

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

**Synthese neuer Reagenzien zur Untersuchung
wissenschaftlicher Fragen bezüglich der neuen
epigenetischen DNA Basen**

Barbara Agnes Steigenberger

aus

München

2016

Erklärung

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

Eidesstattliche Versicherung

Diese Dissertation wurde eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

Barbara Steigenberger, München den 07.03.2016

Dissertation eingereicht am:

07.03.2016

1. Gutachter:

Prof. Dr. T. Carell

2. Gutachter:

Prof. Dr. A. Hoffmann-Röder

Mündliche Prüfung am:

19.04.2016

Publikationsliste

Teile dieser Dissertation wurden bereits publiziert oder auf Konferenzen vorgestellt.

- [5] T. Pfaffeneder, F. Spada, M. Wagner, C. Brandmayr, S. K. Laube, D. Eisen, M. Truss, J. Steinbacher, B. Hackner, O. Kotljarova, D. Schuermann, S. Michalakis, O. Kosmatchev, S. Schiesser, B. Steigenberger, N. Raddaoui, G. Kashiwazaki, U. Müller, C. G. Spruijt, M. Vermeulen, H. Leonhardt, P. Schär, M. Müller & T. Carell;
Tet oxidizes thymine to 5-hydroxymethyluracil in mouse embryonic stem cell DNA, *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10*, 574-81.
- [4] A.S. Schröder, J. Steinbacher, B. Steigenberger, F.A. Gnerlich, S. Schiesser, T. Pfaffeneder, T. Carell;
Synthesis of a DNA Promoter Segment Containing All Four Epigenetic Nucleosides: 5-Methyl-, 5-Hydroxymethyl-, 5-Formyl-, and 5-Carboxy-2'-Deoxycytidine
Angew. Chem. Int. Ed. **2014**, *53*, 315-8.
- [3] S. Serdjukow, F. Kink, B. Steigenberger, M. Tomas-Gamasa, T. Carell;
Synthesis of γ -labeled nucleoside 5'-triphosphates using click chemistry;
Chem. Commun. **2014**, *50*, 1861-1863.
- [2] S. Schiesser, T. Pfaffeneder, K. Sadeghian, B. Hackner, B. Steigenberger, A.S. Schroeder, J. Steinbacher, G. Kashiwazaki, G. Höfner, K.T. Wanner, C. Ochsenfeld, T. Carell;
Deamination, Oxidation and C-C bond Cleavage Reactivity of 5-Hydroxymethylcytosine, 5-Formylcytosine and 5-Carboxycytosine
J. Am. Chem. Soc. **2013**, *135*, 14593-9.
- [1] B. Steigenberger, S. Schiesser, B. Hackner, C. Brandmayr, S.K. Laube, J. Steinbacher, T. Pfaffeneder, T. Carell;
Synthesis of 5-Hydroxymethyl-, 5-Formyl-, and 5-Carboxycytidine-triphosphates and Their Incorporation into Oligonucleotides by Polymerase Chain Reaction
Org. Lett. **2013**, *15*, 366-369.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	III
Zusammenfassung	V
Summary	XI
Einleitung	1
1.1 Epigenetische Regulierung auf der DNA-Ebene	1
1.2 DNA-Methylierung und Demethylierung	2
1.2 Potentielle Funktion der oxidierten Cytosin-Derivate.....	3
1.3 Chemische Reagenzien für die Untersuchung von epigenetischen Modifikationen ...	5
1.3.1 DNA-Bausteine	5
1.3.2 Quantifizierung und Detektion.....	10
1.3.2.1 Isotopenmarkierte Verbindungen für die Massenspektrometrie	10
1.3.2.2 Chemische Reagenzien zur genom-weiten Detektion.....	11
1.3.3 Sequenzierung der epigenetischen Basen	14
1.3.3.1 Chemische Sequenzierung mit Bisulfit	14
1.3.3.4 Chemische Sequenzierung ohne Bisulfit.....	17
1.3.4 Reagenzien für proteomische Studien.....	18
1.3.4.1 Reaktivgruppen.....	19
1.3.4.2 Crosslinking.....	20
1.3.4.2 Spaltbare Reagenzien	21
1.3.4.3 Chemische Quantifizierungsreagenzien	22
Aufgabenstellung.....	25
Ergebnisteil.....	26
2.1 Synthese von epigenetischen Triphosphatbausteinen für die PCR	26
2.1.1 Synthese von <i>f</i> CTP und <i>ca</i> CTP und deren Einbau in PCR-Produkte	26
2.1.2 Synthese von <i>hmd</i> UTP und Einbau in PCR-Produkte	33
2.2 Synthese von ¹⁵N₂-markierten Nukleosidbausteinen	35
2.3 Synthese von Antigenen zur Entwicklung von polyklonalen Antikörpern	41
2.3.1 Synthese eines Antigens für polyklonale Antikörper gegen <i>f</i> C.....	42
2.3.2 Synthese eines Antigens für einen monoklonalen Antikörper gegen <i>hmU</i> ..	50

2.4 Synthese und Entwicklung von Reagenzien für die Proteomanalytik	55
2.4.1 Entwicklung einer DNA-Protein-pull down Sonde.....	55
2.4.2 Entwicklung eines Cystein-reaktiven Redoxsensors	64
2.4.2.1 Synthese von Reagenzien zur Identifizierung von reaktiven Cysteinen.....	69
2.4.2.2 Evaluierung der synthetisierten Cystein-reaktiven Reagenzien	77
Ausblick.....	80
Experimenteller Teil.....	81
3.1 Materialien und Methoden.....	81
3.1.1 Chemische Materialien und Methoden.....	81
3.1.2. Biochemische Materialien und Methoden.....	85
3.2 Chemische Synthesevorschriften	89
3.2.1 Synthese von epigenetischen Triphosphaten.....	89
3.2.2 Synthese von ¹⁵N-markierten epigenetischen Bausteinen	105
3.2.3 Synthese von Hapten-Molekülen für die Antikörpergenerierung	118
3.2.3.1 Haptene für Formylcytosin	118
3.2.3.2 Synthese eines Haptens für Hydroxymethylcytidin.....	123
3.2.4 Synthese von proteomischen Reagenzien	128
Abkürzungsverzeichnis	156
Literaturverzeichnis.....	159

DANKSAGUNG

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich gerne allen danken, die zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben.

Bei meinem Doktorvater *Prof. Dr. Thomas Carell* möchte ich mich herzlich für die spannende Themenstellung, das entgegengebrachte Vertrauen, viele Diskussionen, Aufmunterungen, lehrreiche Jahre und für die exzellenten Arbeitsbedingungen bedanken.

Prof. Dr. Anja-Hoffmann-Röder danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferats. Allen Mitgliedern der Prüfungskommission danke ich für die Evaluierung meiner Arbeit.

Dr. Markus Müller danke ich für ein allzeit offenes Ohr, Hilfe in wissenschaftlichen, organisatorischen und persönlichen Belangen, für seine Begeisterung und Diskussionsbereitschaft.

Slava Gärtner danke ich für ihre Hilfe in bürokratische Belangen. Ich möchte mich außerdem bei *Kristof Hufnagel* für seine synthetische Hilfe und die ansteckende Begeisterung für die synthetische Chemie bedanken. Bei den *Mitarbeitern der Zentralen Analytik* bedanke ich mich für das zuverlässige Messen meiner Proben. Bei *Sabine Voss* und *Kerstin Kurz* möchte ich mich für organisatorische sowie synthetische Unterstützung bedanken.

Der gesamten Epigenetik-Subgroup möchte ich meinen Dank für die tolle Zusammenarbeit aussprechen! Besonders möchte ich mich hier bei den Synthetikern *Dr. Stefan Schiesser*, *Dr. Felix Gnerlich* und *Arne Schröder* sowie bei *Dr. Toni Pfaffeneder*, *Dr. Benjamin Hackner* und *Dr. Caterina Brandmayr* für die gute Zusammenarbeit bedanken. Ebenso möchte ich mich bei der Proteomik-Subgruppe bedanken, hier vor allem bei *Michael Stadlmeier*, dessen Transformation von Synthetiker zum Massenspektrometriker ich *live* beobachten durfte☺. Bei *Silvia Laube* möchte ich mich für die Zusammenarbeit bei dem *fishing*-Projekt bedanken. Ein großes Dankeschön auch an *Rene Rahimoff* für die gute Zusammenarbeit auf dem Antikörperprojekt.

Bei meinen Kooperationspartnern *Dr. Felix Meissner*, *Sebastian Virreira-Winter*, *Dr. Richard Scheltema* und *Dr. Herbert Schiller* möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und lustige Glühweinabende bedanken!

Für ihre tatkräftige synthetische Unterstützung und Begeisterung bedanke ich mich bei meinen Praktikanten *Manuel Gailer*, *Monika Schildhauer*, *Daniel Dölken*, *Dimitra Pournara*, *Thomas*

DANKSAGUNG

Rösener, Ivica Zamarija, Sarah Schiffers und *Marc Weißhaupt*, sowie bei meinen Masterstudenten *Florian Kink, Sebastian Rappenglück* und *Michael Stadlmeier* herzlich bedanken. Ihr seid alle ein Teil dieser Arbeit und in einigen Molekülen verewigt ;).

Für das sorgfältige und gewissenhafte Korrekturlesen dieser Arbeit gilt größter Dank meinen lieben Kollegen *Dr. Sascha Serdjukow, Dr. Markus Müller, Michael Stadlmeier, Arne Schröder, Edris Parsa* und *Dr. Dorothea Matschkal*.

Beim gesamten Arbeitskreis Carell möchte ich mich für die unvergessliche Zeit in der Gruppe bedanken, v.a. für die allzeit hilfsbereite, kollegiale, nette Atmosphäre und die gemeinsamen Aktivitäten! Ein großes Dankeschön gilt besonders meinen Laborkollegen *Dr. Maria Tomas-Gamasa, Thomas Wildenhof, Dr. Sascha Serdjukow, Silvia Laube* und *Kerstin Kurz*. Wir hatten die beste Musik, den meisten Spass bei der Arbeit und die Chemie hat auch noch gestimmt ;) Insbesondere meiner 3-jährigen Bench-Nachbarin *Maria* möchte ich ein fettes Dankeschön für die nette, freundschaftliche Atmosphäre geben! Ebenso ein Dankeschön an die „neueren“ Laborkollegen *Rene Rahimoff, Miriam Wallner* und *Matthias Kurz*.

Für meine momentane sportliche Verfassung bin ich der *Laufgruppe* und der *Bouldergruppe* zu großem Dank verpflichtet! Ihr habt einen großen Ausgleich zur Candy-Bar und zur Chemie geschaffen und mich ungewollt in Form gehalten ;)

Für viele sportliche und sonstige Freizeitaktivitäten sowie den Austausch gepflegter spanischer Sprache möchte ich mich bei *Dr. Karola Gaststeiger, Dr. Ulrike Lischke* und *Olga Kotljarova* bedanken.

Bei der täglichen Kaffeerrunde mit Milchschaumschlacht möchte ich mich bei meinen Kaffeetanten *Sandra Wiedbrauk, Michael Stadlmeier, Kristof Hufnagel* und *Monika Schildhauer* bedanken!

Bei *Dr. Dorothea Matschkal* möchte ich mich für eine unvergessliche Kämmerchen-Zeit bedanken! Ich bin immer mit einem Lachen und guter Laune nach Hause gegangen.☺

Auch bei *Bastien Viverge* möchte ich mich für all die Unterstützung bedanken!

Meiner Familie und Freunden möchte ich für ihre Unterstützung während des Studiums und der Doktorarbeit danken!

Zusammenfassung

5-Methylcytosin ist eine epigenetische Modifizierung der DNA, die die Genaktivität in Säugetieren ohne Veränderung der kanonischen Basenabfolge reguliert. In den letzten Jahren wurden drei weitere potentiell epigenetische Modifikationen von Cytosin gefunden: Hydroxymethylcytosin (hmC), Formylcytosin (fC) und Carboxycytosin (caC), die durch die iterative Oxidation von mC durch die Tet-Enzyme entstehen. Man nimmt an, dass diese Basen Intermediate einer aktiven DNA-Demethylierung darstellen. Zudem wird momentan intensiv an der Frage geforscht, ob diese Basen eine eigenständige biologische Funktion besitzen. Diese und viele weitere Fragestellungen können mithilfe von organisch-synthetischen Reagenzien, die als Modellsysteme und Werkzeuge für diese Art von Untersuchungen dienen, beantwortet werden.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden natürliche und $^{15}\text{N}_2$ -isotopenmarkierte Triphosphat-Bausteine der potentiell epigenetischen Basen fC, caC und hmU über eine konvergente Syntheseroute synthetisiert. Die freien Nucleoside konnten in Ausbeuten von 7 – 15 % über eine Ein-Topfsynthese in die korrespondierenden Triphosphate überführt werden. Für das fCTP lieferte eine alternative Synthesestrategie das Triphosphat ausgehend von Formylcytidin-Monophosphat in einer Ausbeute von 70 %.

Bis zu diesem Zeitpunkt war es nicht möglich, lange Oligonukleotide mit mehreren dieser modifizierten Basen herzustellen. Diese Triphosphatbausteine konnten nun erfolgreich mittels PCR enzymatisch in DNA eingebaut werden (siehe Abb.0-1). Somit stehen im Arbeitskreis *Carell* lange Oligonukleotide für Aktivitätsassays mit Proteinen und *fishing*-Experimente zur Verfügung.

ZUSAMMENFASSUNG

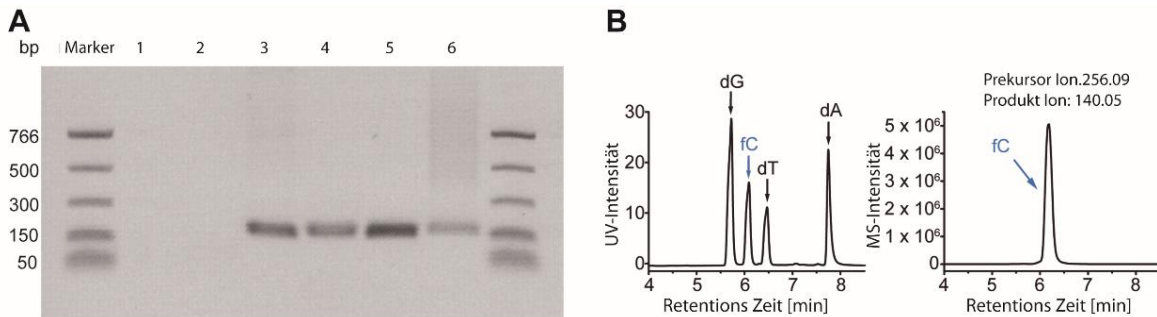
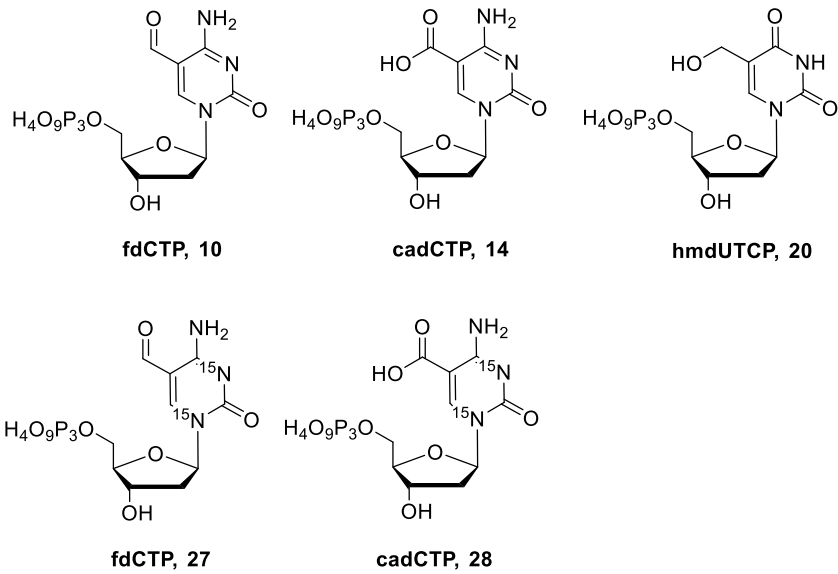
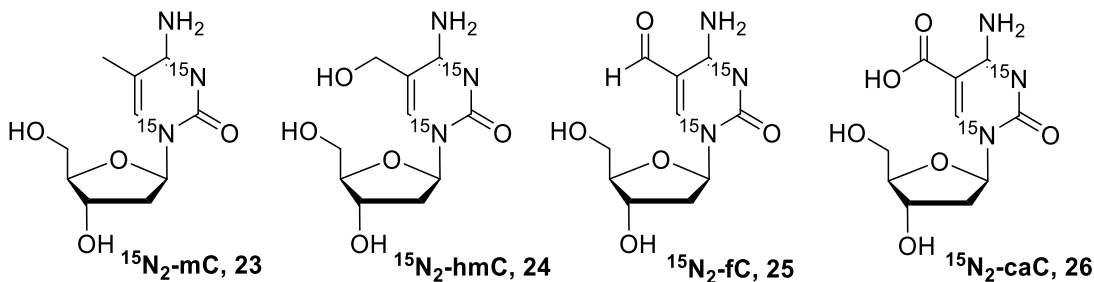


Abb. 0-1 Strukturformeln der synthetisierten Triphosphate. (A) Agarosegel von PCR-Produkten. Reihe 1: ohne Templat, Reihe 2. Ohne dC Derivat, Reihe 3: dCTP, Reihe 4: geschütztes ²H₂,¹⁵N₂-hmCTP (von Dr. S. Schiesser synthetisiert), Reihe 5: fCTP, Reihe 6: caCTP. (B) UV-Spur und MS-Spektrum eines verdauten fC-PCR Produkts.

Desweiteren wurden ¹⁵N₂-markierte Nucleoside, Phosphoramiditbausteine und Triphosphate hergestellt, mit deren Hilfe Quantifizierungen und mechanistische Studien, z.B. zur Deformylierung und Decarboxylierung durchgeführt werden können. Einige hergestellte Bausteine sind in Abb. 0-2 dargestellt.



ZUSAMMENFASSUNG

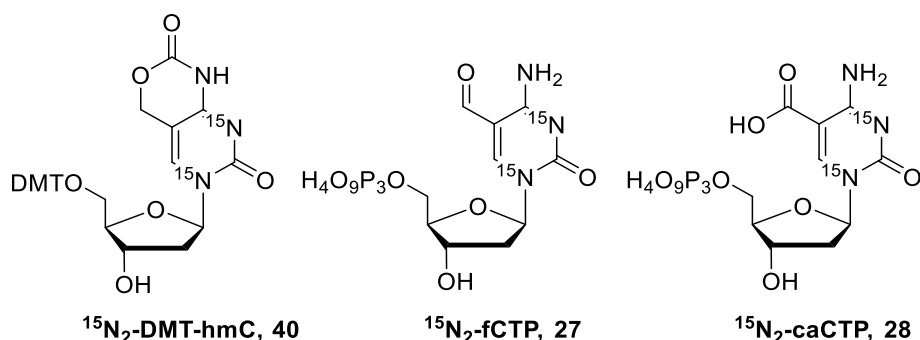


Abb. 0-2 Synthetisierte $^{15}\text{N}_2$ -markierte dC-Nucleoside. fC und caC wurden zu den korrespondierenden Triphosphaten umgesetzt und hmC, fC und caC mit den entsprechenden Schutzgruppen als Phosphoramidite bzw. Phosphoramiditvorstufen dargestellt.

Für eine spezifische Anreicherung der modifizierten Basen fC und hmU, z.B. zum Zweck der Sequenzierung, sollten Antikörper generiert werden. Die kommerziell erhältlichen polyklonalen Antikörper gegen fC und hmU sind nicht spezifisch genug für diese Anwendung. Für die Herstellung von Antikörpern gegen kleine Moleküle (Haptene), müssen diese an immunogene Trägerproteine gekuppelt werden. Es wurden verschiedene Haptene (Monophosphat-Bausteine, Ribonucleoside und 5'-PEG-Nucleoside) für Kupplungen an Trägerproteine hergestellt und verschiedene Kupplungsstrategien getestet.

Unter anderem wurde ein fC-Monophosphat und Nucleoside mit einem Carboxyl- oder Amin-PEG-Linker an der 5'-Position hergestellt. Es stellte sich hierbei heraus, dass die vielfach verwendete EDC-Kupplung nicht geeignet ist, um Konjugate hoher Modifikationsdichte herzustellen.

Daher wurde ein ribo-Formylcytidin-Derivat hergestellt, das über eine Periodatspaltung gekuppelt werden konnte. Die Formylgruppe des ribo-Formylcytidins wurde außerdem mit einem positiv geladenen Hydroxylaminreagenz derivatisiert, um die Aldehydfunktionalität von fC in ein immunogeneres Hapten **41** zu verwandeln. (Strukturformel Abb. 0-3). Nach der Immunisierung von Kaninchen mit KLH-Konjugaten wurde ein Antikörper-Serum mit hohen Titerwerten erhalten. Erste Tests zur Spezifität wurden mittels *Dot blot* Assay an PCR-Produkten durchgeführt und zeigten, dass der Antikörper nur an Formylcytosin-haltige DNA bindet, die vorher mit dem Hydroxylaminreagenz derivatisiert wurde. Die Stärke der Antikörperreaktion war abhängig von dem Gehalt an fC.

ZUSAMMENFASSUNG

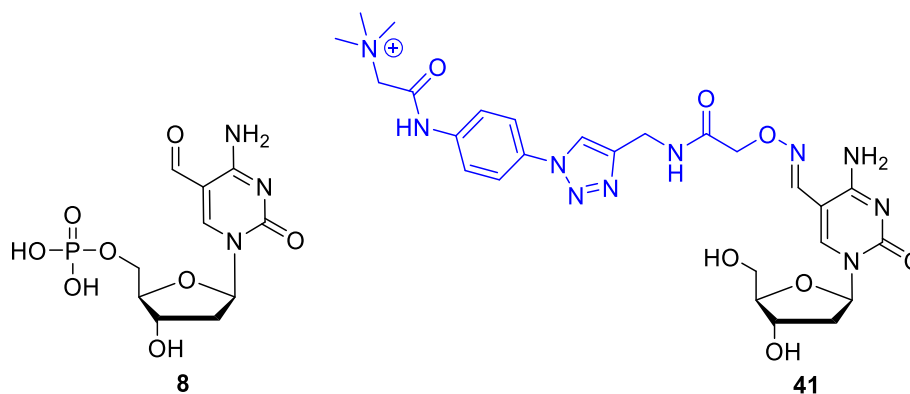


Abb. 0-3 Strukturformel des synthetisierten 5-Formyl-2'-desoxycytidin-monophosphat und des derivatisierten Formylcytidin.

Außerdem wurden hmU-Konjugate mit KLH, BSA und OVA für eine Kooperation mit dem *Helmholtz Zentrum* München und mit *Merck Millipore* erzeugt. Hierzu wurde über eine Appel-artige Reaktion ein Azid an die 5'-Position des hmU-Nukleosids angebracht. Mithilfe von *Click-Chemie* konnten anschließend verschiedene Linker zur Konjugation an Proteine angebracht werden. Es stellte sich heraus, dass sich Hapten **49c** mit einer NHS-Esterfunktionalität als Reaktivgruppe am *Linker* am Besten für die Kupplung an die Trägerproteine eignet. Die erfolgreiche Kupplung an KLH, BSA und OVA wurde durch UV-Vis, Gelelektrophorese und Massenspektrometrie bestätigt. Momentan werden mit diesen Konjugaten polyklonale Antikörper in Kaninchen (*Merck Millipore*) und monoklonale Antikörper in Ratten (*Helmholtz Zentrum* München) hergestellt.

