

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

Synthese der natürlichen tRNA
Nukleosidmodifikationen
Queuosin und Archaeosin

Florian Klepper

aus

Darmstadt

2007

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von Paragraph 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Prof. Dr. Thomas Carell betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 5. Februar 2007

Florian Klepper

Dissertation eingereicht am 5. Februar 2007

1. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Carell
2. Gutachter: Prof. Dr. Paul Knochel

Mündliche Prüfung am 5. März 2007

Die Wissenschaft fängt eigentlich erst da an interessant zu werden, wo sie aufhört.

Justus von Liebig

Publikationen:

F. Klepper, E.-M. Jahn, T. Carell, Synthesis of the tRNA Nucleoside Queuosine using a Chiral Allyl-Azide Intermediate, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 13, 2325-2327.

F. Klepper, K. Polborn, T. Carell, Robust synthesis and crystal-structure analysis of 7-cyano-7-deazaguanine (PreQ₀ base) and 7-(aminomethyl)-7-deazaguanine (PreQ₁ base), *Helv. Chim. Acta* **2005**, *88*, 10, 2610-2616.

Vorträge und Posterpräsentationen:

F. Klepper, T. Carell, *Queuosine, a natural tRNA hypermodification*, Posterpräsentation, 1st European Chemistry Congress, Budapest, Ungarn, Aug. 2006

F. Klepper, T. Carell, *Synthesis of the tRNA modification Queuosine*, Vortrag, 2nd Nucleic Acid Chemical Biology (NACB) PhD Summer School, Odense, Dänemark, Jun. 2006

F. Klepper, E.-M. Jahn, T. Carell, *Synthesis of the tRNA modifications Archaeosine and Queuosine*, Posterpräsentation, Nucleic Acid Research Symposium, Aug. 2005

F. Klepper, T. Carell, *Synthese natürlicher, modifizierter tRNA Nucleoside*, Vortrag, BASF, Ludwigshafen, Mai 2005

F. Klepper, T. Carell, *Synthesis of the tRNA modification Queuosine*, Posterpräsentation, Nucleic Acids in Chemistry and Biology, Sheffield, England, Sep. 2005

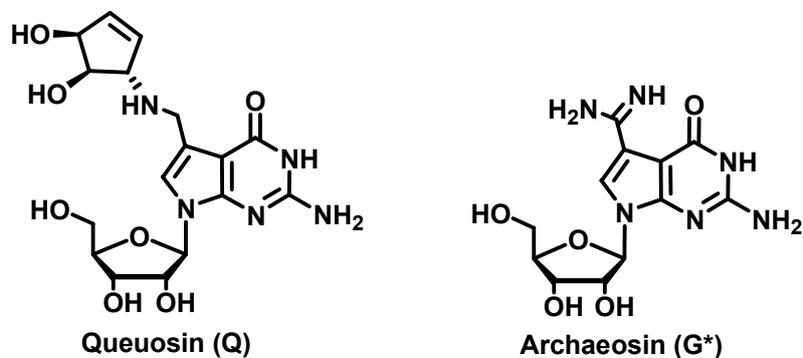
Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----|
| Inhaltsverzeichnis..... | I |
| Zusammenfassung..... | III |
| Summary..... | VI |
| 1. Einleitung..... | 1 |
| 1.1. RNA..... | 1 |
| 1.2. Modifikationen in der RNA..... | 7 |
| 1.3. Queuosin..... | 14 |
| 1.3.1. Struktur und Funktion von Queuosin..... | 14 |
| 1.3.2. Biosynthese von Queuosin..... | 17 |
| 1.3.3. PreQ ₁ als Riboswitch..... | 19 |
| 1.3.4. Chemische Synthese von Queuosin..... | 20 |
| 1.3.5. Chemische Synthese von Queuin..... | 25 |
| 1.4. Archaeosin..... | 32 |
| 1.4.1. Struktur und Funktion von Archaeosin..... | 32 |
| 1.4.2. Biosynthese von Archaeosin..... | 34 |
| 1.4.3. Chemische Synthese der Archaeosin-Base..... | 35 |
| 2. Aufgabenstellung..... | 37 |
| 3. Synthese der natürlichen tRNA Modifikationen Queuosin und Archaeosin..... | 39 |
| 3.1. Synthese von Queuosin..... | 39 |
| 3.1.1. Synthese der Cyclopentenylaminderivate..... | 42 |
| 3.1.2. Alternativroute zur Synthese von Cyclopentenylamin 3..... | 48 |
| 3.1.3. Untersuchung der Allylazid-Umlagerung am <i>Cis-Trans</i> -Alkohol 60..... | 50 |
| 3.1.4. Synthese des galaktosylderivatisierten Cyclopentenylamins 70..... | 52 |
| 3.1.5. Synthese von N ₁ -Queuosin..... | 56 |
| 3.1.6. Synthese von Queuosin..... | 63 |
| 3.2. Synthese von Archaeosin..... | 67 |
| 3.3. Synthese der preQ ₀ und preQ ₁ -Base..... | 75 |
| 4. Zusammenfassung und Ausblick..... | 81 |
| 5. Experimenteller Teil..... | 83 |
| 5.1. Methoden..... | 83 |
| 5.2. Experimente..... | 85 |
| 5.2.1. Synthese von Cyclopentenylamin 3..... | 85 |
| 5.2.2. Cyclopentenylamin Alternativsynthese..... | 93 |
| 5.2.3. Synthese von N ₁ -Queuosin..... | 106 |
| 5.2.4. Synthese von Queuosin..... | 117 |
| 5.2.5. Synthese von Archaeosin..... | 126 |
| 5.2.6. Synthese der PreQ ₁ -Base..... | 136 |
| 6. Abkürzungsverzeichnis..... | 142 |
| 7. Danksagung..... | 144 |
| 8. Literaturverzeichnis..... | 145 |

Zusammenfassung

Es ist schon lange bekannt, dass Ribonukleinsäure (RNA) viele wichtige Funktionen innerhalb der Zelle übernimmt. Im Gegensatz zu Desoxyribonukleinsäure (DNA), die für die Speicherung der genetischen Information zuständig ist, fungiert RNA als wichtiges Intermediat während des Ablesens der genetischen Information und des Übersetzens dieser Information in einen Polypeptidstrang. Dieser faltet sich abschließend zum für die Zelle lebensnotwendigen Protein. Darüber hinaus ist seit kurzem bekannt, dass RNA wichtige Aufgaben innerhalb der Regulation des Metabolismus der Zelle durch *RNA-Interference* und *Riboswitchs* übernimmt.

Um diese Vielfalt gewährleisten zu können, muss RNA extrem variabel und flexibel sein. Dies wird ermöglicht, indem ihr, im Gegensatz zur DNA mit ihren vier Standardbasen, eine große Anzahl an Nukleotidmodifikationen zur Verfügung steht. Neben einfachen Modifikationen, wie am Zucker oder an der Base methylierte Nukleotide, existieren in der RNA, vornehmlich in der tRNA, auch komplexe, in der Zelle aufwändig synthetisierte Nukleotidmodifikationen. Queuosin und Archaeosin gehören zu diesen Hypermodifikationen und besitzen anstelle des Stickstoffatoms an der 7-Position des Heterozyklus einen Kohlenstoff, der eine weitere Funktionalität trägt.

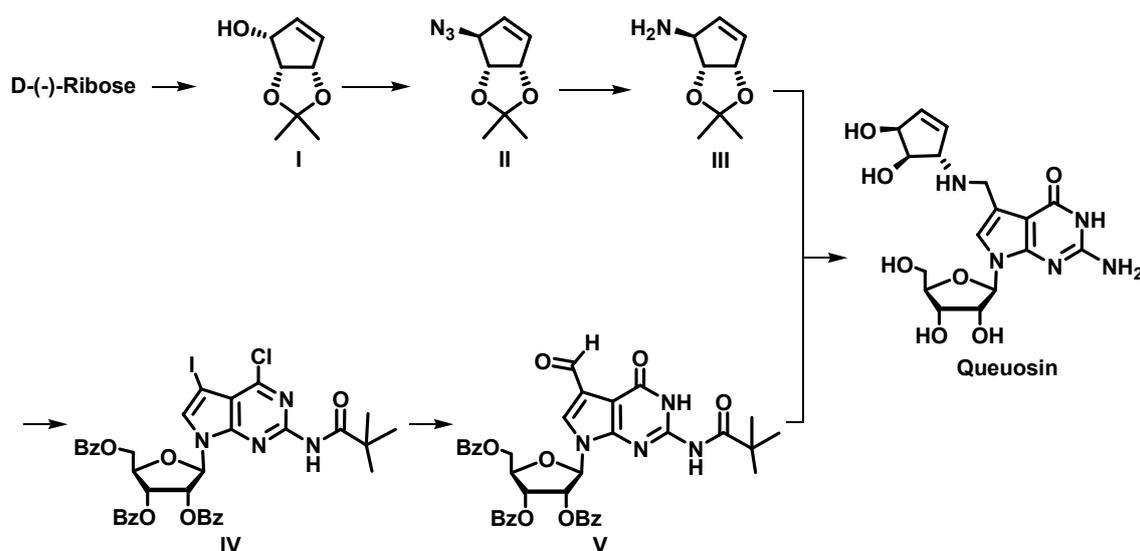


In Queuosin ist ein Cyclopentenylamin an die 7-Position gebunden, Archaeosin trägt eine Amidinfunktion. Man vermutet, dass Queuosin eine wichtige Rolle während des Translationsprozesses spielt, während Archaeosin für die Stabilisierung der

tRNA-Struktur notwendig ist. Die genaue Funktionsweise der tRNA Nukleotidmodifikationen ist aber gänzlich unverstanden. Aus diesem Grund soll mit der Synthese dieser beiden Modifikationen der Grundstein für weitere physikalisch-chemische, sowie biologische Studien gelegt werden.

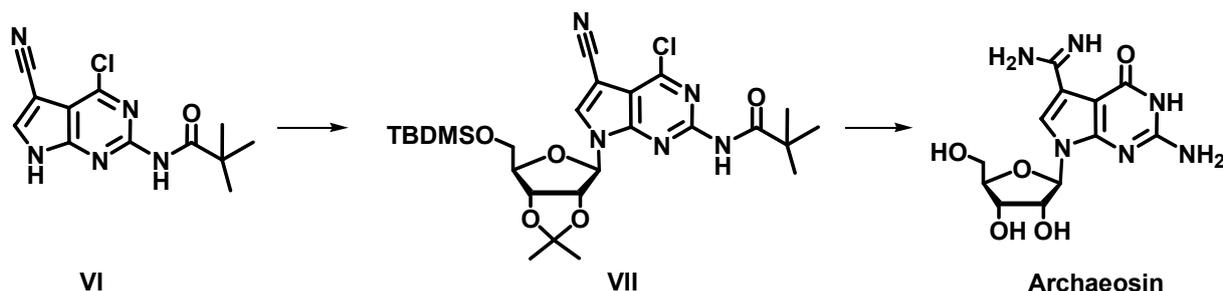
Während Queuosin in den 70er Jahren in einer 30-stufigen Synthese synthetisiert wurde, existiert bislang keine Synthese von dem tRNA Nukleosid Archaeosin. Für beide 7-Desazabausteine wurde daher im Rahmen dieser Dissertation eine neue, im Fall von Queuosin eine außerdem sehr viel kürzere als die bekannte, Synthese entwickelt.

Für die Synthese von Queuosin wurde zunächst das Cyclopentenylamin **III** aus D(-)-Ribose in 5 Schritten synthetisiert. Schlüsselschritt der kurzen Synthesesequenz war die *Mitsunobu*-Inversion des Allylkohols **I** mit Stickstoffwasserstoffsäure. Im Gegensatz zu bisherigen Veröffentlichungen konnten Reaktionsbedingungen erarbeitet werden, in der die *Mitsunobu*-Reaktion allein zum S_N2-Produkt **II** führte. Gleichzeitig konnte die [3.3] sigmatrope Allylazid Umlagerung von **II** unterbunden werden. Mit der anschließenden *Staudinger*-Reduktion wurde Cyclopentenylamin **III** mit einem sehr guten *ee*-Wert von 95% erhalten.

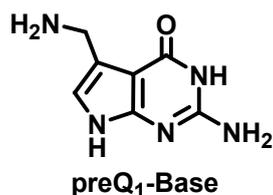


Für die Synthese von Queuosin sollte nun **III** mit 7-Formyl-desazaguanosin **V** reaktiv aminiert werden. Dazu wurde eine 7-Iod-desazaguaninbase in vier Stufen hergestellt und nach *Vorbrüggen*-Bedingungen zum Nukleosid **IV** glykosidiert. Eine Palladium-katalysierte Kohlenmonoxidinsertion führte nun zum 7-Formyl-guanosin **V** und die anschließende Entschützung zur tRNA Modifikation Queuosin. Queuosin konnte somit in nur 14 Stufen und einer Gesamtausbeute von 7% synthetisiert werden.

Für die Synthese von Archaeosin wurden *Koenigs-Knorr*-Glykosidierungsbedingungen verwendet. 7-Cyano-desazaguanin **VI** wurde in 4 Stufen synthetisiert und erfolgreich mit einer chloraktivierten Ribose glykosidiert. Entschützung und Amidierung nach *Pinner*-Bedingungen ergaben schließlich erstmalig die tRNA Modifikation Archaeosin in 15 Stufen.



In einer Kooperation mit der Gruppe um Prof. *Ficner* der Universität Göttingen wurde die Base preQ₁ hergestellt und in Co-Kristallisationstudien eingesetzt. PreQ₁ ist ein wichtiges Intermediat der Biosynthese von Queuosin und Teil eines *Riboswitch*-Mechanismus. In der Dissertation wurden zwei neue, kurze Synthesen zu diesem Molekül erarbeitet.

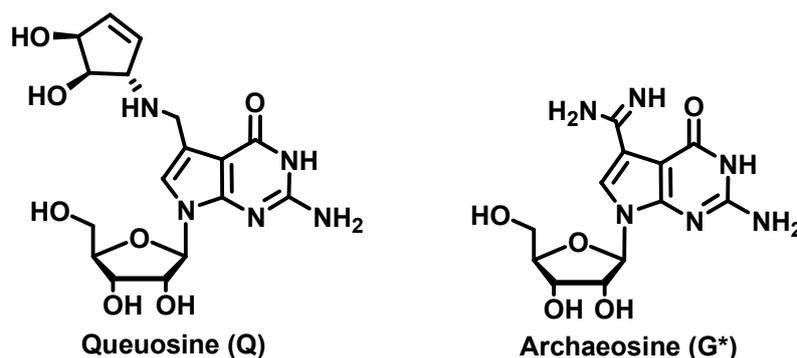


Erste Studien ergaben bereits Kristalle, die in nächster Zeit zur Auflösung des *Riboswitch*-Komplexes zwischen RNA und der preQ₁-Base führen sollten.

Summary

For a long time it has been known that ribonucleic acid (RNA) takes over many functions in the cell. Whilst Deoxyribonucleic acid (DNA) is responsible for saving the genetic information, RNA is an important intermediate between the read-out of the genetic information and the translation of this information into a peptide chain, which then folds into a protein. Furthermore it is known that RNA takes over tasks such as regulation of the metabolism of the cell through RNA-interference and riboswitches.

To assure this diversity, RNA is extremely variable and flexible. This is possible because RNA features, next to the standard four nucleotides, a number of nucleotide modifications. Beside simple modifications, like sugar- or base-methylated nucleotides, in the RNA, mainly in the tRNA, complex nucleotide modifications are found. Queuosine and archaeosine two examples of these hypermodifications and possess a carbon atom at the 7-position of the heterocycle instead of a nitrogen atom. The carbon atom carries different functions.

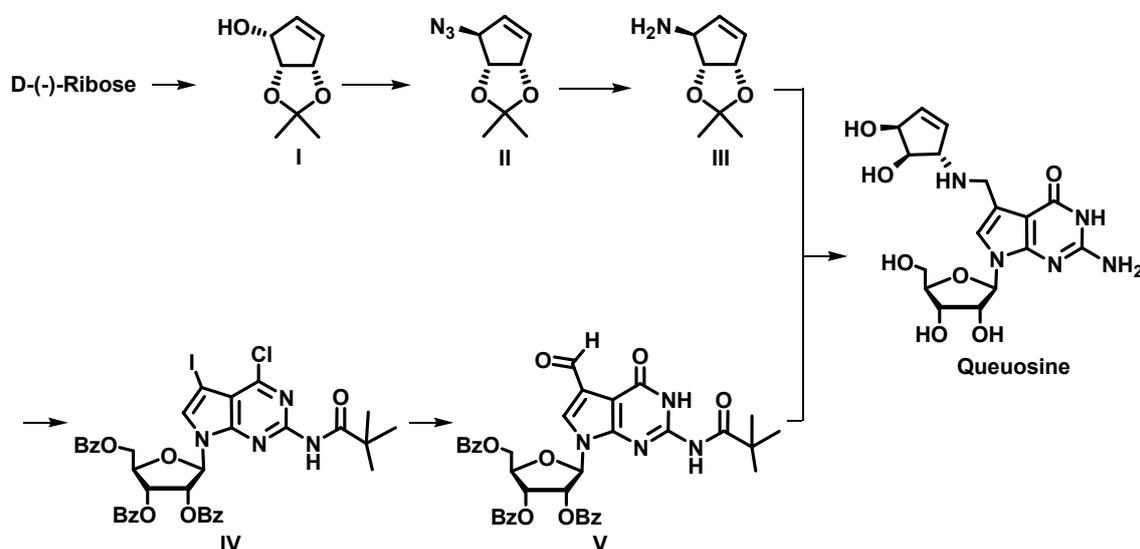


In queuosine a cyclopentenylamin derivative is bound to the 7-position, archaeosine carries an amidine function. It is proposed that queuosine takes over an important part during the translational process, whereas archaeosine is essential for the stabilisation of the tRNA structure. However the functionality of the tRNA nucleotide modifications is not fully understood yet.

This is the reason why a synthesis of these two nucleotide modifications was performed as the basis for more physico-chemical and biological studies.

While queuosine was synthesized in the seventies in a 30 step synthesis, there was no report about the synthesis the RNA nucleoside archaeosine. In this work for both 7-desazaderivatives new synthetic pathways were developed. Regarding queuosine the pathway was additionally much shorter as the known one.

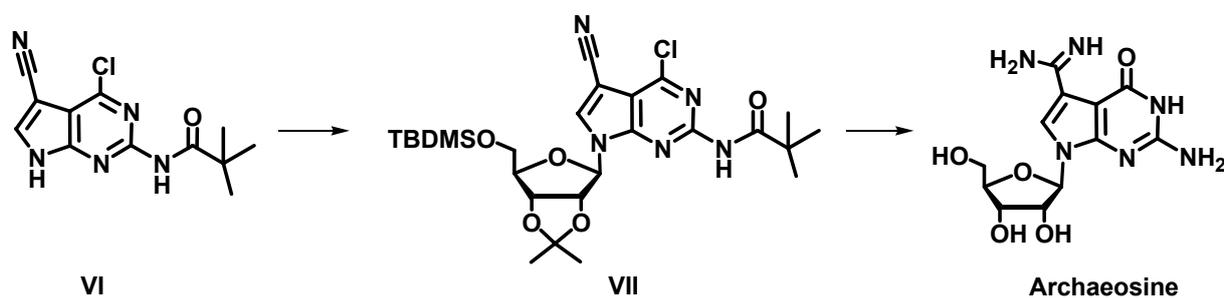
For the synthesis of queuosine cyclopentenylamine **III** was synthesized from D-(-)-ribose in five steps. The key step in this short sequence was a *Mitsunobu*-inversion of allylic alcohol **I** with hydrazoic acid. In contrast to present publications, reaction conditions were found in which the *Mitsunobu*-reaction lead exclusively to the S_N2 -product. At the same time the [3.3] sigmatrope allyl-azide rearrangement could be suppressed. The following *Staudinger*-reduction gave the cyclopentenylamine **III** with an excellent *ee*-value of 95%.



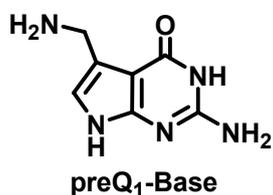
For the synthesis of queuosine, **III** was reductively aminated with 7-formyl-desazaguanosine **V**. A 7-Iodo-desazaguaninbase was synthesized in four steps and glycosylated with *Vorbrüggen*-conditions to nucleoside **IV**. The Palladium-katalyzed carbonmonoxide insertion led to 7-formyl-guanosine **V** and the following

deprotection to the tRNA modification queuosine. Queuosine was synthesized in only 14 steps with a total yield of 7%.

For the synthesis of archaeosine *Koenigs-Knorr*-glycosidation conditions were used. 7-Desazaguanine **VI** was synthesized in four steps and glycosylated successfully with a chloractivated ribosugar. Deprotection and amidation after *Pinner*-conditions yielded the tRNA modification archaeosine in 15 steps.



In cooperation with the research group of Prof. *Ficner* of the University of Göttingen a preQ₁-base was synthesized and used in co-crystallisation experiments.



PreQ₁ is an important intermediate in the biosynthesis of queuosine and part of a riboswitch gene regulation mechanism. In this dissertation two new, short synthetic pathways to this molecule were developed.

First studies provided already crystals, which in the near future should lead to a better understanding of the riboswitch-complex between RNA and the preQ₁-base.

1. Einleitung

1.1. RNA

Die Ribonukleinsäure – Ein Bote der Zelle

Die Nukleinsäure mit der Desoxyribonukleinsäure (DNA) und Ribonukleinsäure (RNA) als ihren wichtigsten Vertretern steht nun schon seit über 50 Jahren intensiv im Interesse der Forschung. Nach der bahnbrechenden Veröffentlichung der molekularen Struktur der Nukleinsäure 1953 von *Watson* und *Crick*^{1,2} folgten weitere große Fortschritte in den Untersuchungen auf diesem Gebiet, wie 1972 die Entdeckung, dass DNA verschiedenster Organismen enzymatisch geschnitten und wieder zusammengefügt werden kann.³ Die Erfindung der Polymerasekettenreaktion (PCR) im Jahr 1985 erlaubte die unbegrenzte Vervielfältigung von DNA Fragmenten.⁴ Im Jahr 2001 erreichte die Nukleinsäureforschung mit der vollständigen Entschlüsselung des menschlichen Genoms einen weiteren wichtigen Meilenstein.⁵ Dennoch ist die Chemie und Biochemie der Nukleinsäuren noch lange nicht vollständig verstanden. Auf dem Gebiet der Desoxyribonukleinsäure sind noch weitergehende Untersuchungen zu den Mechanismen der Replikation, der Schädigung und der Reparatur der DNA erforderlich. Zum anderen muss noch erforscht werden, welche biologischen Funktionen den Tausenden von Genen zuzuordnen sind, bzw. wie diese Information in der Zukunft zu einem besseren Verständnis des Zellmetabolismus führen kann.

Seit kurzem ist aber auch mit der Ribonukleinsäure eine weitere Nukleinsäure-Spezies im besonderen Fokus der Forschungsgemeinde. Lange Zeit wurde der Ribonukleinsäure nur die Botenfunktion der genetischen Information von der DNA zum Ribosom zugewiesen. Erst am Ende des 20. Jahrhunderts konnte gezeigt werden, dass RNA-Moleküle Reaktionen katalytisch beschleunigen können.⁶ Die *Hammerhead* RNA ist ein solches Ribozym, das RNA Stränge an bestimmten Stellen

schneiden kann; das RNA Polymeraseribozym katalysiert die eigene RNA Synthese.⁷ Kleine RNA Fragmente, wie die *short interfering* RNA (siRNA), die *micro* RNA (miRNA) oder die *antisense* RNA dienen zur Feinregulation der Proteinbiosynthese.⁸ Dieser Prozess der RNA-*Interference* (RNAi) ist zur Zeit ein wichtiger Teil der RNA Forschung.⁸

Doch auch der Prozess der Translation, der Übertragung der genetischen Information von der *messenger* RNA (mRNA) auf einen Polypeptidstrang, vermittelt von der *transfer* RNA (tRNA), ist nicht vollständig verstanden. Die Zelle setzt zum Beispiel eine große Anzahl von Enzymen ein, um einzelne RNA Nukleotide zu modifizieren. Bisher sind 95 unterschiedliche Modifikationen bekannt, von denen die meisten innerhalb der tRNA lokalisiert sind. Die komplexesten Modifikationen der RNA sind dabei die modifizierten Nukleoside Archaeosin und Queuosin und dessen Derivate. Um die Funktion dieser Modifikationen untersuchen zu können, wurde in dieser Dissertation eine neue und kurze Synthese von Queuosin und Archaeosin entwickelt, um diese in RNA Modellstrukturen einzubauen und auf ihre Eigenschaften hin untersuchen zu können.

Aufbau und Funktion der Ribonukleinsäure (RNA)

Im Unterschied zur doppelsträngigen DNA trägt RNA, die vorwiegend als Einzelstrang vorliegt, an der 2'-Position des Zuckers eine Hydroxygruppe. Dadurch ist RNA in der Lage, eine größere Anzahl von Wasserstoffbrückenbindungen zu Wassermolekülen auszubilden als DNA. Dies führt dazu, dass sich die strukturelle Flexibilität der RNA im Vergleich zur DNA erhöht. Intramolekulare Wechselwirkungen zwischen komplementären Basen führen zu kompakten Haarnadelstrukturen (*hairpin structures*) oder formen Tripletstrukturen mit zusätzlichen Wasserstoffbrückenbindungen. Diese Tripletstrukturen können wiederum untereinander wechselwirken. Die RNA kann somit verschiedenste dreidimensionale Strukturen bilden, vergleichbar mit denen von Proteinen, und ist daher in der Lage, neben dem temporären Speichern und Weiterleiten genetischer

Informationen, eine große Anzahl weiterer Funktionen zu übernehmen. Darunter fällt zum Beispiel die Katalyse der Peptidyltransferase-Reaktion der ribosomalen RNA (rRNA) oder das Schneiden von RNA des *Hammerhead*-Ribozyms.

Dennoch ist eine der Hauptaufgaben der RNA das Übertragen der genetischen Information von der DNA auf das Protein im Rahmen der Proteinbiosynthese. Im Transkriptionsprozess paaren sich hierbei aktivierte Ribonukleotide mit den komplementären Basen des DNA Stranges und werden durch die RNA Polymerase zu einem RNA Strang verbunden. Die RNA, die nun die Kopie des abgelesenen Genoms enthält, genannt *messenger* RNA (mRNA), wandert zum Ribosom, dem Ort der Translation.

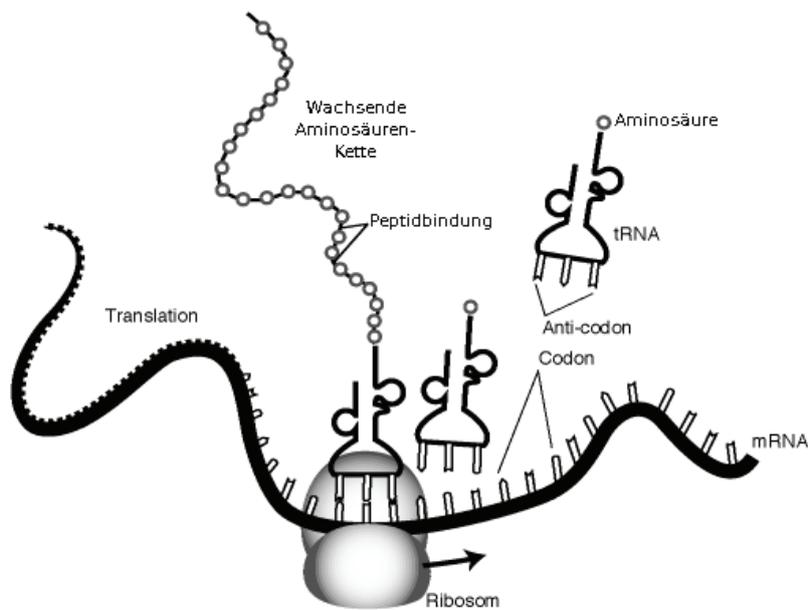


Abbildung 1.1: Translationsprozess im Ribosom.⁹

Dort paar sich jedes Triplet (3 Basen) der mRNA (Codon) mit drei komplementären Nucleotiden (Anticodon) eines Adaptermoleküls, der *transfer* RNA (tRNA) (s. Abbildung 1.1). An jedes tRNA-Molekül ist eine spezifische Aminosäure gebunden, abhängig von den Nucleotiden des Anticodons. Das Ribosom enthält neben fünfunddreißig strukturstabilisierenden Proteinen drei ribosomale RNA Stränge (rRNA) von 300 bis 1500 Nucleotiden und katalysiert unter anderem die

Verknüpfung der Aminosäuren zweier benachbarter tRNAs. Nach Verlassen des Ribosoms findet die Faltung der Aminosäurekette zum Protein statt.

tRNA

Um während der Translation eine RNA Basensequenz in eine Polypeptidsequenz übersetzen zu können, benötigt die Zelle ein Adaptermolekül. Crick stellte 1955 die Hypothese auf, dass solche Moleküle das Nukleinsäurecodon erkennen müssen und eine Aminosäure an dieses Molekül gebunden sein muss.¹⁰ Durch Experimente konnte später nachgewiesen werden, dass kleine lösliche tRNA-Moleküle als solche Adaptermoleküle fungieren.¹¹

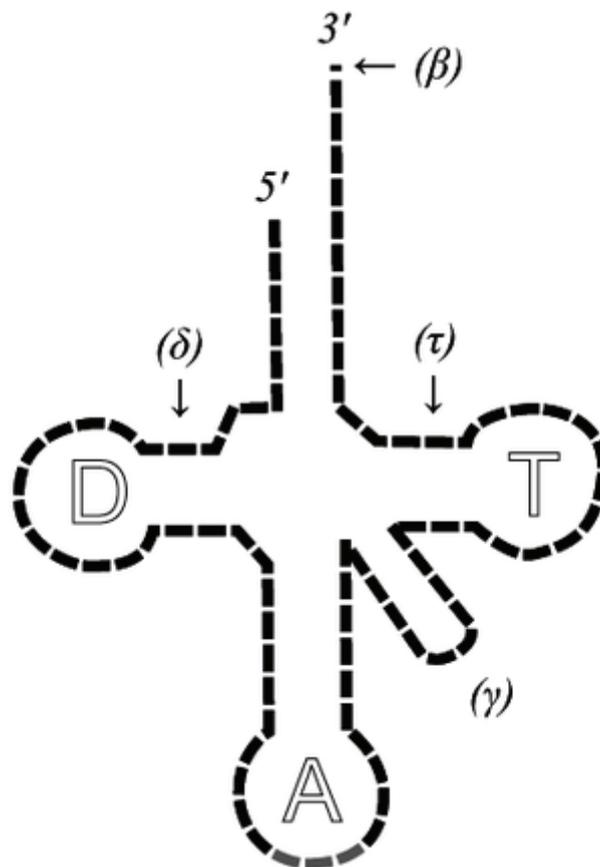


Abbildung 1.2: 2D-Kleeblattstruktur von tRNA^{Asp}.⁹

Die erste tRNA Sequenz wurde 1965 von *Holley* et al. veröffentlicht¹² und weitere Studien zeigten, dass Aminosäure-tRNAs (tRNA^{AA}) aus 65 bis 95 Nucleosiden bestehen und eine Kleeblattstruktur bilden (Abbildung 1.2).⁹

Kennzeichen dieser Struktur ist der Akzeptorstamm, an dessen 3'-Ende eine spezifische Aminosäure gebunden ist. Der Akzeptorstamm trägt die wichtigsten Merkmale für die Erkennung der tRNA-Aminosäure-Synthetase, die für jede tRNA-Spezies die entsprechende Aminosäure spezifisch mit der tRNA verbindet. Der D-Arm (*Dihydrouracil-loop*) und der TΨC-Arm (*TΨC-loop*) enthalten immer die modifizierten Nucleoside Dihydrouracil und Pseudouridin (Ψ). Die Zahl der Nucleotide des variablen Arms variiert zwischen 3 und 21 Nucleotiden und beeinflusst die dreidimensionale Struktur der tRNA wesentlich. Der Anticodonarm ist neben dem Aminoakzeptorstamm, an welchem die Aminosäurebindung stattfindet, die zweite wichtige Stelle der tRNA. Der Anticodonarm, speziell die Haarnadelstruktur des Anticodons, ist für die Bindung zwischen tRNA und mRNA verantwortlich. Die drei Nucleotide des Anticodons – sie sind an Position 34, 35 und 36 lokalisiert und sind spezifisch für die an die tRNA gebundene Aminosäure – binden jeweils mit den drei komplementären Basen der mRNA.

Die erste Position (in 5'-Richtung) des Anticodons (Position 34) wird *Wobble*-Position genannt. Während die letzten beiden Anticodon-Codon-Paarungen normale *Watson-Crick*-Paarungen ausbilden, besitzt die *Wobble*-Position eine leicht erhöhte Flexibilität und kann daher auch Nicht-*Watson-Crick*-Paarungen eingehen.

Betrachtet man die Kristallstruktur der tRNA von Aspartat in Abbildung 1.3, so erkennt man, dass tRNA in Wirklichkeit eine L-förmige Struktur einnimmt. Der Akzeptor- und TΨC-Arm bilden einen kurzen Schenkel, der D- und Anticodonarm bilden den längeren Schenkel aus. Die Aminoakzeptor- und Anticodonbindungsstelle liegen dabei an den entgegengesetzten Enden des Makromoleküls

und haben einen Abstand von ca. 7.6 nm. Der Durchmesser der Struktur beträgt 2.5 nm.

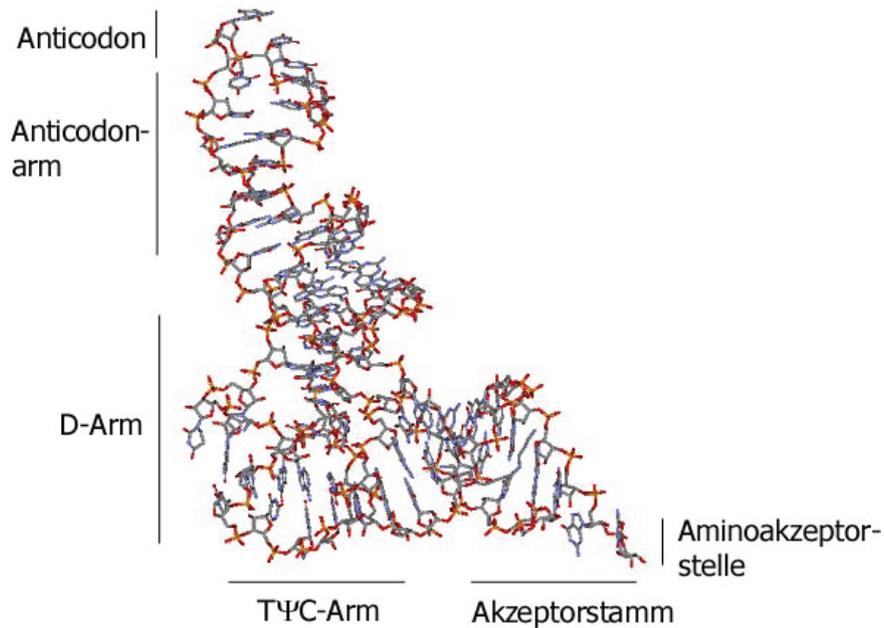


Abbildung 1.3: Dreidimensionale Struktur der tRNA^{Asp.13}

Wie man sieht bildet die tRNA eine komplexe 3D-Struktur. Die Ausbildung von Haarnadel- und Triplettsstrukturen und ineinander verdrehte Einzel-, Doppel- und Tripelstränge sind möglich. Stabilisiert werden diese Strukturen desweiteren durch die natürlich vorkommenden RNA Modifikationen, die innerhalb der tRNA bis zu 25% der Standardnucleotide der tRNA ersetzen können.

1.2. Modifikationen in der RNA

RNA Modifikationen wurden 1948 erstmals von *Hotchkiss* et al. beobachtet.¹⁴ Von den verschiedenen RNA Typen enthält die tRNA am häufigsten Nukleotidmodifikationen. 79 der bisher 95 entdeckten Modifikationen sind in der tRNA zu finden.^{15, 16} In der rRNA und in der kurzlebigen mRNA sind deutlich weniger Nukleotide modifiziert. 28 bzw. 12 verschiedene Modifikationen wurden bisher entdeckt. In der siRNA, miRNA wurden ebenfalls Modifikationen beobachtet, aber in sehr viel geringerem Ausmaß.¹⁵

Betrachtet man Organismen und deren Nukleotidmodifikationen, so konnten in Archaeabakterien, Prokaryoten und Eukaryoten identische Modifikationen wie Ψ 13, Cm32, m¹G37, Ψ 38 oder Ψ 39, dargestellt in Abbildung 1.4 an vergleichbaren Positionen gefunden werden.¹⁷⁻²⁰

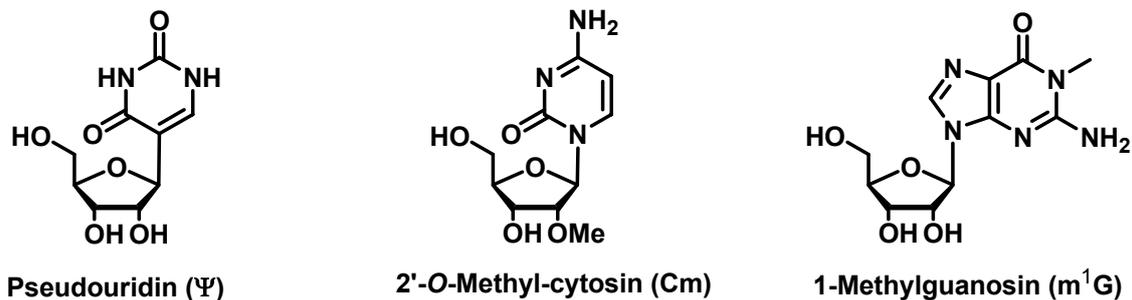


Abbildung 1.4: In allen Organismen auftretende Modifikationen.

Dies ist ein Hinweis darauf, dass Modifikationen schon zu Beginn der Evolution in der RNA existierten und diese im Laufe der Diversifizierung in die einzelnen Organismen übernommen wurden. Eine divergente Evolution führte anschließend dazu, dass bestimmte Modifikationen (wie Archaeosin oder Queuosin) nur noch spezifisch in Archaeabakterien, Prokaryoten- oder Eukaryoten zu finden sind.¹⁹⁻²¹

Modifikationen im D- und TΨC-Arm und im Aminoakzeptorstamm

Betrachtet man die genaue Lokalisation der Modifikationen innerhalb der tRNA, so kann man zwei unterschiedliche Typen von Modifikationen erkennen. Einfache Modifikationen, wie an der Base oder am Zucker methylierte Nucleoside (z.B. 2'-O-Methylguanosin, Gm34;²² 5-Methylcytosin, m⁵C),²³ einfache chemische Modifikationen, wie deaminierte Nucleoside (Inosin, I34),^{24, 25} „rotierte“ Basen (Pseudouridin Ψ35)²⁶⁻²⁸ oder Thioderivate (5-Methylaminomethyl-2-thiouridin, mnm⁵s²U) sind fast überall in der tRNA finden, aber hauptsächlich im Bereich des Akzeptorarms und im D- und TΨC-Arm (s. Abbildung 1.5).²⁹ Archaeosin, das ein 7-Desazaguaningrundgerüst besitzt, ist der einzige Vertreter der komplexen Modifikationen, der auch im Kerngerüst (Position 15) der tRNA gefunden wird.³⁰

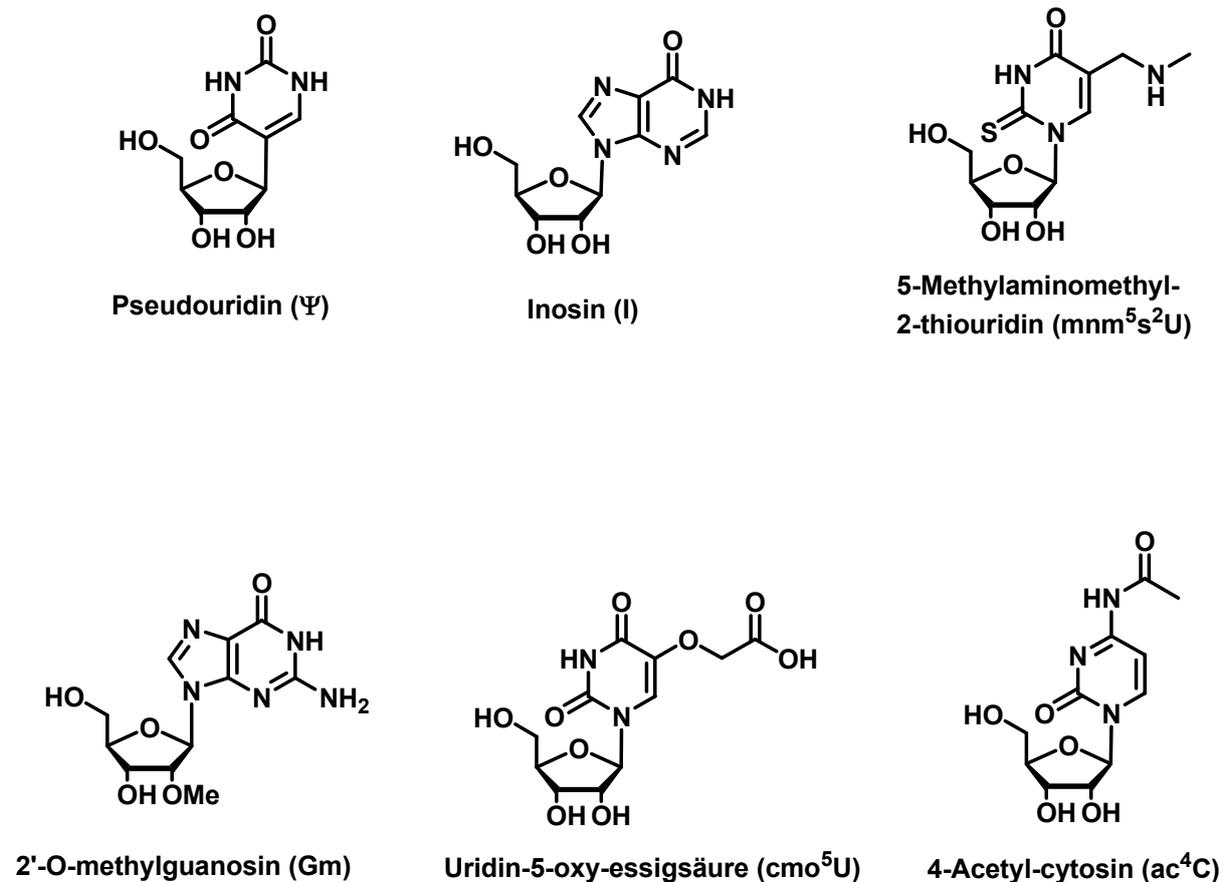


Abbildung 1.5: Einfache Modifikationen in der tRNA.

Es konnte gezeigt werden, dass diese Modifikationen im Akzeptorstamm einen großen Einfluss auf die Aminoacylierungsreaktion haben, in der die tRNA Moleküle mit den für sie spezifischen Aminosäuren beladen werden. Vergleiche der Reaktionsgeschwindigkeiten von modifizierter und nicht modifizierter tRNA zeigten, dass unmodifizierte tRNA^{Ile}, tRNA^{Glu} und tRNA^{Lys} geringere Aminoacylierungsgeschwindigkeiten vorwies als entsprechende modifizierte tRNA.^{31,32} Die Modifikationen müssen also die Erkennung der tRNA durch die Aminoacyl-Synthetase direkt oder indirekt (durch Konformationsänderungen in der tRNA Struktur) beeinflussen.³³ Modifikationen in der Nähe des Codons (z.B. an Position 8, 26, 34, 38, 39 oder 40) beeinflussen die Aminoacylierung in keiner signifikanten Weise.³⁴ Die genannten Modifikationen sind wichtig, um die Struktur des Moleküls zu stabilisieren. Eine einzelne Modifikation ist nicht für die Gesamtmolekülstabilität ausschlaggebend; ist allerdings eine größere Anzahl an Modifikationen, z. B. in den tRNA-Armen, nicht vorhanden, so sinkt die Stabilität des gesamten Moleküls und die Stabilität der für die tRNA charakteristischen L-Form.

Modifikationen im Anticodon

Betrachtet man den Anticodonbereich mit seinen Modifikationen, so sind auch dort die oben genannten Modifikationen wie Inosin, Pseudouridin oder 2-Methylguanosin vertreten.^{35, 36} Zusätzlich treten an dieser Stelle auch chemisch komplexe Modifikationen auf. Zu diesen gehören zum Beispiel die RNA Modifikationen, Hypermodifikationen genannt, Queuosin^{37, 38} und Wybutosin²² und deren Derivate, die an den Positionen 34 und 37 lokalisiert sind (Abbildung 1.6).

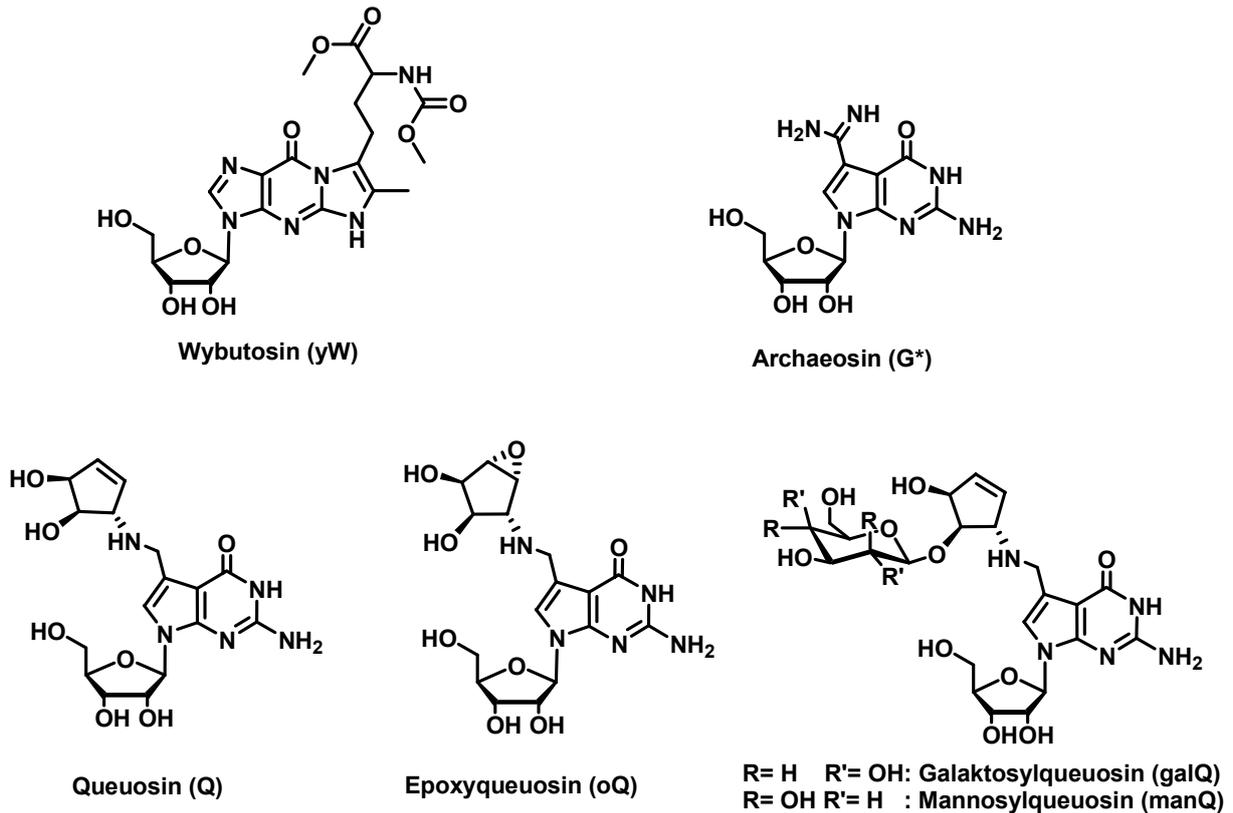


Abbildung 1.6: Komplexe tRNA Nukleotidmodifikationen.

Während außerhalb des Codons an jeder tRNA Nukleotidposition meistens eine oder zwei Modifikationen auftreten, ist die Anzahl an Modifikationen, die die Standardnukleotide im Anticodon ersetzen können, sehr groß.

Jedes dieser Nukleotide spielt während des Dekodierungsprozesses der mRNA durch die tRNA eine wichtige Rolle. Modifizierte Nukleotide an der *Wobble*-Position des Anticodons (Position 34) können zum Beispiel die Basenpaarungskapazität der tRNA erweitern oder verringern (vgl. Tabelle 1.1). Inosin (Paarung mit A, C und U möglich), Carboxymethoxyuridin (cmo⁵U) (Paarung mit A, G und U) und Queuosin (Paarung mit C und U) sind relativ unspezifisch und erweitern die *Watson-Crick*-Basenpaarung, 4-Acetylcytosin (ac⁴C) (Paarung mit G) und 5-Methylaminomethyl-2-thiouridin (mnm⁵s²U) (Paarung mit A) sind relativ spezifisch³⁹⁻⁴³ und akzeptieren jeweils nur eine Komplementärbase.

EINLEITUNG

| Nukleosid an Position 34 | Kann Paaren mit | gilt für |
|--------------------------|-----------------|---|
| C | G | alle Organismen |
| G | C,U | alle Organismen |
| A | U,C,A,G | tRNA ^{Arg} _{CGN} in Bakterien, Archaeobakterien |
| mcmo ⁵ U | U,A,G | Val, Pro, Thr (alle sind unabhängig von dritter Codonstelle) |
| mmn ⁵ SeU | A,G | Pro- und Eukaryoten |
| Q | C,U | Pro- und Eukaryoten |
| I | C,U,A | tRNA ^{Arg} _{CGN} in Bakterien |
| Cm | G | alle Organismen |

Tabelle 1.1: Regeln zur Basenpaarung zwischen Nukleotiden an Position 34 der tRNA und dem dritten Codon der mRNA.⁴⁴

Die relative geringe Spezifität der modifizierten Nukleotide (vgl. Tabelle 1.1), aber auch der Standardnukleotide an der *Wobble*-Position gegenüber dem Codon erklärt die Tatsache, dass den meisten Aminosäuren mehrere (d.h. zwei bis vier) der 64 codierenden Codonsequenzen zur Verfügung stehen (*synonyme* Codons). Ein falsches Ablesen an Position 34 hat im Unterschied zu den ersten beiden Positionen im Anticodon also selten zur Folge, dass eine falsche Aminosäure in den Peptidstrang eingebaut wird. Meistens werden unterschiedliche Codons, die eine Aminosäure kodieren, von ein und derselben tRNA erkannt.

Modifizierten Nukleotiden an Position 37 der tRNA werden zwei unterschiedliche Funktionen zugeschrieben. Zum Einen haben A-U Basenpaare im Gegensatz zu G-C Basenpaaren eine etwas geringere Stabilität. Diese Anticodon-Codon Wechselwirkung kann durch Wechselwirkung der Ψ -Systeme zwischen den Strängen (*interstrand stacking*) von modifizierten Nukleotiden wie Wybutosin und 6-Methyladenosin verstärkt werden.⁴⁴ Zum Anderen stabilisieren Modifikationen den *reading frame*, den Anticodon und Codon bilden. Bestimmte Modifikationen (insbesondere 1-Methylguanosen und Wybutosin) verhindern, dass ein +1 *frameshift*

stattfindet. Hier wird anstelle von 34, 35, 36 fälschlicherweise Nukleotid 34, 35, 36 und zusätzlich 37 abgelesen und die genetische Kodierung um eine Base versetzt. Eine methylierte Base an Position 37 verhindert dies, da sie nicht in der Lage ist zu paaren.^{45, 46} Nicht alle Modifikationen beeinflussen die *frameshift*-Rate: Vergleicht man die *frameshift*-Rate von Q-haltiger tRNA mit einer hypomodifizierten tRNA (d.h. eine Mutation der tRNA wurde generiert, die Q-defizient ist), so lässt sich kein Unterschied feststellen.⁴⁷⁻⁴⁹

In Abbildung 1.7 sieht man den Akzeptorstamm der tRNA^{ASP} mit den teilweise modifizierten Basen im Anticodon (Pos. 34-36) und an der dem Anticodon benachbarten Position 37. Die modifizierte Base Queuosin (Q34) beeinträchtigt die Basenpaarung relativ wenig, denn die komplexe Cyclopentengruppe ragt seitlich aus dem Anticodon heraus; die Methylgruppe des 1-Methylguanosis (m¹G37) verringert die Möglichkeit zur Basenpaarung und verhindert somit *frameshifting*.

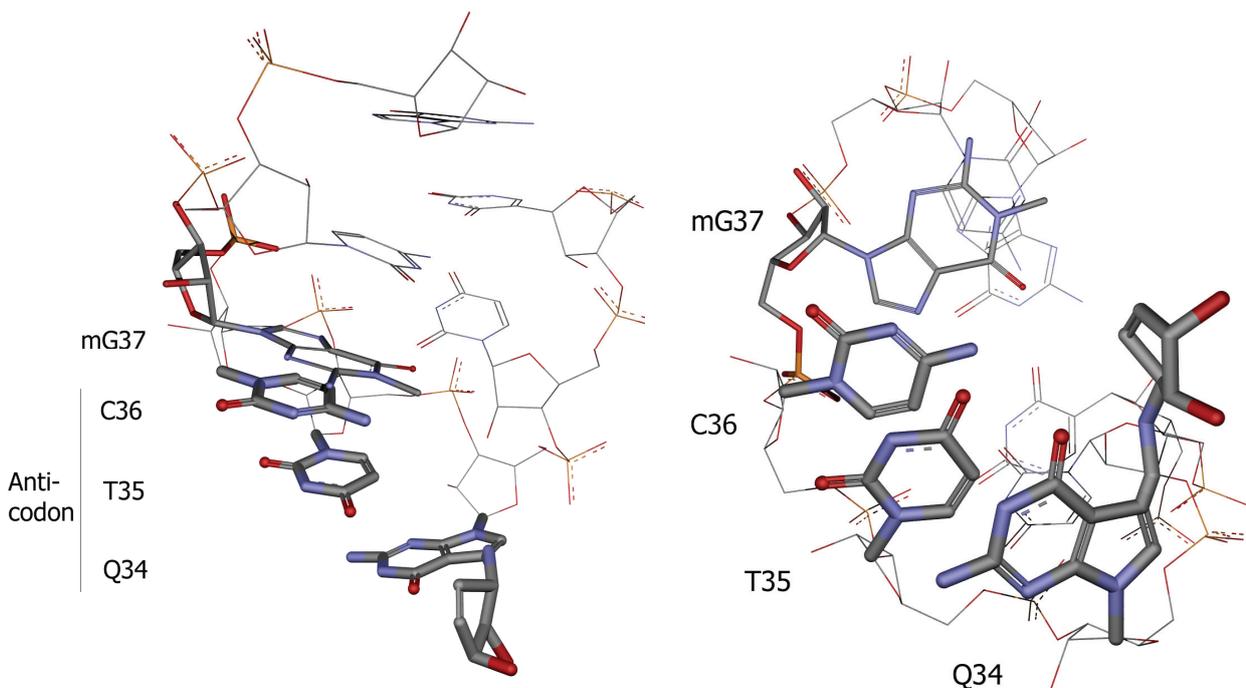


Abbildung 1.7: tRNA-Anticodon mit Q34-T35-C36-m¹G37 links: Seitenansicht, rechts: Ansicht von unten.

Es wird geschätzt, dass in Bakterien etwa 1% der genetischen Information zur posttranskriptionalen Modifizierung von Nukleotiden verwendet wird.⁵⁰ In *Salmonella typhimurium* wurden in der tRNA 29 modifizierte Nukleotide entdeckt, die von etwa 50 Enzymen synthetisiert werden.⁵¹ Die Zelle muss also knapp viermal soviel genetische Information für die Modifizierung der Nukleotide aufwenden wie für die Synthese der unmodifizierten tRNA selbst.³⁴ Der Grund für die aufwändige Biosynthese der Nukleotidmodifikationen in der Zelle ist allerdings noch ungeklärt.⁵²

1.3. Queuosin

1.3.1. Struktur und Funktion von Queuosin

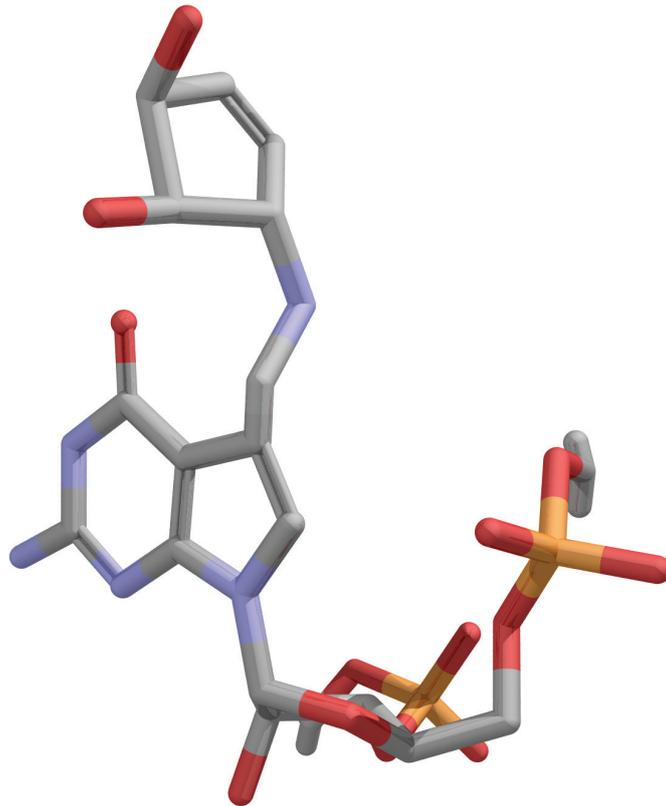


Abbildung 1.8: Queuosin mit Phosphat-Rückgrat.

