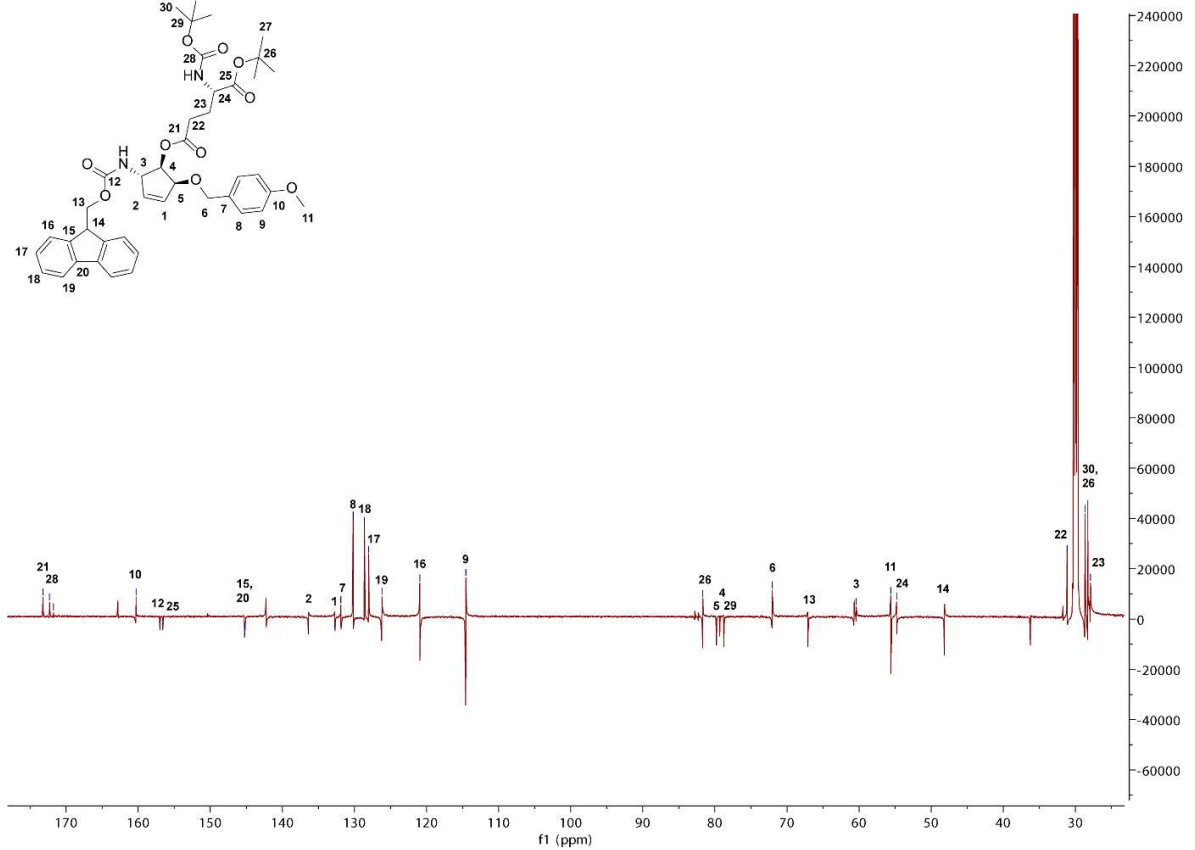
¹H-NMR (159)**¹³C-NMR (159)**

HMBC (159), welches den C4H-C21-crosspeak zeigt

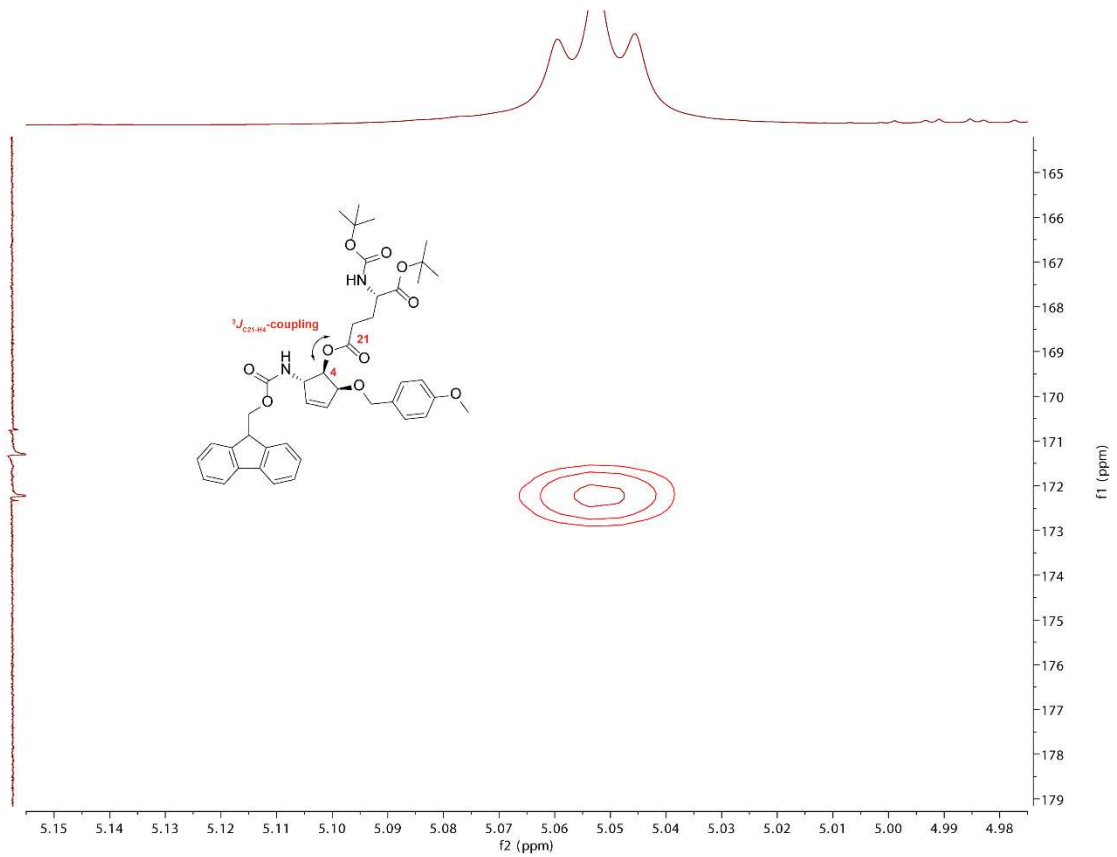


HMBC (159) welches den C5H-C6-crosspeak zeigt

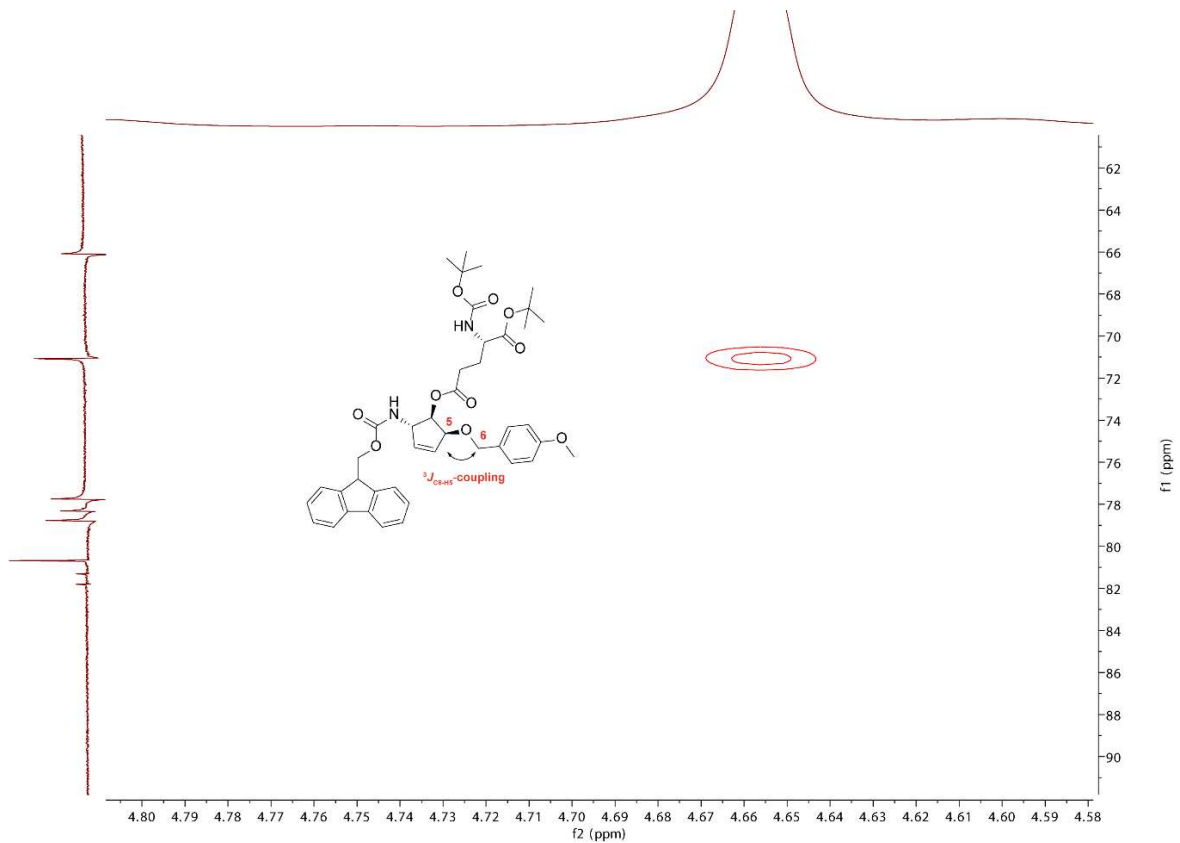


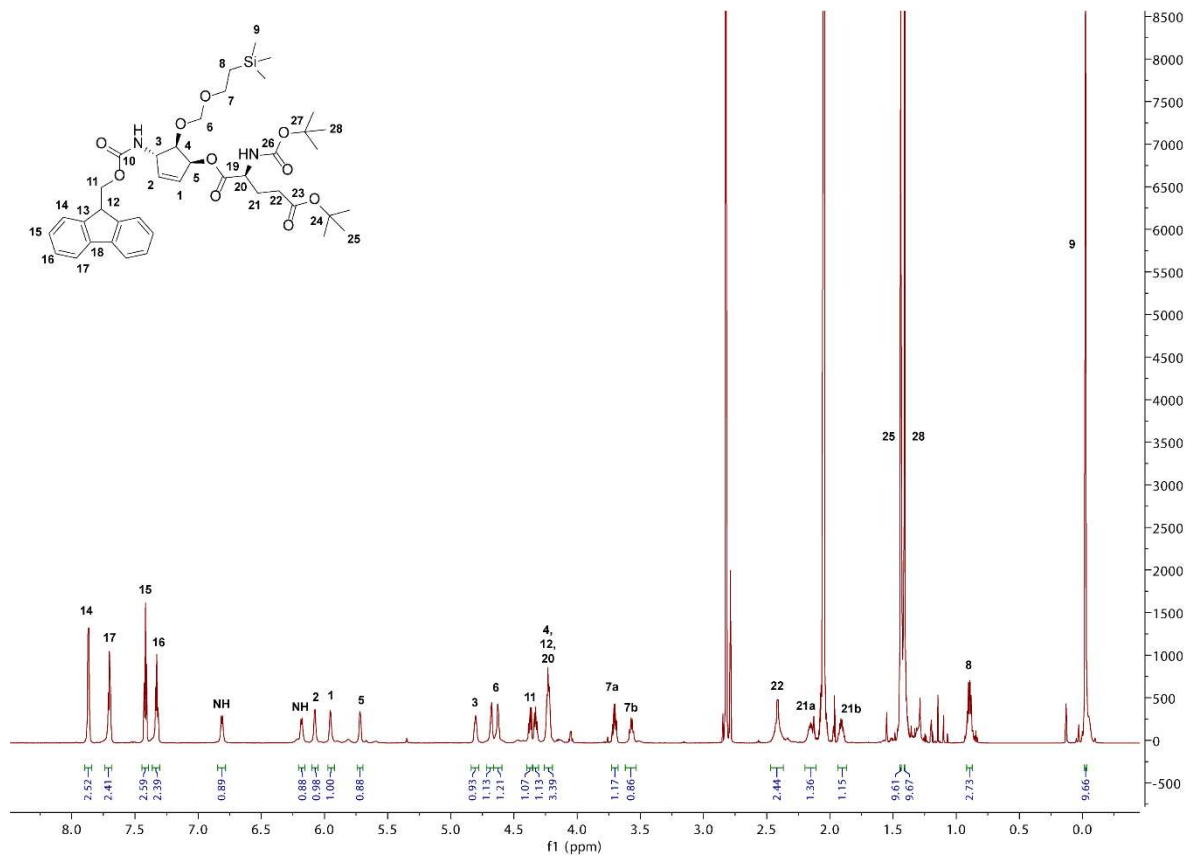
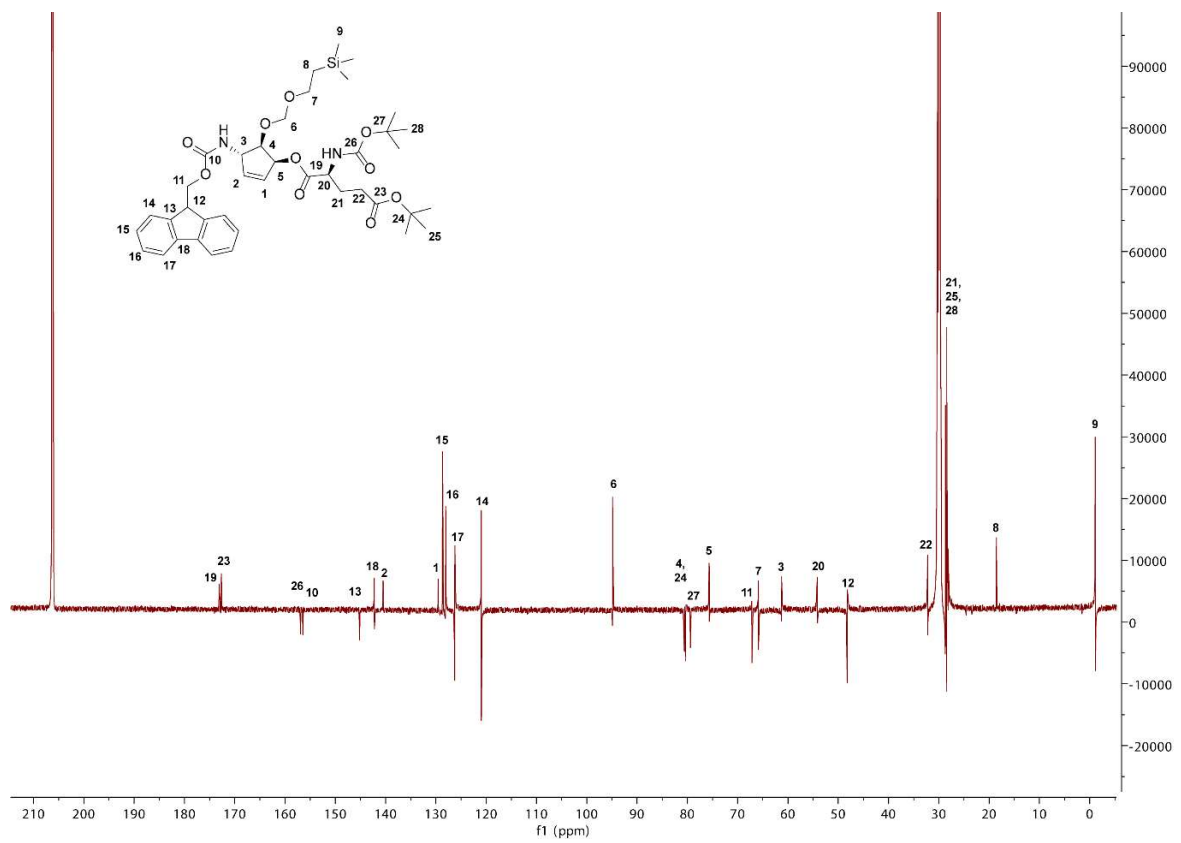
¹H-NMR (168)**¹³C-NMR (168)**

HMBC (168), welches den C4H-C21-crosspeak zeigt

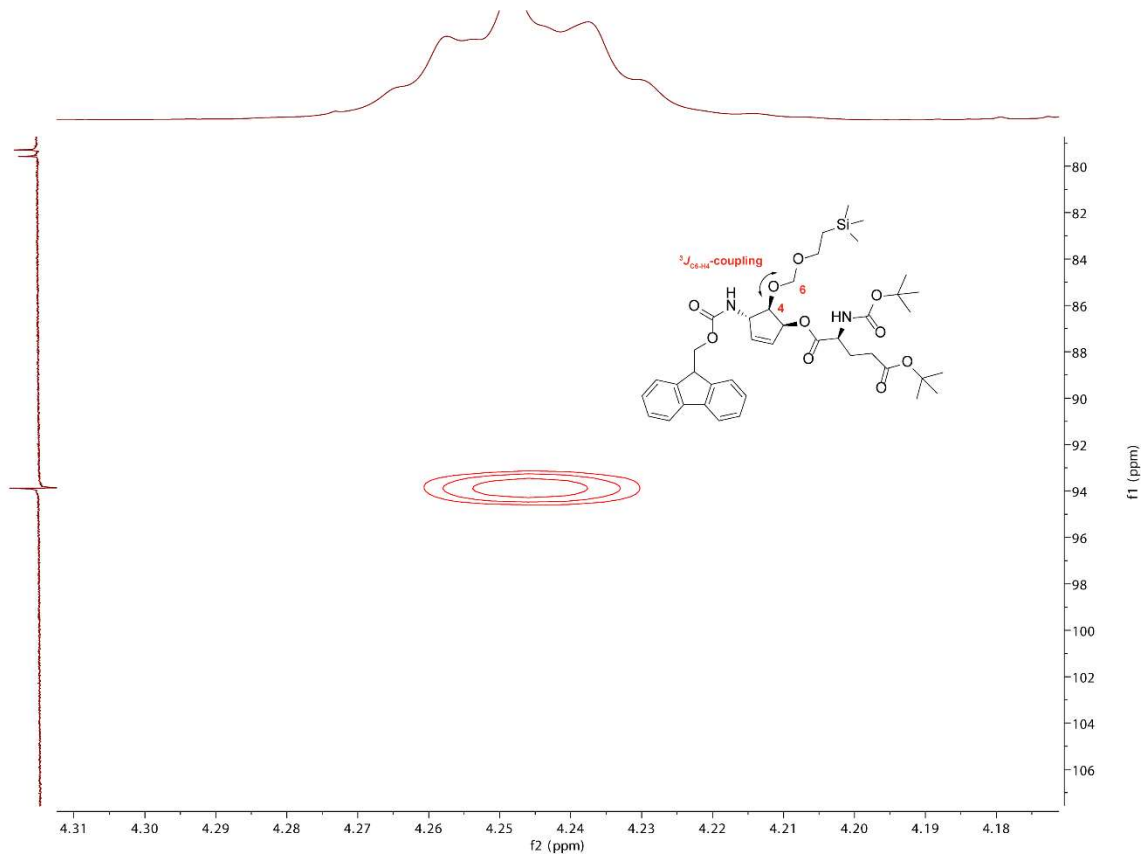


HMBC (168), welches den C5H-C6-crosspeak zeigt

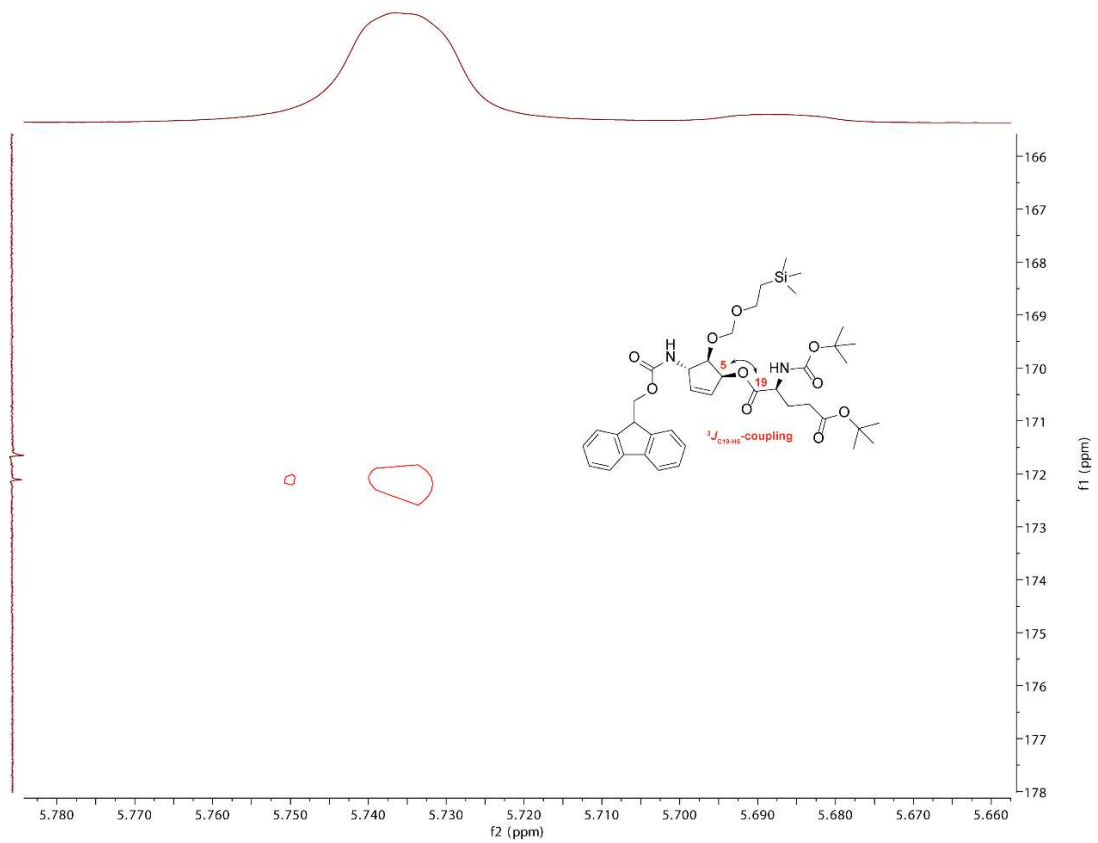


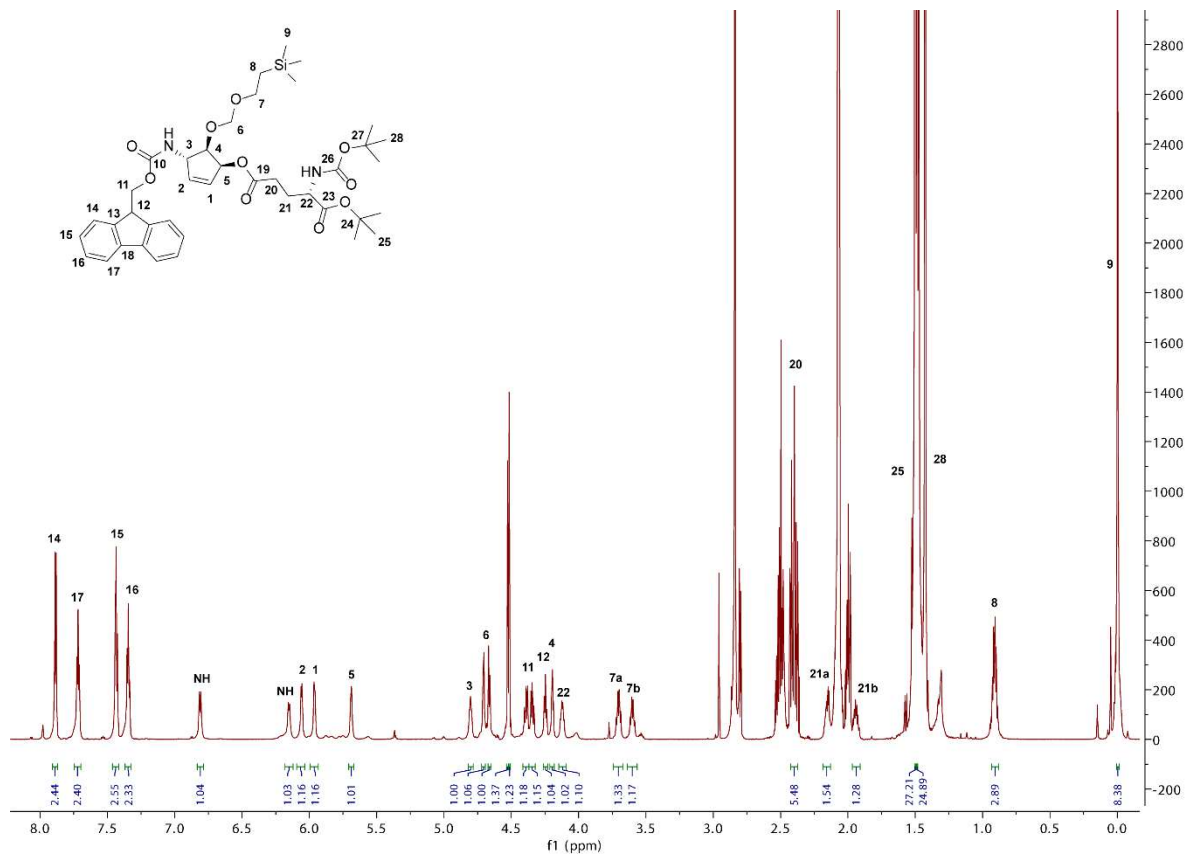
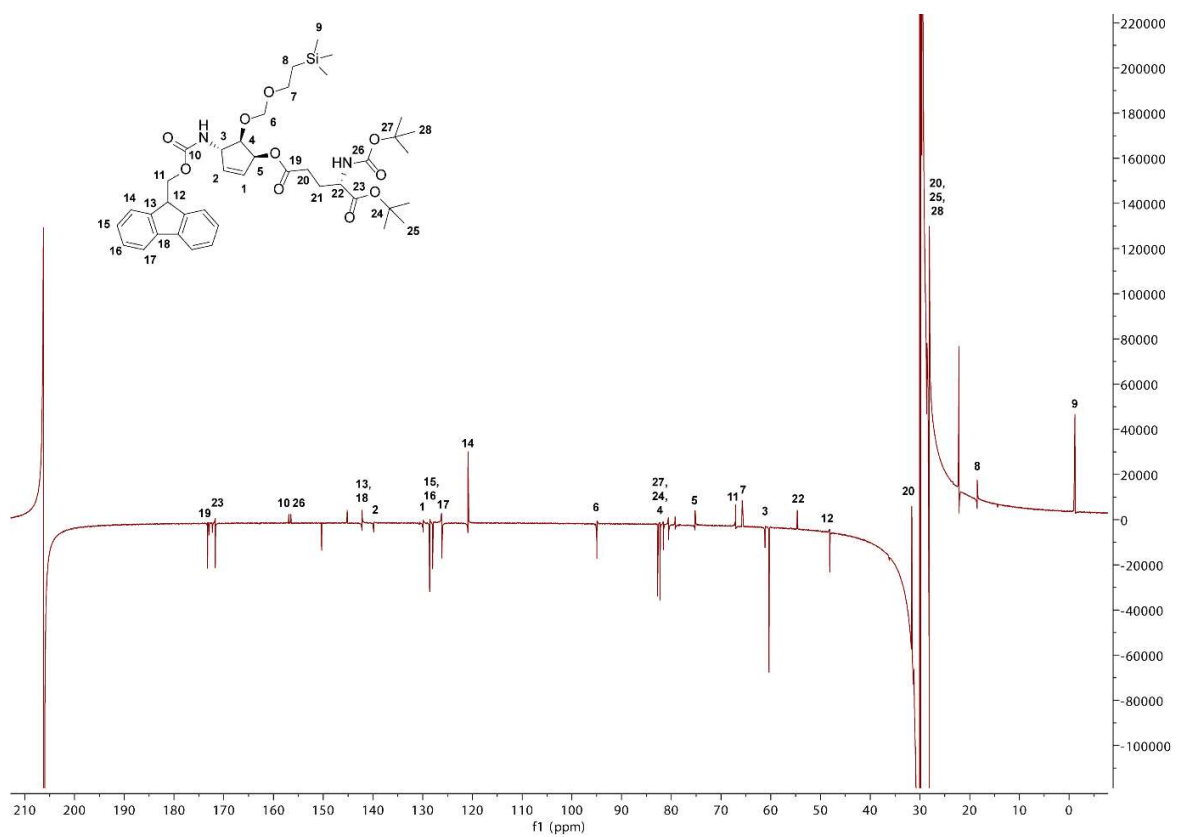
¹H-NMR (162)**¹³C-NMR (162)**