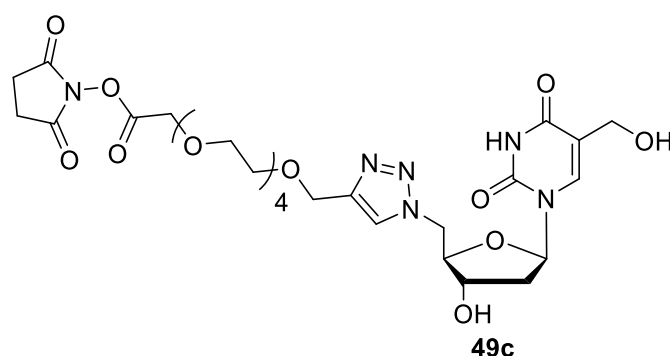


Abb. 0-4 Strukturformel des hmU-Haptens zur Kupplung an Trägerproteine.

Zudem sollten Bindungspartner der epigenetischen Basen gefunden werden, um deren biologische Funktion zu untersuchen. Daher wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit eine DNA-*pull-down* Sonde (siehe Abb. 0-5-A) für proteomische Experimente entwickelt. Diese Sonde besteht aus doppelsträngiger DNA mit der zu untersuchenden epigenetischen Modifikation, einem Biotin an der 5'-Position zur Anreicherung und einer Alkin-haltigen Base, an die über

ZUSAMMENFASSUNG

eine 1,3-dipolare Cycloaddition *Crosslinking* Reagenzien angebracht werden können. Synthetisierte *Crosslinking*-Reagenzien sind in Abb.0-5-B dargestellt. Diese *Crosslinking* Reagenzien enthalten als spaltbare Funktionalität eine Disulfidbrücke. Diese Sonde wurde beispielsweise in Studien zur Identifikation von Bindungspartnern des Hydroxymethyluracils (hmU) verwendet. Hierzu wurde eine synthetisierte hmU-haltige Sonde mit Zellextrakt inkubiert. Nach einer Anreicherung von kovalent gebundenen Interaktionspartnern konnte die Disulfidbrücke des Reagenzes gespalten werden. Somit wurde eine Markierung auf den interagierenden Proteinen hinterlassen, die die Identifizierung über Massenspektrometrie erleichterte.

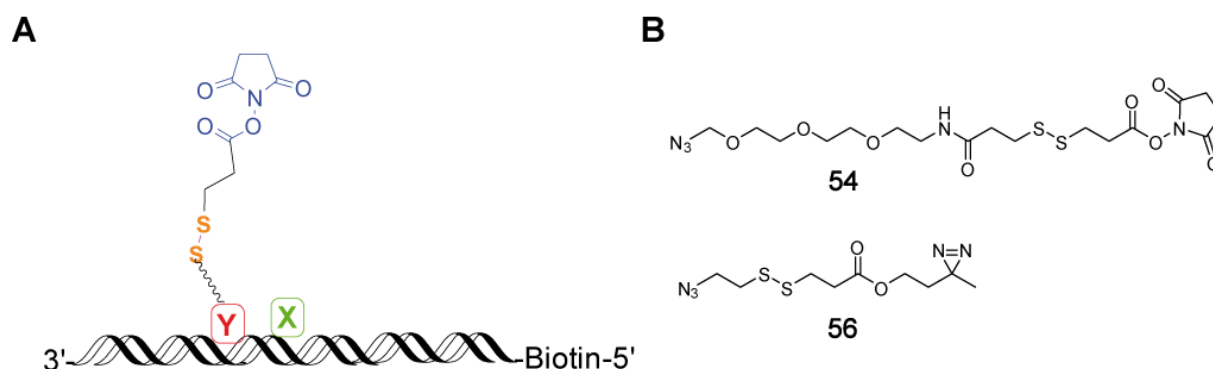


Abb. 0-5 (A) Schematische Darstellung der DNA-Protein-*pull down* Sonde. (B) Strukturformel der *Crosslinking*-Reagenzien für eine DNA-Protein-*pull down* Sonde.

In der Folge wurde zudem ein proteomisches Reagenz für die Detektion und Anreicherung von reaktiven, oxidierten Cysteinen in Kooperation mit der Gruppe *Mann* und *Zyklinski* entwickelt. Reaktive Cysteine spielen beispielsweise eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion. Für diese Anwendung wurde ein Reagenz (siehe Abb. 0-6) mit einer Iodacetamidgruppe als Reaktivgruppe für Cysteine, einem Desthiobiotin zur Anreicherung, einem kurzes PEG-Molekül zur Verbesserung der Wasserlöslichkeit und einer MS-spaltbare Gruppe entwickelt. Als MS-spaltbare Gruppe wurde eine Sulfoxidfunktionalität in Anlehnung an den Protein-Protein *Crosslinker* DSSO gewählt, die bei weitaus geringerer Energie als Peptidbindungen fragmentiert. Im Gegensatz zu DSSO wurde eine asymmetrische Bruchstelle entworfen, die nur zwei anstatt vier Fragmente bildet. Bei ersten Messungen unter *in source*-CID Bedingungen mit Peptiden eines BSA-Verdaus stellte sich heraus, dass das Reagenz in starker Abhängigkeit zum Ladungszustand des Peptids bricht. Die Bildung von nur zwei Fragmenten (Reporter und markiertes Peptid) konnte bestätigt werden. Die Affinitätsanreicherung in komplexen Proben funktionierte sehr gut und die Verwendung von Desthiobiotin anstatt dem üblicheren Biotin verbesserte die Rückgewinnung nach der Anreicherung mit Streptavidin *magnetic beads*. Um

ZUSAMMENFASSUNG

die Fragmentierung weitgehend unabhängig von diesem Ladungszustand zu machen, wurden weitere Derivate (nicht dargestellt) mit protonierbaren Amin- und Triazolfunktionalitäten synthetisiert und untersucht. Durch das Einführen dieser Funktionalitäten wurde das Reagenz in höhere Ladungszustände verschoben. Es wurde außerdem gezeigt, dass diese höheren Ladungszustände die MS-spaltbare Gruppe bei niedrigeren Energien brechen lassen. Dies gewährleistet, dass markierte Peptide intakt bleiben. Desweiteren ermöglicht die Bildung eines Reporters in Kombination mit dem Hinterlassen einer Markierung auf dem Peptid eine eindeutige Identifikation in hoch komplexen Proben, die einzigartig für Reagenzien mit dieser Anwendung ist.

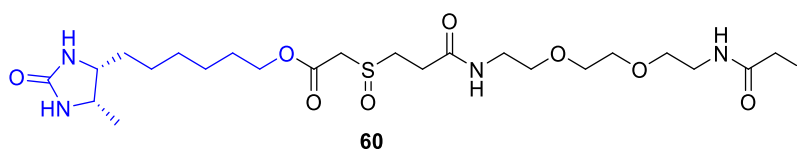


Abb. 0-6 Strukturformeln des optimierten Cystein-reaktiven Reagenzes.

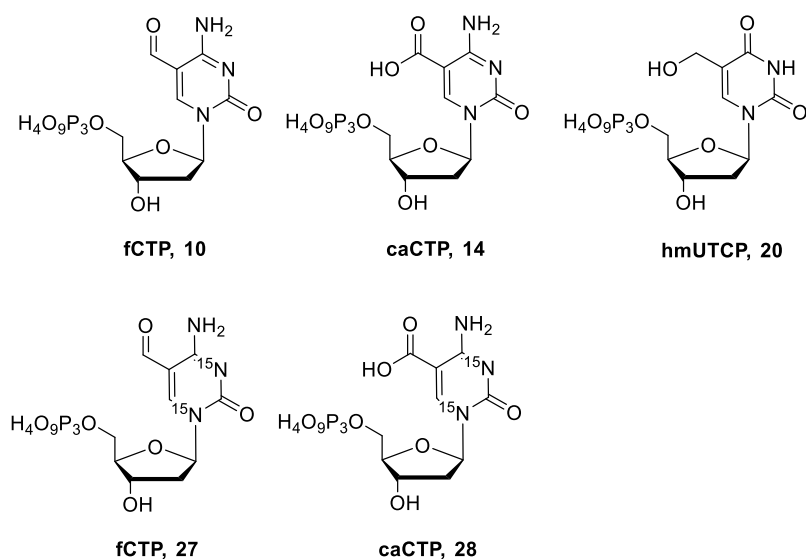
SUMMARY

Summary

5-Methylcytosine (mC) is an epigenetic modification found in mammalian DNA, which regulates gene activity without changing the sequence of the canonical bases. Recently, three more potential epigenetic modifications of cytosine, hydroxymethylcytosine (hmC), formylcytosine (fC) and carboxycytosine (caC), were discovered. These modifications result from the iterative oxidation of mC by Tet enzymes. They are considered to be intermediates in an active DNA demethylation pathway. Alternatively, they could play an independent biological role. Such questions can be addressed with the help of organic reagents that serve as model systems and tools for investigations.

As part of this work, natural and isotope-labelled triphosphate building blocks of the potential epigenetic bases fC, caC and hmU were synthesized *via* a convergent synthetic route. The key step in the synthesis was a *Stille* reaction on the 5-Iodo-2'-desoxycytidine that delivered the 5'-modified bases in high yields. Subsequently the nucleosides were converted into the corresponding triphosphates using a one-pot procedure. The products were obtained in a 7 – 12 % yield range. Furthermore, an alternative route using formylcytosine monophosphate as a starting material was applied to synthesize the triphosphate in 70 % yield.

With these modified triphosphates in hand, we were able to incorporate these bases into DNA by PCR (see figure 0-1). Therefore, long oligonucleotides became available for activity assays with proteins or for *fishing* experiments.



SUMMARY

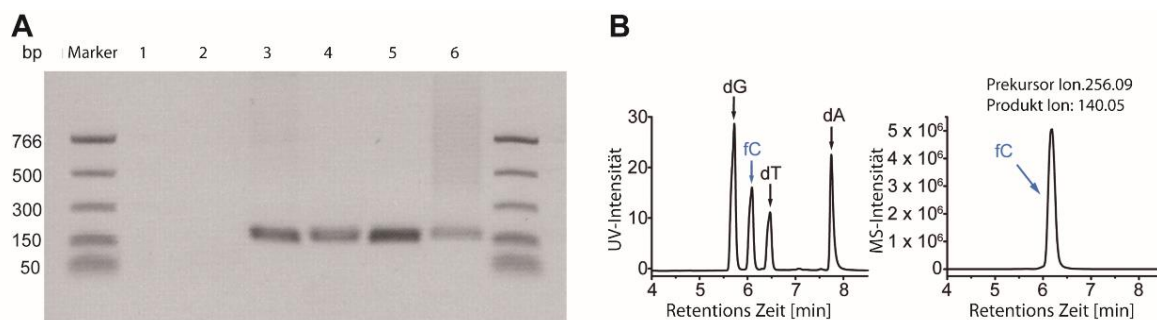


Abb. 0-1 Structural formula of the synthesized triphosphates. (A) agarose gel of PCR products. lane 1: without template, lane 2. without dC derivative, lane 3: dCTP, lane 4: protected $^2\text{H}_2$, $^{15}\text{N}_2$ -hmCTP (synthesized by *S. Schiesser*), lane 5: fCTP, lane 6: caCTP. (B) UV and MS spectra of a digested fC-PCR product.

Furthermore, $^{15}\text{N}_2$ -labelled nucleosides, phosphoramidites and triphosphates were produced in order to quantify the nucleosides and subsequently perform mechanistic studies (e.g. deformylation or decarboxylation of the modified cytosine). Some of the synthesized building blocks are shown in figure 0-2.

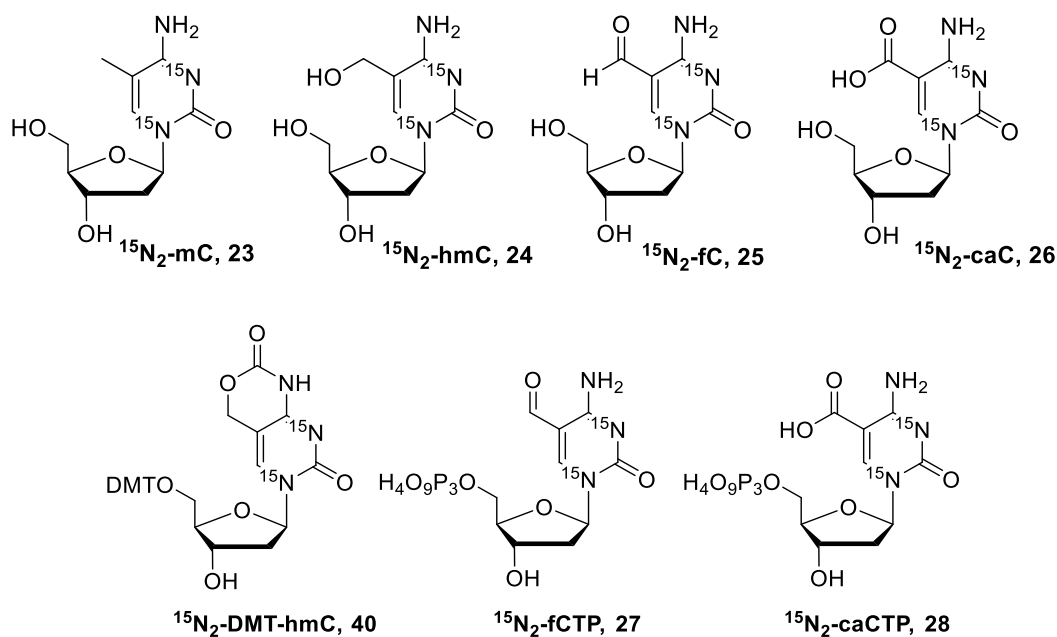


Abb. 0-2 Synthesized $^{15}\text{N}_2$ -labelled dC nucleosides. fC and caC were converted to the corresponding triphosphates and hmC, fC and caC were converted to the corresponding phosphoramidites or phosphoramidite precursors.

The commercially available polyclonal antibodies for fC and hmU are not specific enough for sequencing of these scarcely abundant bases. Therefore, we set out to develop new highly specific antibodies for these bases. Antibodies against small molecules are commonly generated by coupling the small molecule (hapten) to an immunogenic carrier protein. A selection of different haptens was synthesized and tested (monophosphate building block, ribo-nucleosides and 5'-PEGylated nucleosides) for coupling to carrier proteins and immunizations. During this

SUMMARY

investigation it became clear, that for the monophosphate building block and 5'-PEGylated nucleoside the common EDC-coupling strategy was not suitable for conjugations.

Therefore, a ribo-formylcytidine derivative was synthesized that could be conjugated to proteins *via* a periodate cleavage (*Active Motif*). Furthermore, the formyl functionality of the fC was derivatised with a positively charged hydroxylamine reagent for creating a more immunogenic hapten (structural formula in figure 0-X). After the immunization of rabbits with a KLH-conjugate a polyclonal antibody serum with high titers was obtained. The first dot blot assays using PCR products showed that the antibody binds only to formylcytosine containing DNA that had been derivatised with the hydroxylamine reagent before. The strength of the antibody reaction was dependent on the fC content, but in a 150 bp PCR product one to two fC were still detectable.

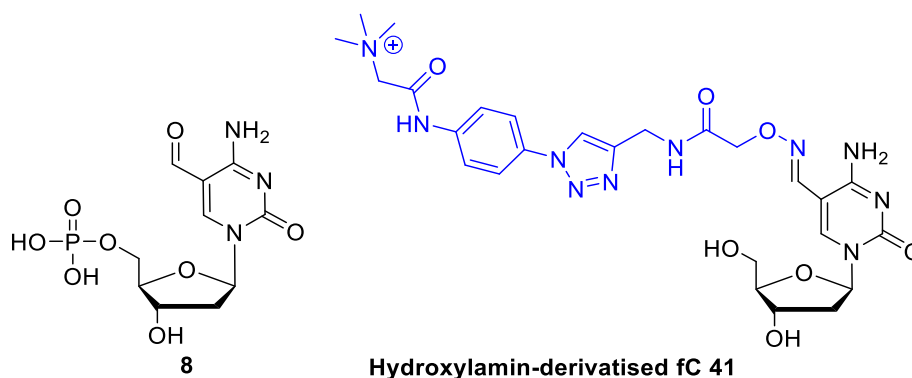


Abb. 0-3 Structural formula of formyl-2'-desoxycytidine-monophosphate and derivatised formylcytidin.

For a cooperation with the *Helmholtz Zentrum* Munich and *Merck Millipore* conjugates of KLH, BSA and OVA with hmU were generated. For this purpose acetyl-protected hmU was synthesized in a four step procedure. Subsequently, an azido functionality was introduced selectively in the 5'-position using a one-pot, Appel-type reaction. Following this, a selection of alkyne-PEG-linkers could be attached using click chemistry. Hapten **49c** with a NHS ester reactive group worked best for the conjugation to carrier proteins. The successful conjugation to KLH, BSA and OVA was proven by UV-Vis, gel electrophoresis and mass spectrometry (orbitrap). At the moment polyclonal and monoclonal antibodies are being generated by *Merck Millipore* and the *Helmholtz Zentrum* Munich.

SUMMARY

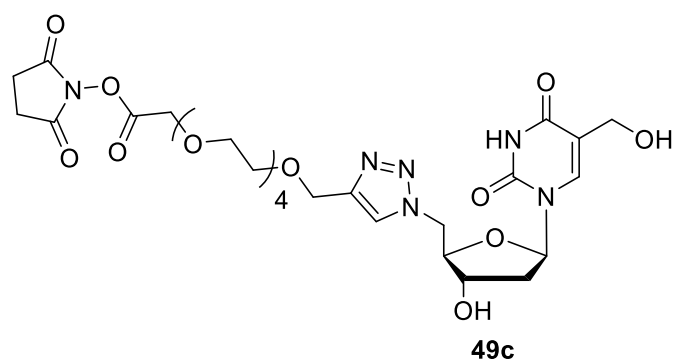


Abb. 0-4 Structural formula of the hmU-Haptens for conjugation to carrier proteins.

Furthermore, binding partners of the epigenetic bases needed to be identified. Therefore, in the course of this thesis a DNA-protein-pull down probe (see figure 0-5-A) for proteomic studies was developed. The probe consists of a double-stranded DNA with the modified base, a 5'-biotin for enrichment and an incorporated alkyne containing base. Using click chemistry, azido-crosslinking reagents were introduced to the alkyne base. Synthesized crosslinking reagents are displayed in figure 0-5-B. The crosslinking reagents featured a chemically cleavable disulfide bridge. This probe was then used for a proteomic study to identify binders of hmU. For this, the synthesized hmU-probe was incubated with cellular extracts. After enrichment of covalently trapped interaction partners the disulfide bridge was cleaved leaving a distinct label on the interacting proteins. This label facilitated analysis by mass spectrometry.

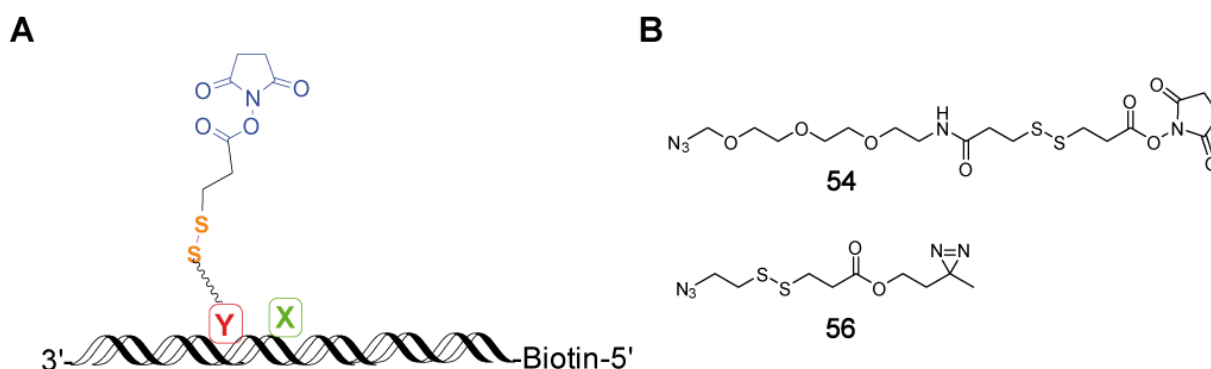


Abb. 0-5 (A) Depiction of the DNA-protein *pull down* probe. (B) Structural formula of the synthesized crosslinking reagents for a DNA-Protein *pull-down* probe.

Consecutively a proteomic reagent for the detection and enrichment of reactive, oxidised cysteines was developed in cooperation with the *Mann* group (MPI for Biochemistry) and *Zychlinsky* lab (MPI Berlin). Reactive cysteines play an important role in signaling. A reagent with iodoacetamide as a reactive group for cysteines, desthiobiotin for enrichment, a PEG-chain for water solubility reasons and a MS-cleavable group was designed. Inspired by the

SUMMARY

literature-known protein-protein crosslinker DSSO, a sulfoxide as a MS-cleavable functionality was chosen. This functionality is cleaved *via* a sulfoxide pyrolysis at a lower energy than peptide bonds. In contrast to DSSO an asymmetric fragmentation side was designed that forms two instead of four fragmentation products. The first reagent is displayed in figure 0-6. First measurements under *in-source* CID conditions with peptides from a BSA digest showed that the reagent breaks in strong dependence to the charge state of the peptide. However, the hypothesized formation of only two fragments could be confirmed. The enrichment and recovery rate of desthiobiotin labelled peptides worked better than biotin in complex samples after making use of streptavidin magnetic beads.

In order to make the fragmentation independent from the charge state of the peptide, two more derivatives with amine- and triazole functionalities, which are protonated, were designed and investigated (figure 0-6). By adding these functionalities, the reagent and the labelled peptides were converted into higher charge states. It was shown that the MS-cleavable group fragments at lower energies. This ensures that labelled peptides stay intact. The formed reporter ion in combination with the label on the peptide enables an unambiguous identification of reactive cysteines in complex samples, which is unique for reagents with this application.

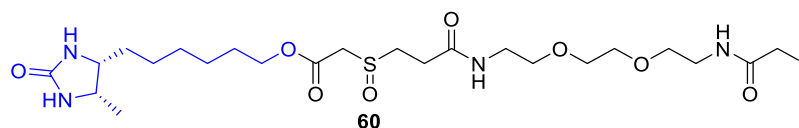


Abb. 0-6 Structural formula of the synthesized cysteine-reactive reagents.