Im Jahre 1968 wurde in einer tRNA^{Tyr} von *E. coli* eine bisher unbekannte Nucleinsäurebase gefunden und ihr die Bezeichnung „Q“ gegeben.⁵³ Die Base wurde schließlich Queuin bzw. die Nucleosidform Queuosin genannt. Kurze Zeit später konnte sie an Position 34, der *Wobble*-Position der tRNA von Aspartat, Asparagin, Histidin und Tyrosin gefunden und ihre Struktur bestimmt werden.^{54, 55} Die Struktur leitet sich von Guanodin ab. Die N⁷-Position ist durch ein C⁷ ersetzt, an dem, über ein

Stickstoff-Atom verknüpft, ein Dihydroxycyclopentenylring gebunden ist (s. Abbildung 1.9).^{56, 57}

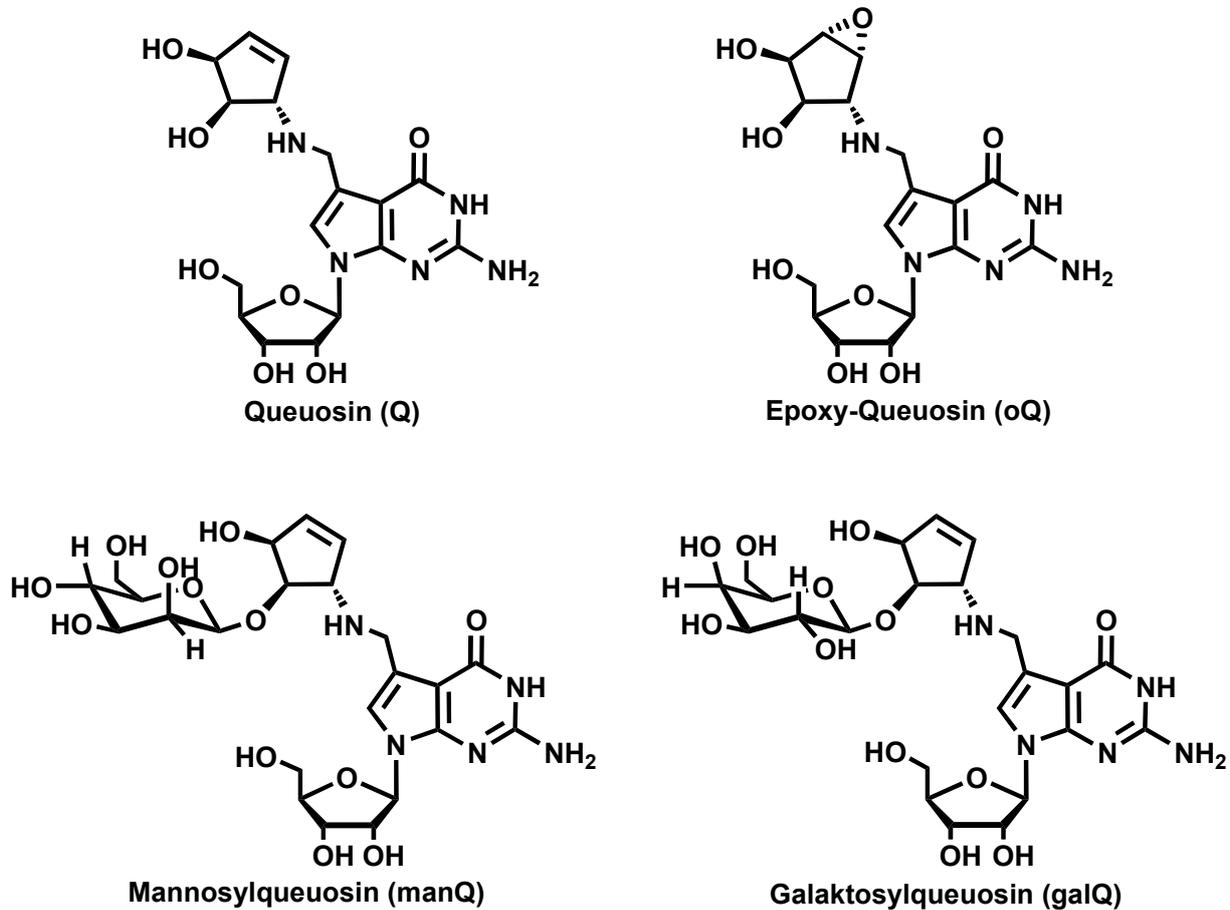


Abbildung 1.9: Derivate des Queuosins.

Weitere modifizierte Derivate des Queuosins sind das Epoxyqueuosin (oQ), das an der Doppelbindung des Cyclopentenrestes von Q epoxidiert vorliegt⁵⁸ und die glykosidischen Derivate von Queuosin. Galaktosylqueuosin (galQ) und Mannosylqueuosin (manQ) sind am nicht-allylischen Alkohol des Cyclopentenylrestes über eine Glykosidbindung mit Zuckern verbunden.

Epoxyqueuosin wurde in tRNA^{Tyr} von *E. coli* entdeckt⁵⁸, Mannosylqueuosin ist spezifisch für eukaryotische tRNA, die Aspartat kodiert, während Galaktosylqueuosin in tRNA gefunden werden kann, die Tyrosin kodiert.⁵⁹⁻⁶¹

Vor Kurzem wurde ein weiteres Queuosinderivat entdeckt.^{62, 63} Eine Glutaminsynthetase, die normalerweise in einer Aminoacylierungsreaktion ein

Glutamat an der 5'-Position der tRNA hängt, kondensiert auch eine Glutamygruppe an den Cyclpentylenring des Queuosins (s. Abbildung 1.10).^{64, 65}

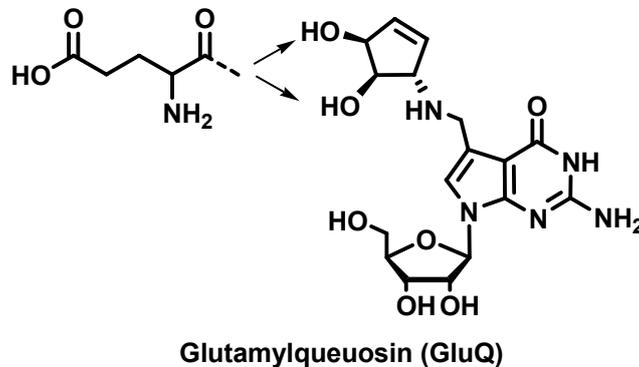


Abbildung 1.10: Struktur von Glutamyqueuosin.

Das isolierte Derivat erweitert damit das Spektrum der Queuosinderivate und zeigt auf, dass neben einfachen RNA Modifikationen mit angehängten Aminosäurederivaten (z.B. Lysidin (k^2C), N^6 -Threonylcarbamoyladenosen (t^6A) oder 5-Taurinomethyl-2-thiouridin (tm^5s2U), s. Abbildung 1.11) auch komplexe Modifikationen mit Aminosäuren verbunden sind.

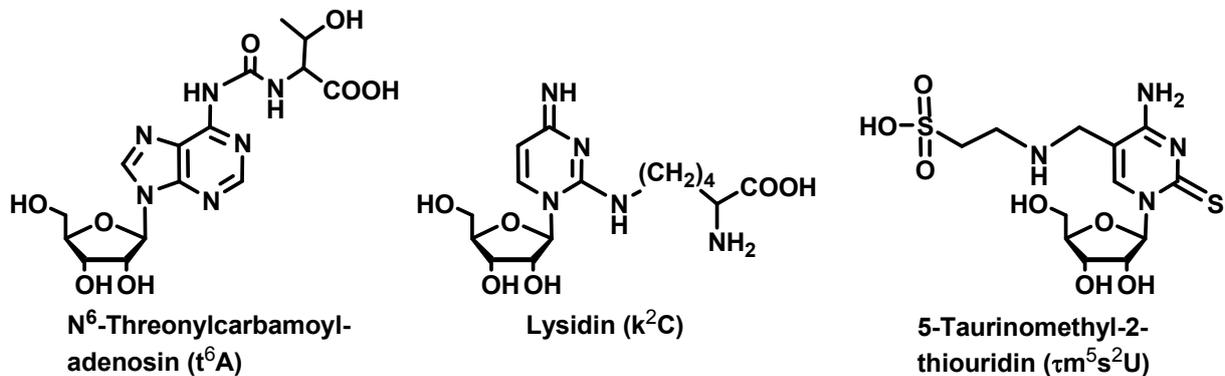


Abbildung 1.11: Modifikationen mit Aminosäurederivaten.

Die Funktion dieser hochsubstituierten Queuosinderivate innerhalb der Zelle ist aber gänzlich unverstanden.

Betrachtet man die Struktur des Queuosins⁵⁷ (Abbildung 1.9) und Berechnungen von Morris et al.⁶⁶ zum Queuosin in der Anticodonstruktur der tRNA^{Asp}, so sieht man,

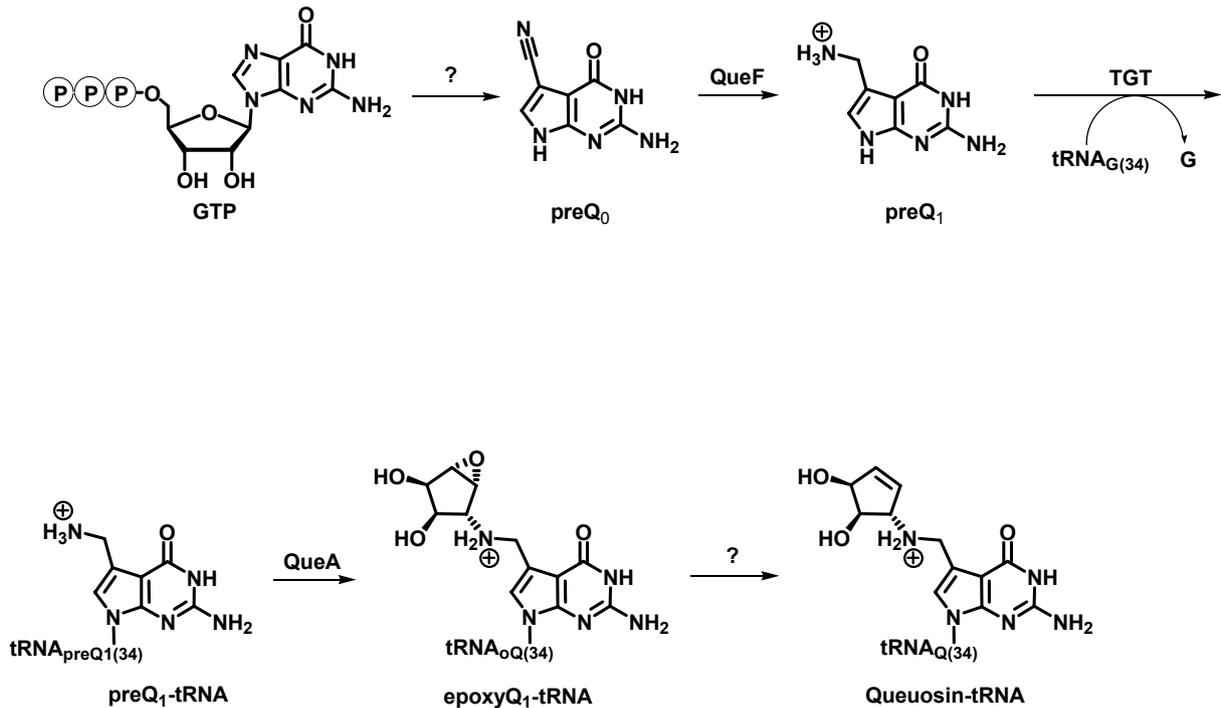
dass der Cyclopentenring der Hypermodifikation die *Watson-Crick*-Paarung der Base nicht direkt beeinträchtigt. Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Hydroxygruppen des Cyclopentenringes und den Sauerstoffatomen des Riboserückgrats des Uracils an Position 33 sind möglich.⁶⁶ Berechnungen der Bindungsstärke (*codon bias*) zwischen dem Anticodon und dem Codon ergaben, dass die unmodifizierte tRNA (mit G an Position 34 (G34)) die Assoziation mit GAC im Vergleich zu GAU präferiert, während die modifizierte tRNA Form weder das Codon GAC noch das Codon GAU bevorzugt. Dies bedeutet, dass in der *Wobble*-Paarung das Nukleosid G34 die Base C erkennt, während Q34 zwischen C und U nicht mehr unterscheiden kann.⁶⁷ Dieses Verhalten wurde mit der Abnahme der Beweglichkeit des Anticodonarms begründet und der damit verbundenen verschlechterten Eigenschaft der *Wobble*-Position eine *Watson-Crick*-Basenpaarung mit dem Codon einzugehen.

1.3.2. Biosynthese von Queuosin

Biosynthese von Queuosin

Wie die meisten anderen Nukleotidmodifikationen wird auch Queuosin *post*-transkriptional modifiziert.⁶⁸ Für die mehrstufigen Biotransformationen der RNA Modifikationen wird in den Organismen eine große Informationsmenge in der DNA für die Kodierung modifizierender Enzyme gespeichert.

Queuosin ist nicht nur auf Grund der hoch komplexen Struktur besonders, sondern auch wegen seines ungewöhnlichen 7-Desazaguanosin Grundgerüsts. Die Biosynthese der 7-Desazanukleoside ist nur teilweise verstanden.⁶⁹ Es konnte gezeigt werden, dass Ausgangsstoff der Queuosinsynthese Guanosintriphosphat (GTP) ist.²² Durch ein unbekanntes Enzym wird GTP zu einem Desazapurin transformiert, dem 7-Cyano-desazaguanin (preQ₀) (s. Schema 1.1).



Schema 1.1: Biosynthese von Queuosin in tRNA.

In einem darauf folgenden Schritt wird das 7-Cyano-desazaguanin durch die Nitrilreduktase QueF zum 7-Aminomethyl-7-desazaguanin (preQ₁) reduziert.⁷⁰⁻⁷³ PreQ₁ wird anschließend in einen tRNA-Strang eingebaut. Eine tRNA-Guanin Transglycosylase (TGT) eliminiert hierbei aus der RNA in einem ersten Schritt die Guaninbase und katalysiert anschließend den Einbau des preQ₁-Moleküls.⁷⁴⁻⁷⁶ An den die modifizierte Base enthaltenden Strang wird durch die S-Adenosylmethionine:tRNA Ribosyltransferase-Isomerase (QueA) ein Epoxycyclopentadiolring unter Verwendung von S-Adenosylmethionine (AdoMet) angefügt und man erhält Epoxyqueuosin-enthaltende tRNA (oQ_{tRNA}).⁷⁷⁻⁸¹ Durch einen bisher unbekannt, Vitamin B₁₂-abhängigen Schritt wird das Epoxid des oQ zur Doppelbindung reduziert und man erhält eine tRNA mit eingebautem Queuosin.^{82*} Queuosin ist sowohl in eukaryotischer als auch prokaryotischer tRNA vorhanden. Dennoch können nur Prokaryoten Queuosin *de novo* synthetisieren.⁸³ Eukaryoten

* Während von archaea und prokaryotischer TGT Cokristallstrukturen bekannt sind, und damit der Mechanismus des Einbaus von preQ₀ bzw preQ₁ sehr gut verstanden ist, sind von eukaryotischer TGT lediglich die entsprechenden kodierenden Gene bekannt.^{76, 83-85} Die Nitrilreduktase QueF wurde ebenfalls cokristallisiert, wogegen von der S-Adenosylmethionine:tRNA Ribosyltransferase-Isomerase QueA lediglich kinetische Studien bekannt sind.^{72, 77, 79}

sind in der Lage Queuosin durch die Nahrung aufzunehmen⁸⁴ und können Queuin, die freie Queuosinbase, mit Hilfe von eukaryotischer TGT in entsprechende tRNAs einbauen. Zur Zeit sind somit nur 3 der 5 Schritte der Biosynthese von Queuosin verstanden; die Synthese der Nitrildesazaguaninbase, als auch die Reduktion zu Queuosin selbst ist noch nicht vollständig bekannt.⁶⁹

1.3.3. PreQ₁ als Riboswitch

Innerhalb der Biosynthese von Queuosin-haltiger tRNA ist 7-Aminomethyl-7-desazaguanin (preQ₁) ein wichtiger Schlüsselbaustein.⁸⁵ Kürzlich wurde entdeckt, dass das preQ₁ Molekül in der Zelle zusätzlich einen *Riboswitch* kontrolliert.^{86, 87}

Es ist schon lange bekannt, dass die Zelle die Expression von Genen reguliert, indem sie proteinbasierende Kontrollsysteme besitzt. Ein Netzwerk aus Proteinsignalwegen und Genkontrollfaktoren beeinflussen in der Zelle die Transkription, Translation und den mRNA Auf- und Abbau.⁸⁸ Mit der Zeit wurde die Wichtigkeit von RNA Faktoren in der Genregulierung immer deutlicher.^{8, 89} *Gene silencing* hervorgerufen durch microRNAs oder short-interfering RNAs führen in Verbindung mit weiteren Proteinen dazu, dass ungefähr 22-Nukleotid-lange Fragmente mit der Ziel RNA paaren. Diese Interaktionen und der Abbau der mRNA führen zur Deaktivierung des entsprechenden Gens.^{90, 91} Auch wenn Proteine zu dieser Genregulation Voraussetzung sind, zeigen diese Beispiele die Wichtigkeit der auf RNA basierenden Genregulation auf. Weitere unentdeckte RNA Kontrollsysteme sind wahrscheinlich. Viele mRNAs in Prokaryoten besitzen außerdem komplex gefaltete Domänen, die *Riboswitchs* genannt werden.^{92, 93} Jeder dieser *Riboswitchs* bindet dabei, ohne Einbeziehung eines Proteinbindungsfaktors, einen Metabolit. Durch die Bindung des Metabolits wird dabei die Struktur der RNA soweit verändert, dass die Translation der RNA eingeleitet oder auch gestoppt wird. Das Gen, das durch diesen

Metaboliten aktiviert oder deaktiviert wurde, kodiert dabei ein Protein, das gerade für die Biosynthese des Metaboliten zuständig ist. In einer *Feedback*-Schleife kontrolliert ein Metabolit durch den *Riboswitch* somit seine eigene Biosynthese (s. Abbildung 1.12).

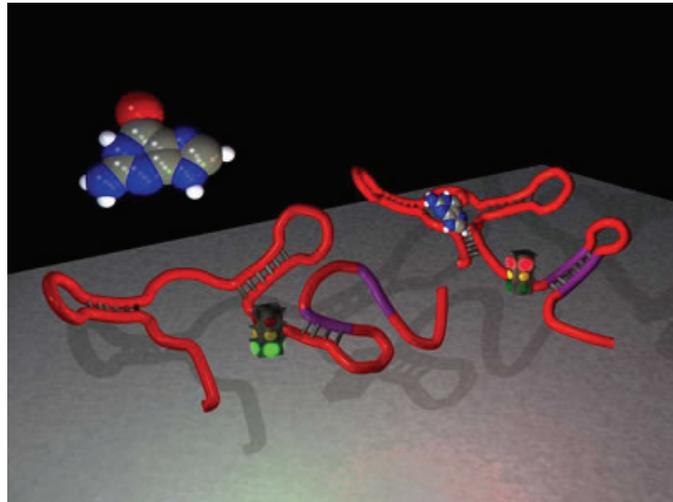


Abbildung 1.12: Funktionsweise eines Riboswitchs.⁹³ Ist wenig von dem Metabolit verfügbar, überwiegt die offene mRNA-Form und ermöglicht das Ablesen der mRNA (lila: Startkodon, z.B. *Shine-Dalgarno*-Sequenz). Ist Metabolit vorhanden, ist die Initiation der Translation der mRNA blockiert.

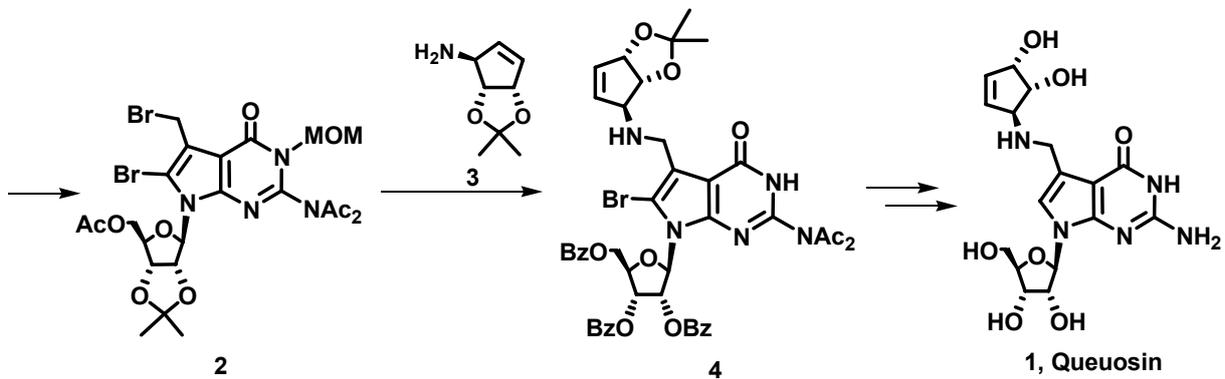
Neben preQ₁ konnte nachgewiesen werden, dass Guanin⁹⁴, Flavinmononukleotid (FMN), Vitamin B12, Thiaminpyrophosphat (TPP)⁹³, S-adenoxylmethionin (SAM)^{95, 96} und Adenin⁹⁷ Metaboliten für *Riboswitchs* sind.

1.3.4. Chemische Synthese von Queuosin

In den vergangenen 20 Jahren wurde nur eine Synthese der tRNA Modifikation Queuosin veröffentlicht. Zwei weitere Synthesen beschreiben den Aufbau der Nukleobase Queuin (Q-Base). Die drei Wege, sowie die Synthese des wichtigen Cyclopentenylbausteins, werden im Folgenden beschrieben.

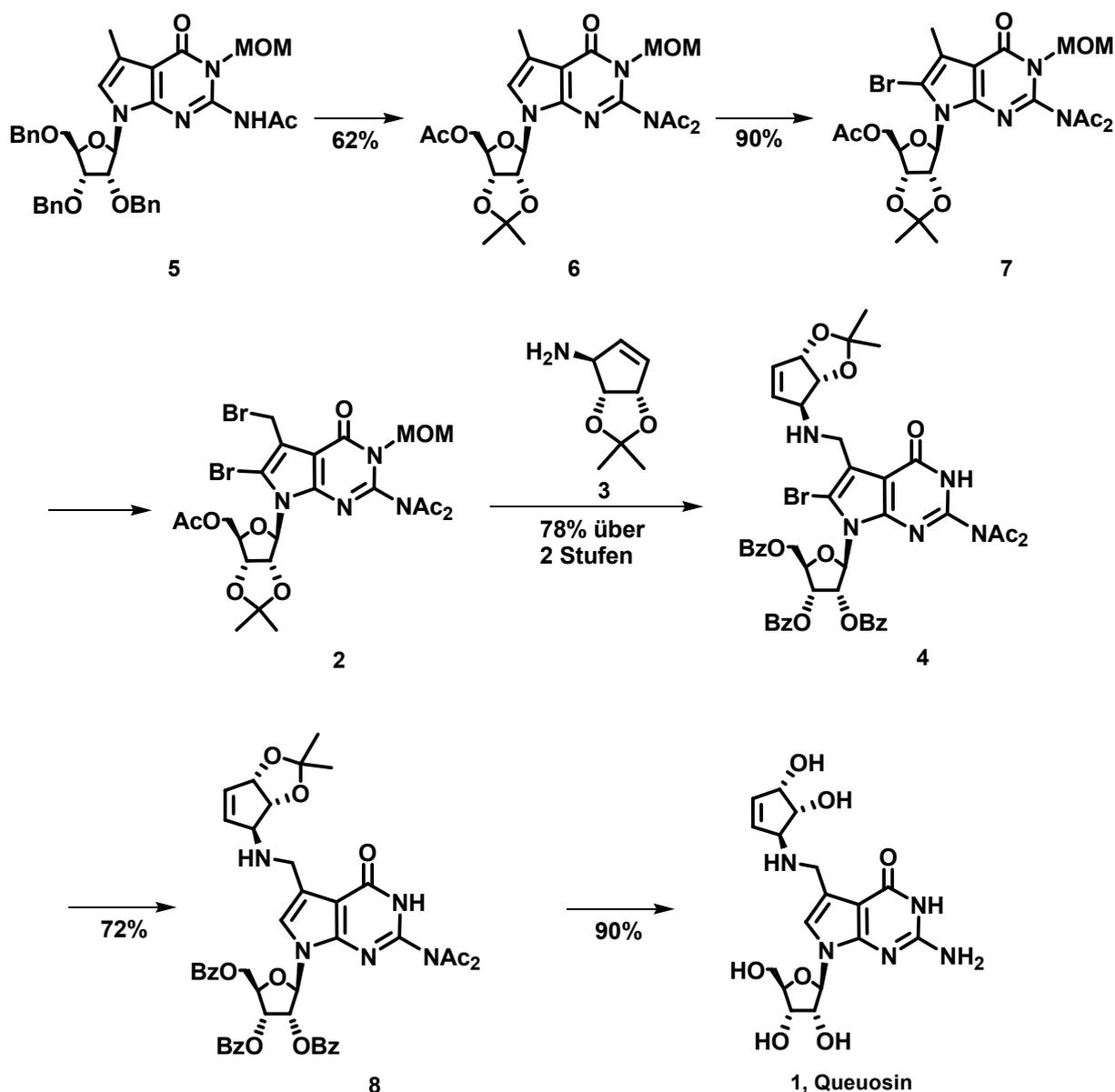
*Synthese von Queuosin nach Ohgi et al.*⁹⁸

Nachdem 1975 die Struktur von Queuosin von *Kasai et al.* bestimmt wurde,⁹⁹ veröffentlichten *Ohgi et al.* vier Jahre später die erste und einzige vollständige Synthese zum Queuosin. Queuosin **1** wurde durch eine nukleophile Substitution eines geschützten Dibrom-desazaguanosinderivats **2** mit einem Cyclopentenylaminbaustein **3** synthetisiert (s. Schema 1.2).¹⁰⁰



Schema 1.2: Syntheschema von Queuosin von *Ohgi et al.*

Die Dibromverbindung **2** wurde erhalten, indem ein methoxymethylether- (MOM-) und acetylgeschütztes 7-Methyl-7-desaza-tribenzyl-guanosin **5** zunächst am Zucker debenzyliert und acetamid- und acetylgeschützt wurde. Verbindung **6** wurde anschließend mit NBS zu Nucleosid **7** monobromiert und in einem weiteren Schritt erneut mit NBS zum Nucleosid **2** dibromiert.

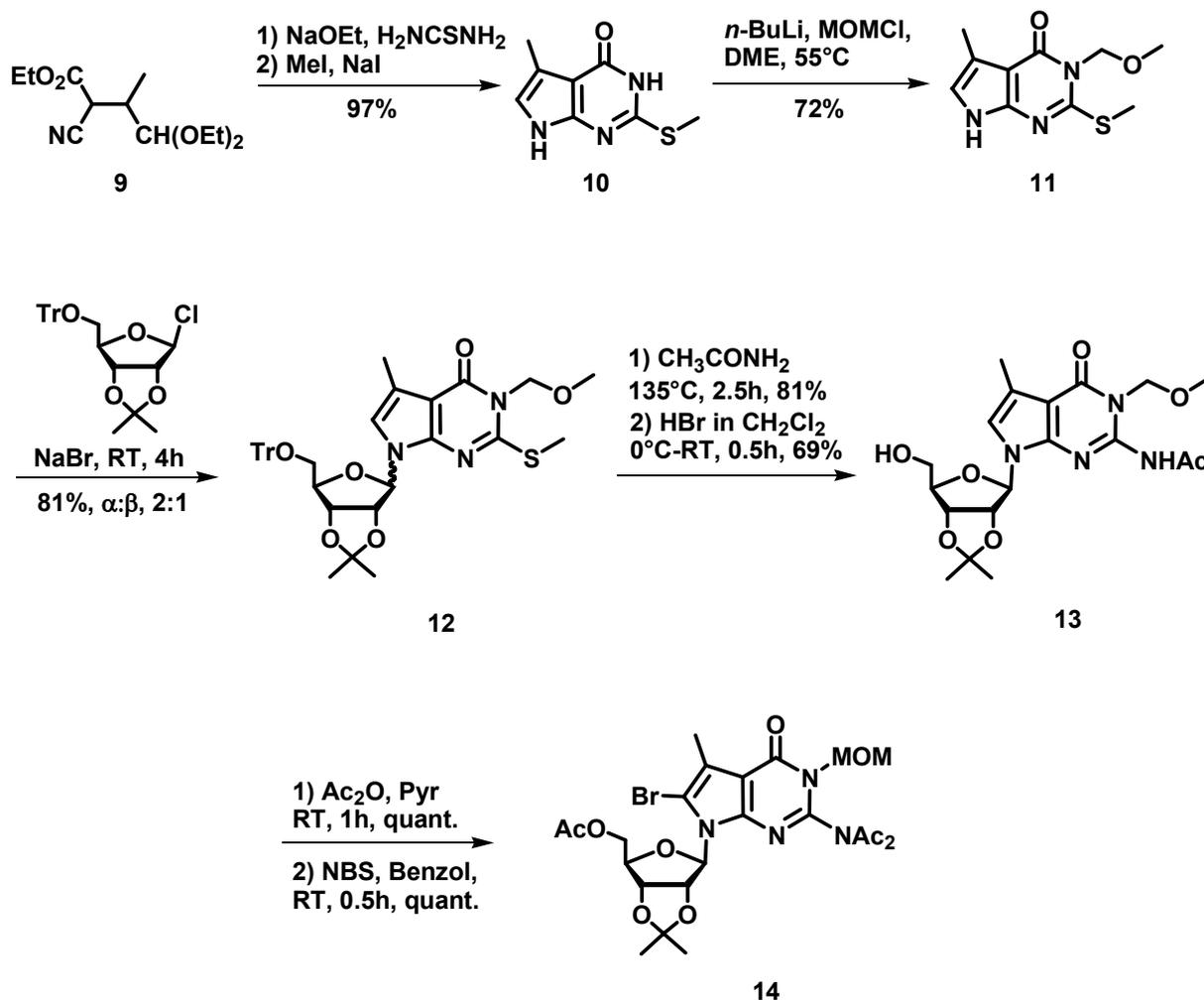


Schema 1.3: Erste Synthese von Queuosin.⁹⁸

Nach erfolgreicher Substitution des Dibromnucleosids durch Cyclopentenylamin **3** mit Diisopropylamin in Benzol bei Raumtemperatur wurde Verbindung **4** mit einem Zink-Kupfer Reagenz debromiert. Nach Entschützung unter alkalischen und sauren Bedingungen konnte Queuosin **1** erhalten werden.[†]

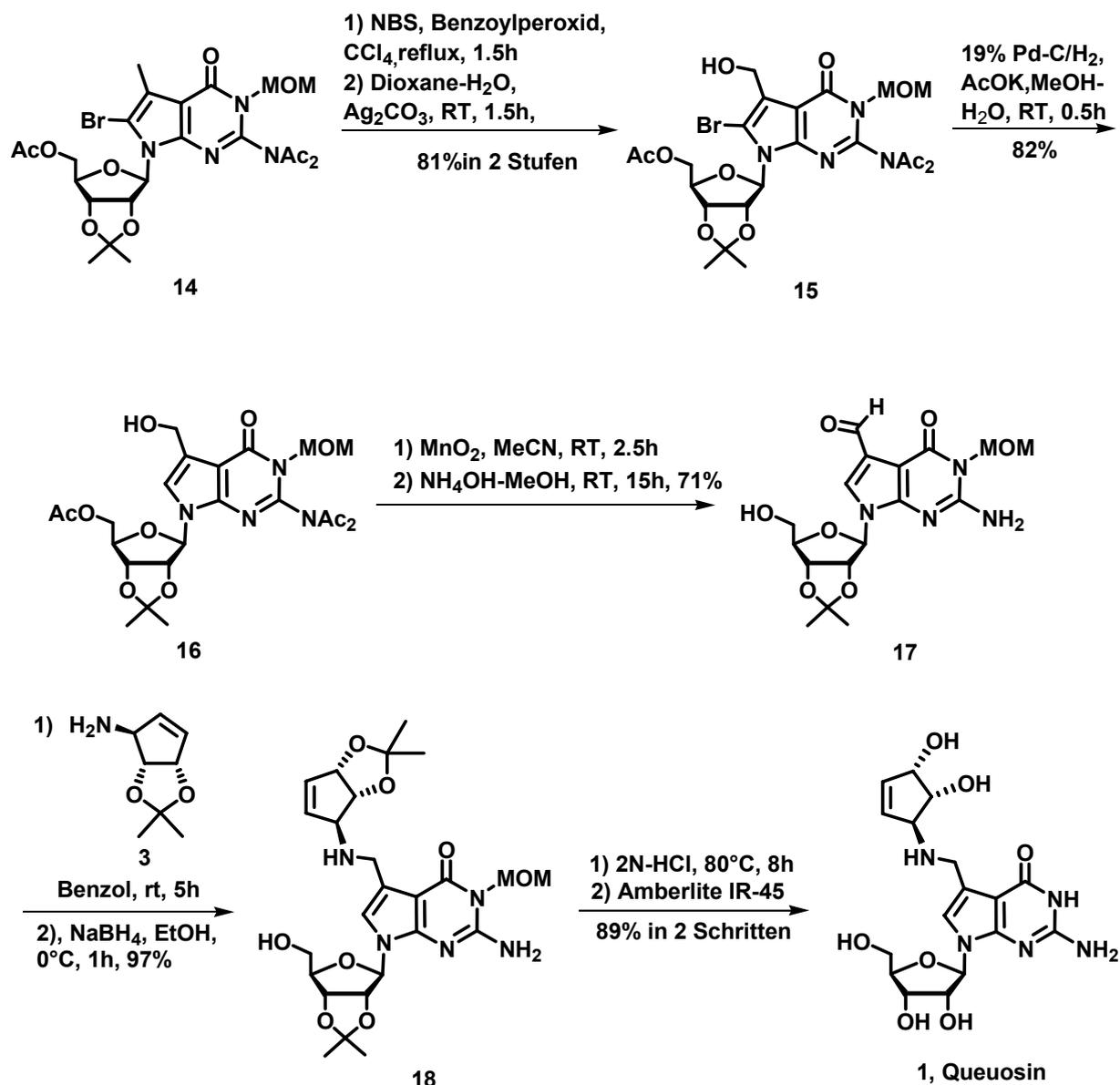
Nachfolgende Versuche ergaben, dass diese publizierte Reaktionssequenz nicht reproduzierbar war, und die bisher veröffentlichten Schlüsselschritte wurden von den Autoren durch eine neue Synthesesequenz ersetzt.¹⁰¹

[†] Eine Gesamtausbeute und Stufenzahl dieser Synthese kann nicht angegeben werden, da die Synthese des Cyclopentenylbausteins **3** von den Autoren nicht veröffentlicht wurde.



Schema 1.4: Verbesserte Synthese von Queuosin, Teil 1.

In der nun verbesserten Synthese kondensierten *Ohgi* et al. zunächst Cyanoacetal **9** mit Thioharnstoff in der Gegenwart von Natriumethoxid zum 3-Methoxymethyl-2-methylthio-7-methyl-7-desazahypoxanthin **10**.¹⁰² Erfolgreiche Schützung als Methoxymethylether mit *n*-BuLi und Methoxymethylchlorid ergab **11**. Die Glycosidierung nach *Königs-Knorr* Bedingungen mit einem trityl- und acetonidgeschützten Chlorzucker verlief in guter Ausbeute, allerdings erhielt man ein Nukleosidgemisch der beiden α : β Anomere im Verhältnis 1:2.¹⁰³ Das Isomerengemisch wurde vor der Trennung zunächst in das Acetylaminderivat überführt und anschließend mit HBr zu **13** detrityliert. Nach Acetylschützung und Bromierung mit NBS wurde Monobromnukleosid **14** in quantitativer Ausbeute erhalten.



Schema 1.5: Verbesserte Synthese von Queuosin, Teil 2.

14 wurde nun mit NBS und Tetrachlormethan in Gegenwart des Radikalstarters Benzoylperoxid zur Dibromverbindung umgesetzt und anschließend mit Silbercarbonat zum Bromalkohol 15 hydrolysiert. Nach Debromierung von 15 in Gegenwart von Palladium auf Kohle wurde 16 mit Mangandioxid zum Aldehyd oxidiert und die Acetylschutzgruppen wurde basisch gespalten. 17 wurde nun in einer reduktiven Aminierung mit dem Cyclopentenylamin 3 gekuppelt und *Ohgi et al.* erhielten nach vollständiger Entschützung Queuosin 1.

Für das von *Ohgi et al.* eingesetzte Cyclopentenylamin 3 wurde zunächst die absolute Konformation bestimmt und nach Kupplung zum Queuosin konnte somit ebenfalls

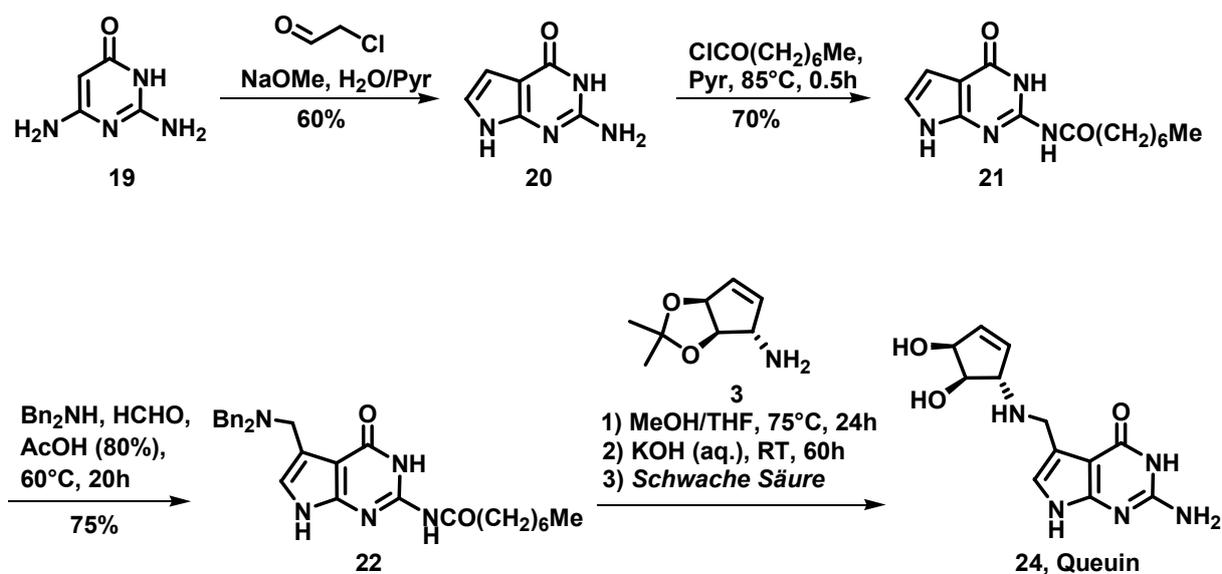
die absolute Konformation des natürlichen Queuosins bestimmt werden.¹⁰⁴ Allerdings wurde von den Autoren nicht angegeben, wie und in welcher Ausbeute das Cyclopentenylamin **3** synthetisiert wurde (dasselbe trifft für die unten angegebene Forschergruppe um *Nishimura* zu, die für die Synthese auf das Synthesepaper von *Ohgi* et al. verweisen).

1.3.5. Chemische Synthese von Queuin

Neben der einen bekannten Synthese von Queuosin wurden zwei weitere Synthesen der Base durchgeführt. *Akimoto* et al. synthetisierten in den 90er Jahren Queuin in einer konvergenten Synthese (s. Schema 1.6),^{75, 105} während *Barnett* et al. einen linearen Syntheseweg verfolgten (s. Schema 1.7).¹⁰⁶

Synthese von Akimoto et al.

Um die Q-Base **24** zu erhalten, synthetisierte die Gruppe um *Akimoto* zunächst durch Kondensation von 2,4-Diamino-6-hydroxypyrimidin mit α -Chlorformaldehyd 7-Desazaguanin **20** (s. Schema 1.6), welches anschließend mit Oktansäurechlorid in Pyridin zu **21** geschützt wurde.



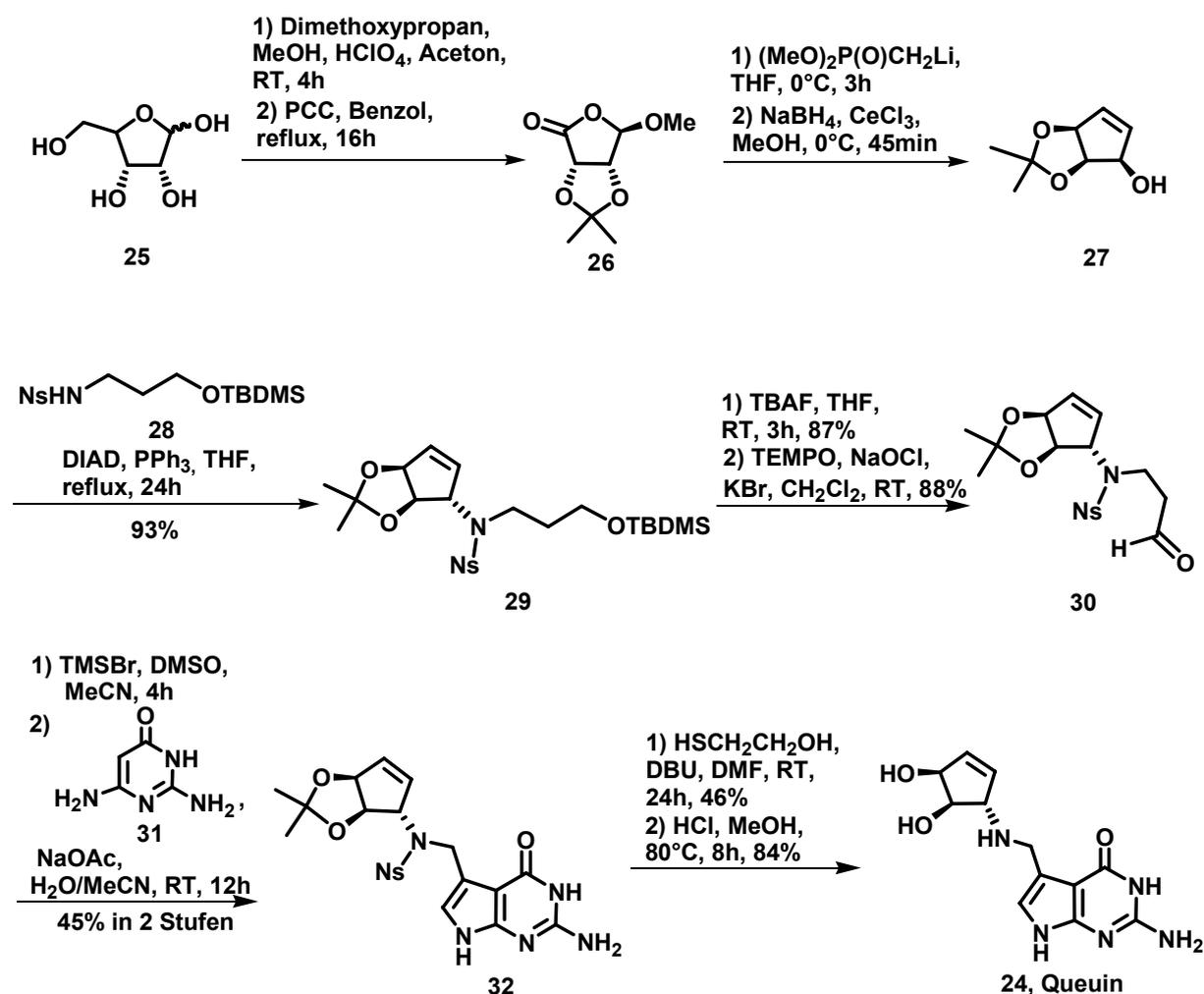
Schema 1.6: Queuinsynthese von Akimoto et al.

Nach Optimieren unterschiedlich substituierter Dialkylamine und Variation der Länge der Alkylgruppe konnte das erwünschte 7-substituierte Produkt **22** in einer *Mannich*-Reaktion erhalten werden. Der zweite kritische Schritt, die Amino austauschreaktion zwischen dem dibenzylierten Amid **22** und dem acetonidgeschützten Cyclopentenylamin **3** wurde ebenso optimiert, jedoch führte nur die Verwendung großer Mengen (5 äq.) des Cyclopentenylamins **3** zu einer zufriedenstellenden Ausbeute der geschützten Q-Base. Nach alkalischer und saurer Entschützung wurde Queuin erhalten.

Dieser Syntheseweg zur Q-Base ist elegant und kurz; es muss allerdings berücksichtigt werden, dass die weiterführende Synthese zum Nukleosid Queuosin nicht durchgeführt wurde. Fünf weitere Stufen müsste man für die Umsetzung zum Nukleosid aufwenden. Nachteilig wirkt sich ebenfalls die große Menge des Cyclopentenylamins **2** aus (5 äq.), welches zur Synthese benötigt wird, da dies die Synthese von GalQ, ManQ und oQ deutlich erschwert. Ebenso ist es fraglich, ob ein hochfunktionalisiertes Cyclopentenylamin die harschen Reaktionsbedingungen der Amino austauschreaktion toleriert.

Synthese von Barnett et al.

In der Queuin Synthese von *Barnett et al.* wird im Gegensatz zur Synthese von *Nishimura et al.* der Cyclopentenring nicht durch eine Kupplung an das Pyrrolopyrimidinringsystem eingeführt, sondern der Heterozyklus der Q-Base am Cyclopenten **30** schrittweise aufgebaut (s. Schema 1.7).



Schema 1.7: Queuin-Synthese von *Barnett et al.*

Schlüsselschritt der Sequenz ist die Cyclokondensation zwischen dem α -bromierten Aldehyd **30**, an dem bereits das Cyclopentylamin gebunden ist, und einem 2,4-Diamino-6-hydroxypyrimidin **31**.

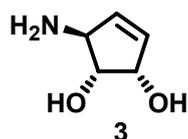
Um Aldehyd **30** zu erhalten, wurde, ausgehend von D-(-)-Ribose **25**, der Zucker geschützt und dieser mit PCC zum Laktone **26** oxidiert. Nach einer intramolekularen

Wittig-Reaktion wurde das Pentenon zum zyklischen Triol **27** reduziert. In einer Mitsunobu-Reaktion wurde ein Sulfonamid an das Cyclopentenol gekuppelt. Das resultierende Sulfonamid **17** wurde am Alkohol entschützt und zum Aldehyd **30** oxidiert. Nach der Kondensation mit **31** und der Entschätzung des Produktes wurde Queuin in 14 Schritten erhalten, von denen elf in linearer Abfolge waren. Auch in dieser Synthese wurde die Queuin-Base nicht zum Nukleosid Queuosin umgewandelt.

Die vorgestellte Synthese von Queuin ist zwar die bisher kürzeste beschriebene Synthese, allerdings wird der Cyclopentenring als Ausgangsverbindung in die lineare Synthese eingesetzt. Eine Glycosidierung zum Queuosin, genauso wie die Verwendung von höher modifizierten Cyclopentenderivaten im Rahmen der Synthese von galQ und manQ, würde die lineare Synthese nochmals verlängern und erschweren. Eine konvergente Synthesestrategie ist daher dem Syntheseweg von *Barnett et al.* vorzuziehen.

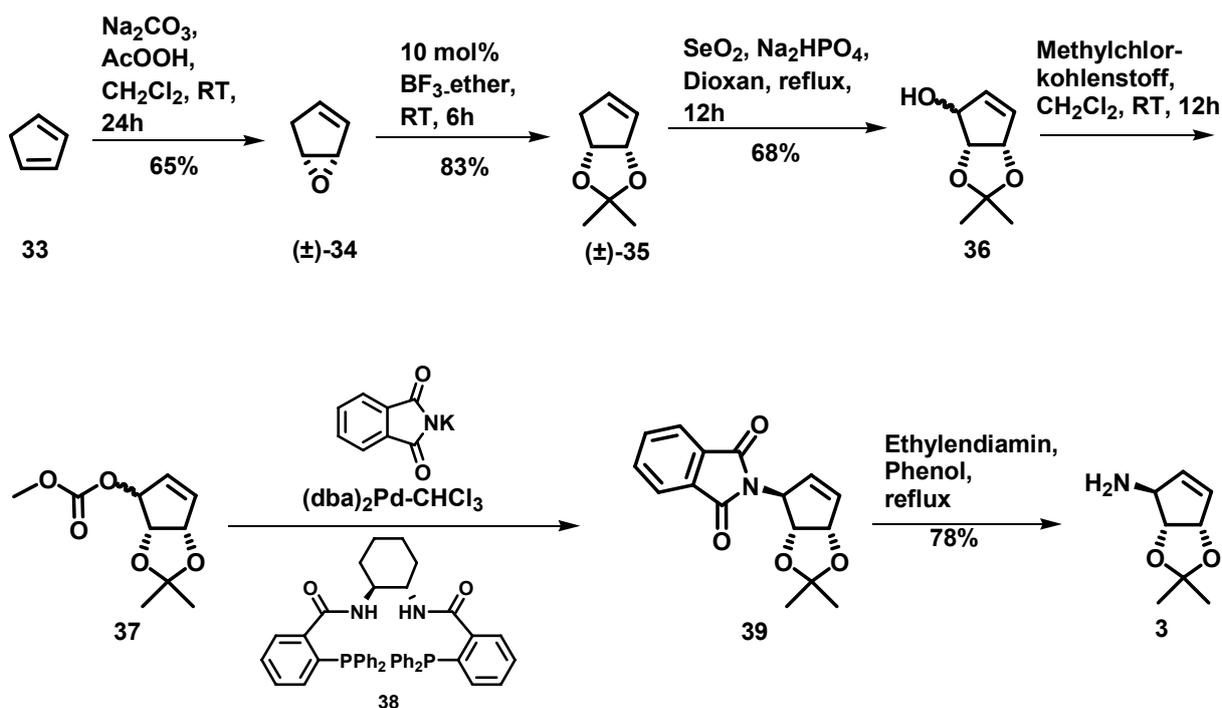
Bekannte Synthesen von Diisopropylidendioxycyclopentenylamin

In den letzten 10 Jahren sind viele Versuche unternommen worden, den Cyclopentenylbaustein **3** in einer kurzen und effektiven Synthese herzustellen.



Kennzeichen dieses Moleküls ist das Cyclopentengrundgerüst. Eine Amin- sowie eine Hydroxyfunktion befinden sich in Allylposition zur Doppelbindung. Die im Molekül befindlichen Hydroxygruppen sind in *cis*-Konfiguration zueinander angeordnet. Die Aminfunktion und der benachbarte Alkohol sind zueinander in *trans*-Stellung.

Die bisher bekannten asymmetrischen Synthesen benötigen für die Synthese des Moleküls 12 bis 16 Stufen oder im Falle einer kürzeren Synthese (s. *Trost et al.*) komplexe Katalysatoren.¹⁰⁷

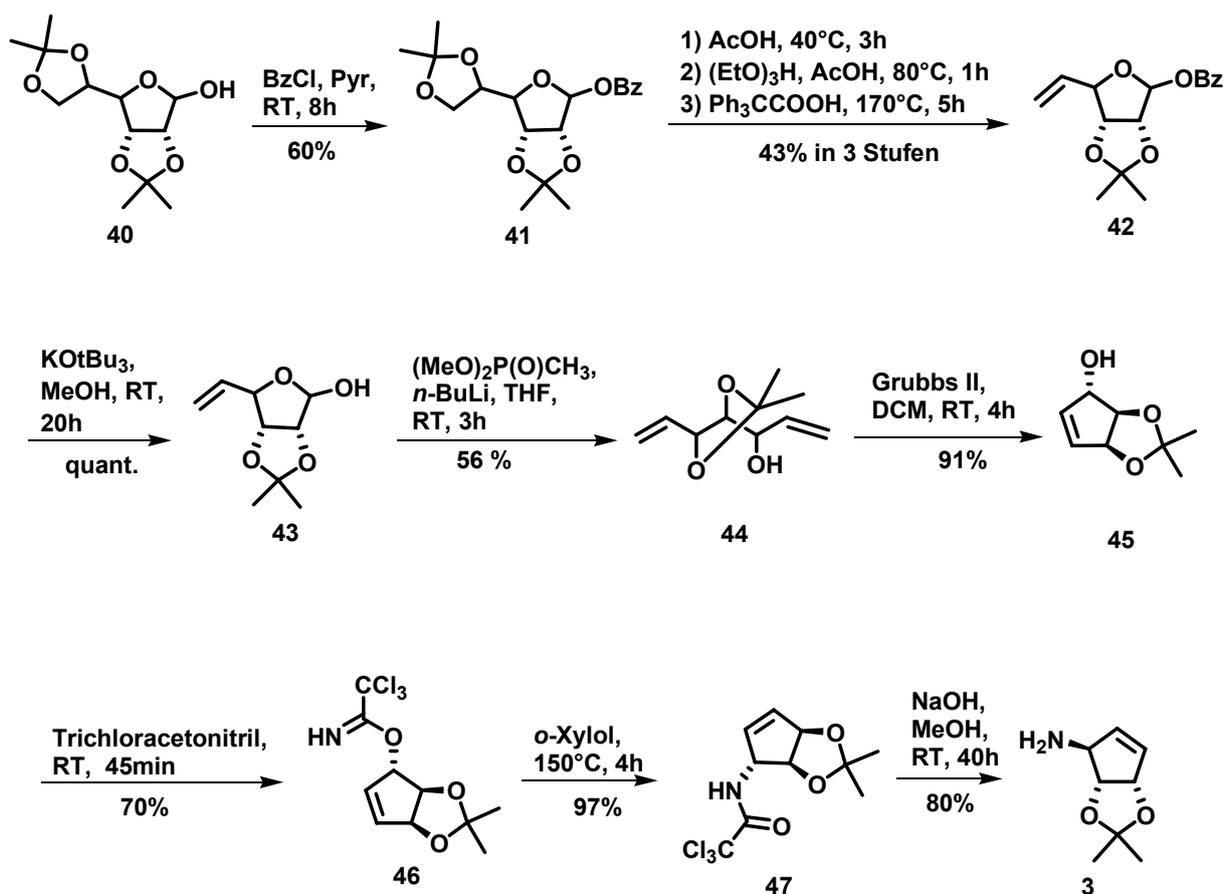


Schema 1.8: Synthese von Cyclopentenylamin **3** von *Trost et al.*¹⁰⁷

Ausgehend vom Cyclopentadien **33** wurde eine der beiden Doppelbindungen epoxidiert¹⁰⁸ und direkt zum Acetonid **35** umgewandelt (s. Schema 1.8). Die Oxidation von **35** wurde mit Selendioxid in heißem Dioxan durchgeführt und ergab den Alkohol **36**. Nach Umwandlung zum Methylcarbonat **37** konnte eine De-Razemisierung vom Enantionerengemisch durch eine palladiumkatalysierte Substitution erfolgreich durchgeführt werden. Hierbei koordinierte das Palladium an die Doppelbindung *syn* zum Acetonid. Nach Entschützung der Phthalimidgruppe erhielt *Trost* Cyclopentenylamin **3** in einer kurzen sechsstufigen Synthese.

Die von *Trost* et al. veröffentlichte Synthese ist sehr kurz, und benötigt den als „(R,R)-DACH-Phenyl *Trost*“ bezeichneten Liganden.¹⁰⁷

Van Boom et al. veröffentlichte zur gleichen Zeit eine Synthese, deren kürzeste lineare Synthesesequenz doppelt so viele Syntheseschritte hatte, wie die von *Trost* et al. Die Synthese war allerdings nach Optimierung von *Vonlanthen* und *Leumann*¹⁰⁹ im Multi-Gramm-Maßstab durchführbar und verspricht eine einfache, aber zeitintensive Synthese des Cyclopentenylamins **3** (s. Schema 1.9).

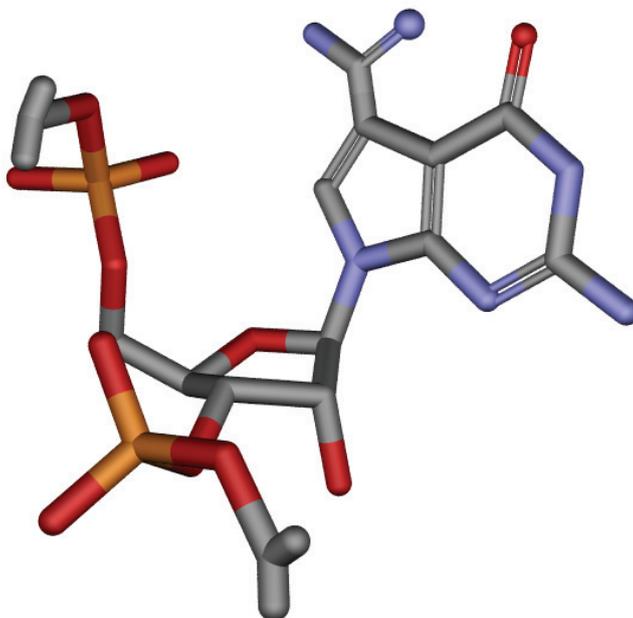


Schema 1.9: Synthese von Cyclopentenylamin 3 nach *Van Boom* et al..

Galaktose wurde zunächst acetonid- und benzoylgeschützt. Selektive Entschützung des endständigen Diols mit folgender Eliminierung der beiden freien Hydroxygruppen führten zum Zuckerderivat **42**. Dieses wurde am 1'-Kohlenstoff des Zuckers wieder basisch entschützt und die offene Form des Zuckers in einer *Wittig*-Reaktion zum terminalen Alken **44** verlängert. Die anschließende *Grubbs*-Ringschlussmetathese verlief in hoher Ausbeute. Der Alkohol **45** wurde dann zum Acetimidat **46** umgewandelt und in einer thermischen [3,3]-Umlagerung erhielt man das entsprechende Trichloroacetamid **47**. Die anschließende alkalische Entschützung ergab das acetonidgeschützte Cyclopentenylamin **3**.

Weitere Cyclopentenylsynthesen, jedoch mit geringeren Gesamtausbeuten wurden von *Tanaka* et al. (13+x Stufen)¹¹⁰, *Fang*¹¹¹ und *Kim* et al. (11 Stufen)¹¹² veröffentlicht.