HMBC (162), welches den C4H-C6-crosspeak zeigt

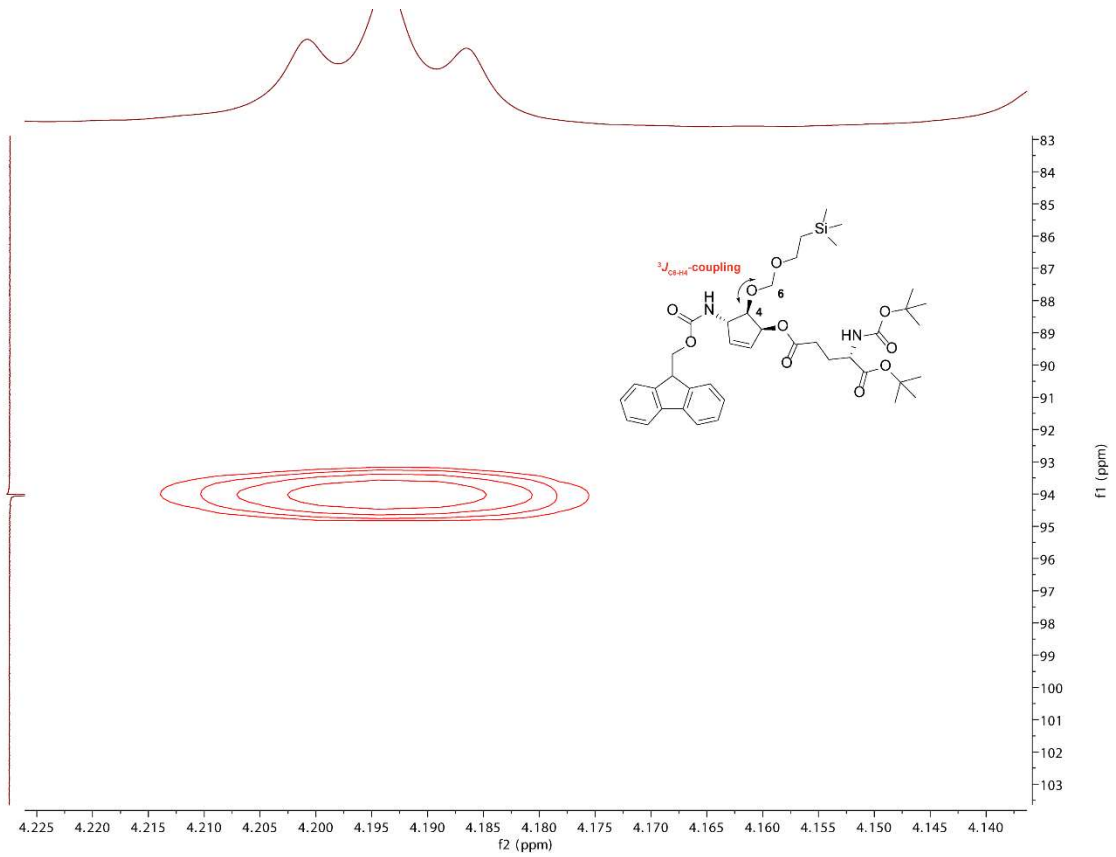


HMBC (162), welches den C4H-C19-crosspeak zeigt

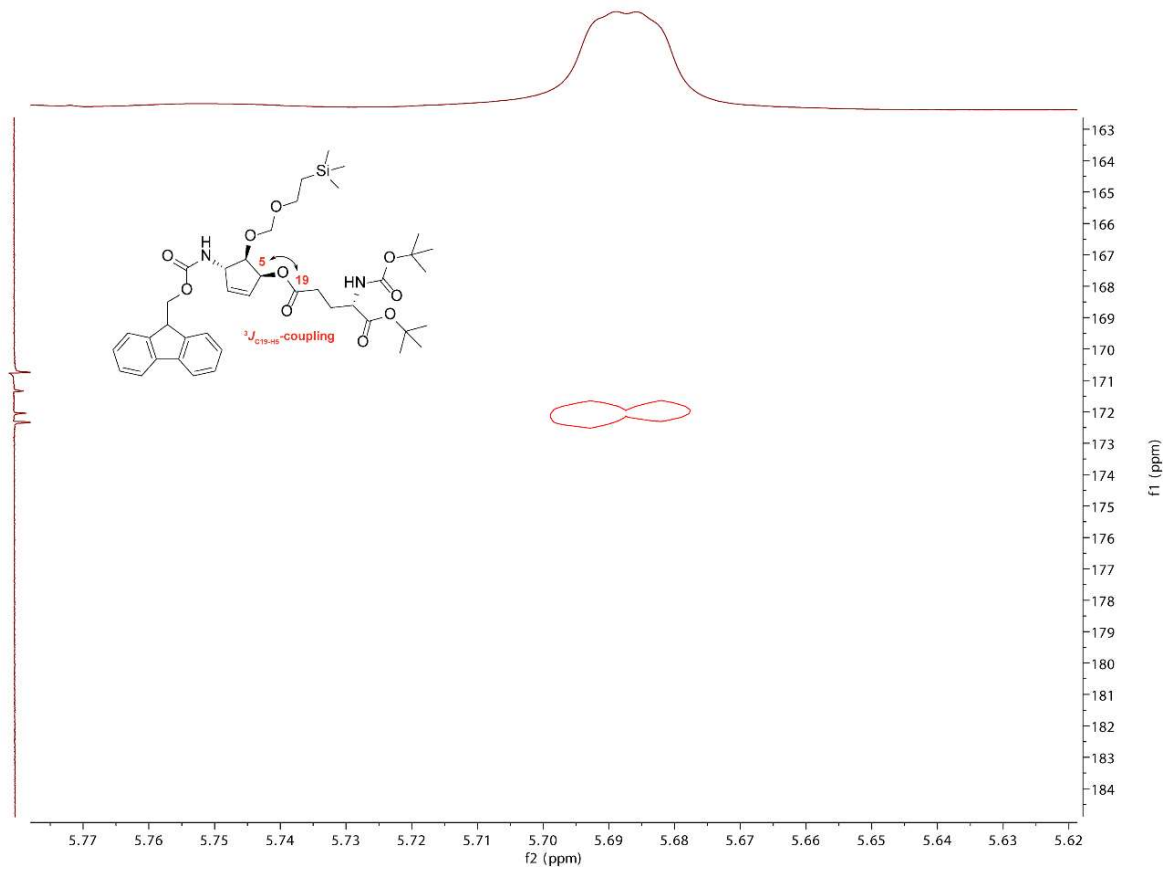


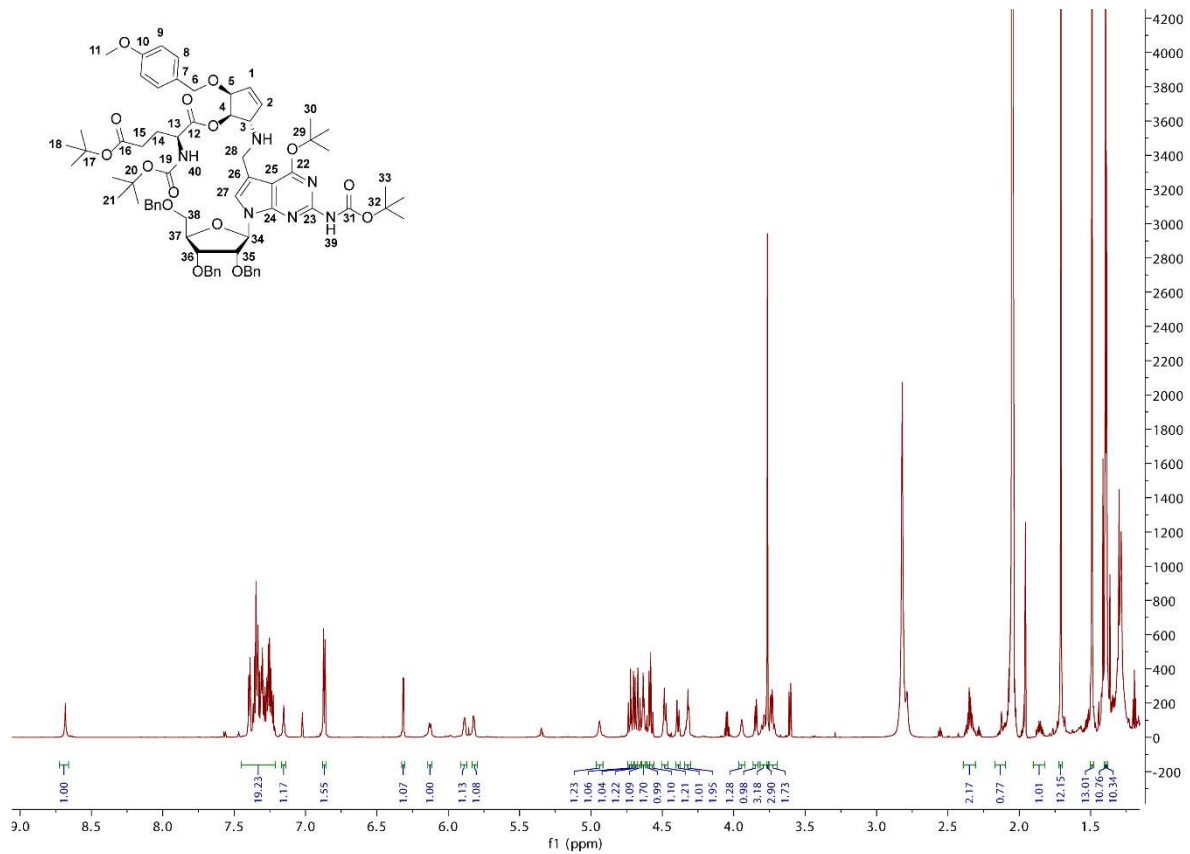
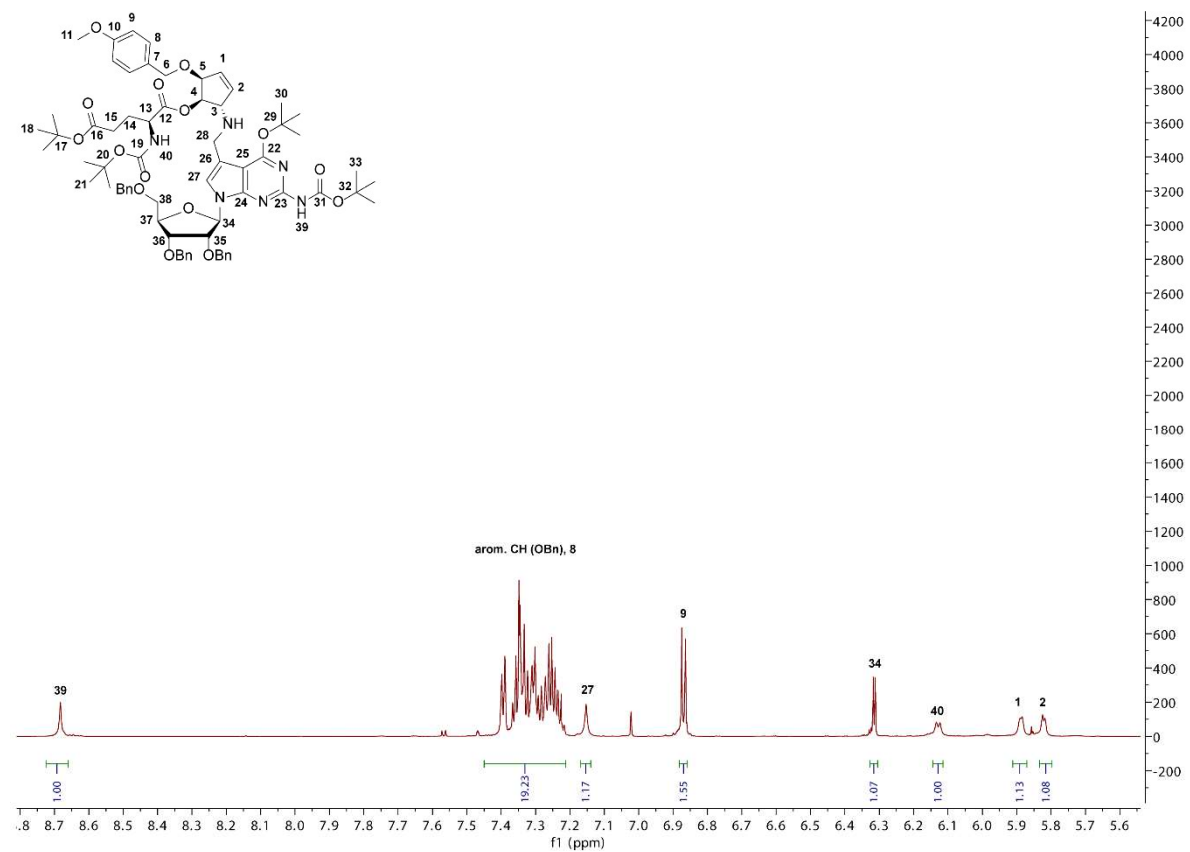
¹H-NMR (171)¹³C-NMR (171)

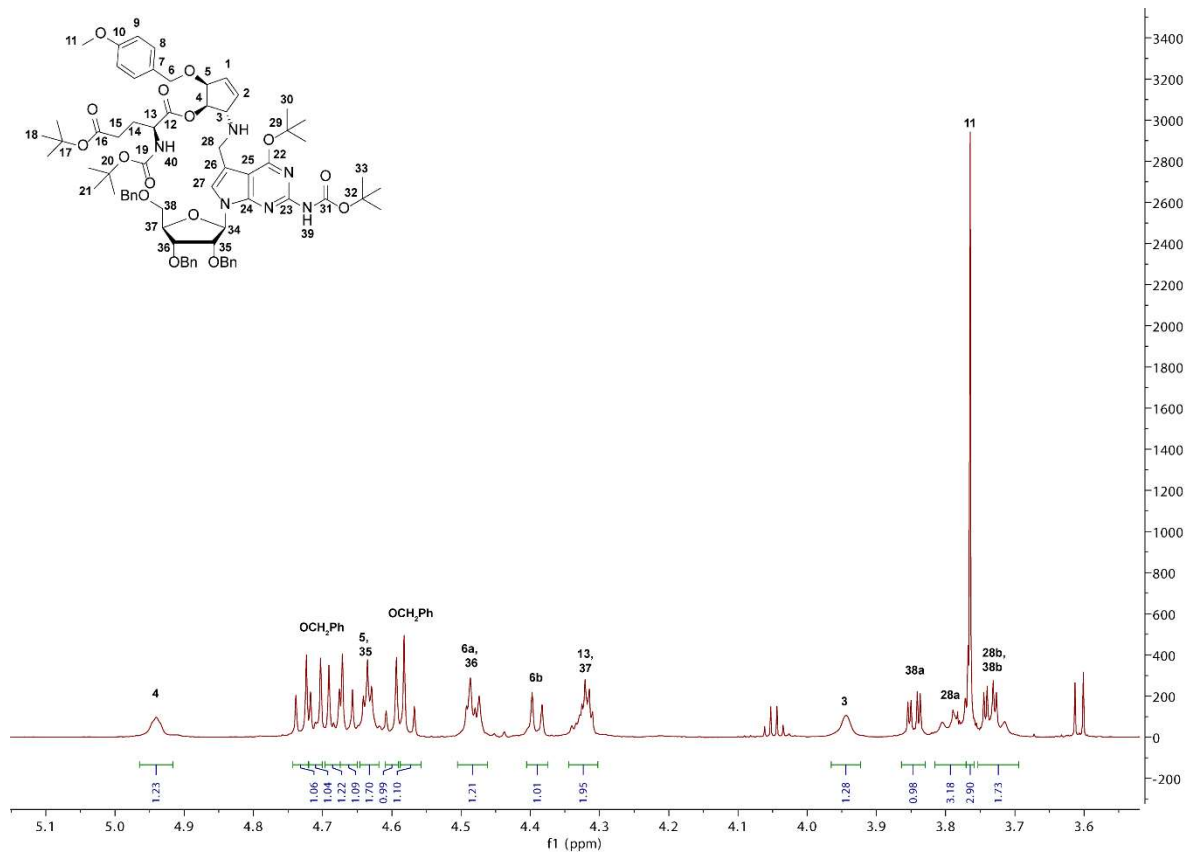
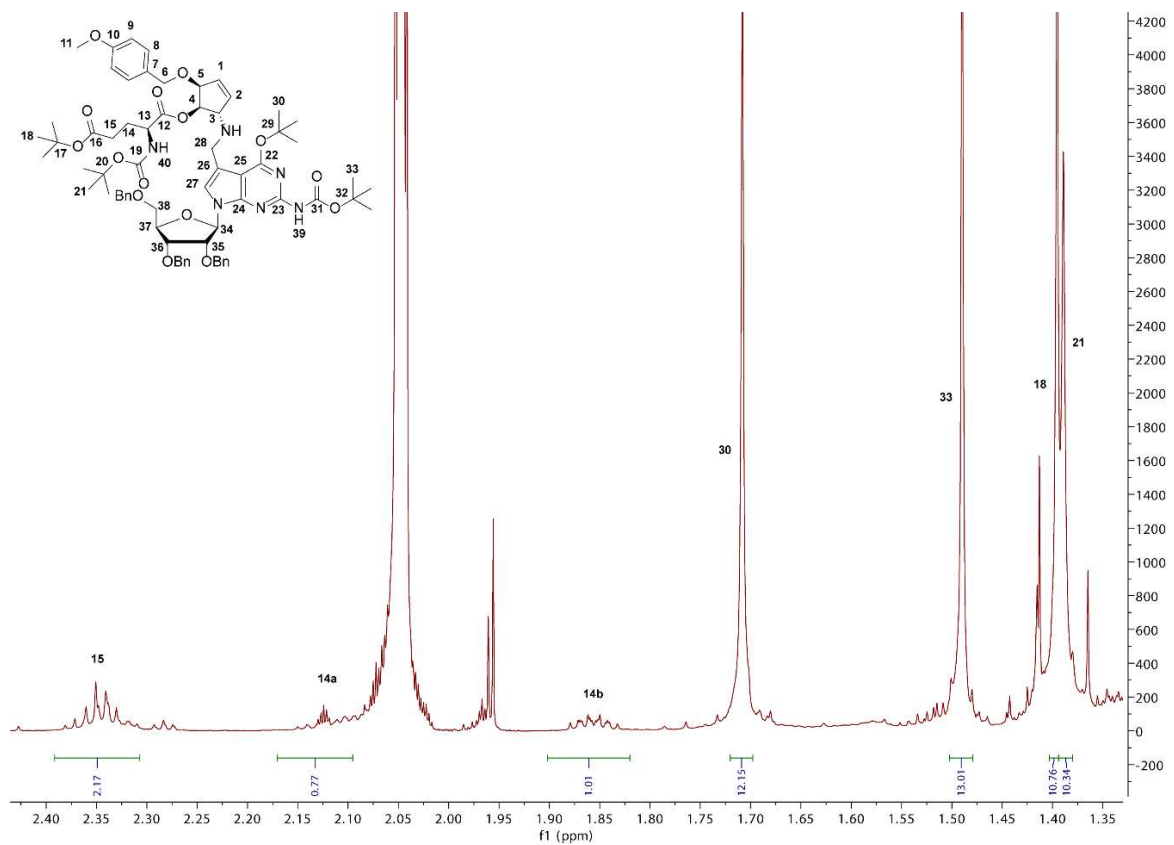
HMBC (171), welches den C4H-C6-crosspeak zeigt



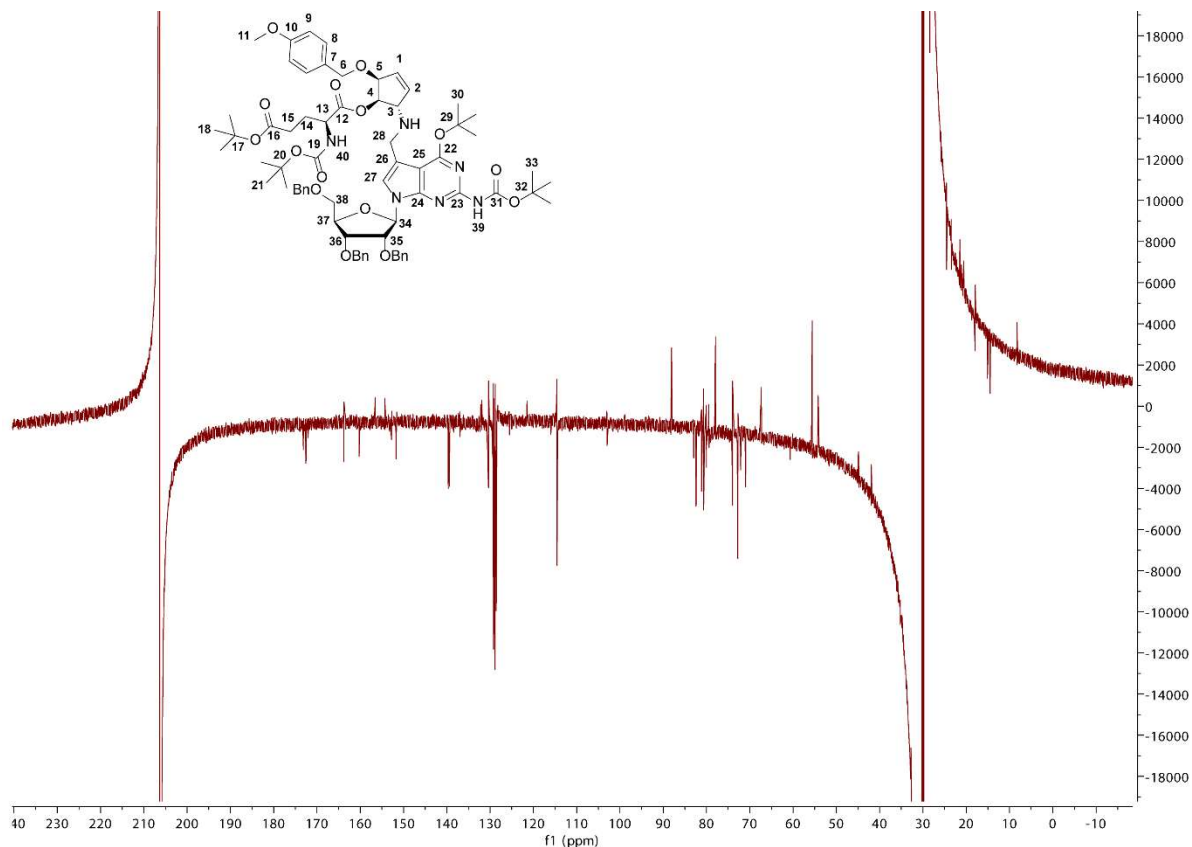
HMBC (171), welches den C5H-C19-crosspeak zeigt



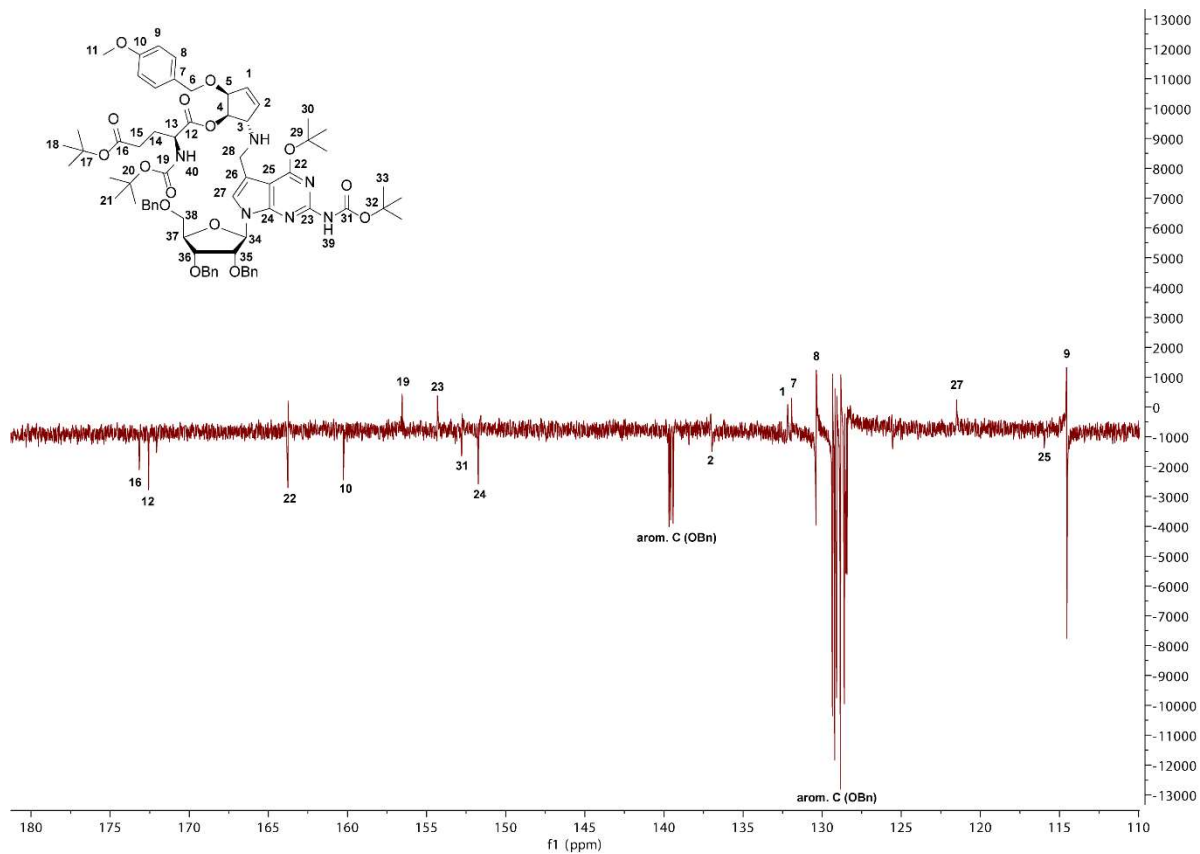
$^1\text{H-NMR}$ (161) $^1\text{H-NMR}$ (161) – Zoom auf den oberen Bereich