Einleitung

1.1 Epigenetische Regulierung auf der DNA-Ebene

Die Epigenetik bestimmt die Genaktivität und Proteinexpression räumlich und zeitlich unabhängig von der klassischen Genregulation über die DNA-Sequenz und die Wirkung der Transkriptionsfaktoren. Dadurch ist es möglich, dass alle Zellen eines Organismus die gleiche genetische Information in Form der Basenabfolge in ihrer DNA besitzen und trotzdem unterschiedliche Phänotypen und Funktionen aufweisen.^[1] Nach *Egger* werden epigenetische Veränderungen ebenso mitotisch und meiotisch vererbt.^[2] Eine andere Definition des Begriff Epigenetik nach *Bird* schließt die Vererbbarkeit nicht zwingend mit ein, sondern bezeichnet die Epigenetik als dynamische und strukturelle Anpassung von chromosomalen Regionen. Durch diese Anpassung würde eine veränderte Genexpression kodiert, signalisiert oder konserviert werden.^[3] Epigenetische Regulation kann ohne eine Veränderung der DNA-Sequenz über chemische, post-translationale Modifizierung auf DNA-assoziierten und DNA-verpackenden Proteinen (Histonen) oder auf der DNA direkt vermittelt werden. Man geht davon aus, dass sich Histon- und DNA-Modifizierungen in einem komplexen Netzwerk untereinander beeinflussen. Histone können durch Methylierung, Acetylierung, Phosphorylierung, SUMOylierung oder ADP-Ribosylierung der Aminosäuren modifiziert werden. Dadurch wird meist die elektrostatische Wechselwirkung der Histone mit der DNA gesteuert und die Zugänglichkeit der DNA reguliert.^[4] DNA kann direkt durch Methylierung der 5-Position von Cytosin zu 5-Methyl-2'-desoxycytidin (mC) durch DNA-Methyltransferasen epigenetisch modifiziert werden. Die Modifikation mC ist seit langem bekannt und wird mit der Inaktivierung der Genexpression in Verbindung gesetzt.^[5] Diese Inaktivierung ist meist von statischer Natur, wie z.B. bei der genomischen Prägung,^[6] Stilllegung von Transposons^[7] und der X-Chromosom-Inaktivierung,^[8] kann aber auch dynamisch sein, wie bei der Zelldifferenzierung.^[9] Erst kürzlich wurde entdeckt, dass mC zu oxidierten Varianten prozessiert werden kann. Diese Modifikationen könnten die lang gesuchten Intermediate eines aktiven Demethylierungsmechanismus darstellen oder eine eigenständige epigenetische Rolle besitzen.^[10] Im Folgenden soll im Detail auf die Methylierung von Cytosin und auf darauf folgende dynamische Prozesse eingegangen werden.

1.2 DNA-Methylierung und Demethylierung

Die Methylgruppe von mC befindet sich in der großen Furche der Doppelhelixstruktur. Dort können Wechselwirkungen mit DNA-bindenden Proteinen stattfinden ohne die Basenpaarung mit dG und die Kodierung im Inneren der Helix zu stören. In Eukaryoten ist mC meist in palindromischen CpG-Dinukleotiden vorhanden, die sich in sogenannten CpG-Inseln befinden. CpG-Inseln sind DNA-Bereiche mit einem C/G-Gehalt von mind. 50 %, die in 57 – 72 % aller Promotorsequenzen gefunden werden.^[11] Die Inaktivierung von Genen kann über ^mCpG-bindende Proteine ablaufen, die die Bindung von Transkriptionsfaktoren verhindern oder Chromatin-modifizierende Enzyme rekrutieren.^[5b, 12] Eine Methylierung von Cytosin kann aber auch direkt die Anlagerung an Transkriptionsfaktoren und Chromatin-modifizierende Enzyme verhindern.^[13]

In Säugetieren sind drei aktive C5-Cytosin-Methyltransferasen bekannt, nämlich Dnmt1, 3a und 3b, die die Methylierung an der C5-Position von Cytosin mithilfe des Co-faktors S-Adenosylmethionin (SAM) katalysieren.^[14] Bei der Replikation sorgt die Erhaltungs- (*maintenance*) Methyltransferase Dnmt1 dafür, dass ein neu synthetisierter Strang, dem ein methyliertes CpG-Dinukleotid gegenübersteht, ebenso methyliert wird.^[15] Dnmt3a und 3b fungieren als *de novo*-Methyltransferasen, die neue Methylierungsmuster bei der Differenzierung einführen.^[16]

Die Methylierung von Cytosin dient der statischen, langfristigen Repression von Genabschnitten. Nach der Befruchtung der Eizelle und bei der Bildung von Urkeimzellen werden diese Methylierungen zugunsten einer epigenetischen Reprogrammierung entfernt. Bei der Embryogenese findet man kurz nach der Befruchtung einen Großteil des Genoms unmethyliert vor. Im maternalen Genom vermutet man, dass eine fehlende *maintenance* Methylierung zu einer passiven Verdünnung der Methylierung über mehrere Zellteilungen führt. Währenddessen beobachtet man für das paternalen Genom schon vor der ersten Zellteilung eine Abnahme der Methylierung. Daher muss es sich um einen aktiven Demethylierungsprozess handeln.^[9] Die Aufklärung dieser aktiven Demethylierung ist Gegenstand aktueller Forschung.

Im Jahr 2009 wurde bei Untersuchungen des mC-Gehalts in Neuronen 5-Hydroxy-methyl-2'-desoxycytidin (hmC) als eine weitere enzymatisch generierte DNA-Base entdeckt.^[10a, 17] Die Base hmC ist ein fester Bestandteil der DNA von Säugetieren und mit mC assoziiert. Sie entsteht als Produkt der Oxidation von mC durch die Tet-Enzyme (Tet1-3, *ten eleven*

translocation, Fe(II)- und Oxoglutarat-abhängige Dioxygenasen). Nach *Wossidlo et al.* und *Iqbal et al.* kann der rapide Rückgang von mC im paternalen Genom bei der Embryogenese mit der Oxidation zu hmC erklärt werden. Folglich handelt es sich in diesem Zusammenhang nicht um eine Demethylierung von mC, sondern um eine Hydroxymethylierung von mC zu hmC.^[18] Im Anschluß an die Entdeckung von hmC wurden 5-Formyl-2'-desoxycytidin (fC) und ebenso 5-Carboxy-2'-desoxycytidin (caC) als weitere Produkte der Oxidation von mC in embryonaler Stammzell-DNA gefunden.^[10b, 10d, 19] Bis zu diesem Zeitpunkt wurden fC und caC als oxidative DNA-Schäden angesehen. Sie entstehen jedoch ebenso wie hmC durch iterative Oxidation von mC durch die Tet-Enzyme.^[10d, 19] Eine kürzliche Veröffentlichung der Gruppe *Carell* zeigte außerdem, dass die Tet-Enzyme ebenso in der Lage sind Thymidin (T) zu 5-Hydroxymethyl-2'-desoxyuridin (hmU) zu oxidieren.^[20]

1.2 Potentielle Funktion der oxidierten Cytosin-Derivate

Die biologische Funktion der nicht-kanonischen DNA-Basen hmC, fC, caC und hmU ist bisher ungeklärt. Aufgrund der gezielten, enzymatischen Bildung von hmC, fC und caC durch Oxidation vermutet man für diese Basen eine Rolle als Intermediate in einem aktiven Demethylierungsweg.

Grundsätzlich kann die Demethylierung von mC passiv oder aktiv ablaufen. Mit passiver Demethylierung ist eine „Auswaschen“ von mC gemeint, das dadurch zustande kommt, dass nach der Replikation nicht neu methyliert wird (keine *maintenance* Methylierung). Eine solche replikations-abhängige Verdünnung wurde z.B. im weiblichen Pronukleus durch zeit-abhängige Färbungen von mitotischen Chromosomen mit mC-, hmC-, fC- und caC-spezifischen Antikörpern gezeigt.^[21] Bei einer sowohl aktiven, als auch passiven Demethylierung wird hmC im Gegensatz zu mC im Gegenstrang von Dnmt1 nicht mehr als Substrat erkannt und daher nicht mehr erhaltungsmethyliert. Bei einer rein aktiven Demethylierung hingegen wird mC gezielt enzymatisch entfernt. Die aktive Demethylierung könnte über die Oxidation zu den Intermediaten hmC, fC und caC erfolgen. Die oxidierten Derivate könnten aktiv entweder durch einen direkten Bindungsbruch an der C5-Position oder mithilfe des DNA-Reparatur-Systems durch Basenexzisionsreparatur (BER) entfernt werden (siehe Abb. 1-1). Im Falle des BER-Weges wurde gezeigt, dass fC und caC direkt aus DNA mit dem Enzym Thymidin-DNA Glykosylase (TDG) ausgeschnitten werden können.^[19, 22] Im

Gegensatz dazu muss hmC zu hmU desaminiert werden, was dann zu einer hmU:G Fehlpaarung führt, aus dem hmU durch Glykosylasen entfernt werden kann.^[23] An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass hmU hauptsächlich durch eine Oxidation von Thymin durch die Tet-Enzyme und nicht durch die Desaminierung von hmC entsteht.^[20] Diese Oxidation liefert hmU:A Basenpaare. Die Demethylierung über BER wird kontrovers diskutiert, da eine abasischen Stelle (AP) als Intermediat entsteht, die für genomische Instabilität sorgen würde.

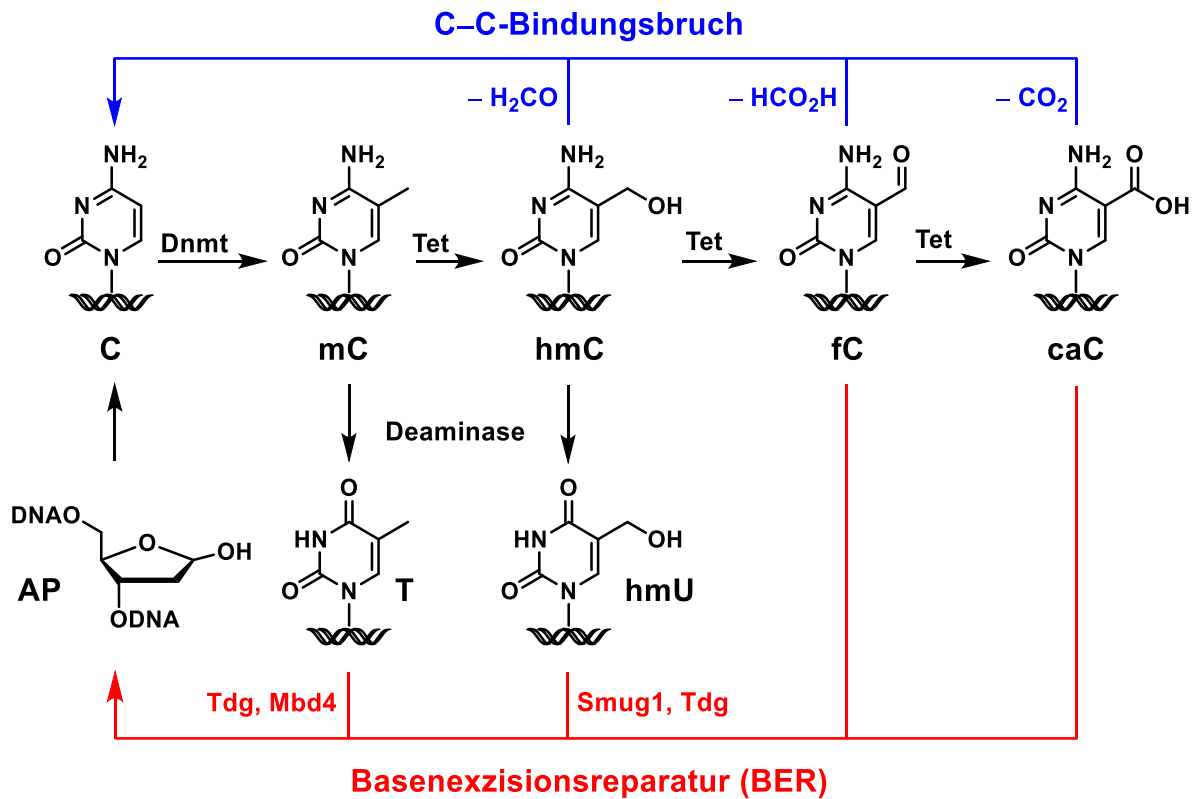


Abb. 1-1 Schematische Darstellung der Methylierung von C zu mC und der potentiellen Demethylierungswege über die Oxidation mit den Tet-Enzymen.

Weitaus eleganter wäre ein Bindungsbruch an der C5-Position, da ohne die Bildung von APs direkt mit Hilfe eines einzigen Enzyms fC und caC zu dC umgesetzt werden könnte. In diesem Falle würde zur Rückbildung von Cytosin Formaldehyd für hmC, Ameisensäure für fC und Kohlenstoffdioxid für caC abgespalten werden.^[24]

Desweiteren wäre auch denkbar, dass die oxidierten Cytosin-Derivate als spezifische DNA-Marker wirken, die die Transkription und die Chromatinstruktur beeinflussen. Proteomische Studien konnten zeigen, dass mC und hmC eine Reihe von spezifischen Proteinen rekrutieren, was auf diverse biologische Funktionen schließen lässt.^[25] Eine weitere Studie identifiziert fC-bindende Proteine, die eine wichtige Rolle in der Regulation der Transkription und der Chromatinstruktur spielen.^[26]

1.3 Chemische Reagenzien für die Untersuchung von epigenetischen Modifikationen

Viele der hier beschriebenen Entdeckungen wären ohne die Hilfe der organisch-synthetischen Chemie nicht möglich gewesen. Die Entdeckung der neuen potentiell epigenetischen Basen sowie vergangene und zukünftige Untersuchungen zur biologischen Funktion der DNA-Basen werden und wurden unter Zuhilfenahme von chemischen Reagenzien durchgeführt.

Triphosphat- und Phosphoramiditbausteine für den Einbau in Oligonukleotide ermöglichen die Kontruktion von Modell-Oligonukleotiden für enzymatische Untersuchungen. Durch enzymatische Assays konnten beispielsweise die Auswirkungen der Oxidation von mC auf die Transkription^[27], ihr mutagenes Potential^[28] oder allgemein die Aktivität der Modifikation als Substrate für Enzyme wie Tet^[29] oder Tdg^[22, 30] untersucht werden. Desweiteren geben Kristallstrukturen von Oligonukleotiden, welche die Modifikationen^[31] enthalten mit Proteinen Aufschluss über die Interaktionen in der Enzymtasche.^[29, 32] Durch proteomische Studien mit mC, hmC, fC oder caC enthaltenden Oligonukleotiden und entsprechenden Zellextrakten können Bindungspartner der oxidierten Cytosine identifiziert werden.^[20, 25]

Um das Vorkommen und die Mengen der epigenetischen Basen zu detektieren und quantifizieren zu können, werden isopenmarkierte sowie natürliche Nucleoside als Referenzverbindungen benötigt.^[33] Für mechanistische Studien zur Demethylierung bedarf es ebenso isopenmarkierter und natürlicher Nucleoside sowie Phosphoramiditbausteine.^[24]

Desweiteren können die epigenetischen Basen über spezifische Antikörper detektiert (z.B. Immunohistochemie IHC)^[18a, 21] und angereichert werden. Dies ist wichtig, um Genabschnitte bezüglich des Vorkommens der modifizierten Basen sequenzieren zu können (*Methylated* und *Hydroxymethylated DNA immunoprecipitation* meDIP^[34], hmeDIP^[35]).

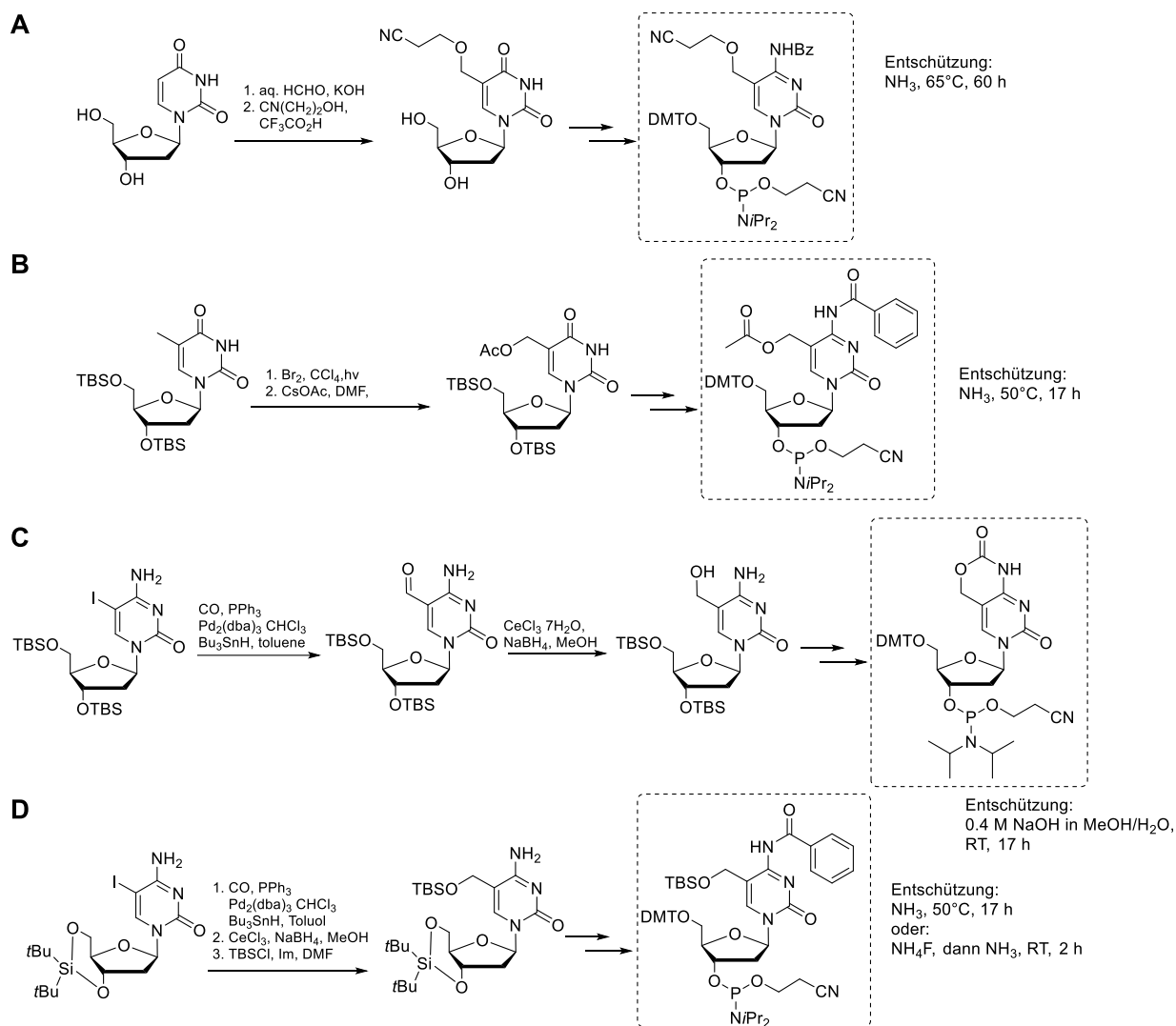
1.3.1 DNA-Bausteine

Um die neuen potentiell epigenetischen Modifikationen untersuchen zu können, werden Oligonukleotide mit diesen epigenetischen Basen benötigt. Die Synthese von Oligonukleotiden kann chemisch durch den Einbau von Phosphoramiditen *via* Festphasen-DNA-Synthese oder enzymatisch über die Triphosphate erfolgen.

Obwohl die oxidierten Cytosin-Modifikationen hmC, fC und caC erst seit 2009 bzw. 2011 in einem epigenetischen Kontext bekannt sind,^[10a, 17] wurden bereits früher entsprechende Phosphoramiditbausteine für die Festphasen-DNA-Synthese entwickelt, da diese

EINLEITUNG

Modifikationen als oxidative DNA-Schäden bekannt waren. An der Entwicklung der heute kommerziell erhältlichen Phosphoramiditbausteine war die Gruppe *Carell* maßgeblich beteiligt. Bekannte Phosphoramiditbausteine für hmC und deren Synthese sind in Schema 1-1 dargestellt.



Schema 1-1 Phosphoramiditbausteine für den Einbau von hmC in synthetische Oligonukleotide *via* Festphasen-DNA-Synthese. (A) Phosphoramiditbaustein von den Gruppen *Sowers* (1997) und *Schofield* (2011) mit einer Cyanoethylschutzgruppe, (B) Phosphoramiditbaustein der Gruppe *van Boom* (2001) mit Acetylschutzgruppe, (C) Phosphoramiditbaustein der Arbeitsgruppe *Carell* (2010). Die Hydroxy-Funktionalität und die exo-Aminogruppe sind als Carbamat geschützt, (D) Phosphoramiditbaustein der Arbeitsgruppe *He* (2011) mit einer TBS-Schutzgruppe.

Phosphoramiditbausteine für den Einbau von hmC in Oligonukleotide sind mit unterschiedlichen Schutzgruppenstrategien für die Hydroxyfunktionalität bekannt. Diese umfassen unter anderem eine Cyanoethylgruppe (*Sowers* 1997, *Schofield* 2011).^[36] Aufgrund

EINLEITUNG

von harschen Entschützungsbedingungen unter Einwirkung von wässrigem Ammoniak bei 65 °C für mehrere Tage ist dieser Phosphoramiditbaustein jedoch ungeeignet für die zusätzliche Derivatisierung mit basenlabilen Markierungen, wie Fluoreszenz- oder Biotinbausteinen. Der von *van Boom* 2001 entwickelte Phosphoramiditbaustein trägt eine Acetylschutzgruppe an der 5-Hydroxymethylgruppe.^[37] Bei der Entschätzung der Oligonukleotide entstehen durch eine nukleophile Substitution der Acetal-Gruppe mit Ammoniak Amin-Nebenprodukte. Deren Entstehung kann durch Behandlung mit NaOH in Dioxan und Wasser umgangen werden. Desweiteren wurde ein Phosphoramiditbaustein entwickelt, der eine TBS-Schutzgruppe enthält. Die TBS-Schutzgruppe kann nach der Inkorporation in Oligonukleotide mit Ammoniak über Nacht bei 55 °C oder unter milderen Bedingungen mit Ammoniumfluorid und einer anschließenden kurzen Ammoniakbehandlung bei Raumtemperatur entschützt werden.^[38] All diese Phosphoramiditbausteine werden in mehrstufigen Synthesen durch Reaktion von Paraformaldehyd mit dU oder durch radikalische Bromierung von Thymidin unter Ausbildung einer instabilen Bromthymidin-Zwischenstufe synthetisiert. Anschließend wird zum entsprechenden dC-Derivat aminiert. Der von *Münzel et al.* 2010 entwickelte Phosphoramiditbaustein benutzt eine elegante reduktive Stille-Kupplung mit CO-Gas und Tributylzinnhydrid an iodiertem Cytidin als Schlüsselschritt, um Hydroxymethyl-dC zu synthetisieren.^[39] Hierbei wird zunächst eine Formylgruppe an der 5-Position eingeführt, die anschließend zur Hydroxygruppe reduziert wird. Als gemeinsame Schutzgruppe für die 4-*exo*-Aminogruppe und die Hydroxygruppe wurde ein Carbamat verwendet, das relativ mild mit Natriumhydroxid entschützt werden kann und keine unerwünschten Nebenprodukte liefert. Literaturbekannte Phosphoramiditbausteine für fC und caC sind in Abb. 1-2 dargestellt.