1.4. Archaeosin



1.4.1. Struktur und Funktion von Archaeosin

Die natürliche tRNA Modifikation Archaeosin wurde in den 80er Jahren das erste Mal von *Walker et al.* beobachtet und tritt in tRNA kodierend für Methionin auf.¹¹³ 10 Jahre später konnte die Struktur dieser Modifikation, abgekürzt mit G*, gelöst werden.¹¹⁴ Archaeosin ist genauso wie Queuosin ein 7-Desazaguanosinderivat. Anstelle des Cyclopentenylrings des Queuosins, ist Archaeosin an der 7-Position Amidin funktionalisiert. Während Queuosin nur in Pro- und Eukaryoten zu finden ist, existiert Archaeosin allein in Archaeabakterien. Auch die Lokalisation von Archaeosin innerhalb der tRNA unterscheidet sich prägnant von dem Ort von Queuosin; während Q an der *Wobble* Position im Codon der tRNA an Position 34 lokalisiert ist, findet man G* an Position 15.

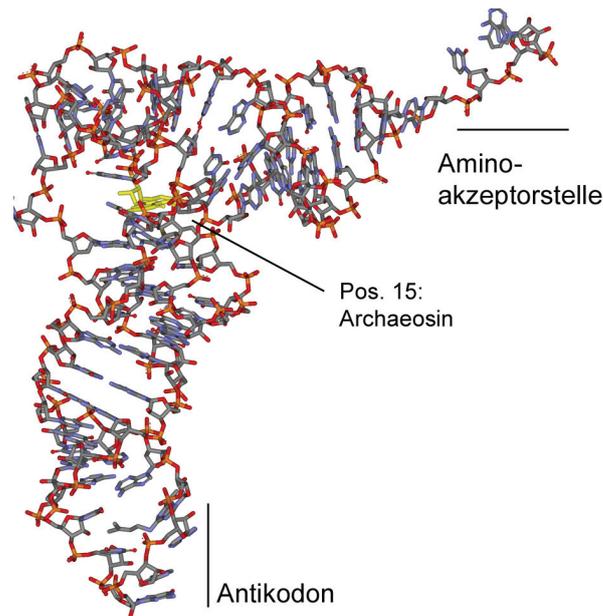


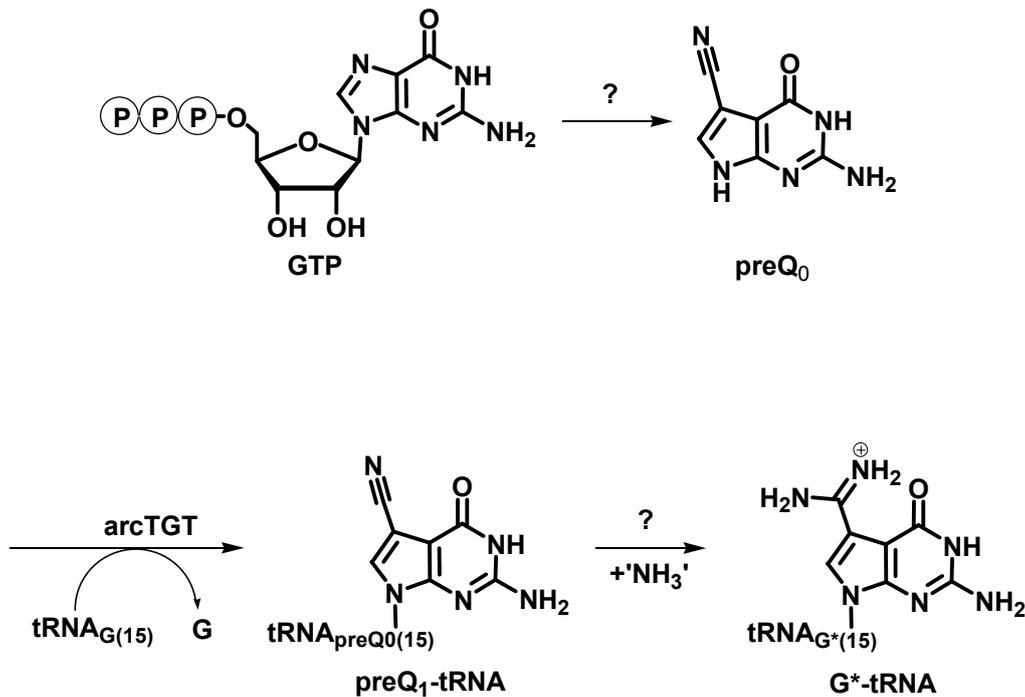
Abbildung 1.10: tRNA Kleeblatt-Struktur mit G* und tRNA-Modell von *thermus thermophilus* mit Archaeosin.¹¹⁵

Betrachtet man die Lage von Archaeosin in der tRNA Struktur, so nimmt G* eine zentrale Position in der tRNA ein. Es verbindet den RNA Teil des D-Arms mit dem Akzeptorarm, ist über RNA Basenpaarung mit dem Aminoakzeptorarm verbunden und in direkter räumlicher Umgebung zum TΨC-Arm der tRNA.

G* bildet hierbei eine Tripletstruktur, wie in Abbildung 1.10 zu sehen ist, aus. So ist G* (Pos. 15) mit einer Pyrimidinbase an Position 48, die im Übergang zwischen T-Arm und dem variablen Arm liegt, über H-Brücken verbunden, sowie mit einer Purinbase an Position 59 verbrückt, die zentral in der T-Schleife liegt (s. Abbildung 1.10). Es ist daher zu vermuten, dass Archaeosin wesentlich dazu beiträgt, die Struktur der tRNA zu stabilisieren^{53, 116-118}.

1.4.2. Biosynthese von Archaeosin

Ebenso wie Queuosin wird Archaeosin ausgehend von Guanosintriphosphat (GTP) in einem vermutlich dreistufigen Prozess synthetisiert (s. Schema 1.11).



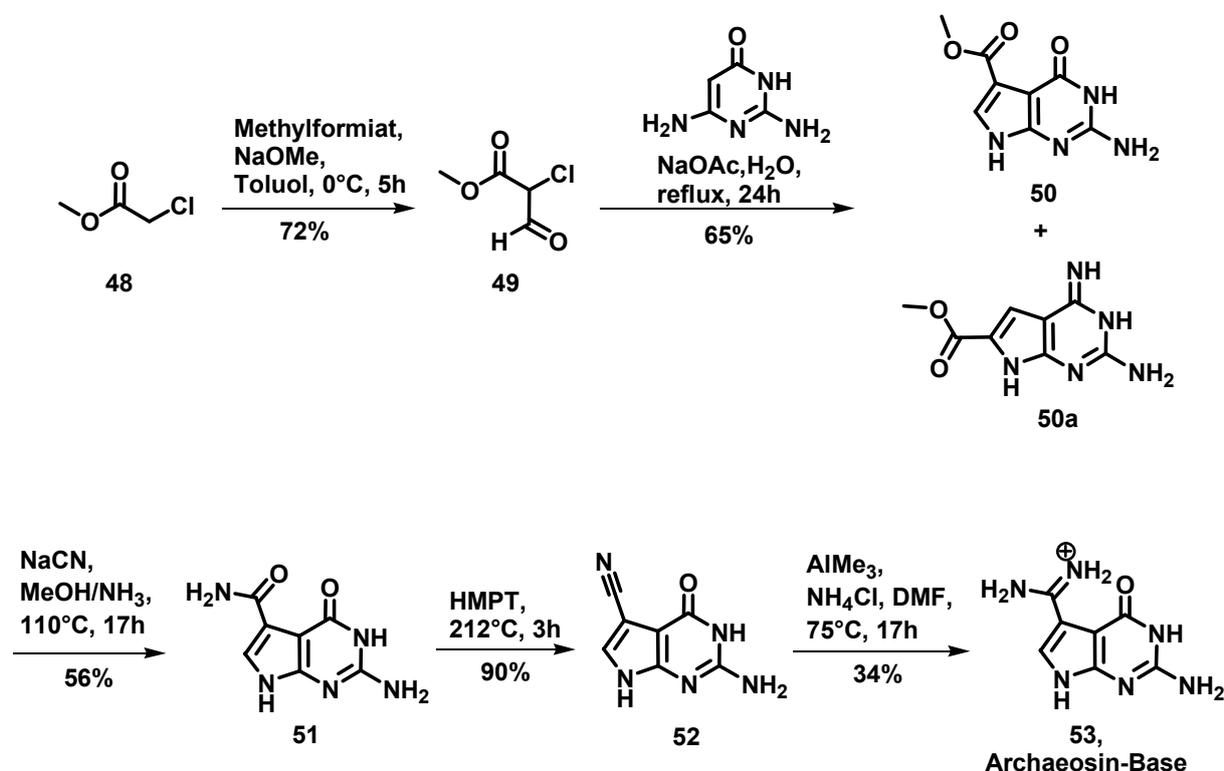
Schema 1.11 Biosynthese von Archaeosin.

Im ersten Schritt wird GTP in die Nucleobase 7-Desazaguanin-7-carbonitril (PreQ₀) umgewandelt. Das bei dieser Reaktion beteiligte Enzym wurde bisher nicht lokalisiert.⁶⁹ Im nachfolgenden Schlüsselschritt synthetisiert eine Archaea spezifische Transglykosid-Transferase (arcTGT) eine Nucleobasen-austauschreaktion, in der Guanin aus einer spezifischen tRNA-Sequenz durch preQ₀ ersetzt wird.^{76, 119-122} Es wird vermutet, dass nach erfolgreichem Einbau eine Transaminase ein NH₃-Molekül auf die tRNA überträgt, das Nitril zum Amidin umwandelt und die Biosynthese des Archaeosins in der tRNA abschließt.

1.4.3. Chemische Synthese der Archaeosin-Base

Während die tRNA Modifikation Queuosin bereits synthetisiert wurde, ist keine Synthese bekannt, die Archaeosin im mg-Maßstab oder größer ergibt.^{†114}

Allein *Hashizume* und *McCloskey* entwickelten eine 5 stufige Synthese der Archaeosin Base (G*-Base) und erhielten in diesem Fall 4 mg der G*-Base.



Schema 1.12: Synthese der Archaeosin-Base 18.

Chlorameisensäuremethylester wurde zunächst mit Methylformiat und 2,4-Diamino-6-hydroxypyrimidin in den Pyrrolopyrimidinerster **50** überführt und ammoniakalisch zum Amid **51** umgewandelt (s. Schema 1.12). Nach Reduktion mit HMPT wurde die preQ₀-Base **52** in guten Ausbeuten erhalten. Die nachfolgende Umwandlung des Nitrils zum Amidin erfolgte mit Trimethylaluminium und Ammoniumchlorid und ergab die Archaeosin-Base **53** in 5 Schritten und einer Gesamtausbeute von 8%.

[†] *Gregson et al.* war in der Lage, in HPLC Experimenten Archaeosin im µg-Maßstab zu synthetisieren und massenspektroskopisch nachzuweisen.

2. Aufgabenstellung

Im Rahmen der Dissertation in der Arbeitsgruppe von Prof. *Carell* sollten drei Forschungsprojekte bearbeitet werden. Da bereits eine Synthese der tRNA Modifikation Queuosin veröffentlicht wurde¹⁰⁰, sollte ein kürzerer und effizienterer Syntheszugang zu diesem Molekül gefunden werden. Für die tRNA Modifikation Archaeosin war dagegen noch keine Synthese bekannt. Eine effiziente Synthese dieser beiden Bausteine sollte die Erforschung der Eigenschaften und die Wirkweise dieser beiden Modifikationen innerhalb der Zelle ermöglichen. Darüberhinaus war die Synthese der biologisch wichtigen Moleküle preQ₀ und preQ₁ geplant. PreQ₁ soll dabei in *Riboswitch*-Kristallisationsstudien der Arbeitsgruppe von Prof. *Ficner* der Universität Göttingen eingesetzt werden.

3. Synthese der natürlichen tRNA Modifikationen Queuosin und Archaeosin

3.1. Synthese von Queuosin

In den 80er Jahren wurde bereits eine Synthese der tRNA Modifikation Queuosin von *Ohgi et al.* veröffentlicht.¹⁰⁰ Es handelte sich, wie in der Einleitung beschrieben, um eine ca. 30-stufige Synthesesequenz[§]. Das Ziel dieser Dissertation war nicht die Reproduktion der Veröffentlichung, es sollte vielmehr ein verbesserter und kürzerer Syntheszugang zum tRNA Nucleosid Queuosin erarbeitet werden. Die neue Synthese sollte konvergent sein und es ermöglichen, im Anschluss an diese Arbeit Zucker- und Aminosäurederivate (s. Abbildung 1.9) mit dem Cyclopentenylring zu verknüpfen. Außerdem sollte die Synthese reproduzierbar und in guten Ausbeuten verlaufen, so dass nach der neuen Vorschrift genug Ausgangsmaterial für die Darstellung eines Phosphoramiditbaustein wie **49** oder **50** hergestellt werden kann, der in die RNA Festphasensynthese eingesetzt werden kann.

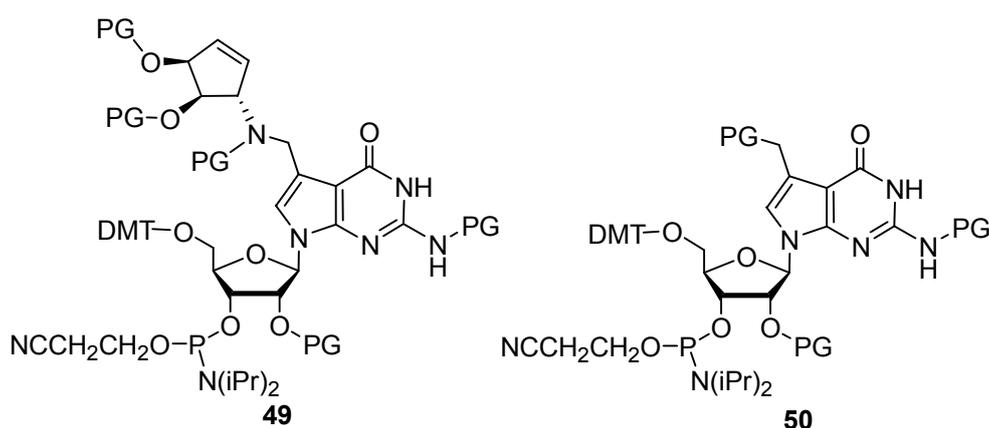


Abbildung 3.1: Phosphoramiditbausteine für die RNA Festphasensynthese.

[§] Bei der Stufenanzahl handelt es sich um eine Schätzung, da die Synthese des Cyclopentenylbausteins nicht veröffentlicht wurde. Die Annahme der Synthese von 30 Stufen erhält man, indem der Stand der Veröffentlichungen des Cyclopentenylbausteins bis zum Jahr 2000 einbezogen wurde.

Die Synthese sollte ferner berücksichtigen, dass ein geeignetes Cyclopentenylaminderivat möglicherweise erst nach der RNA Festphasensynthese auf den RNA Strang übertragen wird. Der Einbau der Modifikation in die tRNA erst nach der RNA Festphasensynthese würde die Anzahl der benötigten verschiedenen, möglichst orthogonalen Schutzgruppen deutlich reduzieren (s. Abbildung 3.1).

Basierend auf diesen Betrachtungen zur Synthese von Queuosin **1** wurde geplant, dass die Bindung zwischen dem 7-Methylkohlenstoff und dem Amin des Cyclopentenylamins in der Synthese möglichst spät aufgebaut werden soll. In dieser Arbeit wurden dabei zwei Möglichkeiten in Betracht gezogen, die Aminomethylbrücke zwischen dem Desazaguanosin und dem Cyclopentenring zu bilden. Eine Möglichkeit bestand darin, ein Tosylat wie **53** oder **55** zu erzeugen und dieses durch das entsprechende Amin **3** oder **54** anzugreifen (s. Abbildung 3.2). Vorarbeiten zu dieser Synthesestrategie wurden in der Arbeit getätigt, aber nach der erfolgreichen Durchführung des zweiten Wegs nicht weiter verfolgt.

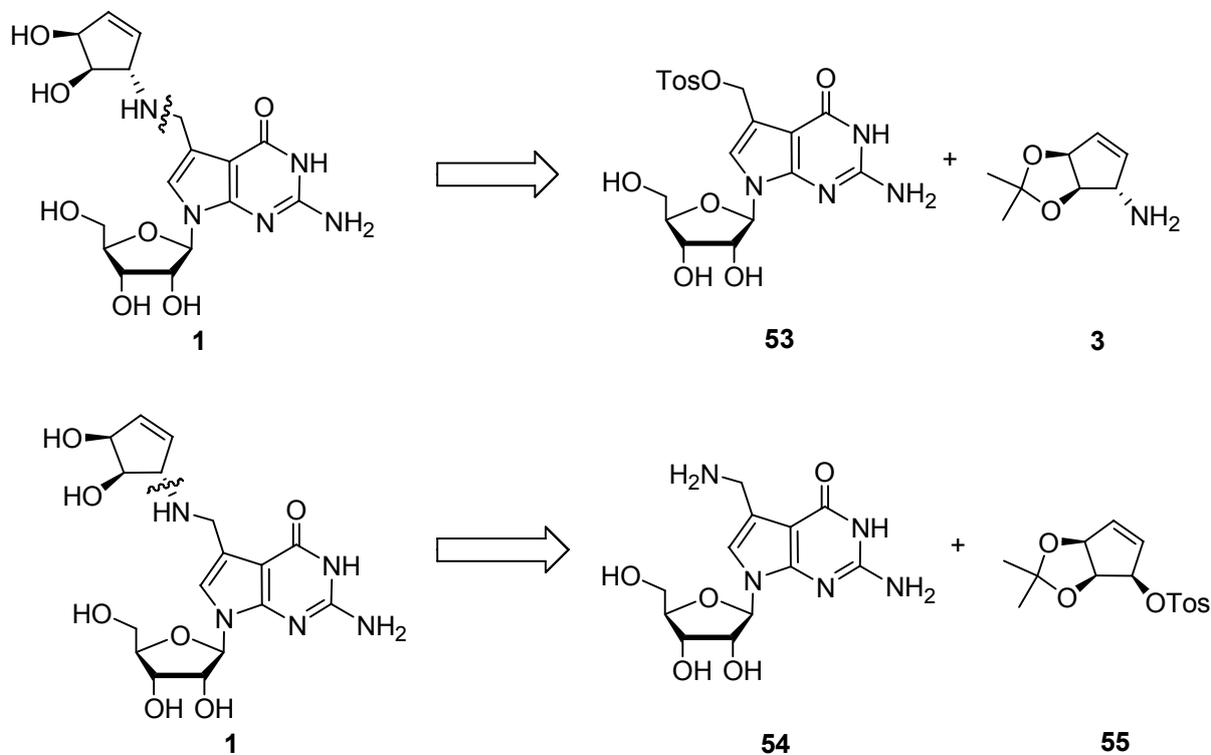


Abbildung 3.2: Queuosinsynthese durch nukleophile Substitution.

Eine weitere Möglichkeit und in der Dissertation erfolgreich angewendete Synthesestrategie war es, die Aminomethylbrücke zwischen dem Cyclopentenylamin und dem 7-Desazaguanosin durch eine reduktive Aminierung zwischen 7-Formyl-desazaguanosinbaustein **52** und dem Cyclopentenylamin **3** (s. Abbildung 3.3) aufzubauen.

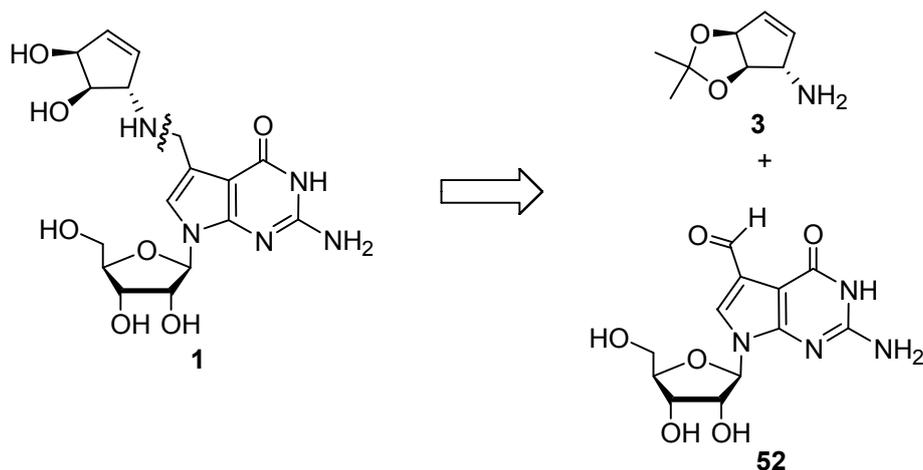


Abbildung 3.3: Queuosinsynthese durch eine reduktive Aminierung als Schlüsselschritt.

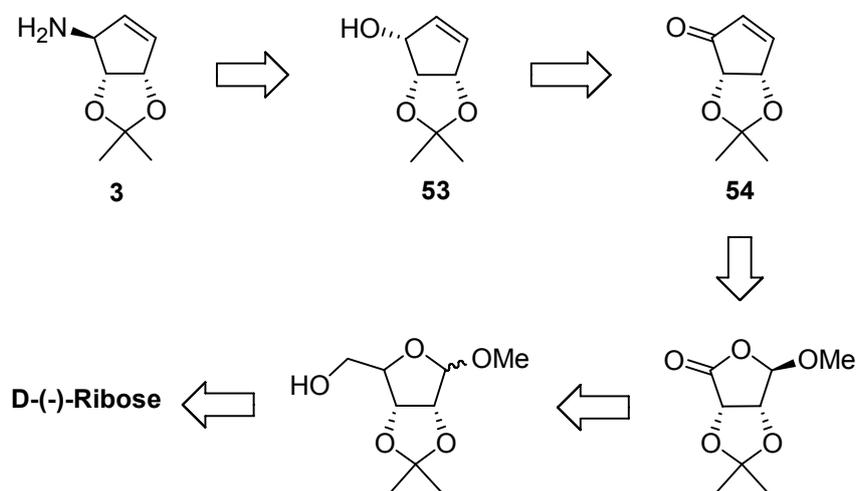
Beide Synthesewege wurden in dieser Arbeit parallel untersucht und werden diskutiert. Die Synthesesequenz mit der reduktiven Aminierung der beiden Bausteine, besteht durch die hohe Toleranz verschiedener funktioneller Gruppen. Die Reaktion kann in unterschiedlichen Lösemitteln und sogar in Wasser durchgeführt werden.

In den folgenden Abschnitten wird die Synthese der beiden Bausteine **3** und **52**, aber auch der alternative Weg der nukleophilen Substitution diskutiert.

3.1.1. Synthese der Cyclopentenylaminderivate

Zu Beginn der Arbeit waren schon verschiedene Synthesen des Cyclopentenylamins **3** bekannt. *Van Boom* et al. (s. Kapitel 1.3.4)¹²³, *Tanaka* et al.¹¹⁰ und *Kim* et al.¹¹² veröffentlichten Synthesen von **3** mit 10-16 Synthesestufen. Mit dem Ziel, die Stufenzahl zum Queuosin deutlich zu reduzieren, sollte eine neue und kürzere Synthese des Cyclopentenylaminbausteins **3** entwickelt werden.^{107, 109}

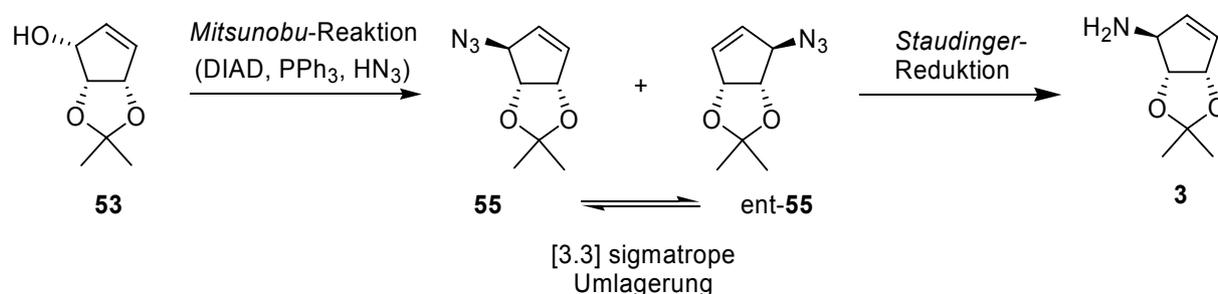
In der Syntheseplanung wurde festgestellt, dass keine der bisherigen Synthesen von **3** durch eine Umfunktionalisierung und Inversion des acetonidgeschützten Allylkohols **53** durchgeführt wurden (s. Schema 3.1). Der Allylkohol wiederum kann durch eine Reduktion des Cyclopentenons **54** dargestellt werden. Dieses erhält man durch eine intramolekulare *Wittig*-Reaktion und eine bereits beschriebene C4'-C5' Bindungsspaltung aus geschützter D-(-)-Ribose.¹²⁴



Schema 3.1: Retrosynthese von Cyclopentenylamin **3**.

Ausgehend von D-Ribose, die bereits zwei der drei benötigten Stereozentren besitzt, scheint die stereoselektive Einführung der zum Diol benachbarten Hydroxygruppe und damit des dritten Stereozentrums wenig problematisch. Hauptproblem dieser sehr kurzen, aber auch anspruchsvollen Synthese (C-C Bindungsspaltung,

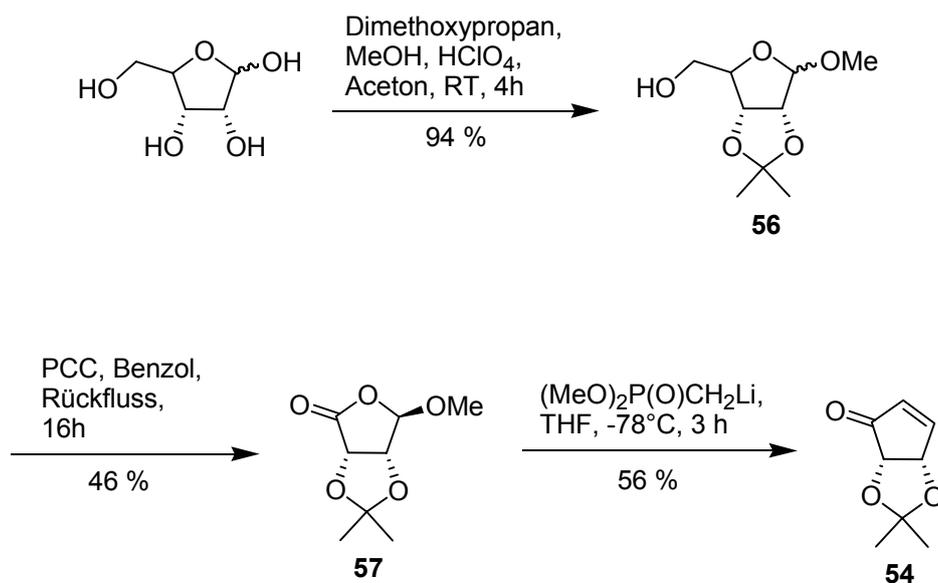
intramolekulare Wittig-Reaktion) war die Erzeugung des Amins **3** durch eine Mitsunobu-Inversion des allylischen Alkohols **53**, welche über eine Allylazid-Zwischenstufe **55** laufen sollte, wie in Schema 3.2 dargestellt wird.



Schema 3.2: Mitsunobu-Reaktion von **53** mit anschließender Staudinger-Reduktion.

Es war zu Beginn der Arbeiten nicht bekannt, wie Mitsunobu-Reaktionen an allylischen Alkoholen verlaufen, wenn die Azid-Zwischenstufe keine bevorzugte regiochemische Position einnehmen kann. Ebenso konnten aus bisherigen Studien nicht entnommen werden, ob das Azid in der Mitsunobu-Reaktion einen Allylalkohol bevorzugt an der S_N2- oder S_N2'-Position angreift.¹²⁵⁻¹²⁸ Beide Fragen konnten nur durch die Synthese des Allylazids **55** bzw. Allylamins **3** beantwortet werden.

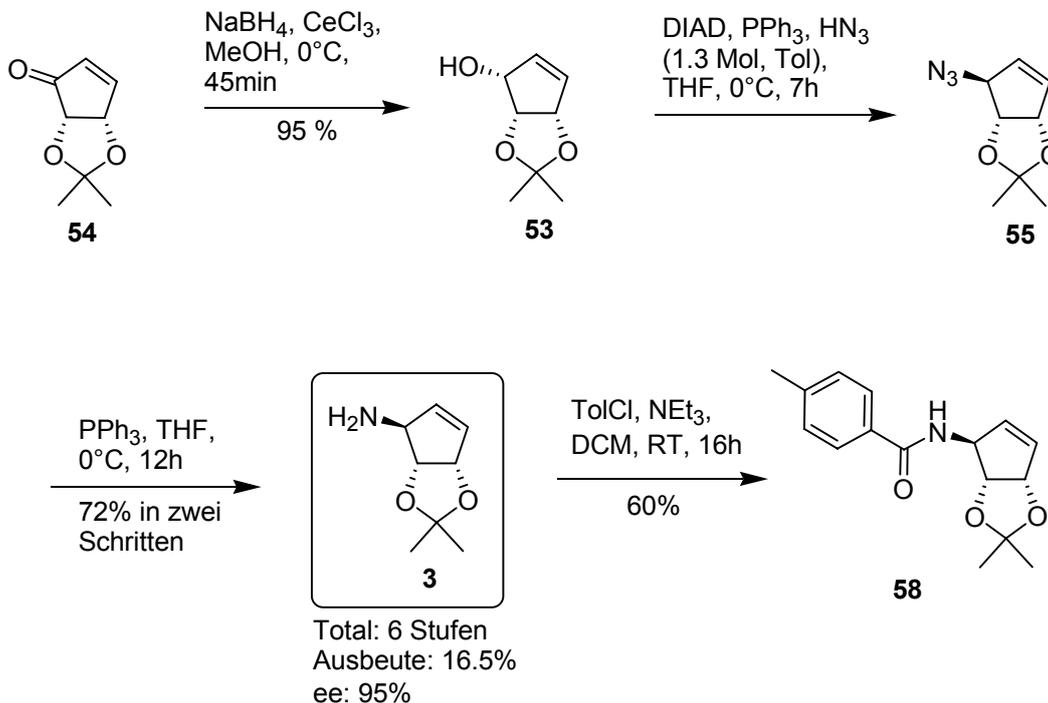
Die Synthese von **3** ging von D(-)-Ribose aus. Die 2'-und 3'-Hydroxygruppen wurden als Acetonid geschützt und die Umwandlung zum Methoxyacetal führte zum Zucker **56** in sehr guter Ausbeute (s. Schema 3.3). Der geschützte Zucker sollte nun nach dem Protokoll von Ali et al. durch Oxidation in das Lakton **57** überführt werden.¹²⁴



Schema 3.3: Synthese von Cyclopentenylamin 3.

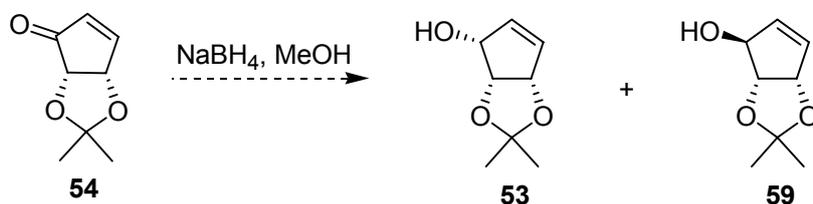
Es wurde ein Überschuss an Pyridiniumchlorochromat (PCC) eingesetzt, wobei **56** zunächst zum Aldehyd oxidiert wird, der als Nebenprodukt in Spuren isoliert werden konnte. Dieses Produkt **7** wurde in einer Ausbeute von 46% isoliert. Längere Reaktionszeiten von über 40 h und ein größerer Überschuss an PCC lieferten keine nennenswerte Ausbeuteerhöhung. Die Substitution von Benzol durch Toluol als Lösungsmittel bewirkte, dass aufgrund der höheren Siedetemperatur von Toluol – es wurde mit einem Wasserabscheider gearbeitet – sich der Zucker zersetzte. Im Anschluss an diese Reaktion wurde eine intramolekulare Ringschlussreaktion nach Wittig zum Cyclopentenon **54** durchgeführt. Die dünnschichtchromatographisch verfolgte Reaktion verlief bei -78°C vollständig und wurde anschließend auf Raumtemperatur erwärmt und mit einem Diethylether-/Wassergemisch extrahiert. Auffällig war, dass sich die Lösung leicht gelblich färbte, während sich die Reaktion auf Raumtemperatur erwärmte. DC Kontrolle ergab, dass sich das gebildete Produkt bei Temperaturen von über 0°C in Lösung zersetzte. Eine zügige Aufarbeitung der Reaktionslösung und die Anwendung geringer Temperaturen und niedriger Drücke beim Entfernen des Lösungsmittels – verbleibender Ether wurde mittels eines N₂-Stroms entfernt – ergaben das leicht flüchtige Cyclopentenon **54** in Form farbloser

Kristalle. Die anschließende Reduktion des Cyclopentenons erfolgte problemlos unter stereoselektiver Kontrolle zum acetonidgeschützten Triol **53** (s. Schema 3.4).¹²⁹



Schema 3.4: Synthese von Cyclopentylamin **3**.

Das dem Reaktionsgemisch zugesetzte Certrichlorid aktiviert die Carbonylgruppe und steuert die 1,2-Addition des H⁻ von der konvexen Seite des Cyclopentenylrings. Für die Studien der darauffolgenden *Mitsunobu*-Reaktion sollte auch die *trans*-ständige Hydroxygruppe **59** (*trans-cis*-Triol) erzeugt werden. Hierzu wurde zunächst versucht das Certrichlorid wegzulassen



Schema 3.5: Geplante Synthese des geschützten Triols als Diastereogemisch.

Doch auch wenn kein Certrichlorid eingesetzt wurde, erhielt man vollständig das *cis-cis*-Triol **53**, d.h. ausschlaggebend für die Regiokontrolle dieser Reaktion, und damit von welcher Seite das Hydrid angreift, ist weniger die Koordination des Certrichlorids, sondern die sterische Hinderung des Cyclopentenons durch die

beiden Hydroxygruppen auf der konkaven Seite. Zur Synthese des trans-Diols mussten andere Wege beschrrieben werden (s. Kapitel 3.1.3)

Die anschließende Mitsunobu-Reaktion von **53** mit Stickstoffwasserstoffsäure in Gegenwart von Diisopropylazodicarboxylat (DIAD) und Triphenylphosphin, die in Kapitel 3.1.1 beschrieben wurde, ergab das Allylazid **55**, welches nachfolgend durch Staudinger-Reduktion zum Cyclopentenylamin **3** umgesetzt wurde. Zur Bestimmung der optischen Reinheit wurde **3** in das toluoylgeschützte Derivat **58** umgewandelt und mittels chiraler HPLC analysiert. Leider zeigte die chirale HPLC einen *ee*-Wert von nur <80%, was auf eine partielle S_N2'-Reaktion und/oder auf ein Allylazid-Umlagerung hinwies (s. Schema 3.2).¹³⁰⁻¹³² Um den Razemisierungsprozess von **55** genauer untersuchen zu können, wurde **55** unter Beobachtung des Drehwertes auf 60°C erhitzt. In der Tat sank die Optische Drehung [α] innerhalb weniger Stunden auf null ab, was bewies, dass der Razemisierungsprozess auch das Ergebnis einer [3.3] sigmatropen Umlagerung sein musste.

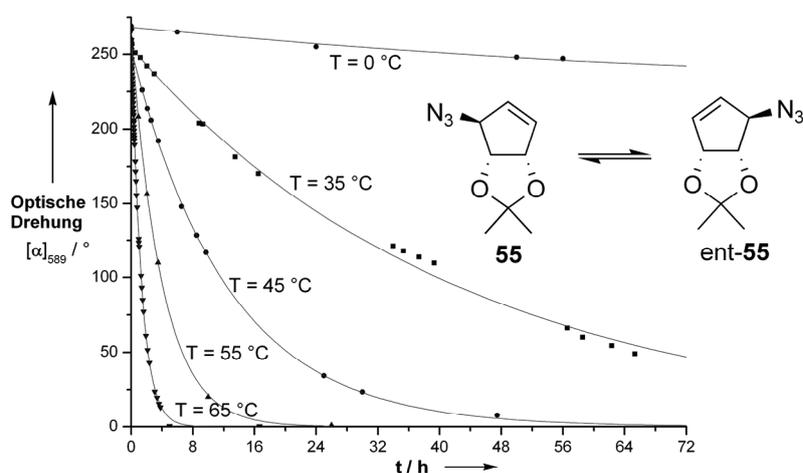


Abbildung 3.4: Razemisierungsprozess von **55**, gemessen in THF.

Um die unerwünschte Allylazid Umlagerung zu unterbinden, wurde die abnehmende optische Drehung in reinem Ethanol bei verschiedenen Temperaturen verfolgt (s. Abbildung 3.4). Aus diesen Ergebnissen lässt sich zum einen entnehmen, dass bei 35°C der Razemisierungsprozess durch Allylazid-Umlagerung nach 5 Tagen

nahezu vollständig abgelaufen ist, aber auch, dass sich die Umlagerung bei 0°C effizient unterdrücken lässt. Die *Mitsunobu*-Reaktion folgt bei dieser Temperatur allein einem S_N2-Mechanismus, kein enantiomeres S_N2'-Produkt lässt sich nachweisen. **53** wurde nun erneut in einer *Mitsunobu*-Reaktion, diesmal bei 0°C, zum Allylazid **55** umgewandelt und die *Staudinger*-Reduktion ebenfalls vorsichtig bei 0°C durchgeführt. Das erhaltene Cyclopentenylamin **3** wurde wieder zu **58** derivatisiert und mittels chiraler HPLC analysiert (s. Abbildung 3.5). Nun konnte Baustein **3** mit einem hervorragenden *ee*-Wert von 95% und einer Ausbeute von 72% über beide Stufen erhalten werden (s. Abbildung 3.3). Dies zeigt, dass die [3.3] sigmatrope Umlagerung erfolgreich unterdrückt werden konnte.

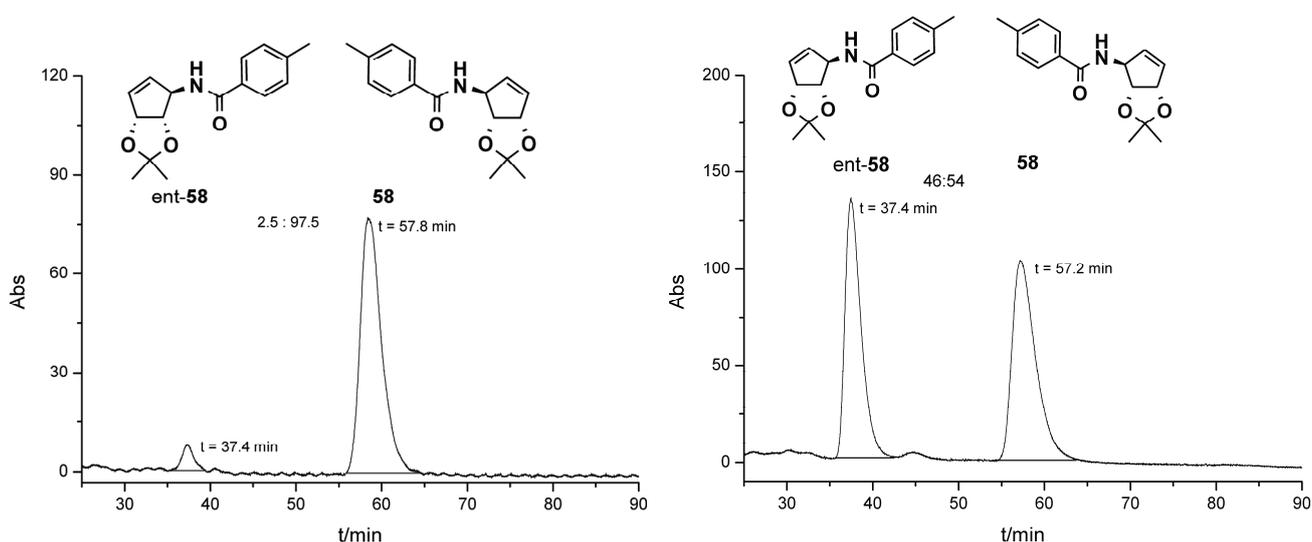


Abbildung 3.5: Chirale HPLC Chromatogramm von **58** und *rac*-**58** (OD-H Säule: Isopropanol/Hexan 90:10, 0.5 mL/min).

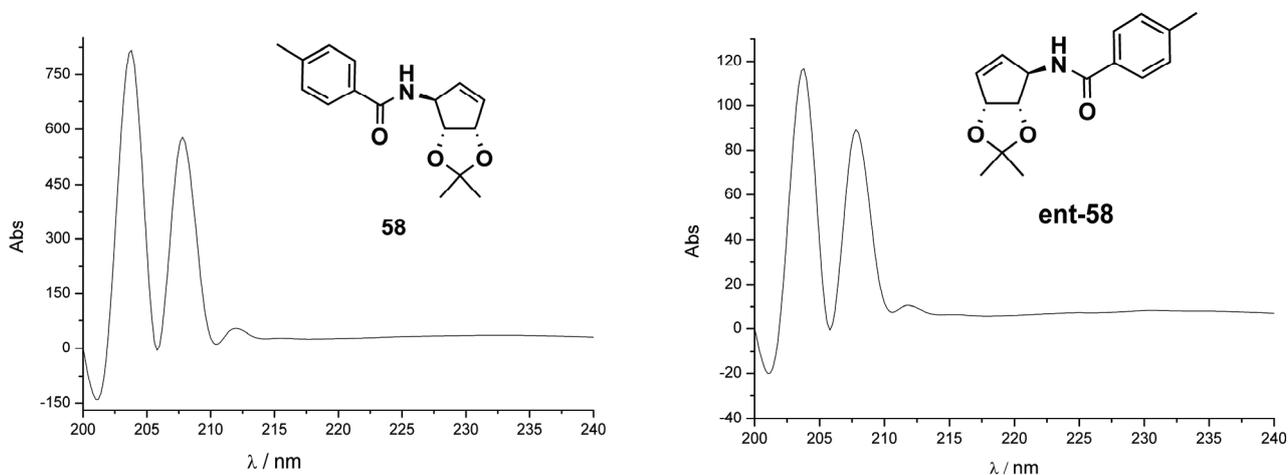


Abbildung 3.6: UV-Vis Absorptionsspektrum von **58** (bei t_R = 37 min) und *ent*-**58** (bei t_R = 57 min).

Es konnte somit eine kurze, sechsstufige Synthese zum enantiomerenreinen Cyclopentenylamin **3** mit einer Gesamtausbeute von 17% entwickelt werden. **3** wurde schließlich als Baustein in einer reduktiven Aminierung in der Totalsynthese des Naturstoffes Queuosin (s. Kapitel 3.1.6) verwendet.

3.1.2. Alternativroute zur Synthese von Cyclopentenylamin **3**

Parallel zur Entwicklung der Synthese des Cyclopentenylamins **3** nach dem beschriebenen Weg und der Untersuchung des Allylazids **55** wurde im Rahmen der Dissertation der bereits beschriebene Syntheseweg von **3** von *Van Boom* et al. untersucht.¹²³ Die Synthese nach *Van Boom* et al. beinhaltet fast doppelt so viele Syntheseschritte wie die in der Arbeit entwickelte Synthese. Die Reproduktion dieser Synthese bot daher auf den ersten Blick keinen nennenswerten wissenschaftlichen Wissenszugewinn. Dennoch wurde diese Synthese durchgeführt, da sie die Synthese interessanter Zwischenbausteine für weitere Razemisierungsuntersuchungen ermöglichte, sowie die Untersuchung von Alternativsynthesestrategien versprach.

Während, wie oben beschrieben, **53** durch die *Mitsunobu*-Reaktion zu Allylazid **55** umgewandelt wurde, und die [3.3] sigmatrope Umlagerung auf der konvexen Seite des Moleküls untersucht wurde, wurde parallel das Isomer **60** nach *Van Boom* synthetisiert, in einer *Mitsunobu*-Reaktion das Allylazid **61** synthetisiert und die Razemisierungsgeschwindigkeit in der konkaven Tasche untersucht (s. Abbildung 3.7). Unterschiede in der Umlagerungsgeschwindigkeit wurden aufgrund der unterschiedlichen direkten räumlichen Umgebung des Allylazids erwartet.

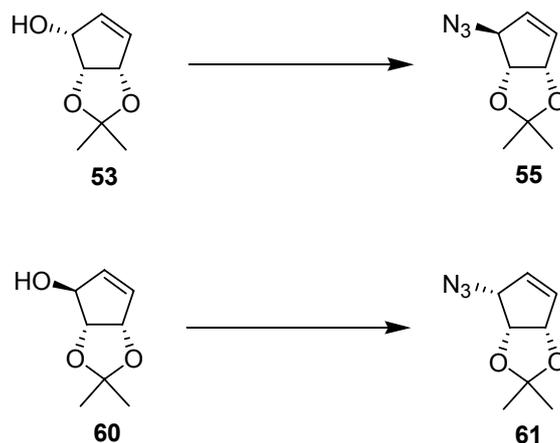
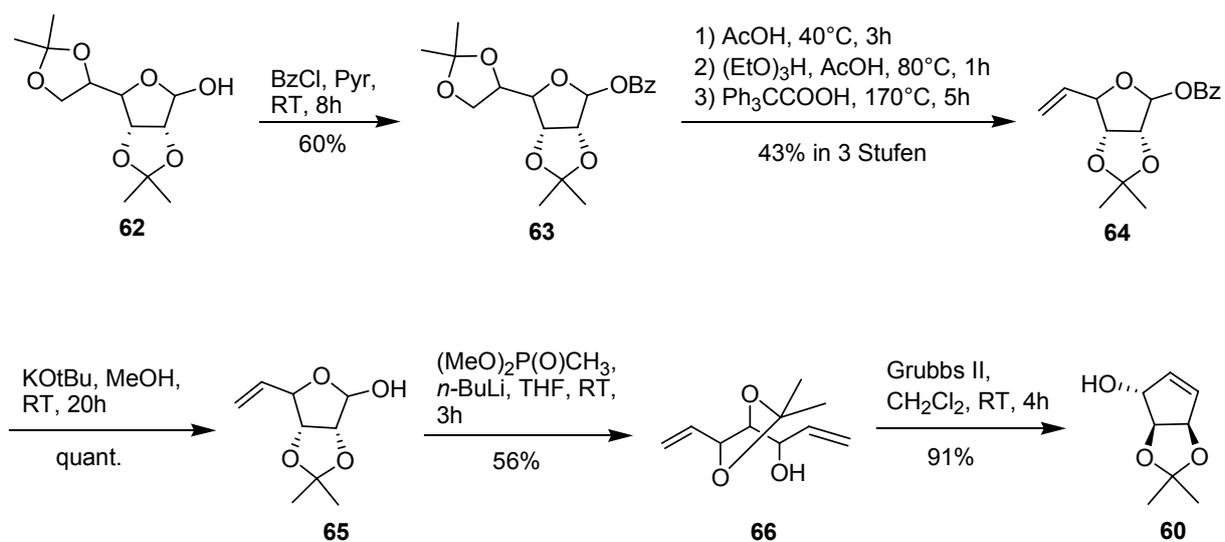


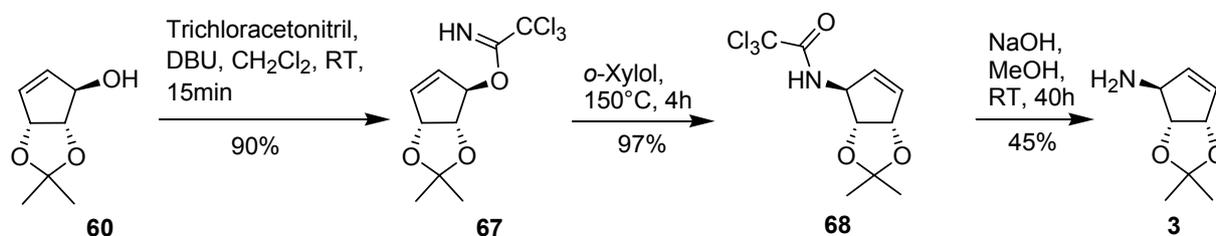
Abbildung 3.7: Synthese der Allylazide 55 und 61.

Für die Synthese von Cyclopentenylamin **3** wurde zunächst kommerziell erhältliche acetonidgeschützte Mannofuranose **62** mit Benzoylchlorid umgesetzt. Der geschützte Zucker **63** wurde am endständigen Diol mit Essigsäure selektiv zum freien Diol entschützt, anschließend zum Orthoester umgewandelt. Diese wurde mit Triphenyllessigsäure eliminiert, so dass man den Vinylzucker **64** erhielt (s. Schema 3.6). **64** wurde nun unter alkalischen Bedingungen entschützt und die offenkettige Form des Zuckers **65** in einer *Wittig*-Reaktion zum Dien **66** verlängert. Eine Ringschlussmetathese mit dem *Grubbs*-Katalysator zweiter Generation ergab den acetonidgeschützten Allylkohol **60** in sehr guten Ausbeuten.



Schema 3.6: Synthese nach Van Boom.

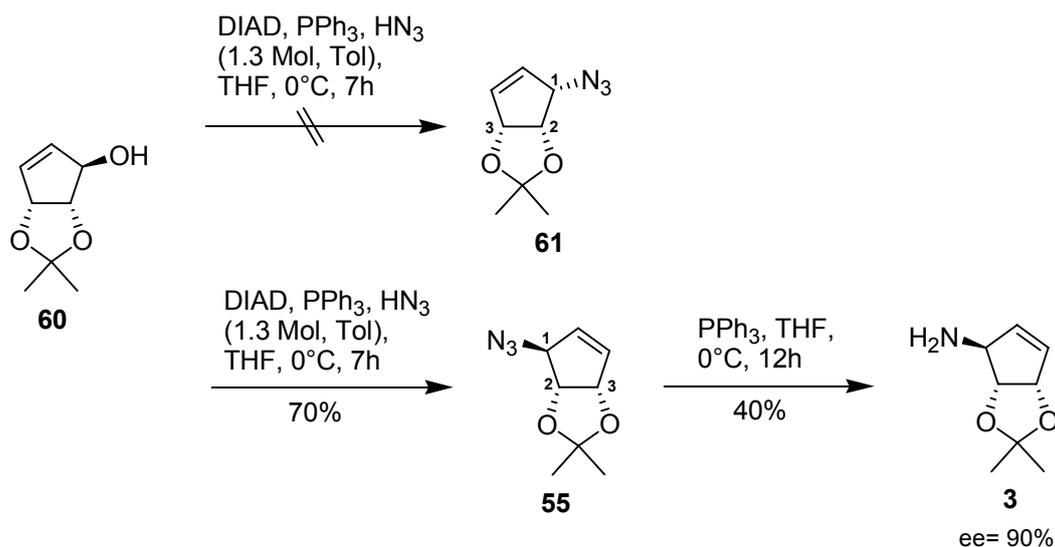
Für die Einführung der Aminofunktion wurde **60** mit Trichloracetonitril umgesetzt und das Trichloracetimidat **67** zum thermodynamisch stabileren Amid **68** umgelagert. **68** wurde anschließend alkalisch zum Cyclopentenylamin **3** entschützt. Man erhielt **3** in 10 Stufen und einer Gesamtausbeute von 6%.



Schema 3.7: Synthese von Cyclopentenylamin **3** nach *Van Boom et al.*

3.1.3. Untersuchung der Allylazid-Umlagerung am *Cis-Trans*-Alkohol **60**

Für die Untersuchung der Allylazid Umlagerung am Cyclopentenringssystem wurde der acetonidgeschützte Allylalkohol **60** verwendet und daraus Allylazid **61** synthetisiert. Nach den bereits ausgearbeiteten *Mitsunobu*-Reaktionsbedingungen konnte, wie erhofft, nur ein Reaktionsprodukt isoliert werden, dessen Masse dem gewünschten Allylazid Produkt **61** entsprach (s. Schema 3.8). Die ¹H-NMR Verschiebungen von dem erwarteten Produkt **61** zeigten jedoch nicht das erwartete Aufspaltungsmuster. Es wurde angenommen, dass das NMR sowohl eine starke und vergleichbare ³J-Kopplung zwischen den Protonen des Diols C(2) und C(3) und zwischen den Protonen an C(1) und C(2) zeigen sollte.



Schema 3.8: Untersuchung der Mitsunobu-Reaktion mit Stickstoffwasserstoffsäure an **60**.

Das Proton an C(2) sollte zum Triplett aufspalten. Beobachtet wurde jedoch ein NMR identisch zu dem bereits synthetisierten Cyclopentenylazid **55**. Die Protonen an C(1) und C(2) koppelten nicht miteinander, ein Dublett zwischen C(2) und C(3) war die einzig beobachtbare Kopplung. Die fast genauso ungewöhnlich Tatsache, dass das Spektrum vom erwähnten Allylazid-Produkt **61** mit dem NMR-Spektrum des über den neuen Syntheseweg hergestellten Allylazids **55** identisch war, führte zu dem Schluss, dass nicht **61**, sondern **55** während der untersuchten Reaktion gebildet wurde. Die unwahrscheinliche Möglichkeit, dass die Diastereomere **61** und **55** identische NMR Spektren aufweisen, wurde in Betracht gezogen, und es wurden daher verschiedene an C(1) substituierte Verbindungen, wie Benzylamin-, Toluoyl-Derivate mit *cis-cis* Konfiguration synthetisiert. Diese wiesen die am C(2) Proton die erwartete Triplettaufspaltung im NMR auf. Die Protonen an C(1) und C(2) der jeweiligen *cis-trans*-Derivate koppelten jedoch nicht miteinander. Damit konnte wiederlegt werden, dass **55** und **61** identische NMR Spektren besitzen.

Die Untersuchung des Drehwertes von **3**, das nach dem Weg von *Van Boom* mit anschließender *Mitsunobu-S_N2'*-Reaktion synthetisiert wurde, ergab nur einen *ee*-Wert von 90%. Dieser ist geringer als der des in Kapitel 3.1.1 hergestellten Cyclopentenylamins **3**. Diese Daten belegen, dass die in Kapitel 3.1.1 beobachtete

S_N2 -Reaktion aufgrund der großen sterischen Abschirmung in **60** nicht stattfindet. Möglich ist hierbei nur noch die S_N2' -Reaktion, die wiederum selektiv das zu **3** identische *syn*-Produkt ergab. Außerdem konnte erneut gezeigt werden, dass die Razemisierung von **55** über eine Allylazid-Umlagerung unterbunden werden konnte.

Aus diesen Untersuchungen kann somit geschlossen werden, dass die Azid *Mitsunobu*-Reaktion bei tiefen Temperaturen vorrangig dem S_N2 -Mechanismus folgt. Ist dieser Mechanismus aufgrund sterischer Einflüsse nicht möglich, findet eine S_N2' -Reaktion statt. Diese läuft vorrangig nach einem *syn*- S_N2' -Mechanismus ab.

3.1.4. Synthese des galaktosylderivatisierten Cyclopentenylamins **70**

Die hergestellte Verbindung **60** ist eine ideale Ausgangssubstanz für weitere Experimente zur Synthese von Queuosinderivaten mit Zuckern. Es wurden Voruntersuchungen zur Synthese von Galaktosylqueuosin (GalQ) durchgeführt und das Galaktosylcyclopentenylamin **70** synthetisiert, ein zentraler Baustein auf dem Weg zur erstmaligen Synthese von GalQ.

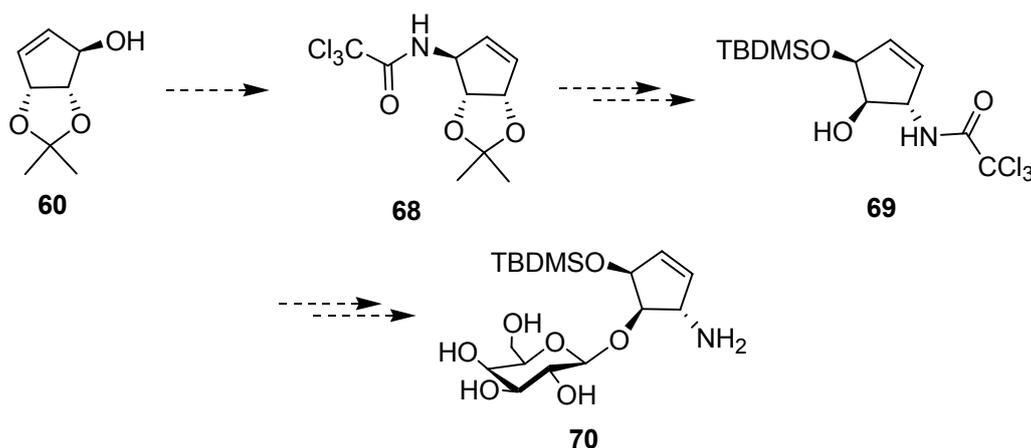
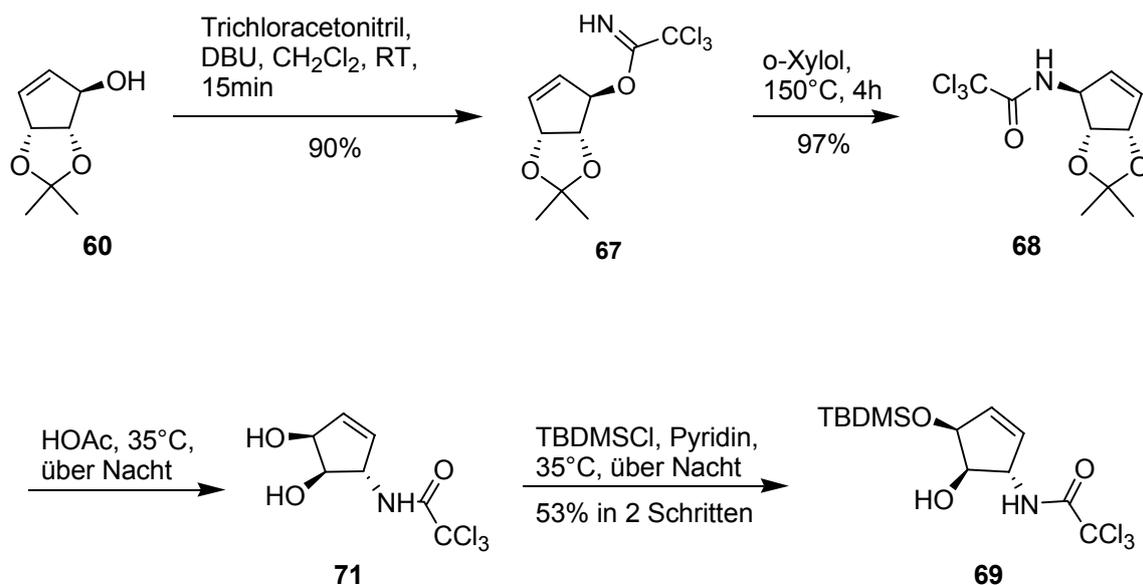


Abbildung 3.8: Synthese von Galaktosylcyclopentenylamin **70**.