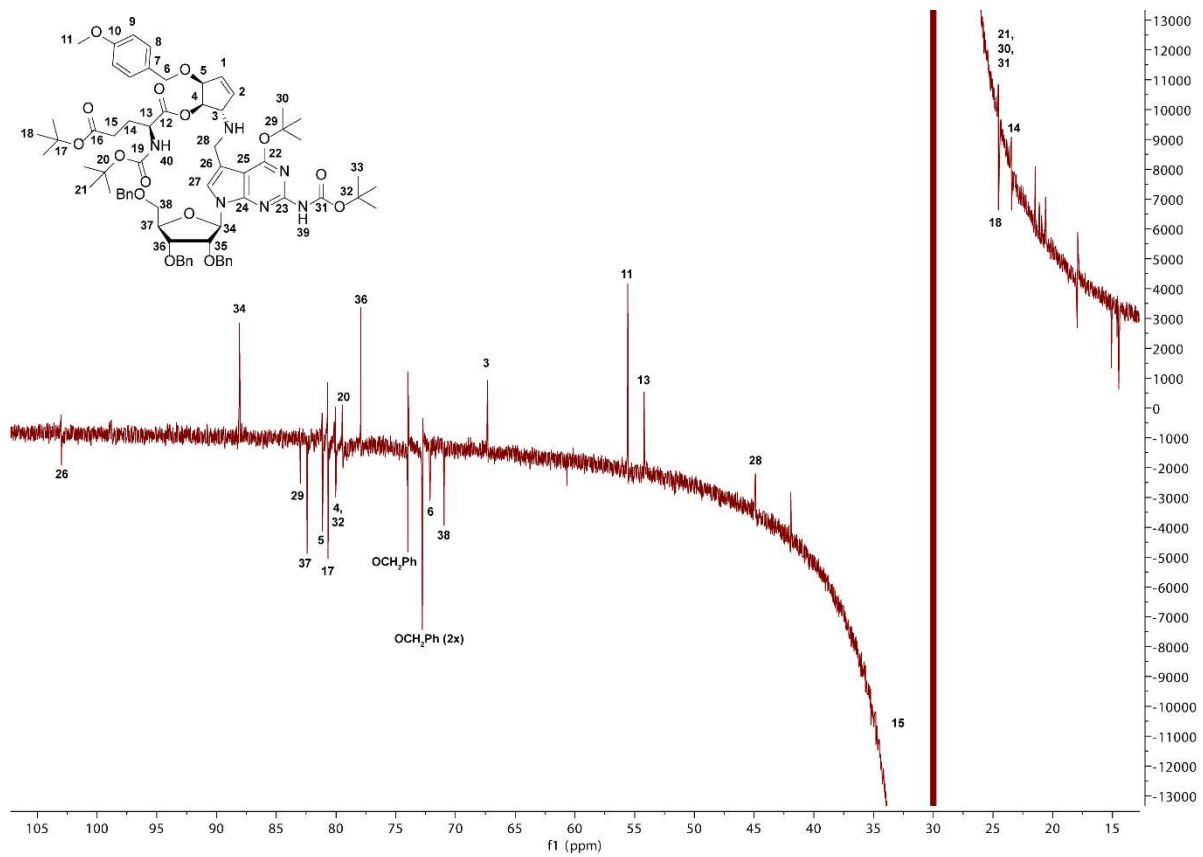
$^1\text{H-NMR}$ (161) – Zoom auf den mittleren Bereich $^1\text{H-NMR}$ (161) – Zoom auf den unteren Bereich

¹³C-NMR (161)

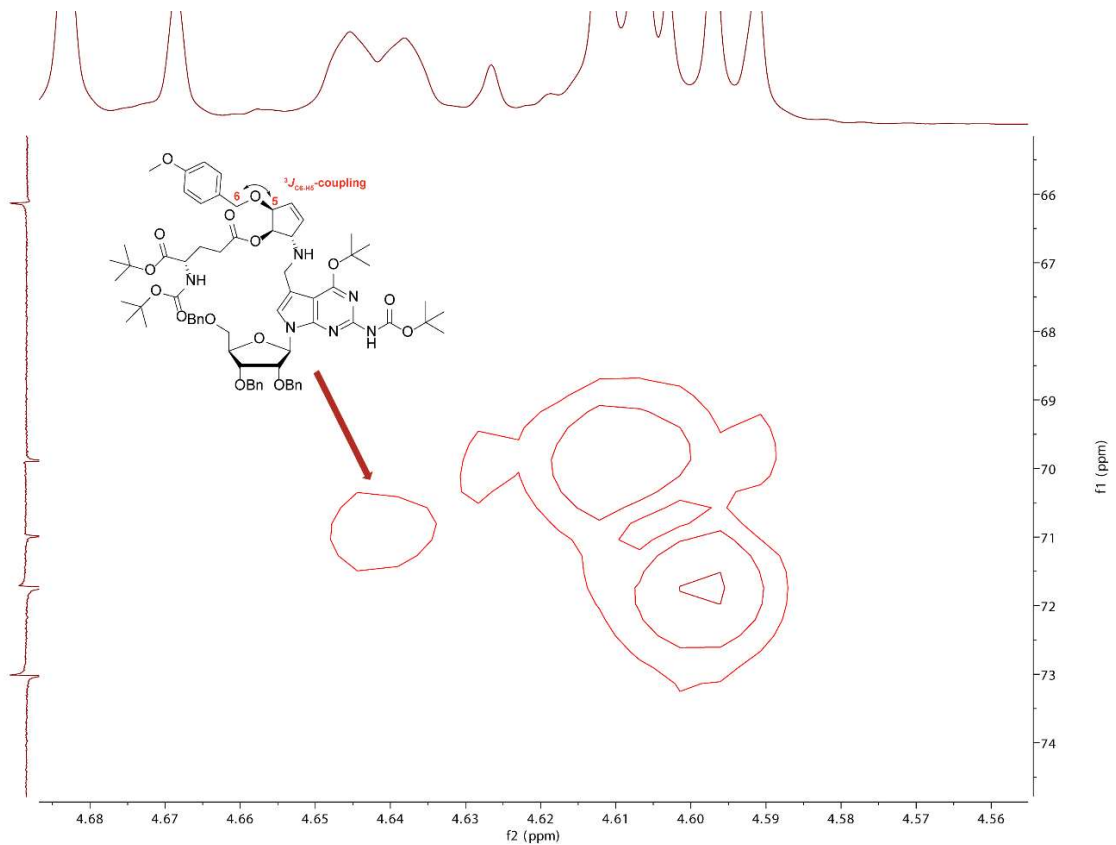


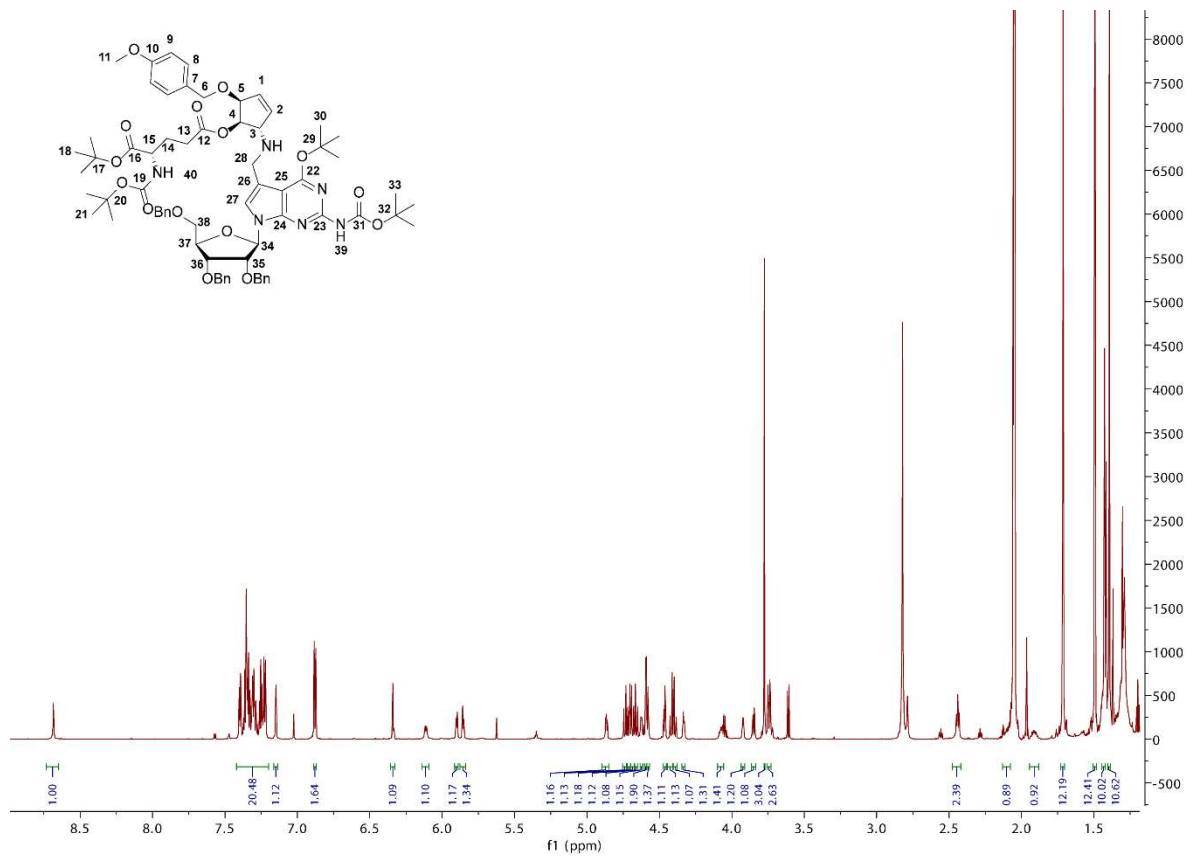
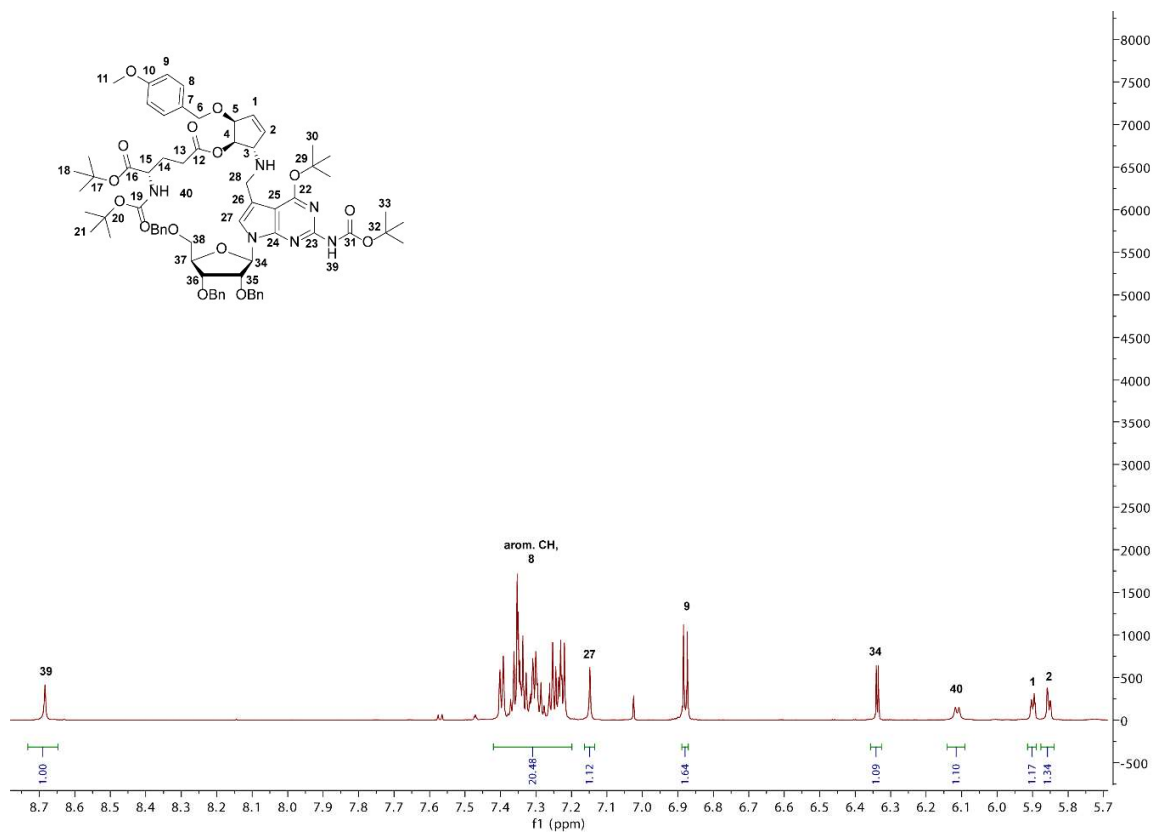
¹³C-NMR (161) – Zoom auf den oberen Bereich

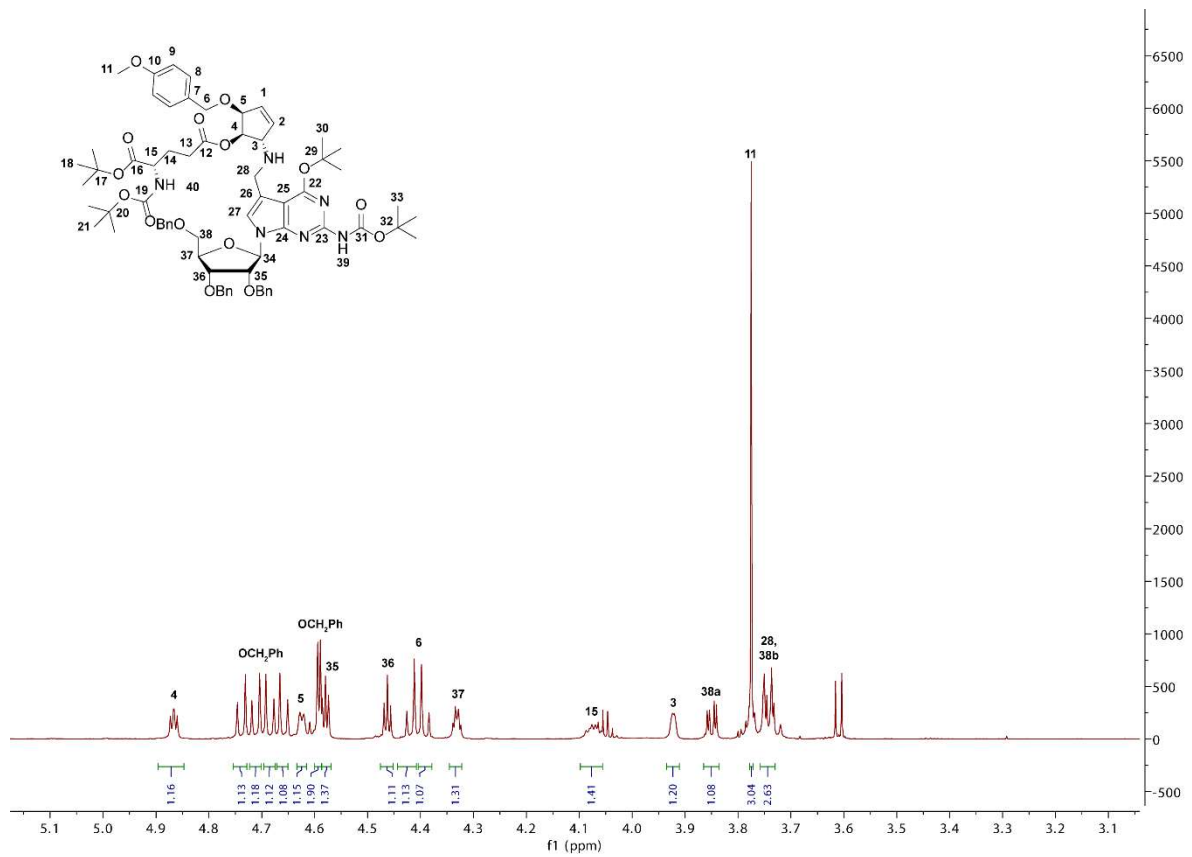
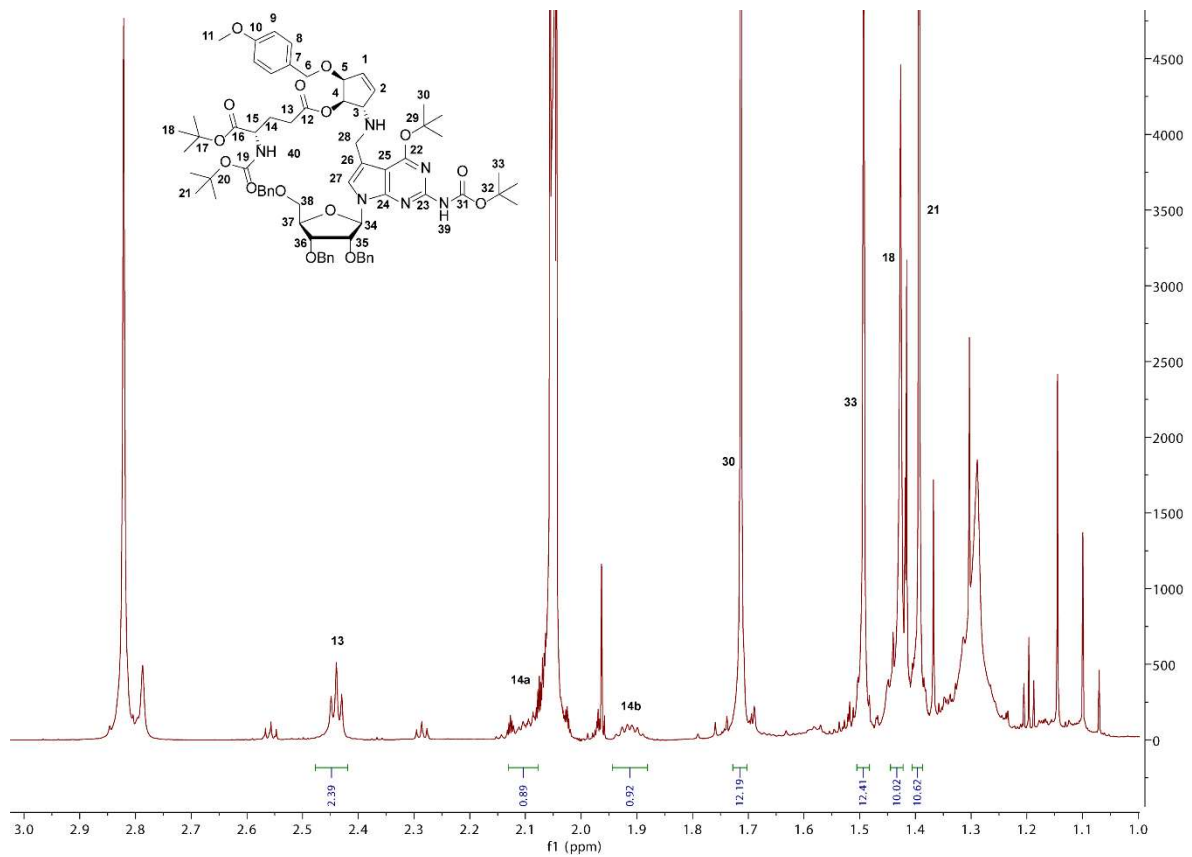


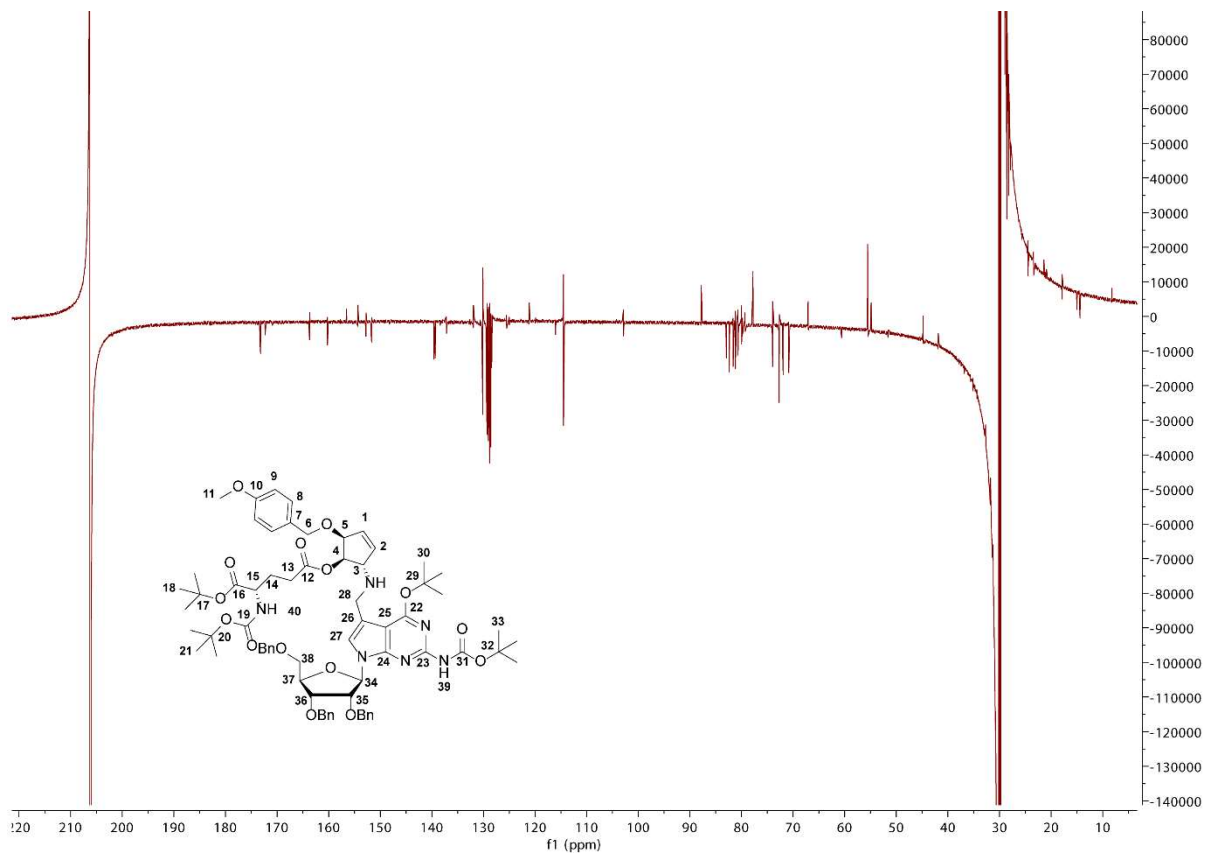
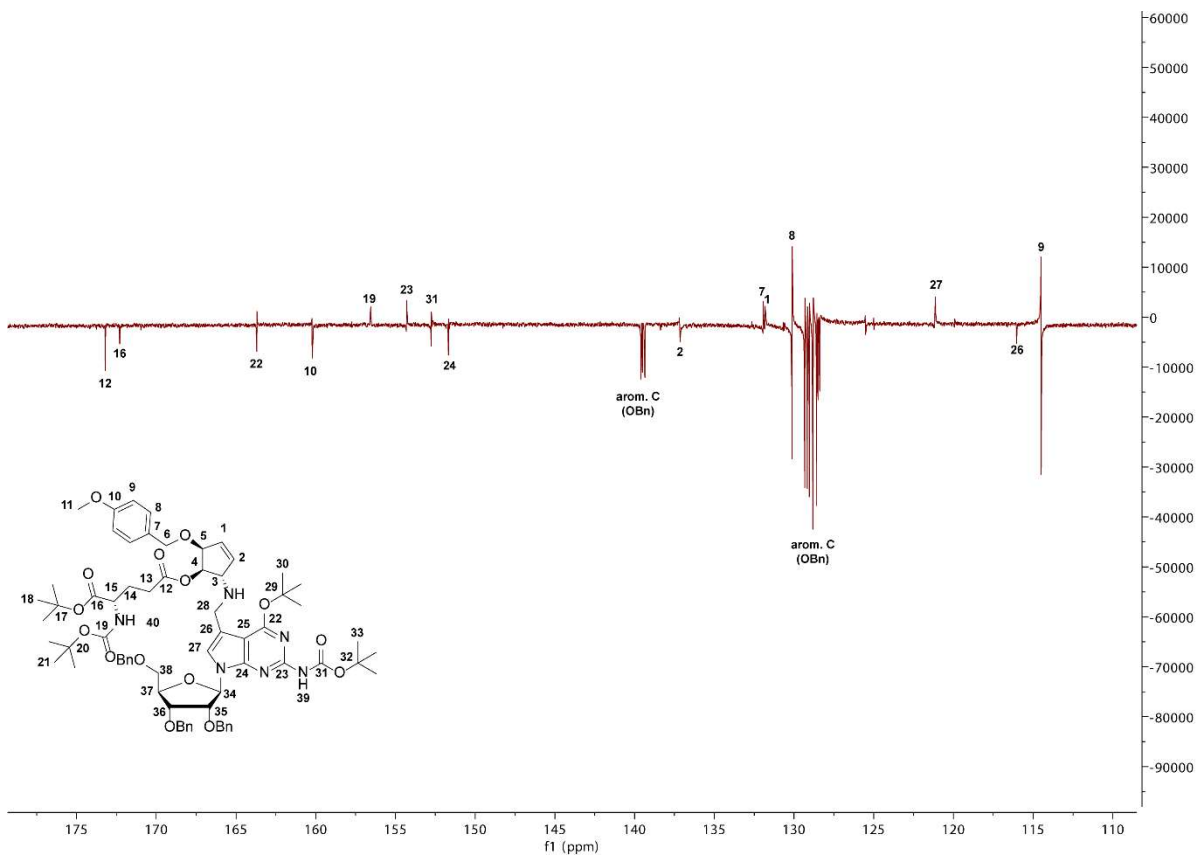
$^{13}\text{C-NMR}$ (161) – Zoom auf den unteren Bereich

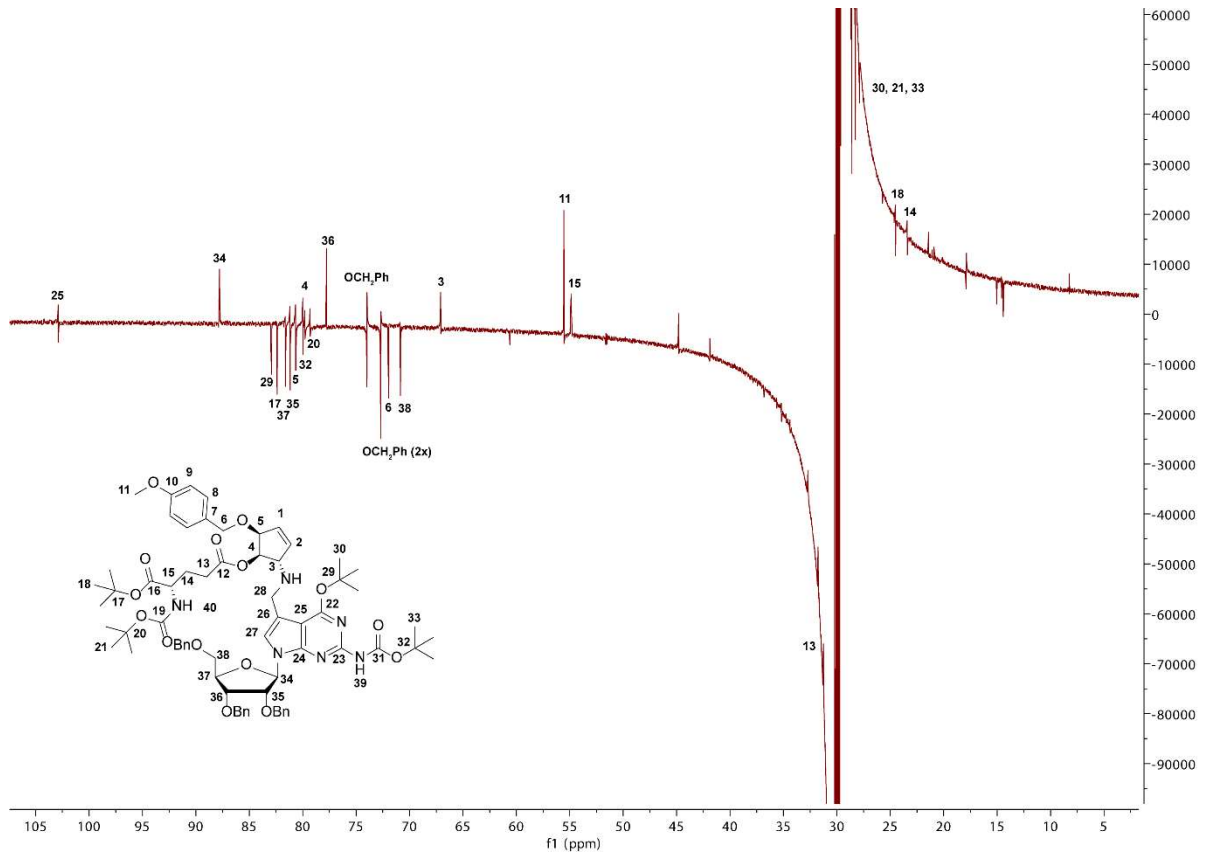
HMBC (161), welches den C5H-C6-crosspeak zeigt