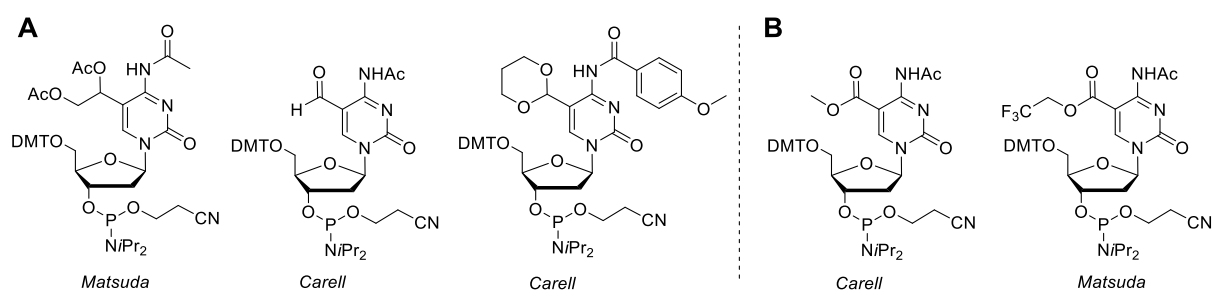


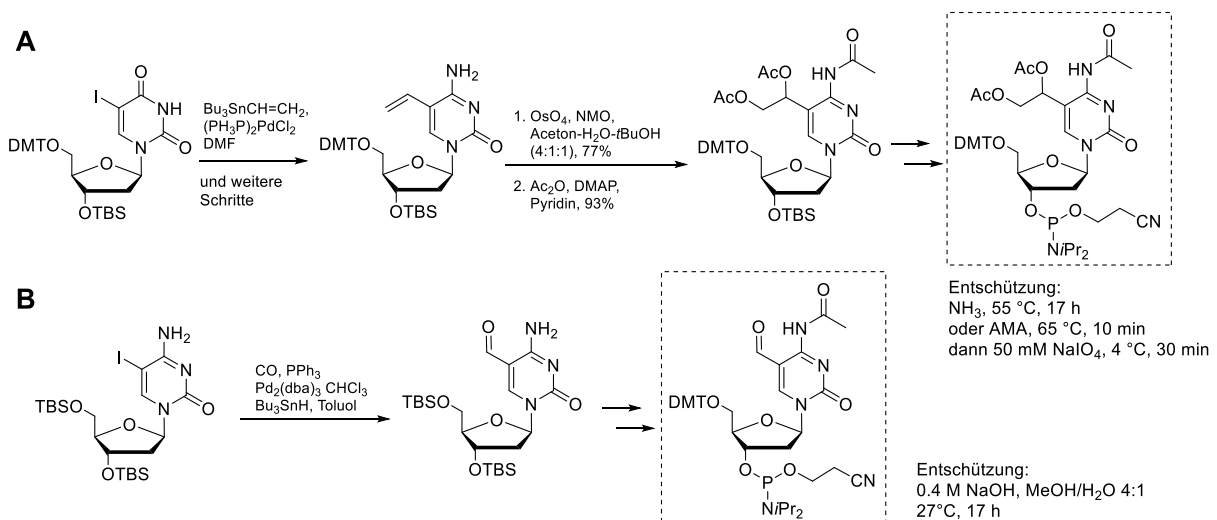
Abb.1-2 (A) Phosphoramiditbausteine für fC. (B) Phosphoramiditbausteine für caC.

Für fC waren zu Beginn dieser Arbeit zwei Phosphoramiditbausteine bekannt. Der von *Matsuda* 2001 entwickelte, kommerziell erhältliche Baustein maskiert die Formylgruppe als acetylgeschütztes Diol (Schema 1-2-A).^[40] Diese Funktionalität wird durch eine Stillekupplung mit einem Alkenstannan und anschließender Dihydroxylierung mit OsO₄ eingeführt. Die

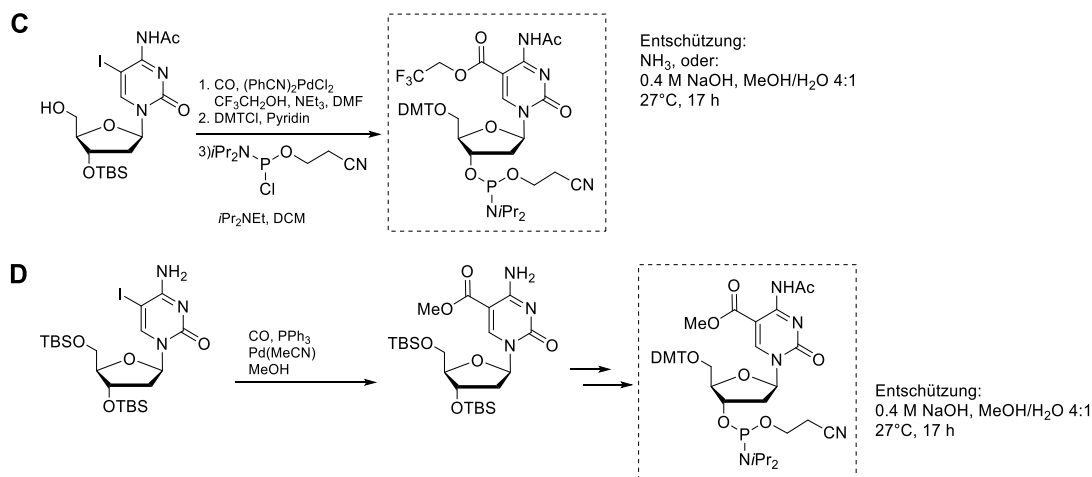
EINLEITUNG

Entschützung verläuft zweistufig durch Inkubation mit Ammoniak bei 55 °C für 17 h oder AMA bei 65 °C für 10 min und einer Periodatspaltung mit NaIO₄ zur Generierung der Formylgruppe. Oxidationsempfindliche Phosphoramidite können daher nicht gleichzeitig mit diesem Baustein in DNA eingebaut werden. Auch der Einbau von fC-Phosphoramiditbausteinen in Oligonukleotid ohne Schutzgruppe an der Formylgruppe wurde unternommen (Schema 1-2-B), was zu beträchtlichen Nebenprodukten bei der Entschützung führt (Schema 1-2-A).^[28] Während dieser Doktorarbeit wurde von *Arne Schröder* im Arbeitskreis *Carell* ein neuer Phosphoramiditbaustein für fC entwickelt, der die Formylgruppe als säurelabiles Acetal maskiert (siehe Abb. 1-2-A). In einer zweistufigen Entschützung unter milden Bedingungen mit NaOH oder mit wässrigem Ammoniak und anschließender Behandlung mit AcOH können fC-enthaltene Oligonukleotide sogar in Kombination mit den anderen epigenetischen Modifikationen mC, hmC und caC erhalten werden.^[41]

Nomura et al. entwickelten 1996 einen ersten Phosphoramiditbaustein für caC mit einer 5-Trifluorethylestergruppe (siehe Schema 1-2-C), die durch eine Pd-katalysierte Carbonylierung eingeführt wurde. Die Carbonylierungsreaktion ist problematisch, da als Nebenprodukt in größeren Mengen reduziertes N4-Ac-2'-desoxycytidin entsteht.^[42] Desweiteren kann zur Entschützung der Oligonukleotide kein Ammoniak benutzt werden, da sonst das korrespondierende Amid entsteht. Mildere Entschützungsbedingungen, mit z.B. 0.4 M NaOH oder K₂CO₃ in Methanol liefern jedoch keine vollständig entschützte freie Säure. Eine Weiterentwicklung und Optimierung stellen daher die von *Münzel et al.* und *Dai et al.* entwickelten Phosphoramiditbausteine dar (Schema 1-2-D), die durch eine Pd-katalysierte Carbonylierung in Methanol eine Methylestergruppe an 5-Iodcytidin anbringen, die mild mit NaOH oder K₂CO₃ in Methanol entschützt werden können.^[28]



EINLEITUNG



Schema 1-2 Phosphoramiditbausteine für den Einbau von fC und caC in synthetische Oligonukleotide *via* Festphasen-DNA-Synthese. (A) Phosphoramiditbaustein für fC der Gruppe Matsuda (2001), (B) Phosphoramiditbaustein für fC der Gruppe Carell (2011) ohne Schutzgruppe für die Formylgruppe, (C) Phosphoramiditbaustein für caC der Gruppe Matsuda (1997), (D) Phosphoramiditbaustein für caC der Arbeitsgruppen He und Carell (2011).

Alternativ können die epigenetischen Modifikationen enzymatisch mittels der entsprechenden Triphosphatbausteine in DNA eingebaut werden. Zu Beginn dieser Doktorarbeit waren die Modifikationen hmC und mC als Triphosphate bekannt und kommerziell erhältlich. Diese werden durch Phosphorylierung der entsprechenden Monophosphate, die aus natürlichen Quellen isoliert werden, gewonnen.

1.3.2 Quantifizierung und Detektion

Das globale Vorkommen sowie die basengenaue Detektion der neuen oxidierten Cytosin-Modifikationen können durch verschiedene Methoden erfasst werden. Diese Methoden umfassen häufig eine chemische Markierung oder Derivatisierung, bzw. die Reaktion mit spezifischen Antikörpern. Oft werden diese Prozesse mit der Massenspektrometrie kombiniert. Auf solche Detektionsmethoden soll im Folgenden eingegangen werden.

1.3.2.1 Isotopenmarkierte Verbindungen für die Massenspektrometrie

Massenspektrometrie in Kombination mit chromatographischer Separation (LC-MS) spielt eine wichtige Rolle bei der Entdeckung und der Identitätsbestimmung der neuen oxidierten Cytosine.^[10a, 10b, 10d, 19]

Um das Vorkommen und den absoluten Gehalt der epigenetischen Basen mit Hilfe der Massenspektrometrie bestimmen zu können, werden isotopenmarkierte Referenzverbindungen benötigt. Isotopologe besitzen die gleiche chemische Struktur, aber eine unterschiedliche Masse. Die chromatographischen Eigenschaften, Ionisierung und Fragmentierung sind fast identisch zu den zu analysierenden Nucleosiden.^[43] Durch Vergleich der Massenintegrale der natürlichen Verbindungen mit den isotopenmarkierten Verbindungen kann unter Verwendung von Kalibrierungskurven quantifiziert werden.

In Abb. 1-3 sind einige ¹⁵N- und D-markierten Isotopenstandards, die in der Gruppe *Carell* synthetisiert wurden, dargestellt.

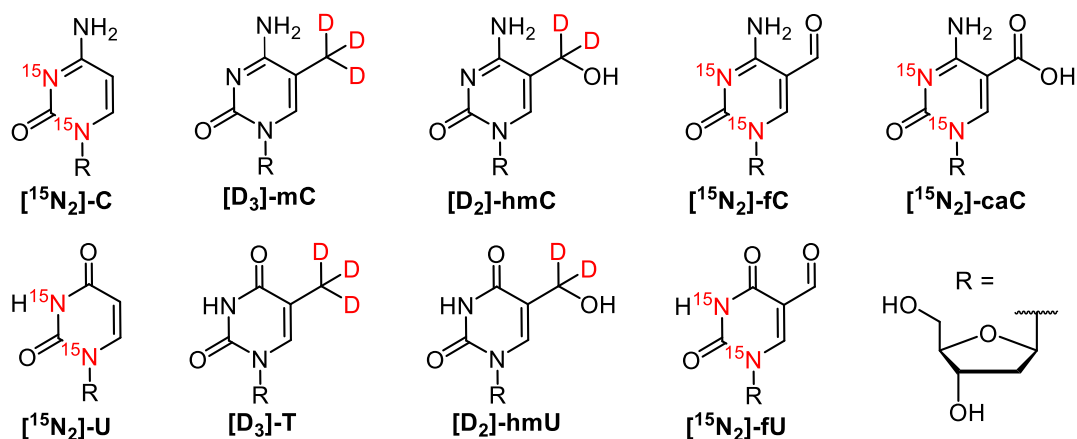


Abb. 1-3 Strukturformeln einiger epigenetischer LC-MS-Standards der Gruppe *Carell*. Die ¹⁵N- und D-Markierungen sind in rot markiert.

Synthesen von $^{15}\text{N}_2$ -markierten Nucleosiden von hmC, fC, hmU und fU und Untersuchungen der Fragmentierungseigenschaften wurden bereits vor dem Bekanntwerden ihrer epigenetischen Bedeutung entwickelt.^[44] Erste gezielte LC-MS-basierte Quantifizierungsstudien von hmC als epigenetische Modifikation in unterschiedlichen Geweben wurden von der Gruppe *Carell* veröffentlicht.^[33c] Der hmC-Gehalt variiert stark in Abhängigkeit vom Gewebe. Die höchsten Werte wurden in Stammzellen und im Gehirn gemessen. Eine neuere Studie der Gruppe *Carell* zeigt, dass im Gehirn 1.2 % aller Cytosine als hmC vorliegen. Das Vorkommen von fC und besonders caC ist generell weitaus geringer als das von hmC, dennoch konnten beide Varianten in Stammzellen nachgewiesen werden. Für fC gelang neuerdings auch eine Detektion und Quantifizierung im menschlichen Gehirn.^[33d]

1.3.2.2 Chemische Reagenzien zur genom-weiten Detektion

Aufgrund der geringen Abundanz der epigenetischen Basen, erleichtert eine Anreicherung durch chemische oder enzymatische Methoden oft die Detektion. Für eine chemische Anreicherung adressiert man Funktionalitäten der epigenetischen Base, wie z.B. die Hydroxyl- und Aldehydgruppen, die in den kanonischen Basen nicht vorkommen. Hilfreiche chemische Reagenzien hierfür sind in Abb. 1-4 dargestellt.

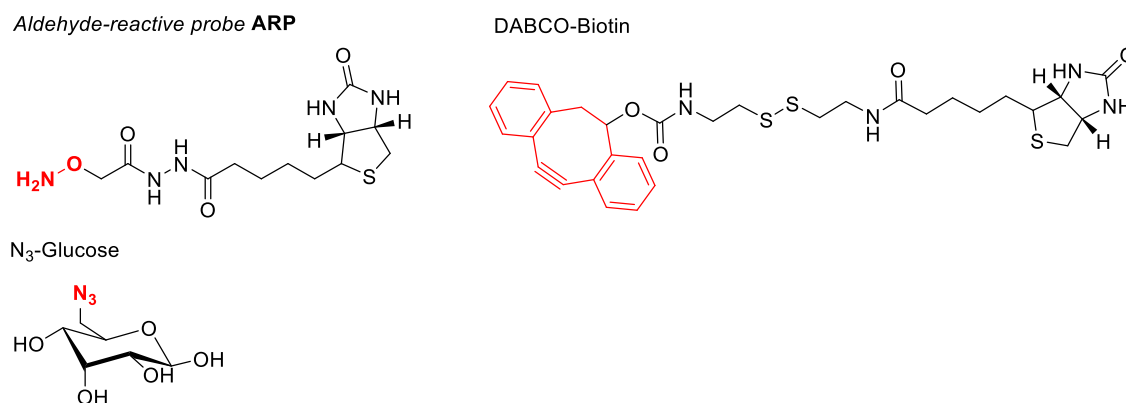


Abb. 1-4 Strukturformeln von chemische Reagenzien zur genomweiten Detektion von hmC und fC. Die Hydroxylaminfunktionalität der *Aldehyde Reactive Group* (ARP) kann mit der Aldehydgruppe von fC reagieren. N_3 -Glucose mit einer bioorthogonalen Azidgruppe kann durch das Enzym β -GT auf die Hydroxylgruppe von hmC angebracht werden. An dieses Azid kann DABCO-Biotin über eine Click-Reaktion angebracht werden.

Song et al. entwickelten eine der ersten chemischen Detektionsmethoden für hmC namens *hmC-Seal* (siehe Abb. 1-5).^[45] Hierbei wird das Enzym β -Glykosyltransferase (β -GT) verwendet, um 6- N_3 -Glucose auf die Hydroxylfunktionalität von hmC zu übertragen.

EINLEITUNG

Anschließend kann in einer Cu-freien 1,3-dipolaren Cycloaddition-Reaktion (*Click*) ein Biotin angebracht werden. Dies ermöglicht eine Affinitätsanreicherung und Detektion.



Abb. 1-5 Darstellung der Methode hmC-Seal zur Detektion von hmC.

Anstatt eine Click-Reaktion zu verwenden, wird bei der *GLIB*-Methode (Glykosylierung, Periodat-Oxidation, Biotinylierung) Glukose durch das Enzym β -GT an hmC angebracht (siehe Abb. 1-6). Nach einer oxidativen Periodatspaltung der *cis*-Hydroxylfunktionen der Glukose werden die entstandenen Aldehydfunktionalitäten mit einem Hydroxylamin-Biotin-Reagenz zur Affinitätsanreicherung umgesetzt.^[46] Gleichzeitig kann fC direkt mit dem Hydroxylamin-Biotin-Reagenz *ARP* (*aldehyde reactive probe*) detektiert werden.^[47]

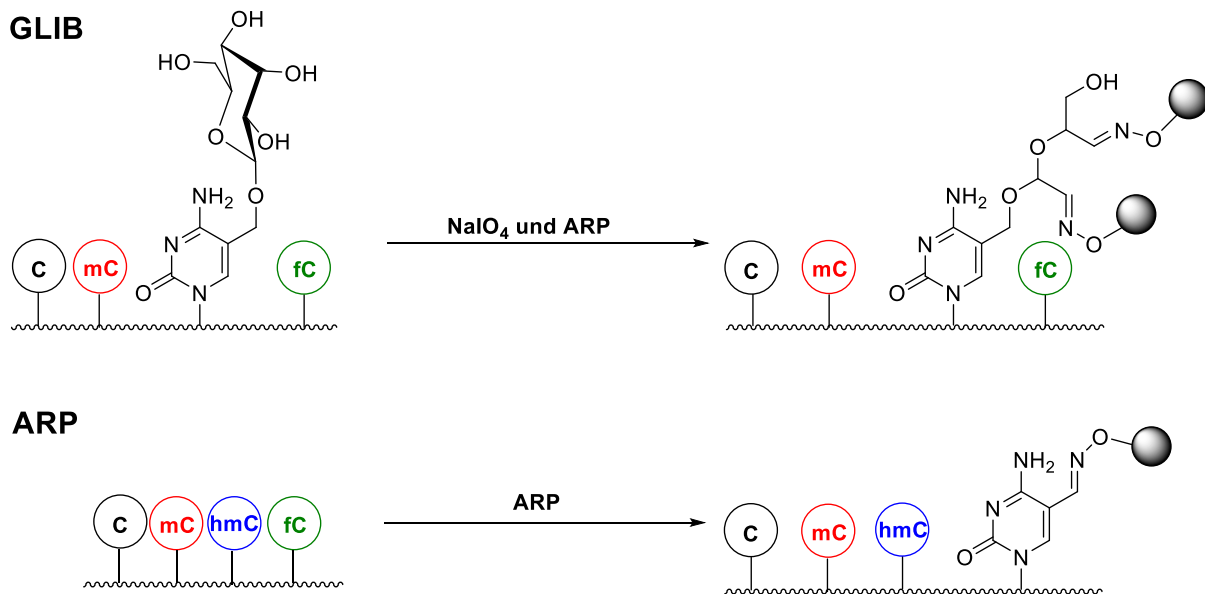


Abb. 1-6 Darstellung der chemischen Methoden GLIB und ARP zum globalen Nachweis von fC.

Eine Weiterentwicklung des *hmC-Seal* stellt die Methode *fC-Seal* dar, mit der fC-haltige DNA detektiert werden kann. Zunächst wird hmC mit unmodifizierter UDP-Glukose mithilfe des Enzyms β -GT blockiert. Anschließend kann fC mit NaBH_4 zu hmC reduziert werden und mit

einem Azid-Zucker glykosyliert werden. Eine anschließende *Click*-Reaktion an ein Alkin-modifiziertes Biotin ermöglicht wiederum die Anreicherung.^[48]

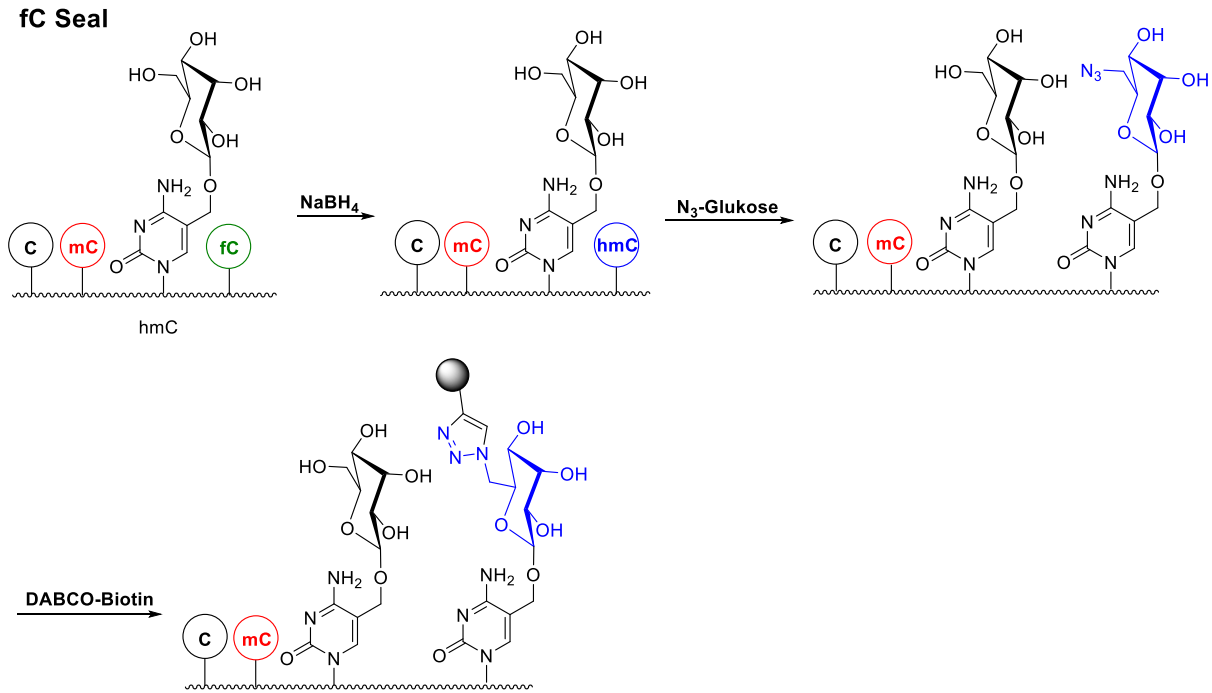
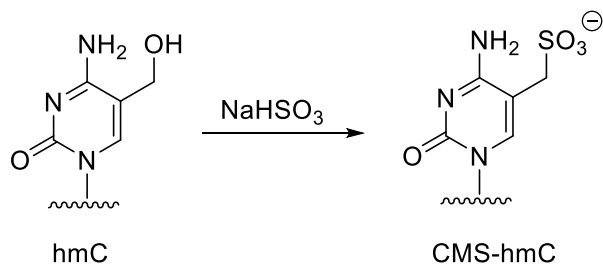


Abb. 1-7 Darstellung der fC SEAL zum globalen Nachweis von fC.