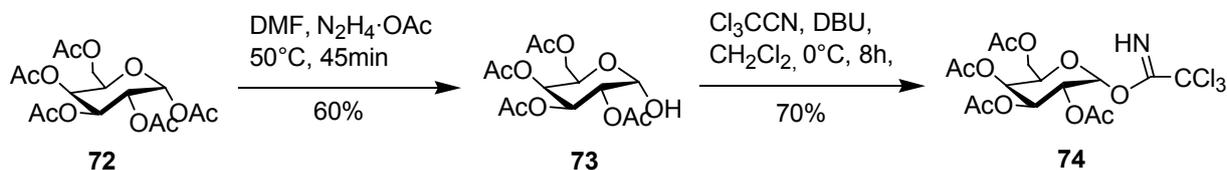
Bei Vorarbeiten für die Synthese eines Zucker-modifizierten Cyclopentenylamins **70** wurde zunächst die Aminogruppe in Form der Trichloracetimidatgruppe eingeführt und thermisch zu **68** umgelagert (s. Schema 3.9). Die Entschützung der

Acetonidschutzgruppe an **68** über Nacht mit Essigsäure führte zum Diol **71**. Da der Alkohol in allylischer Position ein stärkeres Nukleophil als die nichtallylische Hydroxygruppe ist, aber der Zucker des Galaktosylqueuosins in β -Allyl-Position an den Fünfring gebunden ist, wurde zunächst mit einem Äquivalent *tert*-Butyldimethylsilylchlorid die reaktivere Hydroxygruppe geschützt.

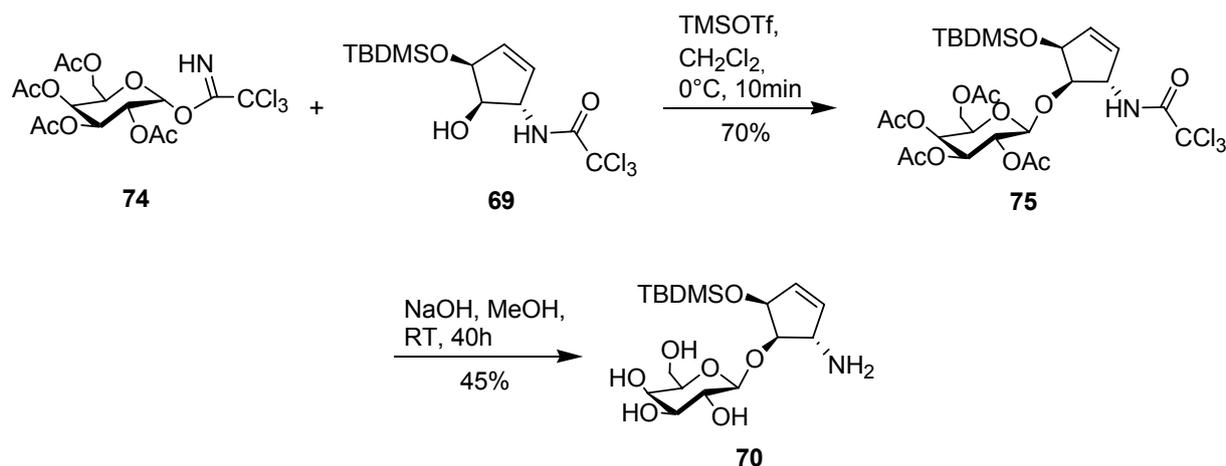


Schema 3.9: Synthese von Trichloracetamin **69**.

Für die Glykosidierung wurde pentaacetylgeschützte Galaktose nach Standardbedingungen an der 1'-Position selektiv entschützt und mit Trichloracetonitril und DBU in das aktivierte Trichloracetimidat **74** überführt.^{133, 134}



Schema 3.10: Synthese des Trichloracetimidatzuckers **74**.



Schema 3.11: Kupplung zwischen Cyclopentenylamin **69** und aktivierter Galaktose **74**.

Der Cyclopentenylbaustein **69** wurde nun mit dem aktivierten Galaktosylzucker **74** katalysiert durch Trimethylsilyltriflat in Dichlormethan gekuppelt. Durch Ausnutzung des Nachbargruppeneffekts der benachbarten Acetylgruppe – der Sauerstoff des Acetylgruppe stabilisiert den Übergangszustand und ermöglicht nur einen *trans*-Angriff des Nucleophils von der Oberseite des Moleküls – konnte selektiv das β -Kupplungsprodukt **75** in guter Ausbeute erhalten werden.

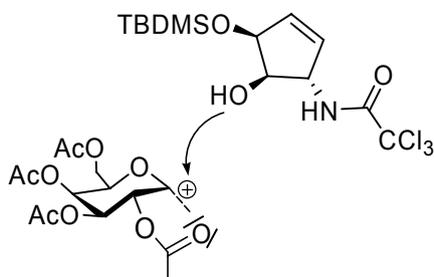
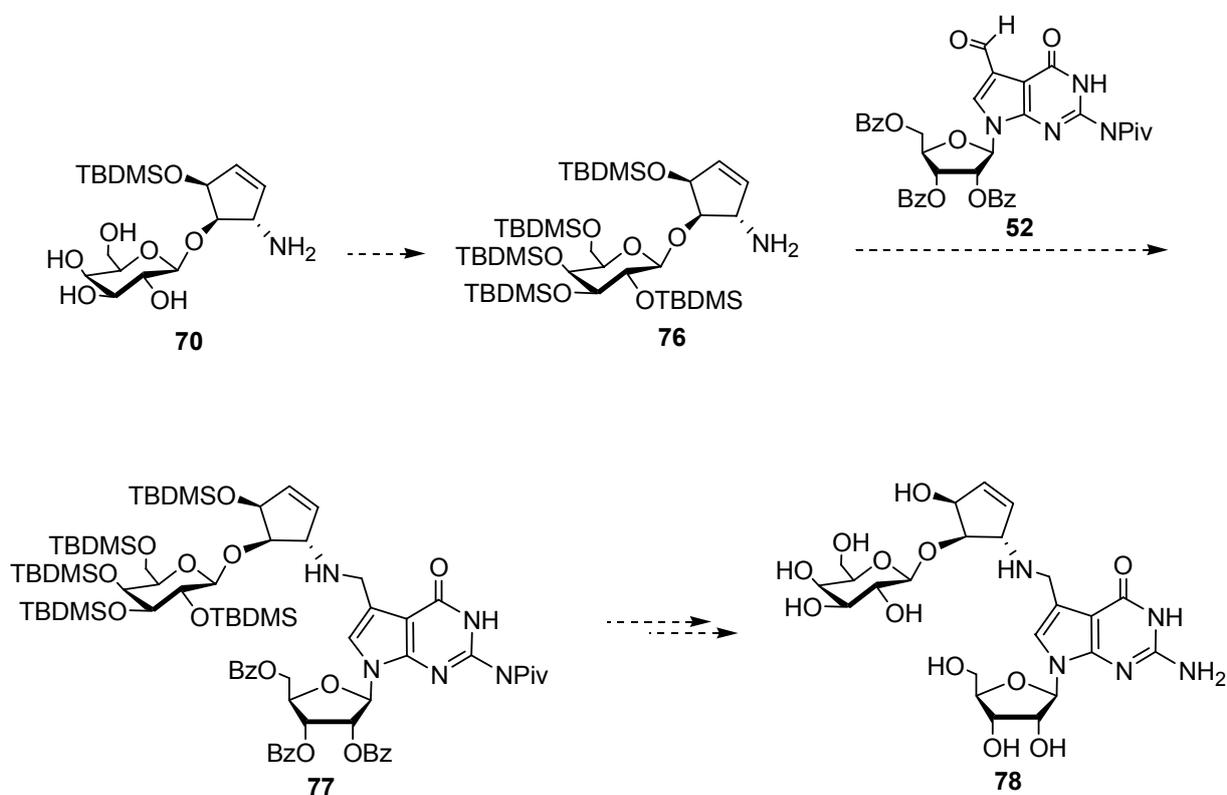


Abbildung 3.9: Mechanismus der Glykosidierungsreaktion von **69** und **74**.

Da die Acetylschutzgruppe sehr viel basenlabiler sind als die Trichloracetamidgruppe ist es nicht möglich, das freie Amin selektiv in einem Schritt zu erhalten. Die Entschützung zum freien Amin und Zucker unter alkalischen Bedingungen führte schließlich zu **70**, das nun mit dem 7-Formyl-desazaguanosin **52** in einer reduktiven Aminierung eingesetzt werden sollte. Problematisch hierbei war die Aufreinigung des Produktes **70**. Aufgrund seiner hohen Polarität und damit schlechten Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln war eine säulenchromatographische Aufreinigung mit Standardlaufmitteln nicht möglich und

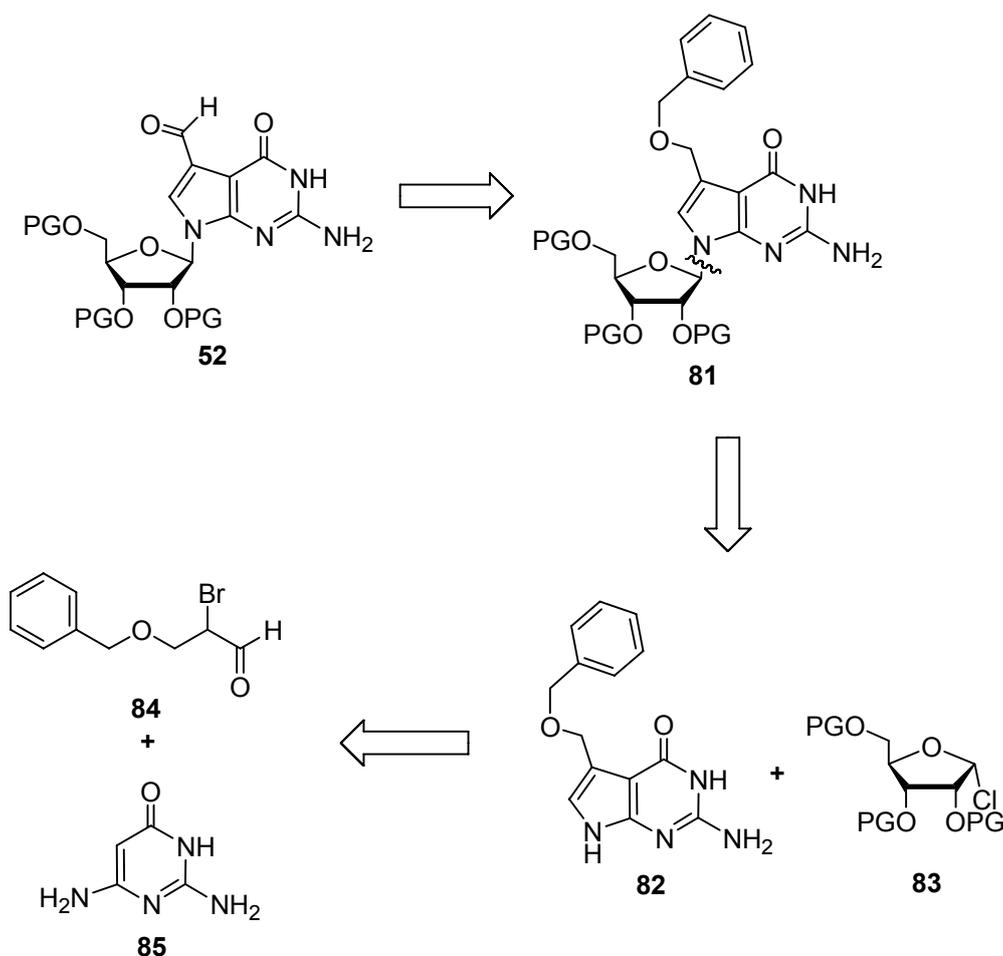
es musste ein Wasser/Acetonitril-Laufmittelgemisch für die Flashchromatographie verwendet werden. Dies führte zur Isolierung von **70**; allerdings konnten im Produkt Spuren von Kieselgel nachgewiesen werden, das sich zu kleinen Teilen im Laufmittelgemisch gelöst hatte. Um auch die Spuren von Kieselgel zu entfernen, wäre eine Aufreinigung unter Verwendung von präparativer HPLC denkbar. Das Löslichkeitsproblem kann ebenso umgangen werden, indem die vier freien OH-Gruppen der Galaktoseeinheit nach der Entschützung zum Beispiel silylgeschützt werden, was die Löslichkeit des Moleküls in organischen Lösungsmitteln erheblich erhöht und eine säulenchromatographische Reinigung möglich machen sollte. Der Einsatz der unpolaren Schutzgruppen, wie in Schema 3.12 abgebildet, würde zusätzlich die Möglichkeit bieten, die optimierten Reaktionsbedingungen der reduktiven Aminierung in Benzol zu verwenden, da das ungeschützte galaktosylierte Cyclopentenylamin **70** sich in Benzol nicht löst. Das silylgeschützte Intermediat **76** würde nun mit **52** reaktiv aminiert werden und in zwei Schritten das zuckermodifizierte Queuosin **78** liefern.



Schema 3.12: geplantes Syntheschema für die Synthese von Galaktosylqueuosin **78**.

3.1.5. Synthese von N₁-Queuosin

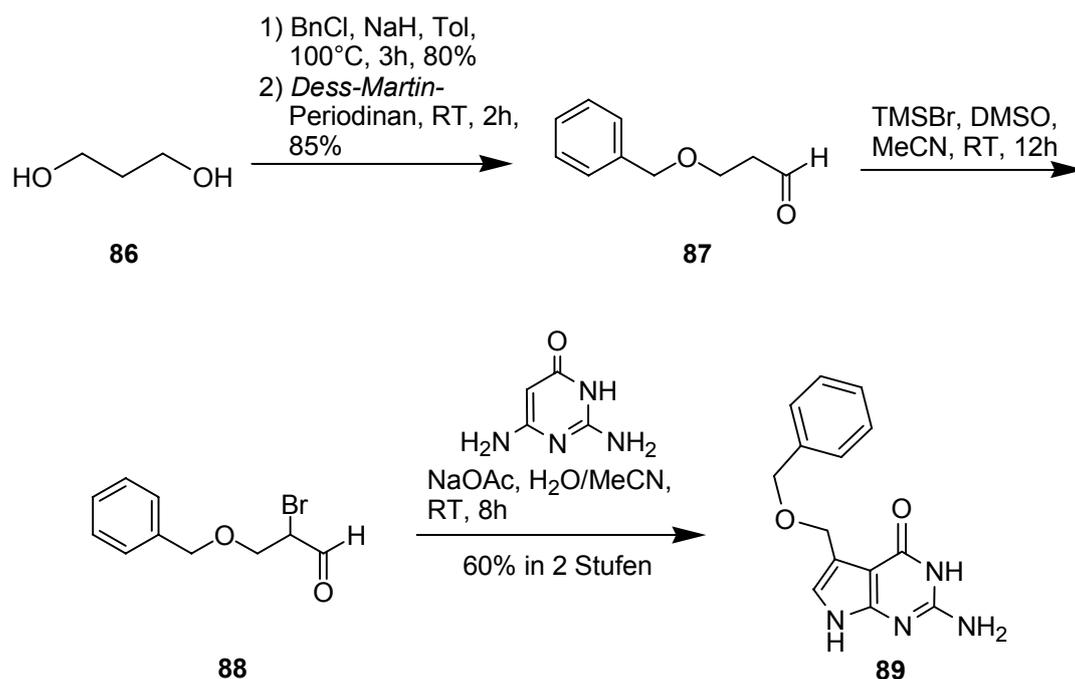
Mit der Synthese des Cyclopentenylaminbausteins **3** konnte die Darstellung von Queuosin fortgesetzt werden. Als Kupplungspartner von **3** wurde das 7-Formyl-desazaguanosin **52** benötigt. Retrosynthetisch kann **52** dabei aus 7-Benzylguanosen **81** durch Entschützung und Oxidation erhalten werden (s. Schema 3.13). **81** würde man aus einer Glykosidierungsreaktion zwischen dem Chlorzucker **83** und der 7-Benzylloxymethylguaninbase **82** erhalten. **82** ist wiederum ein Kondensationsprodukt des α -Bromaldehyds **84** und Hydroxypyrimidins **85**.



Schema 3.13: Retrosynthetische Analyse von Queuosin.

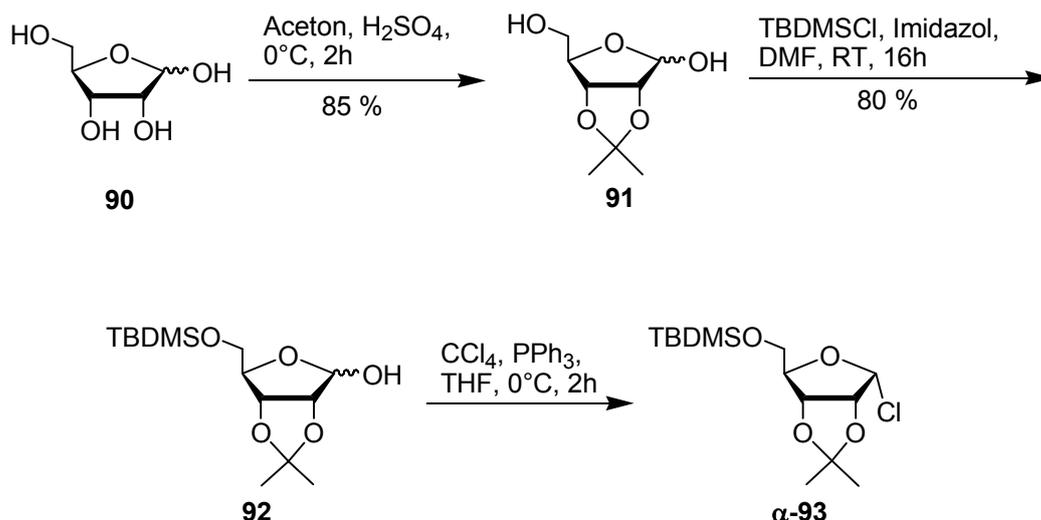
Schlüsselschritt dieser Synthesesequenz ist hierbei die Glykosidierungsreaktion zwischen dem chloraktivierten Zucker **83** und der 7-Desazaguaninbase **82**.

Zur Synthese von Queuosin wurde von Propandiol **86** ausgegangen, das an einer der beiden Alkoholgruppen benzylgeschützt und anschließend mit *Dess-Martin*-Periodinan in guter Ausbeute zum Aldehyd **87** oxidiert wurde. Bromierung in α -Position zum Aldehyd mit Trimethylsilylbromid und *in situ* Kondensation mit 2,4-Diamino-6-hydroxypyrimidin ergab die 7-Benzyloxymethyl-desazaguanin-Base **89**.



Schema 3.14: Synthese der 7-Benzyloxydesazaguanin-Base **89**.

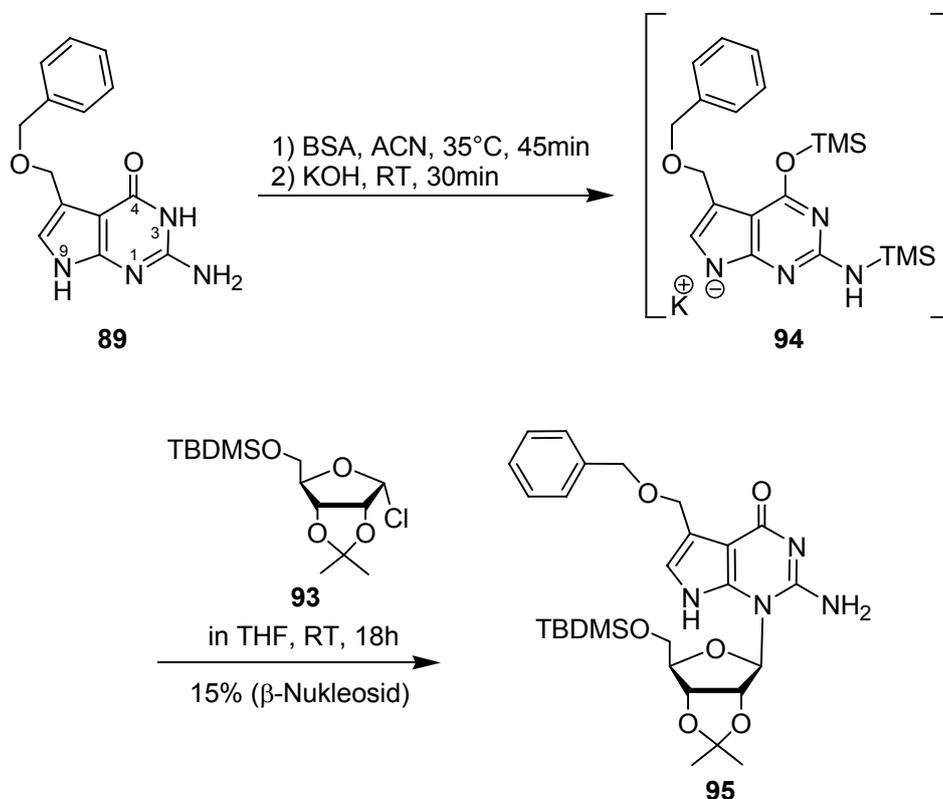
Für die anschließende Glykosidierungsreaktion wurde zunächst der aktivierte Chlorzucker **93** synthetisiert (s. Schema 3.15). D-(-)Ribose **90** wurde nach Standardbedingungen acetonid- und TBDMS-geschützt. **92** wurde nun selektiv nach modifizierten *Appel*-Bedingungen zum α -Chlorzucker umgewandelt. Aufgrund der leichten Anomerisierung zum thermisch stabileren β -Chlorzucker – es ist möglich den α -Chlorzucker durch Erhitzen bei 60°C in Dichlormethan über 24 h in den β -Chlorzucker zu überführen – wurde der synthetisierte Zucker **93** direkt in die nachfolgende Kupplungsreaktion eingesetzt.



Schema 3.15: Synthese des chloraktivierten Zuckers 93.

Desazaguaninbasen sind sehr schlechte Nukleophile und müssen zur Erhöhung ihrer Nukleophilie vor der Reaktion an der N(9)-Position deprotoniert werden. Da das N(3)-Proton sehr viel azider ist als das N(9)-Proton, musste zunächst die N(3)-Position geschützt werden. Dies ist entweder über die direkte Schützung des Stickstoffs möglich oder durch Substitution der Hydroxygruppe über das Keto-Enol-Tautomer. Standardmethoden zur Substitution des sehr unreaktiven Ketons, wie die Chlorierung der 4-Position, die Reaktion zum Methoxymethylether oder Benzylether, führten in allen Fällen zur Zersetzung des sehr labilen Edukts. Ein Ausweg bildete die *in situ* Silylierung von **89** unter Verwendung von Bis(trimethylsilyl)-acetamid (BSA) als Silylierungsreagenz (s. Schema 3.16). Da eine DC-Kontrolle dieser Reaktion aufgrund der Hydrolyseempfindlichkeit der Silylether nicht möglich war, wurden NMR-Studien dieser Reaktion durchgeführt, indem nach Zugabe von BSA zum Reaktionsgemisch halbstündlich eine Analyseprobe isoliert und mittels NMR analysiert wurden. Diese zeigten, dass ein erstes Äquivalent von BSA mit dem exozyklischen 2'-Amin reagierte und anschließend mit weiterer Zugabe von BSA der gewünschte N(3)/O(4)-Silylether entstand. Allerdings wurde zu einem nicht unerheblichen Teil auch die N(9)-Position silyliert. Eine Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 55°C und eine Verlängerung der Reaktionsdauer mit BSA führten jedoch dazu, dass eine intramolekulare Umlagerung der

Trimethylsilylgruppen stattfand und das zweite Äquivalent BSA letztendlich die N(3)-Position silylierte.



Schema 3.16: Reaktionsschritte der Glykosidierungsreaktion

Diese Reaktionsbedingungen wurden nun für die Glykosidierungsreaktion verwendet. Die sehr schlechte Löslichkeit von **89** wurde durch den Einsatz von BSA ebenso verbessert: Nach Zugabe von BSA zur Suspension von **89** in Acetonitril erhielt man nach wenigen Minuten eine klare rote Lösung. Wurde im nun nachfolgenden Schritt durch Zugabe von wasserfreiem Kaliumhydroxid N(9) deprotoniert, bildete sich sofort eine hellgelbe Suspension.

Zu dieser Suspension wurde nun der parallel hergestellte Chlorzucker **93**, gelöst in THF, getropft und die Reaktionslösung bei Raumtemperatur 18 h gerührt. Nach der Aufarbeitung erhielt man ein Nukleosid in einer Ausbeute von 15%.

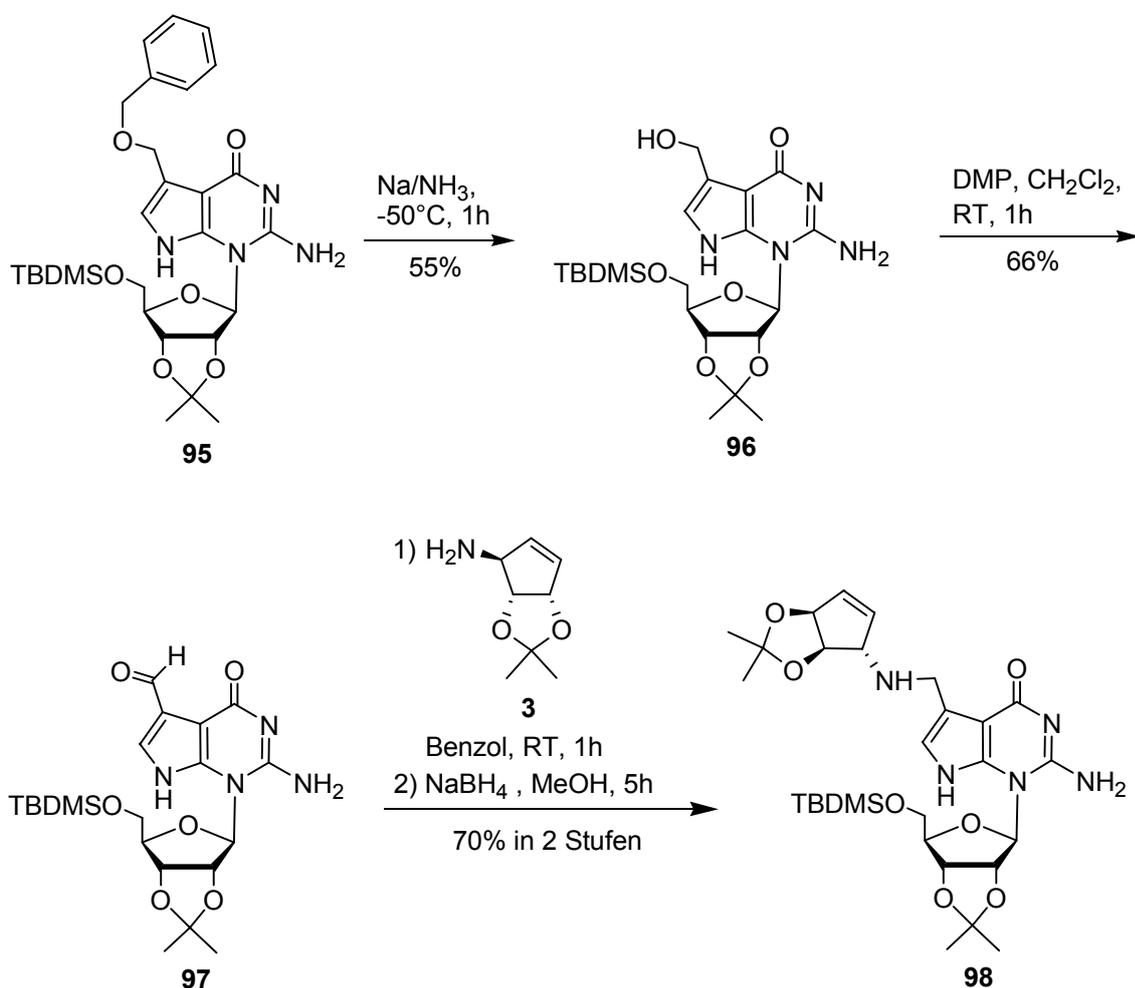
Zur Überprüfung, ob in dieser Reaktion wie geplant ein β-N(9)-konfiguriertes Nukleosid entstanden war, ergaben NOESY-NMR- und COSY-NMR-Messungen.

Neben den zuordenbaren Raum- und Bindungskopplungen des Zuckers und der Nukleobase eines N(9)-Nukleosids wurde eine einzelne zusätzliche Raumkopplung zwischen dem C(8) und einem der beiden Stickstoffatome des Heterozyklus gefunden. Diese Kopplung durfte in einem N(9)-verbrückten Nukleosid nicht auftreten, da das C(8)-Proton von keinem N-H Proton in unmittelbarer Nähe umgeben ist. Dieses Ergebnis gab Anlass zur Annahme, dass ein N(1)-Nukleosid gebildet wurde. Weitere NMR-Studien ergaben, dass diese Raumkopplung in der Tat zwischen dem C(8)-Proton und dem N(9)-Proton vorlag. Im Zusammenhang mit zwei Publikationen, in denen eine Synthese von N(1)-Adeninderivaten beschrieben wurde^{135, 136}, ist dieses Ergebnis eine weitere Beobachtung eines N(1)-Desazaguanosinnukleosids **95**.

Da ausreichend Material vorhanden war, sollte die Synthese dennoch fortgesetzt werden, um zum einen den Schlüsselschritt der reduktiven Aminierung an dieser Modellverbindung zu testen, zum anderen sollte die Frage geklärt werden, wie sich die beiden Queuosinismere chemisch voneinander unterscheiden.

Das benzylgeschützte 7-Hydroxymethylnukleosid **95**, aber auch die Desazaguaninbase **89** waren, wie erwähnt, sehr temperatur- und säureempfindlich. Reaktionstemperaturen von über 60°C oder saure Reaktionsbedingungen führten zu einer Zersetzung des Produktes zu einem dunkelvioletten Feststoff innerhalb von Minuten. D.h. die weiteren Reaktionen der Synthese mussten also bei niedrigen Temperaturen und säurefrei ablaufen. Die Debenzylierung von **95** führte zunächst unter Verwendung verschiedener Hydrierungskatalysatoren zu keiner Entschützung des Eduktes. Der Einsatz von Lewissäuren, wie Zinntetrachlorid, bestätigte die hohe Labilität des Moleküls und führte nur zu dessen Zersetzung. Letztendlich ergab erst die Verwendung von Natrium in flüssigem Ammoniak den gewünschten freien Alkohol **96**. Die Oxidation des Alkohols **96** zum Aldehyd **97** nach *Swern*-Bedingungen oder mit MnO₂ führte erneut zur Zersetzung des Produktes. Hier

konnte das Problem durch Verwendung von *Dess-Martin* Periodinan gelöst werden. Auf diesen Weg wurde **97** in sehr guter Ausbeute erhalten (s. Schema 3.17).

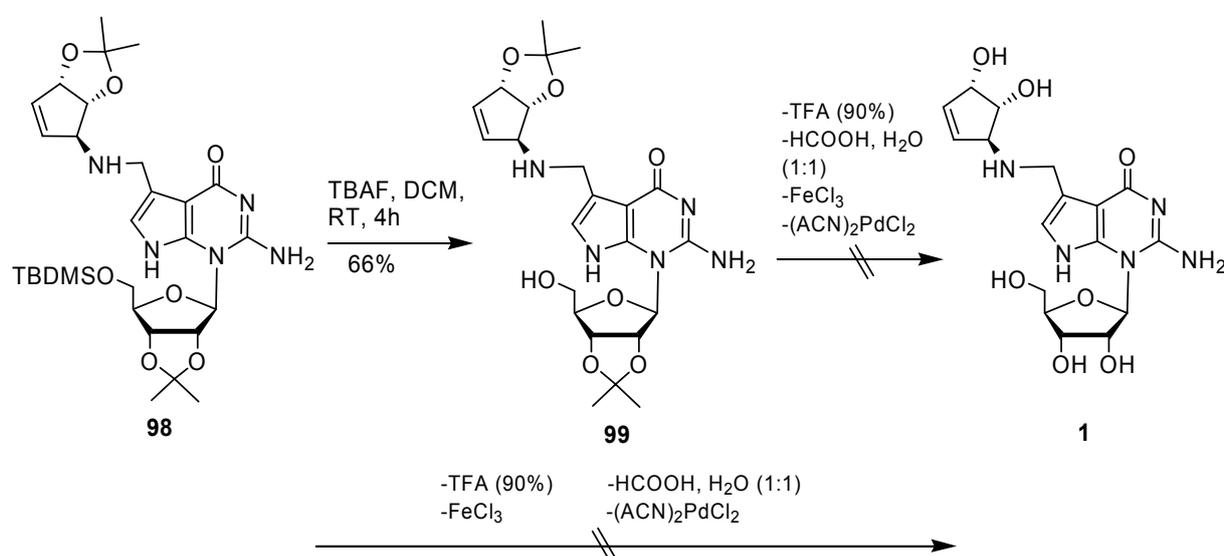


Schema 3.17: Synthese des N(1)-Queuosinvorläufers **98**.

Die Aminierungsreaktion von **97** mit **3** und die anschließende Reduktion mit Natriumborhydrid liefen dagegen problemlos ab und lieferten **98** mit 70%iger Ausbeute.

Für die weitere Charakterisierung des Derivats sollte **98** vollständig zum Queuosin-isomer entschützt werden. Die Silylentschützung von **98** lief ohne Probleme ab. Dagegen führten saure Bedingungen – es wurde Trifluoressigsäure und wässrige, 50%ige Ameisensäure getestet, aber auch die Verwendung von sehr milden Entschützungsbedingungen, wie der Einsatz von FeCl_3 oder $(\text{Acetonitril})_2\text{PdCl}_2$ –

sowohl zur Zersetzung von **98** als auch von **99** (s. Schema 3.18). Dieselbe Beobachtung wurde auch von den Autoren gemacht, die die N(1)-Adenosinnukleoside synthetisiert hatten. Die verwendeten N(1)-Nukleoside zerfielen unter Reaktion mit Trifluoressigsäure oder unter schwach sauren Bedingungen.^{135, 136} Im Gegensatz dazu publizierten die Forschergruppe *Goto et al.* für das Queuosinnukleosid sehr viel drastischere Entschützungsbedingungen, in denen das Nukleosid 8 h bei 80°C in 2 molarer Salzsäurelösung gerührt wurde.⁹⁸ Dieser große Stabilitätsunterschied war ein weiterer Beweis für das Vorliegen des N(1)-Queuosinderivats.¹³⁷



Schema 3.18: Entschützungsversuche von **98** und **99**.

Mit dieser kurzen Synthesesequenz konnte somit eine Synthese zum geschützten N(1)-Nukleosidderivat von Queuosin gezeigt werden. Basierend auf dieser Synthese des N(1)-Queuosinderivats konnten die Reaktionsbedingungen der reduktiven Aminierung zwischen einem 7-Formylguanosinderivat und dem Cyclopentylamin ausgearbeitet werden, die im nachfolgenden Teil der Dissertation erfolgreich verwendet wurden.

Leider war es nicht möglich, die Acetonidschutzgruppen selbst unter Anwendung sehr milder Reaktionsbedingungen abzuspalten und dadurch das freie N(1)-verbrückte Isomer des Queuosins zu erhalten.

3.1.6. Synthese von Queuosin

Für die Synthese von Queuosin musste aufgrund der falschen Regiochemie der Nukleosidierung somit ein neuer Weg gefunden werden. Hauptproblem war nun nicht mehr die Frage der Durchführbarkeit der reduktiven Aminierung zwischen dem Cyclopentenyamin **3** und dem 7-Formyldesazaguanosin **52**, sondern die Synthese des N(9)-Desazaguanosin-Nukleosids selbst. Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente, die wenigen bekannten Publikationen zur Glykosidierung von erfolgreich synthetisierten Queuinbasen, aber auch generelle Syntheseprobleme von Desazanukleosiden zeigten, dass nur eine geringe Anzahl an Substituenten an der 7-Position der Desazaguaninbase eine Glykosidierungsreaktion erlauben. Die einzigen bekannten funktionellen Gruppen an der (7)-Position von Desazaguanin, die von der Glykosidierungsreaktion, entweder nach *Königs-Knorr* oder nach *Vorbrüggen*-Bedingungen, toleriert werden, sind R= H, CN^{122, 138, 139} und die im Jahr 2006 von *Seela* et al. publizierten 7'-Substituenten R= Cl, Br und I.¹⁴⁰

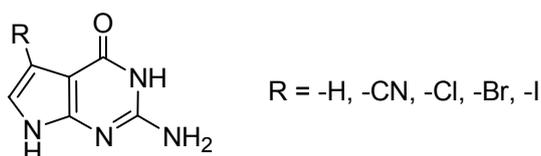
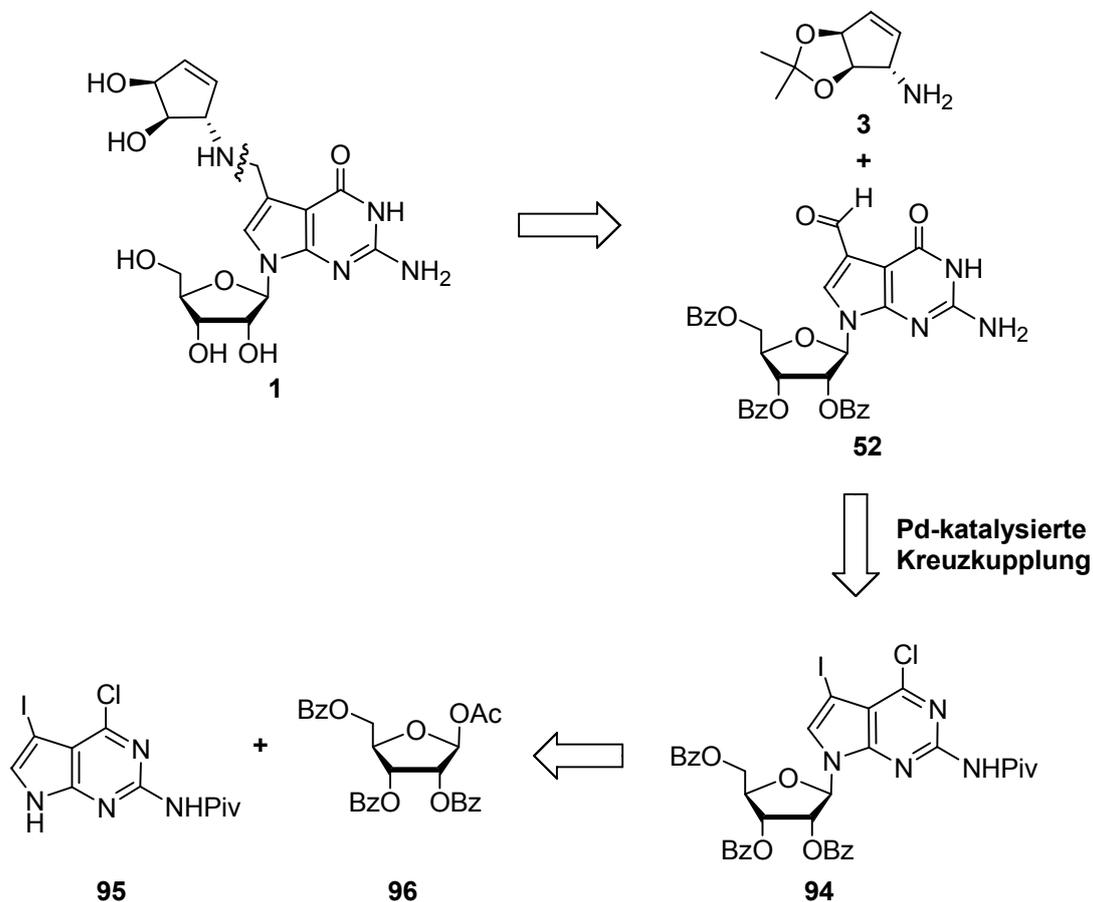


Abbildung 3.10: Tolerierte funktionelle Gruppen der *Vorbrüggen*- und *Königs-Knorr*-Glykosidierungsreaktion.

Arbeiten der Dissertation zeigten, dass *O*- oder *N*-funktionalisierte Substituenten wie Benzylmethylether (s. oben) oder Aminomethyl-derivate die Nukleophilie der N(9)-Position und damit die Tendenz, eine Glykosidierungsreaktion einzugehen, erheblich herabsetzen.

Ein neuer Syntheseweg, der nun getestet werden sollte, war die Möglichkeit mit einem 7-Ioddesazaguanosin eine Kreuzkupplung durchzuführen (s. Schema 3.19). Arbeiten zur Formylierung an Aromaten sind zahlreich bekannt, dennoch blieb die

Frage offen, ob die geplante Kreuzkupplung auch an dem relativ deaktivierten Pyrrolsystem durchführbar ist, da im Gegensatz zur *Sonogashira*-Kreuzkupplung auf dem Gebiet der palladiumkatalysierten Formylierung von Nucleosiden wenig bekannt war.

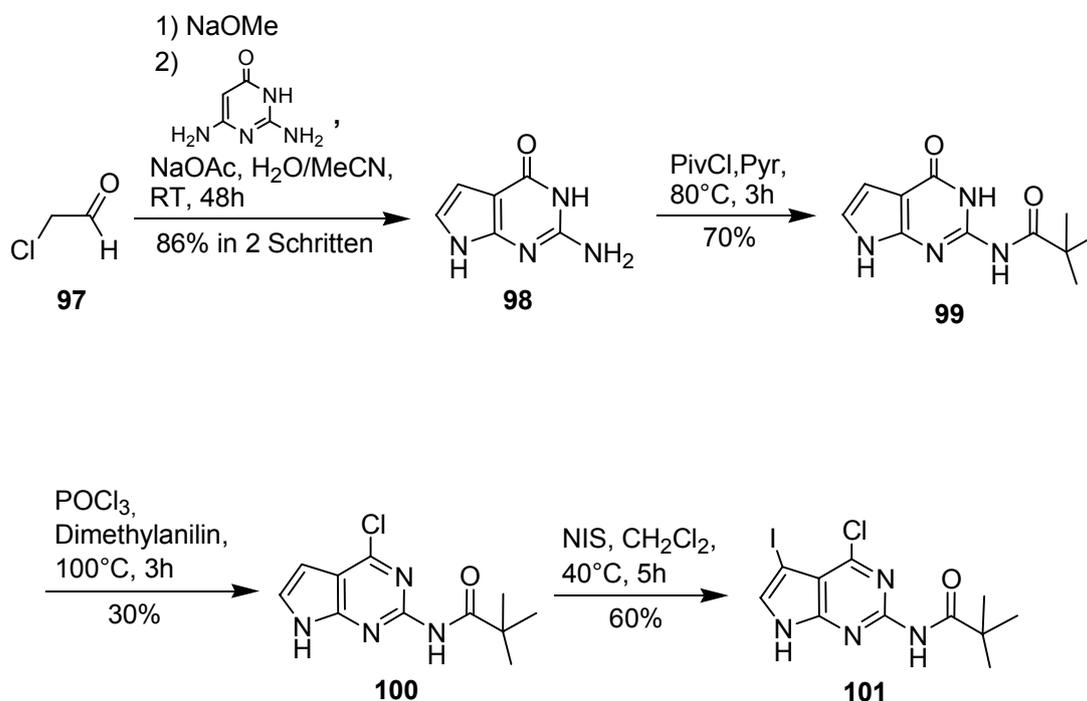


Schema 3.19: Retrosynthese von Queuosin.

Ziel war die Synthese von 7-Formyl-desazaguanosin **52** ausgehend von dem geschützten Iodnucleosid **94**. Dieses kann man über die *Vorbrüggen*-Glykosidierung von Ioddesazaguanin **95** mit Tribenzoylribofuranose **96** erhalten.

Der Ioddesazaguaninbaustein **101** (s. Schema 3.20) wurde synthetisiert, indem Chloracetaldehyd **97** mit 2,4-Diamino-6-hydroxypyrimidin zur Desazaguaninbase **98** in sehr guten Ausbeuten kondensiert wurde. Die Pivaloylschätzung der exozyklischen Aminogruppe, die anschließende Chlorierung mit Phosphorylchlorid

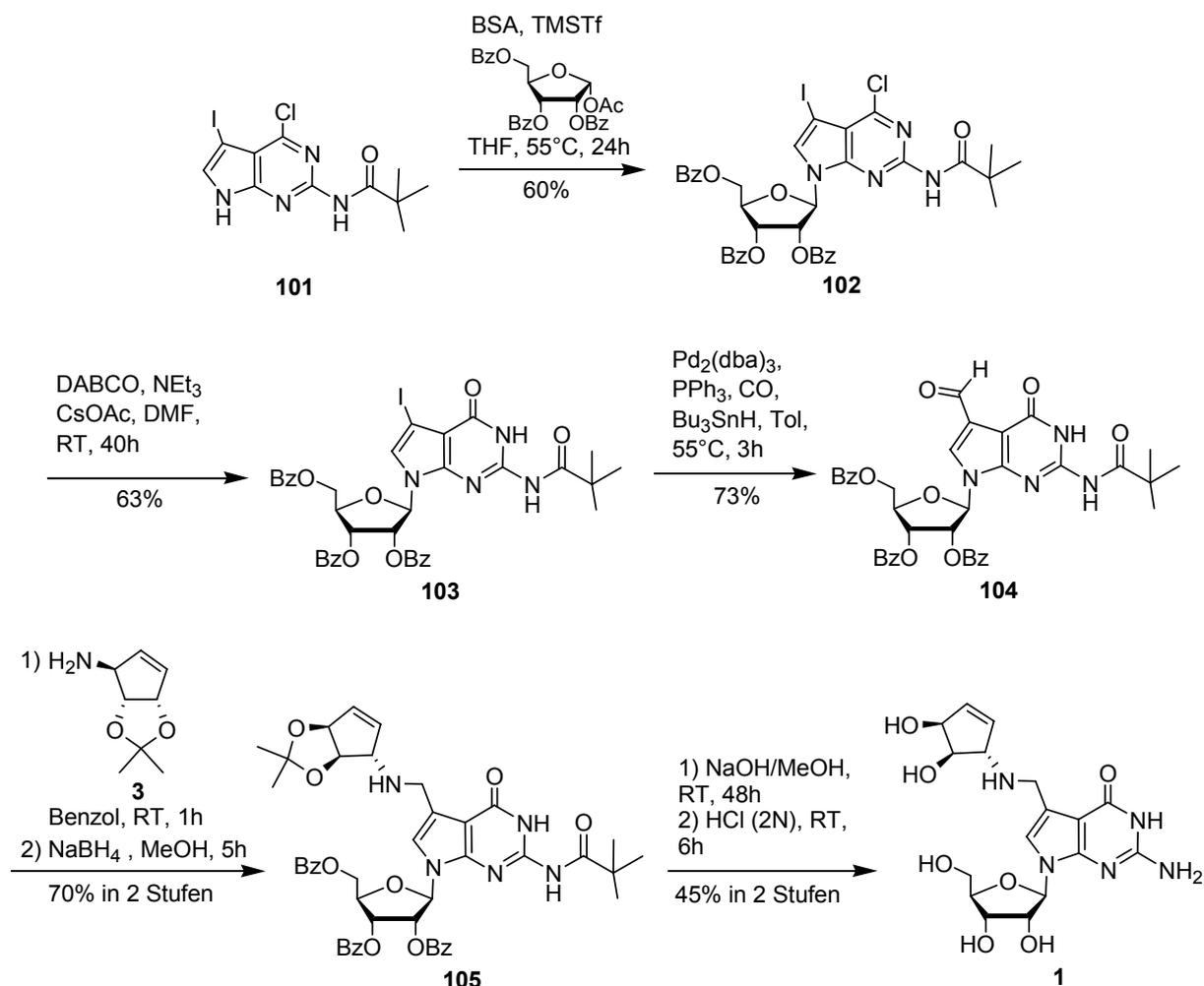
und Iodierung mit *N*-Iodsuccinimid lieferte das geschützte Ioddesazaguaninderivat **101**.



Schema 3.20: Synthese von 7-Iod-desazaguaninderivat **101**.¹⁵³

Die Base **101** wurde nun nach *Vorbriuggen*-Bedingungen mit einem tribenzoylgeschützten D(-)-Ribose-Derivat zum Nukleosid **102** umgesetzt und das Nukleosid mit 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]oktan (DABCO) und Triethylamin dechloriert (s. Schema 3.21). Die Aldehydgruppe wurde über eine Palladium-katalysierte Kohlenmonoxidinsertion mit anschließendem „quenschen“ des metallorganischen Intermediats mit Tributylzinnhydrid eingeführt.

Eine reduktive Aminierung von **104** mit Cyclopentylamin **3** und Natriumborhydrid als Hydridspender ergab **105** in sehr guter Ausbeute. Die Entschützung der Pivaloyl- und Benzoylschutzgruppen mit Natriumhydroxid in Methanol, gefolgt von der Behandlung von **105** mit 2 molarer Salzsäure zur Abspaltung der Acetonidschutzgruppe, lieferte Queuosin **1** in einer nicht optimierten Ausbeute von 45% in zwei Stufen. Das hypermodifizierte Nukleosid Queuosin konnte in 15 Stufen und einer Gesamtausbeute von 7% hergestellt werden.¹⁴¹

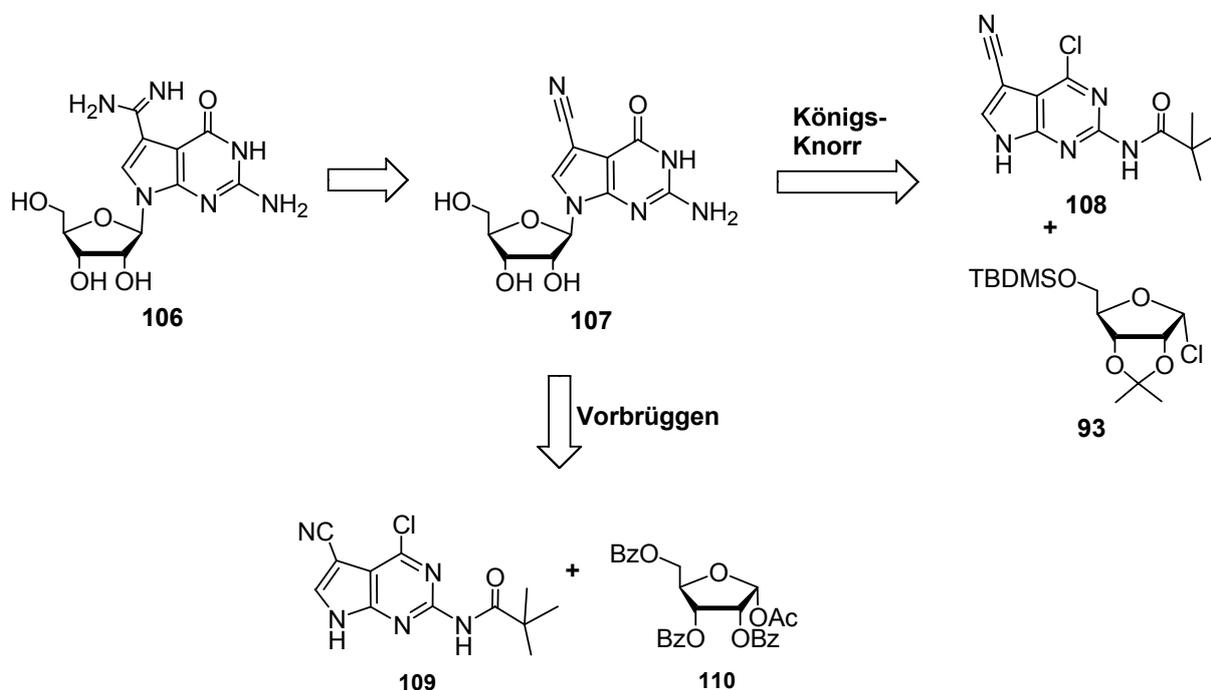


Schema 3.21: Synthese von Queuosin 1.

Das Nucleosid bzw. der Vorläufer soll nun in weiteren Arbeiten über RNA Festphasensynthese in einen RNA-Strang eingebaut werden. Studien über physikalische und chemische Eigenschaften dieser tRNA Modifikation innerhalb der RNA sollen einen Einblick in die Funktionsweise der komplexen tRNA Modifikationen in der Zelle geben. Leider konnte dies im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden.

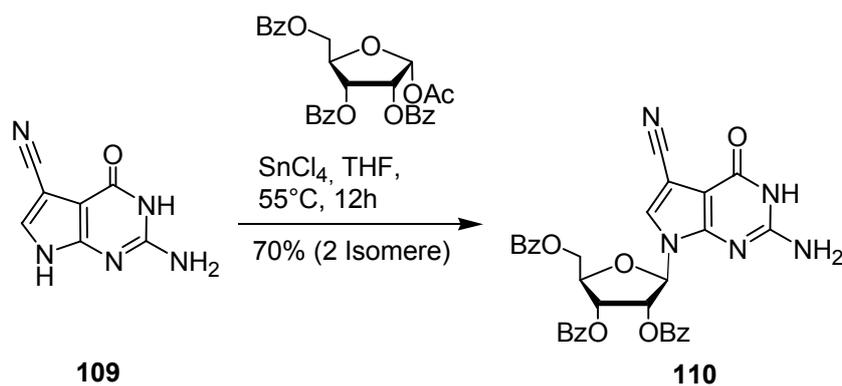
3.2. Synthese von Archaeosin

Neben Queuosin ist Archaeosin ein weiteres wichtiges 7-Desazaguanosinderivat, das in dieser Dissertationsarbeit synthetisiert werden sollte. Geplant war auch Archaeosin in einen Phosphoramiditbaustein umzuwandeln und in einen RNA-Strang einzubauen. Um das 7-Amidino-desazaguanosin **106** zu erhalten, bot sich an, zunächst das 7-Cyano-desazaguanosin **107** zu synthetisieren und anschließend in einer *Pinner*-Umwandlung die Amidgruppe zu erzeugen.¹⁴² Auch hier ist die Verknüpfung zwischen der 7-Desazaguaninbase und dem Ribozucker die Schlüsselreaktion der Synthese. Möglich wäre, wie auch in der Synthese des Queuosins, die Verwendung der Reaktionsbedingungen der *Vorbrüggen*-Reaktion, in der ein acetylgeschützter Zucker mit der Base gekuppelt wird oder die *Königs-Knorr* Synthese, unter Verwendung eines chloraktivierten Zuckers (s. Schema 3.22).



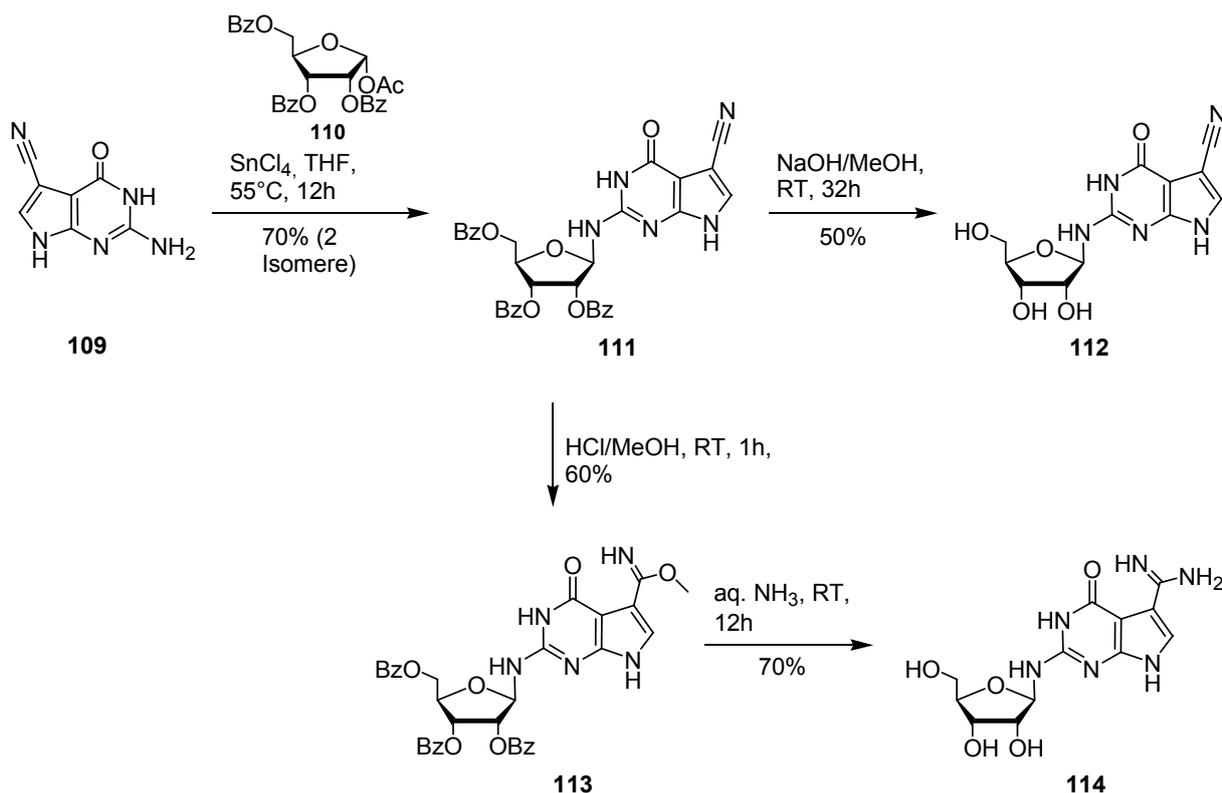
Schema 3.22: Retrosynthese von Archaeosin.