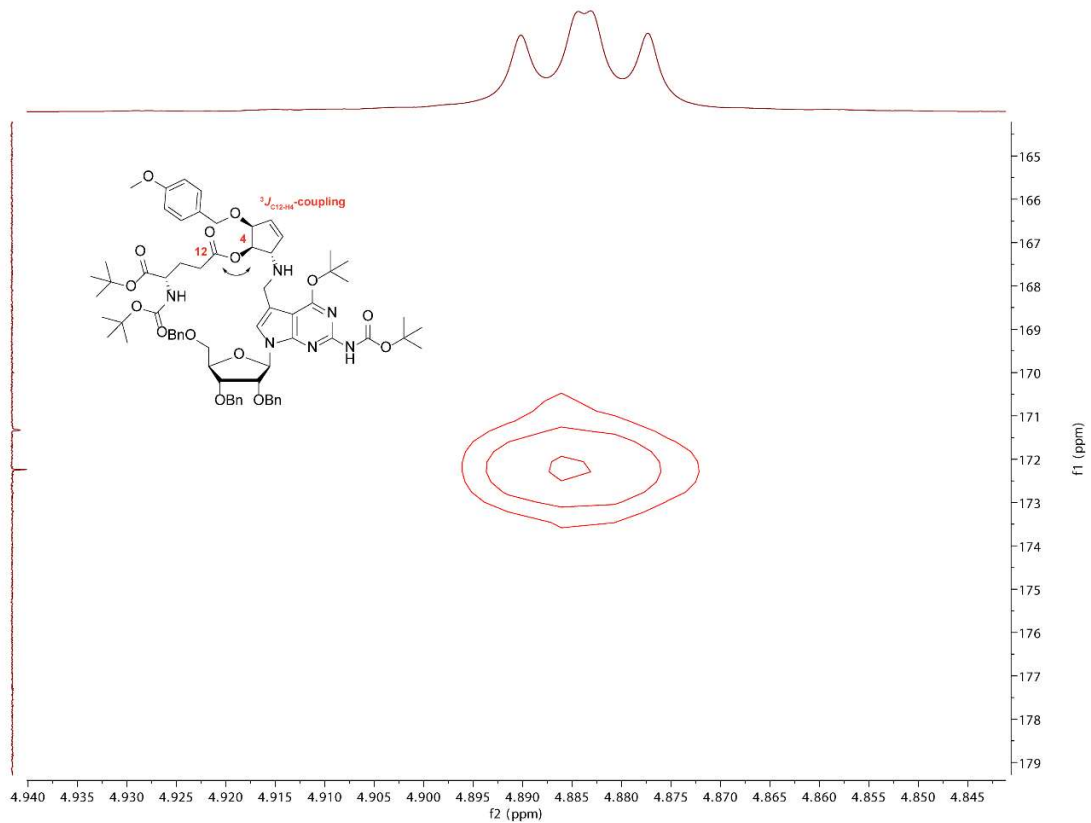
$^1\text{H-NMR}$ (170) $^1\text{H-NMR}$ (170) – Zoom auf den oberen Bereich

$^1\text{H-NMR}$ (170) – Zoom auf den mittleren Bereich $^1\text{H-NMR}$ (170) – Zoom auf den unteren Bereich

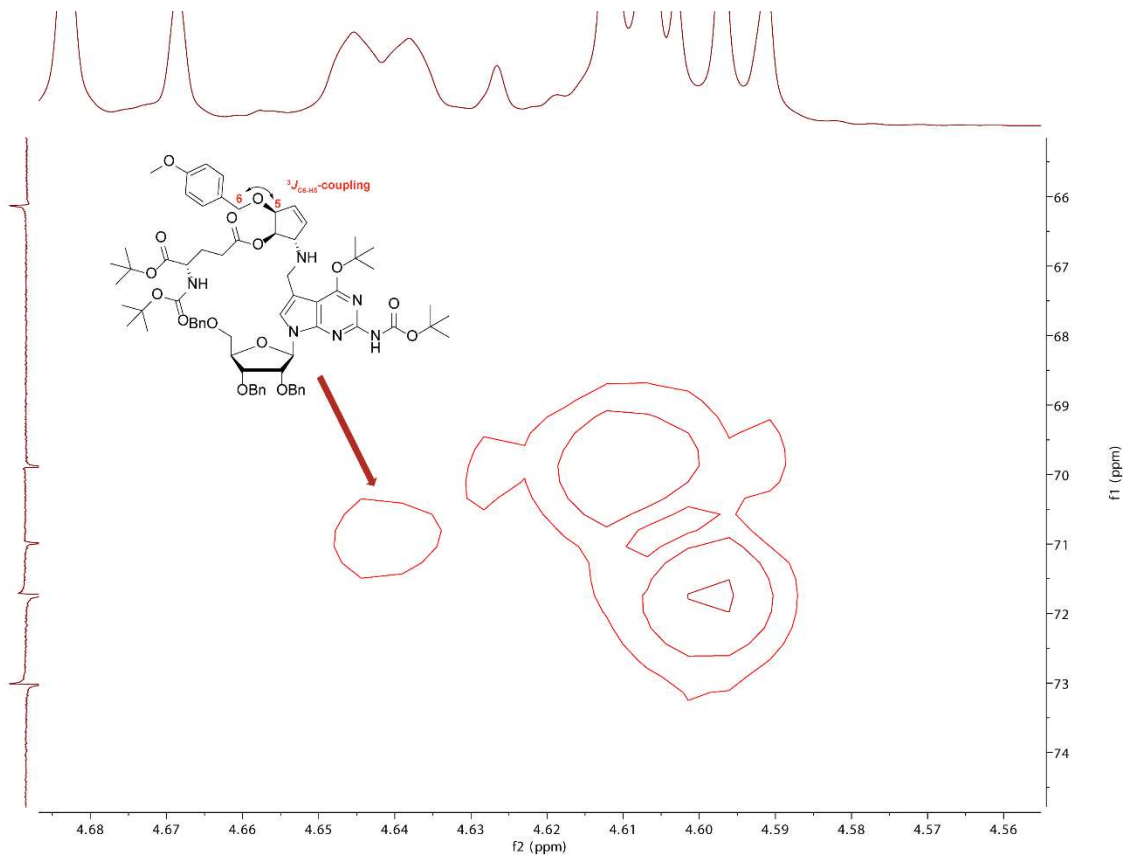
$^{13}\text{C-NMR}$ (170) $^{13}\text{C-NMR}$ (170) – Zoom auf den oberen Bereich

$^{13}\text{C-NMR}$ (170) – Zoom auf den unteren Bereich

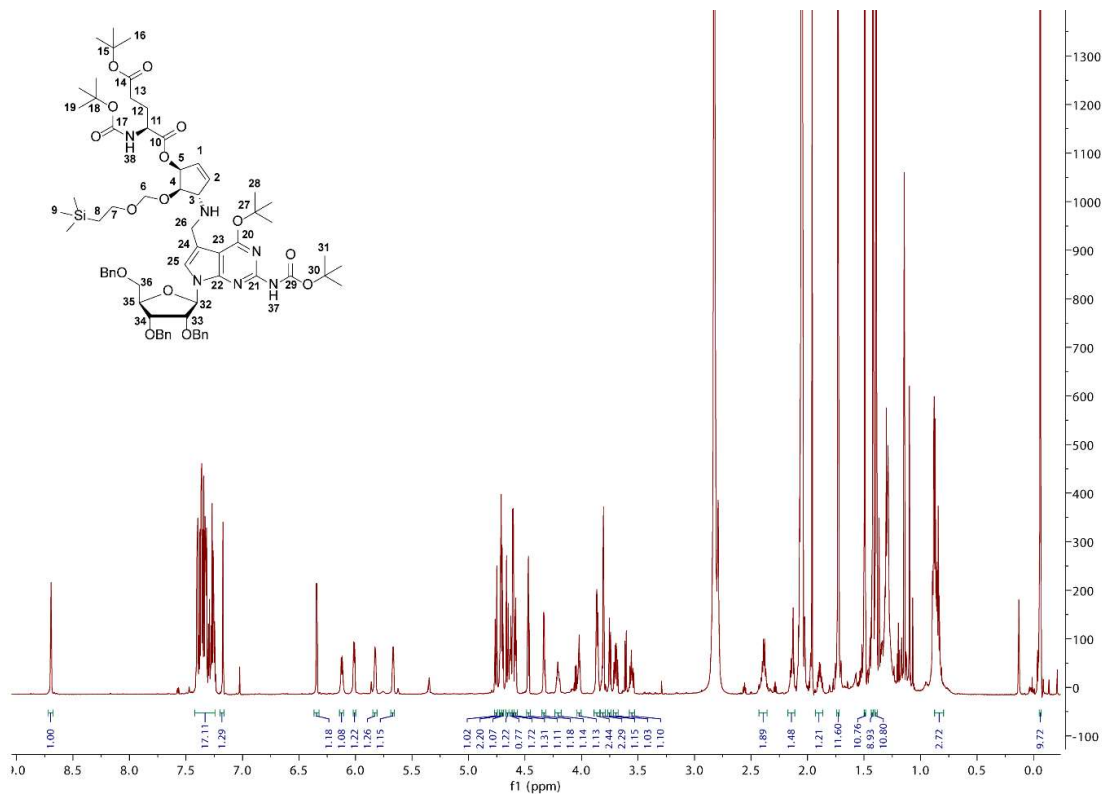
HMBC (170), welches den C4H-C12-crosspeak zeigt

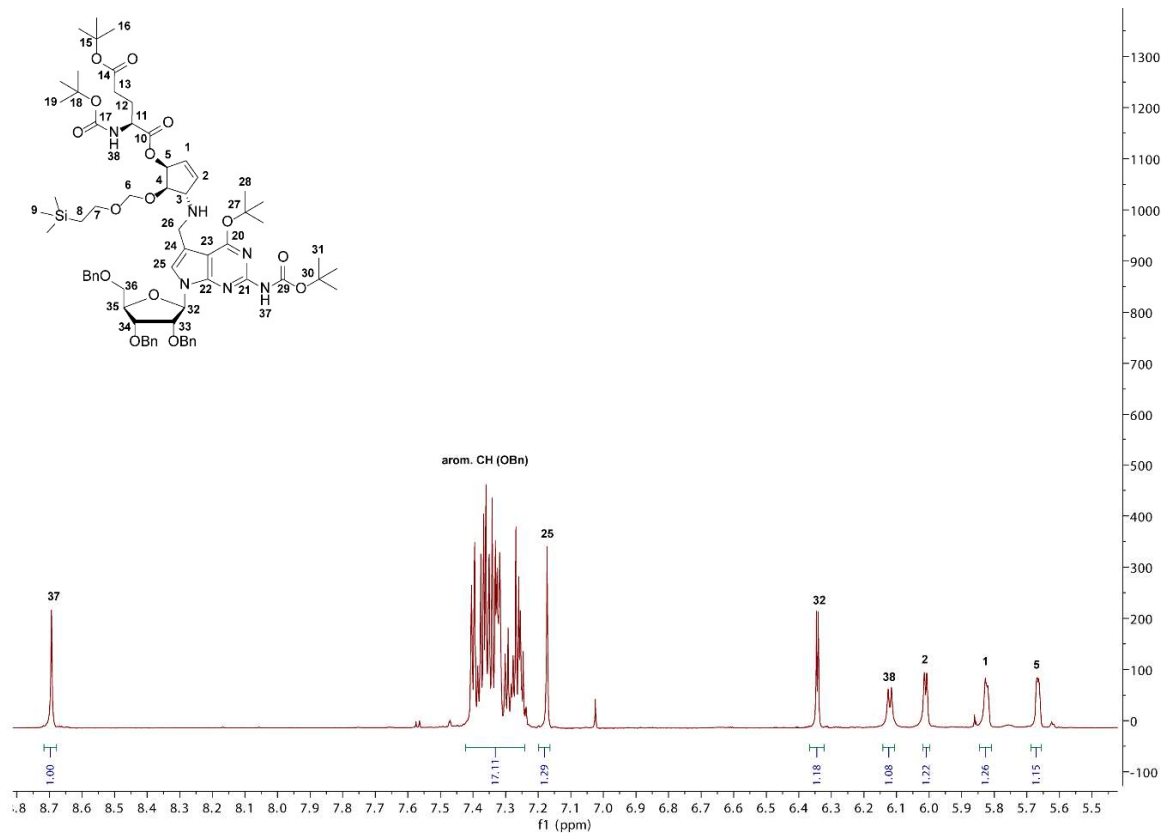
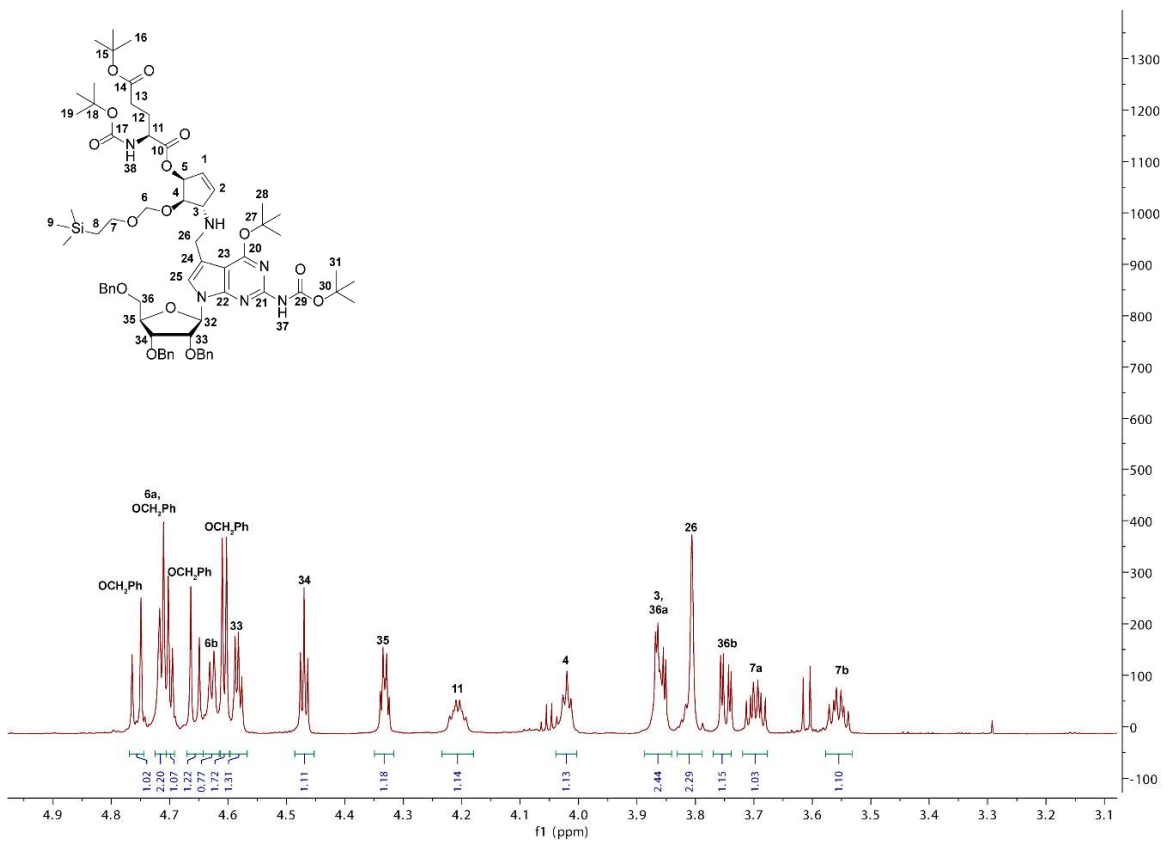


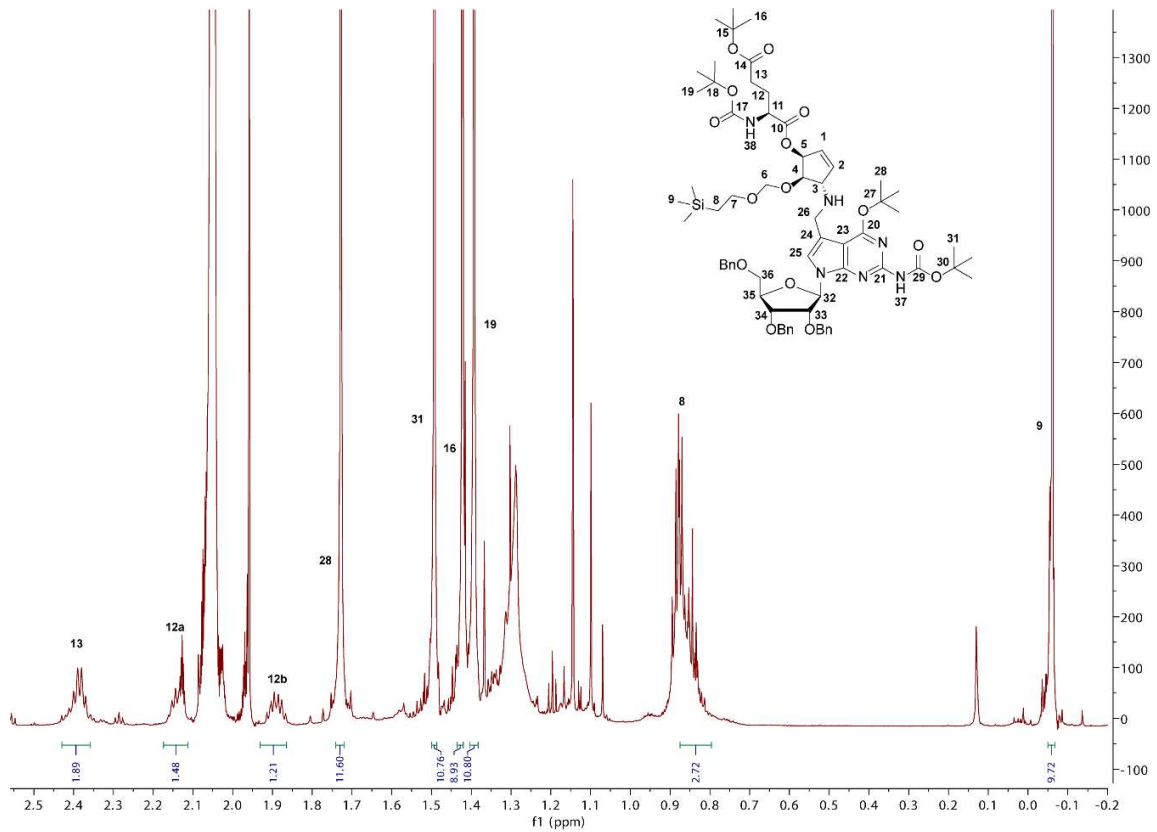
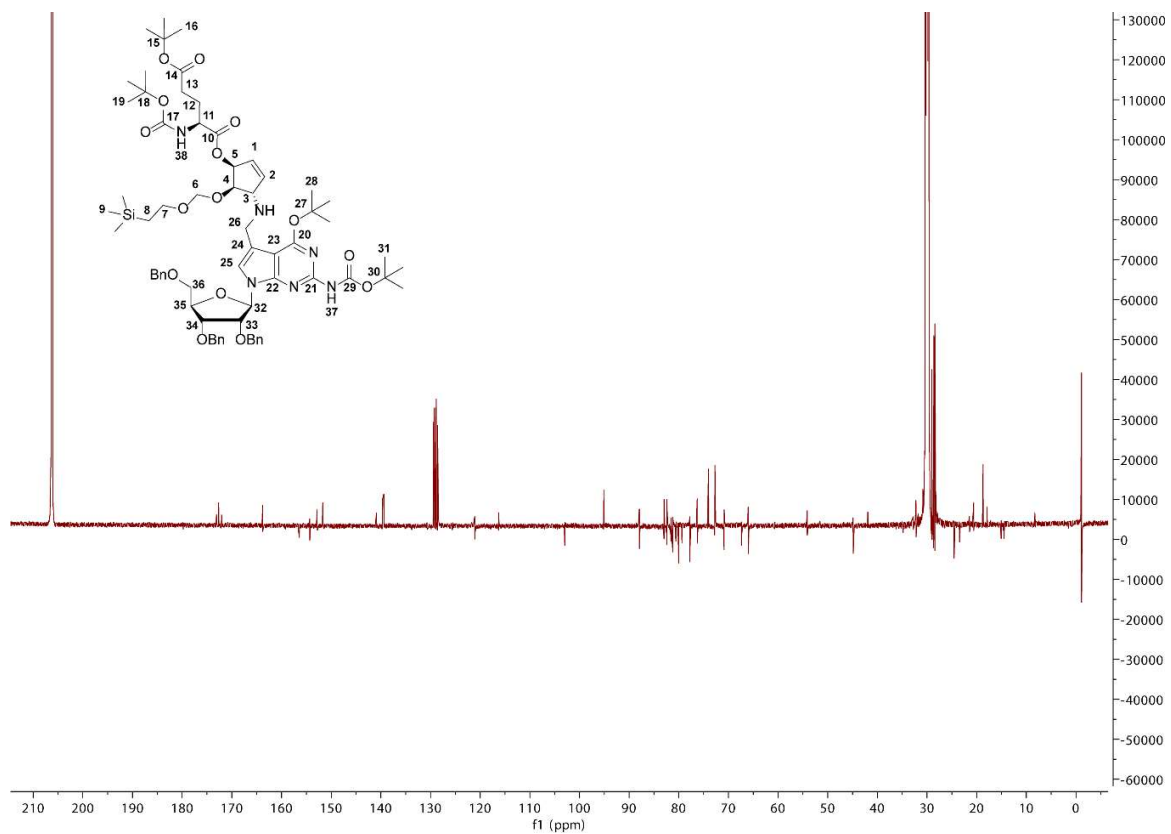
HMBC (170), welches den C5H-C6-crosspeak zeigt

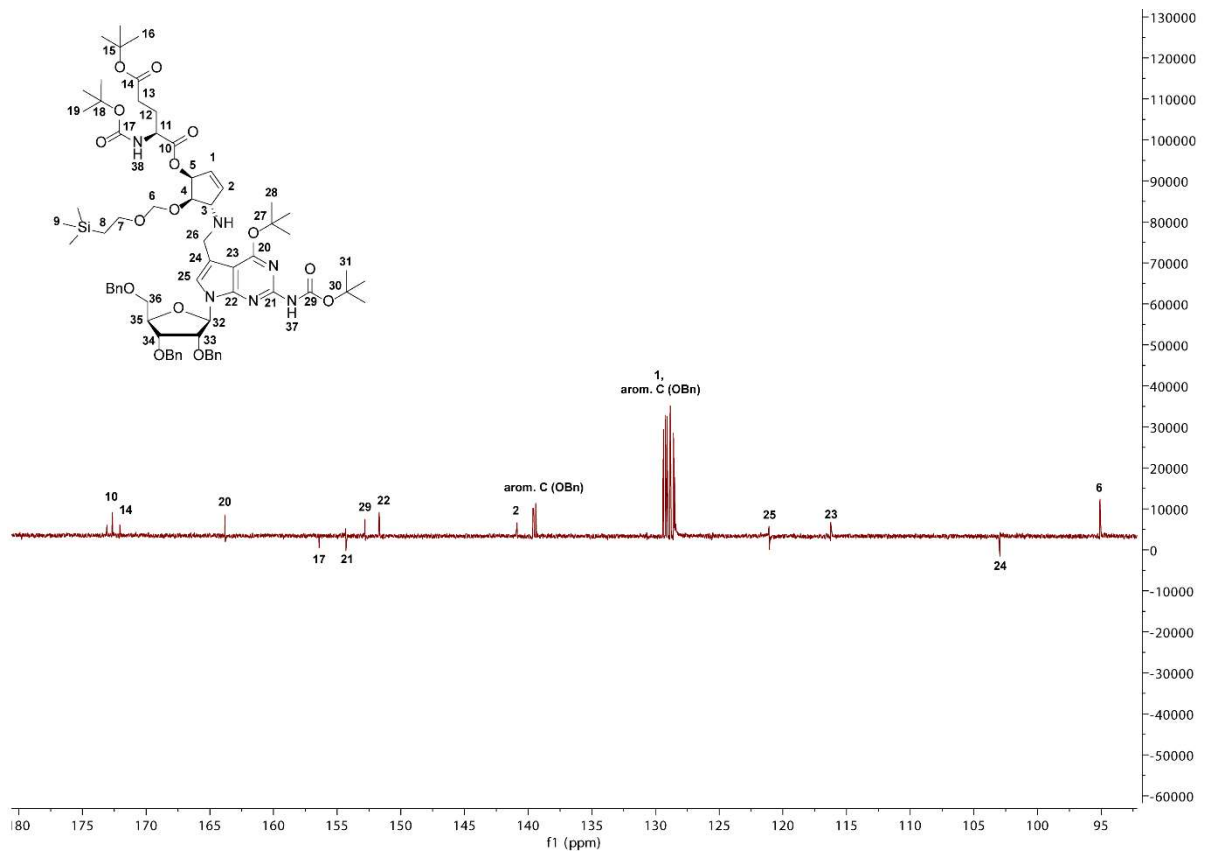
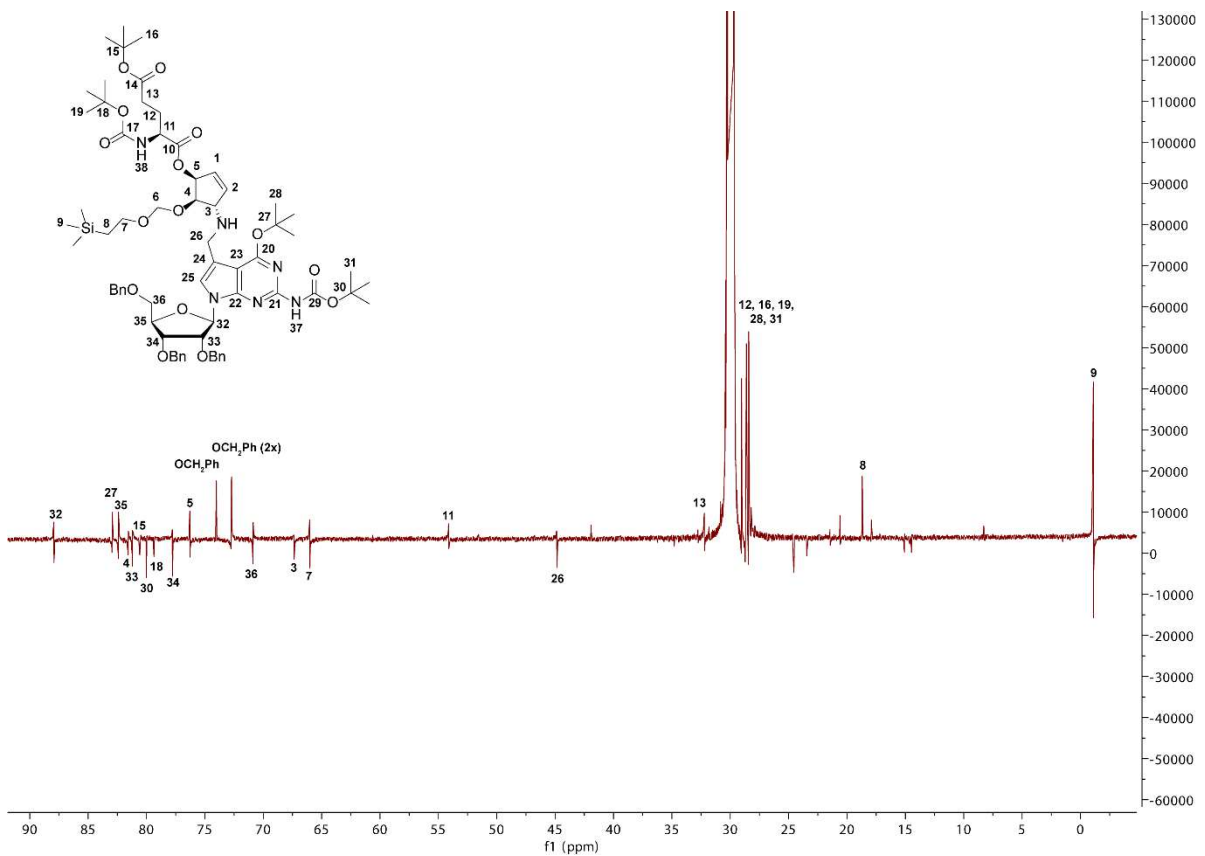