Eine Antikörper-kombinierte chemische Detektionsmethode wurde für die hmC Detektion *in vivo* von *Pastor et al.* entwickelt.^[46] Eine Bisulfit-Behandlung setzt hmC zu einem stabilen Cytosin-5-methylsulfonataddukt (CMS-Addukt) um (siehe Schema 1-4). Ein spezifischer Antikörper gegen diese Modifikation ermöglicht die Anreicherung.



Schema 1-4 Bildung des CMS-Addukts bei der Bisulfitbehandlung (NaHSO_3) von hmC.

Eine weitere Methode reichert hmC-enthaltende DNA über *J-Binding Protein 1* (JBP1) beladene magnetische *beads* an. Hierzu wird hmC durch das Enzym β -GT zu β -Glucosyl-5-hmC (β -glu-5-hmC) umgesetzt. Für die Anreicherung wird die hohe Affinität von JBP1 zu β -Glu-5-hmC ausgenutzt.^[49]

Die am höchsten oxidierte Variante caC kann theoretisch mit einer EDC-vermittelten Amidbildungsreaktion mit einem Biotin-amin detektiert werden.^[50] Aufgrund des geringen

Vorkommens von caC und der fehlenden Sensitivität, war es mit dieser Methode bis jetzt noch nicht möglich caC in genomischer DNA nachzuweisen.

Eine Publikation von *Hardisty et al.* beschreibt die selektive Anreicherungs- und Markierungsmethode für die Thymin-Modifikationen 5-Formyluracil (fU) und 5-Hydroxymethyluracil (hmU) mithilfe eines Acylhydrazid, das mit fU ein stabiles Hydrazon bildet. Über den pH-Wert wird zusätzlich die Selektivität gegenüber fC gesteuert. Die Detektion von hmU kann über eine vorherige Oxidation zu fU realisiert werden.^[51]

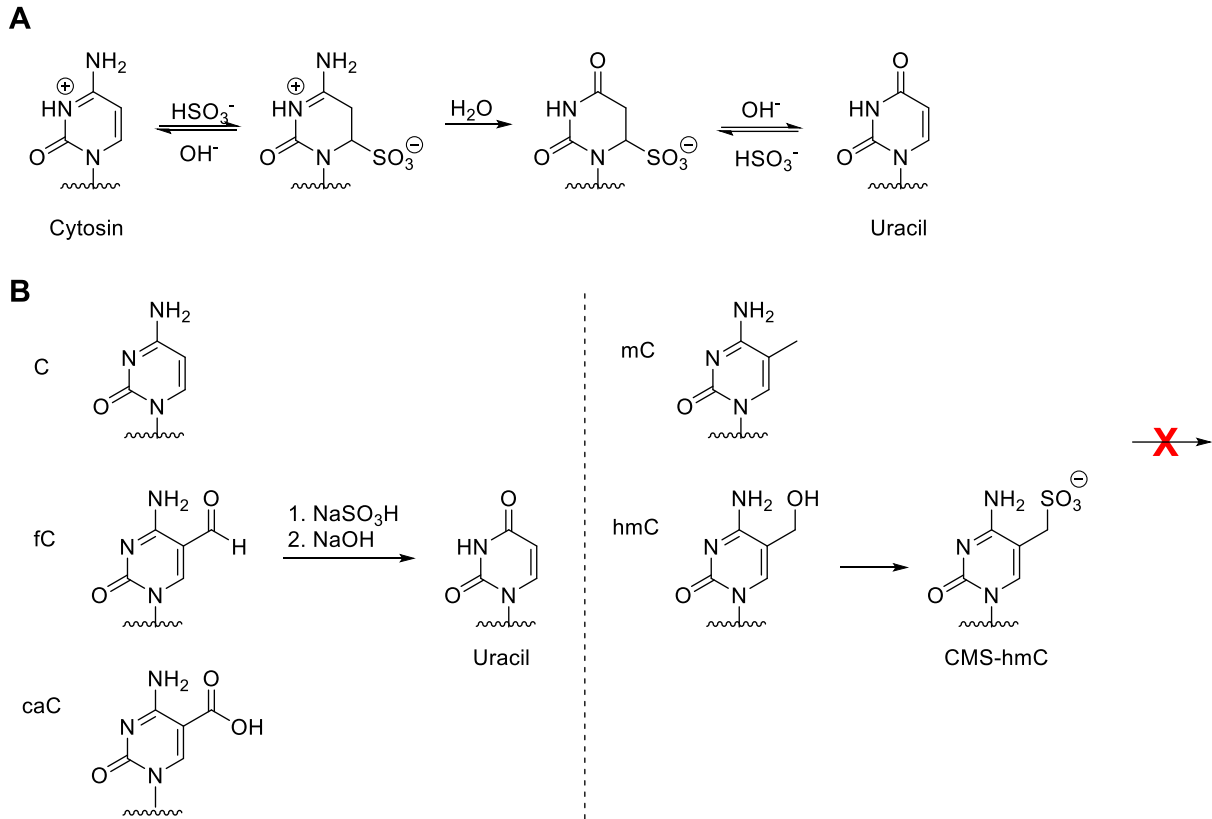
Eine weitere Veröffentlichung von *Chuang He* zeigt, dass ein fehlgepaartes hmU:G-Basenpaar durch Behandlung mit β -GT markiert und angereichert werden.^[52] Um eine Kreuzreaktion zu vermeiden, muss allerdings vorweg mC und hmC Tet-vermittelt oxidiert werden.

1.3.3 Sequenzierung der epigenetischen Basen

1.3.3.1 Chemische Sequenzierung mit Bisulfit

Bei einer Standard-Sequenzierung der neuen epigenetischen Basen kann grundsätzlich zwischen den oxidierten Cytosin-Modifikationen nicht unterschieden werden. Für die Detektion von mC hat sich die Bisulfitsequenzierung etabliert. Mit dieser Methode kann zwischen C und mC differenziert werden.^[53] Bei einer Behandlung mit Bisulfit desaminiert, wie in Schema 1-5 (A) dargestellt Cytosin zu Uracil und wird entsprechend als Thymin (T) gelesen, während mC nicht effizient genug desaminiert.^[54] Die „neuen“ epigenetischen Modifikationen hmC, fC und caC verhalten sich unterschiedlich bei einer Bisulfitbehandlung. Die Base hmC reagiert mit Bisulfit unter Bildung eines Cytosin-5-methylsulfonataddukts, das ebenso wie mC nicht desaminieren kann und bei der Sequenzierung als C gelesen wird.^[55] Währenddessen desaminieren fC und caC zu U^[56] und verhalten sich somit wie C.

EINLEITUNG



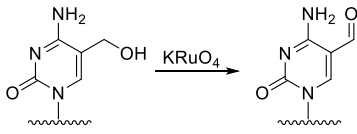
Schema 1-5 (A) Mechanismus der Desaminierung von Cytosin zu Uracil durch Natriumbisulfit. Nach einer Addition von Bisulfit an die C6-Position von Cytosin wird desaminiert. Durch Eliminierung von HSO₃⁻ wird die Aromatizität wiedergewonnen. (B) Verhalten der Basen C, fC und caC im Vergleich zu den Basen mC und hmC unter einer Bisulfitbehandlung.

Somit sind bei einer Bisulfitsequenzierung die Modifikationen mC und hmC bzw. C, fC und caC nicht voneinander unterscheidbar.

Zwei unabhängig voneinander entwickelte Methoden nutzen eine Oxidation von hmC zu fC aus, um zwischen mC und hmC in der Bisulfitsequenzierung zu differenzieren. So wird so eine basengenaue Auflösung ermöglicht. Im *oxidative bisulfite sequencing* (oxBS-Seq) wird KRuO₄ zur Oxidation von hmC zu fC verwendet.^[57] Das neu entstandene fC wird bei der Bisulfitsequenzierung zu U umgesetzt. Durch Subtraktion der Daten einer nicht mit Bisulfit-behandelten Probe kann hmC identifiziert werden, da mC als C gelesen wird. Bei der enzymatischen Methode *TET-assisted bisulfite sequencing* (TAB-seq) wird zunächst hmC durch Umsatz mit β -Glykosyltransferase vor einer Oxidation geschützt.^[10c] Anschließend wird mC durch rekombinantes TET1 zu caC oxidiert. Bei der Bisulfitbehandlung wiederum wird hmC als C gelesen, während die anderen Basen zu U desaminieren und als T gelesen werden. Eine veranschaulichende Übersicht ist in Abb. 1-8 gezeigt.

EINLEITUNG

A OxBS-Seq



C

Base	BS-Seq	oxBS-Seq	TAB-Seq
C	T	T	T
mC	C	C	T
hmC	C	T	C

B TAB-Seq

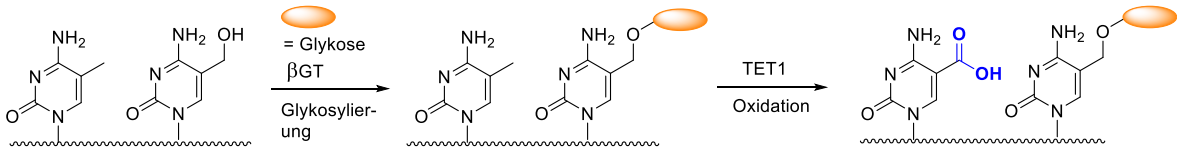
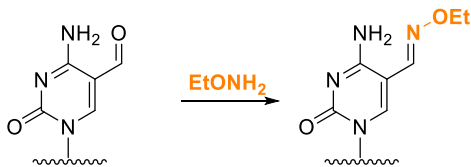


Abb. 1-8 Schematische Darstellung von Methoden, die eine Oxidation von hmC zu fC oder caC ausnutzen, um in einer Bisulfitsequenzierung zwischen mC und hmC unterscheiden zu können. (A) OxBS-Seq. Die Oxidation zu fC erfolgt chemisch durch die Verwendung von KRuO_4 . (B) TAB-Seq. Bei dieser enzymatischen Methode wird zunächst hmC mit Glukose blockiert und anschließend mC zu caC mithilfe von TET1 oxidiert. (C) Zusammenfassung, wie die Modifikationen C, mC und hmC im BS-Seq, oxBS-Seq und TAB-Seq gelesen werden.

Für die Sequenzierung von fC in Kombination mit einer Bisulfitbehandlung wurden zwei Methoden, *5fC-chemically assisted bisulfite sequencing* (fCAB-Seq)^[58] und *reductive bisulfite sequencing* (redBS-Seq) entwickelt, die chemisch die Umwandlung von fC zu U blockieren (siehe Abb 1-9).^[48]

A fCAB-Seq



C

Base	BS-Seq	fCAB-Seq	redBS-Seq
C	T	T	T
mC	C	C	C
hmC	C	C	C
fC	T	C	C

B redBS-Seq

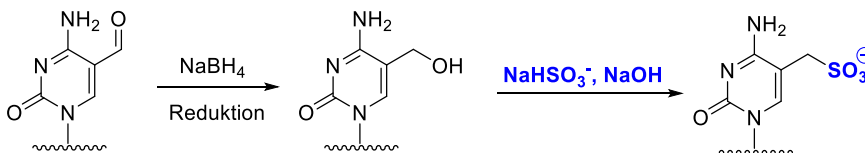


Abb. 1-9 Schematische Darstellung von chemischen Methoden zur Sequenzierung von fC. (A) fCAB-Seq. Die Formylgruppe von fC wird derivatisiert. (B) redBS-Seq. Bei dieser chemischen Methode wird zunächst fC mit NaBH_4 zu hmC reduziert. Bei der anschließenden Bisulfitbehandlung entsteht das CMS-Addukt, das nicht zu U desaminieren kann und als C gelesen wird. (C) Zusammenfassung, wie die Modifikationen C, mC, hmC und fC im BS-Seq, fCAB-Seq und redBS-Seq gelesen werden.

Im fCAB-Seq wird fC mit einem Hydroxylamin maskiert. Das gebildete Oxim kann nicht mehr zu U desaminiert werden. Bei der Methode *reductive bisulfite sequencing* (redBS-Seq) wird fC mit NaBH₄ zu hmC reduziert. Dieses „reduzierte fC“ kann unter Bisulfitbehandlung nicht mehr zu U desaminieren. Durch Subtraktion der Daten mit der Bisulfit-behandelten Kontrollprobe kann in beiden Fällen fC identifiziert werden.

Chemical modification-assisted bisulfite sequencing (CAB-Seq.) ermöglicht die Sequenzierung von caC durch Aktivierung der Säuregruppe mit EDC und Reaktion mit einem primären Amin. Das entstehende Amid verhindert die Desaminierung von caC.^[50] Die CAB-Seq Technologie wurde erfolgreich an synthetischer DNA demonstriert, aufgrund der geringen Abundanz an caC ist die Anwendung in genomischen DNA noch nicht erfolgt.

Desweiteren wurde von *Neri et al.* die sogenannte *Methylation Assisted Bisulfit*-Methode (MAB-Seq) etabliert.^[59] Es handelt sich um eine enzymatische Methode, bei der vor der Bisulfitbehandlung unmodifiziertes Cytosin durch S-Adenosyl-methionin-abhängige CpG-Methyltransferasen M.SssI zu 5-Methylcytosin umgesetzt wird. Dadurch können nach der Bisulfitbehandlung bei der Sanger Sequenzierung fC und caC als T gelesen werden, während unmodifiziertes C (durch M.SssI methyliert), sowie mC und hmC als T detektiert werden.

1.3.3.4 Chemische Sequenzierung ohne Bisulfit

Eine neue Methode, fC-CET, modifiziert die Formylgruppe von fC selektiv chemisch.^[60] Diese Modifizierung führt in der PCR zu einer C→T Transition und macht somit eine Unterscheidung von den anderen oxidierten Cytosinen möglich. Daher wird keine Bisulfitbehandlung benötigt, die zu starker DNA-Degradierung führt. Hierzu wird ein Diketon als Reagenz verwendet, das in einer Friedländer-Reaktion mit fC zu einem Quinolin zyklisiert. Da an dem Reagenz zusätzlich ein Azid angebracht ist, kann mithilfe von Click-Chemie ein spaltbares Biotin-Reagenz (DABCO-Biotin) angebracht werden, das eine Anreicherung ermöglicht (siehe Abb. 1-10).

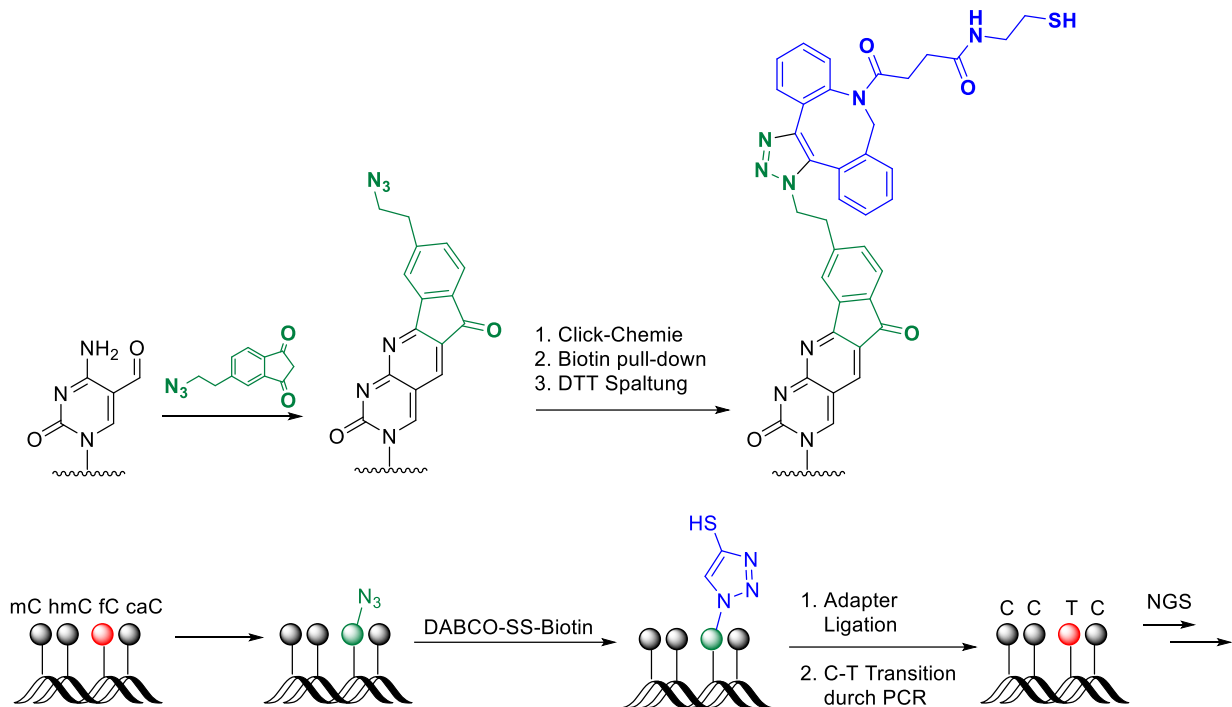


Abb. 1-10 Markierung von fC mit einem Diketon führt zu einer Zyklisierungsreaktion mit fC. Über eine Click-Reaktion kann ein spaltbares Biotin-Reagenz (DABCO-SS-Biotin) angebracht werden. Nach dem Pull-down und einer Abspaltung des Biotins mit DTT wird eine Adapter-Ligation durchgeführt. In der PCR wird vormaliges fC somit zu „T“ übersetzt. Die Sequenz kann über *Next generation sequencing* (NGS) ausgelesen werden.

1.3.4 Reagenzien für proteomische Studien

Um die biologische Funktion der epigenetischen Basen entschlüsseln zu können, ist es wichtig ihre Interaktionen mit Proteinen zu untersuchen. Proteomische Studien mit Zellextrakten können erste Hinweise auf eine biologische Rolle geben, da spezifische Bindungspartner gefunden werden können.^[25] Die Interaktionen der Bindungspartner untereinander können anschließend ebenso proteomisch untersucht werden.

Die Analyse von proteomischen Daten geschieht über massenspektrometrische Methoden. Seit der Entwicklung sanfter Ionisierungsmethoden für Proteine und Peptide, wie MALDI (*matrix-assisted laser desorption ionization*) und ESI (*electrospray ionization*) haben sich diese als Standard zur Analyse von Proteinen etabliert.^[61] Trotz rascher instrumenteller Entwicklungen, können viele Fragestellungen aufgrund der Probenkomplexität oft nur in Verbindung mit der chemischen Markierung von Peptiden beantwortet werden. Zum einen können chemische

EINLEITUNG

Reagenzien zur Quantifizierung von Peptiden dienen, zum anderen werden chemische Reagenzien benötigt, um transiente Wechselwirkungen kovalent „einzufrieren“.

Als Angriffspunkt für die chemische Markierung oder Verknüpfung von Proteinen bzw. Peptiden dienen die Seitenketten von ionisierbaren Aminosäuren (Cysteine, Lysine, Arginine, Histidine und Tyrosine). Diese besitzen nukleophile Funktionalitäten. Aminosäuren mit Säurefunktionalitäten wie Asparagin- und Glutaminsäure können ebenfalls modifiziert werden. Hierzu müssen die Säuregruppen jedoch zunächst aktiviert werden. Des Weiteren können N- und C- Terminus chemisch markiert werden. Besondere Eigenschaften, z.B. Spaltbarkeit, Ladungszustand oder Wasserlöslichkeit können zusätzlich in den chemischen, proteomischen Reagenz implementiert sein.

1.3.4.1 Reaktivgruppen

Chemische Reagenzien für die Proteomik können speziell an die jeweilige Anwendung angepasst werden. Je nachdem, welche Aminosäuren verknüpft werden sollen, können unterschiedliche spezifische Reaktivgruppen verwendet werden. Auf eine Auswahl gebräuchlicher Reaktivgruppen für Lysine und Cysteine soll im Folgenden eingegangen werden (siehe Abb. 1-11).

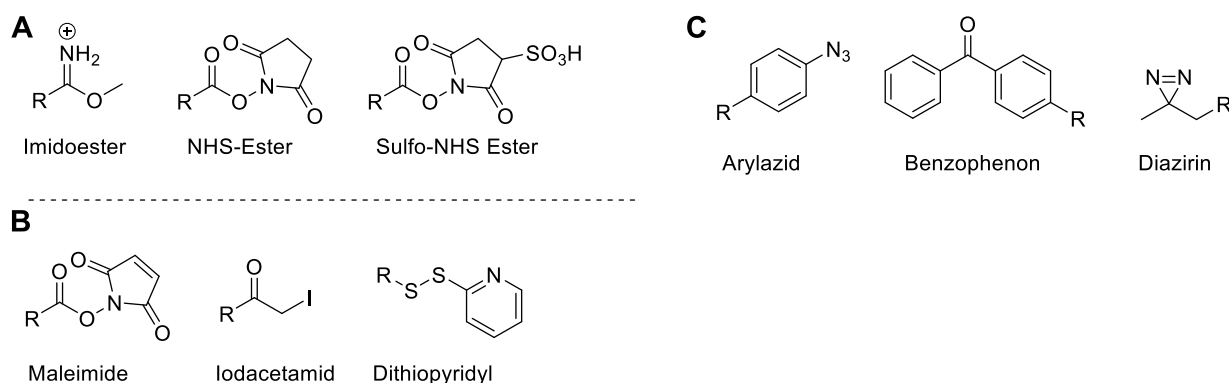


Abb. 1-11 Darstellung von Reaktivgruppen für die kovalente Verknüpfung von Peptiden mit proteomischen Reagenzien oder Reagenzien für die Biokonjugation. (A) für Lysine, (B) für Cysteine, (C) Photoreaktivgruppen.

Besonders beliebt sind Reaktivgruppen, die mit primären Aminen, wie dem ϵ -Amin an Lysinen und den α -Aminen des *N*-Terminus reagieren, da diese sehr abundant und zugänglich sind. Die ältesten Reaktivgruppen hierfür stellen die Imidoester dar, bei denen nach der Konjugation eine positive Ladung am Peptid erhalten bleibt und die somit den „nativen“ Ladungszustand der Lysine erhalten.^[62] Die Verknüpfung ist jedoch bei hohem pH-Wert reversibel und die Effizienz

der Verknüpfung vermutlich aufgrund der starken Hydrolyseempfindlichkeit gering. Daher ist heute der Einsatz der reaktiveren, aber ebenso hydrolyseempfindlichen NHS-Ester stärker verbreitet. Diese bilden eine stabile Amidbindung mit Aminen aus.^[63] Eine wasserlösliche, nicht-zellmembranpermeable Variante stellen die negativ geladenen Sulfo-NHS-Ester da.^[64] Ihre Halbwertszeit in Wasser ist durchschnittlich länger als die der NHS-Ester.^[65]

Für bestimmte Anwendung sind Reaktivgruppen für Cysteine erforderlich. Die Thiol-Gruppe am Cystein ist weitaus nukleophiler als das ϵ -Amin des Lysins, jedoch ist das Vorkommen von Cysteinen in Proteinen weitaus geringer und zudem liegen diese oft in Disulfidbrücken gebunden oder anderweitig oxidiert vor. Als Reaktivgruppen für Cysteine haben sich Maleimide,^[66] und Iodacetamide,^[67] die eine stabile Thioetherbindung ausbilden sowie Thiopyridyldisulfide^[68], die eine reduzierbare Disulfidbrücke ausbilden bewährt. Für weitere Reaktivgruppen sei auf die Literatur verwiesen.^[69]

Für zeitabhängige, relativ unspezifische Konjugationen kommen photo-reaktive Reagenzien zum Einsatz. Bei ihnen handelt es sich um chemisch inerte Funktionalitäten, die bei Bestrahlung mit UV-Licht reaktiv werden und kovalente Addukte ausbilden. Beispiele hierfür sind Arylazide, die bei Bestrahlung kurzlebige reaktive Arylnitrene bilden. Diese Arylnitrene können unspezifisch an Doppelbindungen addieren oder in C-H und N-H Bindungen insertieren.^[70] Dahingegen bilden Diazirine Carbene aus, die effizient in C-H und N-H-Bindungen insertieren können. Benzophenone^[71] erzeugen Diradikale bei Bestrahlung mit UV-Licht.^[72] Von Vorteil ist hier, dass dieser Prozess reversibel ist und das Diradikal rekombiniert, wenn sich kein Reaktionspartner findet.