In einer Arbeit von *Gibson et al.* wurde bereits ein Cyano-desazaguanosinnukleosid **111**, wie in Schema 3.23 dargestellt ist, nach *Vorbrüggen*-Bedingungen synthetisiert.¹⁴³



Schema 3.23: Von *Gibson* et al. publizierter Syntheseschritt.¹⁴³

110 sollte als Ausgangssubstanz für die Synthese von Archaeosin dienen und der Weg von *Gibson* et al. wurde in Rahmen der Arbeit zunächst untersucht. Nach der durchgeführten Synthese von **110** wurden wie beschrieben tatsächlich zwei Nucleoside mit dem gesuchten Molekulargewicht identifiziert, die sowohl säulenchromatographisch als auch über präparative HPCL aufgrund einer identischen Retentionszeit nicht voneinander zu trennen waren. Nach dem NMR-Spektrum des Gemisches lagen zwei Isomere im Verhältnis von 3:1 vor. Diese zeigten jedoch für N(9)-Nucleoside ungewöhnliche Verschiebungen. Im Bereich zwischen 10-12 ppm waren jeweils zwei Signale zu erkennen, die zwei einzelne an Stickstoff gebundene Protonen zeigen ($\delta = 10.96, 12.26$ und $11.24, 12.32$ ppm) (s. Abbildung 3.12). Ebenso waren zwei Protonensignale des Zuckers im Bereich von $\delta = 6.0$ bis 8.0 ppm zu erkennen, obwohl in N(9)-verbrückten Ribonucleosiden nur das C_{1'}-Proton in diesem Bereich liegt. Es konnte somit angenommen werden, dass die *Vorbrücken*-Reaktion den Zucker mit der Base gekuppelt hat, aber nicht, wie von *Gibson* et al. postuliert, über den N(9)-Stickstoff des Pyrrolosystems verbrückt, sondern über einen anderen Stickstoff des Heterozyklus.



Schema 3.24: Synthese von **111** nach Gibson et al.¹⁴³ und weitere in der Arbeit durchgeführte Syntheseschritte.

Der Versuch, zur näheren Charakterisierung die beiden Isomere über präparative HPLC zu trennen, misslang ebenso, da beide Stoffe identische Retentionszeiten besaßen. Sowohl die Entschützungsreaktion am Zucker zu **112**, dargestellt in Schema 3.24) als auch die weitere Umwandlung vom Nitril **111** zum 7-Methylimidat **113** und weiter zum 7-Amidinderivat **114**, die massenspektroskopisch nachgewiesen wurden, lieferten keine trennbaren Gemische. Die Untersuchung von **111** über ²D-NMR lieferte schließlich das Ergebnis, dass die Gruppe um Gibson nicht das N(9)-verbrückte Nucleosid synthetisiert hatten, sondern ein α/β -Isomerengemisch, in dem die exozyklische Aminogruppe die Verbindung zum Zucker darstellt (s. Abbildung 3.11). Welches der Isomere im Überschuss gebildet wurden, konnte aus den Spektren leider nicht entnommen werden.

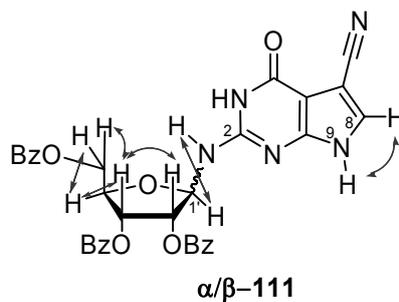


Abbildung 3.11: Struktur von α/β -111 und gemessene NMR-NOESY-Kopplungen.

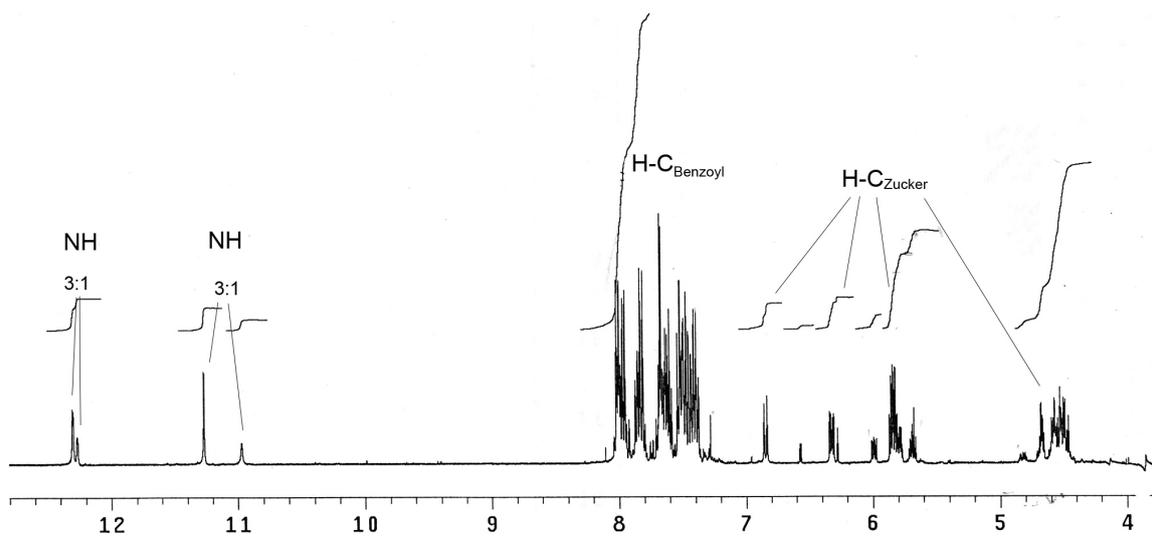


Abbildung 3.12: NMR-Spektrum von α/β -111

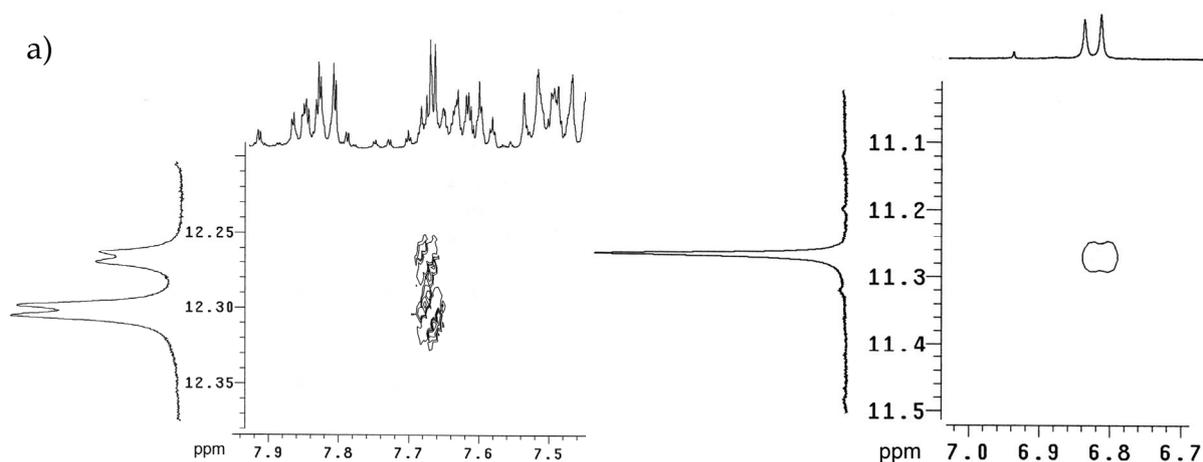
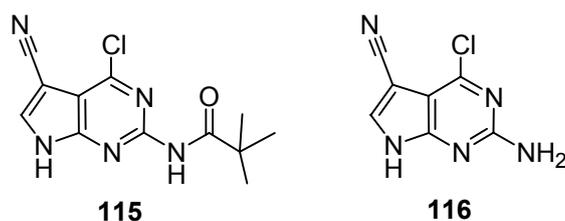


Abbildung 3.13: NMR-NOESY-Kopplung in α/β -111 zwischen a) $H-C(8)/H-N(9)$ und b) $H-N(2)/H-C_1$.

In den NMR-Messungen sieht man zum einen die NOESY- und COSY-Kopplung zwischen dem N(9)-Proton und dem C(8)-Proton (s. Abbildung 3.13), aber auch die Raumkopplung zwischen dem verbrückenden-N-Proton und dem C_1 -Proton des

Zuckers. Das dritte N-gebundene Proton konnte aufgrund seiner Tieffeldverschiebung nicht gemessen werden. Dieses Ergebnis konnte zusätzlich untermauert werden, indem eine pivaloylgeschützte 7-Cyanodesazaguaninbase **115** (s. Schema 3.25) in derselben Reaktion nach *Vorbrüggen*-Bedingungen eingesetzt wurde und diese zu keiner Umsetzung der Edukte führte. Es zeigte erneut auf, wie unreaktiv die N(9)-Position der 7-Cyanoguaninbase ist.



Schema 3.25: Cyanobasen für die Glykosidierungsreaktion.

Nach diesen Erkenntnissen musste ein anderer Weg zur Synthese von Archaeosin gefunden werden. Wie die Vorarbeiten auf dem Gebiet des Archaeosins und Queuosins zeigten, war zwar die *Vorbrüggen*-Reaktion geeignet, um die Totalsynthese zu ermöglichen, dennoch nur bedingt für die Synthese verschiedener 7-Desazanukleoside geeignet. Da nur sehr wenige funktionelle Gruppen an der 7-Position der Guaninbase die *Vorbrüggen*-Reaktion ermöglichen, war nun das Ziel, einen Weg zu finden, wie 7-Cyanodesazaguaninbasen und deren Derivate mit chloraktivierten Zuckern reagieren. Dazu wurden Verbindungen **115** und **116** synthetisiert und die Reaktion mit dem *in situ* hergestellten Zucker **93** getestet. In der Glykosidierungsreaktion wurde als Deprotonierungsreagenz der Nukleobase zum einen KOH in Verbindung mit Tris-(methoxyethoxyethyl)-amin als Phasentransferkatalysator verwendet, als auch Natriumhydrid eingesetzt.

Ergebnis dieser Reaktionsreihe war, dass allein die pivaloyl- und chlorgeschützte Cyanobase **115** reaktiv genug war, um mit dem Chlorzucker zu reagieren und ein 7-Cyano-desazaguanosinnukleosid entstanden war. Verbindung **116** zeigte dagegen keine Reaktivität. ¹D- und ²D-NMR Untersuchungen ergaben, dass das N(9)-

verbrückte Nukleosid **117** in β -Konformation entstanden ist (s. Abbildung 3.14 und Abbildung 3.15).

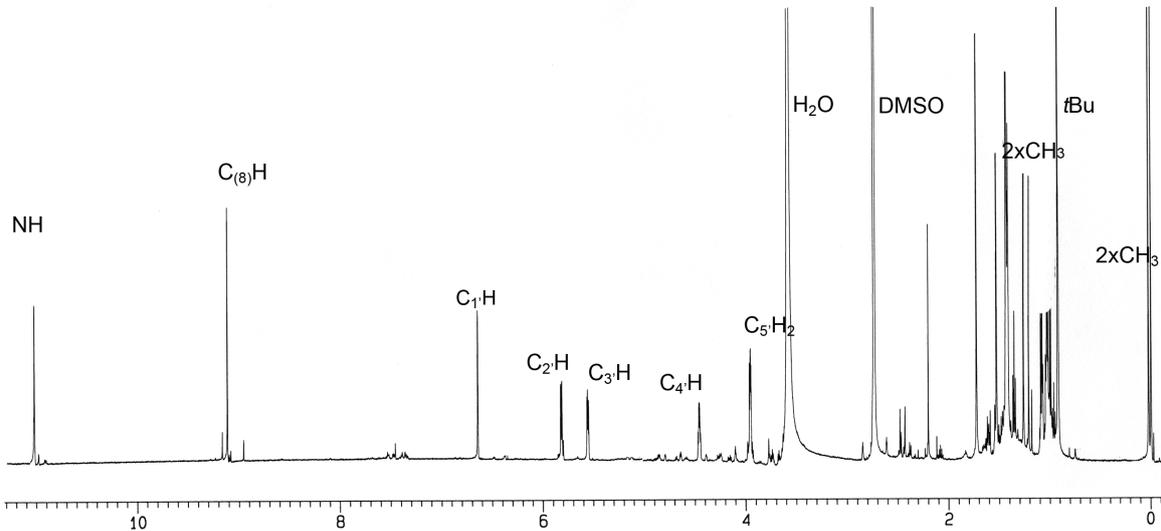


Abbildung 3.14: NMR-Spektrum von **117**.

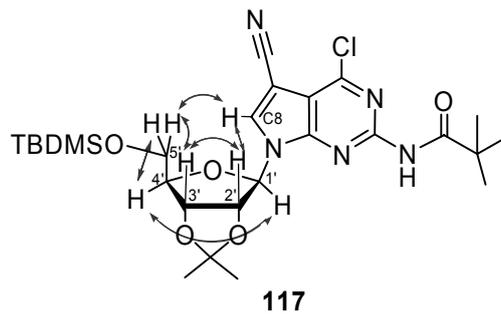
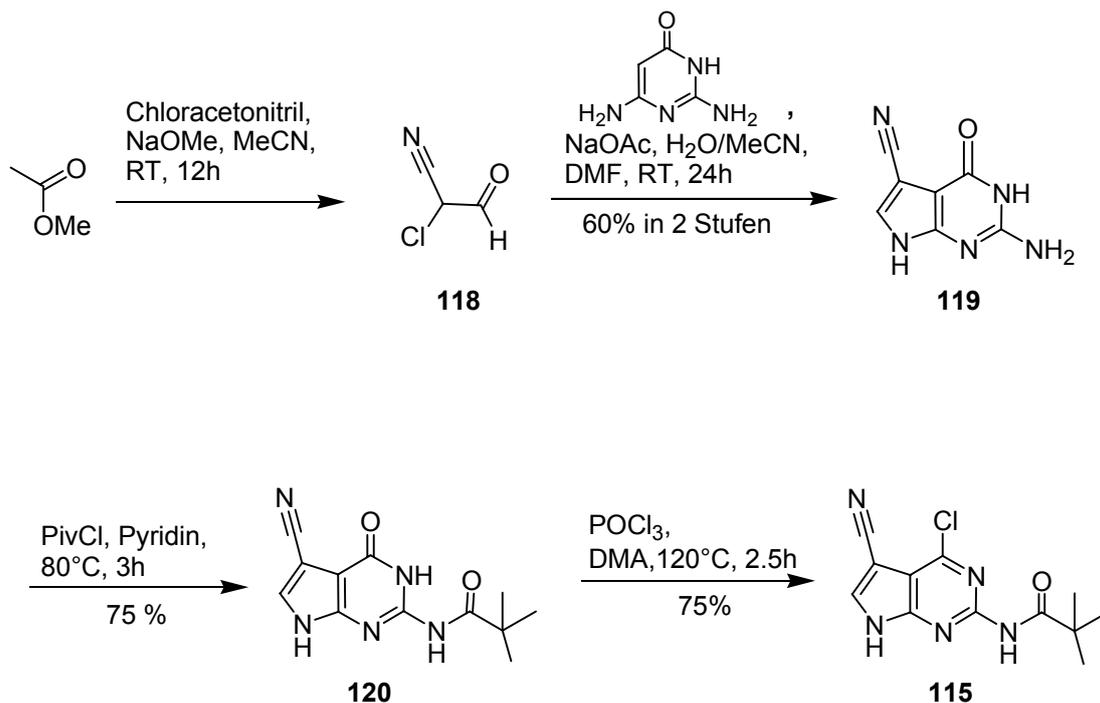


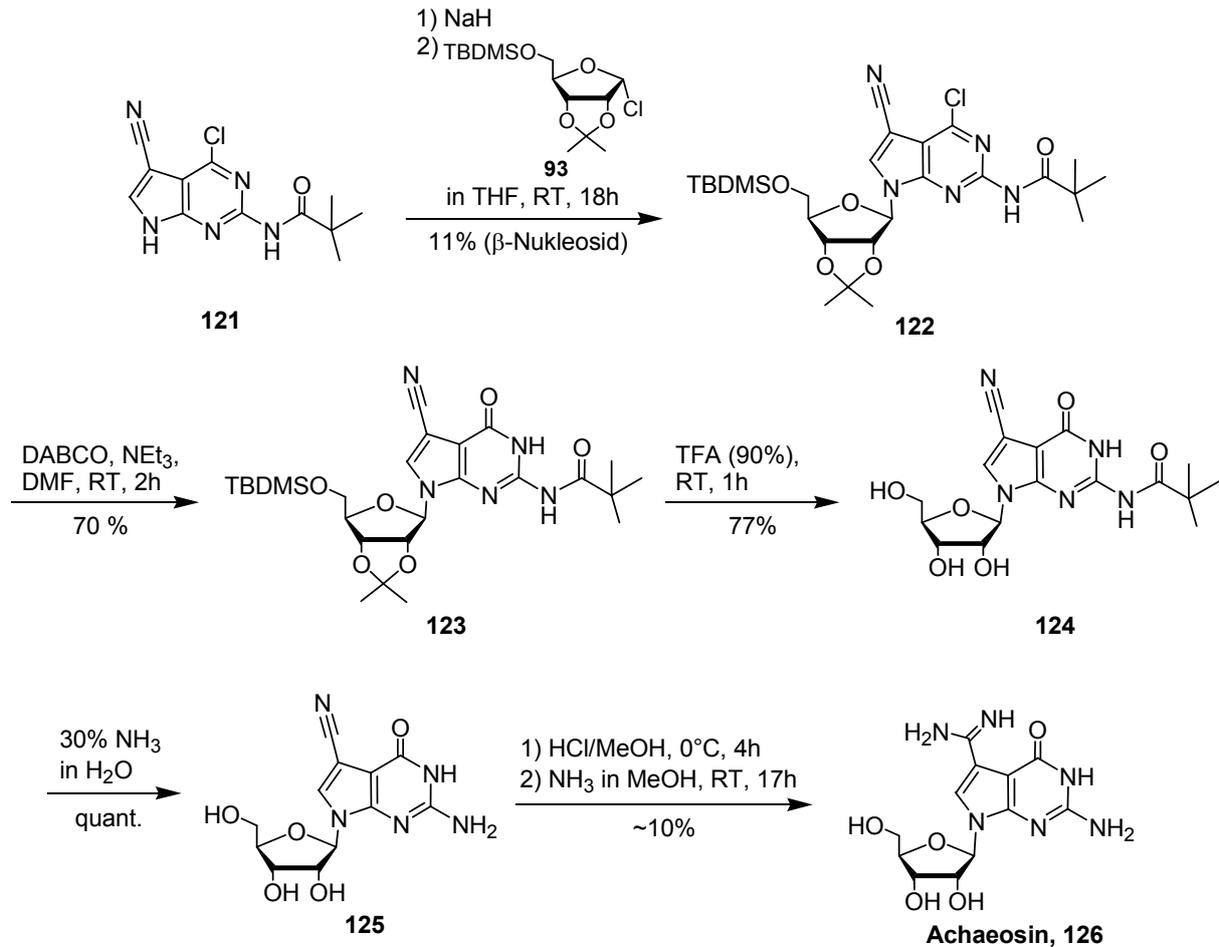
Abbildung 3.15: Struktur von **117** und ausgewählte NOESY-Kopplungen.

Mit der Synthese des 7-Cyano-desazaguanosinnukleosids als Schlüsselbaustein zur Synthese von Archaeosin wurde nun folgende Synthese entwickelt. Ausgangssubstanz war Essigsäuremethylester, welches nach Enolisierung und Reaktion mit Chloracetonitril zum 2-Chlor-3-oxopropannitril umgewandelt wurde. Kondensation von Nitril **118** mit 2,4-Diamino-6-hydroxypyrimidin ergab 7-Cyano-desazaguanin **119** (preQ₀-Base) in hoher Ausbeute. Diese wurde mit Pivaloylsäurechlorid umgesetzt und mit Phosphorylchlorid chloriert (s. Schema 3.26).



Schema 3.26: Synthese des Cyanodesazuguaninderivats 115.

115 wurde nun nach der beschriebenen Glykosidierungsreaktion mit Natriumhydrid deprotoniert und zu der Lösung der *in situ* hergestellten Chlorzucker gegeben (Schema 3.27). Nach 18 h wurde die Reaktion aufgearbeitet und **122** in mäßigen Ausbeuten isoliert. Die Dechlorierung des Nukleosids mit DABCO und Triethylamin und die Abspaltung der Acetonid- und *tert*-Butyldimethylsilylschutzgruppe nach Standardbedingungen verliefen reibungslos. Der Abschluss der Synthese von Archaeosin wurde in der Diplomarbeit von Tobias Brückl erarbeitet. Die Pivaloylschutzgruppe konnte so in einem anschließenden Schritt alkalisch gespalten werden und man erhielt das preQ₀-Nukleosid **125** in guten Ausbeuten (s. Schema 3.27).



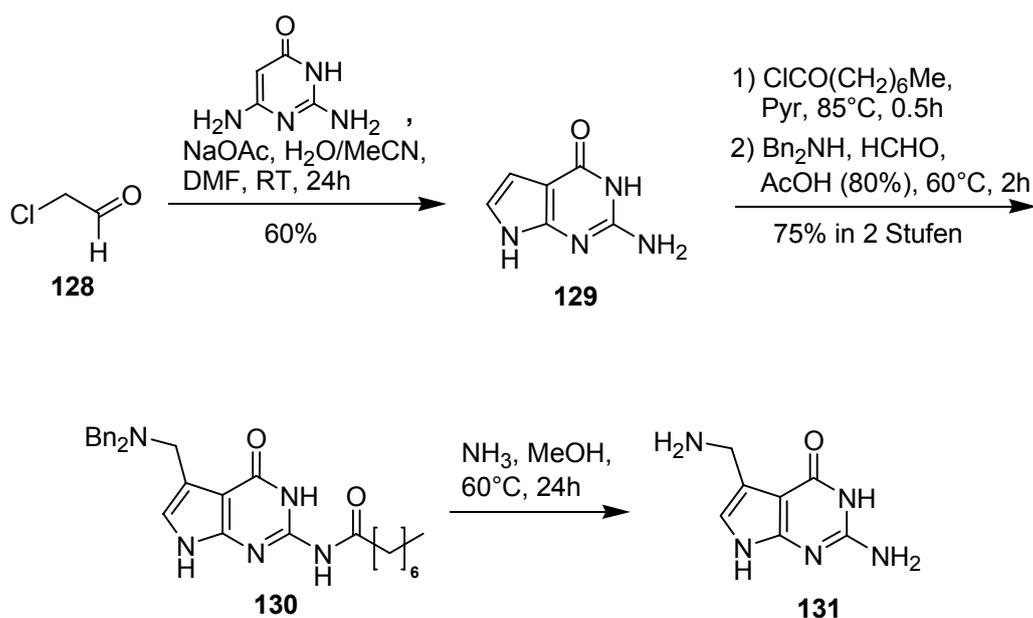
Schema 3.27: Synthese von Archaeosin 126.

Mit HCl in Methanol wurde dann zunächst der Imidester gebildet und in einem abschließenden Schritt mit methanolischem Ammoniak die Amidfunktion synthetisiert. Während **125** noch säulenchromatographisch gereinigt werden konnte, musste das sehr polare Archaeosin mit Hilfe präparativer HPLC isoliert werden. Archaeosin konnte somit erstmals in 12 Syntheseschritten hergestellt werden.

3.3. Synthese der *preQ*₀ und *preQ*₁-Base

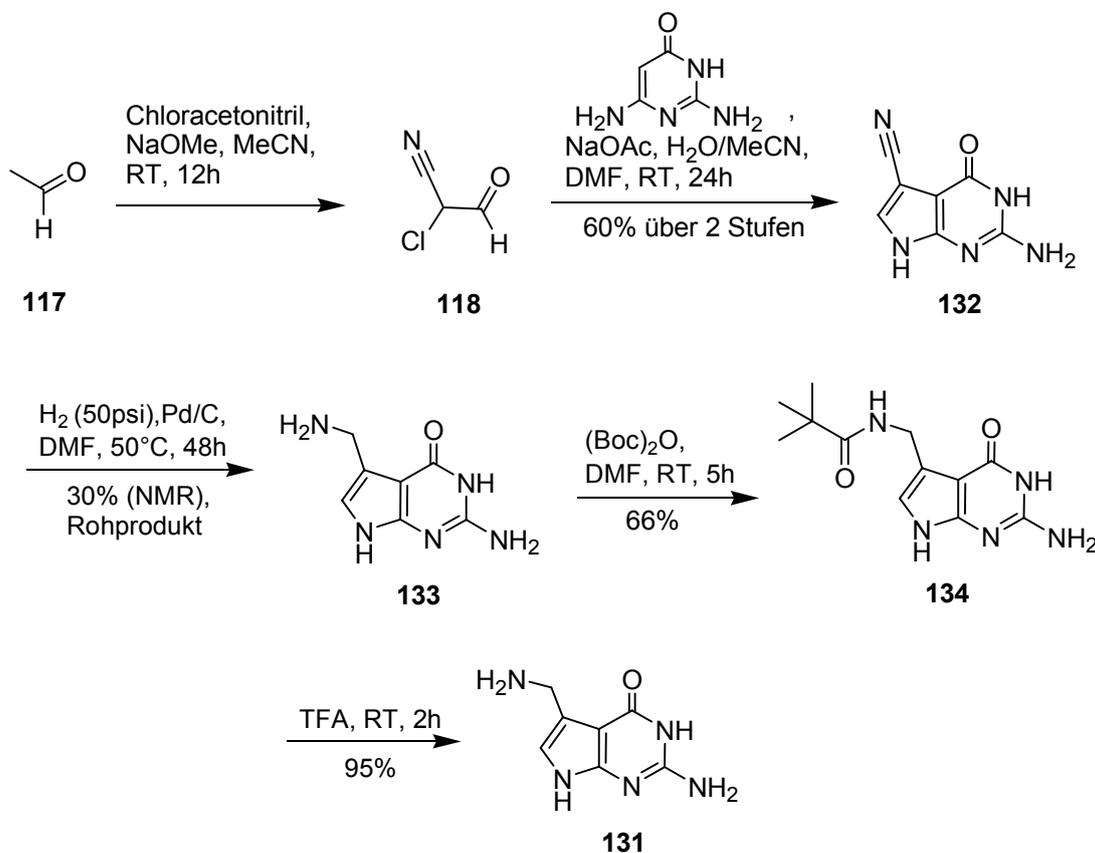
In der Kooperation mit der Arbeitsgruppe um *Ficner* sollte für *Riboswitch*-Studien die *preQ*₁-Base (7-Aminomethyl-desazaguanin) **131** synthetisiert werden. Dieses sollte mit RNA co-kristallisiert werden und aufzuklären, wie *preQ*₁ in einem *Riboswitch* erkannt wird.

*PreQ*₁ wurde bereits von *Akimoto* et al. synthetisiert und es schien somit einfach, das Molekül zu erhalten (s. Schema 3.28).¹⁰⁵ Es wurde Chloracetaldehyd mit 2,4-Diamino-6-hydroxypyrimidin kondensiert und die Desazaguaninbase **129** mit Oktylsäurechlorid am exozyklischen Stickstoff geschützt. Eine *Mannich*-Reaktion mit Formaldehyd und Dibenzylamin liefert das Dibenzylaminomethyl-desazaguanin **130**. Eine Aminoaustauschreaktion, die von *Akimoto* et al. mit einer 78%igen Ausbeute angegeben wurde, mit gleichzeitiger Entschützung sollte nun das freie Amin *preQ*₁ **131** ergeben. Die Umsetzung von **131** misslang jedoch, da außer der Oktyl-Schutzgruppenabspaltung keine Reaktion des Dibenzylamins zu beobachten war.



Schema 3.28: Synthese von *preQ*₁ nach *Akimoto* et al.

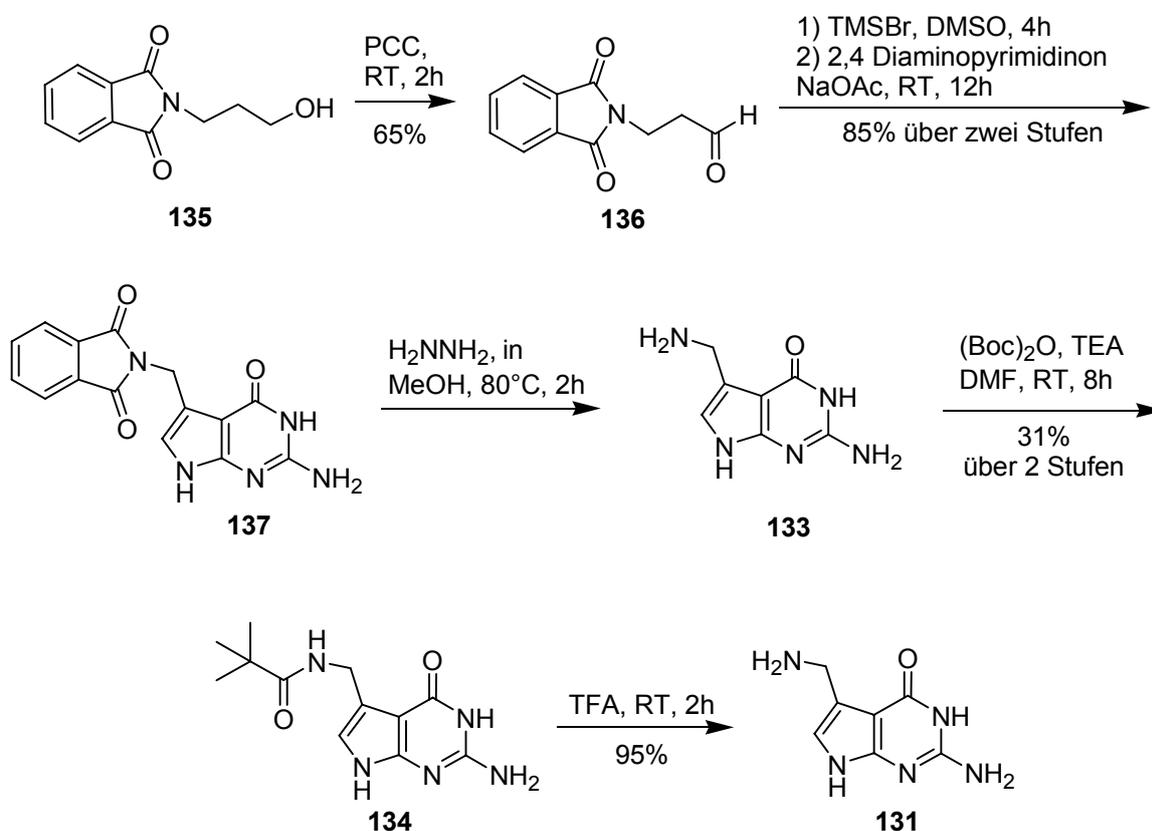
Um die preQ₁-Base dennoch zu erhalten, wurde eine neue fünf-stufige Route erarbeitet, die über die Synthese der preQ₀-Base verlief und die in Schema 3.29 dargestellt ist. Ausgangssubstanz, wie schon für die Synthese von Archaeosin, war Essigsäuremethylester **117**, welcher nach Enolisierung und Reaktion mit Chloracetonitril zum 2-Chlor-3-oxopropanitril **118** umgewandelt wurde. Kondensation von Nitril **118** mit 2,4-Diamino-6-hydroxypyrimidin ergab 7-Cyano-desazaguanin **132** (preQ₀) in guter Ausbeute.¹⁴⁴ Für die Synthese von preQ₁ sollte die Cyanogruppe direkt zur Aminomethylgruppe von preQ₁ hydriert (H₂, Pd/C) werden.¹⁴⁵ Die Reaktion ergab preQ₁, aber leider nur als Reaktionsgemisch, bestehend aus nicht umgesetzten Edukt und der preQ₁-Base **133**, dessen Reinigung sich als sehr schwierig herausstellte. Um die Aufreinigung durchzuführen, wurde das Reaktionsgemisch mit (Boc)₂O umgesetzt. Die *N*-Boc-geschützte preQ₁-Base **134** wurde dann mittels Flashchromatographie gereinigt. Entschützung mit Trifluoressigsäure ergab die preQ₁-Base **131** in hoher Reinheit.



Schema 3.29: Synthese von preQ₁ – Weg über preQ₀-Zwischenstufe.

Die Gesamtausbeute war mit 10% leider niedriger als erwartet. Versuche, die Ausbeute von **131** zu erhöhen, z.B. durch Durchführung der kritischen Hydrierung bei erhöhtem Druck, blieben erfolglos. Um größere Mengen von preQ₁ (**131**) zu synthetisieren, wie sie z.B. für Kristallisationsstudien benötigt werden, wurde ein alternativer Syntheseweg entwickelt, der in Schema 3.30 abgebildet ist.

Ausgangsverbindung war *N*-(3-Hydroxypropyl-)phthalimid **135**, das mit *Dess-Martin* Periodinan zu Aldehyd **136** umgesetzt wurde. α -Bromierung mit Trimethylsilylbromid, und nachfolgende Reaktion mit 2,4-Diamino-6-hydroxypyrimidin ergab direkt die phthalimidgeschützte preQ₁-Base **137** in einer Ausbeute von 85%.¹⁴⁶ Die anschließende Phthalimidentschützung wurde mit Hydrazin durchgeführt.¹⁴⁷ Die Aufreinigung von preQ₁ wurde wieder nach der Reaktion mit (Boc)₂O säulenchromatographisch durchgeführt. Spaltung der Boc-Schutzgruppe erfolgte wie oben beschrieben. Diese synthetische Route ist etwas länger, erlaubt aber die Synthese der preQ₁-Base (**131**) in einer Gesamtausbeute von 25%.¹⁴⁸



Schema 3.30: Synthese von preQ₁ – Weg über Phthalidylmethyl-desazaguanin.

Dieser Syntheseweg, dargestellt in Schema 3.30, ergab genügend Material, um Kristallisationsstudien von **131** durchzuführen. Es wurden gelbe Kristalle von **131** erhalten, indem eine methanolische ges. Lösung von **131** über 4 h erhitzt ($T=40^{\circ}\text{C}$) wurde. Die gebildeten Kristalle wurden eliminiert, getrocknet und in die Röntgendiffraktionsanalyse eingesetzt. Die Analyse der Kristallstrukturdaten ergaben das überraschende Ergebnis, dass die Elementarzelle das doppelte Volumen wie vorausberechnet hatte. Eine genauere Betrachtung der Kristallstruktur zeigte, dass das Monokation und Dikation des PreQ_1 -Trifluoroacetatsalzes in dem Kristall zu gleichen Teilen vorlagen. In dem Kristall sind beide Verbindungen von drei Trifluoroacetatmolekülen umgeben (Abbildung 3.16). Die Messung zeigt deutlich, dass das Monokation an der Aminomethylgruppe (N10) protoniert ist. Die dikationische Spezies ist an der Aminomethylgruppe (N5)) und am N(1)-Stickstoff des Heterozyklus (N2) protoniert.

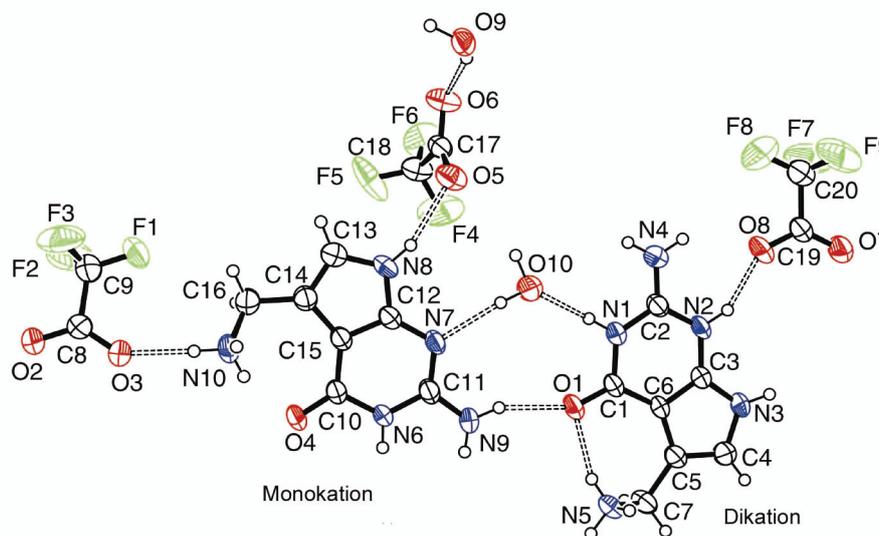


Abbildung 3.16: Kristallstruktur von preQ_1 -Trifluoroacetat Salz. Die Elliptoide stellen eine 30%ige Aufenthaltswahrscheinlichkeit dar.

Eine intramolekulare Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Proton der protonierten Aminogruppe und dem Keton des Heterozyklus (N5-O1 und N10-O4) kann man in beiden Basen erkennen. Die Länge der H-Bindung zwischen N(10) und

O(4) beträgt 1.944Å sowie zwischen O(1) und N(5) 1.994Å. Es existieren zwei direkte Wechselwirkungen zwischen den kationischen Basen.

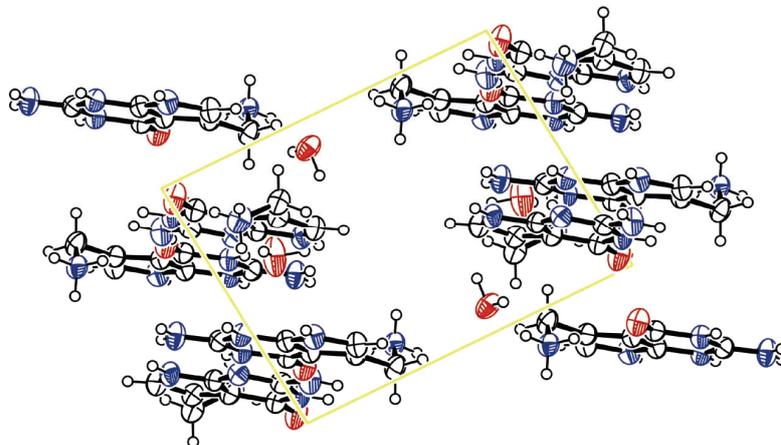


Abbildung 3.17: Packung des preQ₁ Kations (Projektion Normal (001)) im Kristall. Die Elliptoide stellen eine 30%ige Aufenthaltswahrscheinlichkeit dar.

In Abbildung 3.17 ist die Kristallpackung des Mono- und Dikations gezeigt. Beide Basen liegen in einer dimer-ähnlichen und planar angeordneten Form vor. Die Zigzag-Kette von Monokation N3-C3-N2-C2-N4 liegt über der Zickzack-Kette des Dikations C13-N8-C12-N7-C11, so dass abwechselnd Stickstoffatome über Kohlenstoffatomen liegen und umgekehrt und damit eine π - π Wechselwirkung vorliegt. Die Abstände dieser Atome variieren zwischen 3.269 und 3.356 Å.

Das auf diesen Weg synthetisierte preQ₁ wurde in oben beschriebenen Kristallisationsstudien mit RNA der Forschungsgruppe um Prof. *Ficner* an der Universität Göttingen eingesetzt. Nach Testen verschiedener Kristallisationsbedingungen konnten erste kleine Kristalle erhalten werden (s. Abbildung 3.18). Diese streuen allerdings relativ schlecht nur bis ca. 7Å, so dass noch nicht gesagt werden kann, ob es sich bei diesen Kristallen um Kokristalle zwischen RNA und preQ₁-Base handelt. Problematisch ist derzeit der sehr lange Zeitraum (4-5 Monate) der für das Wachstum eines Kristalls benötigt wird, d.h. man

ist relativ limitiert im Optimieren der Kristallisationsbedingungen. Dennoch kann erwartet werden, dass in einiger Zeit Co-Kristalle gebildet werden, die sowohl RNA als auch den gebundenen Metaboliten enthalten. Wir erwarten, dass eine solche Cokristallstruktur neue Einblicke liefert wie ein *Riboswitch* die preQ₁-Base molekular erkennt.

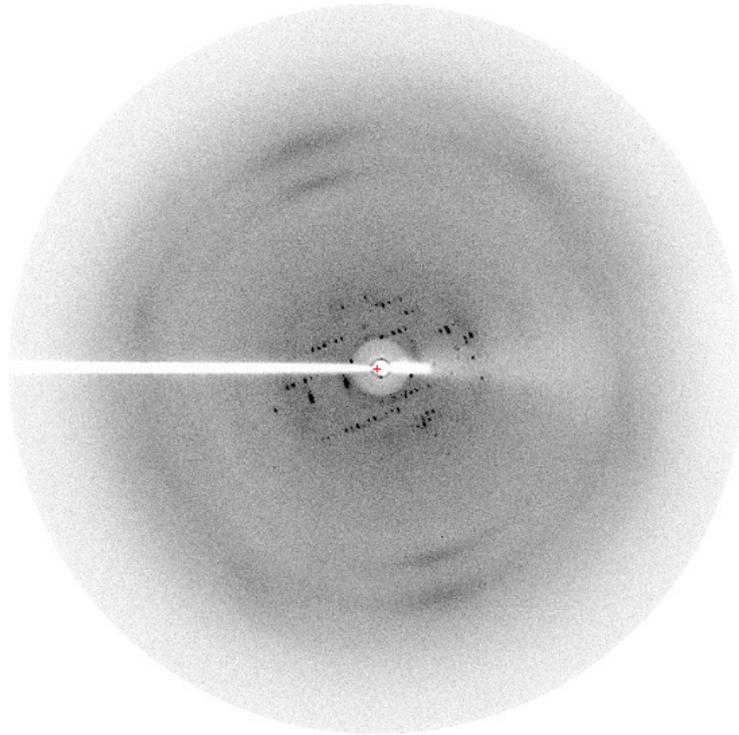


Abbildung 3.18: Röntgenstrukturaufnahme der preQ₁-RNA Kristallisationsstudie.

4. Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte sowohl die Synthese der tRNA Modifikation Queuosin als auch von Archaeosin erfolgreich durchgeführt werden. Queuosin konnte in 15 Stufen und einer Gesamtausbeute von 7% erhalten werden, in dem ein Cyclopentenylring mit einem 7-Formyl-desazaguanosinderivat reduktiv aminiert wurde. Das Cyclopentenylamin wurde in einer kurzen sechs-stufigen Synthesesequenz synthetisiert. Die *Mitsunobu*-Bedingungen wurden so angepasst, dass allein das S_N2 -Produkt erhalten wurde. Die Allylazid-Umlagerung konnte erfolgreich unterbunden werden. Der zweite Formyl-desazaguanin-Baustein wurde in einer weiteren sechs-stufigen Synthesesequenz erzeugt. Das Nukleosid wurde nach *Vorbrüggen*-Bedingungen erhalten. Dieses wurde über eine Palladium-katalysierte Kohlenmonoxid-Insertion formyliert. Die anschließende reduktive Aminierung verlief problemlos und ergab nach Entschützung das tRNA Nukleosid Queuosin.

Das natürliche tRNA Nukleosid Archaeosin konnte synthetisiert werden, indem ein 7-Cyano-desazaguaninderivat nach *Koenigs-Knorr*-Bedingungen glykosidiert wurde. Nach weiteren chemischen Umwandlungen wurde das PreQ₀-Nukleosid (7-Cyano-desazaguanosin) erhalten, welches nach *Pinner*-Bedingungen zum Archaeosin umgewandelt wurde. Archaeosin wurde somit erstmals in einer 15-stufigen Synthese leider mit einer Gesamtausbeute von <1% erhalten.

Beide Modifikationen, bzw. im Falle von Queuosin auch der Formyl-desazaguanosinvorläufer, können nun in das entsprechende Phosphoramidit umgewandelt werden und mittels Festphasensynthese in einen tRNA Strang eingebaut werden. Schmelzpunkt- und 2D-NMR Studien können einen Einblick in

die konformationellen und elektronischen Eigenschaften der RNA Modifikationen liefern. Desweiteren kann durch die erstmalige Synthese der Glykosid- und Aminosäuremodifikationen der Einfluß dieser weiteren Derivatisierung aufgeklärt werden. Mit den wichtigen Bausteinen ist es nun ebenfalls möglich, einzelne, noch nicht genauer untersuchte Schritte der Biosynthese, und die daran beteiligten Enzyme zu untersuchen.

Die Untersuchung des preQ_1 -*Riboswitchs* durch eine Kristallstruktur sollte Einblicke in die molekulare Erkennung von preQ_1 im *Riboswitch* ermöglichen.

5. Experimenteller Teil

5.1. Methoden

Kernresonanzspektroskopie

^1H - und ^{13}C -Kernresonanzspektroskopie-Spektren wurden an einem *Varian Gemini 200*, *Varian*, *Bruker ARX 200*, *Bruker AMX 300* bei Raumtemperatur aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen (δ) wurden auf das jeweilige Lösungsmittel kalibriert. Die Kopplungen (J) wurden in Hz angegeben. Für die Feinstruktur der Signale gilt: s = Singulett, d = Duplett, t = Triplet, m = Multiplet.

Massenspektroskopie

Massenspektren wurden von der Massenabteilung des FB-Chemie, Marburg, aufgenommen. ESI-Massenspektren wurden auf einem *Finnigan TSQ 7000*, *Finnigan MAT 95 S* oder *Q-STAR Pulsar i* Spektrometer der Firma *PE SUIEX* gemessen.

IR-Spektroskopie

IR-Spektren wurden auf einem *Bruker IFS 25* FT-IR-Spektrometer als Filme mit NaCl-Platten gemessen. Die Lage der Banden wird in cm^{-1} angegeben; die relativen Intensitäten sind mit den Symbolen s (stark), m (mittel), w (schwach) vermerkt.

Dünnschichtchromatographie

Für die Dünnschichtchromatographie wurden Aluminium-Fertigplatten Kieselgel 60 F254, Schichtdicke 0.25 mm, der Firma *Merck* verwendet. Die Detektion der Substanzen erfolgte mittels UV-Licht ($\lambda = 254 \text{ nm}$ bzw. 366 nm), durch Anfärben mit Tauchreagenzien wie Kaliumpermanganat-Lösung (1 g KMnO_4 in 100 mL H_2O),

Anisaldehyd-Lösung (2.2 g Anisaldehyd, 2 mL konz. H₂SO₄ und 100 mL Eisessig),
Cer-Phosphormolybdänsäure-Lösung (10 g Ce(SO₄)₂·H₂O, 25 g Phosphor-
molybdänsäure, 60 mL H₂SO₄ und 940 mL H₂O).

Säulenchromatographie

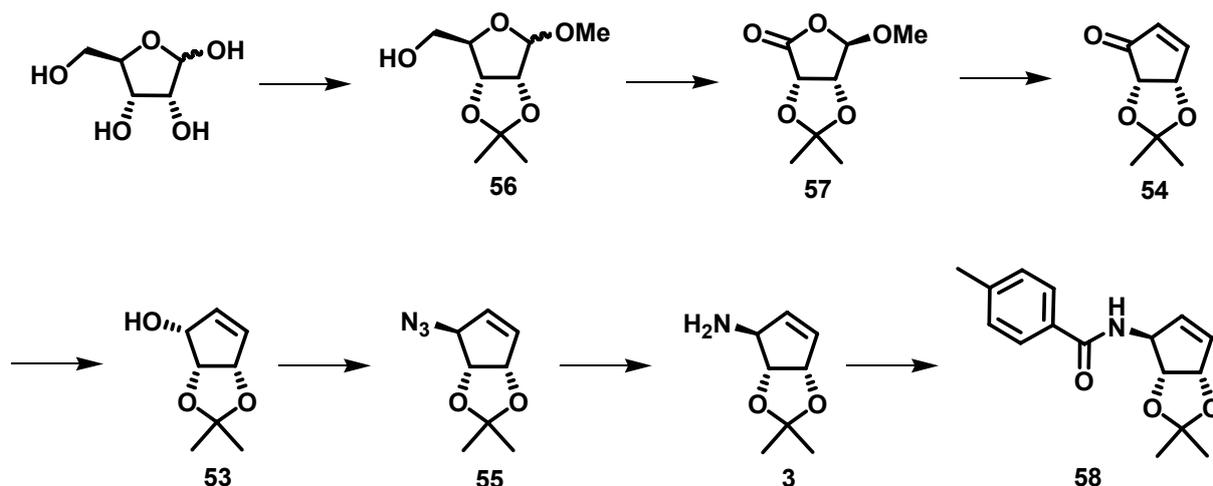
Für die Flash-Säulenchromatographie (FC) wurde Kieselgel 60 der Firma *Merck* (Korngröße 0.040- 0.063 mm) verwendet. Lösungsmittelgemische sind in Volumenanteilen angegeben.

Lösungsmittel/Chemikalien

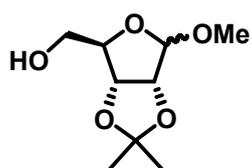
Lösungsmittel und Chemikalien wurden, soweit nicht anderes angegeben, von den Firmen *Acros, Aldrich, Fluka, Merck, Sigma* in den Qualitäten purum oder puriss. p.a. eingesetzt. Dichlormethan wurde über Calciumhydrid, THF über Kalium und Methanol über Magnesium getrocknet. Lösungsmittel für Extraktionen und Säulenchromatographie waren von technischer Qualität und wurden vor Verwendung destilliert. Das Entfernen von Lösungsmitteln *in vacuo* wurde mit einem Rotationsverdampfer *VV2000* der Firma *Heidolph* am Membranpumpenvakuum durchgeführt.

5.2. Experimente

5.2.1. Synthese von Cyclopentenyamin 3



1-Methoxy-2,2-isopropyliden- α/β -D-ribofuranose (56 α /56 β)^[124]

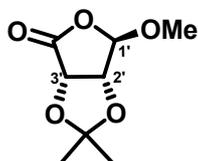


Eine Lösung von D-Ribose (10 g, 66.6 mmol) und 2,2-Dimethoxypropan (20 mL, 163 mmol) in Aceton (80 mL) wurde mit einem Eisbad auf 0°C gekühlt. Dann wurde langsam 70%ige Perchlorsäure (4 mL, 46.8 mmol) zugetropft. Das Eisbad wurde entfernt und die Lösung bei RT 2 h gerührt, wobei sich diese langsam gelb-orange färbte. Methanol (14 mL, 345 mmol) wurde zugegeben und nochmals 2 h gerührt. Unter Eiskühlung wurde eine Natriumcarbonatlösung (6.4 g in 20 mL H₂O, 60.4 mmol) zugegeben und ein weißer Niederschlag fiel aus, der abfiltriert wurde. Das *in*

vacuo eingengte Filtrat (ca. 30 mL) wurde mit Diethylether (2 × 200 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit ges. NaCl-Lösung und H₂O (je 100 mL) gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und *in vacuo* eingengt. Es verblieb **56α/56β** (12.1 g, 94%) als hellgelbes Öl.

R_f = 0.65 (Pentan/Ethylacetat, 7:1); [α]_D³⁵ = -96° (c = 3.41, CHCl₃); IR (neat): 3452 (m, br), 2939 (m), 1373 (m), 1209 (m), 1160 (m), 1080 (s), 1040 (s), 868 (s) cm⁻¹; ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ = 5.06 (s, 1 H, C₁H), 4.92 (d, J = 6.0 Hz, 1H, C₂H), 4.68 (d, J = 6.0 Hz, 1H, C₃H), 4.60-4.50 (m, 1H, C₄H), 3.75 (m, 2H, C₅H₂), 3.51 (s, 3H, OCH₃), 1.57 (s, 3H, CH₃), 1.41 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 112.4, 110.1, 88.5, 86.0, 81.8, 64.1, 55.6, 26.6, 25.0; MS (ESI⁺): 173 (10, MNa⁺-iPr-Me), 227 (100, MNa⁺); HR-MS (ESI⁺): ber. für [C₉H₁₆O₅]⁺: 204.0998, gef.: 204.0989.

(1R,5S,8R)-8-Methoxy-3,3-dimethyl-2,4,7-trioxabicyclo(3.3.0)octan-6-one (57)^[124]

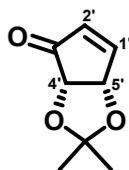


1-Methoxy-2,2-acetondiacetal-D-ribose **56α/56β** (4.0 g, 19.6 mmol) wurde in einem 500 mL Schlenkkolben mit Wasserabscheider und Rückflusskühler in Benzol (200 mL) gelöst (Rührfischhandel) und unter Rühren mit Pyridiniumchlorochromat (16.8 g, 77.9 mmol) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei 90°C (Ölbad 110°C) refluxiert. Das LM wurde vom schwarzen Rückstand abdekantiert und der Rückstand mit Et₂O (3 × 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden *in vacuo* auf 50 mL eingengt und durch Kieselgel mit Ether (200 mL) filtriert. Nach Einengen *in vacuo* verblieb ein bräunlicher Feststoff, der erneut durch Kieselgel filtriert wurde und *in vacuo* zu einem klaren Öl eingengt. Dieser wurde in

wenig Et₂O/*n*-Hexan umkristallisiert. Das Lacton **57** (1.6 g, 46%) kristallisierte in weißen Nadeln.

R_f = 0.30 (Pentan/Ethylacetat, 4:1); [α]_D³⁵ = -55° (c = 1.0, CHCl₃); m.p. 75-76°C; IR (neat): 2999 (w), 2951 (w), 1770 (s), 1377 (m), 1366 (m), 1184 (s), 1123 (s), 1076 (s), 975 (m), 926 (m), 858 (m) cm⁻¹; ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ = 5.34 (s, 1H, C₁H), 4.80 (d, J = 5.5 Hz, 1H, C₂H), 4.56 (d, 1H, J = 5.5 Hz, C₃H), 3.53 (s, 3H, OCH₃), 1.46 (s, 3H, CH₃), 1.38 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 174.0, 114.8, 105.4, 79.7, 74.8, 57.5, 27.0, 26.1; MS: m/z (%): 173 (23, [M-CH₃]⁺), 389 (13), 345 (32, [2(M-CH₃)-H]⁺), 129 (38); HR-MS (EI⁺): ber. für [C₈H₁₂O₅]⁺: 188.0685, gef.: 188.0675.

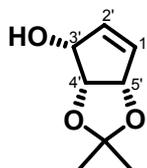
(4*R*,5*S*)-4,5-Isopropylidenedioxy-3-cyclopentenone (**54**)



Dimethylmethylphosphonat (1.14 mL, 10.6 mmol) wurde in THF (66 mL) gelöst und die Lösung auf -78°C gekühlt. *n*-BuLi (1.6 M in Hexan, 4.24 mL, 10.6 mmol) wurde innerhalb von 10 min zugetropft und die Lösung wurde weitere 15 min gerührt. Das Lacton **57** (2 g, 10.6 mmol) gelöst in THF (10 mL) wurde schnell zugegeben und die Lösung 2.5 h bei -78°C gerührt. Die Lösung wurde dann auf RT erwärmt (~45 min) und bei RT 30 min gerührt und eine gelbe Färbung trat auf. Die Lösung wurde in ein Diethylether-Wasser-Gemisch (5:1, 150 mL) gegeben und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde mit Ether (2 × 50 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit wässriger NaCl-Lösung gewaschen und über NaSO₄ getrocknet. Das LM wurde *in vacuo* zur Hälfte entfernt (T=30°C) und das verbleibende LM im N₂-Strom entfernt, bis das Cyclophenon **54** (860 mg, 56%) als weiße Kristalle ausfiel (wenig verbliebenes gelbfarbenedes Öl wurde entfernt).

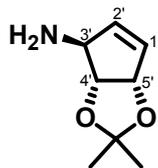
$R_f = 0.75$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 10:1); $[\alpha]_{\text{D}}^{35} = 70.1^\circ$ ($c = 5.7$, CHCl_3); m.p. 71°C ; IR (neat): 2935 (m), 1718 (s), 1585 (m) cm^{-1} ; ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.59$ (dd, $J = 5.5$ Hz, $J = 2.4$ Hz, 1H, C_1H), 6.21 (d, $J = 5.8$ Hz, 1H, C_2H), 5.25 (dd, $J = 5.5$ Hz, $J = 2.4$ Hz, 1H, C_5H), 4.80 (d, $J = 5.5$ Hz, 1H, C_4H), 1.39 (s, 6H, $2 \times \text{CH}_3$); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 200.1$, 158.5, 133.3, 114.5, 77.6, 64.8, 26.6, 23.4; HR-MS (EI^+): ber. für $[\text{C}_8\text{H}_{10}\text{O}_3]^+$: 154.0630, gef.: 154.0612.

(3R,4R,5S)-3-Hydroxy-4,5-isopropylidenedioxy-cyclopentene (53)^[149]



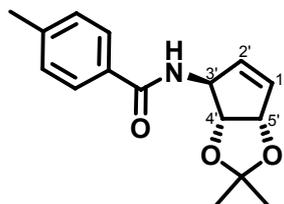
Eine Lösung des Cyclopentenons **54** (370 mg, 2.4 mmol) in MeOH (abs., 15 mL) wurde auf 0°C gekühlt und Certrichlorid-heptahydrat (941 mg, 2.52 mmol) und Natriumborhydrid (110 mg, 2.9 mmol) hinzugegeben. Die Reaktion wurde bei 0°C 45 min gerührt und anschließend H_2O (0.2 mL) zugegeben. Nach 10 min wurde die Reaktion mit Ether (60 mL), Natriumhydrogencarbonat (30 mL) und NaCl-Lösung (30 mL) extrahiert. Nach Trocknen über MgSO_4 wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (Isohexan/Ethylacetat 4:1) gereinigt. Man erhielt **53** (370 mg, 95%) als farbloses Öl.

$R_f = 0.65$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 10:1), 0.23 (hexane/EE, 4:1); $[\alpha]_{\text{D}}^{35} = 14.3^\circ$ ($c = 10.7$, CHCl_3); IR (neat): 3416 (br, w), 2986 (m), 2935 (m), 2338 (w), 1372 (m), 1209 (m), 1040 (s) cm^{-1} ; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 5.88$ (s, 2H, C_2H , C_3H), 5.03 (d, $J = 5.6$ Hz, 1H, C_5H), 4.74 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H, C_4H), 4.54 (dd, $J = 5.6$ Hz, 1H, C_3H), 1.43 (s, 3H, CH_3), 1.40 (s, 3H, CH_3); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 136.8$, 132.3, 109.6, 81.9, 74.6, 64.4, 28.0, 26.2; HR-MS (EI^+): ber. für $[\text{C}_8\text{H}_{13}\text{O}_3]^+$: 157.0865, gef.: 157.0856.

(3*S*,4*R*,5*S*)-3-Amino-4,5-isopropylidenedioxy-cyclopentene (3)

Zu einer Lösung des Alkohols **53** (33 mg, 0.219 mmol) in THF (abs., 1.5 mL) wurde bei 0°C Triphenylphosphin (72 mg, 0.275 mmol) zugegeben und Stickstoffwasserstoffsäure (0.92 M in Toluol, 0.295 mL, 0.27 mmol) und Diisopropylazodicarboxylat (0.052 mL, 0.27 mmol) mit einer Spritzenpumpe tropfenweise in einer Stunde zugegeben. Die Reaktion wurde bei 0°C weitere 7 h gerührt. Anschließend wurde Triphenylphosphin (55 mg, 0.21 mmol) zugegeben und 6 h bei 0°C und 6 h bei RT gerührt. Anschließend wurde H₂O (40 µL, 2.2 mmol) zugegeben. Die flüchtigen Anteile wurden unter vermindertem Druck entfernt (40°C, 70 mbar). Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (CHCl₃/MeOH, 7:1) gereinigt und man erhielt **3** (24 mg, 72%) als farbloses Öl.