$^1\text{H-NMR}$ (164)

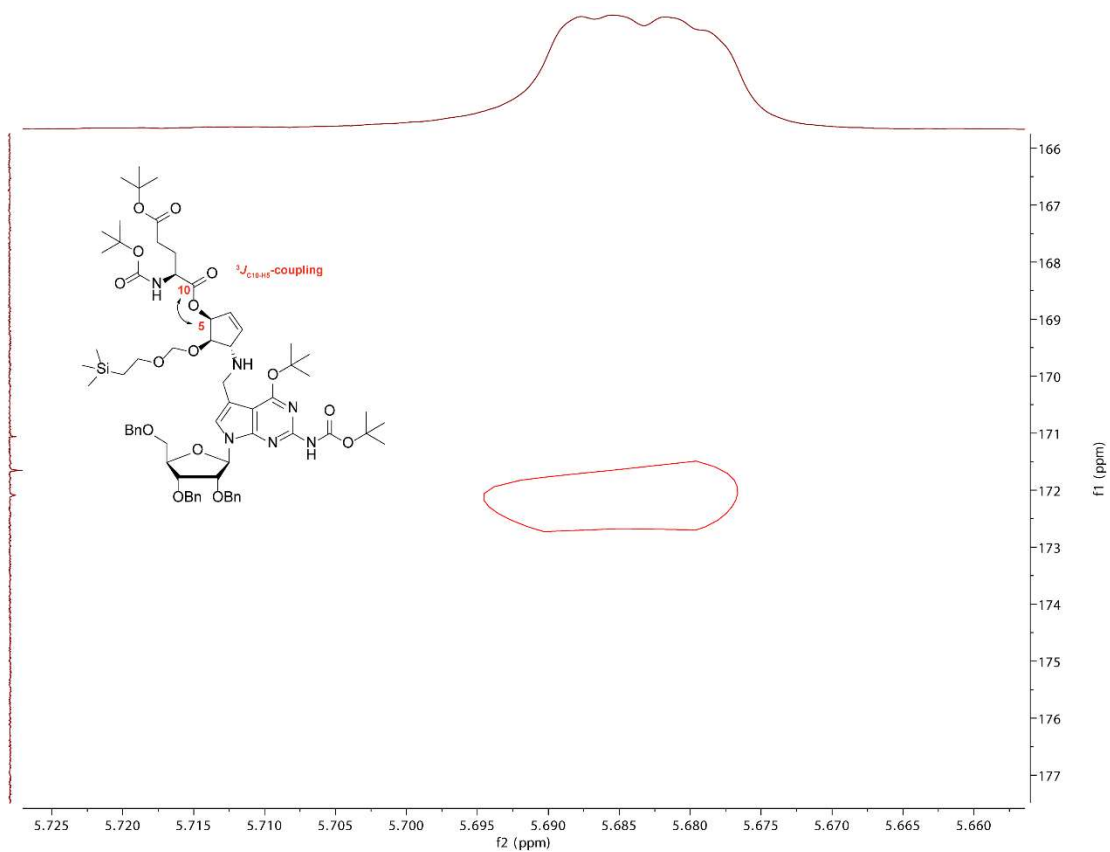


$^1\text{H-NMR}$ (164) – Zoom auf den oberen Bereich $^1\text{H-NMR}$ (164) – Zoom auf den mittleren Bereich

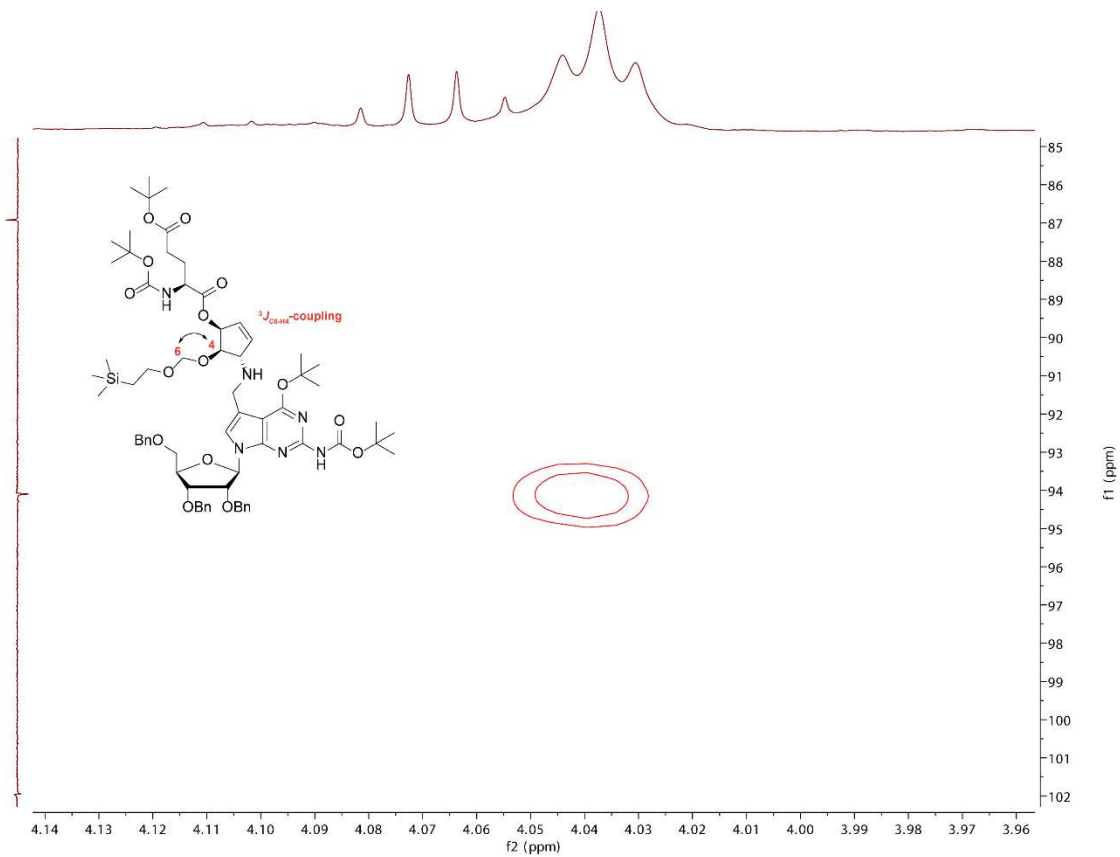
¹H-NMR (164) – Zoom auf den unteren Bereich¹³C-NMR (164)

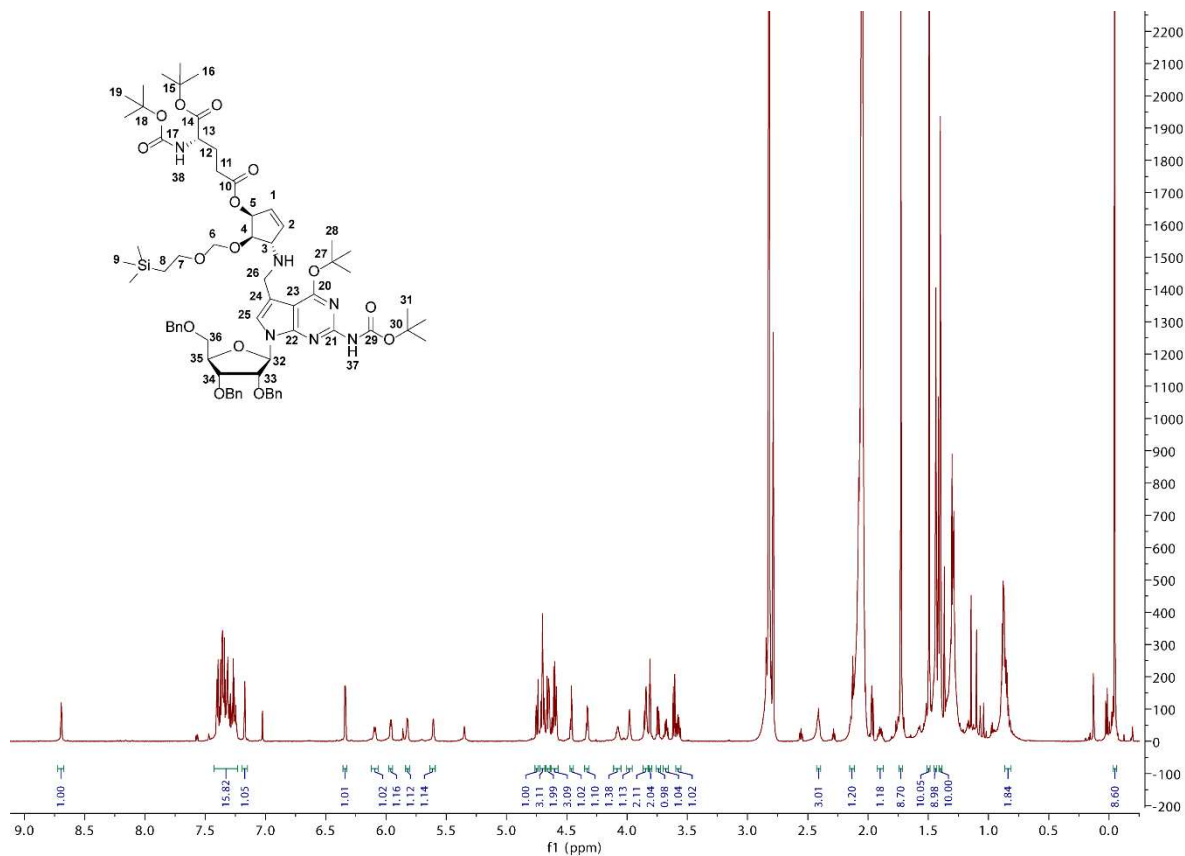
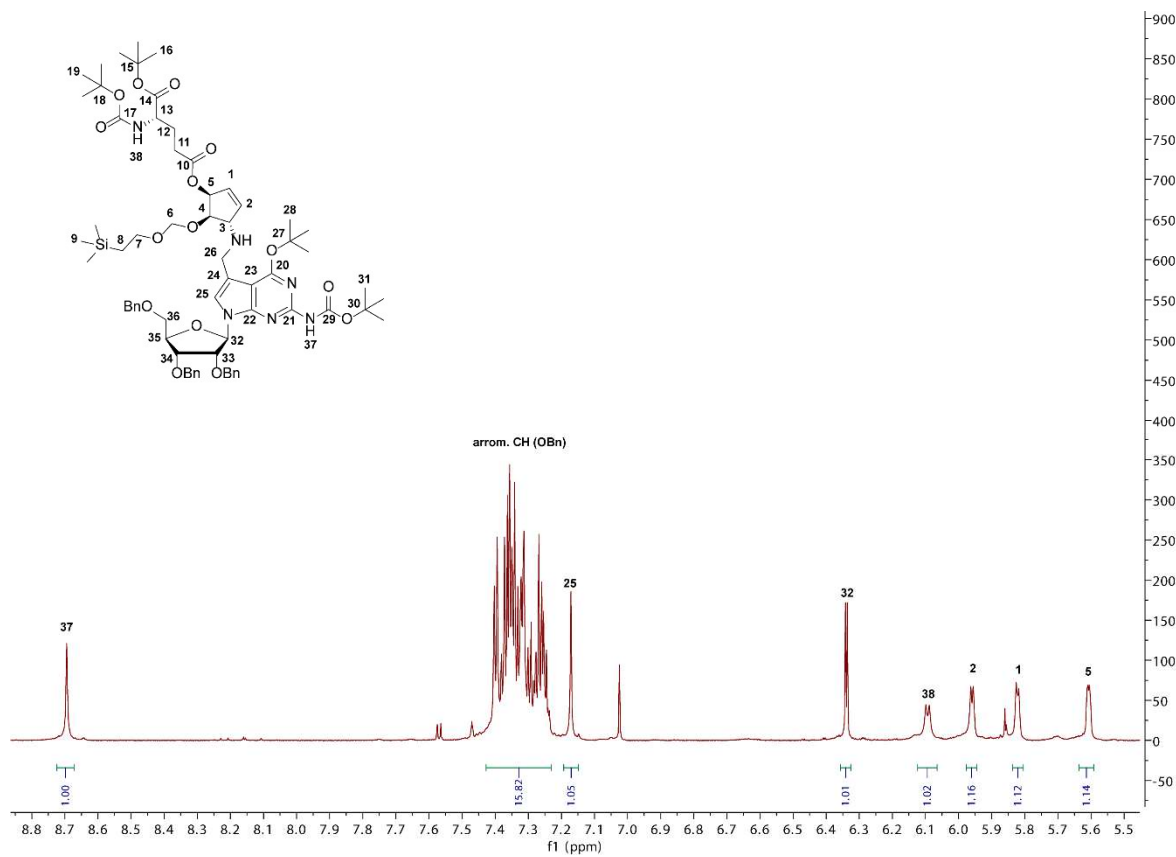
$^{13}\text{C-NMR}$ (164) – Zoom auf den oberen Bereich $^{13}\text{C-NMR}$ (164) – Zoom auf den unteren Bereich

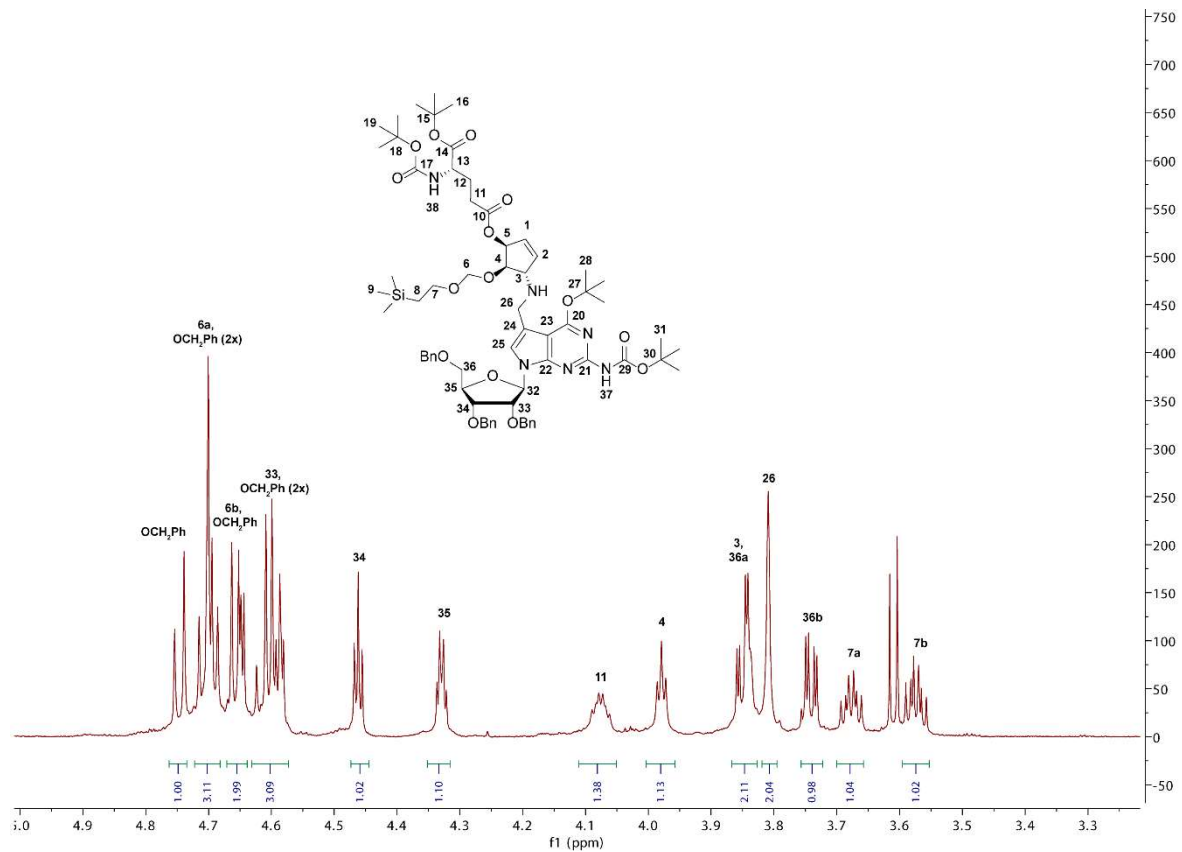
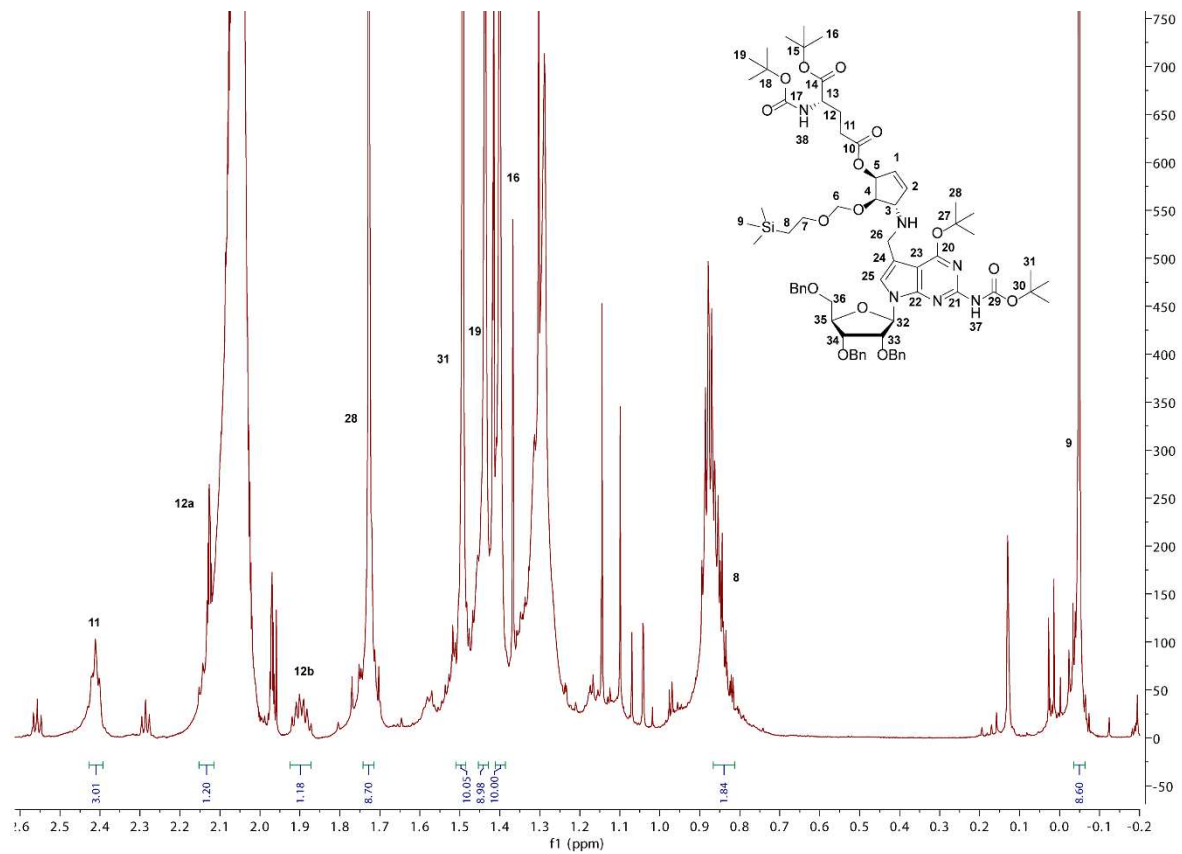
HMBC (164), welches den C5H-C10-crosspeak zeigt

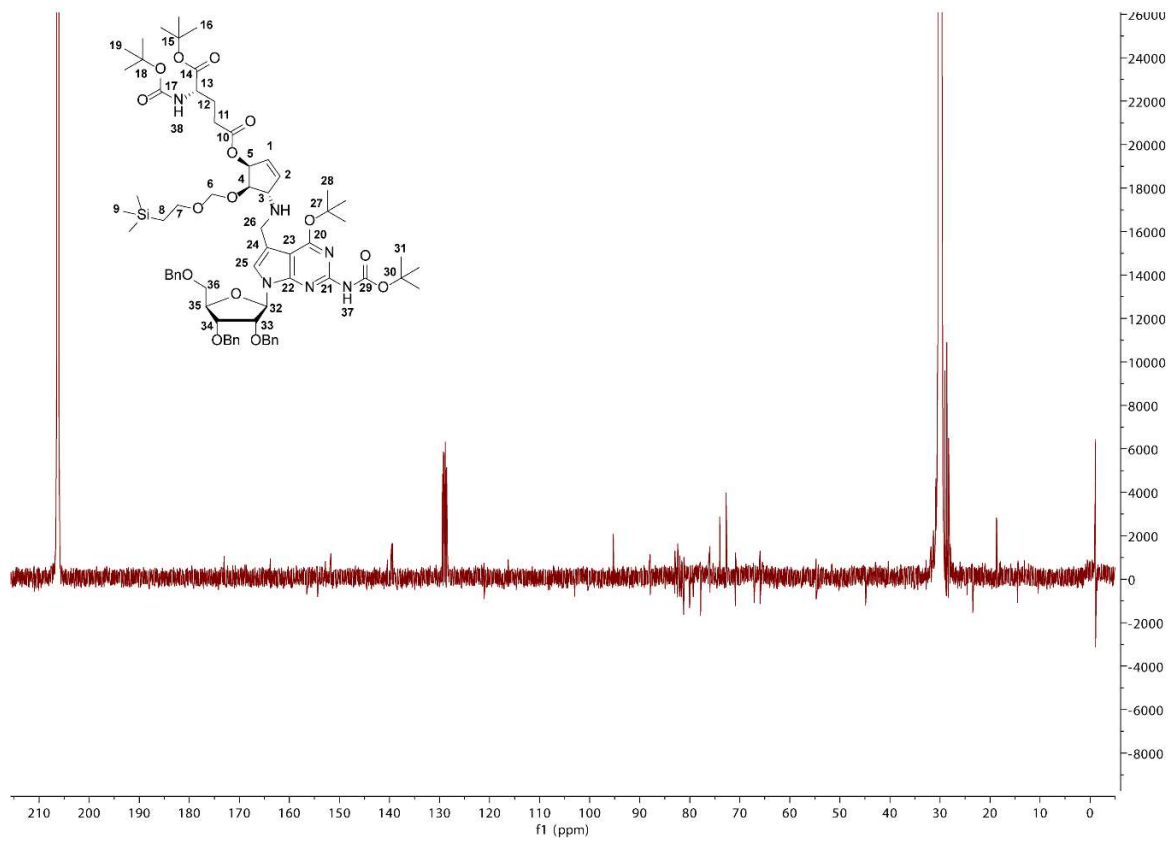
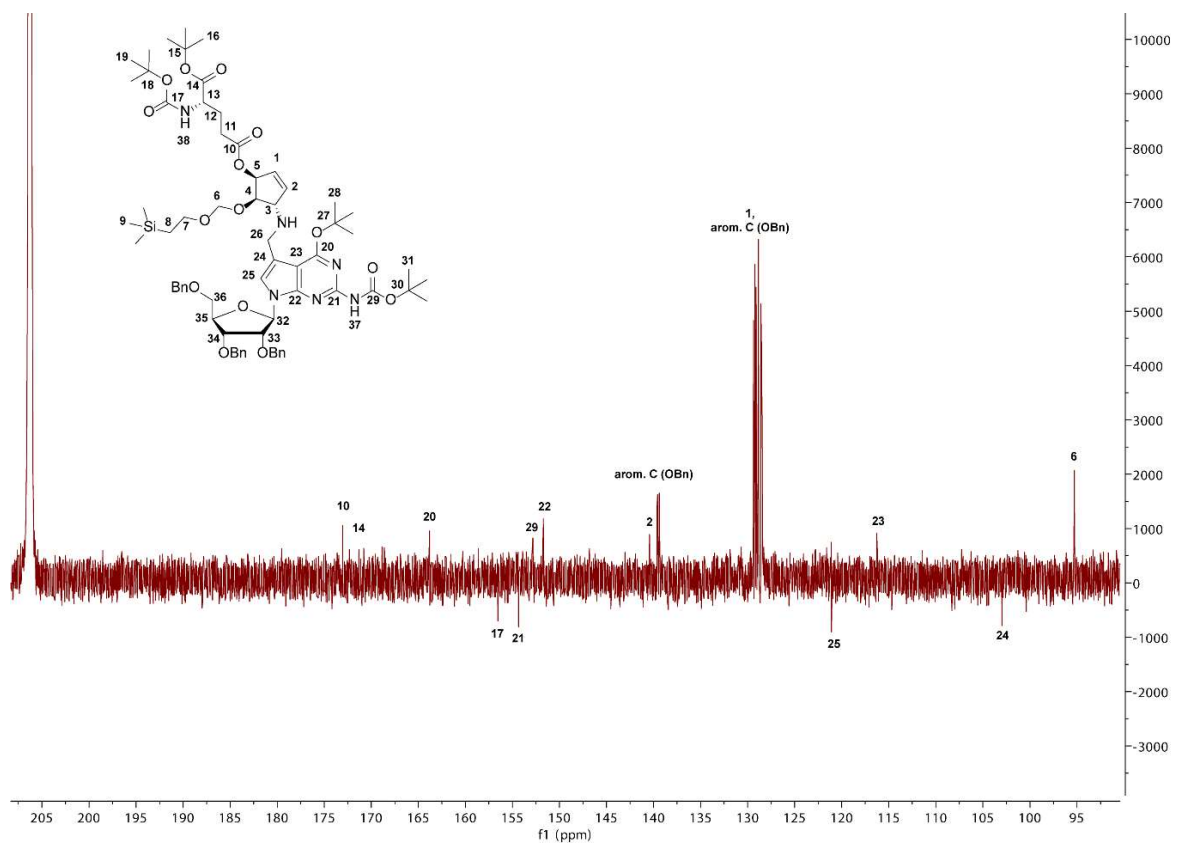