1.3.4.2 Crosslinking

Unter *Crosslinking* versteht man die möglichst selektive, kovalente Verknüpfung zweier räumlich funktioneller Gruppen von Aminosäuren durch einen *Linker*.^{[73a], [73]b, [73c, 73d]} Anwendungsbereiche umfassen unter anderem die Strukturaufklärung von Proteinen, Zellmembranen oder Proteinkomplexen, die Erforschung von Protein-Protein-Interaktionen, aber auch die Untersuchung von DNA-Protein-Wechselwirkungen. In der *Spacer*-Region, die das Verbindungsstück in einem *Crosslinker* oder einem Markierungsreagenz darstellt, können zusätzliche Funktionalitäten eingefügt werden. So lässt sich beispielsweise die Wasserlöslichkeit durch die Einführung von PEG-Bausteinen verbessern. Durch die Verwendung von 1:1-Mischungen eines Sets aus Reagenzien mit und ohne Isotopenmarkierungen, ist es möglich die Detektion von *Crosslinking*-Produkten in der

massenspektrometrischen Analyse zu verbessern.^[74] In diesem Fall erleichtern das Auftreten charakteristischer Masseshifts die Identifikation von modifizierten Peptiden.^[75] Ebenso bewährt ist das Einführen von gut ionisierbaren Funktionalitäten^[76] oder die Einführung von chemischen oder MS/MS-spaltbaren Gruppen in proteomische Reagenzien. Um die Probenkomplexität bei *Crosslinking*-Reaktionen zu verringern, können Affinitätsgruppen eingefügt werden. Diese erlauben die Aufreinigung von *Crosslinking*-Produkten oder markierten Peptiden vor der massenspektrometrischen Analyse. Häufig werden hierfür z.B. Biotin oder das schwächere Analogon Desthiobiotin in Kombination mit Streptavidin verwendet.^[77] Dem gleichem Prinzip folgen auch Reagenzien, die an Festphasenmaterialien gebunden sind.^[78]

1.3.4.2 Spaltbare Reagenzien

Eine funktionelle Besonderheit kann der Einbau von chemisch-, photochemisch- oder MS-spaltbaren Gruppen in ein proteomisches Reagenz sein, die die Datenkomplexität und Identifizierung erleichtern sollen. Auf chemisch spaltbare Strukturen soll im Folgenden eingegangen werden. Durch den Einbau von Disulfidbrücken ist eine Spaltung durch Reduktionsmittel möglich,^[79] z.B. im photo-reaktiven Crosslinker SDAD.^[80] Weitere chemisch spaltbare Systeme sind Periodat-spaltbare Dirole,^[81] Dithionit-spaltbare Diazobindungen,^[82] Hydroxylamin-spaltbare Ester^[83] und basen-labile Sulfone^[84]. Eine chemische Spaltbarkeit ist von Vorteil für die Identifikation, da durch Vergleich der Peptide vor und nach der Spaltung eine eindeutige Zuordnung erleichtert bzw. sichergestellt wird.

Bei der Verwendung von MS-spaltbaren Systemen wird dieser Vergleich vor und nach der Spaltung in einem einzelnen MS-Experiment ermöglicht. Dazu wird zunächst ein MS¹-Scan aufgenommen, welcher das intakte Reagenz/die intakten Peptide misst. Im folgenden Scan wird durch verschiedene Fragmentierungsmethoden das Reagenz gespalten und die Fragmentierungsprodukte werden gemessen. In dem Reagenz eingebaute spaltbaren Gruppen spalten bei niedriger Energie unter CID- (*collision induced dissociation*), HCD- (*higher-energy collisional dissociation*), ETD- (*electron-transfer dissociation*) oder SID- (*source-induced dissociation*) Bedingungen zu spezifischen Fragmenten. Die Fragmentierungsenergie sollte für die Anwendung möglichst unterhalb der Peptidfragmentierungsenergie liegen, um eine Identifikation der Peptide ohne deren Fragmentierung zu gewährleisten. Eine Auswahl an CID-spaltbaren *Crosslinkern* ist in Abb. 1-12 dargestellt.

EINLEITUNG

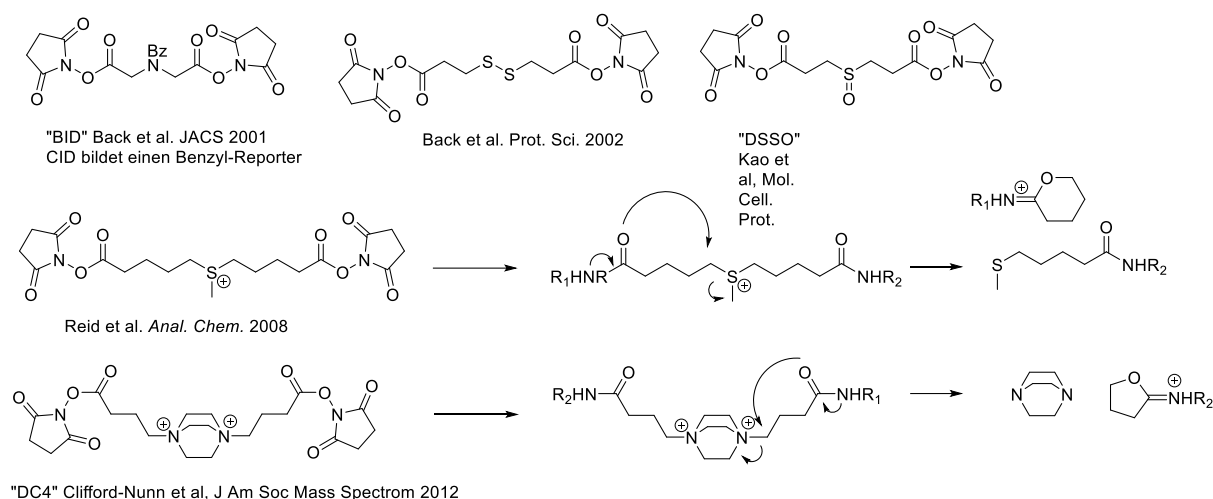


Abb. 1-12 Beispiele ausgewählter CID-spaltbarer Crosslinker.

Eine weitere Strategie ist die MS-basierte Spaltung zur Generierung eines Reporterions, das die Identifikation erleichtert. Beispiel hierfür ist im Jahre 2001 von *Back et al.* erstmals als beschriebenen MS-spaltbaren Crosslinker „BID“, das im MS/MS ein Benzylkation bildet.^[85] Bei der Entwicklung von CID-spaltbaren Crosslinkern ließ man sich zu Beginn von bereits bekannten Fragmentierungswegen von Aminosäuren in Peptiden inspirieren. So nutzt der Peptid-basierte *Crosslinker* SuDP (nicht dargestellt) die niedrige Spaltungsenergie zwischen einer Asparaginsäure- und einem Prolin-Amid aus.^[86] Weitere Beispiele sind Crosslinker, die schwache Bindungen ausnutzen, wie die C-N Bindung eines Trialkoxydiphenylmethylesters „Rink“^[87] oder eine Disulfid-Bindung wie im DSSTP.^[88] Andere Crosslinker nutzen MS-induzierte spezifische Reaktionen aus, wie im Sulfoxid-basierten „DSSO“,^[89] welches gemäß einer Sulfoxid-Pyrolyse spaltet oder die positiv geladenen Crosslinker „DC4“^[90] und „DSP“ (Lomants Reagenz), deren Fragmentierungswege in Abb. 1-12 dargestellt sind.

1.3.4.3 Chemische Quantifizierungsreagenzien

Zur relativen Quantifizierung von proteolytischen Peptiden werden unter Anderem chemischen Markierungsreagenzien eingesetzt. Der Prototyp hierfür ist die *Isotope-Coded-Affinity Tag* (ICAT) Technologie (siehe Abb. 1-13).^[91] Es handelt es sich um ein Set aus zwei strukturell gleichen, jedoch in einer leichten und in einer schweren Form isotopenmarkierten Reagenzien. Ursprünglich wurde diese Markierung mit Deuterium realisiert. Aufgrund von Interaktionen mit der stationären Phase wurden später Reagenzien mit ¹³C oder ¹⁵N verwendet.^[92] Cystein-

EINLEITUNG

haltige Proteine oder Peptide werden spezifisch durch das Iodacetamid-haltige Reagenz markiert. Des Weiteren besitzen diese Reagenzien einen Biotin-Tag für die Affinitätsanreicherung der markierten Peptide. Da eine Probe mit der leichten Version des Isotops markiert wird und die andere mit der schweren, kann eine Quantifizierung der Peptide über die Signalintensitäten im MS erfolgen.^[93]

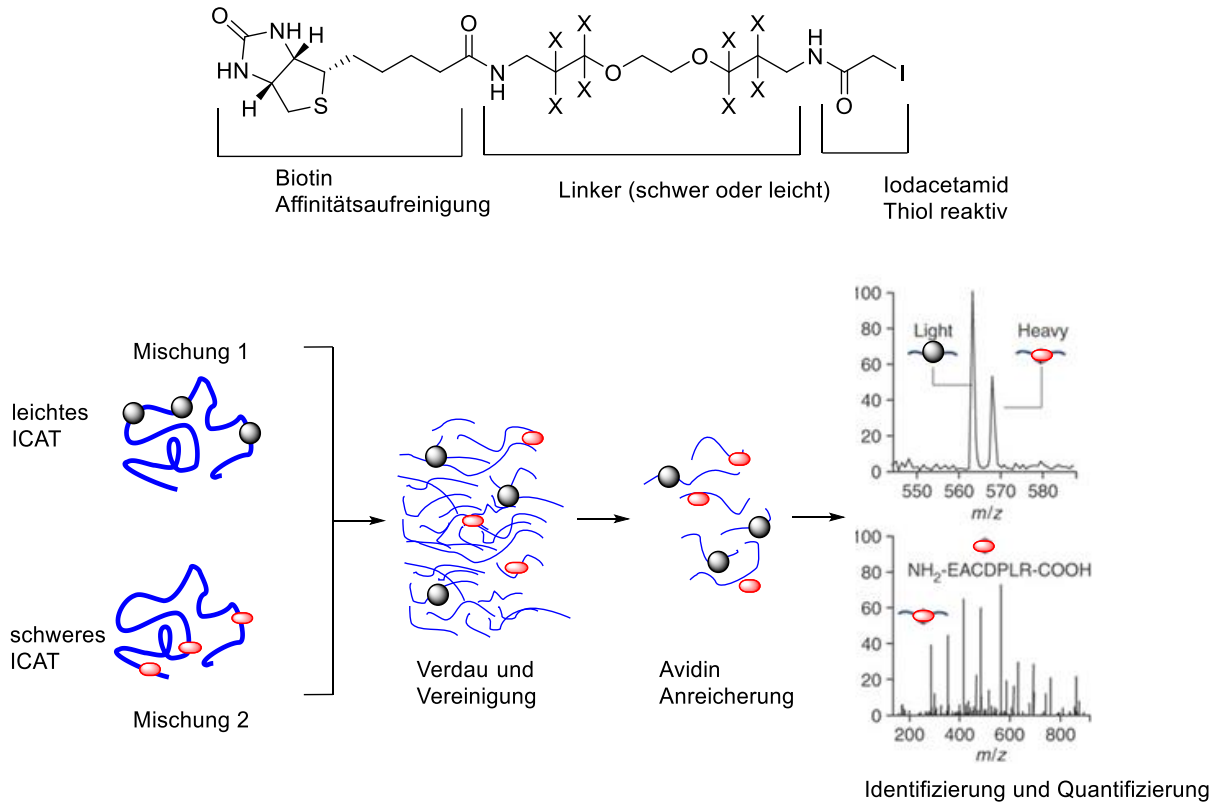


Abb. 1-13 (A) Struktur des ICAT-Reagenzes. Es besteht aus einem Affinitäts-Tag (Biotin), um ICAT-markierte Peptide anzureichern; einer Reaktivgruppe, die spezifisch für Thiole (Cysteine) ist. Das Reagenz existiert in zwei Formen: schwer (mit Isotopenmarkierung) und leicht (ohne Isotopenmarkierung). (B) Arbeitsablauf: Zwei unterschiedliche Proteinmischungen (z.B. zwei unterschiedliche Zellzustände) werden jeweils mit dem schweren oder dem leichten ICAT-Reagenz markiert. Die Proteine werden kombiniert und zu Peptiden verdaut. ICAT-markierte Peptide werden angereichert. Auf der HPLC co-eluiert die markierten Peptide nahezu. Ein Paar von ICAT-markierten Peptiden trägt einen Massenunterschied von 8 Da. Die relative Quantifizierung erfolgt über die Verhältnisse dieser Massenpeaks im MS¹-Scan. Die Peptididentifizierung erfolgt über MS².

Eine Weiterentwicklung dieser Strategie zur Quantifizierung sind die *Tandem Mass Tags* (TMT)-Reagenzien (siehe Abb. 1-14). Die wesentliche Neuerung besteht im Vorhandensein eines im MS/MS spaltbaren Bereich, der die Analyse der Tags im Massenspektrometer erlaubt. Die Reagenzien bestehen aus einem Lysin-reaktiven NHS-Ester als Reaktivgruppe, einer Massennormalisierungsbereich (*balancer*) und einer *Reportergruppe*. Mit ihnen können Peptide/Proteine isobar (= mit der gleichen Ausgangsmasse) chemisch identisch markiert

EINLEITUNG

werden.^[94] Durch dieses Design wird sichergestellt, dass identische Peptide, die mit unterschiedlichen TMTs markiert wurden, in der LC (oder anderen chromatographischen Methoden) co-eluiert werden. Erst in der MS/MS-Analyse werden unterschiedlich schwere *Reporter*-Ionen generiert, über deren Integrale quantifiziert werden kann. Dies wird über einen spaltbaren Bereich realisiert. Während *Thomson et al.* ein erstes Molekülgerüst als TMTduplex vorstellten,^[94] entwickelten *Dayon et al.* das heutige kommerziell erhältliche Gerüst als 6plex.^[95] Weiterentwicklungen und die Implementierung von Kombinationen aus $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ und $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Markierungen, welche nur sehr kleine Massendifferenzen generieren, ermöglichten die Entwicklung eines TMT8plex und TMT10plex-Reagenzes mit dem acht bzw. zehn unterschiedliche Proben gleichzeitig miteinander verglichen werden können.^[96] Während das ICAT-Reagenz die Markierung von Cysteinen erlaubt, können mit den TMT-Reagenzien Lysine markiert werden, die sich für eine Quantifizierung aufgrund des häufigeren Vorkommens weitaus besser eignen.

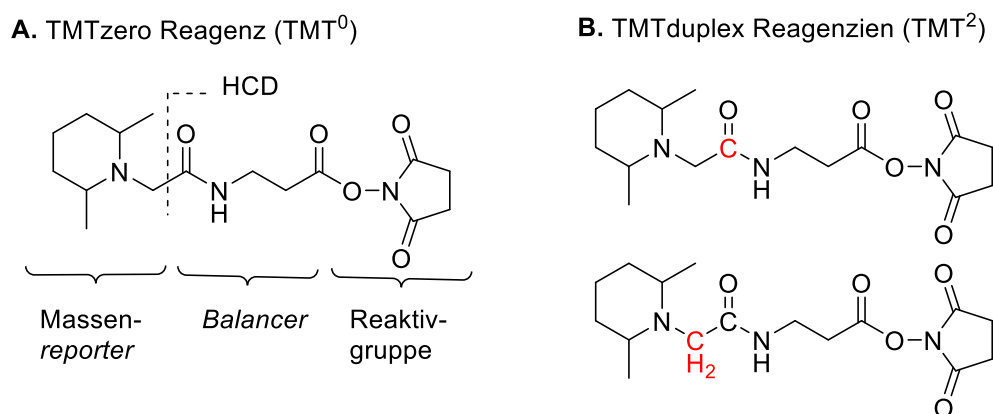


Abb. 1-14 (A) Darstellung des TMTzero Reagenzes mit Bruchstelle. (B) Darstellung des TMTduplex Reagenzes (TMT²). Rote C-Atome bedeuten eine ^{13}C -Markierung.

Aufgabenstellung

Die Methylierung von Cytosin an der 5`-Position zu 5-Methylcytosin stellt ein wesentliches Regulationsprinzip in der Zellbiologie dar. Seit 2009 weiß man, dass mC durch die Tet-Enzyme zu hmC prozessiert werden kann. Im Jahr 2011 wurden weitere höher oxidierte Cytosine, nämlich fC und caC unter anderem von der Gruppe *Carell* entdeckt. Für die Erforschung der neuen epigenetischen Basen und für die Entdeckung von weiteren potentiell epigenetischen Basen werden organisch-synthetisch hergestellte Reagenzien benötigt.

Im Zuge dieser Doktorarbeit sollten Triphosphat- und Phosphoramiditbausteine für die neuen Basen entwickelt werden. Diese DNA-Bausteine sollten in Oligonukleotide eingebaut werden und so als Modellsysteme für Studien, z.B. Aktivitäts- und Transkriptionsassays dienen. Desweiteren sollten isotope markierte $^{15}\text{N}_2$ -Nukleoside und DNA-Bausteine zur Quantifizierung der neuen Basen und für mechanistische Studien am Detektionslimit (z.B. Deformylierung und Decarboxylierung) synthetisiert werden.

Um die neuen Basen zu lokalisieren und ihren Sequenzkontext zu erforschen, werden spezifische Antikörper benötigt. Für die Antikörperentwicklung von kleinen Molekülen müssen diese an immunogene Proteine gekuppelt werden. Für die Kupplung an Proteine sollten Haptene synthetisiert werden und eine optimale Kupplungsstrategie gefunden werden. Die erhaltenen polyklonalen und monoklonalen Antikörper sollen anschließend auf ihre Spezifität getestet und charakterisiert werden und der Entwicklung von Sequenziermethoden dienen.

Mithilfe von proteomischen Studien sollen Bindungspartner der neuen Basen gefunden werden und so erste Hinweise auf die biologische Bedeutung gefunden werden. Hierzu sollte eine DNA-Protein-Sonde entwickelt werden, die einen spaltbaren Crosslinker trägt, der interagierende Proteine kovalent verknüpft und eine Markierung auf den interagierenden Proteinen hinterlässt.

Ein weiteres Ziel dieser Doktorarbeit war die Entwicklung eines spaltbaren, Cystein-reaktiven Reagenzes für die Proteomik. Mit diesem Reagenz sollte es ermöglicht werden, Redox-Prozesse, wie sie in der Signaltransduktion vorkommen zu erforschen.

Ergebnisteil

2.1 Synthese von epigenetischen Triphosphatbausteinen für die PCR

Während durch Festphasen-DNA Synthese Oligonukleotide mit definierter Sequenz, jedoch begrenzter Länge (> 40mere) und Anzahl an modifizierten Basen hergestellt werden können, liefert die Polymerasekettenreaktion doppelsträngige DNA nahezu beliebiger Länge, variabler Sequenzmotive und höherer Dichte an modifizierten Basen. Für biologische Studien, bei denen ein genauer Sequenzkontext nicht nötig ist, sind solche PCR-Produkte wünschenswert. Sollen in der Polymerasekettenreaktion epigenetische Modifikationen eingebaut werden, so wird dCTP/dTTP entweder komplett oder teilweise durch das korrespondierende xdCTP/xdTTP ersetzt. In den letzten Jahren wurden bereits diverse Phosphoramiditbausteine für die Festphasen-DNA Synthese von hmC, fC und caC entwickelt.^[28, 36a, 38b, 39, 41] Während die Triphosphate von mC und hmC bereits kommerziell erhältlich waren (Isolation und Synthese durch Phosphorylierung des Monophosphats)^[97] mussten Synthesen für die Triphosphate für fC und caC, hmU sowie für deren ¹⁵N₂-Isotopologe im Rahmen dieser Doktorarbeit entwickelt werden (Darstellung der Triphosphate in Abb. 2.1-1).

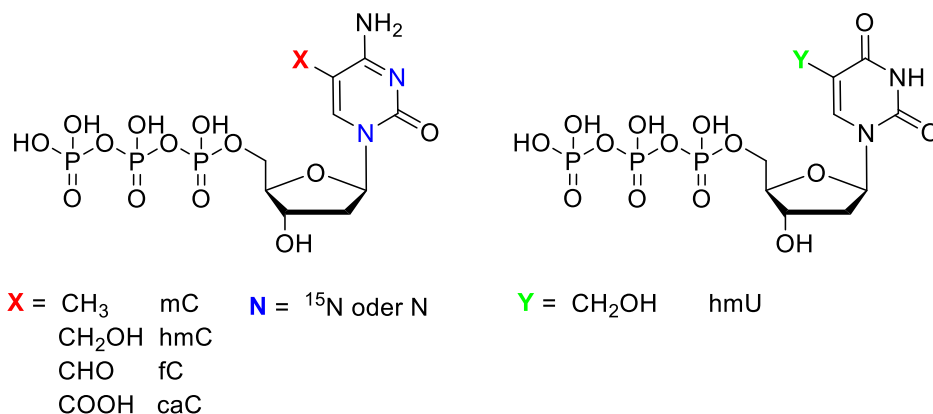


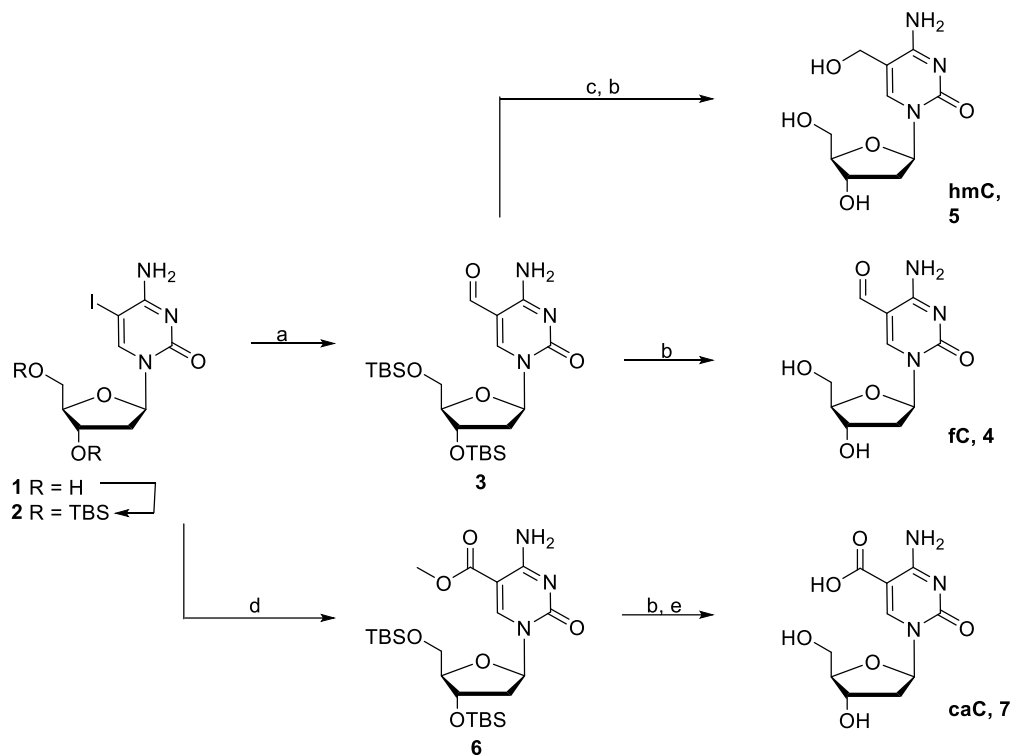
Abb. 2.1-1 Abbildung der Triphosphate der epigenetischen Basen mC, hmC, fC, caC und hmU. Die blau markierten Stickstoffe stellen die natürlichen oder ¹⁵N-markierten Verbindungen dar.