$R_f = 0.35$ (CHCl₃/MeOH, 3:1); $[\alpha]_{D^{35}} = +118^\circ$ ($c = 0.66$, CHCl₃) [Lit.: $+123^\circ$ ($c = 0.46$, CHCl₃)]; IR (neat): 3412 (m), 2987 (s), 2917 (s), 1548 (m), 1480 (s), 1367 (m), 1206 (m), 1049 (m) cm⁻¹; ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): $\delta = 5.90$ (d, $J = 6$ Hz, 1H, C₁H), 5.81 (d, $J = 6$ Hz, 1H, C₂H), 5.32 (d, $J = 5.7$ Hz, 1H, C₅H), 4.52 (d, $J = 5.7$ Hz, 1H, C₄H), 4.09 (s, 1H, C₃H), 2.52 (b, 2H, NH₂), 1.40 (s, 3H, CH₃), 1.34 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): $\delta = 136.6, 128.0, 111.0, 87.8, 85.0, 63.3, 27.8, 26.1$; HR-MS (EI⁺): ber. für [C₈H₁₃NO₂]⁺: 155.0946, gef.: 155.0941.

(3*S*,4*R*,5*S*)-3-(4-Toluoylamino)-4,5-isopropylidenedioxy-cyclopentene (58)

Zu einer Lösung des Amins **2** (6.2 mg, 40 μ mol) in CH_2Cl_2 (1 mL) wurde Toluoylchlorid (5.8 μ L, 44 μ mol) und NEt_3 (17 μ L, 12 μ mol) bei 0°C zugegeben. Die Reaktion wurde 16 h bei RT gerührt. Die Lösung wurde mit CH_2Cl_2 (5 mL) verdünnt, mit ges. wässrige NaHCO_3 -Lösung (5 mL) und ges. wässriger NaCl-Lösung (5 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* wurde der ölige Rückstand säulenchromatographisch (Isohexane/EE, 3:1 \rightarrow 2:1) gereinigt. **58** (6 mg, 60%) wurde als farbloses Öl erhalten. **58** wurde in Isopropanol (0.5 mL) gelöst und mit chiraler HPLC (OD-H Säule, Isopropanol/Hexan 90:10) analysiert.

$R_f = 0.40$ (Isohexan/Ethylacetat, 1:1); $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.65$ (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, ArH), 7.22 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H, ArH), 6.08 (d, $J = 5.5$ Hz, 1H, C_1H), 5.87 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H, C_2H), 5.30 (d, $J = 5.3$ Hz, 1H, C_5H), 5.05 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H, C_4H), 4.60 (d, $J = 5.5$ Hz, 1H, C_3H), 2.39 (s, 3H, ArCH_3), 1.45 (s, 3H, CH_3), 1.35 (s, 3H, CH_3); $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 207.2, 167.3, 142.4, 136.1, 132.5, 131.3, 129.5, 127.1, 111.9, 85.8, 62.0, 41.0, 31.2, 27.6, 25.9, 24.0$; HR-MS (ESI $^+$): ber. für $[\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{NO}_3]^+$: 274.1438, gef.: 274.1428.

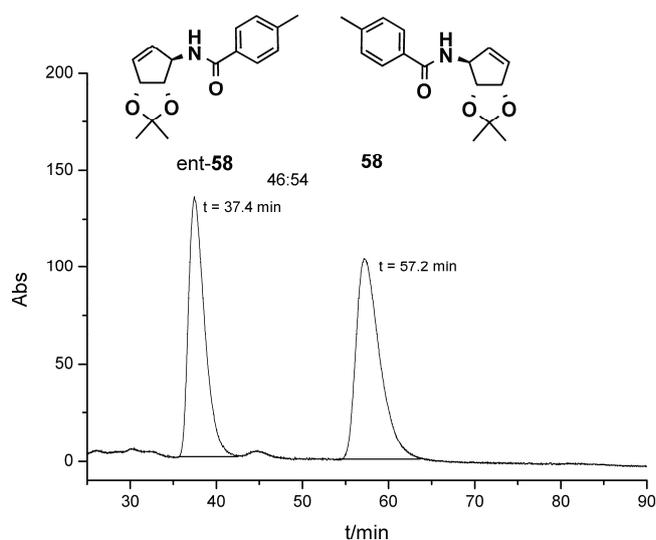


Abbildung 1: Ch. HPLC-Chromatogramm von rac-58 zeigt Trennung von ent-58 ($t_R = 37.4$ min) und 58 ($t_R = 57.6$ min) auf einer OD-H Säule (Isopropanol/Hexan 90:10, 0.5 mL/min).

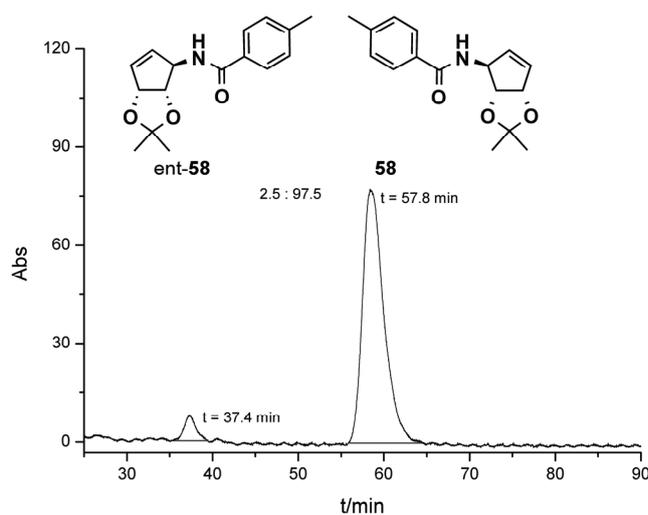


Abbildung 2: Ch. HPLC-Chromatogramm von 58: ent-58 ($t_R = 37.4$ min) und 58 ($t_R = 57.8$ min) auf OD-H Säule (Isopropanol/Hexane 90:10, 0.5 mL/min).

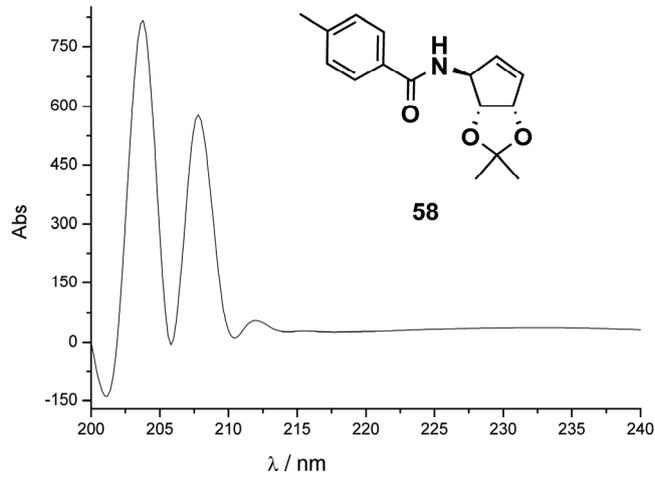


Abbildung 3: UV-Vis Spektrum von ent-**58** bei $t_R = 37$ min.

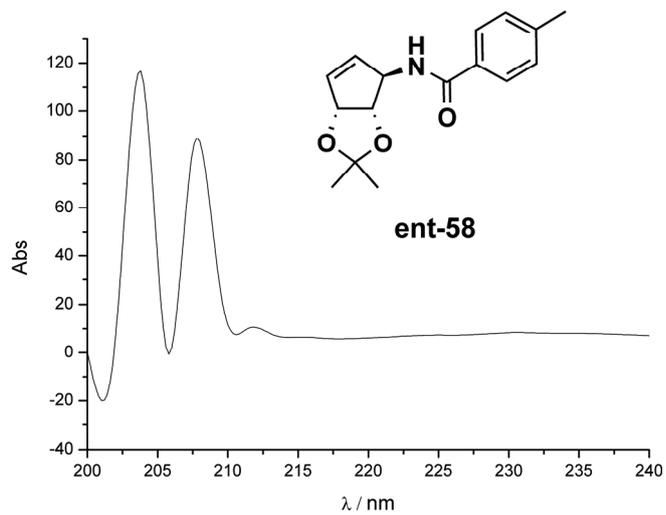
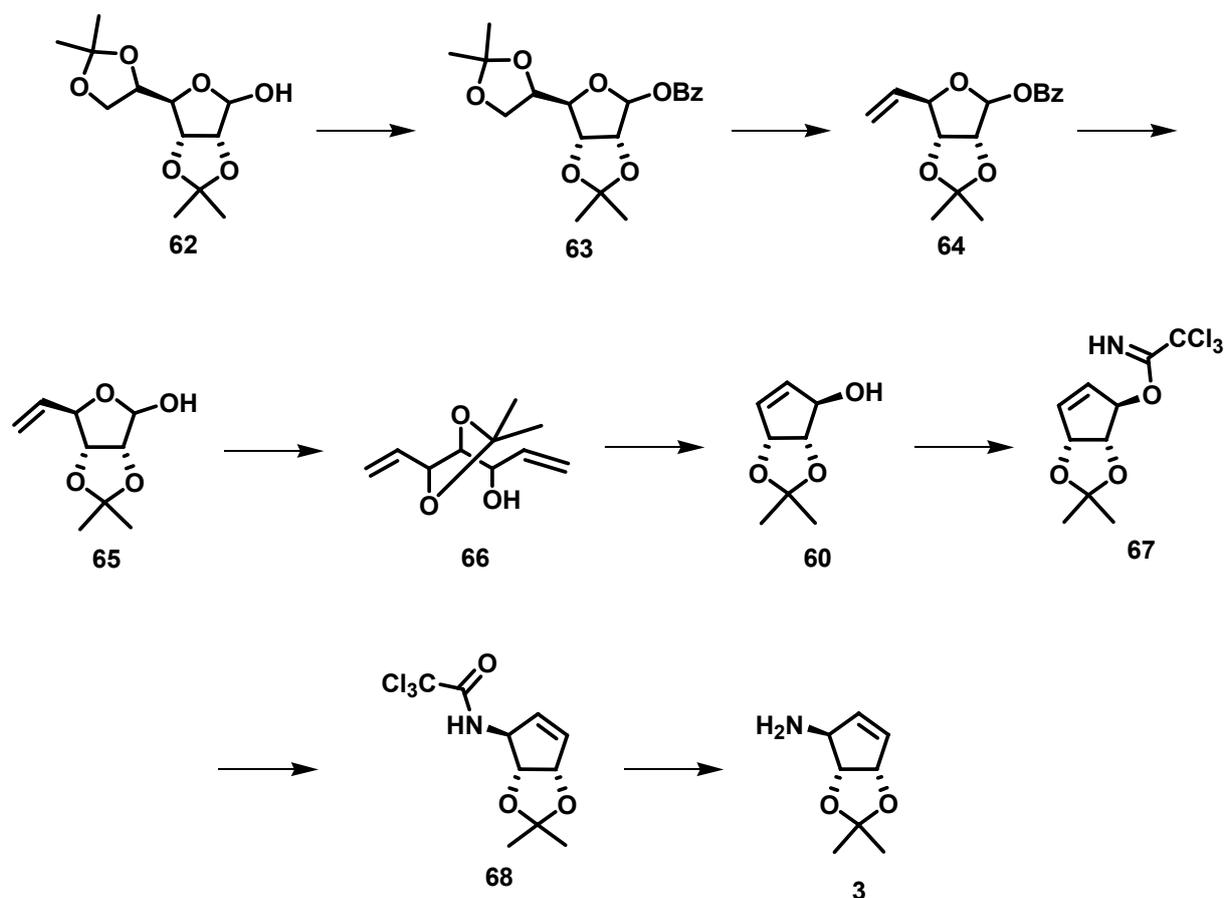
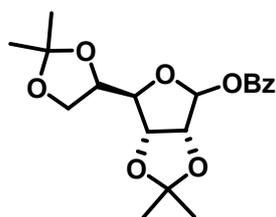


Abbildung 4: UV-Vis Spektrum von **58** bei $t_R = 57$ min.

5.2.2. Cyclopentenylamin Alternativsynthese



Benzoessäure 6-(2,2-dimethyl-[1,3]dioxolan-4-yl)-2,2-dimethyl-tetrahydro-furo[3,4-*d*][1,3]dioxol-4-yl ester (**63**)¹²³

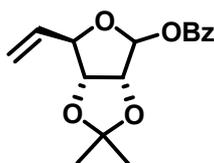


1-Hydroxy-2,3-5,6-diisopropylidene- α -D-lyxo-hex-5-enofuranose (10.4 g, 40 mmol) wurde in Pyridin (abs., 90 mL) vorgelegt und Benzylchlorid (6 mL, 52 mmol) zugegeben. Es wurde über Nacht gerührt. Die Lösung wurde *in vacuo* eingengt und das Produkt mit Ethylacetat (250 mL) und NaHCO₃ (150 mL) aufgenommen und

gewaschen. Die wässrige Fraktion wurde erneut mit Ethylacetat (250 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit ges. NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknen über MgSO_4 wurde das LM *in vacuo* entfernt und das Produkt in heißem *n*-Hexan umkristallisiert. Man erhielt den geschützten Zucker **63** (12.9 g, 89%).

$^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): δ = 1.3 (s, 6H, $2 \times \text{CH}_3$), 1.46 (s, 3H, CH_3), 1.53 (s, 3H, CH_3), 4.07 (m, 2H, $\text{HC6}'$), 4.11 (m, 1H, $\text{HC5}'$), 4.45 (m, 1H, $\text{HC4}'$), 4.89 (m, 2H, $\text{HC2}'$, $\text{HC3}'$), 6.37 (s, 1H, $\text{HC1}'$), 7.45 (m, 2H, HC_{arom}), 7.60 (m, 1H, HC_{arom}), 8.00 (m, 2H, HC_{arom}).

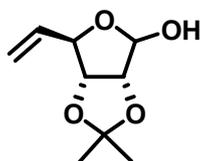
Benzoessäure 2,2-dimethyl-6-vinyl-tetrahydro-furo[3,4-d][1,3]dioxol-4-yl ester (**64**)¹²³



63 (8.19 g, 22.47 mmol) wurde in Essigsäure (konz., 50 mL) gelöst und auf 40°C erhitzt. Nach Zugabe von Wasser (20 mL) bildete sich ein weißer Niederschlag, der sich nach 30 min bei 40°C auflöste. Nach 22 h wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der Feststoff Toluol (2×15 mL) koevaporiert. Der weiße Feststoff wurde in $(\text{EtO})_3\text{CH}$ (100 mL) gelöst und auf 80°C erhitzt. Nach Zugabe von Essigsäure (konz., 0.43 mL) wurde 30 min gerührt, die Lösung geringfügig *in vacuo* eingeeengt und auf 170°C erhitzt. Es wurde Triphenyllessigsäure (0.03 g, 0.21 mmol) zugegeben und weitere 10 h bei 170°C unter Rückfluss gekocht. Das Öl wurde auf RT gekühlt und das Produkt säulenchromatographisch (Isohexan/Ethylacetat 7:3) gereinigt. Man erhielt **64** (3.9 g, 60%) als gelbes Öl.

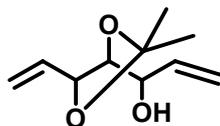
$R_f = 0.21$ (Isohexan/Ethylacetat, 4:1); $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.36$ (s, 3H, CH_3), 1.53 (s, 3H, CH_3) 7.65 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, ArH), 4.64 (m, 1H, $\text{HC4}'$), 4.86 (m, 2H, $\text{HC2}'$, $\text{HC3}'$), 5.40 (m, 2H, $\text{HC6}'$), 6.01 (m, 1H, $\text{HC5}'$), 6.42 (s, 1H, $\text{HC1}'$), 7.45 (m, 2H, HC_{arom}), 7.58 (m, 1H, HC_{arom}), 8.03 (m, 2H, HC_{arom}); $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 25.4, 26.5$ (2C), 81.6, 83.9, 85.8 (3C), 101.7, 113.7, 120.1, 128.8, 130.1, 131.9, 133.8 (2C), 165.4.

2,2-Dimethyl-6-vinyl-tetrahydro-furo[3,4-d][1,3]dioxol-4-ol (**65**)¹²³



Benzoessäureester **64** (1.5 g, 5.17 mmol) wurde in MeOH (7 mL, abs.) vorgelegt und KOtBu (7 mg, 0.06 mmol) zugegeben. Es wurde 20 h lang bei RT gerührt und die Reaktionslösung anschließend mit DOWEX-HCR2 auf pH=7 gebracht. Der Kationenaustauscher wurde abfiltriert und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Man erhielt ein farbloses Öl als Rohprodukt (1.4 g), welches säulenchromatographisch (Isohexan/EE, 7:1) aufgereinigt wurde. **65** (1.00 g, ca. 100%) wurde als farbloses Öl hergestellt.

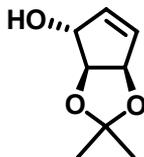
$R_f = 0.44$ (Isohexan/Ethylacetat, 1:1); $^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.29$ (s, 3H, CH_3), 1.45 (s, 3H, CH_3), 3.75 (br s, 1H, OH), 4.62 (m, 2H), 4.69 (m, 1H,) (H-2, H-3, H-4), 5.29 – 5.43 (m, 2H, H-6), 5.97 (m, 1H, H-5); $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 25.2, 26.3$ (2 $\times\text{CH}_3$), 79.3, 81.9, 86.0 (C-2, C-3, C-4), 101.4 (C-1), 113.0 (C_q), 119.6 (C-6), 132.1 (C-5).

(3R,4S,5R)-3,4-isopropylidenehepta-1,6-diene-3,4,5-triol (66)¹²³

Methyltriphenylphosphoniumbromid (4.03 g, 11.3 mmol) wurde in THF (abs., 50 mL) gelöst und auf -20°C gekühlt, wobei *n*-BuLi (1.6 M in Hexan, 7.0 mL) langsam zutropft wurde. Die Lösung wurde auf RT erwärmt, 30 min gerührt und wiederum auf -20°C abgekühlt. **65** (0.96 g, 5.16 mmol) wurde in THF (abs., 2 × 2 mL) über die Glaswand langsam zugegeben und bei RT über Nacht gerührt.

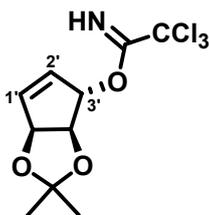
Es wurde ges. wässrige NH₄Cl-Lösung (10 mL) zugegeben, auf ca. 10 mL eingengt und mit Diethylether (ca. 100 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde mit ges. wässriger Ammoniumchloridlösung und Wasser gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Flashchromatographie (Isohexan/EE, 6:1) ergab **66** als weißen Feststoff (430 mg, 45%).

R_f = 0.60 (Isohexan/Ethylacetat 1:1); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 1.40 (s, 3H, CH₃), 1.54 (s, 3H, CH₃), 2.30 (br s, 1H, OH), 4.08 (m, 2H), 4.61 (m, 1H,) (H-3, H-4, H-5), 5.21 – 5.42 (m, 4H, H-1, H-7), 5.86 (m, 1H, H-2), 6.02 (m, 1H, H-6); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 24.8, 27.2 (2×CH₃), 70.4, 78.8, 80.6 (C-3, C-4, C-5), 108.6 (C_q), 116.8, 119.2(C-1, C-7), 133.7. 136.5 (C-2, C-6);

(3R,4S,5R)-3,4-O-isopropylidencyclopentene-3,4,5-triol (60)¹²³

(3R,4S,5R)-3,4-Isopropylidenehepta-1,6-diene-3,4,5-triol **66** (430 mg, 2.33 mmol) wurde in CH₂Cl₂ (abs., 7 mL) vorgelegt und zu der farblosen Lösung Grubbs-Katalysator II (52 mg, 2.2 mol%) hinzugefügt. Die braune Suspension wurde 4 h lang bei RT gerührt, wobei eine immer dunklere Suspension entstand. Die Aufreinigung mittels Flashchromatographie (Isohexan/EE, 6:4) ergab **60** als braunes Öl (330 mg, 91%).

R_f = 0.40 (Isohexan/Ethylacetat, 6:4); ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 1.35 (s, 3H, CH₃), 1.40 (s, 3H, CH₃), 1.77 (br s, 1H, OH), 4.52(d, J=5.6 Hz, 1H, H-3), 4.80 (s, 1H, H-5), 5.29 (d, 1H, J=5.5, H-4), 5.90 (m, 1H, H-2), 6.03 (d, J=5.4, 1H, H-1); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 25.3, 27.3 (2×CH₃), 81.1, 84.2, 85.9 (C-5, C-4, C-3), 111.7 (C_q), 134.6, 135.7 (C-1, C-2);

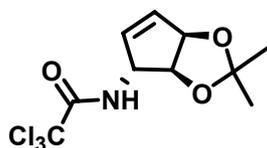
(3R,4S,5R)-3-O-Trichloroacetimidoyl-4,5-O-isopropyliden-cyclopenten-3,4,5-triol (67)

Einer Lösung von **60** (500 mg, 3.2 mmol) in CH₂Cl₂ (abs., 8 mL) wurden bei 0°C DBU (0.6 mL, 3.7 mmol) und Trichloroacetonitril (0.48 mL, 4.8 mmol)

tropfenweise zugegeben. Das dunkelbraune Reaktionsgemisch wurde 15 min bei RT gerührt und verfärbte sich tiefrot. Dem Reaktionsgemisch wurde ges. wässr. NH_4Cl -Lösung (5 mL) zugegeben. Die wässrige Phase wurde mit CH_2Cl_2 (3×7.5 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit H_2O gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Die säulenchromatographische Reinigung (Isohexan/EE, 10:1) lieferte **67** als weißen Feststoff (860 mg, 90%).

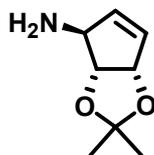
$R_f = 0.35$ (Isohexan/Ethylacetat, 10:1); $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.38$ (s, 3H, CH_3 isopr.), 1.45 (s, 3H, CH_3 isopr.), 4.69 (d, 1H, $J = 5.7$ Hz, C_5H), 5.32-5.34 (m, 1H, C_4H), 5.76 (s, 1H, C_3H), 6.00-6.05 (m, 1H, C_1H), 6.20-6.22 (m, 1H, C_2H).

(3S,4R,5S)-5-(N-Trichloracetyl-amino)-3,4-O-isopropylidene-cyclopenten-3,4-diol
(68)¹²³



67 (270 mg, 0.90 mmol) wurde in *o*-Xylol (5 mL) gelöst und 4 h lang bei 150°C unter Rückfluss gekocht. Aus der dunkelgelben Lösung wurde das Lösemittel *in vacuo* entfernt, das erhaltene Rohprodukt (250 mg) in MeOH gelöst und mit Kieselgel (ca. 2 g) aufgenommen. Die säulenchromatographische Reinigung (Isohexan/Ethylacetat, 7:1) ergab **68** (250 mg, 97%) als gelben Feststoff.

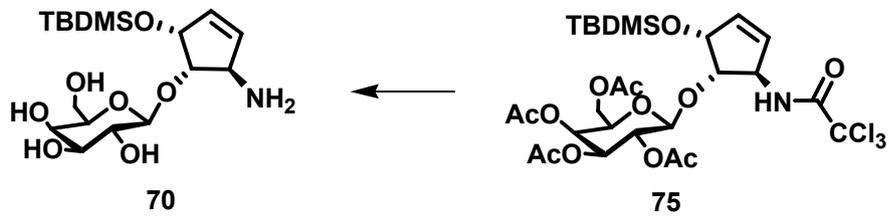
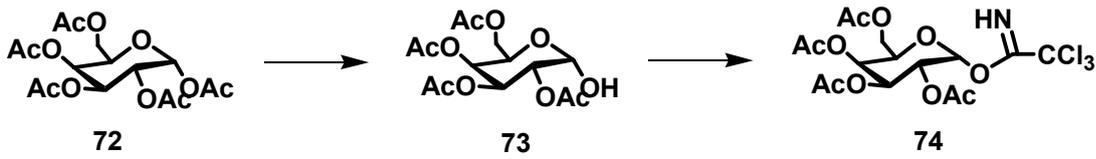
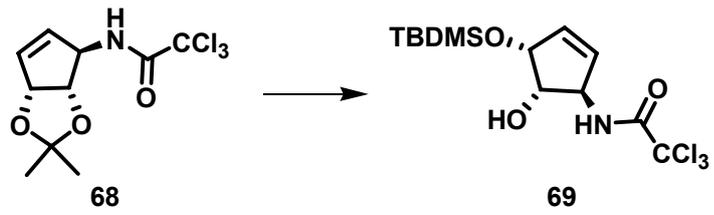
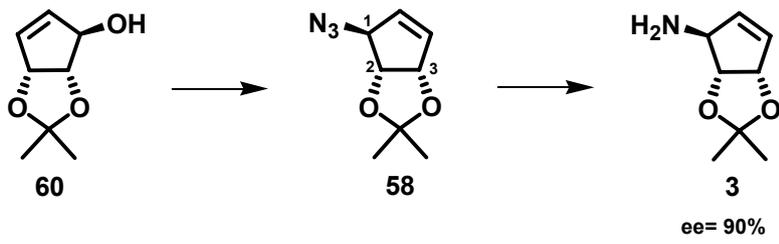
$R_f = 0.60$ (Isohexan/Ethylacetat, 7:1); $^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.36$ (s, 3H, CH_3), 1.44 (s, 3H, CH_3), 4.57 (d, 1H, H-3, $J = 5.8$ Hz), 4.84 (m, 1H, H-4), 5.31 (m, 1H, H-5), 5.85 (m, 1H), 6.15 (m, 1H) (H-1, H-2), 6.58 (br s, 1H, NH).

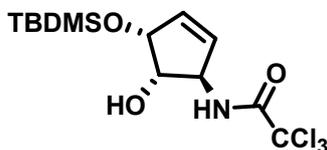
(3S,4R,5S)-3-Amino-4,5-isopropylidenedioxy-cyclopentene (3)

68 (525 mg, 1.76 mmol) wurde in Methanol (30 mL) gelöst und 12 mL wässrige NaOH-Lösung (12 mL) zugegeben. Die Lösung färbte sich nach einer Minute gelblich und wurde 12 h bei RT gerührt. Es wurde ges. wässrige NaHCO₃-Lösung (50 mL) zugeben und mit CH₂Cl₂ (3 x 60 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit NaHCO₃-Lösung (50 mL) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und der Feststoff säulenchromatographisch (Ethylacetat/MeOH/NH₄OH, 100:1:0.3) gereinigt. Man erhielt **3** (200 mg, 74%) als weißen Feststoff.

R_f = 0.35 (CHCl₃/MeOH, 3:1); [α]_D³⁵ = -118° (c = 0.66, CHCl₃) [Lit.: +123° (c = 0.46, CHCl₃)]; IR (neat): 3412 (m), 2987 (s), 2917 (s), 1548 (m), 1480 (s), 1367 (m), 1206 (m), 1049 (m) cm⁻¹; ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ = 5.90 (d, J = 6 Hz, 1H, C₁H), 5.81 (d, J = 6 Hz, 1H, C₂H), 5.32 (d, J = 5.7 Hz, 1H, C₅H), 4.52 (d, J = 5.7 Hz, 1H, C₄H), 4.09 (s, 1H, C₃H), 2.52 (b, 2H, NH₂), 1.40 (s, 3H, CH₃), 1.34 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 136.6, 128.0, 111.0, 87.8, 85.0, 63.3, 27.8, 26.1; HR-MS (EI⁺): ber. für [C₈H₁₃NO₂]⁺: 155.0946, gef.: 155.0941.

EXPERIMENTELLER TEIL

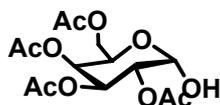


N-[4-(*tert*-Butyl-dimethyl-silanyloxy)-5-hydroxy-cyclopent-2-enyl]-2,2,2-trichloroacetamid (69)

Eine Lösung von **68** (500 mg, 1.67 mmol) in 70%igem Eisessig (7 mL) wurde 13 h lang bei 35°C gerührt. Durch DC-Kontrolle (Isohexan/EE, 4:1) konnte das als weißer Feststoff resultierende Zwischenprodukt (2,2,2-Trichlor-N-(4,5-dihydroxy-cyclopent-2-enyl)-acetamid) nachgewiesen werden. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Unter Stickstoffatmosphäre wurde das Rohprodukt (450 mg, 1.62 mmol) in Pyridin (7 mL) gelöst und mit TBDMSCl (0.30 g, 2.00 mmol) versetzt. Die Mischung wurde über Nacht bei 35°C gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Nach Zugabe von ges. wässrige Ammoniumcarbonat-Lösung (20 mL) wurde die wässrige Phase mit CH₂Cl₂ (3 × 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. NaCl-Lösung (20 mL) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Die säulenchromatographische Reinigung (Isohexan/EE, 4:1) lieferte **69** als gelbes Öl (480 mg, 53%).

R_f = 0.40 (Isohexan/Ethylacetat, 4:1); ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 0.14 (d, 6H, J = 3.6 Hz, CH₃), 0.92 (s, 9H, CH₃), 3.15 (d, 1H, J = 7.9 Hz, H-O), 3.98-4.04 (m, 1H, C₅H), 4.73-4.75 (m, 1H, C₄H), 4.75-4.78 (m, 1H, C₃H), 5.91-6.01 (m, 2H, C₁H, C₂H), 6.72 (s, 1H, H-N); ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 4.1, 4.6, 26.0 (C(CH₃)₃), 63.6, 74.7, 76.6, 76.8, 77.2, 133.5, 135.2; HR-MS (ESI⁺): ber. für [C₁₃H₂₂Cl₃NO₃Si+Na]: 396.0333, gef.: 396.0328.

Essigsäure-4,5-diacetoxy-2-acetoxymethyl-6-hydroxy-tetrahydro-pyran-3-yl ester (73)



Methode 1:

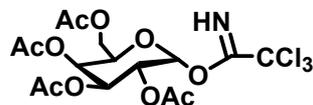
Zu einer Lösung von Pentaacetyl- β -D-galaktose (5.00 g, 13.0 mmol) in DMF (50 mL) wurde $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (wässrige, 24%ig, 0.77 g, 15.4 mmol) zugegeben. Die gelbliche Lösung wurde 45 min bei 50°C gerührt. Mit Hilfe einer DC-Kontrolle (Isohexan/EE, 1:1) konnte kein Umsatz festgestellt werden. Weiteres $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (2.30 g, 71.8 mmol) wurde zugegeben und die Mischung $\frac{1}{2}$ h bei 50°C gerührt. Die wässrige Phase wurde mit EE (3 \times 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. wässriger NaCl-Lösung (50 mL) gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Es verblieb **73** als farbloses Öl (4.5 g, 99%).

Methode 2 :

Zu einer Lösung von Pentaacetyl- β -D-galaktose (5.00 g, 13.0 mmol) in DMF (50 mL) wurde trockenes $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{OAc}$ (1.38 g, 15.4 mmol) zugegeben. Die gelbliche Lösung wurde 45 min bei 50°C gerührt. Die wässrige Phase wurde mit Ethylacetat (3 \times 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. NaCl-Lösung (50 mL) gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Es verblieb **73** (4.0 g, 88%) als farbloses Öl.

$R_f = 0.35$ (Isohexan/Ethylacetat, 1:1); $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.96, 2.01, 2.06, 2.11$ (s, 12H, 4 OAc), 2.70-3.00 (m, 1H), 3.90-4.00 (m, 0.4H, $\text{C}_{5\alpha}\text{H}$), 4.10-4.17 (m, 3H, $\text{C}_{5\alpha}\text{H}$), 4.51 (m, 1H, C_4H), 4.75 (s, 0.4H, C_1H), 5.09-5.19 (m, 2H), 5.40-5.51 (m, 3H); $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 20.8, 20.9, 31.8, 36.8, 62.0, 66.1, 67.6, 71.1, 86.5, 90.8, 163.0$ (4 Cq).

Essigsäure-4,5-diacetoxy-6-acetoxymethyl-2-(3,3,3-trichlor-2-imino-propyl)-tetrahydro-pyran-3-yl ester (74)^{133, 134}



Methode 1:

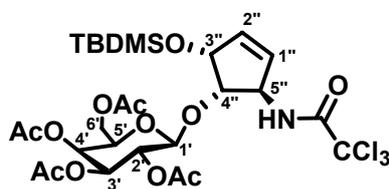
Eine Lösung von **73** (2.00 g, 5.77 mmol) in CH₂Cl₂ (abs., 21 mL) wurde unter Stickstoffatmosphäre mit Trichloracetonitril (5.70 mL, 57.6 mmol) und Cs₂CO₃ (2.06 g, 6.3 mmol) bei RT versetzt. Die farblose Mischung verfärbte sich orange und wurde 1 h lang gerührt. Durch DC-Kontrollen (Isohexan/Ethylacetat, 1:1) wurde der Reaktionsverlauf verfolgt. Das Reaktionsgemisch wurde über Kieselgur abfiltriert. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Die säulenchromatographische Reinigung (Isohexan/EE, 3:1) lieferte **74** (1.23 g, 43%) als gelblichen Feststoff.

Methode 2:

Einer Lösung von **73** (1.00 g, 2.87 mmol) in CH₂Cl₂ (abs., 8 mL) wurde unter Stickstoffatmosphäre Trichloracetonitril (1.40 mL, 17.0 mmol) und DBU (20 µL, 0.14 mmol) bei 0°C tropfenweise zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht gerührt. Die gelbe Mischung wurde im Verlauf der Reaktion schwarz. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Die säulenchromatographische Reinigung (Isohexan/EE, 3:1) lieferte **74** (0.27 g, 22%) als gelblichen Feststoff.

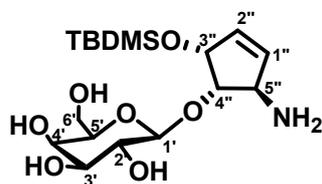
R_f = 0.45 (Isohexan/Ethylacetat, 1:1), ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 2.02, 2.03, 2.04, 2.17, (4s, 12H, 4 CH₃), 4.02-4.13 (m, 2H, C₆H), 4.42 (t, 1H, J = 6.4, C₅H), 5.38 (d, 1H, J = 3.0 Hz, C₂H), 5.40 (d, 1H, J = 2.5 Hz, C₃H), 5.56 (s, 1H, C₄H), 6.59 (d, 1H, J = 3.1 Hz, C₁H), 8.66 (s, 1H, H-N); ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 20.8, 20.8, 20.9, 21.8, 61.9, 65.8, 67.6, 68.4, 68.7, 90.6, 92.3, 162.8, 170.2, 170.3, 170.4, 170.6.

Essigsäure-4,5-diacetoxy-2-acetoxymethyl-6-[2-(*tert*-butyl-dimethyl-silanyloxy)-5-(2,2,2-trichloro-acetyl-amino)-cyclopent-3-enyloxy]-tetrahydro-pyran-3-yl ester (75)



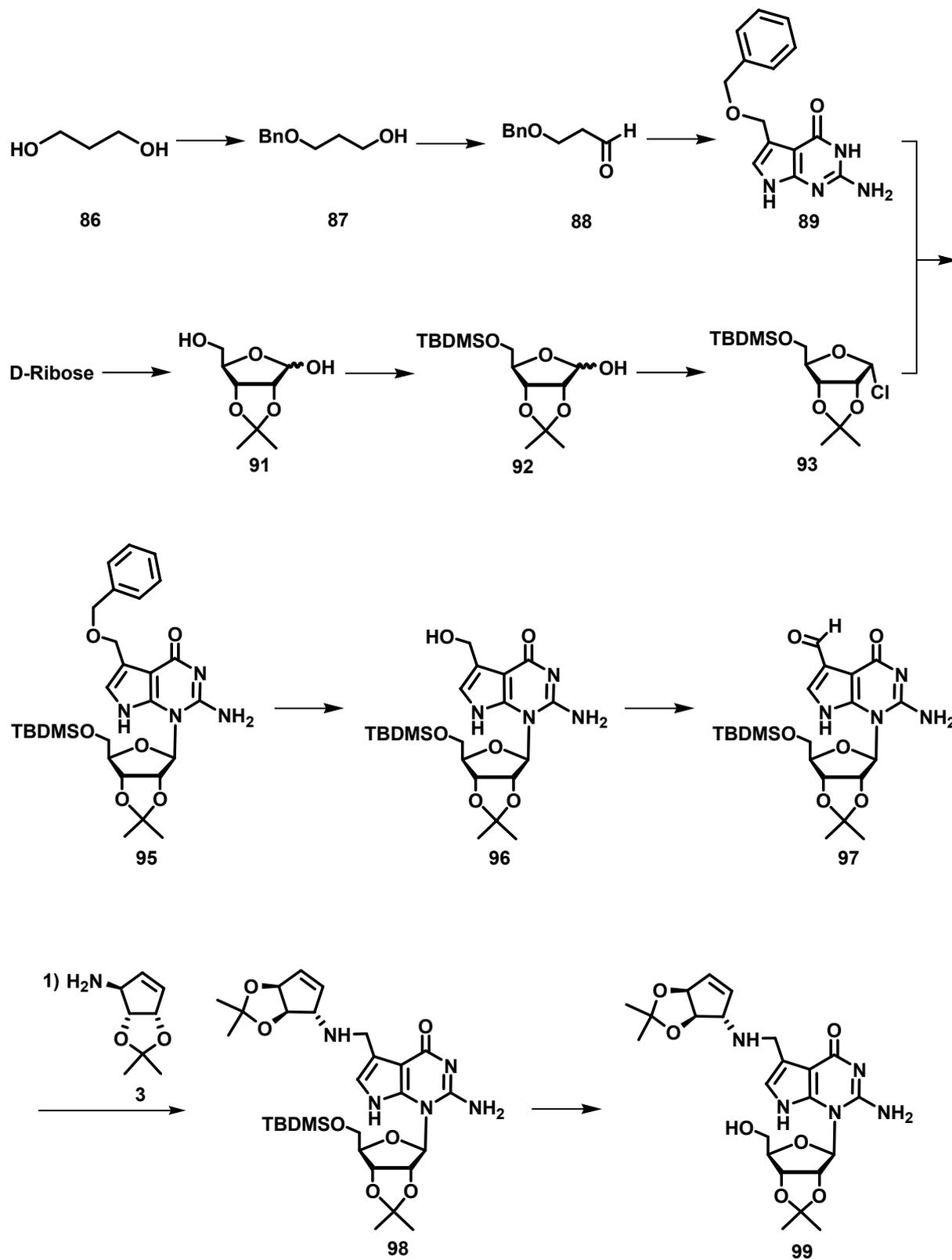
Eine Lösung von **69** (300 mg, 0.73 mmol) und **73** (710 mg, 1.45 mmol) in CH_2Cl_2 (abs., 5 mL) wurde mit trockenem Molsieb 2 h lang bei RT gerührt. Anschließend wurde langsam eine Lösung von TMSOTf (22 μL , 0.16 mmol) in CH_2Cl_2 (abs., 1 mL) zu der Reaktionsmischung bei 0°C zugetropft. Nach Zugabe von NaHCO_3 (0.5 mL) wurde das Molsieb mit Celite abgetrennt. Die Reaktionslösung wurde in CH_2Cl_2 (20 mL) aufgenommen und die organische Phase wurde mit ges. wässr. NaCl-Lösung (20 mL) nachgewaschen, über MgSO_4 getrocknet und abfiltriert. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Die säulenchromatographische Reinigung (Isohexan/EE, 5:1 \rightarrow 3:1) lieferte **75** als gelblichen Feststoff (330 mg, 70%).

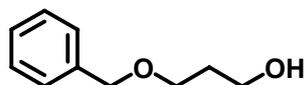
$R_f = 0.45$ (Isohexan/Ethylacetat, 1:1), $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): $\delta = 0.18\text{-}0.55$ (m, 6H, $\text{Si}-(\text{CH}_3)_2$), $0.82\text{-}0.94$ (m, 9H, $\text{Si}-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), $1.95\text{-}2.15$ (m, 12H, 4 OAc), 3.88 (t, 1H, $J = 6.6$ Hz, C_5H), 3.96 (t, 1H, $J = 5.4$ Hz, C_4H), 4.09-4.17 (m, 2H, C_6H), 4.66 (dd, 1H, $J = 4.9$, 2.0 Hz, C_3H), 4.73 (d, 1H, $J = 7.6$ Hz, C_4H), 4.95 (m, 1H, C_5H), 4.97 (dd, 1H, $J = 10.3$, 3.3 Hz, C_2H), 5.17-5.22 (m, 1H, C_3H), 5.36 (d, 1H, $J = 3.4$ Hz, C_1H), 5.80 (dd, 1H, $J = 6.1$, 1.7 Hz, C_1H), 6.02-6.03 (m, 1H, C_2H), 6.56 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz, H-N); $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): $\delta = -4.4$, 14.4, 18.5, 20.8, 20.8, 20.9, 20.9, 21.0, 21.3, 22.8, 26.0, 60.4, 60.6, 61.5, 67.2, 68.9, 70.8, 71.3, 74.4, 83.4, 101.2, 131.9 (Cp), 136.6 (Cp), 169.6, 170.4, 170.6, 171.4 (4 OAc).

2-[2-Amino-5-(*tert*-butyl-dimethyl-silanyloxy)-cyclopent-3-enyloxy]-6-hydroxymethyl-tetrahydro-pyran-3,4,5-triol (76)

Das Kupplungsprodukt **75** (10 mg, 0.01 mmol) wurde in MeOH (abs., 4 mL) vorgelegt. Anschließend wurde NaOH (2N, 3 mL) hinzugefügt und 8 h lang bei RT gerührt. Nach Neutralisation mit HCl (2N, 1.5 mL) wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Die säulenchromatographische Reinigung (CH₃CN/H₂O, 7:3) lieferte vermutlich noch Kieselgel enthaltendes **76** (85 mg). Dieses Rohprodukt wurde in MeOH (abs., 5 mL) aufgenommen und unlösliche Bestandteile abfiltriert. **76** wurde als farbloser Feststoff (40 mg, 73%) erhalten.

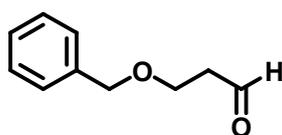
R_f = 0.35 (Chloroform/MeOH, 3:1); ¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD): δ = 0.09-0.11 (m, 6H, Si-(CH₃)₂), 0.87-0.86 (m, 9H, Si-C(CH₃)₃), 3.47-3.49 (d, 1H, J = 2.9 Hz, C₃H), 3.52-3.54 (d, 1H, J = 2.6 Hz, C₄H), 3.67-3.69 (m, 1H, C₅H), 3.73 (m, 1H, C₂H), 3.75 (s, 2H, J = 3.6 Hz, C₆H), 3.83 (d, 1H, J = 2.4 Hz, NH₂), 4.04 (t, 1H, J = 5.9 Hz, C₄'H), 4.19-4.28 (m, 1H, C₅'H), 4.48 (s, 1H, C₁'H), 4.76-4.78 (m, 1H, C₃'H), 5.93 (m, 1H, C₁''H), 6.10-6.12 (m, 1H, C₂''H); ¹³C-NMR (75 MHz, CD₃OD): δ = 18.0, 22.6, 25.2, 25.3, 29.5, 58.7, 61.3, 69.0, 70.5, 73.8, 74.7, 75.8, 77.7, 78.1, 78.4, 82.3, 103.6; HR-MS (ESI⁺): ber. für [C₁₇H₃₄NO₇Si]⁺: 392.2099, gef.: 392.2091.

5.2.3. Synthese von N₁-Queuosin

3-Benzyloxy-propan-1-ol (87)^{150, 151}

Natrium (25.0 g, 1.09 mol) wurde in kleinen Portionen zu einer 120°C heißen, kräftig rührenden Lösung aus 1,3-Propandiol (250 g, 329 mol) und trockenem Xylol (2 h über Molsieb gerührt, 130 mL) gegeben. Nach Lösen des Natriums wurde Benzylchlorid (150 g, 1.06 mol) innerhalb von 1 h zugegeben. Die Temperatur durfte nicht über 130°C steigen. Die Reaktionsmischung wurde 1 h erhitzt und nach Abkühlen auf RT filtriert und mit Toluol (120 mL) gewaschen. Das Filtrat wurde destillativ gereinigt (4 mbar, ca. 120°C). Man erhielt **87** (114 g, 65%) als farbloses Öl.

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ = 1.80 (tt, 2H, ³J = 5.8 Hz, ³J = 5.76 Hz, CH₂), 2.61 (s, 1H, , OH), 3.59 (t, 2H, CH₂-C_{ar}), 3.70 (t, 2H, H₂C_r), 4.46 (s, 2H, CH₂), 7.24-7.28 (m, 5H, Ph).

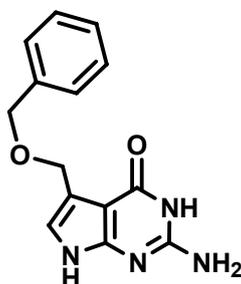
3-Benzyloxy-1-propionaldehyd (88)¹⁵⁰

DMSO (abs., 8.4 mL) wurde in eine gekühlte (-78°C) Lösung von Oxalyldichlorid (5.6 mL, 64 mmol) in CH₂Cl₂ (500 mL) gegeben. Die Lösung wurde 10 min gerührt und es wurde 3-Benzyl-1-propylalkohol **87** (8.5 mL, 54 mmol) gelöst in CH₂Cl₂ (25 mL) innerhalb von 5 min zugetropft. Nach 15 min wurde Triethylamin (38 mL) zugefügt und die Lösung 5 min gerührt. Das Acetonbad wurde entfernt und die Lösung wurde 30 min bei RT gerührt. Die hellgelbfarbene Lösung wurde mit ges. wässriger Ammoniumchlorid-Lösung (50 mL) und die wässrige Phase mit CH₂Cl₂

(2 × 100 mL) gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung (2 × 50 mL), ges. wässriger Natriumchlorid-Lösung (50 mL) extrahiert, über NaSO₄ getrocknet und das LM *in vacuo* entfernt. Das Öl wird säulenchromatographisch gereinigt. Man erhielt Aldehyd **88** (6.8 g, 77%) als farbloses Öl.

R_f = 0.25 (Pentan/Ethylacetat, 4:1); ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ = 2.74 (dt, 2H, ³J = 6.0 Hz, ³J = 2.0 Hz, CH₂CHO), 3.85 (t, 2H, ³J = 6.0 Hz, OCH₂CH₂), 4.67 (s, 2H, CH₂-C_{ar}), 7.36 (m, 5H, H-C_{ar}), 9.83 (s, 1H, CHO); ¹³C NMR (50 MHz, (CD₃)₂SO): δ = 44.29 (C-CH₂-C), 64.24 (OCH₂), 73.68 (OCH₂), 128.12 (C_{ar}), 128.20 (C_{ar}), 128.87 (C_{ar}), 201.57 (CHO); MS (ESI⁺): 187 (100, MNa⁺).

2-Amino-3,4-dihydro-4-oxo-7H-pyrrolo[2,3-d]pyridin-5-benzylmethan (**89**)¹⁰⁶

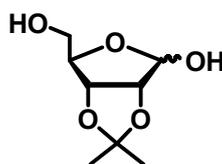


Eine Lösung des Aldehyds **88** (5 g, 24.6 mmol) in Acetonitril (40 mL) wurde auf 0°C gekühlt. Dimethylsulfoxid (1.84 mL, 25.9 mmol) wurde zügig tropfenweise zugegeben und Bromtrimethylsilan (3.35 mL, 35.9 mmol) wurde innerhalb von genau 5 min zugetropft. Die gelbfarbene später rotfarbene Lösung wurde 4 h bei RT gerührt und eine feine Suspension von 2,4-Diamino-6-hydroxypyrimidin (3.1 g, 24.6 mmol) und Natriumacetat trihydrat (3.5 g, 25.1 mmol) in Wasser (40 mL) langsam zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde über Nacht gerührt. Die hellrosafarbene Suspension wurde abfiltriert und in der Glasfritte mit wenig H₂O und Aceton gewaschen und zur Trockene evakuiert. Der Rückstand wurde mit viel

Methanol gelöst bzw. nachgespült. Das Lösemittel wird *in vacuo* entfernt und man erhielt **89** (6.5 g, 85%) als hellgelbfarbenen Feststoff.

$R_f = 0.3$ (Ethylacetat/MeOH, 10:1); IR (Nujol): 2921 (s), 2724 (w), 1456 (s), 1377 (s), 722 (m) cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): $\delta = 4.52$ (s, 2 H, $\text{CH}_2\text{-O}$), 4.58 (s, 2 H, $\text{CH}_2\text{-O}$), 6.04 (s, 2 H, NH_2), 6.62 (s, 1 H, HC), 7.26-7.35 (m, 5 H, H-C_{ar}), 10.23 (s, 1 H, H-N), 10.91 (s, 1 H, H-N); $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, $[\text{D}_6]\text{-DMSO}$): $\delta = 64.7$ ($-\text{CH}_2\text{O}$), 71.2 ($\text{OCH}_2\text{-C}_{\text{Ph}}$), 98.8 (C_{py}), 115.4 (C_{py}), 115.9 (C_{py}), 126.7 (C_{Ph}), 126.9 (C_{Ph}), 127.5 (C_{Ph}), 127.8 (C_{Ph}), 127.9 (C_{Ph}), 139.4 ($\text{C}_{\text{Ph,q}}$), 151.7 (C_{py}), 152.7 (C_{py}), 159.4 (C_{py}); MS (ESI⁺): 121 (19), 163 (100), 185 (50), 195 (10, $\text{MH}^+\text{-Bn}$), 293 (80, MNa^+); HR-MS (ESI⁺): ber. für $[\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2]^+$: 270.1117, gef.: 270.1114.

6-Hydroxymethyl-2,2-dimethyl-tetrahydro-furo[3,4-*d*][1,3]dioxol-4-ol (**91**)¹⁵²

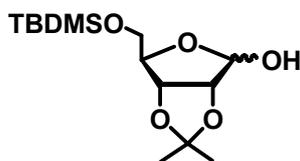


D-Ribose (5.0 g, 33.4 mmol) wurde in Aceton (150 mL) suspendiert. Bei 0°C wurde H_2SO_4 (2 mL, 27.5 mmol) zugegeben und 2 h gerührt, wobei die Ribose in Lösung ging. Die Lösung wurde anschließend mit KOH (4.5 g, 80.2 mmol) in MeOH (50 mL) bei 0°C abgefangen. Zur Suspension wurde noch K_2CO_3 (2.5 g, 18.1 mmol) gegeben und das Reaktionsgemisch 30 min schwach gerührt. Nach Abfiltrieren des Niederschlags (Glasfritte, Celite mit dünner Aktivkohleschicht) wurde das Filtrat eingengt und man erhielt ein leicht gelbliches Öl, das mit FC (CH_2Cl_2 : MeOH 15:1) gereinigt wurde. Es wurde **91** (5.36 g, 85%) als farbloses Öl erhalten.

$R_f = 0.29$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 20:1); $^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.29$, 1.45 (s, 6H, H_3C), 3.67-3.70 (m, 2H, H_2C_5), 4.37 (t, $^3J = 2.75$ Hz, 1H, HC_4), 4.56 (d, $^3J = 6.0$ Hz, 1H, HC_3),

4.78 (d, $^2J = 6.0$ Hz, 1H, HC_2), 5.38 (s, 1H, HC_1); ^{13}C NMR (50 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 25.1$ (H_3C-), 26.7 (H_3C-), 64.0 (C_5), 82.0 (C), 87.2 (C), 88.1 (C), 103.2 (C_1), 112.5 (C_4); MS (ESI⁺): 173 (20, $MNa^+ - iPr$), 213 (100, MNa^+); HR-MS (ESI⁺): ber. für $[C_8H_{14}O_5]^+$: 190.0841, gef.: 190.0834.

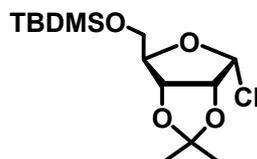
6-(tert-Butyl-dimethyl-silanyloxymethyl)-2,2-dimethyl-tetrahydro-furo[3,4-*d*][1,3]dioxol-4-ol (92)¹⁵³



Zu einer Lösung des Zuckers **91** (3.37 g, 17.7 mmol) und Imidazol (3.6 g, 53.1 mmol) in DMF (abs., 6 mL) wurde *t*-BuMe₂SiCl (2.81 g, 18.6 mmol) gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 16 h bei RT gerührt und anschließend H₂O (10 mL) zugegeben. Das Produkt wurde mit Ethylacetat (3 × 25 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit H₂O (2 × 12 mL) gewaschen, über MgSO₄ und das LM wurde *in vacuo* entfernt. Reinigung durch FC ($CHCl_3/MeOH$ 100:1) ergab **92** (4.3 g, 80%) als farbloses Öl.

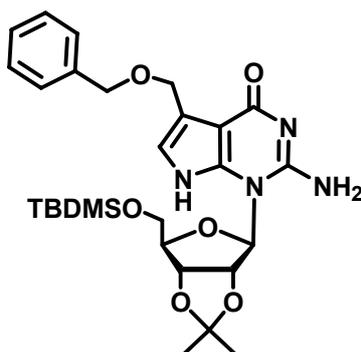
$R_f = 0.6$ ($CHCl_3/MeOH$ 10:1); 1H NMR (200 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 0.06$ (s, 6H, $(CH_3)_2Si$), 0.88 (s, 9H, $SiC(CH_3)_3$), 1.25, 1.45 (s, 6H, H_3C), 3.59 (d, 2H, H_2C_5), 3.95 (t, $^3J = 2.75$ Hz, 1H, HC_4), 4.46 (d, $^3J = 6.0$ Hz, 1H, HC_2), 4.63 (d, $^3J = 6.0$ Hz, 1H, HC_3), 5.19 (s, 1H, HC_1), 6.44 (d, 1H, -OH); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): $\delta = -5.1, 25.1, 26.2, 26.7, 64.7, 82.2, 86.0, 86.4, 102.2$; MS (ESI⁺): 327 (100, MNa^+); HR-MS (ESI⁺): ber. für $[C_{14}H_{28}O_5Si]^+$: 304.1706, gef.: 304.1715.

***tert*-Butyl-(6-chloro-2,2-dimethyl-tetrahydro-furo[3,4-*d*][1,3]dioxol-4-ylmethoxy)-dimethyl-silan (93)¹⁵³**



Hydroxyzucker **92** (590 mg, 1.94 mmol) wurde in THF (abs., 10 mL) gelöst und CCl₄ (300 µL, 3.1 mmol) zugegeben. Nach Abkühlen auf -78°C wurde HMPA (420 µL, 2.3 mmol) innerhalb von 10 min langsam zugetropft. Nach Rühren über 2 h bei -78°C wobei nach ca. 90 min die Lösung gelartig fest wird, wird die Lösung über 30 min auf RT kommen gelassen, die hellgelbe Lösung färbt sich hellgrün. Der Chlorzucker **93** wird ohne Aufarbeitung in die folgende Reaktion eingesetzt.

2-Amino-5-benzyloxymethyl-1-[6-(*tert*-butyl-dimethyl-silyloxy)methyl]-2,2-dimethyl-tetrahydro-furo[3,4-*d*][1,3]dioxol-4-yl]-1,7-dihydro-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-on (95)¹⁵⁴

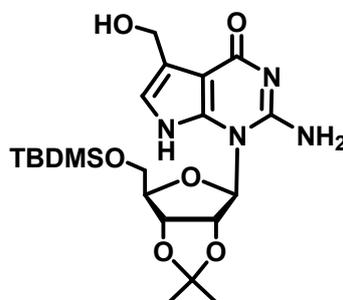


Acetylamino-3,4-dihydro-4-oxo-7H-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-5-benzyloxymethan **89** (590 mg, 1.94 mmol) wurde in Acetonitril (10 mL) suspendiert und BSA (910 mg, 3.7 mmol) zugegeben. Die entstehende gelbfarbene Lösung wurde bei 65°C 90 min erhitzt. In einem weiteren Reaktionsgefäß wurde KOH (310.8 mg, 5.55 mmol) in Acetonitril (5 mL) suspendiert und nach 10 min TDA-1 (16 µL, 0.05 mmol)

zugegeben. Nach weiteren 10 min wurde die Lösung des Pyrrolopyrimidins hinzugegeben und 20 min gerührt. Es entsteht eine hellgelbe Suspension. Anschließend wurde die Lösung des Chlorzuckers **93** innerhalb von 5 min langsam zugegeben. Die nun dunkelgelbe Suspension wurde 20 h über Nacht gerührt. Zur braunen Suspension wurde H₂O gegeben und 1 h bei RT gerührt. Es wurde mit CH₂Cl₂ (100 mL) zugegeben, die organische Phase mit ges. wässriger Natriumhydrogencarbonatlösung (60 mL) gewaschen, mit CH₂Cl₂ (3 × 100 mL) gegengewaschen und die vereinigten organischen Phasen mit CH₂Cl₂ NaHCO₃-Lösung (100 mL) extrahiert und über MgSO₄ getrocknet. Nach säulenchromatographischer Reinigung (CH₂Cl₂/MeOH, 50:1) erhält man **95** (130 mg, 13%) als gelben öligen Feststoff.

R_f = 0.15 (Ethylacetat/Pentan, 3:1); ¹H NMR (300 MHz, [D₆]-DMSO): δ = 2.84 (s, 3 H, CH₃-CO-), 4.59 (s, 2 H, CH₂-O), 4.67 (s, 2 H, CH₂-O), 7.35-7.38 (m, 5 H, H-C_{ar}), 7.58 (s, 1 H, HC), 11.57 (s, 1 H, H-N), 12.01 (s, 1 H, H-N); HR-MS (ESI⁺): ber. für [C₁₆H₁₈N₄O₃]⁺: 314.1379, gef.: 314.1382.