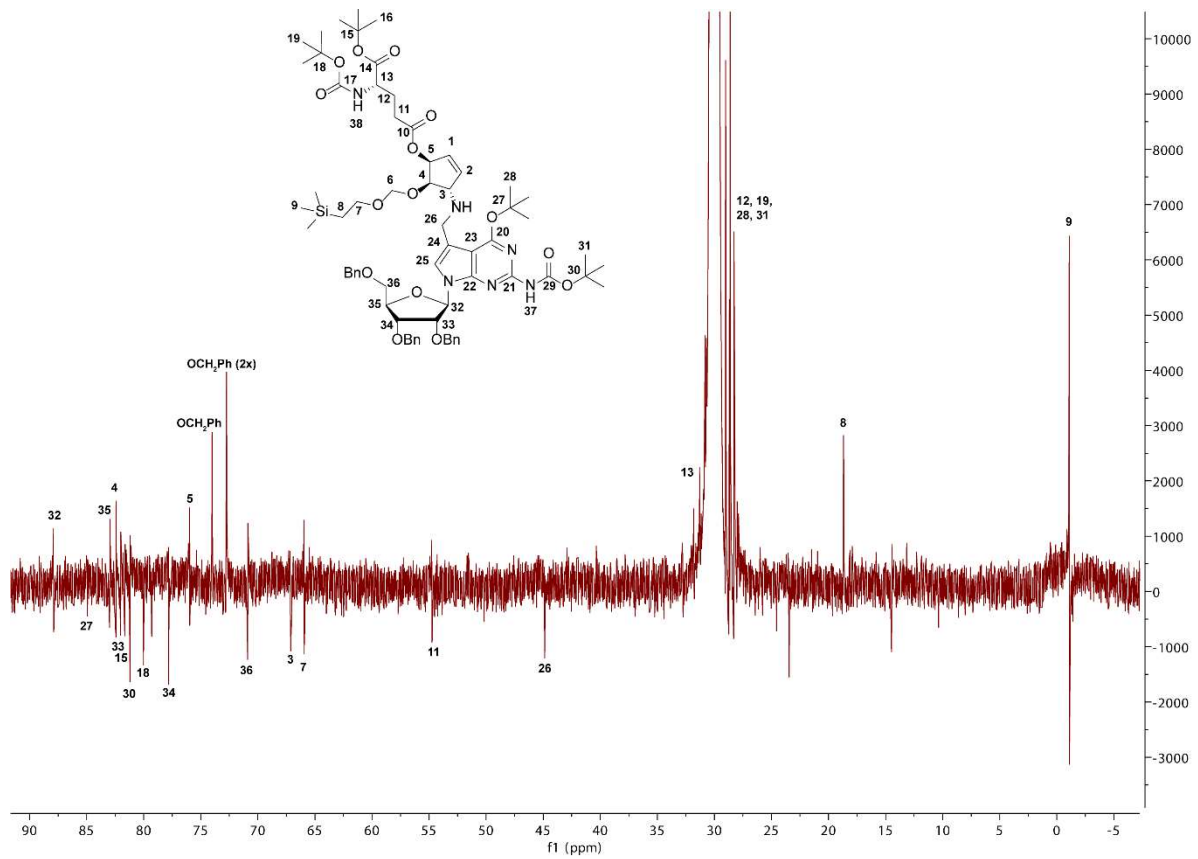
HMBC (164), welches den C4H-C6-crosspeak zeigt



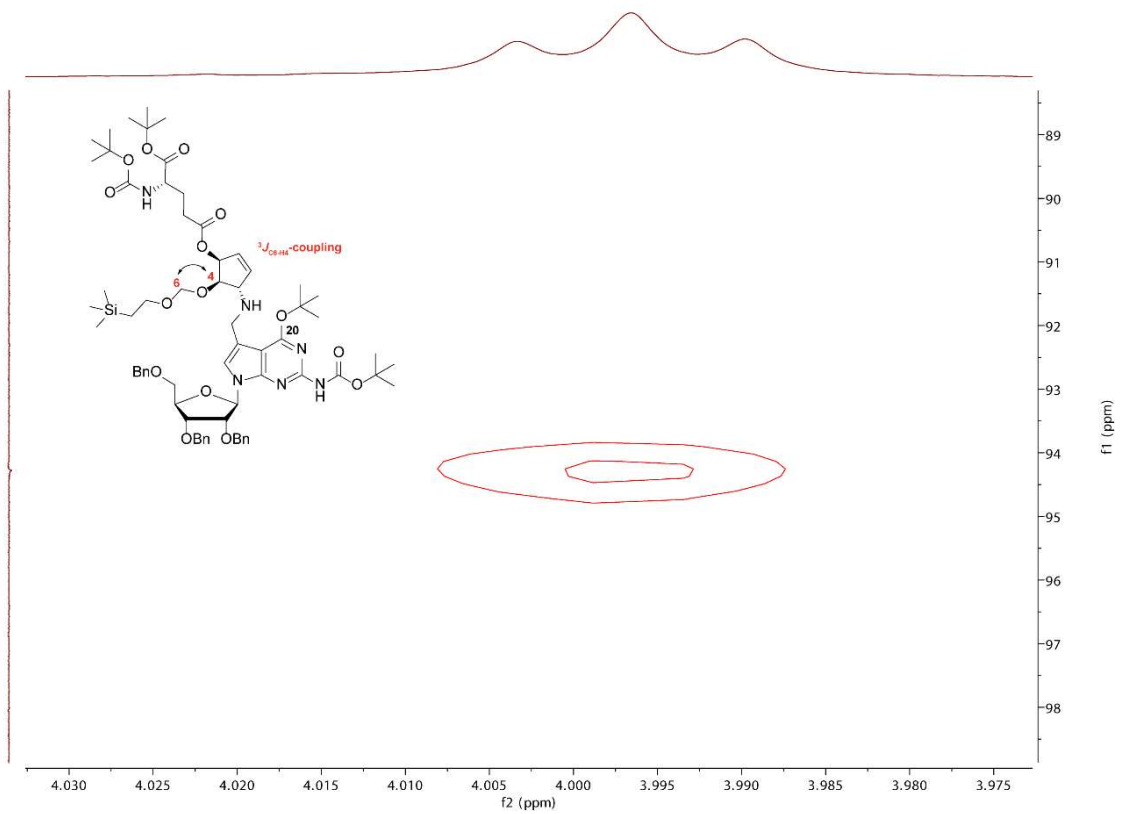
$^1\text{H-NMR}$ (173) $^1\text{H-NMR}$ (173) – Zoom auf den oberen Bereich

¹H-NMR (173) – Zoom auf den mittleren Bereich¹H-NMR (173) – Zoom auf den unteren Bereich

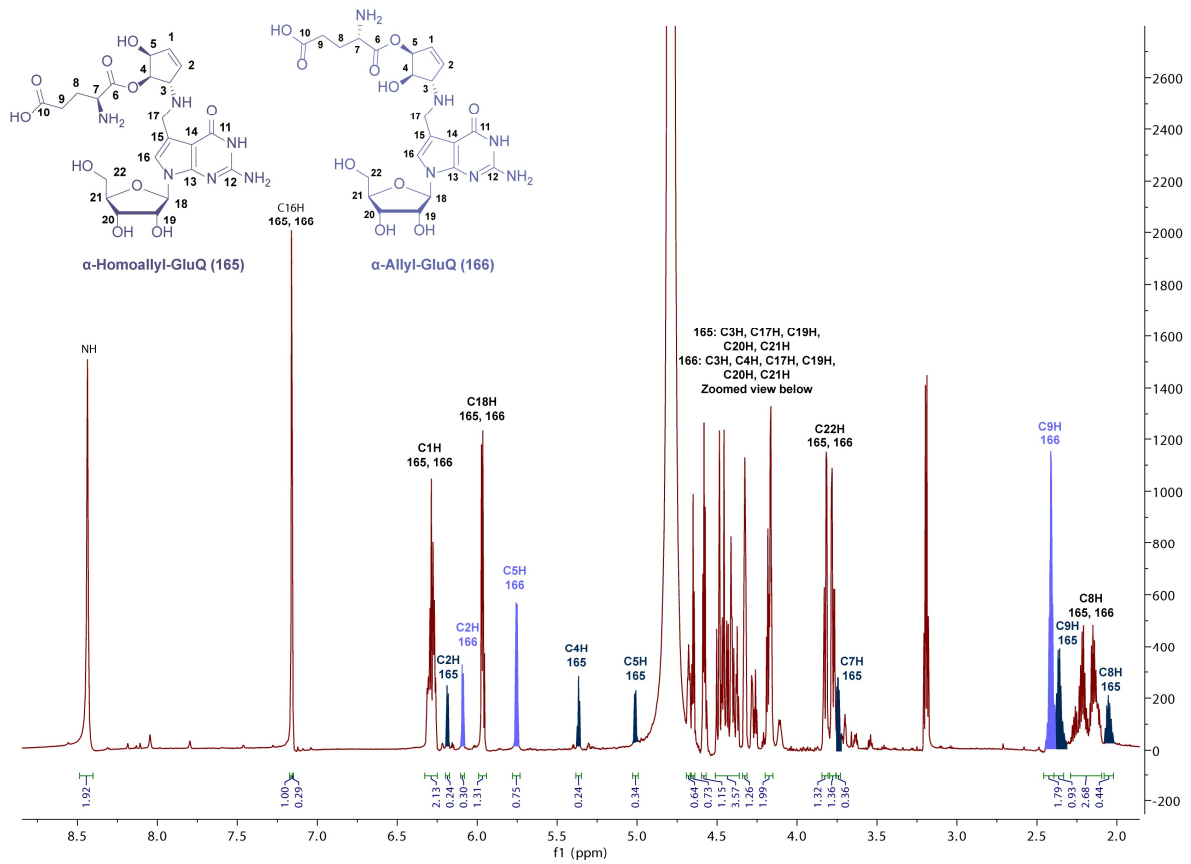
$^{13}\text{C-NMR}$ (173) $^{13}\text{C-NMR}$ (173) – Zoom auf den oberen Bereich

^{13}C -NMR (173) – Zoom auf den unteren Bereich

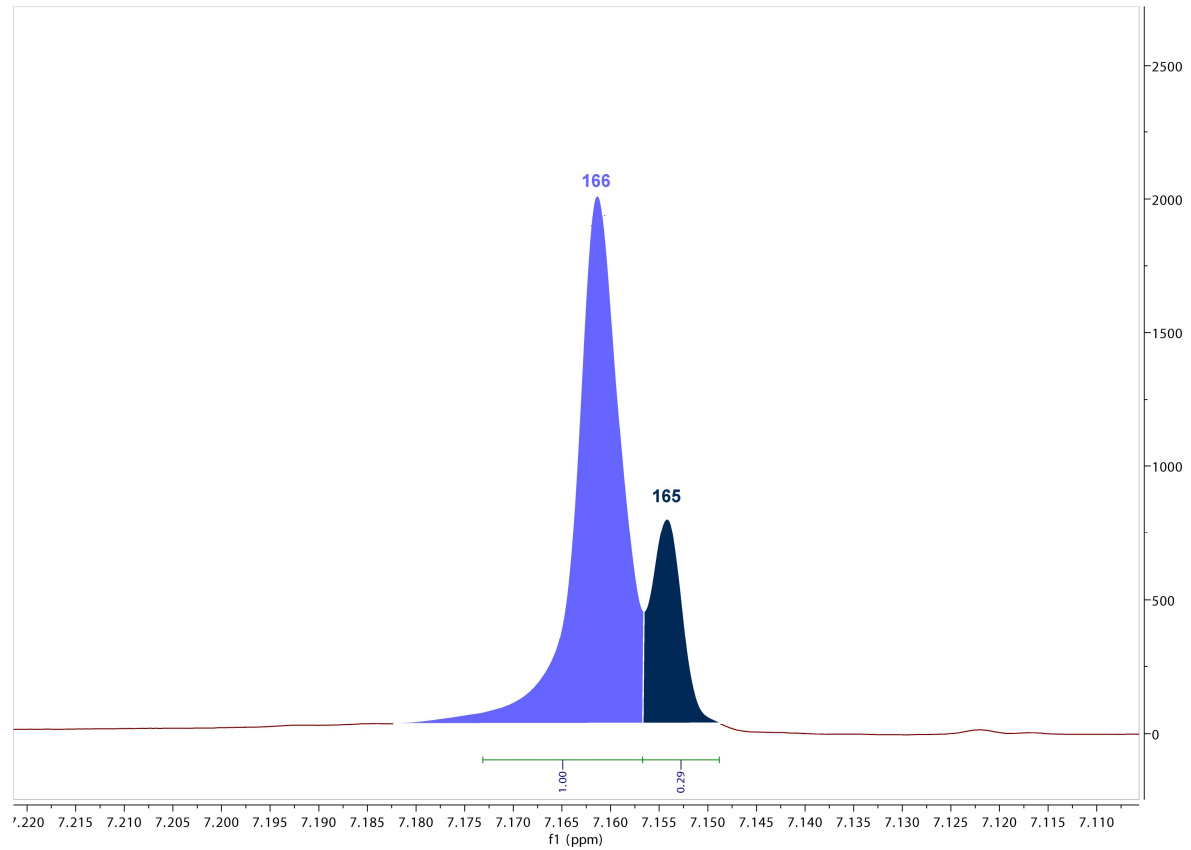
HMBC (173), welches den C4H-C6-crosspeak zeigt

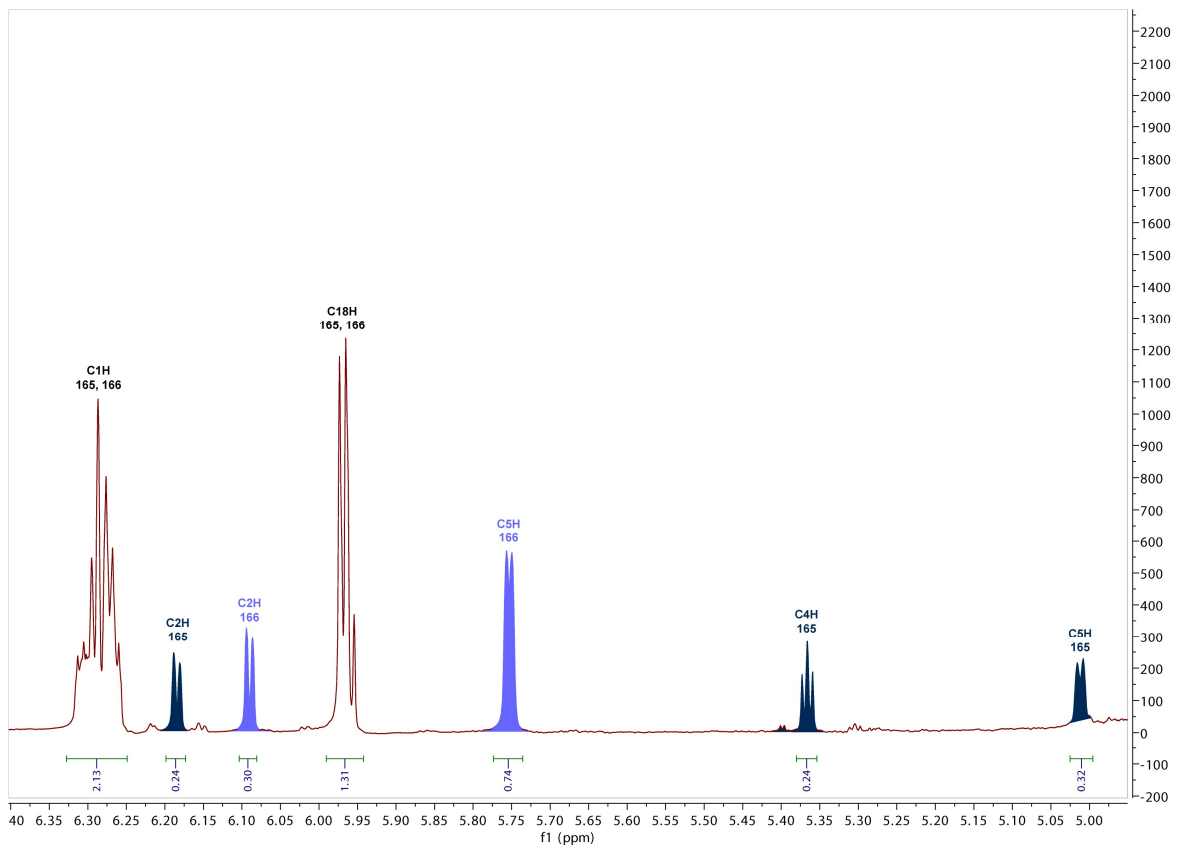
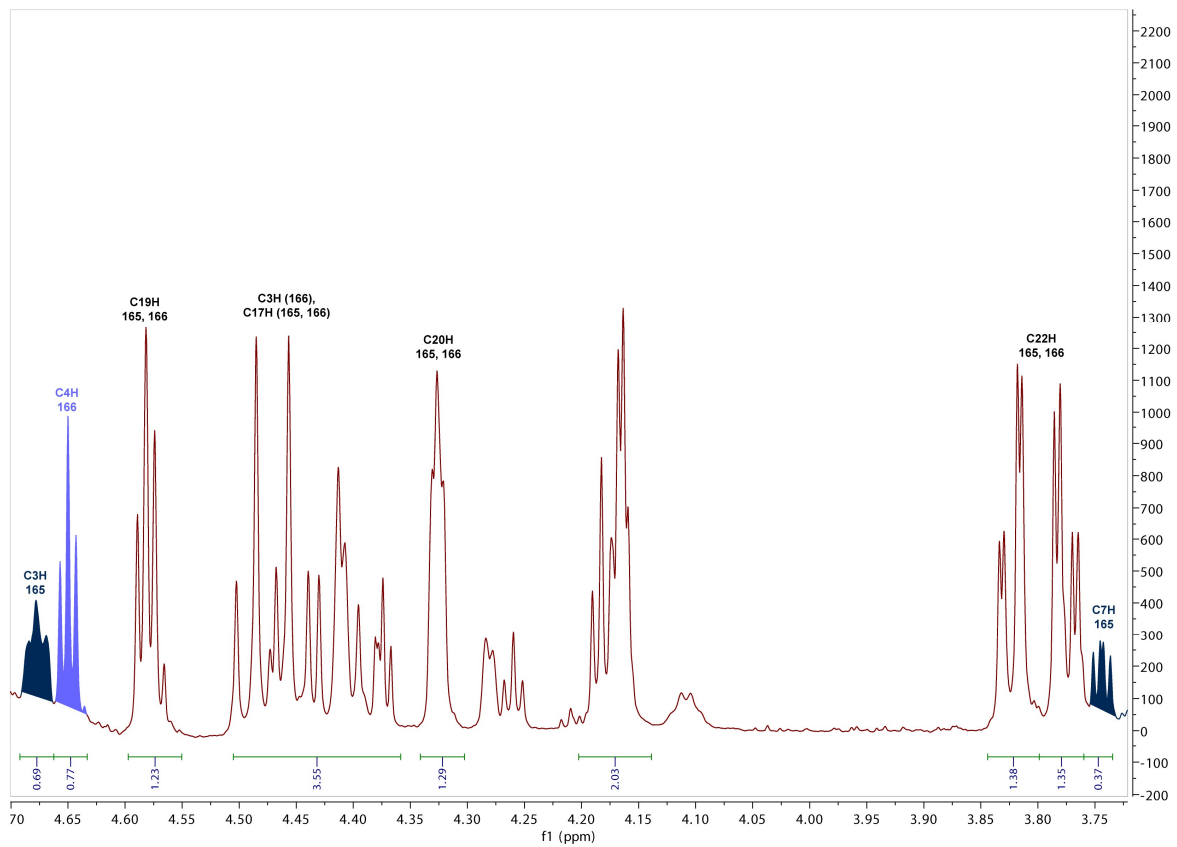


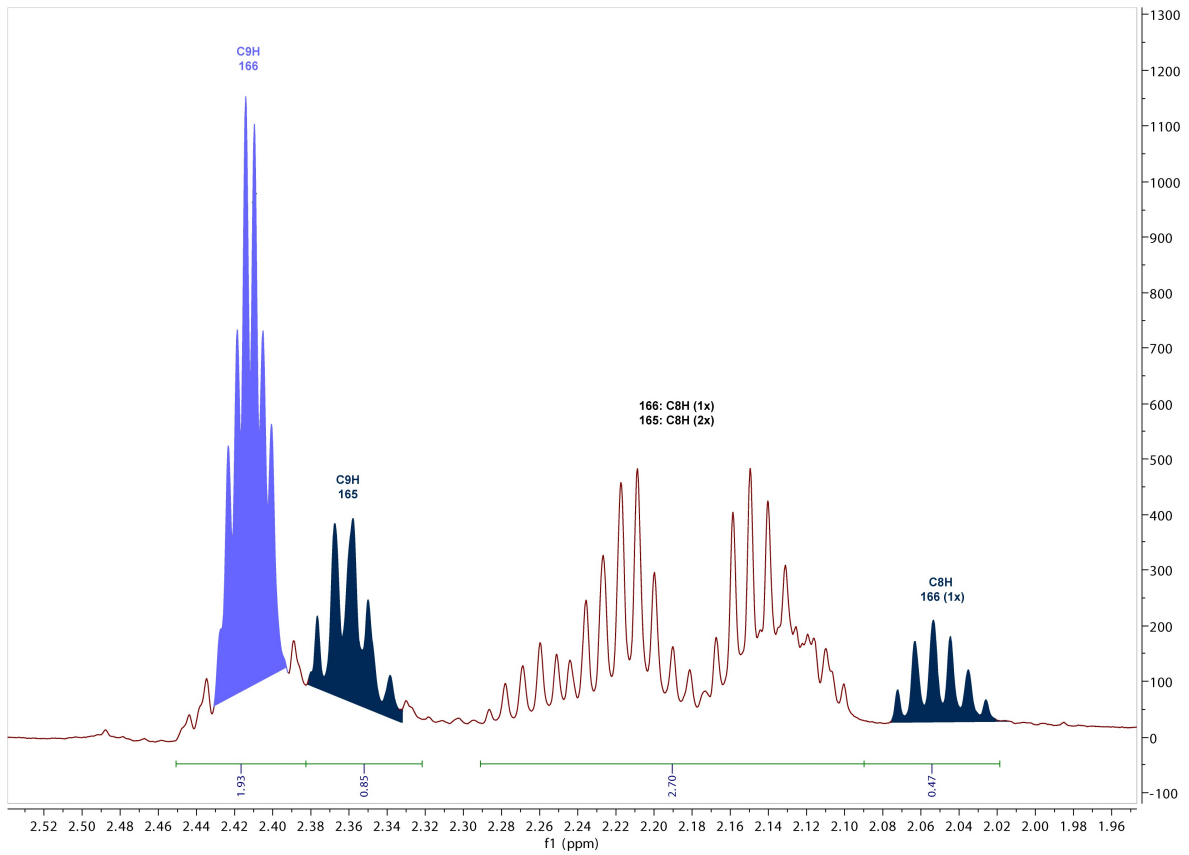
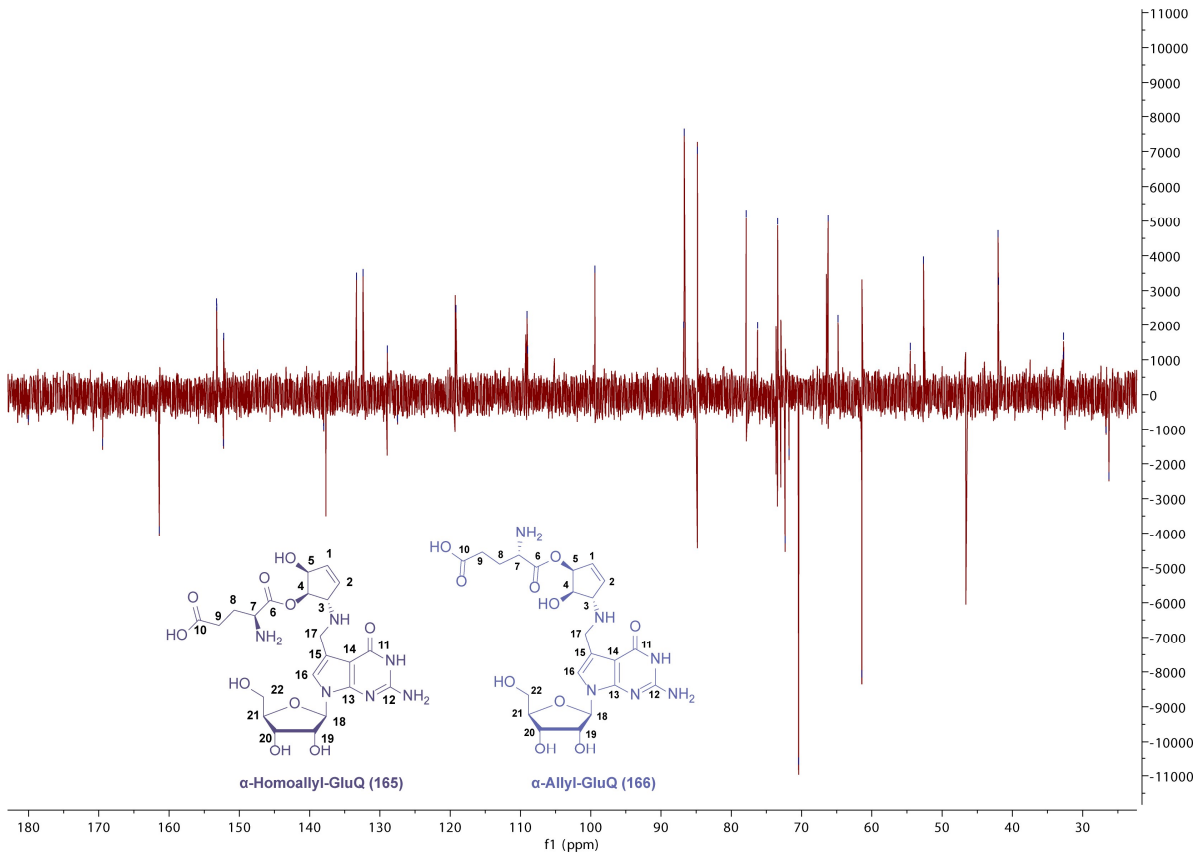
¹H-NMR (165+166)