2.1.1 Synthese von fCTP und caCTP und deren Einbau in PCR-Produkte

Für die Synthese der Triphosphate mussten zunächst die korrespondierenden freien Nukleoside hergestellt werden. Diese wurden ausgehend von TBS-geschütztem 5-Iodcytidin **2** durch eine

universelle und divergente Stille-Kupplung mit CO-Gas als Schlüsselschritt gewonnen (siehe Schema 2.1-1).^[33a]

Das Ausgangsmaterial für die Pd-katalysierte Stille-Kupplung wurde aus 2'-Desoxycytidin hergestellt. Zunächst wurde 2'-Desoxycytidin unter oxidativen Bedingungen mit *m*CPBA und I₂ an der 5'-Position zu 5-Iod-dC **1** in einer Ausbeute von 79 % iodiert. Hierbei wird I₂ zu einer I⁺-Spezies oxidiert, die den Pyrimidinring in einer Friedel-Crafts-artigen Reaktion angreift. Es entsteht dabei perferentiell nur das an der C5-Position iodierter Produkt **1**.^[98] Anschließend wurde eine Schützung der freien Zuckeralkohole mit TBSCl in Pyridin/DMF und Imidazol als Base zu Verbindung **2** vorgenommen. Nachfolgend wurde die Stille-Kupplung durchgeführt. Hierbei kann nach der Insertion der Palladium(II)-Spezies und des CO-Gases in die Kohlenstoff-Iod-Bindung mit Bu₃SnH oder MeOH gestoppt werden (a, b). Man erhält im ersten Fall eine Formyl-Gruppe an der 5-Position (Verbindung **3**). Die TBS-Entschützung mit HF-Pyridin lieferte das fC-Nukleosid **4**. Wird die Formylgruppe einer Luche-Reduktion mit CeCl₃ als Lewis-Säure und NaBH₄ unterzogen, so erhält man nach der Silyletherabspaltung das Hydroxynukleosid (hmC, **5**). Findet die Carbonylierung in Methanol als Lösungsmittel statt, so wird ein als Methylester maskiertes caC **6** erhalten, das mit LiOH verseift werden kann. Eine nachfolgende TBS-Entschützung liefert das caC-Nukleosid **7**.



Schema 2.1-1 Synthese der epigenetischen Nucleoside hmC, fC, caC aus einer gemeinsamen Vorstufe. a) CO, PPh₃, Pd₂(dba)₃·CHCl₃, Bu₃SnH, 85 %; b) HF·Pyridin, Pyridin, EtOAc, 89 - 73 %; c) NaBH₄, CeCl₃·7H₂O, MeOH, 61%; d) CO, DIPEA, PdCl₂(MeCN)₂, MeOH, 84 %; e) LiOH, THF/H₂O 4:1, 44 %.

Für die Synthese des fC-Triphosphats wurde das ungeschützte freie fC-Nukleosid mit frisch destilliertem POCl_3 und Protonenschwamm in über Molsieb getrocknetem Trimethylphosphat $\text{PO}(\text{OMe})_3$ nach einer Methode von *Yoshikawa et al.* selektiv in das 5'-Monophosphat **8** überführt.^[99] Als Lösungsmittel scheiden polare Lösungsmittel wie DMF oder DMSO aus, da diese mit POCl_3 in einer Vilsmeier-Haak-Reaktion reagieren. Durch die Verwendung von Trialkylphosphat $\text{PO}(\text{OMe})_3$ als Lösungsmittel wird die Phosphorylierung an die 5'-Position dirigiert (siehe Schema 2.1-2) durch Aktivierung der 5'-OH-Gruppe.^[100] Anschließend entsteht durch Angriff an das elektrophile POCl_3 ein reaktives Phosphordichloratintermediat **9**, das durch Zugabe eines wässrigen TEAB-Puffers (1M, pH 8) zum Monophosphat hydrolysiert wird.

Das Rohprodukt der Reaktion wurde durch Umkehrphasen-HPLC in einem Triethylammoniumacetat-Puffersystem gereinigt. Man erhielt so das fCMP **8** in einer Ausbeute von 23 %. Die Phosphorylierung in 5'-Position wurde durch ein Protonen-gekoppeltes ^{31}P -NMR und ein ^1H - ^{31}P -HMBC bewiesen (siehe Abb. 2.1-2).

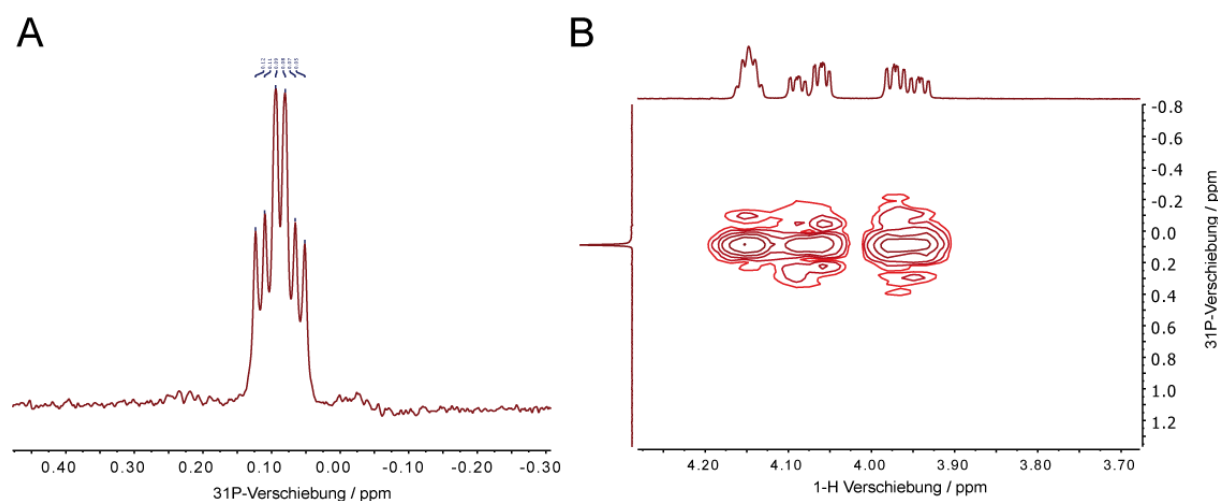
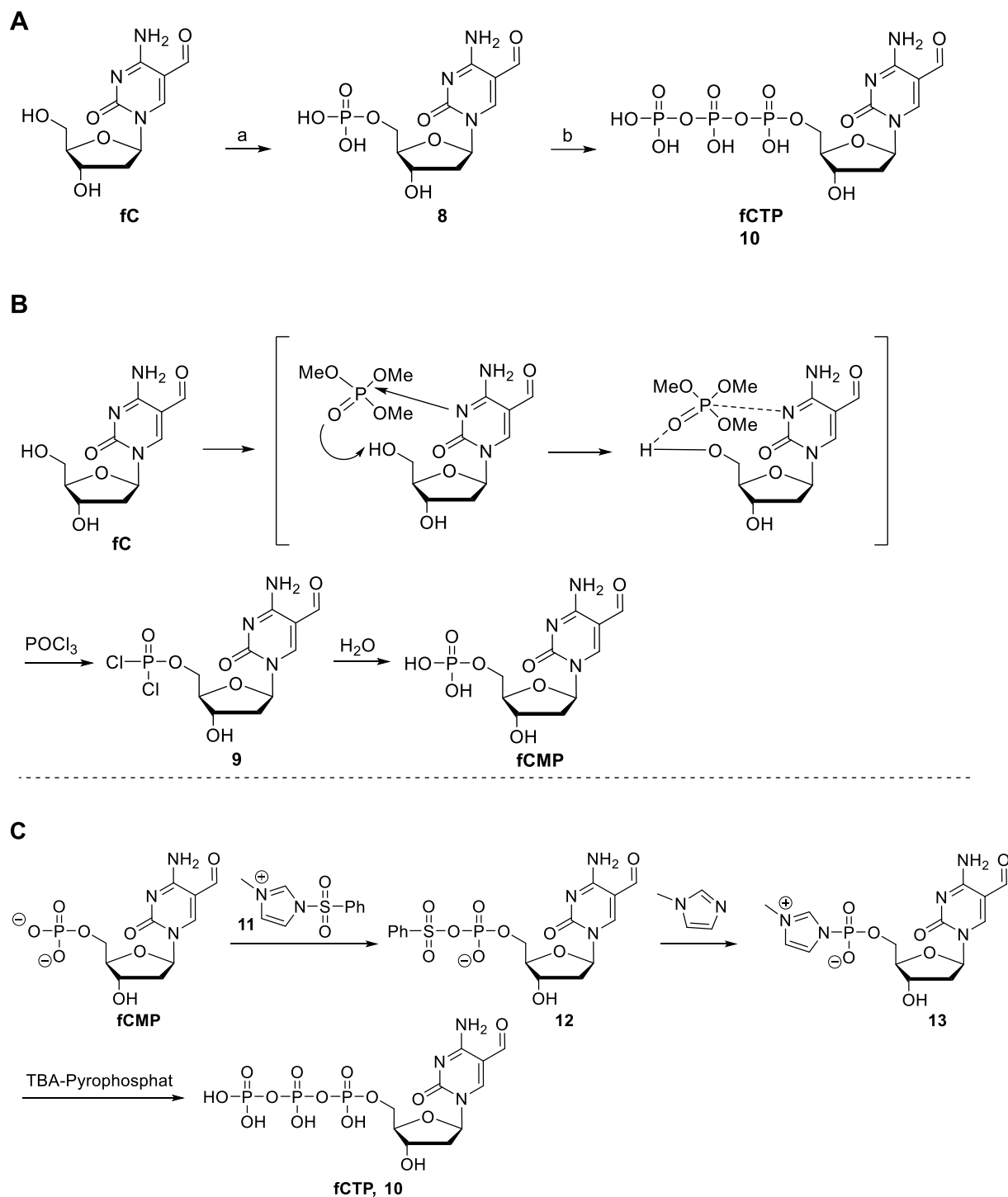


Abb. 2.1-2 (A) Protonen-gekoppeltes ^{31}P -NMR Experiment zeigt ein td, (B) Das ^1H - ^{31}P -HMBC zeigt eine Kupplung des Phosphors mit den Protonen an der 5'- und 4'-Position.

Eine neue Triphosphatmethode, die von *S.D. Taylor* in der Literatur beschrieben wurde, lieferte ausgehend vom Monophosphat das fertige fCTP **10** in einer Ausbeute von 70 % (siehe Schema 2.1-2 A).^[101]

ERGEBNISTEIL

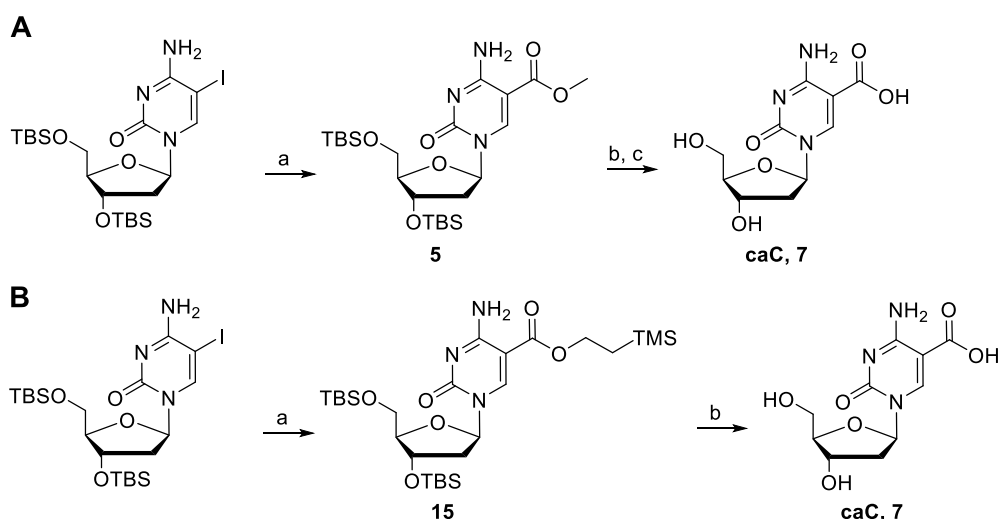


Schema 2.1-2 Synthese des fCTP ausgehend von fC-Nucleosid. (A) Schematische Darstellung der Synthese des fC-Triphosphats über das Monophosphat. a) Protonenschwamm, $\text{PO}(\text{OMe})_3$, POCl_3 , Protonenschwamm, 0°C , 3 h, 29 %; b) (I) Phenylsulfonylmethylimidazoliumtriflat, Bu_3N , DMF, 0°C , (II) $(\text{Bu}_3\text{NH})_2(\text{H}_2\text{O}_7\text{P}_2)$, DMF, $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$, 3 h, 70 %. (B) Darstellung des Mechanismus der Synthese des Monophosphats und des Triphosphats von fC.

Hierbei diente ein Sulfonylimidazoliumtriflat-Salz **11** als Aktivierungsreagenz, und TBA-Pyrophosphat als Diphosphatquelle. Das Sulfonylimidazoliumtriflat-Salz wurde nach der von Taylor *et al.* beschriebenen Vorschrift synthetisiert. Hierzu wurde Imidazol mit

Benzolsulfonsäure umgesetzt und die N3-Position mit MeOTf methyliert. Sulfonylimidazolium-Salze sind besonders gut zur Aktivierung von Phosphatgruppen geeignet, da diese aufgrund der positiven Ladung schneller mit den negativ geladenen Phosphatgruppen reagieren als mit Hydroxy- und Aminogruppen von Nucleosiden. Das Reaktionsschema zur Aktivierung des fCMP ist in Schema 2.1-2-C dargestellt. Das Sulfonylimidazoliumsalz reagiert mit dem 5'-Phosphat des fCMP unter Bildung des gemischten Anhydrids **12**. Abgespaltenes *N*-Methylimidazol kann dann erneut mit dem Anhydrid **12** zu einem reaktiven Imidazoliumsalz **13** reagieren. Durch anschließende Zugabe von TBA-Pyrophosphat wurde das Triphosphat gewonnen. Man erhält so das fC-Triphosphat **10** in einer Ausbeute von 70 % ausgehend vom Monophosphat. Die Reinigung ist über Umkehrphasen-HPLC unter Verwendung eines Triethylammoniumacetat-Puffersystems möglich. Außerdem wurden andere Aufreinigungsmöglichkeiten getestet. Hierbei stellte sich Ionenaustauschchromatographie an einem Äktasystem bei 4°C unter Verwendung einer DEAE-Cellulose-Säule einer MonoQ-Säule als sehr gute Möglichkeit heraus.^[102]

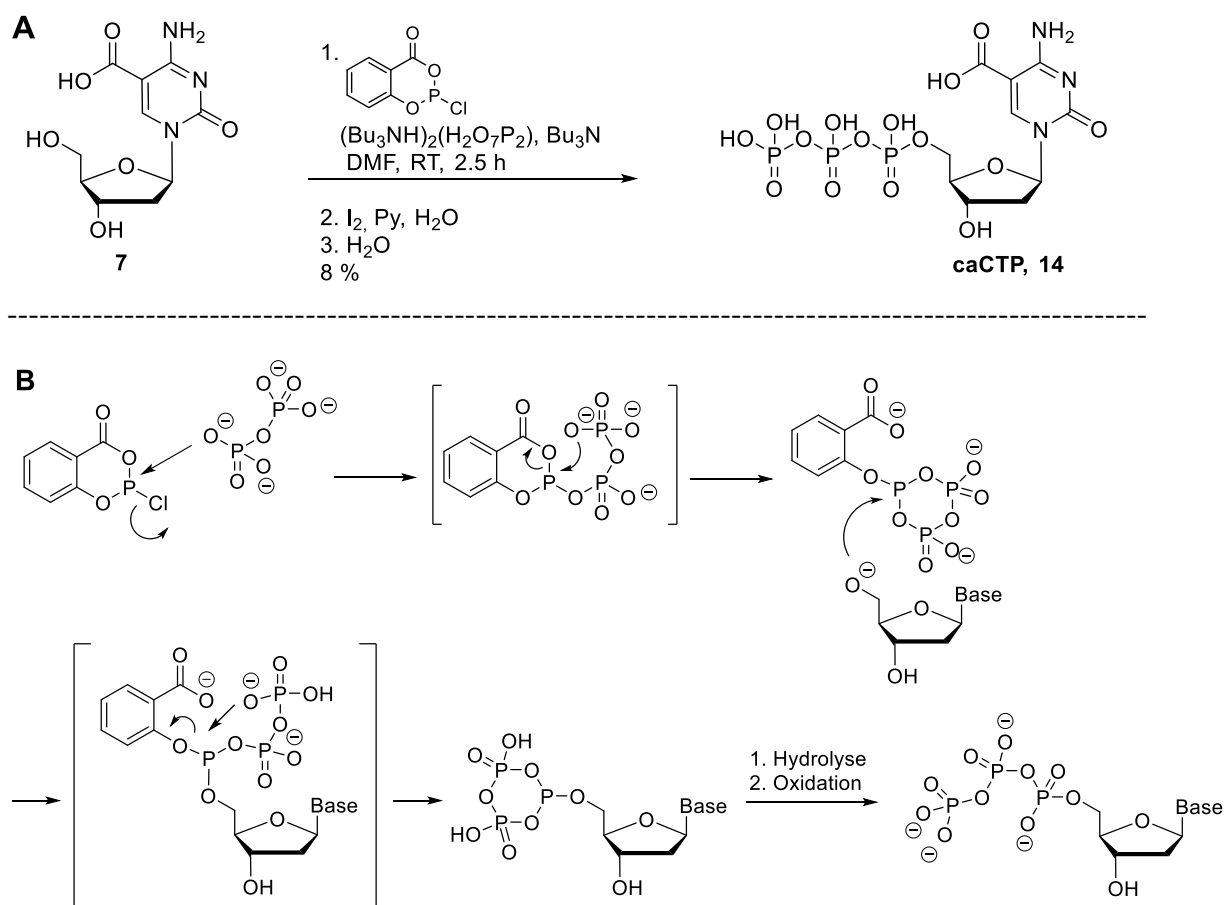
Für die Synthese des caCTP **14** wurde der aus der Stille-Kupplung gewonnene Methylester **6** mit LiOH verseift. Dadurch wurde das freie Nucleosid **7** erhalten (siehe Schema 2.1-3 A). Alternativ wurde auch ein TMS-geschütztes caC **15** durch eine Stille-Kupplung hergestellt (siehe Schema 2.1-3 B). Von Vorteil ist hier, dass in einem Schritt die TBS- und die TMS-Schutzgruppen gleichzeitig entfernt werden können, wodurch sich die Synthese um einen Schritt verkürzt. Die Ausbeute dieser alternativen Stille-Kupplung ist jedoch geringer.



Schema 2.1-3 Alternative Synthesen des caC-Nucleosids. (A) a) DIPEA, PdCl₂(MeCN)₂, MeOH, 3,5 bar CO, 14 h, 60 °C, 46–76 %; b) HF·Pyridin, Pyridin, EtOAc, 70 %; e) LiOH, THF/H₂O 4:1, 44 %; (B) a) DIPEA, PdCl₂(MeCN)₂, TMS-*i*-PrOH, 3,5 bar CO, 24 h, 60 °C, 46 %; b) TBAF, THF, RT, 44 %.

Das ungeschützte caC-Nucleosid **7** wurde anschließend nach einer modifizierten Methode von *Ludwig* und *Eckstein* in das Triphosphat überführt.^[103] Bei der Methode nach *Ludwig und*

Eckstein wird ein Nucleosid mit Salicylchlorphosphit und anschließender Zugabe von Pyrophosphat umgesetzt. Da dieses Reagenz hoch reaktiv ist, muss die 3'-OH-Gruppe und andere Amino- oder Hydroxyfunktionalitäten aufwendig geschützt werden, um die Bildung von Nebenprodukten zu verhindern. Nach der neuen Methode von *Caton-Williams et al.* wird die Reaktivität des Salicylchlorphosphit durch Umsetzung mit Pyrophosphat zu einem *in situ* erzeugten, milderen Phosphitierungsreagenz herabgesetzt (siehe Schema 2.1-4 B).^[104] Es stellte sich hierbei heraus, dass die Qualität des kommerziell erhältlichen Salicylchlorphosphit (P^{III}) ausschlaggebend für eine erfolgreiche Synthese ist. Die Oxidationsstufen des Salicylchlorphosphit sowie des *in situ* erzeugten Reagenzes wurden daher mit ^{31}P -NMR überprüft.^[104a] Für eine Vorschrift zur Synthese des Salicylchlorphosphit sei auf die Doktorarbeit von *Sascha Serjukow* verwiesen.



Schema 2.1-4 Eintopfsynthese nach *Caton-Williams et al.*^[104a] (A) Synthese des caCTP ausgehend vom freien Nucleosid. (B) Vorgeschlagener Mechanismus für die Bildung des 5'-Triphosphates.

Nach der *in situ*-Bildung des Phosphitierungsreagenzes, kann die 5'-Position an das Reagenz nukleophil angreifen. Es bildet sich ein cyclisches Intermediat aus. Anschließend wird dieses cyclische Intermediat mit Iod oxidiert und mit Wasser hydrolysiert. Eine Ethanol-fällung liefert

ERGEBNISTEIL

das Rohprodukt. Nach einer zweimaliger Aufreinigung durch Anionenaustauschchromatographie an einem Äktasystem konnte das caC-Triphosphat in einer Ausbeute von 8 % als Tetrakis(triethylammonium)-Salz gewonnen werden.^[102] Eine Aufreinigung war auch mit Umkehrphasen-HPLC möglich, allerdings wurde das caC-Triphosphat hierdurch erst nach dreimaliger Aufreinigung in zufriedenstellender Reinheit gewonnen. Nach dieser Methode wurde auch das hmC- und fC-Triphosphat hergestellt. Die Identität der Triphosphate von fC **10** und caC **14** wurden über ¹H und ³¹P-NMR Experimente überprüft. Ein ¹H-gekoppeltes ³¹P-NMR und ein HMBC-Experiment bestätigten, dass sich die Triphosphatgruppen an den jeweiligen 5'-OH-Gruppe befinden (Spektren nicht gezeigt).