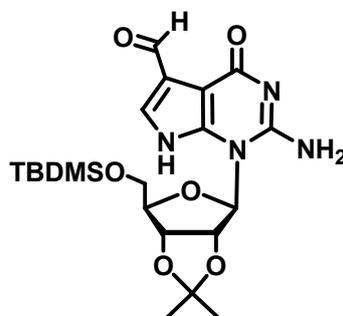
2-Amino-1-[6-(*tert*-butyl-dimethyl-silanyloxymethyl)-2,2-dimethyl-tetrahydrofuro[3,4-*d*][1,3]dioxol-4-yl]-5-hydroxymethyl-1,7-dihydro-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-on (96)¹⁵⁵



In ein ausgeheiztes Schlenkrohr wurde bei -60°C Ammoniak (2 mL) einkondensiert. Bei -78°C wird Natrium (40 mg) zugegeben, es entstand eine dunkelblaufarbene Lösung, die 15 min gerührt wird. Das Benzylnukleosid **95** (110 mg, 0.198 mmol) wurde in THF (abs., 2 mL) gelöst zugetropft, die blaue Farbe durfte nicht verschwinden, oder es musste erneut Natrium zugegeben werden und weitere 15 min bei -78°C gerührt. Es wurde langsam ges. wässrige Ammoniumchlorid-Lösung (2 mL) zugetropft und Methanol (10 mL) zugegeben. Die Lösung wurde auf RT kommen gelassen und mit HCl neutralisiert. Die Lösung wurde mit CH_2Cl_2 (3×40 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit NaHCO_3 gewaschen und das Lösungsmittel *in vacuo* eingengt. Der weiße Feststoff wird säulenchromatographisch ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 1:25) gereinigt und man erhält **96** (50 mg, 50%) als weißgelblichfarbenen durchsichtigen kristallinen Feststoff.

$R_f = 0.45$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 10:1); $^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): $\delta = -0.01$ (3 H, s), 0.1 (3 H, s), 0.82 (9 H, s), 1.38 (3 H, s), 1.55 (3 H, s), 3.65 (2 H, dq, $J = 10.3, 7.6$ Hz), 4.36 (1 H, dd, $J = 8.8, 6.6$ Hz), 4.89 (1 H, d, $J = 6.0$ Hz), 4.99 (1 H, d, $J = 6.0$ Hz), 5.11 (2 H, s), 6.72 (1 H, s), 7.61 (1 H, s), 10.00 (1 H, s); $^{13}\text{C NMR}$ (50 MHz, $[\text{D}_6]\text{-DMSO}$): $\delta = 18.2, 63.5, 82.0, 85.3, 88.4, 96.0, 103.6, 112.8, 118.5, 125.9, 128.1, 131.1, 133.0, 135.1, 156.4, 159.6, 162.5, 184.2$; MS (ESI⁺): 187 (100, MNa^+).

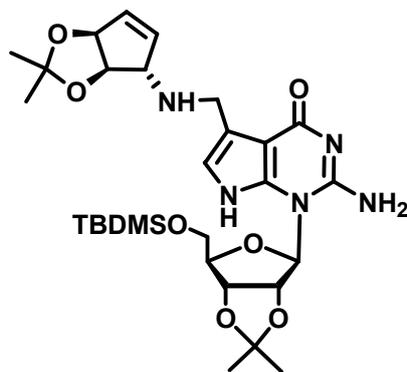
2-Amino-1-[6-(*tert*-butyl-dimethyl-silanyloxymethyl)-2,2-dimethyl-tetrahydrofuro[3,4-*d*][1,3]dioxol-4-yl]-4-oxo-4,7-dihydro-1*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidine-5-carbaldehyd (97)



96 (13 mg, 28 mmol) wurde in CH_2Cl_2 (7 mL) gelöst und *Dess-Martin* Periodinan (24 mg, 56 mmol) und Pyridin (11 μL , 140 mmol) zugegeben. Eine Gelbfärbung der Lösung war zu beobachten. Nach 2 h wurde die Lösung mit ges. wässrige Natriumhydrogencarbonat-Lösung (2×10 mL) extrahiert, die vereinigten org. Phasen mit ges. wässrige Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und das Produkt säulenchromatographisch ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 50:1) gereinigt. Man erhielt **97** (11 mg, 85%) als farbloses Öl.

$R_f = 0.45$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 10:1); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = -0.01$ (s, 3H), 0.1 (s, 3H), 0.82 (s, 9H), 1.37 (s, 3H), 1.55 (s, 3H), 3.65 (dq, $J = 10.3, 7.6$ Hz, 2H), 4.38 (dd, $J = 8.8, 6.6$ Hz, 1H), 4.67 (s, 2H), 4.90 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H), 4.99 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H), 6.66 (s, 1H), 6.72 (s, 1H), 7.26 (s, 1H), 9.00 (s, 1H); HR-MS (FAB+): ber. für $[\text{C}_{21}\text{H}_{35}\text{N}_4\text{O}_6\text{Si}]^+$: 467.2326, gef.: 467.2338.

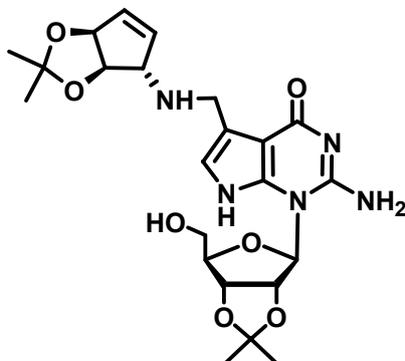
2-Amino-1-[6-(*tert*-butyl-dimethyl-silanyloxymethyl)-2,2-dimethyl-tetrahydrofuro[3,4-*d*][1,3]dioxol-4-yl]-5-[(2,2-dimethyl-4,6a-dihydro-3a*H*-cyclopenta[1,3]dioxol-4-ylamino)-methyl]-1,7-dihydro-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-one (98)⁹⁸



97 (5.7 mg, 12 mmol) und **3** (2.3 mg, 0.15 mmol) wurden in Benzol (abs., 2 mL) gelöst und die rote Lösung 5 h bei RT gerührt. Das Lösemittel wurde *in vacuo* entfernt. Ein Teil der Probe wurde in CDCl₃ aufgenommen und mittels NMR analysiert. Das Singulett Proton bei 8.75 zeigte die erfolgreiche Bildung des Imins auf. Nach Zugabe von Ethanol (2 mL) wurde bei 0°C NaBH₄ (0.3 mg, 6 mmol) zugegeben und die sich braun färbende Lösung 1 h bei 0°C gerührt. Nach Zugabe von H₂O (0.2 mL) wurden weitere 30 min gerührt. Das Lösemittel wurde *in vacuo* entfernt und der braune Feststoff säulenchromatographisch (CH₂Cl₂/MeOH, 15:1) gereinigt. Man erhielt **98** (4.8 mg, 66%) als gelbes Öl.

R_f = 0.4 (CH₂Cl₂/MeOH, 10:1); ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ = 0.00 (s, 6H), 0.84 (s, 9H), 1.37 (s, 3H), 1.38 (s, 3H), 1.40 (s, 3H), 1.55 (s, 3H), 3.55 (t, J = 10.2, 1H), 3.70 (ddd, J = 10.2, 9.0, 4.4 Hz, 2H), 3.88 (s, 1H), 4.32 (dd, J = 10.0, 5.3 Hz, 1H), 4.48 (s, 2H), 4.87 (q, J = 6.1, 6.0 Hz, 2H), 5.25 (d, J = 5.3 Hz, 1H), 5.83 (d, J = 4.7 Hz, 1H), 5.94 (d, J = 3.9 Hz, 1H), 6.62 (s, 1H), 6.73 (s, 1H), 8.34 (s, 1H); HR-MS (ESI⁺): ber. für [C₂₉H₄₆N₅O₇Si]⁺: 604.3161, gef.: 604.6157.

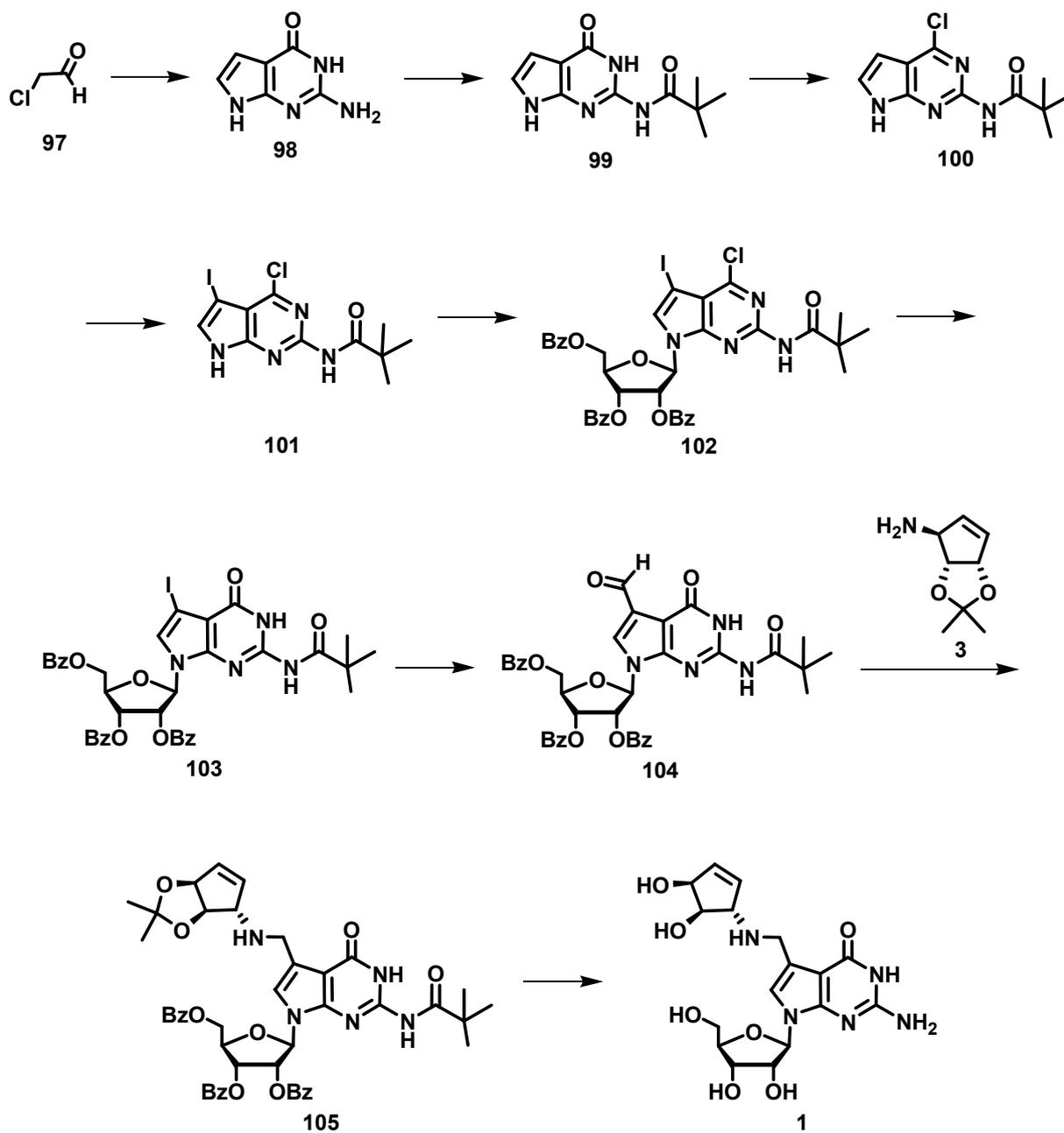
2-Amino-5-[(2,2-dimethyl-4,6a-dihydro-3aH-cyclopenta[1,3]dioxol-4-ylamino)-methyl]-1-(6-hydroxymethyl-2,2-dimethyl-tetrahydro-furo[3,4-d][1,3]dioxol-4-yl)-1,7-dihydro-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-on (99)

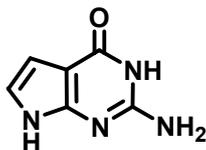


98 (7.4 mg, 12.3 mmol) und TBAF (7.7 mg, 24.5 mmol) wurden in THF (abs., 1 mL) gelöst und 1.5 h bei RT gerührt. Die Lösung wurde mit CH₂Cl₂ (2 x 10 mL) extrahiert, mit NaCl-Lösung (10 mL) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Die säulenchromatographische Reinigung (CH₂Cl₂/MeOH, 10:1) ergab **99** (3.3 mg, 55%) als farbloses Öl.

R_f = 0.1 (CH₂Cl₂/MeOH, 10:1); ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ = 1.37 (s, 3H), 1.38 (s, 3H), 1.40 (s, 3H), 1.55 (s, 3H), 3.60 (t, J = 10.2, 1H), 3.70 (m, 2H), 3.90 (s, 1H), 4.20 (m, 1H), 4.48 (s, 2H), 4.82 (m, 2H), 5.15 (d, J = 5.3 Hz, 1H), 5.26 (m, 1H), 6.03 (d, J = 3 Hz, 1H), 6.40 (d, J = 7 Hz, 1H), 6.77 (s, 1H), 6.90 (s, 1H); HR-MS (ESI⁺): ber. für [C₂₃H₃₂N₅O₇]⁺: 490.2224, gef.: 490.2293.

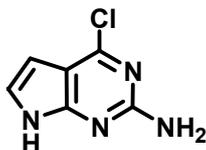
5.2.4. Synthese von Queuosin



2-Amino-3,7-dihydro-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-one (98)

2,4-Diamino-6-hydroxypyrimidin (25.2 g, 200 mmol) wurde bei RT in DMF (240 mL) und Wasser (40 mL) gelöst und der gelbe Niederschlag wurde 15 min gerührt. Chloroacetaldehyd (25.3 mL, 200 mmol) wurde hinzugefügt und die Suspension weitere 46 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und der rote Feststoff in Wasser (5 mL) gelöst. Nach Filtration und Trocknen des Filtrats am HV erhielt man **98** (25.8 g, 86%) als roten Feststoff.

IR (neat): 3444 (m), 3080 (s), 2990 (m), 1628 (s), 1578 (s), 1415 (w) cm^{-1} ; ^1H NMR (200 MHz, $[\text{D}_6]$ -DMSO): δ = 10.94 (s, 1H, NH), 10.35 (s, 1H, NH), 6.58 (dd, J = 3.4, 2.2 Hz, 1H, NHCHCH), 6.15 (dd, J = 3.4, 2.1 Hz, 1H, CHNH), 6.09 (s, 2H, NH_2); HR-MS (EI^+): ber. für $[\text{C}_6\text{H}_6\text{N}_4\text{O}]^+$: 150.0542, gef.: 150.0544.

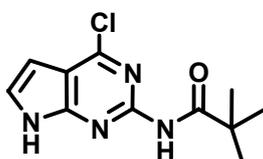
4-Chloro-7H-pyrrolo[2,3d]pyrimidin-2-ylamin (99)

98 (10.0 g, 66.6 mmol) wurde in POCl_3 (100 mL) suspendiert und die Lösung wurde 2 h unter Rückfluss gekocht. Nach Abkühlen auf RT wurde überschüssiges POCl_3 am HV entfernt. Unter Eiskühlung wurde Eiswasser (120 mL) hinzugefügt und der resultierende Feststoff wurde abfiltriert. Der pH-Wert des Filtrats wurde mit aq. Ammoniak (konz.) auf pH = 2 gebracht. Der Niederschlag wurde 2 h im Eisbad gekühlt, abfiltriert und mit kaltem Wasser (10 mL) und kaltem Ether (30 mL)

gewaschen. Der Feststoff wurde am HV getrocknet und man erhielt **99** (8.70 g, 78%) als gelben Feststoff.

IR (neat): 3166 (bs), 1680 (s), 1630 (s), 1419 (m), 1064 (m) cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (200 MHz, $[\text{D}_6]$ -DMSO): δ = 11.43 (s, 1H, NH), 7.07 (d, 1H, NHCHCH), 6.46 (s, 2H, NH_2), 6.22 (d, 1H, CHNH); HR-MS (EI^+): ber. für $[\text{C}_6\text{H}_6\text{ClN}_4]^+$: 168.0203, gef.: 168.0206.

***N*-(4-Chloro-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-2-yl)-2,2-dimethyl-propionamid (100)**



Methode 1:

99 (8.5 g, 50.42 mmol) wurde in Pyridin (120 mL) suspendiert und Pivaloylsäurechlorid (21.68 mL, 176.20 mmol) zugegeben. Die dunkelbraune Lösung wurde 2 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und in CH_2Cl_2 (1.7 L) aufgenommen. Die organische Phase wurde mit aq. HCl (0.1 N, 2×350 mL) gewaschen, über MgSO_4 getrocknet, abfiltriert und auf Zelite absorbiert. Die säulenchromatographische Aufreinigung ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 98:2) ergab **100** (8.15 g, 64%) als weißen Feststoff.

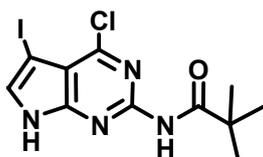
Methode 2:

99 (200 mg, 0.73 mmol) wurde in POCl_3 (2 mL, 13.2 mmol) suspendiert und Dimethylanilin (40 μL , 0.33 mmol) zugegeben. Die Suspension wurde auf 100°C erhitzt und 2.5 h unter Rückfluss gekocht. Es entstand eine dunkelrot farbene Lösung. Überschüssiges POCl_3 wurde abdestilliert und unter Eiskühlung wurde Wasser (0.5 mL) zugegeben und 30 min gerührt. Die hellbraune Suspension wurde mit wässrigem konzentriertem Ammoniak auf $\text{pH}=2$ gebracht, der entstandene

hellbraune Feststoff abfiltriert und am HV getrocknet. Man erhielt **100** (60 mg, 33%) als gelben Feststoff.

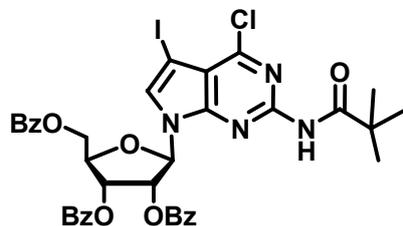
$R_f = 0.80$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 10:1); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $[\text{D}_6]-\text{DMSO}$): $\delta = 9.98$ (s, 1H, NHC(O)), 7.50 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H, NHCHCH), 6.49 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H, CHNH), 1.20 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); $^{13}\text{C NMR}$ (150 MHz, $[\text{D}_6]-\text{DMSO}$): $\delta = 188.0, 176.5, 153.4, 152.0, 150.9, 128.0, 113.9, 99.5, 27.6$ (3); HR-MS (EI^+): ber. für $[\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{ClN}_4\text{O}]^+$: 252.0778, gef.: 252.0782.

***N*-(4-Chloro-5-iodo-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-2-yl)-2,2-dimethyl-propionamid**
(101)



100 (1.07 g, 4.3 mmol) wurde in CH_2Cl_2 (20 mL) gelöst und *N*-Iodsuccinimid (1.14 g, 5.1 mmol) zugegeben. Die Lösung wurde bei 40°C 4 h gerührt und das Lösemittel anschließend *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde in H_2O wenig aufgenommen, filtriert und mit H_2O gewaschen. Man erhielt einen dunkelgrün farbenen Feststoff, der säulenchromatographisch ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Methanol}$ 100:1 \rightarrow 75:1) gereinigt wurde. Man erhielt **101** (870 mg, 55%) als hellgrünen Feststoff.

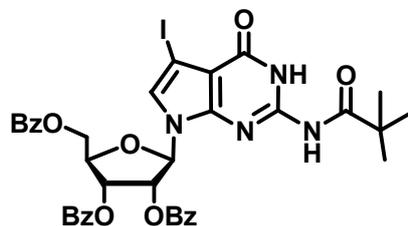
$R_f = 0.80$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 20:1); IR (neat): 3423 (w) 3205 (m) 2966 (m), 1705 (s), 1600 (s), 1561 (s), 1430 (s), 1411 (s), 1257 (m), 1159 (m) cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $[\text{D}_6]-\text{DMSO}$): $\delta = 12.65$ (s, 1H, CHNH), 10.06 (s, 1H, NHC(O)), 7.73 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, CH), 1.19 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); $^{13}\text{C NMR}$ (150 MHz, CDCl_3): $\delta = 180.1, 176.5, 153.2, 152.1, 151.3, 133.4, 113.0, 52.3, 27.5$ (3); HR-MS (EI^+): ber. für $[\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{ClIN}_4\text{O}]^+$: 377.9744, gef.: 377.9756.

4-Chloro-5-iodo-2-pivaloylamino-7-[(2,3,5-tri-O-benzoyl)- β -D-ribofuranosyl]-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (102)

101 (60 mg, 0.159 mmol) wurde unter N_2 in Acetonitril (abs., 1.1 mL) vorgelegt, und N-O-Bis(trimethylsilyl)acetamid (47 μ L, 0.19 mmol) und Trimethylsilyltriflat (37 μ L, 0.21 mmol) und zugegeben und auf 50°C erhitzt. Acetyltribenzoylribofuranose (160 mg, 0.32 mmol) wurde innerhalb von 24 h in drei Portionen zugegeben. Nach Abschluss der Reaktion wurde die Lösung mit CH_2Cl_2 (10 mL) verdünnt und mit ges. wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung (5 mL) und ges. wässriger NaCl-Lösung (5 mL) gewaschen und über $MgSO_4$ getrocknet. Nach Entfernen des Lösemittels *in vacuo* erhielt man einen braunen Feststoff, der säulenchromatographisch (Isohexan/Ethylacetat 7:1) gereinigt wurde. Man erhielt **102** (70 mg, 55%) als gelbes Öl.

R_f = 0.30 (Isohexan/Ethylacetat, 3:1); IR (neat): 3354 (m), 3201 (w), 2962 (m), 2874 (w), 1723 (s), 1669 (s), 1601 (s), 1544 (m), 1451 (m), 1262 (s), 1117 (m), 1093 (m), 707 (s) cm^{-1} ; 1H NMR (600 MHz, $[D_6]-DMSO$): δ = 10.29 (s, 1H, NH), 8.02 (s, 1H, NCH), 7.91-7.85 (m, 6H, HAr), 7.64-7.58 (m, 3H, HAr), 7.46-7.39 (m, 6H, HAr), 6.48 (d, J = 3.9 Hz, 1H, C_1H), 6.41 (t, J = 6.1, 6.1 Hz, 1H, C_3H), 6.32 (dd, J = 6.0, 4.0 Hz, 1H, C_2H), 4.82 (dd, J = 10.7, 5.0 Hz, 1H, C_4H), 4.75 (dd, J = 11.8, 4.4 Hz, 1H, C_5H), 4.63 (dd, J = 11.8, 5.7 Hz, 1H, C_5H), 1.15 (s, 9H, $C(CH_3)_3$); ^{13}C NMR (150 MHz, $[D_6]-DMSO$): δ = 176.5, 166.0, 165.2, 152.5, 152.2, 152.0, 134.6, 134.4 (2), 134.1, 130.1, 130.0, 129.9 (3), 129.8 (2), 129.5 (2), 129.4 (3), 129.3 (2), 129.1 (2), 113.9, 88.3, 79.8, 74.6, 71.9, 64.4, 55.6, 27.3 (3C); HR-MS (ESI): ber. für $[C_{36}H_{32}ClN_4O_8]$: 821.0881, gef.: 821.0883.

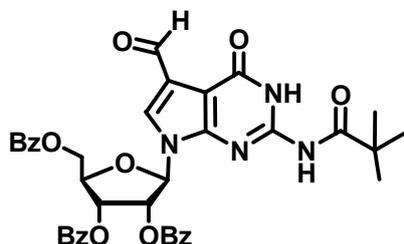
5-Iodo-4-oxo-2-pivaloylamino-7-[(2,3,5-tri-O-benzoyl)- β -D-ribofuranosyl]-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (103)



102 (710 mg, 0.86 mmol) wird in DMF (abs., 1 mL) vorgelegt und CsOAc (500 mg, 2.6 mmol), DABCO (96 mg, 0.86 mmol) sowie Triethylamin (360 μ L, 2.6 mmol) zugegeben. Die schwach gelb gefärbte Lösung wird 40 h bei RT gerührt.

Anschließend wird H₂O (1.2 mL) zugegeben und 30 min gerührt. Die Lösung wird mit EE (2 \times 20 mL) extrahiert, mit ges. wässriger NaCl-Lösung (15 mL) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösemittel wird *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt als gelb-braunes Öl erhalten. Das Rohprodukt wurde unter Hochvakuum getrocknet und säulenchromatographisch (Isohexan/Ethylacetat 2:1) gereinigt. Man erhielt **103** (450 mg, 63%) als rötlich-farblosen, kristallinen Feststoff.

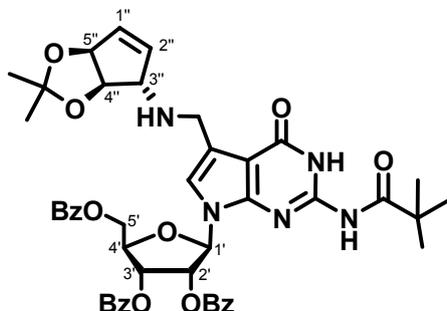
R_f = 0.50 (Isohexan/Ethylacetat, 1:1); IR (neat): 3340 (m), 3202 (w), 2967 (m), 1722 (s), 1680 (s), 1602 (s), 1538 (m), 1451 (m), 1262 (s), 1117 (m), 1068 (m), 706 (s) cm⁻¹; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 11.54 (s, 1H, NHC(O)C(CH₃)₃), 8.03-7.73 (m, 6H, ArH), 8.72 (s, 1H, NCH), 7.64-7.50 (m, 3H, ArH), 7.49-7.28 (m, 6H, ArH), 6.96 (s, 1H, C₁H), 6.87 (dd, *J* = 8.4, 5.0 Hz, 1H, C₃H), 6.47 (dd, *J* = 4.8, 1.4 Hz, 1H, C₂H), 4.75-4.82 (m, 1H, C₄H), 4.72 (dd, *J* = 12.4, 2.8 Hz, 1H, C₅H), 4.63 (dd, *J* = 12.5, 3.2 Hz, 1H, C₅H), 1.35 (s, 9H, C(CH₃)₃); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ = 134.0 (2C), 130.1, 130.0 (3C), 129.5, 129.3 (4C), 128.9 (4C), 128.8 (3C), 128.7 (2C), 128.6 (2C), 89.7, 78.7, 74.7, 70.8, 61.6, 27.1, 27.0, 26.7, 24.0, 14.4; HR-MS (ESI): ber. für [C₃₅H₃₄N₄O₉]: 803.1220, gef.: 803.1277.

5-Formyl-4-oxo-2-pivaloylamino-7-[(2,3,5-tri-*O*-benzoyl)- β -D-ribofuranosyl]-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin (104)

In einem Schlenkkolben wurde in eine Stickstoffatmosphäre **103** (130 mg, 0.16 mmol) in Toluol (abs, 2 mL) gelöst und Palladiumdibenzylidenacetone (15 mg, 0.016 mmol) und Triphenylphosphin (25 mg, 0.096 mmol) dazugegeben. Die Apparatur wurde mit Kohlenmonoxid zweimal gespült. Die Reaktionslösung wurde auf 55°C erhitzt und Tributylzinnhydrid innerhalb 1 h zugetropft. Nach 3 h Rühren bei dieser Temperatur wurde die Reaktion eingeeengt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (Isohexan/Ethylacetat 2:1) gereinigt und ergab die Verbindung **104** (80 mg, 71%) als farbloses Öl.

R_f = 0.25 (Isohexan/Ethylacetat, 1:1); $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ = 11.79 (s, 1H $\text{NHC(O)C(CH}_3)_3$), 10.37 (s, 1H, CHO), 8.83 (s, 1H, NCH), 8.02-7.74 (m, 6H, ArH), 7.64-7.52 (m, 3H, ArH), 7.49-7.30 (m, 6H, ArH), 6.89 (dd, J = 8.4, 5.0 Hz, 1H, C_1H), 6.51 (dd, J = 4.9, 1.6 Hz, 1H, C_2H), 6.07 (d, J = 1.6 Hz, 1H, C_3H), 4.81 (ddd, J = 12.2, 6.1, 3.1 Hz, 1H, C_4H), 4.76 (dd, J = 12.4, 3.2 Hz, 1H, C_5H), 4.67 (dd, J = 12.4, 3.4 Hz, 1H, C_5H), 1.38 (s, 9H, $\text{C(CH}_3)_3$); $^{13}\text{C NMR}$ (150 MHz, CDCl_3): δ = 186.3, 134.1, 134.0, 133.8, 130.0 (2C), 129.5, 128.9, 128.8, 128.6, 126.8, 90.7, 79.0, 77.4, 77.2, 77.0, 74.6, 70.8, 61.6, 41.1, 27.1, 24.0, 21.0, 17.7, 14.8; HR-MS (ESI $^+$): ber. für $[\text{C}_{38}\text{H}_{35}\text{N}_4\text{O}_{10}]^+$: 707.2348, gef.: 707.2312.

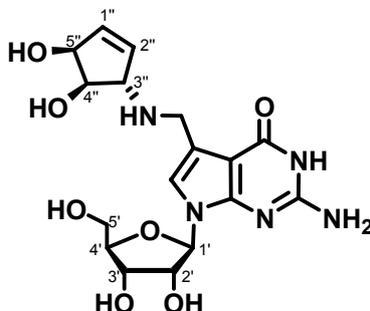
5-[(*3S,4R,5S*)-4,5-isopropylidenedioxy-cyclopent-1-en-3-ylamino)-methyl]-4-oxo-2-pivaloylamino-7-[(2,3,5-tri-*O*-benzoyl)- β -D-ribofuranosyl]-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin (**105**)



104 (150 mg, 0.21 mmol) und **3** (40 mg, 0.25 mmol) wurden in Benzol (abs., 4 mL) gelöst und die rote Lösung 5 h bei RT gerührt. Das Lösemittel wurde *in vacuo* entfernt und Ethanol (2 mL) zugegeben. Bei 0°C wurde NaBH₄ (5 mg, 0.7 mmol) zugegeben und die sich braun färbende Lösung 1 h bei 0°C gerührt. Nach Abquenschen mit H₂O (0.4 mL) wurde weitere 30 min gerührt. Das Lösemittel wurde entfernt und der braune Feststoff säulenchromatographisch (CH₂Cl₂/MeOH 50:1) gereinigt. Man erhielt **105** (100 mg, 80%) als gelbes Öl.

R_f = 0.55 (CH₂Cl₂/MeOH, 10:1); IR (neat): 3250 (m), 2950 (m), 2942 (m), 1790 (w), 1596 (s), 1549 (s), 1405 (s), 1069 (m), 863 (m) cm⁻¹; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 8.73 (s, 1H, NCH), 8.01-7.76 (m, 6H, ArH), 7.66-7.51 (m, 3H, ArH), 7.44-7.32 (m, *J* = 7.8 Hz, 6H, ArH), 6.86 (dd, *J* = 8.1, 5.0 Hz, 1H, C_{1'}H), 6.45 (dd, *J* = 5.0, 2.0 Hz, 1H, C_{2'}H), 6.02 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, C_{3'}H), 5.93 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H, C_{1''}H), 5.88 (dd, *J* = 5.8, 2.1 Hz, 1H, C_{2''}H), 5.29 (s, 1H, C_{5''}H), 4.76 (td, *J* = 8.0, 3.2 Hz, 1H, C_{4'}H), 4.69-4.65 (m, 2H, C_{5'}H₂), 4.64-4.62 (m, 1H, C_{3'}H), 3.99 (d, *J* = 13.4 Hz, 1H, C_{4''}H), 3.86 (t, *J* = 6.67 Hz, 2H, CH₂), 1.40 (s, 3H, CH₃), 1.35-1.30 (m, 12H, C(CH₃)₃, CH₃); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ = 180.3, 171.3, 166.3, 166.2, 165.4, 158.1, 147.4, 146.5, 134.0, 130.0 (2), 129.6, 128.8, 128.7, 128.6, 120.6 (2), 111.1, 105.4, 89.5, 85.0, 78.6, 77.4, 77.2, 77.0, 74.8, 71.0, 69.2, 62.1, 60.6, 53.6, 43.8, 40.4, 27.6, 27.1, 25.9, 21.3, 14.4; HR-MS (ESI⁺): ber. für [C₄₆H₄₇N₅O₁₁]⁺: 846.3345, gef.: 846.3316.

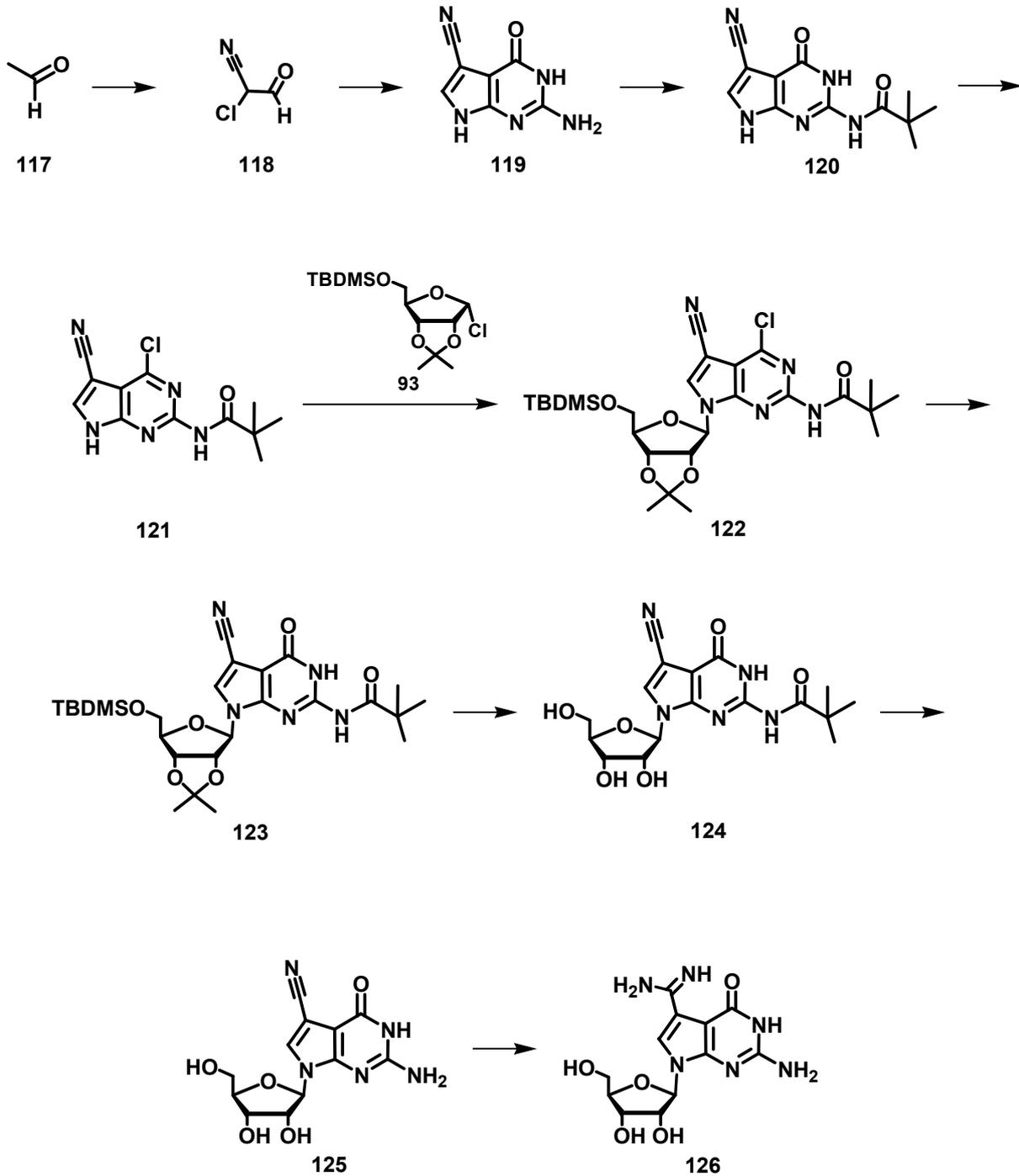
2-Amino-5-(((3*S*,4*R*,5*S*)-4,5-dihydroxy-cyclopent-1-en-3-ylamino)-methyl]-7-(3,4-dihydroxy-5-hydroxymethyl-tetrahydro-furan-2-yl)-3,7-dihydro-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-on, Queuosin (Q, 1)

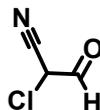


105 (40 mg, 0.047 mmol) wurde in einer methanolischen Natriumhydroxidlösung (0.5 M, 1 mL) gelöst und 48 h bei RT gerührt. Die Lösemittel wurde *in vacuo* entfernt. Der weiße kristalline Rückstand wurde anschließend in wässriger HCl-Lösung (2N, 1 mL) gelöst und weitere 5 h bei RT gerührt. Das Lösemittel wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand in H₂O (1 mL) aufgenommen. Das Produkt wurde durch eine präparative HPLC (R_t = 13.0 min, grad. 0-10% Acetonitril / H₂O in 45 min, 5 μ Nucleosil C₁₈ RP Säule, 0.5 mL/min) gereinigt. Das gereinigte Produkt wurde in wenig H₂O aufgenommen und Triethylammoniumacetat an der Lyophilie entfernt. Man erhielt **1⁹⁸** (6 mg, 45 %) als hellgelben kristallinen Feststoff. Die analytischen Daten entsprechen den in der Literatur angegebenen Werten.

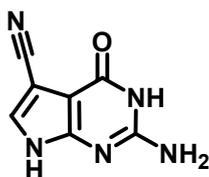
R_f = 0.50 (*n*-BuOH/AcOH/H₂O, 4:1:1); IR (neat): 3320 (br, s), 2950 (s), 2851 (m), 1634 (s), 1601 (s), 1560 (s), 1440 (m), 1045 (m) cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ = 7.06 (s, 1H, C₈H), 6.14 (td, J = 6.2, 2.1 Hz, 1H, C_{1'}H), 5.98 (dd, J = 6.2, 1.3 Hz, 1H, C_{2'}H), 5.87 (d, J = 6.0 Hz, 1H, C₁H), 4.56-4.51 (m, 1H, C_{5'}H), 4.38 (t, J = 5.6 Hz, 1H, C₂H), 4.34 (d, J = 13.8 Hz, 1H, NHCH₂), 4.25 (d, J = 13.8 Hz, 1H, NHCH₂), 4.18 (td, J = 5.1, 4.3 Hz, 2H, C_{4'}H, C₃H), 4.11-4.06 (m, 2H, C_{3'}H, C₃H), 4.00-3.95 (m, 1H, C₄H), 3.75 (dd, J = 12.2, 3.1 Hz, 1H, C₅H), 3.66 (dd, J = 12.1, 3.6 Hz, 1H, C₅H); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD): δ = 177.5, 161.3, 153.3, 152.4, 137.8, 129.5, 118.9, 110.2, 88.5, 85.4, 74.6, 74.5, 73.4, 71.0, 67.2, 62.1, 42.5; HR-MS (ESI⁺): ber. für [C₁₇H₂₃N₅O₇]⁺: 410.1670, gef.: 410.1658.

5.2.5. Synthese von Archaeosin



2-Chloro-3-oxo-propionitril (118)¹⁴⁴

Natriummethanolat (3.57 g, 66 mmol) wurde in THF (abs., 60 mL) in einem ausgeheizten Dreihalskolben suspendiert. Bei 0°C wurde Methylformat (4.38 g, 77 mmol) mit einer Spitzenpumpe innerhalb 1 h zugetropft. Nach 15 min Rühren wurde Chloracetonitril (5 g, 66 mmol) innerhalb 1 h zugetropft. Es wurde 2 h bei 0°C und 2 h bei RT gerührt. Anschließend wurde Salzsäure (konz., 6 mL) langsam zugetropft, so dass die Temperatur der rotfarbenen Lösung nicht über 10°C stieg. Nach Filtration wurde die Lösung *in vacuo* auf 15 mL eingeeengt und direkt mit einer Spitze in die nächste Reaktion eingesetzt. Aus der Lösung wurden 100 µL in einen separaten Kolben transferiert und das LM *in vacuo* entfernt. Man erhielt **118** als dunkelrotfarbenes Öl, das direkt in die nachfolgende Reaktion eingesetzt wurde.

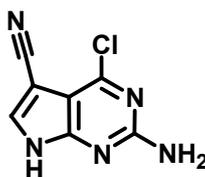
2-Amino-4-oxo-4,7-dihydro-3H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidine-5-carbonitril (119)¹⁴⁴

Natriumacetat trihydrat (14 g, 110 mmol) und 2,6-Diaminopyrimidin-4-one (6.66 g, 5.28 mmol) wurden in Wasser (110 mL) gelöst und auf 50°C erhitzt. Mit einer Spitzenpumpe wurde bei dieser Temperatur **118** innerhalb 1 h bei 50°C zugetropft und anschließend 1 h bei der Temperatur gehalten. Anschließend wurde die Suspension über Nacht bei RT gerührt. Das THF wurde dann *in vacuo* entfernt und die Suspension 1 h bei 110°C unter Rückfluss gekocht. Die Suspension wurde anschließend abfiltriert und der Filtrückstand mit Aceton und H₂O gewaschen. Der

hellgelbfarbene Feststoff wurde in wässriger KOH-Lösung (6N, 50 mL) gelöst. Nach Zugabe von Aktivkohle wurde die Suspension filtriert und das Filtrat mit Salzsäure (30%) auf pH=6 gebracht. Der ausgefallene Feststoff wurde bei 50°C im Vakuum 24 h getrocknet und man erhielt **119** (4.4 g, 38 %) als weißes Pulver.

M.p. >250°C. IR (KBr): 3437 (m), 2229 (s), 1685 (s), 1510 (m), 1162 (w), 883 (w), 610 (w) cm^{-1} . ^1H NMR (600 MHz, $[\text{D}_6]$ -DMSO): δ = 6.40 (s, 2H, NH_2), 7.63 (s, 1 H, CH), 10.72 (s, 1H, NH), 12.00 (s, 1H, NH) ppm. ^{13}C NMR (150 MHz, $[\text{D}_6]$ -DMSO): δ = 78.0, 84.4, 97.6, 114.8, 126.6, 150.5, 152.7, 156.4 ppm. MS (EI+): 77 (6), 105 (7), 133 (28), 158 (26), 175 (100). HR-MS (EI+): ber. für $[\text{C}_7\text{H}_5\text{N}_5\text{O}]^+$: 175.0494; gef.: 175.0479.

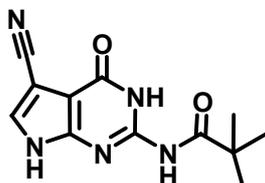
2-Amino-4-chloro-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidine-5-carbonitril (**119a**)



119 (100 mg, 0.57 mmol) wurde in POCl_3 (2 mL) suspendiert und Dimethylanilin (25 μL , 0.20 mmol) zugegeben. Die Suspension wurde 3 h unter Rückfluss gekocht und das LM *in vacuo* entfernt. Der verbliebene Rückstand wurde unter Kühlung in Ethylacetat (10 mL) und H_2O (10 mL) gelöst und die wässrige Phase mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit H_2O (5 mL) gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Das LM wurde *in vacuo* entfernt. Man erhielt **119a** als grünfarbenen Feststoff.

R_f = 0.3 (MeOH/Ethylacetat, 1:10); IR (neat): 3166 (bs), 1680 (s), 1630(s), 1419 (m), 1064 (m) cm^{-1} ; ^1H NMR (200 MHz, $[\text{D}_6]$ -DMSO): δ = 11.43 (s, 1H, NH), 7.07 (d, 1H, NHCHCH), 6.46 (s, 2H, NH_2), 6.22 (d, 1H, CHNH); HR-MS (EI $^+$): ber. für $[\text{C}_6\text{H}_6\text{ClN}_4]^+$: 168.0203, gef.: 168.0206.

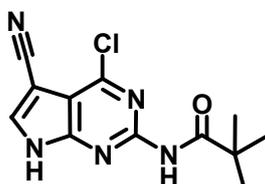
***N*-(5-Cyano-4-oxo-4,7-dihydro-3*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-2-yl)2,2-dimethyl-propionamide (120)¹⁰⁵**



119 (1.5 g, 8.6 mmol) wurde in Pyridin (abs., 10 mL) vorgelegt und Pivaloylsäurechlorid (3.10 g, 26 mmol) zugegeben, woraufhin eine hellgraue Suspension entstand. Es wurde 2 h lang bei 85°C gerührt – es bildet sich eine hellbraune Lösung aus. Beim Abkühlen fällt weißer Niederschlag aus, der abfiltriert wird. Es wurde mit NH₃ in EtOH neutralisiert und die Lösung über Nacht bei 4°C gelagert, worauf ein hellgelber Niederschlag ausgefallen ist, der abfiltriert wurde und mit 20 mL EtOH und 10 mL Diethylether gewaschen wurde. Man erhielt **120** (1.65 g, 75%) als einen weißen Feststoff.

R_f = 0.2 (CH₂Cl₂/MeOH, 20:1); ¹H NMR (200 MHz, [D₆]-DMSO): δ = 1.24 (s, 9H, CH₃), 7.94 (s, 1H, CH), 11.00 (s, 1H, NH), 12.11 (s, 1H, NH), 12.65 (s, 1H, NH); ¹³C NMR (150 MHz, [D₆]-DMSO): δ = 25.64 (CH₃), 85.54 (C_{Py}), 102.34 (C_{Py}), 114.54 (C_{Py}), 123.23 (C_{Py}), 129.58 (CN), 147.76 (C₂), 155.04 (C₆), 180.39 (C=O); MS (FAB⁺, NBA) *m/z* (%): 260(64, [M+H]⁺), 282 (32, [M+Na]⁺); HR-MS (FAB⁺): ber. für [C₁₂H₁₄N₅O₂]⁺: 260.1161, gef.: 260.1147.

***N*-(4-Chloro-5-cyano-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-2-yl)-2,2-dimethyl-propionamid (121)¹⁴⁵**



Methode 1:

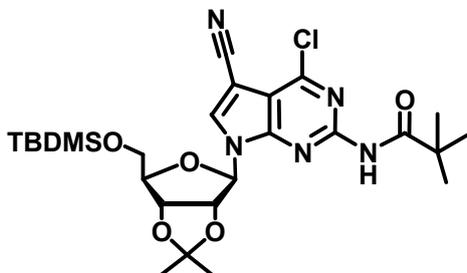
120 (200 mg, 0.77 mmol) wurde mit Phosphorylchlorid (2 mL, 22 mmol) 2 h lang bei 120°C unter Rückfluss gekocht, wobei die weiße Suspension nach ca. 1 h gelb wurde und nach 2 h eine orange-dunkelrote Lösung vorlag. POCl₃ wurde *in vacuo* entfernt und der dunkelrote Rückstand mit Eis (ca. 5 g) versetzt, sowie mit Ammoniumhydroxid-Lösung auf pH=4 gebracht. Der hier ausfallende orange Feststoff wurde abfiltriert und mit eiskaltem Wasser (10 mL) gewaschen. Das Rohprodukt wurde in MeOH aufgenommen, Silica Gel (2 g) zugegeben und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Flashchromatographie (Isohexan/Ethylacetat, 3:2) ergab **121** (39 mg, 18%) als hellgelben Feststoff.

Methode 2:

120 (200 mg, 772 μmol) wurde in Acetonitril (1.2 mL) vorgelegt und *N,N*-Dimethylanillin (413 μL, 3.28 mmol), POCl₃ (716 μL, 7.72 mmol) und Triethylbenzylammoniumchlorid (TEBA, 88 mg, 0.386 mmol) zugegeben. Die gelb-weiße Suspension wurde 1 h lang bei 90°C unter Rückfluss gekocht, wobei nach bereits 5 min eine gelbe Lösung vorlag. Das Lösemittel sowie überschüssiges Phosphorylchlorid wurde *in vacuo* entfernt, der ölige Rückstand 1 h lang mit Eiswasser hydrolysiert und mit konz. NH₃ auf pH = 4 gebracht, wobei ein weisser Niederschlag ausfiel. Der weiss-rosa Niederschlag wurde abfiltriert, mit wenig Wasser gewaschen, in MeOH gelöst und in wenig Kieselgel (ca. 1 g) aufgenommen. Eine säulenchromatographische Aufreinigung (Isohexan/Ethylacetat, 3:2) ergab **121** (160 mg, 75%) als weissen, kristallinen Feststoff.

R_f = 0.65 (CHCl₃/MeOH, 9:1); ¹H NMR (200 MHz, [D₆]-DMSO): δ = 1.23 (s, 9H, tBu), 8.52 (s, 1H, HC8), 10.31 (s, 1H, HN7), 13.39 (s, 1H, NHAc); MS (EI⁺) *m/z* (%): 277 (34, [M]⁺), 193.1 (97, [C₇H₃CIN₅]⁺), 158 (43, C₇H₄N₅⁺), 85.1 (9, C₅H₉O⁺), 57.1 (100, C₄H₉⁺).

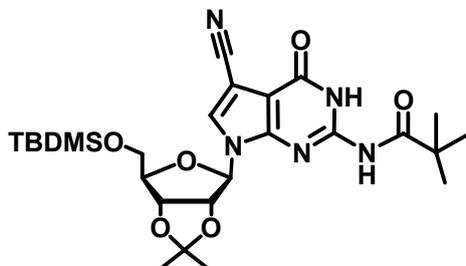
***N*-[7-[6-(*tert*-Butyldimethylsilanyloxymethyl)-2,2-dimethyl-tetrahydro-furo[3,4-*d*][1,3]dioxol-4-yl]-4-chloro-5-cyano-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-2-yl]-2,2-dimethyl-propionamide (122)**



121 (25 mg, 0.09 mmol) und NaH (in Mineralöl) (3.6 mg, 0.09 mmol) wurden in Acetonitril (abs., 2.7 mL) vorgelegt. In der gelben Lösung war eine sofortige Gasentwicklung zu beobachten. Nach 1 h wurde **24** (15 mg, 0.045 mmol) in THF (abs., 0.2 mL) zugegeben und über Nacht bei RT gerührt, wobei sich eine gelbe Suspension ausbildete. Das Lösemittel wurde *in vacuo* entfernt, mit Wasser (10 mL), Ethylacetat (2 × 20 mL) und NaCl-Lösung (10 mL) extrahiert und über MgSO₄ getrocknet. Das Rohprodukt wurde in Kieselgel aufgenommen und säulenchromatographisch (Isohexan/Ethylacetat 10:1) aufgereingt. Man erhielt **122** als dunkles Öl (16 mg, 16%).

R_f = 0.85 (Isohexan/Ethylacetat); ¹H NMR (400 MHz, [D₆]-DMSO): δ = -0.16 (s, 3H; Me₂Si), -0.13 (s, 3H, Me₂Si), 0.73 (s, 9H, *t*Bu), 1.22 (s, 9H, COC(CH₃)₃), 1.32 (s, 3H, CH₃), 1.51 (s, 3H, CH₃), 3.64 (dd, J=11Hz, J= 5Hz, HC5'), 3.67 (dd, J=11 HZ, J=6 Hz, 1H, HC5'), 4.12 (ddd, J=6 Hz, J=5 Hz, J=4 Hz, 1H, HC4'), 5.21 (dd, J=6 Hz, J= 4 H, 1H, HC3'), 5.45 (dd, J=6 Hz, J= 1Hz, 1H, HC2'), 6.25 (d, J= 1Hz, 1H, HC1'), 8.64 (s, 1H, HC_{Pyr}), 10.51 (s, 1H, HN); ¹³C NMR (100 MHz, [D₆]-DMSO): δ = -4.9, -4.8, 18.7, 25.9, 26.4, 27.3, 27.6, 40.6, 64.1, 81.3, 84.4, 84.9, 88.7, 91.3, 112.2, 113.6, 114.3, 138.9, 151.7, 151.9, 153.8, 176.6 ; HR-MS (ESI⁺): ber. für [C₂₆H₃₉ClN₅O₅Si]⁺: 564.2404, gef. 564.2368.

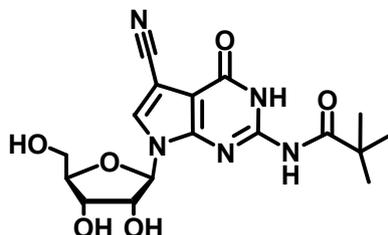
N-[7-[6-(*tert*-Butyl-dimethyl-silanyloxymethyl)-2,2-dimethyl-tetrahydro-furo[3,4-*d*][1,3]dioxol-4-yl]-5-cyano-4-oxo-4,7-dihydro-3*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-2-yl]-2,2-dimethyl-propionamid (**123**)¹⁵⁶



122 (160 mg, 0.28 mmol) wurde in DMF (abs., 3.2 mL) vorgelegt und KOAc (23 mg, 0.85 mmol), DABCO (32 mg, 0.28 mmol) sowie Triethylamin (117 μ L, 0.85 mmol) zugegeben. Die schwach gelb gefärbte Lösung wurde zwei Stunden bei RT gerührt, wobei sich nach kurzer Zeit eine stark gelbe Lösung ausbildet. Anschließend wird mit Wasser (4 mL) abgequentscht, mit Ethylacetat (2 \times 30 mL) extrahiert, mit ges. wässrige NaCl-Lösung (ca. 25 mL) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt als gelb-braunes Öl erhalten. Eine Aufreinigung mittels Flashchromatographie (Isohexan/Ethylacetat 3:1) ergab **123** (110 mg, 71%) als weißen, kristallinen Feststoff.

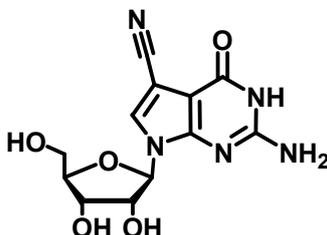
R_f = 0.5 (Isohexan/Ethylacetat, 1:1); IR (neat): 3163 (br, s), 2933 (s), 2232 (s), 1671 (s), 1606 (s), 1542 (m), 1250 (m), 1077 (s), 833 (s), 780 (s) cm⁻¹; ¹H NMR (200 MHz, [D₆]-DMSO): δ = 0.02 (s, 6H, DMSi), 0.85 (s, 9H, *t*BuSi), 1.25 (s, 9H, *t*Bu), 3.74 (m, 2H, HC5'). 4.14 (q, 1H, J=4.1Hz, HC4'), 4.96 (dd, 1H, J=3.6 Hz, J=6.4 Hz, HC3'), 5.14 (dd, 1H, J=2.2 Hz, J=6.4 Hz, HC2'), 6.25 (d, 1H, J = 2.2 Hz, HC1'), 8.13 (s, 1H, HC8), 11.07 (s, 1H, HN1), 12.22 (s, 1H, NHAc); ¹³C NMR (100 MHz, [D₆]-DMSO): δ = -5.6, -5.4, 18.0, 15.2, 15.7, 26.2, 26.9, 40.6, 63.0, 80.4, 83.9, 86.3, 87.2, 88.2, 103.0, 113.3, 114.2, 129.7, 147.8, 148.9, 155.3, 181.1; HR-MS (ESI⁺): ber. für [C₂₆H₃₉O₆N₅NaSi]⁺: 568.2562, gef.: 568.2572.

***N*-[5-Cyano-7-(3,4-dihydroxy-5-hydroxymethyl-tetrahydro-furan-2-yl)-4-oxo-4,7-dihydro-3*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-2-yl]-2,2-dimethyl-propionamid (124)**



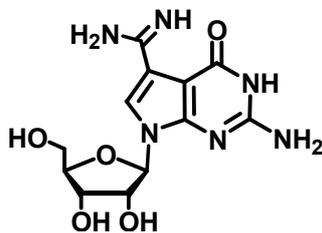
123 (18.0 mg, 0.03 mmol) wurde in Wasser (0.15 mL) gelöst und mit Trifluoressigsäure (0.35 mL) bei 0°C versetzt. Die Mischung wurde für 4 h bei 0°C gerührt und anschließend das Lösungsmittel unter Eiskühlung am Hochvakuum entfernt. Nach dem Lösen des Rohprodukts in Wasser (2 mL) wurde 10 min bei RT gerührt. Durch Entfernen des Lösungsmittels resultierte ein frabloses Öl, das säulenchromatographisch (CH₂Cl₂/Methanol 10:1) aufgereinigt wurde. Es wurde **124** (10.0 mg, 77%) als weißer Feststoff isoliert.

R_f = 0.38 (CH₂Cl₂/Methanol, 10:1); IR (neat): 3482 (br, m), 3417 (s), 3152 (bm), 2966 (m), 1884 (m), 2233 (m), 1693 (s), 1659 (s), 1598 (m), 1557 (m), 1538 (m), 1411 (m), 1091 (m), 775 (m) cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, [D₆]-DMSO): δ = 1.20 (s, 9H, COC(CH₃)₃), 3.5 (dd, J=12Hz, J=4Hz, 1H, HC5'), 3.6 (dd, J=12 Hz, J=4 Hz, 1H, HC5'), 3.9 (ddd, J=4 Hz, J=4 Hz, J=3 Hz, 1H, HC4'), 4.1 (dd, J=4 Hz, J=1 Hz, 1H, HC3'), 4.3 (dd, J=6 Hz, J=5 Hz, 1H, HC2'), 6.1 (d, J=6 Hz, 1H, HC1'), 8.2 (s, 1H, HC_{Pyr}), 11.1 (s, 1H, HN); ¹³C NMR (100 MHz, [D₆]-DMSO): δ = 26.9, 40.7, 61.9, 71.0, 74.9, 86.1, 87.0, 87.7, 103.6, 115.2, 130.3, 149.3, 149.7, 156.1, 182.0; HR-MS (ESI⁺): ber. für [C₁₇H₂₁O₅N₆Na]⁺: 414.1384, gef.: 414.1363.