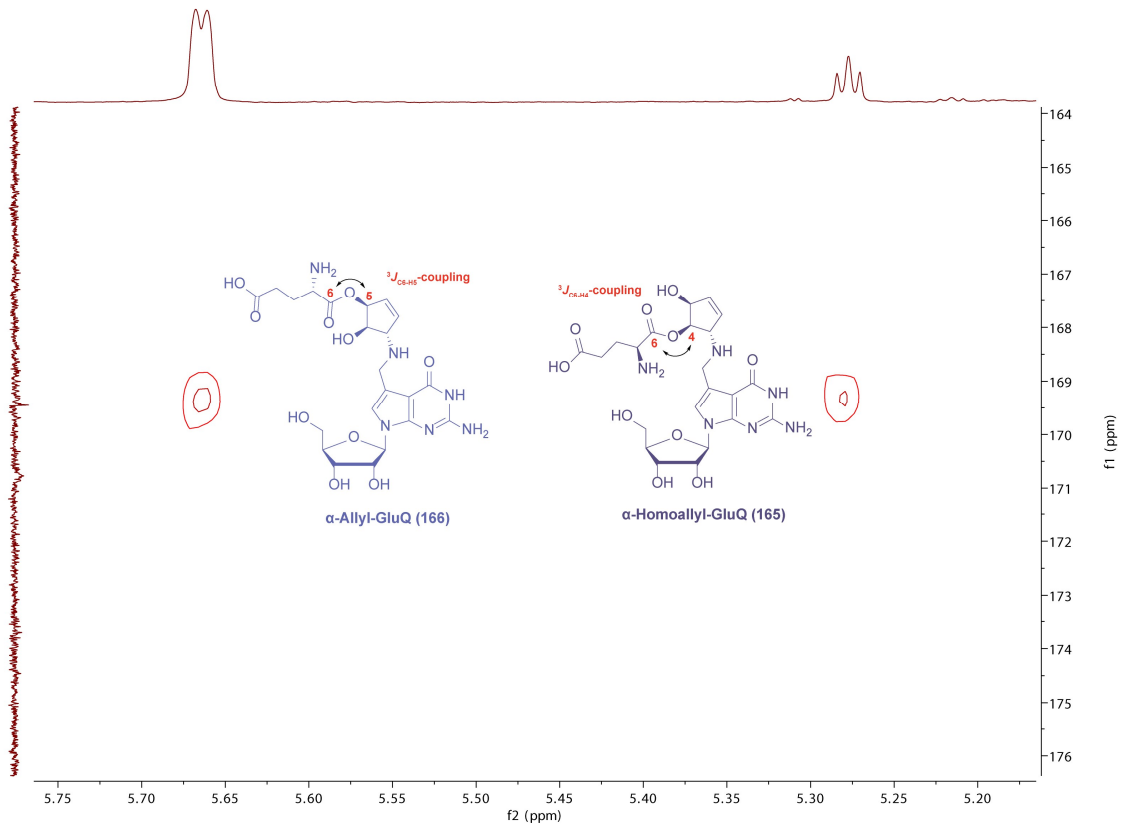
¹H-NMR (165+166) – Zoom auf C16H



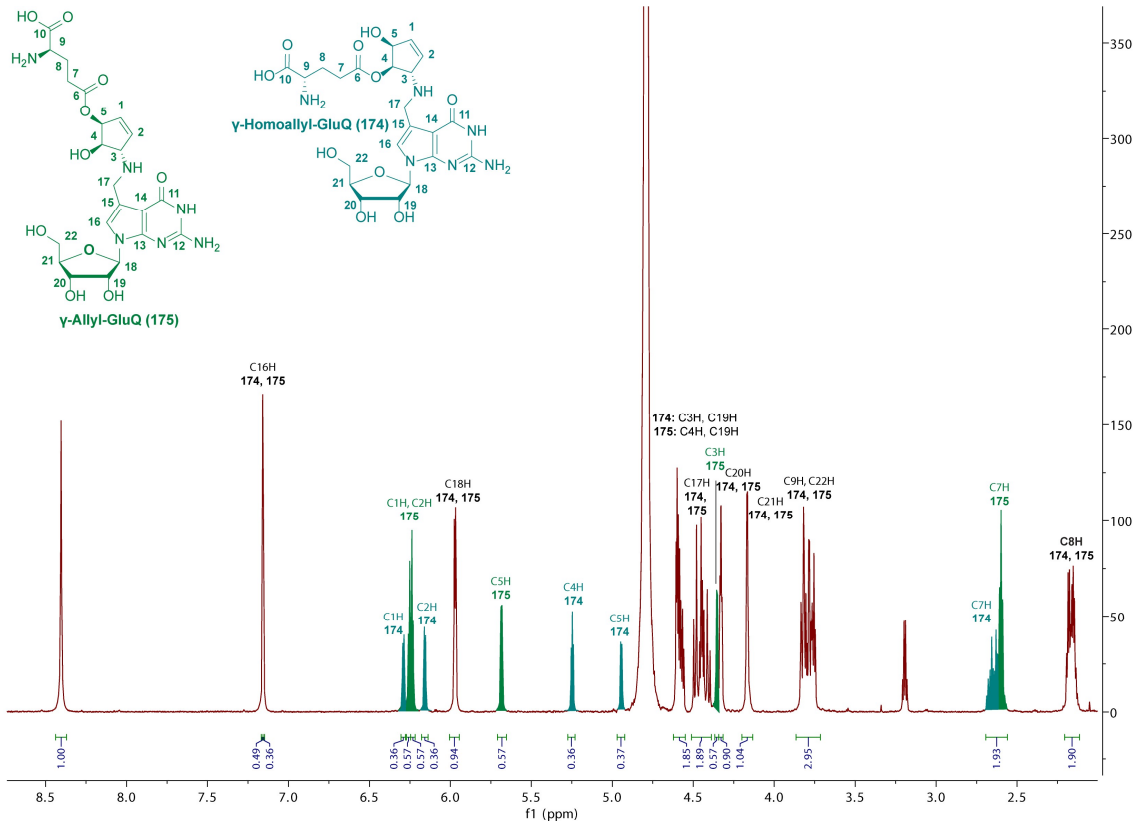
$^1\text{H-NMR}$ (165+166) – Zoom auf den oberen Bereich $^1\text{H-NMR}$ (165+166) – Zoom auf den mittleren Bereich

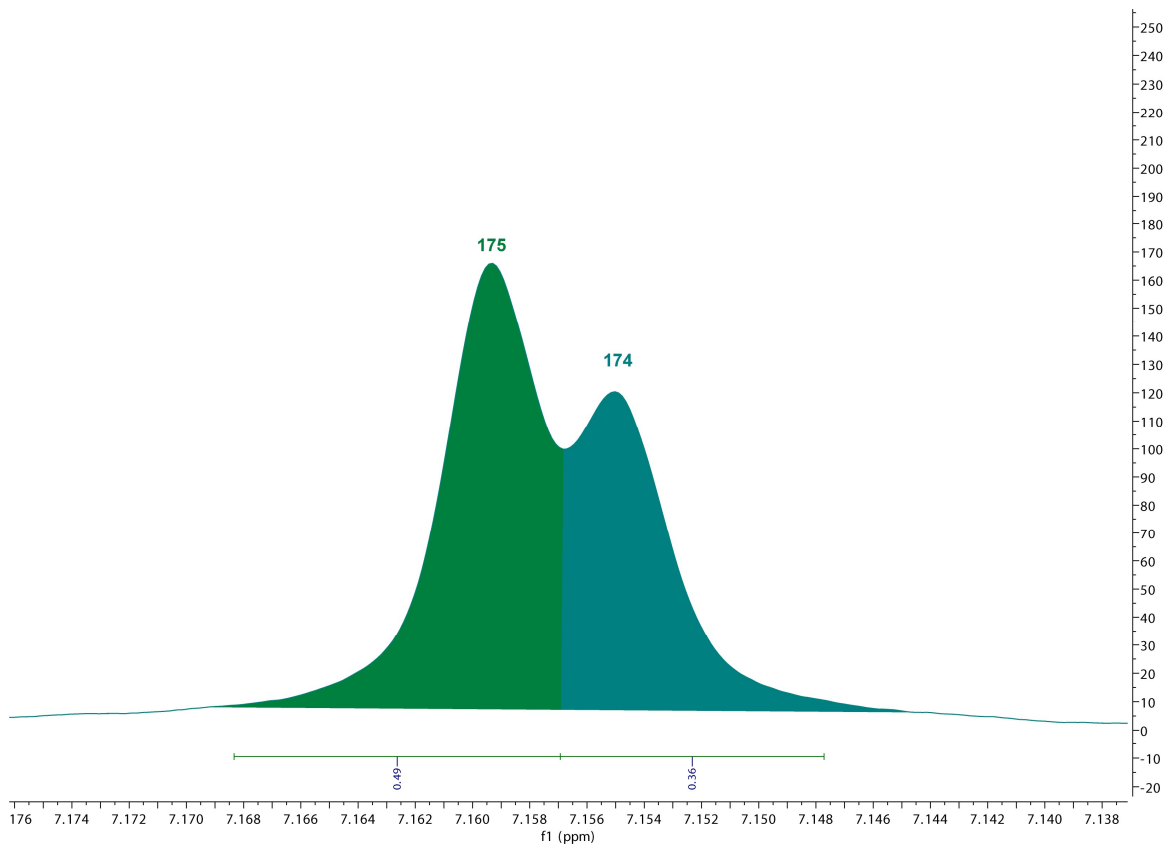
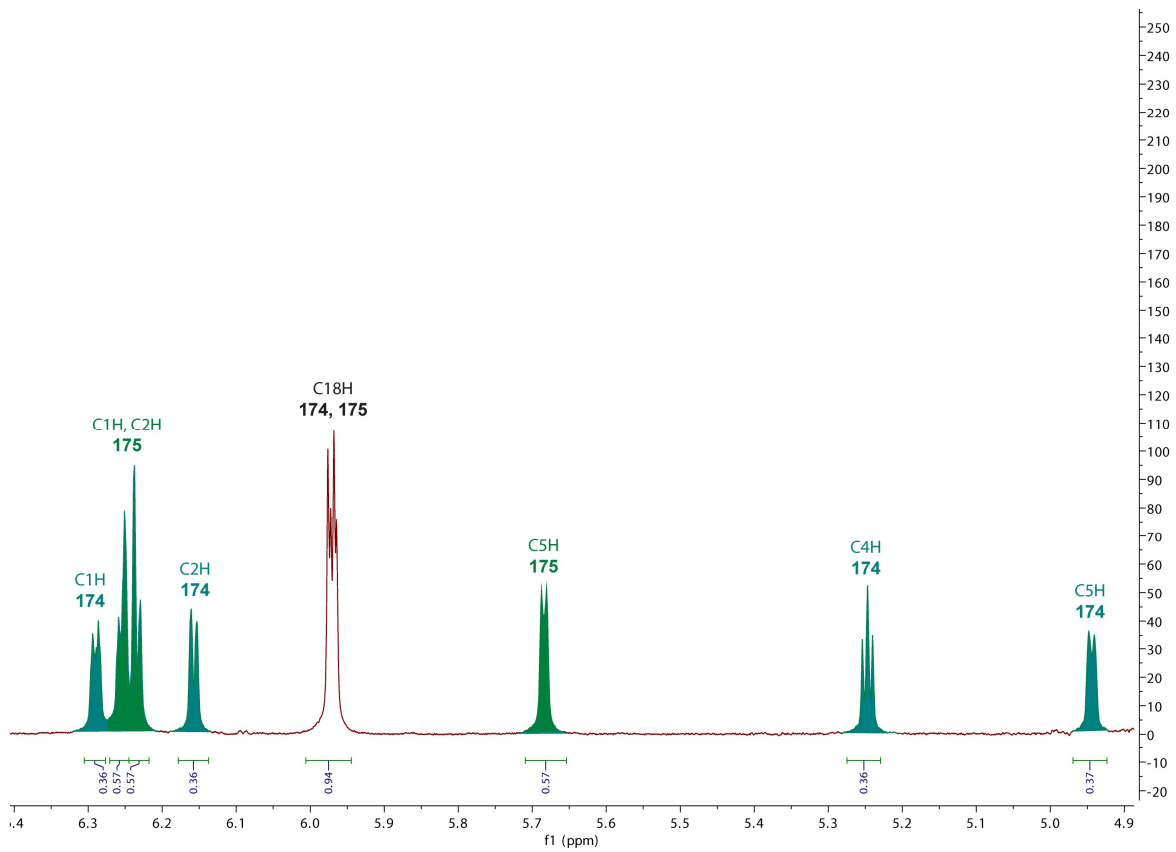
$^1\text{H-NMR}$ (165+166) – Zoom auf den unteren Bereich $^{13}\text{C-NMR}$ (165+166)

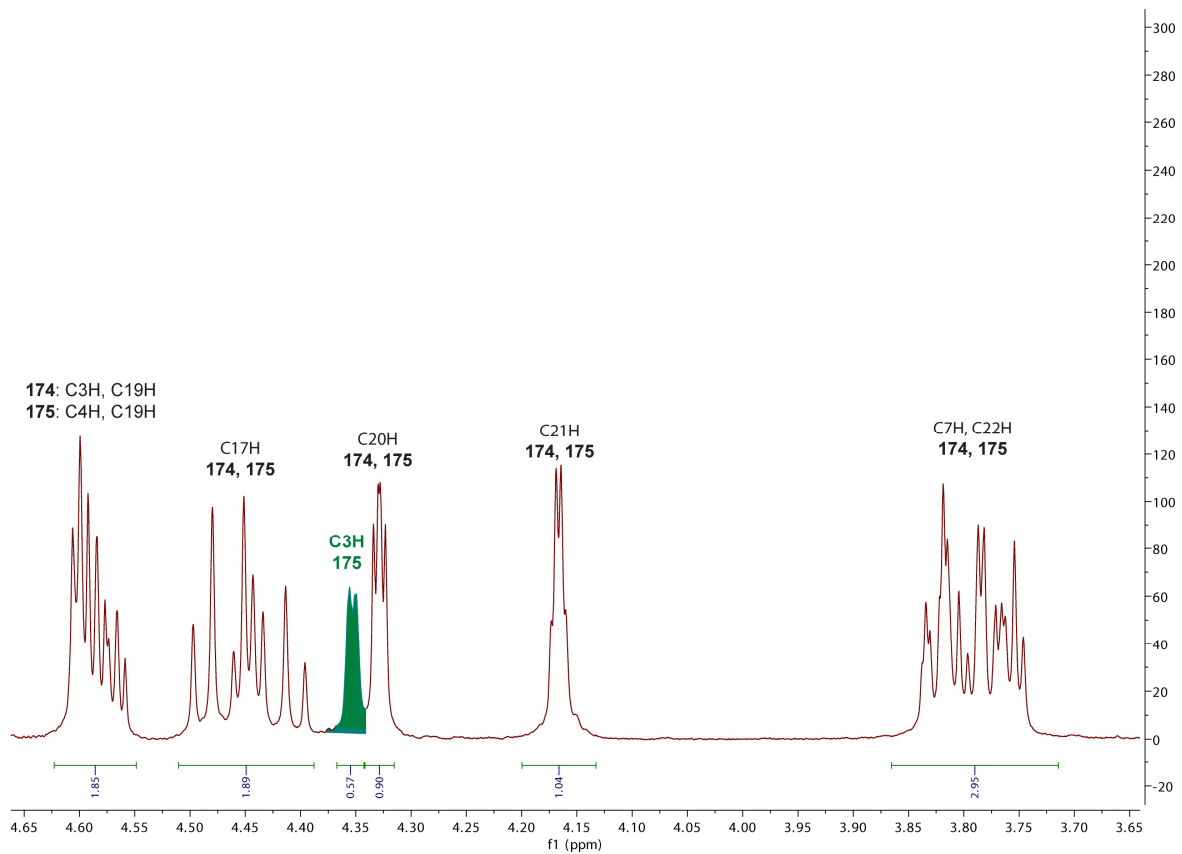
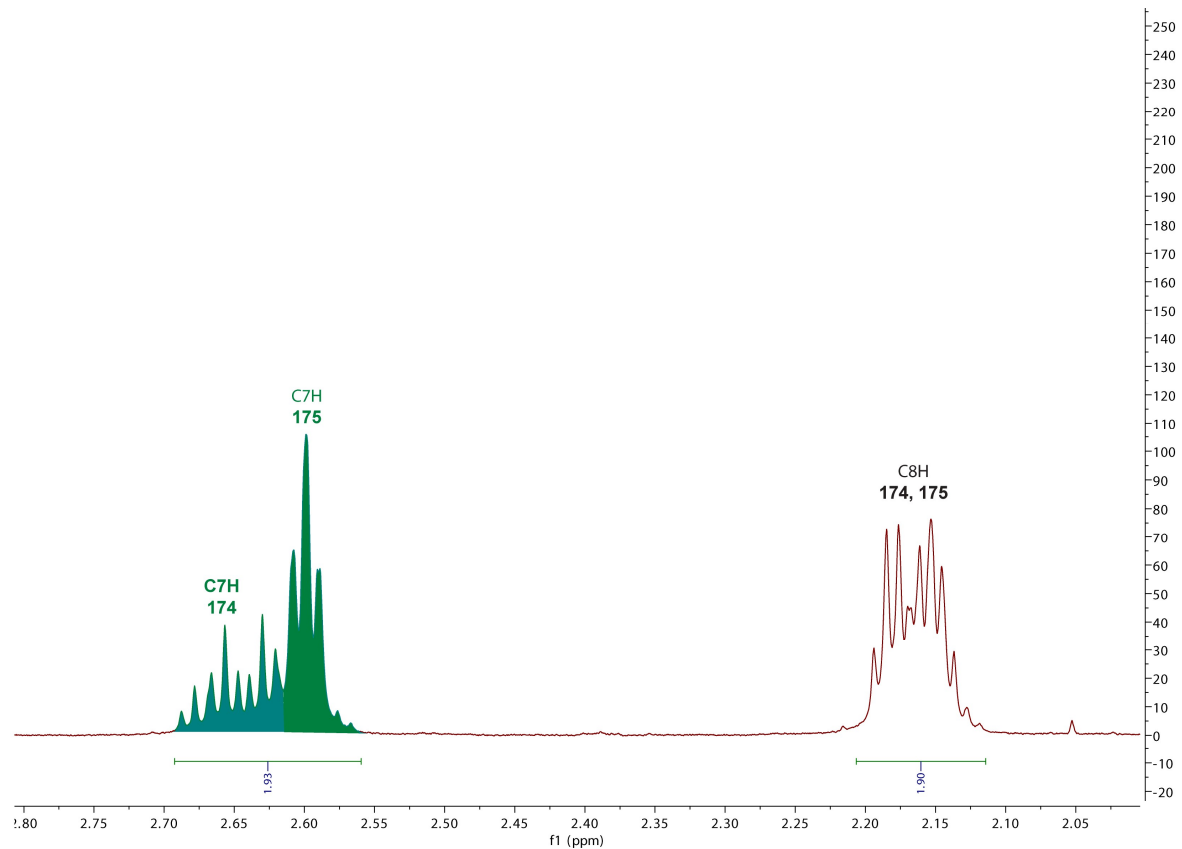
HMBC (165+166) mit den C5H-C6- (166) und den C4H-C6-crosspeaks (165)

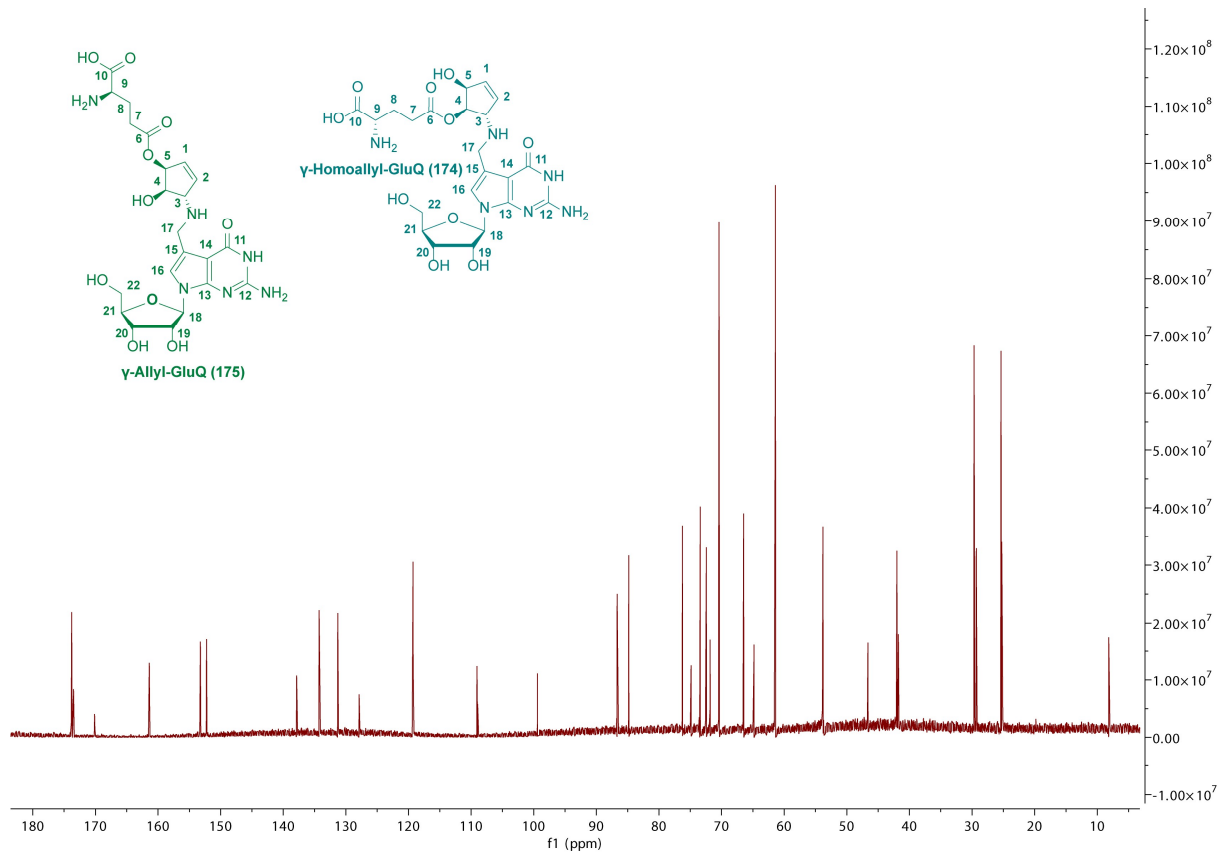


1H -NMR (174+175)

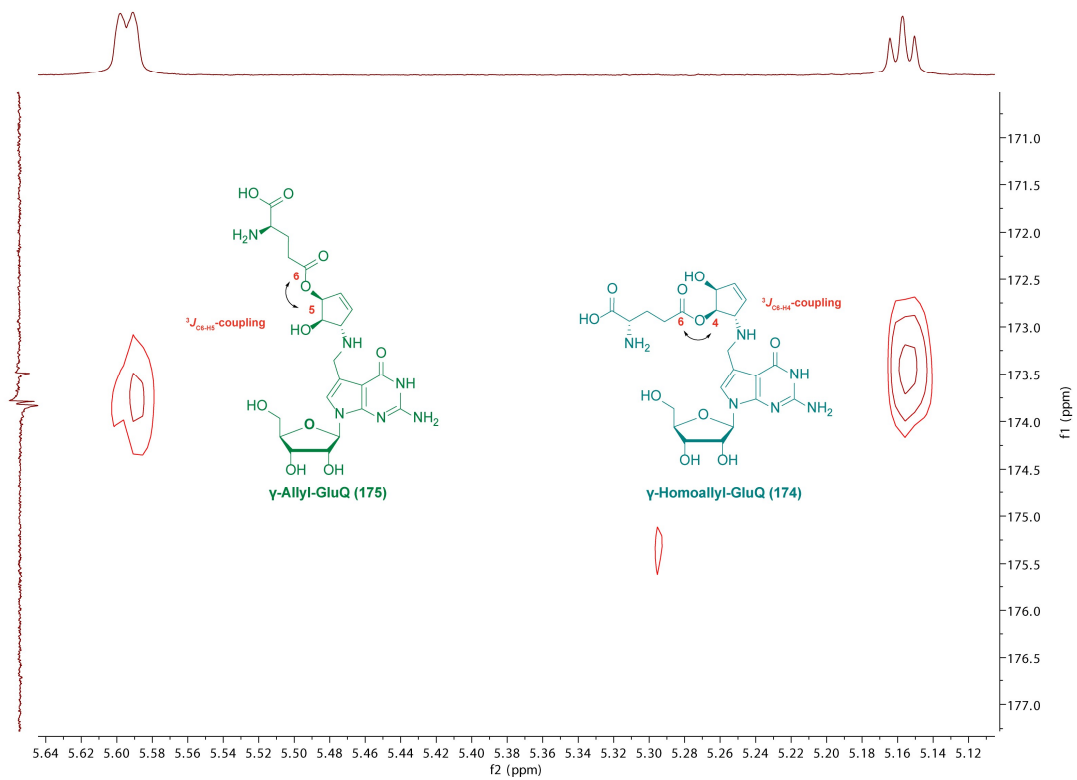


$^1\text{H-NMR}$ (174+175) – Zoom auf C16 $^1\text{H-NMR}$ (174+175) – Zoom auf den oberen Bereich

$^1\text{H-NMR}$ (174+175) – Zoom auf den mittleren Bereich $^1\text{H-NMR}$ (174+175) – Zoom auf den unteren Bereich

^{13}C -NMR (174+175)

HMBC (174+175) mit den C5H-C6- (175) and the C4H-C6-crosspeaks (174).



8 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] F. Crick, *Nature* **1970**, 227, 561-563.
- [2] M. Morange, *Resonance* **2009**, 14, 236-247.
- [3] M. Cobb, *PLOS Biol.* **2017**, 15, e2003243.
- [4] E. Dolgin, *Nature* **2021**, 597, 318-324.
- [5] M. J. Hogan, N. Pardi, *Annu. Rev. Med.* **2022**, 73, 17-39.
- [6] J. Chen, J. Chen, Q. Xu, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2022**, 24, 85-109.
- [7] K. Kruger, P. J. Grabowski, A. J. Zaug, J. Sands, D. E. Gottschling, T. R. Cech, *Cell* **1982**, 31, 147-157.
- [8] T. J. Wilson, D. M. J. Lilley, *RNA* **2015**, 21, 534-537.
- [9] N. K. Tanner, *FEMS Microbiol. Rev.* **1999**, 23, 257-275.
- [10] S. Altman, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1990**, 29, 749-758.
- [11] S. Altman, C. Gurrier-Takada, *Science* **1984**, 223, 285-286.
- [12] R. M. Anderson, M. Kwon, S. A. Strobel, *J. Mol. Evol.* **2007**, 64, 472-483.
- [13] M. P. Robertson, G. F. Joyce, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2012**, 4, a003608-a003608.
- [14] G. F. Joyce, *Nature* **2002**, 418, 214-221.
- [15] A. Bastide, A. David, *Biomolecules* **2018**, 8.
- [16] J. Ulvila, D. Hultmark, M. Rämetsä, *Scand. J. Immunol.* **2010**, 71, 146-158.
- [17] N. Pumphlin, O. Voinnet, *Nat. Rev. Microbiol.* **2013**, 11, 745-760.
- [18] D. H. Kim, J. J. Rossi, *Biotechniques* **2008**, 44, 613-616.
- [19] T. Cech, J. Steitz, *Cell* **2014**, 157, 77-94.
- [20] S. Geisler, J. Collier, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2013**, 14, 699-712.
- [21] J. A. Martens, *Genes Dev.* **2005**, 19, 2695-2704.
- [22] M. G. A. Khalil, M. Huarte, M. Garbera, A. Rajd, D. Rivea Morales, K. Thomas, A. Presser, B. Bernstein, A. van Oudenaardend, A. Regeva, E. Landera, J. Rinn, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, 106, 11667-11672.
- [23] P. Boccaletto, F. Stefaniak, A. Ray, A. Cappannini, S. Mukherjee, E. Purta, M. Kurkowska, N. Shirvanizadeh, E. Destefanis, P. Groza, G. Avşar, A. Romitelli, P. Pir, E. Dassi, S. G. Conticello, F. Aguilo, J. M. Bujnicki, *Nucleic Acids Res.* **2022**, 50, D231-D235.
- [24] K. E. Sloan, A. S. Warda, S. Sharma, K.-D. Entian, D. L. J. Lafontaine, M. T. Bohnsack, *RNA Biol.* **2017**, 14, 1138-1152.
- [25] J. E. Jackman, J. D. Alfonzo, *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **2013**, 4, 35-48.
- [26] T. Pan, *Cell Res.* **2018**, 28, 395-404.
- [27] J. Jiang, H. Seo, C. S. Chow, *Acc. Chem. Res.* **2016**, 49, 893-901.
- [28] H. Zachau, *Angew. Chem.* **1969**, 17, 645-662.
- [29] G. Steger, Birkhäuser Basel, **2003**, pp. 3-37.
- [30] J. Zhang, D. A. R. Ferre, *Biomolecules* **2016**, 6.
- [31] S. Chladek, M. Sprinzl, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1985**, 24, 371-391.
- [32] M. Liu, W. Chu, J. Liu, J. Horowitz, *Nucleic Acids Res.* **1997**, 25, 4883-4890.
- [33] M. A. Swairjo, F. J. Otero, X.-L. Yang, M. A. Lovato, R. J. Skene, D. E. McRee, L. R. De Pouplana, P. Schimmel, *Mol. Cell.* **2004**, 13, 829-841.
- [34] R. T. Byrne, A. L. Konevega, M. V. Rodnina, A. A. Antson, *Nucleic Acids Res.* **2010**, 38, 4154-4162.
- [35] R. Giegé, M. Sissler, C. Florentz, *Nucleic Acids Res.* **1998**, 26.
- [36] T. Hendrickson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, 98, 13473-13475.
- [37] C. W. Chan, B. Chetnani, A. Mondragón, *WIREs RNA* **2013**, 4, 507-522.
- [38] C. Lorenz, C. E. Lünse, M. Morl, *Biomolecules* **2017**, 7.
- [39] R. Giegé, F. Jühling, J. Pütz, P. Stadler, C. Sauter, C. Florentz, *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **2012**, 3, 37-61.