2-Amino-7-(3,4-dihydroxy-5-hydroxymethyl-tetrahydro-furan-2-yl)-4-oxo-4,7-dihydro-3H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidine-5-carbonitril (125)

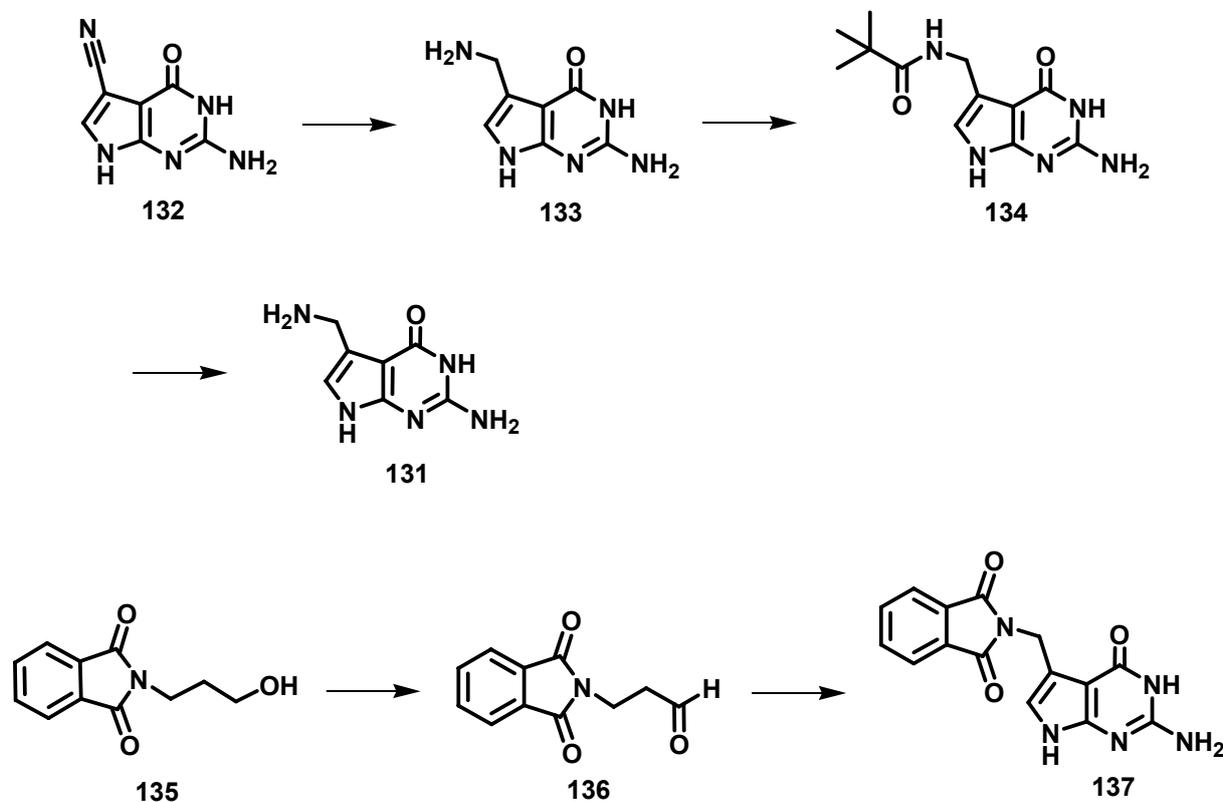
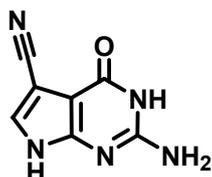
124 (18.0 mg, 0.046 mmol) wurde mit Ammoniumhydroxylösung (28% Ammoniak in Wasser, 4 mL) versetzt. Die Mischung wurde für 17 h bei 60°C gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Es resultierte ein farbloses Öl, das säulenchromatographisch (Ethylacetat/Methanol 7:1) aufgereinigt wurde. **125** (14 mg, 99%) wurde als weißer Feststoff erhalten.

R_f = 0.30 (Ethylacetat/Methanol 7:1); Smp: >260°C (Zersetzung); IR (neat): 3305 (br, s), 3219 (br, s), 2935 (m), 2229 (m), 1673 (s), 1633 (s), 1591 (m), 1561 (m), 1514 (w), 1426 (w), 1104 (m), 775 (m) cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, [D₆]-DMSO): δ = 3.50 (dd, J= 12Hz, J=4Hz, 1H, HC5'), 3.57 (dd, J=12 Hz, J=4 Hz, 1H, HC5'), 3.82 (ddd, J=4 Hz, J=4 Hz, J=4 Hz, 1H, HC4'), 4.03 (dd, J=5 Hz, J=4 Hz, 1H, HC3'), 4.28 (dd, J=6 Hz, J=5 Hz, 1H, HC2'), 6.05 (d, J=6 Hz, 1H, HC1'), 7.82 (s, 1H, HC_{PyT}), 10.86 (s, 1H, HN); ¹³C NMR (150 MHz, [D₆]-DMSO): δ = 61.9, 71.9, 74.8, 85.8, 87.0, 87.2, 99.99.3, 116.0, 128.2, 152.1, 154.7, 157.9; HR-MS (ESI): ber. für [C₁₂H₁₂O₅N₅]: 306.0837, gef.: 306.1739.

2-Amino-7-(3,4-dihydroxy-5-hydroxymethyl-tetrahydro-furan-2-yl)-4-oxo-4,7-dihydro-3H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidine-5-carboxamidin (Archaeosin, 126)

125 (10.0 mg, 0.03 mmol) wurde unter Schutzgas bei 0°C in Methanol (3 mL) gelöst und HCl-Gas für 4 h langsam in die Lösung eingeleitet. Die Mischung wurde für 24 h bei RT gerührt. Anschließend wurde unter Kühlung auf 0°C langsam Ammoniak (7N in Methanol, 5 mL) zugetropft und das Reaktionsgemisch für 17 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und das Reaktionsprodukt in Wasser aufgenommen. Die Lösung wurde filtriert und das Produkt durch präparative HPLC aufgereinigt (Puffer A: 0.1 M Triethylamin/Eisessig in Wasser, Puffer B: 0.1 M Triethylamin/Eisessig in 20% Wasser und 80% Acetonitril, Gradient: 100%A, 0%B → 80%A, 20%B in 45 min, Retentionszeit = 22.2 min, Nukleosil 100-7 C18). Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Der resultierende Feststoff wurde in Ethylacetat aufgenommen und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Dies wurde 5 Mal wiederholt. Es wurde Archaeosin **126** (3 mg) als farbloses Öl isoliert.

$R_f = 0.57$ (Isopropanol/Wasser/Essigsäure 5:1:1); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $[\text{D}_6]$ -DMSO): $\delta = 3.49$ (d, $J = 12\text{ Hz}$, 1H, HC5'), 3.56 (d, $J = 12\text{ Hz}$, $J = 4\text{ Hz}$, 1H, HC5'), 3.82 (m, 1H, HC4'), 4.03 (m, 1H, HC3'), 4.20 (d, $J = 6\text{ Hz}$, 1H, HC2'), 5.88 (d, $J = 6\text{ Hz}$, 1H, HC1'), 6.98 (s, 2H, NH₂), 8.15 (s, 1H, HC_{Pyr}), 9.95 (s, 1H, HN); HR-MS (ESI): ber. für $[\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{O}_5\text{N}_6]^+$: 323.1109, gef.: 323.1116.

5.2.6. Synthese der PreQ₁-Base2-Amino-4-oxo-4,7-dihydro-3H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidine-5-carbonitril (preQ₀, 132)

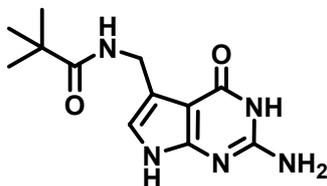
Natriummethanolat (3.57 g, 66 mmol) wurde in THF (abs., 60 mL) in einem ausgeheizten Dreihalskolben suspendiert. Bei 0°C wurde Methylformat (4.38 g, 77 mmol) mit einer Spitzenpumpe innerhalb 1 h zugetropft. Nach 15 min Rühren wurde Chloracetonitril (5 g, 66 mmol) innerhalb 1 h zugetropft. Es wurde 2 h bei 0°C und 2 h bei RT gerührt. Anschließend wurde Salzsäure (konz., 6 mL) langsam

zugetropft, so dass die Temperatur der rotfarbenen Lösung nicht über 10°C stieg. Nach Filtration wurde die Lösung *in vacuo* auf 15 mL eingengt und direkt mit einer Spitze in die nächste Reaktion eingesetzt. Aus der Lösung wurden 100 µL in einen separaten Kolben transferiert und das LM *in vacuo* entfernt. Man erhielt **132a** als dunkelrotfarbenes Öl.

Natriumacetat trihydrat (14 g, 110 mmol) und 2,6-Diaminopyrimidin-4-one (6.66 g, 5.28 mmol) wurden in Wasser (110 mL) gelöst und auf 50°C erhitzt. Mit einer Spitzenpumpe wurde bei dieser Temperatur **132a** innerhalb 1 h bei 50°C zugetropft und anschließend 1 h bei der Temperatur gehalten. Anschließend wurde die Suspension über Nacht bei RT gerührt. Das THF wurde dann *in vacuo* entfernt und die Suspension 1 h bei 110°C unter Rückfluss gekocht. Die Suspension wurde anschließend abfiltriert und der Filtrückstand mit Aceton und H₂O gewaschen. Der hellgelbbare Feststoff wurde in wässriger KOH-Lösung (6N, 50 mL) gelöst. Nach Zugabe von Aktivkohle wurde die Suspension filtriert und das Filtrat mit Salzsäure (30%) auf pH=6 gebracht. Der ausgefallene Feststoff wurde bei 50°C im Vakuum 24 h getrocknet und man erhielt **132** (4.4 g, 38%) als weißes Pulver.

IR (KBr): 3437 (m), 2229 (s), 1685 (s), 1510 (m), 1162 (w), 883 (w), 610 (w) cm⁻¹; Smp. >250°. ¹H NMR (600 MHz, [D₆]-DMSO): δ = 6.40 (s, NH₂); 7.63 (s, CH); 10.72 (s, NH); 12.00 (s, NH). ¹³C NMR (150 MHz, [D₆]-DMSO): δ = 78.0; 84.4; 97.6; 114.8; 126.6; 150.5; 152.7; 156.4. HR-MS (EI⁺): ber. für [C₇H₅N₅O]⁺: 175.0494, gef. 175.0479.

N-(2-Amino-4-oxo-4,7-dihydro-3H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-5-ylmethyl)-2,2-dimethyl-propionamid (134).



Methode 1:

7-Cyano-7-desazaguanin **132** (100 mg, 0.57 mmol) wurde in DMF (5 ml) suspendiert. Pd/C (20 mg) wurde hinzugefügt und die Reaktion unter H₂-Atmosphäre (50 psi) 24 h gerührt. Die Reaktionsmischung wurde abfiltriert, mit DMF gewaschen und die Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der rote Feststoff wurde in DMF (8 ml) gelöst und (Boc)₂O (73 mg, 0.33 mmol) und NEt₃ (46 µL, 0.33 mmol) hinzugefügt. Die Lösung wurde 16 h bei RT gerührt und anschließend mit wässriger NaHCO₃-Lösung (10 ml), CH₂Cl₂ (4 × 10 ml) gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit NaCl-Lösung (10 ml) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und der Feststoff säulenchromatographisch (MeOH/CHCl₃ 1:10) aufgereinigt. Man erhielt **134** (10 mg, 10%) als weißen Feststoff.

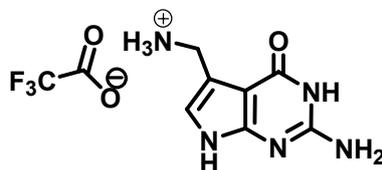
Methode 2:¹⁴⁷

137 (800mg, 2.64 mmol) wurde in EtOH (5 mL) suspendiert und Hydrazin (1.3 mL, 26.4 mmol) wurde zugegeben. Die Suspension wurde 2 h bei 80°C unter Rückfluss erhitzt und weitere 16 h gerührt. Das LM wurde *in vacuo* entfernt und man erhielt **131** als Rohprodukt. **131** wurde ohne Aufarbeitung in die nächste Stufe eingesetzt. **131** (200 mg, 1.12 mmol) wurde in DMF (8 mL) suspendiert und Triethylamin (93 µL, 0.67 mmol) zugegeben. Anschließend wurde (Boc)₂O (46 mg, 0.67 mmol) zugegeben und 8 h gerührt. Es wurde weiteres (Boc)₂O (146 mg, 0.67 mmol) und Triethylamin (93 µL, 0.67 mmol) zugegeben und weitere 24 h gerührt. Nach Zugabe von NaHCO₃ (50 mL) wurde die wässrige Phase mit CH₂Cl₂ (4 × 50 mL) extrahiert und die

vereinigten organischen Phasen mit ges. wässrige NaCl-Lösung (40 mL) gewaschen. Nach Trocknen über MgSO₄ wurde das LM *in vacuo* entfernt und man erhielt ein gelbfarbendes Öl (200 mg). Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (MeOH/CHCl₃ 1:10) gereinigt und man erhielt **134** (50 mg, 31%) als weißes Pulver.

R_f = 0.40 (CHCl₃/MeOH 5:1); M.p. >250°; IR (KBr): 3429 (s), 2978 (m), 2933 (m), 1673 (s), 1592 (s), 1535 (m), 1249 (w), 1169 (w) cm⁻¹. ¹H NMR (600 MHz, [D₆]-DMSO): δ = 1.33 (s, 3 × Me); 4.13 (s, CH₂); 6.08 (s, NH₂); 6.46 (s, HC); 7.04 (s, NH); 10.33 (s, NH); 10.79 (s, NH). ¹³C NMR (150 MHz, [D₆]-DMSO): δ = 27.7; 37.0; 78.1; 98.9; 113.7; 113.9; 116.3; 151.9; 152.7; 155.7; 160.1. MS (EI⁺): 178 (100), 279 (6, M+H⁺). HR-MS (EI⁺): ber. für [C₁₂H₁₇N₅O₃]⁺: 279.1331, gef.: 279.1359.

Trifluoro-acetate-2-amino-4-oxo-4,7-dihydro-3H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-5-ylmethyl-ammoniumsalz (PreQ₁, **131**)



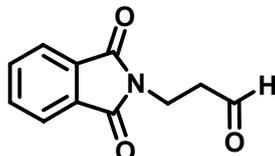
Boc-aminomethyl-desazaguanin **134** (13 mg, 0.046 mmol) wurde bei 0°C in Trifluoessigsäure (1 mL) gelöst, weitere 5 min bei 0°C und 2 h bei RT gerührt. Es wurde MeOH (5 mL) zugegeben und das LM *in vacuo* entfernt. Man erhielt **131** (13 mg, 96%) als hellgelbes Pulver.

R_f = 0.40 (*n*-BuOH/Essigsäure/H₂O 2:1:1); m.p. =220° (Zers.); IR (KBr): 3402 (m), 1684 (s), 1204 (s), 802 (w), 724 (m) cm⁻¹. ¹H NMR (200 MHz, CD₃OD): δ =4.15 (s, CH₂); 6.81 (s, HC). ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD): δ = 38.2; 100.9; 112.6; 119.3; 154.7; 155.5; 163.5. MS (EI⁺): 164 (100), 178 (20, M⁺). HR-MS (EI⁺): ber. für [C₇H₉N₅O]⁺: 179.0807, gef.: 179.0807.

X-ray Kristallstruktur von preQ₁ (131): C₂₀H₂₅F₉N₂₀O₁₀, M = 736.50, Eigenschaft: gelbes Plättchen, Kristallgröße: (mm) = 0.13 × 0.43 × 0.47, triklinisch, Raumgruppe P-1 (Nr. 2), a = 8.5290(17), b = 10.870(2), c = 16.646(3) Å, α = 88.01(3), β = 78.82(3), γ = 84.02(3)°, V = 1505.6(5) Å³, T = 295(2)K, Z = 2, λ(Mo-K_α) = 0.71073 Å, 5587 einzelne Reflektionen (R_i = 0.0174) und 3635 beobachtete Reflektionen mit I > 2σ(I). Die R-Werte sind R₁ = 0.0581 und wR₂ (F₂) = 0.1311 für die gemessenen Reflektionen mit 529 Parameters und 144 restraints. Die CF₃-Gruppe war aufgesplittet. Benutzte Programme: SHELXS-90 and SHELXL 97^{157, 158}.

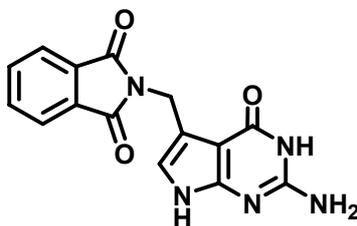
CCDC-265111 enthält die kristallographischen Daten. Diese Daten können kostenlos in dem *Cambridge Crystallographic Data Center* über www.ccdc.cam.ac.uk/conts/retrieving.html erhalten werden.

3-(1,3-Dioxo-1,3-dihydro-isoindol-2-yl)-propionaldehyd (136)¹⁰⁶



Zu einer Lösung vom Phthalimidpropanol (15 g, 24.6 mmol) in CH₂Cl₂ (300 mL) wurde Pyridiniumchlorochromat (30 g, 48.8 mmol) gegeben und 2 h gerührt. Die dunkelbraunfarbene Lösung wurde über Celite abfiltriert und das Filtrat *in vacuo* eingengt. Das dunkelbraunfarbene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Isohexan/Ethylacetat 1:1) gereinigt und man erhielt **136** (9 g, 66%) als weißes Pulver.

R_f = 0.45 (Hexan/Ethylacetat 1:2); M.p. 121-123°; IR (KBr): 3456 (m), 1768 (s), 1706 (s), 1441 (s), 1403 (s), 1369 (s), 1324 (m), 1031 (s), 721 (s), 532 (m) cm⁻¹. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ = 2.81 (t, CH₂ (2)); 3.98 (t, CH₂ (3)); 7.63-7.66 (m, 3 arom. H); 7.75-7.79 (m, 2 arom. H); 9.75 (s, HC (1)). ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ = 31.8; 42.5; 123.5; 132.1; 134.1; 168.1; 199.5. MS (EI⁺): 160 (100), 203 (8, M⁺). HR-MS (EI⁺): ber. für [C₁₁H₉NO₃]⁺: 203.0582, gef. 203.0573.

2-(2-Amino-4-oxo-4,7-dihydro-1H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-5-ylmethyl)-isoindole-1,3-dion (137)¹⁰⁶

Eine Lösung vom Aldehyd **136** (5 g, 24.6 mmol) in Acetonitril (80 mL) wurde auf 0°C gekühlt. Dimethylsulfoxid (1.84 mL, 25.9 mmol) wurde in 5 min zugegeben und Bromtrimethylsilan (3.35 mL, 35.9 mmol) wurde innerhalb von genau 5 min zugetropft. Die gelbfarbene Lösung wurde 4 h bei RT gerührt und eine feine Suspension von 2,4-Diamino-6-hydroxypyrimidin (3.1 g, 24.6 mmol) und Natriumacetat trihydrat (3.5 g, 25.1 mmol) in Wasser (80 mL) langsam zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde über Nacht gerührt. Die hellrosafarbene Suspension wurde abfiltriert und in der Glasfritte mit wenig H₂O und Aceton gewaschen und zur Trockene evakuiert. Der Rückstand wurde mit viel Methanol gelöst bzw. nachgespült. Das Lösemittel wird *in vacuo* entfernt und man erhielt **137** (6.5 g, 85%) als hellgelbfarbenen Feststoff.

M.p. >250°. IR (KBr): 3387 (bs), 2926 (m), 1770 (m), 1711s, 1627 (s), 1444 (m), 1361 (s), 1116 (w), 950 (w), 719 (m), 532 (m) cm⁻¹. ¹H NMR (200 MHz, [D₆]-DMSO): δ = 4.82 (s, CH₂-N); 6.06 (s, NH₂); 6.36 (s, HC); 7.75-7.90 (m, 4 arom. H); 10.21 (s, H-N); 10.80 (s, H-N). ¹³C NMR (150 MHz, [D₆]-DMSO): δ = 27.9; 28.3; 35.0; 37.9; 98.4; 114.0; 123.2; 123.4; 132.1; 134.6; 151.7; 152.8; 163.7; 168.2. HR-MS (FAB⁺): ber. für [C₁₄H₁₄N₄O₂]⁺: 310.0940, gef. 310.0943.

6. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------|--|
| (EI-)MS | (Electron Impact Ionisation-) Massenspektrum |
| (ESI-)MS | (Electrosprayionisation-) Massenspektrum |
| ACN | Acetonitril |
| ber. | berechnet |
| DC | Dünnschichtchromatographie |
| DCM | Dichlormethan |
| DME | Dimethoxyethan |
| DMF | Dimethylformamid |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| EE | Essigsäureethylester |
| eq. | Äquivalent(e) |
| FC | Flash-Chromatographie |
| gef. | gefunden |
| h | Stunde |
| HR-MS | Highresolution-Massenspektrum |
| Hz | Hertz |
| IR | Infrarotspektrum |
| konz. | konzentriert |
| L | Liter |
| LM | Lösungsmittel |
| MeOH | Methanol |
| min | Minuten |
| NMR | Kernresonanz-Spektrum |
| Pyr. | Pyridin |
| q | NMR: Quartett |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|----------------|-----------------------------|
| quant. | quantitativ |
| R | Rest |
| R _f | Retentionsfaktor |
| RT | Raumtemperatur |
| Smp. | Schmelzpunkt |
| T | Temperatur |
| t | Triplet |
| THF | Tetrahydrofuran |
| TFA | Trifluoressigsäure |
| Tol | Toluol |
| UV | ultraviolett |
| Vis | <i>visible</i> |
| w | IR: schwach (<i>weak</i>) |
| Zers. | Zersetzung |

7. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Thomas Carell für das sehr interessante und aktuelle Thema meiner Arbeit, für die großzügige intellektuelle und materielle Unterstützung, sowie seinen großen Ideenreichtum und Optimismus bedanken.

Herrn Prof. Dr. Paul Knochel danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Ina Pinnschmidt, Frau Gärtner und Frau Voß danke ich herzlich für die große Hilfsbereitschaft und Unterstützung in organisatorischen Belangen.

Mein besonderer Dank gilt der Massen- und NMR-Abteilung des Fachbereichs Chemie der Philipps-Universität Marburg und der Ludwig-Maximilians-Universität München. Herrn. Dr. W. Spahl und Frau Breitenstein danke ich für die Untersuchung der Massenproben. Weiterhin danke ich Dr. D. Stevenson und Frau C. Dubler der NMR-Abteilung.

Für das gewissenhafte Korrekturlesen des Manuskriptes dieser Arbeit danke ich Sophia Schor, Eva-Maria Jahn und Tobias Brückl.

Ich danke meinen Forschungspraktikanten Katrin Gutschmidl, Melanie Riederer, Laurin Melzig, Max Pitscheider und Volker Hickmann für ihre erfolgreiche und engagierte Mitarbeit.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe danke ich für die tolle Arbeitsatmosphäre. Mein besonderer Dank gilt meinen Laborkollegen Claudia Gräf, Dr. Guido Clever, Dr. Glenn A. Burley, Dr. Dave Hammond und Tobias Brückl.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie, die während des gesamten Studiums immer bedingungslos für mich da war und mir den nötigen Rückhalt gegeben hat.

8. Literaturverzeichnis

1. Watson, J. D.; Crick, F. H. C., Molecular structure of nucleic acids. *Nature* **1953**, 171, 737-738.
2. Watson, J. D.; Crick, F. H. C., Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. *Nature* **1953**, 171, 964-967.
3. Jackson, D. A.; Symons, R. S.; Berg, P., Inserting new genetic information. *Proc. Nat. Sci. USA* **1972**, 69, 2904.
4. Mullis, K. B., The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American* **1990**, 262, 56-65.
5. Venter, J. C.; et al., The sequence of the human genome. *Science* **2000**, 291, 1304.
6. Unrau, P. J.; Bartel, D. P., RNA-catalysed nucleotide synthesis. *Nature* **1998**, 395, (260-263).
7. Hagerman, P. J.; Amiri, K. M. A., Hammering away RNA. *Curr. Opin. Struc. Biol.* **1996**, 6, 317-321.
8. Hannon, G. J., RNA interference. *Nature* **2002**, 418, 244-251.
9. Voet, D.; Voet, J. G.; Pratt, C. W., *Biochemie*. Viley-VCH Verlag: Weinheim, 2002; Vol. 2.
10. Crick, F. H. C., On protein synthesis. *Symp. Soc. Exp. Biol.* **1958**, 12, 138-163.
11. Germanyk, Y. L.; Mironenko, V. I., *Nature* **1969**, 222, (192), 486-487.
12. Holley, R. W.; Apgar, G. A.; et al., Structure of a ribonucleic acid. *Science* **1965**, 147, 1462-1465.
13. Kim, S. H.; Suddath, F. L.; Quigley, G. J.; McPherson, A.; Sussman, J. L.; Wang, A. H. J.; Seeman, N. C.; Rich, A., Three-dimensional tertiary structure of yeast phenylalanine transfer RNA. *Science (Washington, DC, United States)* **1974**, 185, (4149), 435-40.
14. Hotchkiss, R. D., The quantitative separation of purines, pyrimidines, and nucleosides by paper chromatography. *J. Biol. Chem.* **1948**, 175, 315-332.

15. Limbach, P. A.; Crain, P. F.; McCloskey, J. A., Summary: the modified nucleosides of RNA. *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, (12), 2183-2196.
16. McCloskey, J. A.; Crain, P. F., The RNA modification database--1998. *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, (1), 196-197.
17. Woese, C. R., Bacterial evolution. *Microbiological Reviews* **1987**, *51*, (2), 221-71.
18. Woese, C. R.; Kandler, O.; Wheelis, M. L., Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1990**, *87*, (12), 4576-9.
19. Gregson, J. M.; Crain, P. F.; Edmonds, C. G.; Gupta, R.; Hashizume, T.; Phillipson, D. W.; McCloskey, J. A., Structure of the archaeal transfer RNA nucleoside G^{*}-15 (2-amino-4,7-dihydro-4-oxo-7-b-D-ribofuranosyl-1H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidine-5-carboximidamide (archaeosine)). *Journal of Biological Chemistry* **1993**, *268*, (14), 10076-86.
20. Björk, G. R., Transfer RNA modification in different organisms. *Chemica Scripta* **1984**, *26B*, 91-95.
21. McCloskey, J. A., Nucleoside modification in Archaeobacterial tRNA System. *Appl. Microbiol.* **1986**, *7*, 246-252.
22. Kushino, Y.; Ihara, M.; Yabusaki, Y.; Nishimura, S., Changes of post-transcriptional modification of wye base in tumor-specific tRNA^{Phe}. *Nucleic Acids Res.* **1982**, *10*, 6421-6432.
23. Strobel, M. C.; Abelson, A., Effect of intron mutations on processing and function of *Saccharomyces cerevisiae* SUP53 tRNA in vitro and in vivo. *Molecular and cellular biology* **1986**, *6*, (7), 2663-2673.
24. Kammen, H. O.; Spengler, S. J., Biosynthesis of inosinic acid in transfer RNA. . *Biochim. Biophys. Acta, Nucleic Acids and Protein Synthesis* **1970**, *213*, (2), 352-364.
25. Dungere, M.; Cedergren, R. J., Inosin. *Can. J. Biochem.* **1973**, *52*, 417-422.
26. Choffat, Y.; Suter, B.; Behra, R.; Kubli, E., Pseudouridine modification in the tRNA^{Tyr} anticodon is dependent on the presence, but independent of the size and sequence, of the intron in eukaryotic tRNA^{Tyr} genes. . *Mol. Cells Biol.* **1988**, *8*, (8), 3332-3337.

27. Foster, P. G.; Huang, L.; Santi, D. V.; Stroud, R. M., The structural basis for tRNA recognition and pseudouridine formation by pseudouridine synthase I. *Nature Struct. Biol.* **2000**, *7*, 23-27.
28. Johnson, P. F.; Abelson, J., The yeast tRNA^{Tyr} gene intron is essential for correct modification of its tRNA product. *Nature* **1983**, *302*, (5910), 681-687.
29. Björk, G. R., Biosynthesis and Function of modified nucleotides. In *tRNA: Structure, Biosynthesis, and Function*, RajBhandary, U. L., Ed. American Society for Microbiology, Washington, DC, 1995.
30. Kowalak, J. A.; McCloskey, J. A., The determination of posttranscriptional modification in RNA. In *Translational Apparatus*, Nierhaus, K., Ed. Springer-Verlag, Berlin, 1992; pp 79-88.
31. Sylvers, L. A.; Rogers, K. C.; Shimizu, M.; Ohtuska; Söll, D., A 2-Thiouridine Derivative in tRNA^{Glu} Is a Positive Determinant for Aminoacylation by *Escherichia coli* Glutamyl-tRNA Synthetase. *Biochemistry* **1993**, *32*, 3836-3841.
32. Tamura, K.; Takeshi, K.; Nishimura, S.; Ukita, T., Transfer of Valine into Rabbit Haemoglobin from Various Isoaccepting Species of Valyl-tRNA Differing in Codon Recognition. *Eur. J. Biochem* **1973**, *38*, 489-496.
33. Perret, V.; Garcia, A.; Puglisi, J.; Grosjean, H.; Ebel, J. P.; Florentz, C.; Giege, R., Conformation in solution of yeast tRNA^{Asp} transcripts deprived of modified nucleotides. *Biochimie* **1990**, *72*, (10), 735-43.
34. Björk, G. R., The role of modified nucleosides in tRNA interactions. In *Transfer RNA in protein synthesis*, Umberger, H. E., Ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, 1992; pp 23D-85D.
35. Murphy, F. V.; Ramakrishnan, V., Structure of a purine-purine wobble base pair in the decoding center of the ribosome. *Nat Struct Biol.* **2004**, *11*, (12), 1251-1252.
36. Murphy, F. V.; Ramakrishnan, V.; Malkiewicz, A.; Agris, P. F., The role of modifications in codon discrimination by tRNA^{Lys}UUU. *Nat Struct Biol.* **2004**, *11*, (12), 1186-1191.
37. Okada, N.; Harada, F.; Nishimura, S., Specific replacement of Q base in the anticodon of tRNA by guanin catalyzed by a cell-free extract of rabbit reticulocytes. *Nucleic Acids Res.* **1976**, *3*, 2593-2603.

38. Marks, T.; Farkas, W. R., Effects of a diet deficient in tyrosine and queuine on germ-free mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1997**, 230, (2), 233-237.
39. Boren, T.; Elias, P.; Samuelsson, C.; Clasesson, C.; Barciszewska, M.; Gehrke, C. W.; Kuo, K. C.; Lustig, F., Undiscriminating Codon Reading with Adenosine in the Wobble Position. *J. Mol. Biol.* **1993**, 230, 739-749.
40. Crick, F. H., Codon-anticodon pairing: the wobble hypothesis. *J. Mol. Biol.* **1966**, 19, (2), 548-555.
41. Ishikura, H.; et al., Structure of serine tRNA from Escherichia coli. I. Purification of serine tRNA's with different codon responses. *Biochem. Biophys. Acta* **1971**, 228, 471-481.
42. Sekiya, T.; Takeishi, K.; Ukita, T., Specificity of yeast glutamic acid transfer RNA for codon recognition. *Biochim. Biophys. Acta* **1969**, 182, (2), 411-426.
43. Stern, L.; Schulman, L. H., The role of the minor base N4-acetylcytidine in the function of the Escherichia coli noninitiator methionine transfer RNA. *J. Biol. Chem.* **1978**, 253, 6132-6139.
44. Grosjean, H.; Chantrenne, H., On codon- anticodon interactions. In *Molecular biology, biochemistry, and biophysics*, 1980; Vol. 32, pp 347-367.
45. Pieczenik, G., Predicting coding function from nucleotide sequence or survival of "fitness" of tRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1980**, 77, (6), 3539-3543.
46. Jukes, T. H., Possibilities for the Evolution of the Genetic Code from a Preceding Form. *Nature* **1973**, 246, 22-26.
47. Brierley, I.; Meredith, M. R.; Bloys, A. J.; Hagervall, T. G., Expression of a coronavirus ribosomal frameshift signal in Escherichia coli: influence of tRNA anticodon modification on frameshifting. *J. Mol. Biol.* **1997**, 270, (3), 360-373.
48. Carlson, B. A.; Kwon, S. Y.; Chamorro, M.; Oroszlan, S.; Hatfield, D. L.; Lee, B. J., Transfer RNA modification status influences retroviral ribosomal frameshifting. *Virology* **1999**, 255, (1), 2-8.
49. Masucci, J. P.; Gallant, J.; Lindsley, D.; Atkinson, J., Influence of the relA gene on ribosome frameshifting. *Molecular Genetics and Genomics* **2002**.
50. Björk, G. R.; Ericson, J. U.; Gustafsson, H.; Hagervall, T. G.; Jönsson, Y. H.; Wikström, P. M., *Annu. Rev. Biochem* **1987**, 56, 263-287.

51. Björk, G. R., Modification of stable RNA. In *Escherichia coli and Salmonella typhimurium. Cellular and Molecular Biology*, Neidhardt, F. C.; Ingraham, J. L.; Low, K. B.; Magasanik, B.; Schaechter, M.; Umberger, H. E., Eds. American Society for Microbiology, Washington, DC., 1987; Vol. 1., pp 719-731.
52. Persson, B. C., Modification of tRNA as a regulatory device. *Molecular microbiology* **1993**, 8, (6), 1011-6.
53. Rich, A.; RajBhandary, U. L., Transfer RNA: molecular structure, sequence, and properties. *Annual review of biochemistry* **1976**, 45, 805-60.
54. 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* **1972**, 11, (2), 301-8.
55. Kasai, H.; Kuchino, Y.; Nihei, K.; Nishimura, S., Distribution of the modified nucleoside Q and its derivatives in animal and plant transfer RNAs. *Nucleic Acids Research* **1975**, 2, 1931-1939.
56. Kasai, H.; Nakanishi, H.; Macfarlane, R. D.; Torgerson, D. F.; Ohashi, Z.; McCloskey, J. A.; Gross, H. J.; Nishimura, S., The Structure of Q* Nucleoside isolated from rabbit liver Transfer Ribonucleic Acid. *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, 98, (16), 5044-5046.
57. Yokohama, S.; Miyazawa, T.; Iitaka, Y.; Yamaizumi, Z.; Kasai, H.; Nishimura, S., Three-dimensional structure of hyper-modified nucleoside Q located in the wobbling position of tRNA. *Nature* **1979**, 282, 107-109.
58. Phillipson, D. W.; Edmonds, C. G.; McCloskey, J. A., Isolation and Structure Elucidation of an Epoxide Derivative of the Hypermodified Nucleoside Queuosine from *Escherichia coli* Transfer RNA*. *J. Biol. Chem.* **1987**, 262, 3462-3471.
59. Okada, N.; Nishimura, S., Enzymic 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.* **1977**, 4, (8), 2931-7.
60. Walden, T. L. J.; Howes, N.; Farkas, W. R., Purification and properties of guanine, queuine-tRNA transglycosylase from wheat germ. *J. Biol. Chem.* **1982**, 257, 13218-13222.

61. Haumont, E.; Droogmans, L.; Grosjean, H., Enzymatic formation of queuosine and galactosyl queuosine in yeast tRNAs microinjected into *Xenopus laevis* oocytes. *Eur. J. Biochem* **1987**, 168, 219-225.
62. Ibba, M.; Francklyn, C., Turning tRNA upside down: When aminoacylation is not a prerequisite to protein synthesis. *Proc. Nat. Sci. USA* **2004**, 101, (20), 7493-7494.
63. Sabina, J.; Soll, D., The RNA-binding PUA domain of archaeal tRNA-guanine transglycosylase is not required for archaeosine formation. *J. Biol. Chem.* **2006**, 281, (11), 6993-7001.
64. Blaise, M.; Becker, H. D.; Lapointe, J.; Cambillau, C.; Giege, R.; Kern, D., Glu-Q-tRNA^{Asp} synthetase coded by the *yadB* gene, a new paralog of aminoacyl-tRNA synthetase that glutamylates tRNA^{Asp} anticodon. *Biochimie* **2005**.
65. Blaise, M.; Becker, H. D.; Keith, G.; Cambillau, C.; Lapointe, J.; Giege, R.; Kern, D., A minimalist glutamyl-tRNA synthetase dedicated to aminoacylation of the tRNA^{Asp} QUC anticodon. *Nucleic Acids Res.* **2004**, 2004, (32), 9.
66. Morris, R. C.; Brown, K. G.; Elliott, M. S., The effect of queuosine on tRNA structure and function. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1999**, 16, (4), 757-774.
67. Meier, F.; Suter, B.; Grosjean, H.; Keith, G.; Kubli, E., Queuosine modification of the wobble base in tRNA^{His} influences 'in vivo' decoding properties. *The EMBO journal* **1985**, 4, (3), 823-7.
68. Morris, R. C.; Elliott, M. S., Queuosine Modification of tRNA: A Case for Convergent Evolution. *Mol. Genet. Metab.* **2001**, 74, 147-159.
69. Iwata-Reuyl, D., Biosynthesis of the 7-deazaguanosine hypermodified nucleosides of transfer RNA. *Bioorganic Chemistry* **2003**, 31, (1), 24-43.
70. Gaur, R.; Varshney, U., Genetic Analysis Identifies a Function for the queC (*ybaX*) Gene Product at an Initial Step in the Queuosine Biosynthetic Pathway in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **2005**, 187, (20), 6893-6901.
71. Swaijo, M. A.; Reddy, R. R.; Lee, B.; Van Lanen, S. G.; Bown, S.; de Crecy-Lagard, V.; Iwata Reuyl, D.; Schimmel, P., *Acta Cryst. Sec. F* **2005**, F61, 945-948.
72. Swaijo, M. A.; Reddy, R. R.; Lee, B.; Van Lanen, S. G.; Bown, S.; de Crecy-Lagard, V.; Iwata Reuyl, D.; Schimmel, P., Structural Biology and Crystallization Communications. *Acta Cryst. Sec. F* **2005**, F61, 945-948.

73. Reader, J. S.; Metzgar, D.; Schimmel, P.; de Crecy-Lagard, V., Identification of Four Genes Necessary for Biosynthesis of the Modified Nucleoside Queuosine. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, (8), 6280-6285.
74. Okada, N.; Noguchi, S.; Nishimura, S.; Ohgi, T.; Goto, T.; Crain, P. F.; McCloskey, J. A., Structure determination of a nucleoside Q precursor isolated from *E. coli* tRNA: 7-(aminomethyl)-7-deazaguanosine. *Nucleic Acids Res.* **1978**, *5*, (7), 2289-96.
75. Okada, N.; Noguchi, S.; Kasai, H.; Shindo-Okada, N.; Ohgi, T.; Goto, T.; Nishimura, S., Novel mechanism of post-transcriptional modification of tRNA. Insertion of bases of Q precursors into tRNA by a specific tRNA transglycosylase reaction. *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, (8), 3067-73.
76. Xie, W.; Liu, X.; Huang, R. H., Chemical trapping and crystal structure of a catalytic tRNA guanine transglycosylase covalent intermediate. *Nature Structural & Molecular Biology* **2004**, *11*, (7), 678.
77. Van Lanen, S. G.; Iwata-Reuyl, D., Kinetic Mechanism of the tRNA-Modifying Enzyme S-Adenosylmethionine:tRNA Ribosyltransferase-Isomerase (QueA). *Biochemistry* **2003**, *42*, (18), 5312-5320.
78. Slany, R. K.; Bosl, M.; Kersten, H., Transfer and isomerization of the ribose moiety of AdoMet during the biosynthesis of queuosine tRNAs, a new unique reaction catalyzed by the QueA protein from *Escherichia coli*. *Biochimie* **1994**, *76*, (5), 389-93.
79. Kinzie, S. D.; Thern, B.; Iwata-Reuyl, D., Mechanistic studies of the tRNA-modifying enzyme QueA: a chemical imperative for the use of AdoMet as a "ribosyl" donor. *Org. Lett.* **2000**, *2*, (9), 1307-10.
80. Slany, R. K.; Bosl, M.; Crain, P. F.; Kersten, H., A new function of S-adenosylmethionine: the ribosyl moiety of AdoMet is the precursor of the cyclopentenediol moiety of the tRNA wobble base queuine. *Biochemistry* **1993**, *32*, (30), 7811-7.
81. Mueller, S. O.; Slany, R. K., Structural analysis of the interaction of te tRNA modifying enzymes Tgt and QueA with a substrate tRNA. *FEBS letters* **1995**, *261*, 259-264.

82. Frey, B.; McCloskey, J.; Kersten, W.; Kersten, H., New function of vitamin B12: cobamide-dependent reduction of epoxyqueuosine to queuosine in tRNAs of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **1988**, 170, (5), 2078-82.
83. Kersten, H., The nutrient factor queuine: biosynthesis, occurrence in transfer RNA and function. *BioFactors* **1988**, 1, (1), 27-29.
84. Frey, B.; McCloskey, J.; Kersten, W.; Kersten, H., New function of vitamin B12: cobamide-dependent reduction of epoxyqueuosine to queuosine in tRNAs of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Journal of bacteriology* **1988**, 170, (5), 2078-82.
85. Barrick, J. E.; Corbino, K. A.; Winkler, W. C.; Nahvi, A.; Mandal, M.; Collins, J.; Lee, M.; Roth, A.; Sudarsan, N.; Jona, I.; Wickiser, J. K.; Breaker, R. R., New RNA motifs suggest an expanded scope for riboswitches in bacterial genetic control. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, 101, (17), 6421-6426.
86. Bergert, P.; Dandekar, T., Riboswitch Finder- a tool for identification of riboswitch RNAs. *Nucleic Acids Res.* **2004**, 32, W154-W159.
87. Desai, S. K.; Gallivan, J. P., Genetic Screens and Selections for Small Molecules Based on a Synthetic Riboswitch That Activates Protein Translation. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**.
88. Ptashne, M.; Gann, A., *Genes and Signals*. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, 2002.
89. Dykxhoorn, D. M.; Novina, C. D., Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **2003**, 4, 457-467.
90. McManus, M. T.; Sharp, P. A., Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nature Rev. Genetics* **2002**, 3, 737-747.
91. Carrington, J. C.; Ambros, V., Role of microRNAs in plant and animal development. *Science* **2003**, 301, 336-338.
92. Nahvi, A.; al., e., Genetic control by a metabolite binding mRNA. *Chem. Biol.* **2002**, 9, 1043-1049.
93. Winkler, W.; Nahvi, A.; Breaker, R. R., Thiamine derivatives bind messenger RNAs directly to regulate bacterial expression. *Nature* **2002**, 419, 952-956.

94. Mandal, M.; Boese, B.; Barrick, B.; Winkler, W. C.; Breaker, R. R., Riboswitches control fundamental biochemical pathways. *Cell* **2003**, 111, 747-756.
95. Winkler, W.; Nahvi, A.; Sudarsan, N.; Barrick, J. E.; Breaker, R. R., An mRNA structure that controls gene expression by binding S-adenosylmethionine. *Nature Struct. Biol.* **2003**, 10, 701-707.
96. Epshtein, V.; Mironov, A. S.; Nudler, E., The riboswitch-mediated control of sulfur metabolism in bacteria. *2003* **2003**, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (100).
97. Mandal, M.; Breaker, R. R., Adenine riboswitches and gene activation by disruption of a transcription terminator. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2004**, 11, 29-35.
98. Ohgi, T.; Kondo, T.; Goto, T., Total Synthesis Of Optically Pure Nucleoside Q. Determination of Absolute Configuration of Natural Nucleoside Q. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, 101, (13), 3629-3633.
99. Kasai, H.; Ohashi, Z.; Harada, F.; Nishimura, S.; Oppenheimer, N. J.; Crain, P. F.; Liehr, J. G.; Von Minden, D. L.; McCloskey, J. A., 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* **1975**, 14, (19), 4198-208.
100. Ohgi, T.; Kondo, T.; Goto, T., Total Synthesis Of Optically Pure Nucleoside Q. Determination of Absolute Configuration of Natural Nucleoside Q. *Journal of the American Chemical Society* **1979**, 101, (13), 3629-3633.
101. Kondo, T.; Okamoto, K.; Ohgi, T.; Goto, T., Syntheses of hypermodified nucleoside Q and its biosynthetic precursors preQ0 and preQ1. *Tetrahedron* **1986**, 42, (1), 207-13.
102. Kondo, T.; Ohgi, T.; Goto, T., Synthesis of 5-methyltubercidin and its α -anomer via condensation of the anion of 4-methoxy-5-methyl-2-methylthiopyrrolo [2,3-d] pyrimidine and 2,3,5-tri-O-benzyl-D-ribofuranosyl bromide. *Agricultural and Biological Chemistry* **1977**, 41, (8), 1501-7.
103. Kondo, T.; Okamoto, K.; Yamamoto, M.; Goto, T.; Tanaka, N., A total synthesis of cadeguomycin, a nucleoside antibiotic produced by *Streptomyces hygrosopicus*. *Tetrahedron* **1986**, 42, (1), 199-205.
104. Ohgi, T.; Goto, T., Stereochemistry of the cyclopenten side chain of Q. *Tetrahedron Lett.* **1976**, 5, 367-370.

105. Akimoto, H.; Imamiya, E.; Hitaka, T.; Nomura, H.; Nishimura, S., Synthesis of queuine, the base of naturally occurring hypermodified nucleoside (queuosine), and its analogs. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1: Organic and Bio-Organic Chemistry (1972-1999)* **1988**, (7), 1637-44.
106. Barnett, C. J.; Grubb, L. M., Total Synthesis of Q-Base (Queuine). *Tetrahedron* **2000**, 56, 9221-9225.
107. Trost, B. M.; Sorum, M. T., The Asymmetric Synthesis of (3S, 4R, 5S)-3-Amino-4,5-O-isopropylidenedioxycyclopentene. *Org. Proc. Res. & Dev.* **2003**, 7, 432-435.
108. Froehner, W.; Monse, B.; Braxmeier, T. M.; Casiraghi, L.; Sahagun, H.; Seneci, P., Regiospecific Synthesis of Mono-N-substituted Indolopyrrolocarbazoles. *Org. Lett.* **2005**, 7, (21), 4573-4576.
109. Vonlanthen, D.; Leumann, C. J., Hydroxycyclopentanone Derivatives from D-Mannose via Ring Closing Metathesis: An Improved Synthesis of a Key Intermediate of Tricyclo-DNA. *Synthesis* **2003**, 7, 1087-1090.
110. Tanaka, K.; Ogasawara, K., Enantioselective Synthesis of the Cyclopentene Segment of Queuosine. *Synthesis* **1996**, 219-222.
111. Fang, J.; Chering, Y., A Synthetic Approach to Neplanocin A and Queuosine: Unusual Natural Nucleosides containing Cyclopentenyl Rings. *J. Chem. Research* **1986**, 1568-1577.
112. Kim, K.-H.; Miller, M. J., An enantioselective synthesis of the cyclopentene fragment of nucleoside Q. *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 4571-4573.
113. Kilpatrick, M. W.; Walker, R. T., The nucleotide sequence of the tRNAMet from the archaebacterium *Thermoplasma acidophilum*. *Zentralblatt fuer Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene, Abt. 1, Originale C: Allgemeine, Angewandte und Oekologische Mikrobiologie* **1982**, 3, (1), 79-89.
114. Gregson, J. M.; Crain, P. F.; Edmonds, C. G.; Gupta, R.; Hashizume, T.; Phillipson, D. W.; McCloskey, J. A., Structure of the Archaeal Transfer RNA Nucleoside G^{*}-15 (2-Amino-4,7-dihydro-4-oxo-7-(β-D-ribofuranosyl-1H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidine-5-carboximidamide (Archaeosine)). *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, (14), 10076-10086.

115. Yaremchuck, A.; Tukalo, M.; Cusack, S., A Succession of Substrate Induced Conformational Changes Ensure the Amino Acid Specificity of *Thermus Thermophilus* Prolyl-tRNA Synthetase: Comparison with Hisidyl-tRNA Synthetase. *J. Mol. Biol.* **2001**, 309, 989-1002.
116. Dirheimer, G.; Keith, G.; Dumas, P.; Westhof, E., Primary, secondary, and tertiary structures of tRNAs. *tRNA: Structure, Biosynthesis, and Function* **1995**, 93-126.
117. Dock-Bregeon, A. C.; Westhof, E.; Giege, R.; Moras, D., Solution structure of a tRNA with a large variable region: yeast tRNA^{Ser}. *J. Mol. Biol.* **1989**, 206, (4), 707-22.
118. Stein, A.; Crothers, D. M., Conformational changes of transfer RNA. The role of magnesium(II). *Biochemistry* **1976**, 15, (1), 160-8.
119. Ishitani, R.; Nureki, O.; Fukai, S.; Kijimoto, T.; Nameki, N.; Watanabe, M.; Kondo, H.; Sekine, M.; Okada, N.; Nishimura, S.; Yokoyama, S., Crystal structure of archaeosine tRNA-guanine transglycosylase. *Journal of Molecular Biology* **2002**, 318, (3), 665-677.
120. Watanabe, M.; Matsuo, M.; Tanaka, S.; Akimoto, H.; Asahi, S.; Nishimura, S.; Katze, J. R.; Hashizume, T.; Crain, P. F.; McCloskey, J. A.; Okada, N., Biosynthesis of archaeosine, a novel derivative of 7-deazaguanosine specific to archaeal tRNA, proceeds via a pathway involving base replacement on the tRNA polynucleotide chain. *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, (32), 20146-20151.
121. Bai, Y.; Fox, D. T.; Lacy, J. A.; Van Lanen, S. G.; Iwata-Reuyl, D., Hypermodification of tRNA in Thermophilic archaea. Cloning, overexpression, and characterization of tRNA-guanine transglycosylase from *Methanococcus jannaschii*. *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, (37), 28731-8.
122. Ramasamy, K.; Joshi, R. V.; Robins, R. K.; Revankar, G. R., Total and stereospecific synthesis of cadeguomycin, 2'-deoxycadeguomycin, aracadeguomycin, and certain related nucleosides. *J. Chem. Perkin Trans. I* **1989**, 2375-2384.
123. Ovaa, H.; Codee, J. D. C.; Lastdrager, B.; Overkleft, H. S.; Gijsvert, A.; Boom van, J. H., A Stereoselctive Route to Cyclopenten. *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 7987-7990.

124. Ali, M. S.; Ramesh, K.; Borchardt, R. T., Efficient enantioselective syntheses of carbocyclic nucleoside and prostaglandin synthons. *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, (11), 1509-1512.
125. Cardillo, G.; Fabbroni, S.; Gentilucci, L.; Perciaccante, R.; Piccinelli, F.; Tolomelli, A., Highly Diastereoselective Allylic Azide Formation and Isomerization. Synthesis of 3(2'-Amino)- β -lactams. *Org. Lett.* **2005**, 7, (4), 533-536.
126. Gagnon, D.; Lauzon, S.; Godbout, C.; Spino, C., Sterically Biased 3,3-Sigmatropic Rearrangement of Azides: Efficient Preparation of Nonracemic α -Amino Acids and Heterocycles. *Org. Lett.* **2005**, 7, (21), 4769-4771.
127. Takasu, H.; Tsuji, Y.; Sajiki, H.; Hirota, K., Rearrangement of allylic azide and phenylthio groups of 3'-azido- or 3'-phenylthio-4',5'-dideoxy-5'deoxyarabinofuranosyluridines. *Tetrahedron* **2005**, 61, 11027-11031.
128. Feldman, A. K.; Colasson, B.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V., The Allylic Azide Rearrangement: Achieving Selectivity. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 13444-13445.
129. Chio, W. J.; Park, J. G.; Yoo, S. J.; Kim, H. O.; Moon, H. R.; Chun, M. W.; Jung, Y. H.; Jeong, K. S., Synthesis of D- and L-Cyclopentenone Derivatives Using Ring-Closing Metathesis: Versatile Intermediates for the Synthesis of D- and L-Carbocyclic Nucleosides. *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 6490-6494.
130. Padwa, A.; Sa, M. M., Intramolecular O-H Insertion Reaction of Azido Substituted Diazoesters and its Relevance to the Mechanism of the Allylic Azide Rearrangement. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, (29), 5087-5090.
131. VanderWerf, C. A.; Heasley, V. L., Studies on the Preparation and Rearrangements of Allylic Azides. *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, 88, 3534-3537.
132. Le Noble, W. J., The effect of pressure on the equilibrium of α - and γ -methylallyl azide. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 2451-2453.
133. Yu, H.; Chen, X., Aldolase-Catalyzed Synthesis of β -D-Galp-(1 \rightarrow 9)-D-KDN: A Novel Acceptor for Sialyltransferases. *Org. Lett.* **2006**, 8, (11), 2393-2396.
134. de la Fuente, J. M.; Pèñades, S., Synthesis of Lex-neoglycoconjugate to study carbohydrate-carbohydrate associations and its intramolecular interaction. *Tetrahedron Asymmetry* **2002**, 13, 1879-1888.

135. Ugarkar, B. G.; Castellino, A. J.; DaRe, J. M.; Kopcho, J. J.; Wiesner, J. B.; Schanzer, J. M.; Erion, M. D., Adenosine Kinase Inhibitors. 2. Synthesis, Enzyme Inhibition, and Antiseizure Activity of Diaryltubercidin Analogues. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 2894-2905.
136. Ugarkar, B. G.; Castellino, A. J.; Dandekar, T.; Ramirez-Weinhouse, M.; Kopcho, J. J.; Rosengren, S.; Erion, M. D., Adenosine Kinase Inhibitors. 3. Synthesis, SAR, and Antiinflammatory Activity of a Series of L-Lyxofuranoxyl Nucleosides. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 4750-4760.
137. Murai, Y.; Shiroto, H.; Ishizaki, T.; Iimori, T.; Kodama, Y.; Ohtsuka, Y.; Oishi, T., Synthesis and an X-ray Analysis of 2'-C, 3'-C and 5'-C-Methylsangivamycins. *Heterocycles* **1992**, *33*, 391-404.
138. Prakash, T. P.; Prhavc, M.; Eldrup, A. B.; Cook, P. D.; Carroll, S. S.; Olsen, D. B.; Stahlhut, M. W.; Tomassini, J. E.; MacCoss, M.; Galloway, S. M.; Hilliard, C.; Bhat, B., Synthesis and Evaluation of S-Acyl-2-thioethyl Esters of Modified Nucleoside 5'-Monophosphates as Inhibitors of Hepatitis C Virus RNA Replication. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, (4), 1199-1210.
139. Seela, F.; Soulimane, T.; Mersmann, K.; Juergens, T., 2,4-Disubstituted pyrrolo[2,3-d]pyrimidine a-D- and b-D-ribofuranosides related to 7-deazaguanosine. *Helv. Chim. Acta* **1990**, *73*, (7), 1879-1887.
140. Seela, F.; Peng, X., 7-Functionalized 7-Deazapurine Ribonucleosides Related to 2-Aminoadenosine, Guanosine, and Xanthosine: Glycosylation of Pyrrolo[2,3-d]pyrimidines with 1-O-Acetyl-2,3,5-tri-O-benzoyl-D-ribofuranose. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, (1), 81-90.
141. Klepper, F.; Jahn, E.-M.; Carell, T., Synthesis of the tRNA Nucleoside Queuosine using a Chiral Allyl-Azide Intermediate. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, in Druck.
142. Poupaert, J.; Bruylants, A.; Crooy, P., N-acyl- α -aminonitriles in the Pinner reaction. *Synthesis* **1972**, *11*, 622-624.
143. Gibson, C. L.; La Rosa, S.; Ohta, K.; Boyle, P. H.; Leurquin, F.; Lemacon, A.; Suckling, C. J., The synthesis of 7-deazaguanines as potential inhibitors of guanosine triphosphate cyclohydrolase I. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 943-959.

144. Migawa, M. T.; Hinkley, J. M.; Hoops, G. C.; Townsend, L. B., A two step synthesis of the nucleoside Q precursor 2-amino-5-cyanopyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-one(PreQo). . *Synthetic Communications* **1996**, *26*, (17), 3317-3322.
145. Gangjee, A.; Vidwans, A.; Elzein, E.; McGuire, J. J.; Queener, S. F.; Kisliuk, R. L., Synthesis, antifolate, and antitumor activities of classical and nonclassical 2-amino-4-oxo-5-substitued-pyrrolo[2,3-3]pyrimidines. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 1993-2003.
146. Barnett, C. J.; Grubb, L. M., Synthesis of pyrrolo[2,3-d]pyrimidines via cyclocondensation of beta-alkoxy. and beta-amino-alpha-bromoaldehydes. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 9741-9745.
147. Kotch, F. W.; VSidorov, V.; Lam, Y.; Kayser, K. J.; Li, H.; Kaucher, M.; Davis, J., Water-mediated association provides an ion pair receptor. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 15140-15150.
148. Klepper, F.; Polborn, K.; Carell, T., Robust synthesis and crystal-structure analysis of 7-cyano-7-deazaguanine (PreQ0 base) and 7-(aminomethyl)-7-deazaguanine (PreQ1 base). *Helv. Chim. Acta* **2005**, *88*, (10), 2610-2616.
149. Borcherdig, R. T.; Scholtz, S. A.; Borchardt, R. T., Synthesis of Analogues of Neoplanocin A. *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 5457-5461.
150. Davis, F. A.; Qi, H.; Sundarababu, G., Application of Oxazolidinone α -Fluoro Amide Chiral Building Blocks in the Asymmetric Synthesis of Fluorinated Carbohydrates: 2-Deoxy-2-fluoropentoses. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 5303-5310.
151. Kutney, J. P.; Abdurahman, N.; Gletsos, C.; Vlattas, I.; , Total synthesis of indole and dihydroindole alkaloids. V. Total synthesis of dl-quebrachamine and dl-aspidospermidine. General entry into the aspidosperma alkaloids. *J. Am. Chem. Soc.* **1970** *92*, (6), 1727-1735.
152. Schwögler, A., Dissertation, ETH Zürich, 2000.
153. Siegert, C., Dissertation, Hamburg, 1999.
154. Kondo, T.; Okamoto, K.; Yamamoto, M.; Goto, T., A total synthesis of cadeguomycin. *Tetrahedron* **1986**, *42*, (1), 199-205.
155. Hewitt, C.; Seeberger, P. H., Rapid Synthesis of a Glycosylphosphatidylinositol-Based Malaria Vaccine Using Automated Solid-Phase Oligosaccharide Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 13434-13436.

156. Kaneko, T.; Aso, M.; Koga, N.; Suemune, H., Synthesis and EPR Studies of 2-N-tert-Butylaminoxypurine Derivatives. *Org. Lett.* **2005**, *7*, (2), 303-306.
157. Sheldrick, G. M.; SHELXS-90 University of Göttingen, 1990.
158. Sheldrick, G. M.; SHELXL-97 University of Göttingen, 1997.

Curriculum Vitae

Name: Florian Klepper

Geburtsdatum: 27. September 1978

Geburtsort: Darmstadt

Familienstand: ledig

Nationalität: deutsch

Schul. Laufbahn: 1989-1998 Edith-Stein-Schule, Gymnasium, Darmstadt

Akad. Laufbahn: 1998-2003 Chemiestudium an der Philipps-Universität Marburg
2003-2007 Promotion an der Philipps-Universität Marburg und
Ludwigs-Maximilians-Universität München in der Arbeits-
gruppe von Prof. Carell

Publikationen: F. Klepper, E.-M. Jahn, T. Carell, Synthesis of the tRNA
Nucleoside Queuosine using a Chiral Allyl-Azide Intermediate,
Angew. Chem. Int. Ed. **2007**, in Druck.
F. Klepper, K. Polborn, T. Carell, Robust synthesis and crystal-
structure analysis of 7-cyano-7-deazaguanine (PreQ₀ base) and 7-
(aminomethyl)-7-deazaguanine (PreQ₁ base), *Helv. Chim. Acta*
2005, 88, 10, 2610-2616.

Email: f.klepper(at)gmx.de

München, den 5. März 2007

Florian Klepper