- [40] R. Giegé, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2008**, *15*, 1007-1014.
- [41] L. Han, E. M. Phizicky, *RNA* **2018**, *24*, 1277-1284.
- [42] T. Suzuki, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2021**, *22*, 375-392.
- [43] M. Heiss, F. Hagelskamp, V. Marchand, Y. Motorin, S. Kellner, *Nat. Commun.* **2021**, *12*.
- [44] T. Carell, C. Brandmayr, A. Hienzsch, M. Müller, D. Pearson, V. Reiter, I. Thoma, P. Thumbs, M. Wagner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 7110-7131.
- [45] Y. Motorin, M. Helm, *Biochemistry* **2010**, *49*, 4934-4944.
- [46] M. Helm, H. Brule, F. Degoul, C. Capanec, J. Leroux, R. Giege, C. Florentz, *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 1636-1643.
- [47] S. Oerum, C. Dégut, P. Barraud, C. Tisné, *Biomolecules* **2017**, *7*, 20.
- [48] M. Helm, R. Giegé, C. Florentz, *Biochemistry* **1999**, *38*, 13338-13346.
- [49] G. R. Bjork, T. G. Hagervall, *EcoSal Plus* **2014**, *6*.
- [50] M. W. Kilpatrick, R. T. Walker, *Nucleic Acids Res.* **1981**, *9*, 4387-4390.
- [51] M. Watanabe, M. Matsuo, S. Tanaka, H. Akimoto, S. Asahi, S. Nishimura, J. R. Katze, T. Hashizume, P. F. Crain, J. A. McCloskey, N. Okada, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 20146-20151.
- [52] J. M. Gregson, P. F. Crain, C. G. Edmonds, R. Gupta, T. Hashizume, D. W. Phillipson, J. A. McCloskey, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 10076-10086.
- [53] T. Brückl, I. Thoma, A. J. Wagner, P. Knochel, T. Carell, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, *2010*, 6517-6519.
- [54] F. Klepper, Dissertation, *Synthese der natürlichen tRNA Nukleosidmodifikationen Queuosin und Archaeosin*, Dissertation, LMU München **2007**.
- [55] M. Helm, J. D. Alfonzo, *Chem Biol* **2014**, *21*, 174-185.
- [56] X. Ou, J. Cao, A. Cheng, M. P. Peppelenbosch, Q. Pan, *PLoS Genet.* **2019**, *15*, e1008017.
- [57] D. Zhang, D. Chen, L. Cao, G. Li, H. Cheng, *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0148302.
- [58] D. A. Drummond, C. O. Wilke, *Nat. Rev. Genet.* **2009**, *10*, 715-724.
- [59] J. Urbonavičius, Q. Qian, J. M.B. Durand, T. G. Hagervall G. R. Björk, *EMBO J.* **2001**, *20*, 4863-4873.
- [60] J. Urbonavičius, G. Stahl, J. M. B. Durand, S. N. Ben Salem, Q. Qian, P. J. Farabaugh, G. R. Björk, *RNA* **2003**, *9*, 760-768.
- [61] S. J. Nasvall, K. Nilsson, G. R. Bjork, *J. Mol. Biol.* **2009**, *385*, 350-367.
- [62] N. Manickam, K. Joshi, M. J. Bhatt, P. J. Farabaugh, *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, 1871-1881.
- [63] F. Tuorto, F. Lyko, *Open Biol.* **2016**, *6*, 160287.
- [64] Y.-M. Hou, H. Gamper, W. Yang, *RNA* **2015**, *21*, 642-644.
- [65] P. Agris, *Biochimie* **1991**, *73*, 1345-1349.
- [66] I. Avcilar-Kucukgoze, A. Kashina, *Front. Mol. Biosci.* **2020**, *7*, 610617.
- [67] J. L. Chaney, P. L. Clark, *Annu. Rev. Biophys.* **2015**, *44*, 143-166.
- [68] C. E. Brule, E. J. Grayhack, *Trends Genet.* **2017**, *33*, 283-297.
- [69] F. Crick, *J. Mol. Biol.* **1966**, *19*, 548-555.
- [70] S. J. Näsvall, P. Chen, G. R. Björk, *RNA* **2007**, *13*, 2151-2164.
- [71] F. V. Murphy, V. Ramakrishnan, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2004**, *11*, 1251-1252.
- [72] P. F. Agris, F. A. Vendeix, W. D. Graham, *J. Mol. Biol.* **2007**, *366*, 1-13.
- [73] P. F. Agris, E. R. Eruysal, A. Narendran, V. Y. P. Väre, S. Vangaveti, S. V. Ranganathan, *RNA ce.* **2018**, *15*, 537-553.
- [74] L. Lei, Z. F. Burton, *Life* **2022**, *12*, 252.
- [75] E. M. Gustilo, F. A. Vendeix, P. F. Agris, *Curr. Opin. Microbiol.* **2008**, *11*, 134-140.
- [76] M. H. Saier, *FEBS Lett.* **1995**, *362*, 1-4.
- [77] F. Harada, S. Nishimura, *Biochemistry* **1972**, *11*, 301-308.
- [78] H. Kasai, Y. Kuchino, K. Nihei, S. Nishimura, *Nucleic Acids Res.* **1975**, *2*, 1931-1940.
- [79] H. Kasai, Z. Ohashi, F. Harada, S. Nishimura, N. J. Oppenheimer, P. F. Crain, J. G. Liehr, D. L. von Minden, J. A. McCloskey, *Biochemistry*, *14*, 4198-4208.

- [80] S. Yokoyama, T. Miyazawa, Y. Iitaka, Z. Yamaizumi, H. Kasai, S. Nishimura, *Nature* **1979**, *282*, 107-109.
- [81] H. M. Goodman, J. Abelson, A. Landy, S. Brenner, J. D. Smith, *Nature* **1968**, *217*, 1019-1024.
- [82] H. M. Goodman, J. N. Abelson, A. Landy, S. Zadrzil, J. D. Smith, *Eur. J. Biochem.* **1970**, *13*, 461-483.
- [83] B. P. Doctor, J. E. Loebel, M. A. Sodd, D. B. Winter, *Science* **1969**, *163*, 693-695.
- [84] T. Ohgi, T. Kondo, T. Goto, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 3629-3633.
- [85] T. Ohgi, T. Goto, H. Kasai, S. Nishimura, *Tetrahedron Lett.* **1976**, *5*, 367-370.
- [86] S. Nishimura, **1983**, pp. 49-73.
- [87] C. Fergus, D. Barnes, M. Alqasem, V. Kelly, *Nutrients* **2015**, *7*, 2897-2929.
- [88] W. R. Farkas, *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 6832-6835.
- [89] J. R. Katze, B. Basile, J. A. McCloskey, *Science* **1982**, *216*, 55-56.
- [90] J. P. Reyniers, J. R. Pleasants, B. S. Wostmann, J. R. Katze, W. R. Farkas, *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 11591-11594.
- [91] S. Johannsson, P. Neumann, R. Ficner, *Biomolecules* **2018**, *8*, 81.
- [92] Y.-C. Chen, V. P. Kelly, S. V. Stachura, G. A. Garcia, *RNA* **2010**, *16*, 958-968.
- [93] M. A. Alqasem, C. Fergus, J. M. Southern, S. J. Connon, V. P. Kelly, *ChemComm.* **2020**, *56*, 3915-3918.
- [94] N. Shindo-Okada, N. Okada, T. Ohgi, T. Goto, S. Nishimura, *Biochemistry* **1980**, *19*, 395-400.
- [95] C. Fergus, M. Al-Qasem, M. Cotter, C. M. McDonnell, E. Sorrentino, F. Chevot, K. Hokamp, M. O. Senge, John, S. J. Connon, V. P. Kelly, *Nucleic Acids Res.* **2021**, *49*, 4877-4890.
- [96] U. Gündüz, J. R. Katze, *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 1110-1113.
- [97] J. R. Katze, U. Gündüz, D. L. Smith, C. S. Cheng, J. A. McCloskey, *Biochemistry* **1984**, *23*, 1171-1176.
- [98] U. Gündüz, J. R. Katze, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1982**, *109*, 159-167.
- [99] R. Zallot, C. Brochier-Armanet, K. W. Gaston, F. Forouhar, P. A. Limbach, J. F. Hunt, V. De Crécy-Lagard, *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 1812-1825.
- [100] M. S. Elliott, R. W. Trewyn, J. R. Katze, *Cancer Res.* **1985**, *45*, 1079-1085.
- [101] M. S. Elliott, J. R. Katze, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 13019-13025.
- [102] F. Tuorto, C. Legrand, C. Cirzi, G. Federico, R. Liebers, M. Müller, A. E. Ehrenhofer-Murray, G. Dittmar, H. J. Gröne, F. Lyko, *EMBO J.* **2018**, *37*, e99777.
- [103] M. Müller, C. Legrand, F. Tuorto, V. P. Kelly, Y. Atlasi, F. Lyko, A. E. Ehrenhofer-Murray, *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, 3711-3727.
- [104] M. Heiss, Dissertation, *NAIL-MS Untersuchung von RNA-Modifikationen in eukaryotischen Modellorganismen*, Dissertation, LMU München **2021**.
- [105] M. Bienz, E. Kubli, *Nature* **1981**, *294*, 188-190.
- [106] H. Beier, M. Barciszewska, H.-D. Sickinger, *EMBO J.* **1984**, *3*, 1091-1096.
- [107] K. Zeffass, H. Beier, *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20*, 5911-5918.
- [108] T. Ensfelder, Dissertation, *Studie zu seltenen RNA-Modifikationen*, Dissertation, LMU München **2020**.
- [109] G. Ott, H. Kersten, *Biol. Chem. Hoppe Seyler* **1985**, *366*, 69-76.
- [110] T. Marks, W. R. Farkas, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, *230*, 233-237.
- [111] T. Nagatsu, I. Nagatsu, *J. Neural. Transm.* **2016**, *123*, 1255-1278.
- [112] T. Rakovich, C. Boland, I. Bernstein, V. M. Chikwana, D. Iwata-Reuyl, V. P. Kelly, *J Biol. Chem.* **2011**, *286*, 19354-19363.
- [113] A. Ehrenhofer-Murray, *Biomolecules* **2017**, *7*, 14.
- [114] M. Müller, M. Hartmann, I. Schuster, S. Bender, K. L. Thüring, M. Helm, J. R. Katze, W. Nellen, F. Lyko, A. E. Ehrenhofer-Murray, *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, 10952-10962.
- [115] S. Johannsson, P. Neumann, A. Wulf, L. M. Welp, H.-D. Gerber, M. Krull, U. Diederichsen, H. Urlaub, R. Ficner, *Sci. Rep.* **2018**, *8*.

- [116] M. Schaefer, T. Pollex, K. Hanna, F. Tuorto, M. Meusburger, M. Helm, F. Lyko, *Genes Dev.* **2010**, *24*, 1590-1595.
- [117] F. Tuorto, R. Liebers, T. Musch, M. Schaefer, S. Hofmann, S. Kellner, M. Frye, M. Helm, G. Stoecklin, F. Lyko, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2012**, *19*, 900-905.
- [118] L. Flemmich, S. Heel, S. Moreno, K. Breuker, R. Micura, *Nat. Commun.* **2021**, *12*.
- [119] R. Morris, M. Galicia, K. Clase, M. S. Elliott, *Mol. Genet. Metab.* **1999**, *68*, 56-57.
- [120] P. Richard, L. Kozlowski, H. Guillorit, P. Garnier, N. C. McKnight, A. Danchin, X. Manière, *PLoS ONE* **2021**, *16*, e0253216.
- [121] C. A. D. Costa, W. E. Manaa, E. Duplan, F. Checler, *Cells* **2020**, *9*, 2495.
- [122] J. J. Hoozemans, E. S. van Haastert, P. Eikelenboom, R. A. de Vos, J. M. Rozemuller, W. Scheper, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**, *354*, 707-711.
- [123] A. Martinez, N. Lopez, C. Gonzalez, C. Hetz, *Biol Cell* **2019**, *111*, 161-168.
- [124] T. Muller, H. M. Thiede, *J. Neural Transm. (Vienna)* **2019**, *126*, 1417-1420.
- [125] C. Hetz, K. Zhang, R. J. Kaufman, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2020**, *21*, 421-438.
- [126] S. S. Cao, R. J. Kaufman, *Curr. Biol.* **2012**, *22*, R622-R626.
- [127] T. Suzuki, Y. Yashiro, I. Kikuchi, Y. Ishigami, H. Saito, I. Matsuzawa, S. Okada, M. Mito, S. Iwasaki, D. Ma, X. Zhao, K. Asano, H. Lin, Y. Kirino, Y. Sakaguchi, T. Suzuki, *Nat. Commun.* **2020**, *11*.
- [128] S. Varghese, M. Cotter, F. Chevot, C. Fergus, C. Cunningham, K. H. Mills, S. J. Connon, J. M. Southern, V. P. Kelly, *Nucleic Acids Res.* **2016**, gkw847.
- [129] B. Huang, R. Wu, K. Chien, *Cancer Res.* **1992**, *52*, 4696-4700.
- [130] P. Hayes, C. Fergus, M. Ghanim, C. Cirzi, L. Burtnyak, C. J. McGrenaghan, F. Tuorto, D. P. Nolan, V. P. Kelly, *Nutrients* **2020**, *12*, 871.
- [131] P. Vaupel, G. Multhoff, *J. Physiol.* **2021**, *599*, 1745-1757.
- [132] M. V. Liberti, J. W. Locasale, *Trends Biochem. Sci.* **2016**, *41*, 211-218.
- [133] J. Zhang, R. Lu, Y. Zhang, Ż. Matuszek, W. Zhang, Y. Xia, T. Pan, J. Sun, *Cancers* **2020**, *12*, 628.
- [134] K. Kumari, P. Groza, F. Aguilo, *NAR Cancer* **2021**, *3*, zcab036.
- [135] M. Vinayak, C. Pathak, *Biosci. Rep.* **2009**, *30*, 135-148.
- [136] G. Phillips, B. El Yacoubi, B. Lyons, S. Alvarez, D. Iwata-Reuyl, V. de Crecy-Lagard, *J. Bacteriol.* **2008**, *190*, 7876-7884.
- [137] R. M. McCarty, Á. Somogyi, V. Bandarian, *Biochemistry* **2009**, *48*, 2301-2303.
- [138] D. P. Dowling, N. A. Bruender, A. P. Young, R. M. McCarty, V. Bandarian, C. L. Drennan, *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10*, 106-112.
- [139] R. M. McCarty, Á. Somogyi, G. Lin, N. E. Jacobsen, V. Bandarian, *Biochemistry* **2009**, *48*, 3847-3852.
- [140] J. S. Reader, D. Metzgar, P. Schimmel, V. De Crécy-Lagard, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 6280-6285.
- [141] J. Jung, T. Czabany, B. Wilding, N. Klempier, B. Nidetzky, *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 25411-25426.
- [142] S. G. Van Lanen, J. S. Reader, M. A. Swairjo, V. de Crecy-Lagard, B. Lee, D. Iwata-Reuyl, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 4264-4269.
- [143] A. Roth, W. C. Winkler, E. E. Regulski, B. W. K. Lee, J. Lim, I. Jona, J. E. Barrick, A. Ritwik, J. N. Kim, R. Welz, D. Iwata-Reuyl, R. R. Breaker, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2007**, *14*, 308-317.
- [144] R. C. Spitale, A. T. Torelli, J. Krucinska, V. Bandarian, J. E. Wedekind, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 11012-11016.
- [145] E. Neuner, M. Frener, A. Lusser, R. Micura, *RNA Biol* **2018**, *15*, 1376-1383.
- [146] B. Sarkar, K. Ishii, T. Tahara, *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143*, 7968-7978.
- [147] N. Okada, N. Shindo-Okada, S. Sato, Y. H. Ito, K. Oda, S. Nishimura, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1978**, *75*, 4247-4251.
- [148] N. Okada, S. Nishimura, *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 3061-3066.
- [149] N. Okada, S. Noguchi, H. Kasai, N. Shindo-Okada, T. Ohgi, T. Goto, S. Nishimura, *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 3067-3073.

- [150] W. Xie, X. Liu, R. H. Huang, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2003**, *10*, 781-788.
- [151] S. G. Van Lanen, D. Iwata-Reuyl, *Biochemistry* **2003**, *42*, 5312-5320.
- [152] R. Slany, M. Bösl, H. Kersten, *Biochimie* **1994**, *76*, 389-393.
- [153] K. Reuter, R. Slany, F. Ullrich, H. Kersten, *J. Bacteriol.* **1991**, *173*, 2256-2264.
- [154] K. A. P. Payne, K. Fisher, H. Sjuts, M. S. Dunstan, B. Bellina, L. Johannissen, P. Barran, S. Hay, S. E. J. Rigby, D. Leys, *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 27572-27581.
- [155] Z. D. Miles, R. M. McCarty, G. Molnar, V. Bandarian, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 7368-7372.
- [156] Z. D. Miles, W. K. Myers, W. M. Kincannon, R. D. Britt, V. Bandarian, *Biochemistry* **2015**, *54*, 4927-4935.
- [157] Q. Li, R. Zallot, B. S. Mactavish, A. Montoya, D. J. Payan, Y. Hu, J. A. Gerlt, A. Angerhofer, V. De Crécy-Lagard, S. D. Bruner, *Biochemistry* **2021**, *60*, 3152-3161.
- [158] T. Kondo, T. Ohgi, T. Goto, *Agric. Biol. Chem.* **1977**, *41*, 1501-1507.
- [159] T. Ohgi, T. Goto, H. Kasai, S. Nishimura, *Tetrahedron Lett.* **1976**, *17*, 367-370.
- [160] T. Kondo, K. Okamoto, T. Ohgi, T. Goto, *Tetrahedron* **1986**, *42*, 207-213.
- [161] T. Kondo, K. Okamoto, M. Yamamoto, T. Goto, N. Tanaka, *Tetrahedron* **1986**, *42*, 199-205.
- [162] S. Warren, P. Wyatt, *Organic Synthesis: The Disconnection Approach*, 2nd ed., Wiley VCH, Weinheim, **2008**.
- [163] F. Klepper, E.-M. Jahn, V. Hickmann, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 2325-2327.
- [164] T. Kondo, T. Ohgi, T. Goto, *Chem. Lett.* **1983**, 419-422.
- [165] H. Akimoto, E. Imamiya, T. Hitaka, H. Nomura, S. Nishimura, *J. Chem. Soc., Perkin trans. 1* **1988**, 1637.
- [166] C. J. Barnett, L. M. Grubb, *Tetrahedron* **2000**, *56*, 9221-9225.
- [167] A. F. Brooks, G. A. Garcia, H. D. H. Showalter, *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 4163-4165.
- [168] A. Brooks, Dissertation, *Synthesis of Tritium Labeled Queuine, PreQ1 and Related Azide Probes Toward Examining the Prevalence of Queuine*, Dissertation, University of Michigan **2012**.
- [169] M. Krull, Dissertation, *Synthesis of rare Nucleobases and artificial Nucleotides for Investigation of catalytic Enzyme Activity*, Dissertation, Universität Göttingen **2019**.
- [170] M. M. K. Boysen, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 8648-8659.
- [171] B. M. Trost, M. T. Sorum, *Org. Process Res. Dev.* **2003**, *7*, 432-435.
- [172] K. Tanaka, K. Ogasawara, *Synthesis* **1996**, *1996*, 219-222.
- [173] H. Ovaa, J. D. C. Codée, B. Lastdrager, H. S. Overkleeft, G. A. Van Der Marel, J. H. Van Boom, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 7987-7990.
- [174] K.-H. Kim, M. J. Miller, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 4571-4573.
- [175] M. Blaise, H. D. Becker, G. Keith, C. Cambillau, J. Lapointe, R. Giege, D. Kern, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 2768-2775.
- [176] J. Salazar, A. Ambrogelly, P. Crain, J. McCloskey, D. Söll, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *101*, 7536-7541.
- [177] M. Blaise, H. D. Becker, J. Lapointe, C. Cambillau, R. Giege, D. Kern, *Biochimie* **2005**, *87*, 847-861.
- [178] H. Grosjean, V. de Crécy-Lagard, G. R. Bjork, *Trends Biochem. Sci.* **2004**, *29*, 519-522.
- [179] M. Blaise, V. Olieric, C. Sauter, B. Lorber, B. Roy, S. Karmakar, R. Banerjee, H. D. Becker, D. Kern, *J. Mol. Biol.* **2008**, *381*, 1224-1237.
- [180] V. Caballero, V. Toledo, C. Maturana, C. Fisher, S. Payne, J. Salazar, *BMC Microbiol.* **2012**, *12*.
- [181] H. Kasai, K. Nakanishi, R. D. Macfarlane, D. F. Torgerson, Z. Ohashi, J. A. McCloskey, H. J. Gross, S. Nishimura, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 5044-5046.
- [182] R. Lemieux, J. Stevens, *Can. J. Chem.* **1966**, *44*, 249-262.

- [183] T. Lindhorst, *Essentials of Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, Wiley-VCH, Weinheim, **2006**.
- [184] P. Thumbs, Dissertation, *Synthese der natürlichen tRNA-Modifikation Galaktosylqueuosin und Untersuchungen zur Struktur der natürlichen tRNA-Modifikation Mannosylqueuosin*, Dissertation, LMU München **2013**.
- [185] N. Okada, S. Nishimura, *Nucleic Acids Res.* **1977**, *4*, 2931-2937.
- [186] P. Thumbs, T. T. Ensfelder, M. Hillmeier, M. Wagner, M. Heiss, C. Scheel, A. Schön, M. Müller, S. Michalakis, S. Kellner, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 12352-12356.
- [187] R. Brem, I. Daehn, P. Karran, *DNA Repair (Amst)* **2011**, *10*, 869-876.
- [188] T. Nishioka, I. Oshiro, K. Onizuka, Y. Taniguchi, S. Sasaki, *Chem. Pharm. Bull.* **2016**, *64*, 1315-1320.
- [189] R.-W. Wang, B. Gold, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 2465-2468.
- [190] Q. Ma, J. He, *Ann. Transl. Med.* **2020**, *8*, 1658-1658.
- [191] S. V. Pushkarev, V. A. Vinnik, I. V. Shapovalova, V. K. Švedas, D. K. Nilov, *Biochem. (Mosc.)* **2022**, *87*, 443-449.
- [192] H.T. Abelson, L. F. Johnson, S. Penman, H. Green, *Cell* **1974**, *1*, 161-165.
- [193] U. Karnahl, C. Wasternack, *Int. J. Biochem.* **1992**, *24*, 493-497.
- [194] Q. Gueranger, A. Kia, D. Frith, P. Karran, *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, 5057-5066.
- [195] J. Dong, C. Huang, S. Guo, Y. Xia, Y. Hou, C. Yang, X. Zhang, J. Jie, B.-Z. Zhu, H. Su, *J. Phys. Chem. B* **2022**, *126*, 14-22.
- [196] A. Favre, C. Saintome, J. Fourrey, P. Clivio, P. Laugaa, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **1998**, *42*, 109-124.
- [197] H. Akimoto, H. Nomura, M. Yoshida, N. Shindo-Okada, A. Hoshi, S. Nishimura, *J. Med. Chem.* **1986**, *29*, 1749-1753.
- [198] R. Rodebaugh, J. Debenham, B. Fraser-Reid, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 5477-5478.
- [199] F. R. Traube, S. Schiffers, K. Iwan, S. Kellner, F. Spada, M. Muller, T. Carell, *Nat. Protoc.* **2019**, *14*, 283-312.
- [200] J.-L. Abad, B. L. Gaffney, R. A. Jones, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 6575-6582.
- [201] J. Levic, R. Micura, *Beilstein J. Org. Chem.* **2014**, *10*, 1914-1918.
- [202] A. K. Mailyan, J. L. Chen, W. Li, A. A. Keller, S. M. Sternisha, B. G. Miller, A. Zakarian, *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 6027-6032.
- [203] J. S. Weinger, S. A. Strobel, *Biochemistry* **2006**, *45*, 5939-5948.
- [204] M. Englert, S. Moses, M. Hohn, J. Ling, P. O'Donoghue, D. Soll, *FEBS Lett.* **2013**, *587*, 3360-3364.
- [205] C. Reese, D. Trentham, *Tetrahedron Lett.* **1965**, *29*, 2467-2172.
- [206] B. E. Griffin, M. Jarman, C. B. Reese, J. E. Sulston, D. R. Trentham, *Biochemistry* **1966**, *5*, 3638-3649.
- [207] M. Taiji, S. Yokoyama, T. Miyazawa, *Biochemistry* **1983**, *22*, 3220-3225.
- [208] D. Dubois, M. Blaise, H. D. Becker, V. Campanacci, G. Keith, R. Giege, C. Cambillau, J. Lapointe, D. Kern, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 7530-7535.
- [209] E. Merino, K. Wilkinson, J. Coughlan, K. Weeks, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 4223-4231.
- [210] N. G. Anthony, J. Baiget, G. Berretta, M. Boyd, D. Breen, J. Edwards, C. Gamble, A. I. Gray, A. L. Harvey, S. Hatzieremia, K. H. Ho, J. K. Huggan, S. Lang, S. Llona-Minguez, J. L. Luo, K. McIntosh, A. Paul, R. J. Plevin, M. N. Robertson, R. Scott, C. J. Suckling, O. B. Sutcliffe, L. C. Young, S. P. Mackay, *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 7043-7066.