Zusätzlich wurden ¹⁵N₂-markierte Varianten des fCTP **27** und caCTP **28** in Ausbeuten von 12 % und 7 % nach der oben beschriebenen Methode synthetisiert, auf die im Kapitel zur Synthese von ¹⁵N₂-markierten Verbindungen eingegangen wird.

Zur Evaluierung des Einbaus der synthetisierten Triphosphate fCTP **10** und caCTP **14** wurde das PGL3_pOct4_eGFP-Plasmid als DNA-Templat verwendet. Erste Einbaustudien wurden von *Dr. Caterina Brandmayr* und *Dr. Benjamin Hackner* mittels PCR durchgeführt. Hierbei wurde dCTP komplett durch das modifizierte Triphosphat ersetzt. Die *Primer* wurden so gewählt, dass ein 150 bp langes Fragment amplifiziert wird, das bis zu 73 modifizierte dCs im Duplex nach erfolgtem Einbau enthält. Hierbei wurden *forward* und *reversed Primer* bei einer Temperatur von 55 °C an das Templat hybridisiert und diese bei Temperaturen von 75 °C (für fCTP) und 72 °C (für caCTP) verlängert. Von den untersuchten Polymerasen ergaben Vent[®] (exo-) für das fdCTP und KOD XL für caCTP den effizientesten Einbau (siehe Gelfoto in Abb. 2.1-3, Reihe 5 und 6). Die caC-enthaltenen PCR-Produkte konnten zunächst nicht visualisiert werden, da standardmäßig ein schwach pufferndes TAE-Puffersystem für die Gelelektrophorese verwendet wurde. Bei Verwendung eines TBE-Puffersystems wurde aufgrund der höheren Pufferkapazität dann allerdings eine scharf Bande für das caC-PCR-Produkts erhalten.

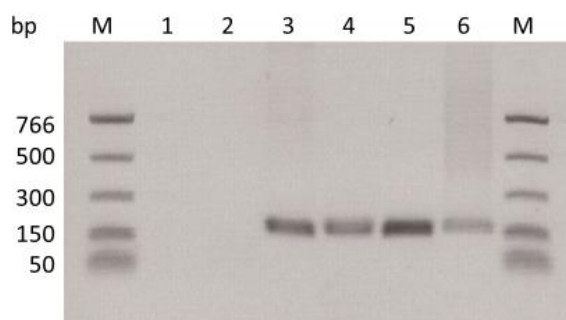


Abb. 2.1-3 Agarosegel von PCR-Produkten. Reihe 1: ohne Templat, Reihe 2: Ohne dC Derivat, Reihe 3: dCTP, Reihe 4: geschütztes $^2\text{H}_2, ^{15}\text{N}_2$ -hmCTP (von *S. Schiesser* synthetisiert), Reihe 5: fCTP, Reihe 6: caCTP.

Wie in Abb. 2.1-3 sichtbar, wurden Vollängen-PCR-Produkte erhalten. Die korrekte Inkorporation der Triphosphate wurde anschließend mit LC-MS (Triple-Quad) bestätigt. Hierzu wurden die PCR-Produkte mit Nuklease S1 und Snake Venom Phosphodiesterase zu den Monophosphaten und durch Zugabe von Antarctic Phosphatase zu den Nucleosiden verdaut. Die erhaltene Mischung wurde mit LC-HRMS oder LC-MS/MS an einem Triple-Quadrupol-Instrument untersucht. Diese Analysen wurden von *Dr. Caterina Brandmayr* und *Dr. Benjamin Hackner* durchgeführt. In Abb. 2.1-4 kann man das erhaltene Ergebnis für fCTP und caCTP sehen. Neben den kanonischen Nucleosiden dA, T und dG wurde fC-Nucleosid und das caC-Nucleosid als dC-Derivat nach dem Verdau erhalten.

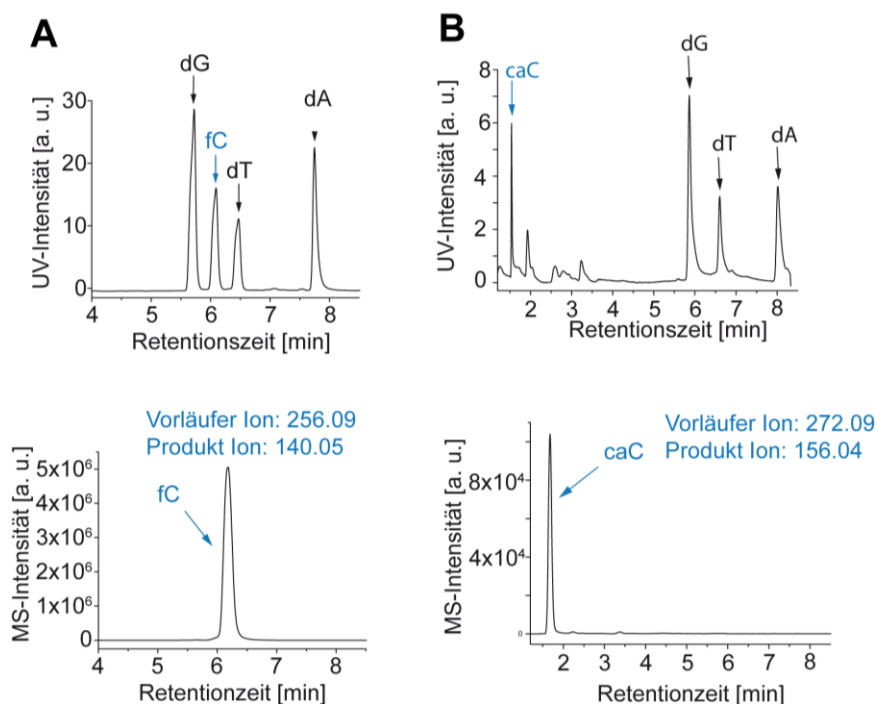


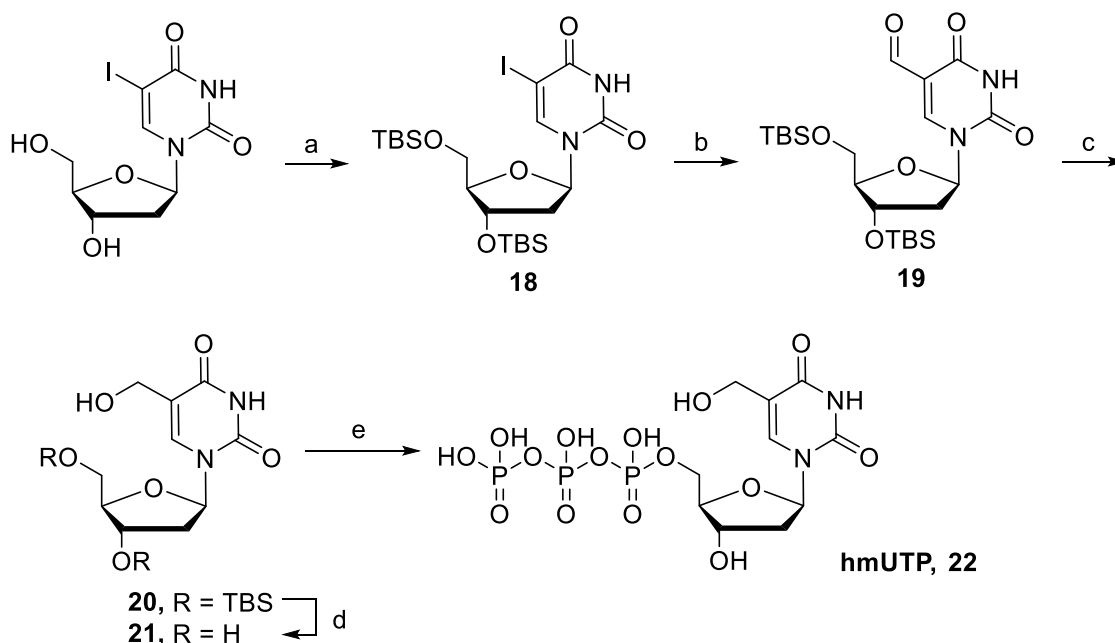
Abb. 2.1-4 UV-Detektion bei 260 nm (oben) und Massenspur (unten) des Totalverdaus der PCR-Produkte mit fCTP (A) und caCTP (B) gemessen mit HRMS.

2.1.2 Synthese von hmdUTP und Einbau in PCR-Produkte

Literaturbekannte Synthesen von hmU gehen von Thymin-Vorläufern aus, die an der C5-Methylgruppe bromiert werden. Das Bromid wird anschließend mit Wasser substituiert. Eine andere Synthese benutzt Uracilvorläufer, die mit Paraformaldehyd direkt zu der hydroxylierten Verbindung umgesetzt werden.^[105] Diese Synthesen sind arbeitsintensiv und haben

vergleichsweise schlechte Ausbeuten (beispielsweise liefert die radikalische Bromierung von TBS-geschützten T eine Ausbeute von 8 %)

Daher wurde versucht hmU ebenso wie die modifizierten dC-Derivate über eine Pd-katalysierte Stille-Kupplung herzustellen (siehe Abb 2.1-5). Hierzu wurde kommerziell erhältliches 5-Iod-2'-desoxyuridin unter Standardbedingungen für TBS-Schützungen zu **18** umgesetzt. Das TBS-geschützte 5-Formyl-2'-desoxyuridin **19** konnte so in einer Ausbeute von 89 % gewonnen werden. Anschließend wurde die Formylgruppe mit CeCl_3 und NaBH_4 in einer Luche-Reaktion zu TBS-hmU **20** reduziert und die TBS-Gruppen mit $\text{HF}\cdot\text{Pyridin}$ in EtOAc entfernt. Hierbei war eine zusätzliche Zugabe von Pyridin notwendig, da sonst die glykosidische Bindung hydrolysierte. Man erhielt so hmU **21** ausgehend von kommerziell erhältlichem 5-Iod-2'-desoxyuridin über vier Stufen in einer Gesamtausbeute von 10 %. Die erzielten Ausbeuten für das Desoxyuridin-Derivat sind ähnlich gut wie Ausbeuten für die Desoxycytidin-Derivate.



Schema 2.1-5 Synthese des hmdU-Triphosphats ausgehend von 5-I-dU. a) TBSCl, Imidazol, DMF/Pyridin, 99 %
 b) CO, PPh_3 , $\text{Pd}_2(\text{dba})_3\cdot\text{CHCl}_3$, Bu_3SnH , Toluol, 89 % c) NaBH_4 , $\text{CeCl}_3\cdot 7\cdot\text{H}_2\text{O}$, MeOH, 21 - 40 % d) $\text{HF}\cdot\text{Pyridin}$, Pyridin, EtOAc, 54 %, e) I. $(\text{Bu}_3\text{NH})_2(\text{H}_2\text{O}_7\text{P}_2)$, Bu_3N , DMF, II. I_2 , Pyridin, H_2O , III. H_2O , 15 %.

Anschließend wurde das Triphosphat analog zu den anderen epigenetischen Bausteinen durch eine Eintopf-Synthese nach *Caton-Williams et al.* gewonnen und durch Umkehrphasen-HPLC gereinigt.^[104a] Die Identität des Triphosphats an der 5'-Position wurde durch $^1\text{H}\text{-}^{31}\text{P}$ -HMBC bestätigt. Das 5-Hydroxymethyl-2'-desoxyuridin (hmUTP, **22**) wurde anschließend erfolgreich in ein 700 bp langes PCR Produkt eingebaut. Hierzu wurde erneut das natürliche TTP durch hmUTP **22** ersetzt.

ERGEBNISTEIL

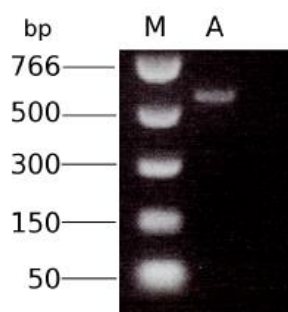


Abb. 2.1-6 Gelfoto der Agarose-Elektrophorese mit hmUTP. M= Marker, A= PCR-Ansatz.

2.2 Synthese von $^{15}\text{N}_2$ -markierten Nukleosidbausteinen

Isotopologe besitzen die gleichen chemischen Strukturen und beinahe gleiche chromatographischen Eigenschaften, jedoch eine größere Masse als ihre natürlichen Analoga. Über diese Massenmarkierung kann von den natürlichen Analoga unterschieden werden. Durch den Einbau von isotopenmarkierten Bausteinen in DNA *via* Festphasen-Synthese oder durch PCR werden biologische Studien am Detektionslimit ermöglicht. Für *isotope tracing*-Experimente werden entsprechende Isotopologe benötigt, um zum Beispiel eine mögliche Demethylierung, Deformylierung oder Decarboxylierung *in vitro* oder *in vivo* nachzuweisen. Ebenso werden stabile Isotopologe der Nukleoside als Referenzverbindungen für die Quantifizierung der epigenetischen Modifikationen eingesetzt.

Als Isotopenmarkierung sollten ^{15}N -Markierungen an der Base eingeführt werden. Anders als bei der Synthese der natürlichen epigenetischen Nukleoside, muss die Base daher zunächst aufgebaut werden und mit einem Glykosyldonor verknüpft werden. Diese Art ^{15}N -Markierungen in Nukleoside einzuführen ist bereits in der Literatur bekannt. Im Arbeitskreis *Carell* wurde die Synthese des Grundgerüsts von *Stefan Schießer et al.* für die Darstellung eines $^{15}\text{N}_2$ -isotopenmarkierten caC-Phosphoramidits optimiert und etabliert.^[24a] Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden die freien $^{15}\text{N}_2$ -Nukleoside von mC **23**, hmC **24**, fC **25** und caC **26** hergestellt (siehe Abb. 2.2-1). Ausgehend von diesen Nukleosiden wurden die Triphosphate von fC **27** und caC **28** für den Einbau in PCR-Produkte synthetisiert. Desweiteren wurde ein $^{15}\text{N}_2$ -caC-Phosphoramidit für eine Kooperation *A. Drohat* und $^{15}\text{N}_2$ -fC-Phosphoramidite mit einer alternativen Schutzgruppenstrategie synthetisiert (nicht in dieser Doktorarbeit beschrieben). Außerdem wurde eine $^{15}\text{N}_2$ -markierte Phosphoramidit-Vorstufe von hmC hergestellt.

ERGEBNISTEIL

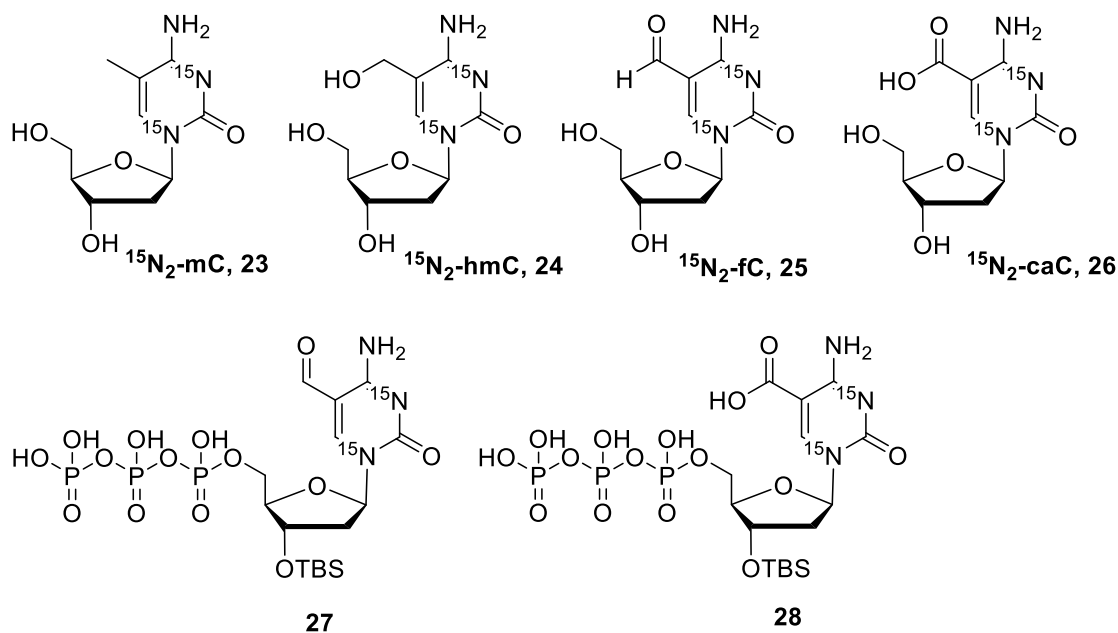
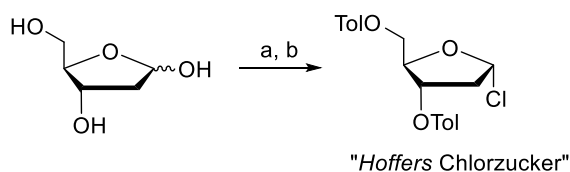
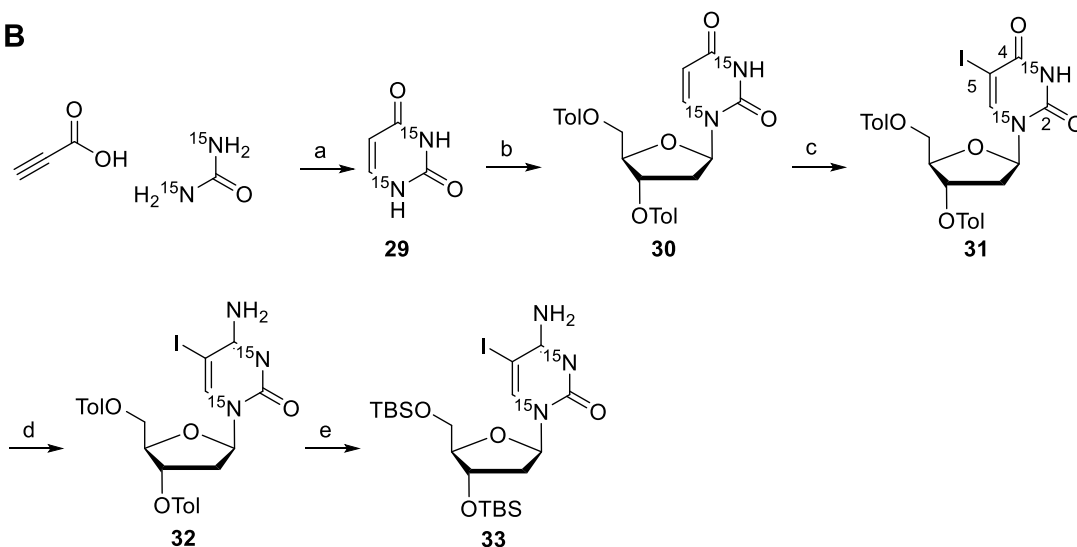


Abb. 2.2-1 Synthetisierte $^{15}\text{N}_2$ -markierte dC-Nucleoside fC **25** und caC **26** wurden zudem als Triphosphate und hmC, fC und caC mit den entsprechenden Schutzgruppen als Phosphoramidite bzw. Phosphoramiditvorstufen hergestellt.

Die Synthese des $^{15}\text{N}_2$ -markierten Grundgerüsts ist in Schema 2.2-1 dargestellt. Als Glykosyldonor wurde *Hoffers* Chlorzucker^[106] verwendet, der ausgehend von Desoxyribose in zwei Stufen synthetisiert werden kann. $^{15}\text{N}_2$ -markiertes Uracil **29** wurde durch Kondensation von $^{15}\text{N}_2$ -markierten Harnstoff und Propiolsäure nach *Nui et al.* hergestellt.^[107] Anschließend wurde $^{15}\text{N}_2$ -Uracil **29** mit TMSCl und HMDS silyliert und mit *Hoffers* Chlorzucker nach *Vorbrüggen* gekuppelt.^[108] Durch die Silylierung bei der Vorbrüggen-Glykosylierung nimmt die Nukleophilie des N1 zu, da das Elektronenpaar nicht mehr an der aromatischen Stabilisierung beteiligt ist. Durch Filtration konnte das in EtOAc gut lösliche α -Anomer von dem schlecht löslichen β -Anomer abgetrennt werden.^[108] Das erhaltende 2'-Desoxyuridin-Derivat **30** wurde anschließend elektrophil mit Lithiumiodid und $\text{Ce}(\text{NH}_4)_2(\text{NO}_3)_6$ (CAN) zum 5-Iod-2'-desoxyuridin-Derivat **31** iodiert.^[109]

A

B


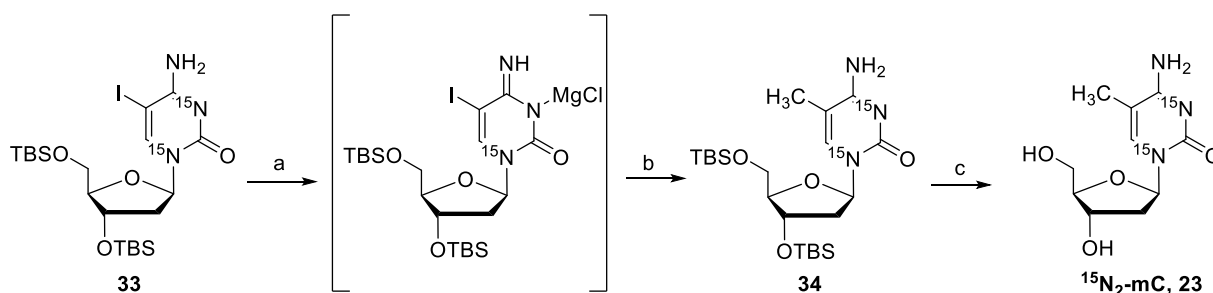
Schema 2.2-1 (A) a) i) AcCl, MeOH, 30 min, RT, ii) TolCl, Pyridin, 2 h, 45 °C, b) HOAc (konz), AcCl, H₂O, 15 min, 0 °C. (B) a) Polyphosphorsäure, 95 °C, 22 h, 39 %, b) i) TMSCl, HMDS, 60 °C, 1.5 h, ii) *Hoffers* Chlorzucker, CHCl₃, RT, 15 h, 53 %, c) LiI, CAN, 80 °C, 75 min, 94 %, d) i) 1*H*-1,2,4-Triazol, POCl₃, TEA, MeCN, 0 °C → 30 °C, 17 h, ii) NH_{3(aq)}, 1,4-Dioxan, 30 °C, 15 min, 73 %, e) i) K₂CO₃, MeOH, 40 °C, 15 h, ii) TBSCl, Imidazol, Pyridin, 40 °C, 4 d, 61 %.

Nachfolgend wurde das Desoxyuridin-Derivat an der 4-Position mit 1*H*-1,2,4-Triazol und POCl₃ aktiviert und durch eine darauf folgende nukleophile Substitution mit Ammoniak in das Desoxycytidin-Derivat **32** überführt.^[110] Die Toluoyl-Schutzgruppen wurden basisch hydrolysiert. Ohne weitere Aufarbeitung wurde dann eine TBS-Schützung mit TBSCl und Imidazol zu **33** durchgeführt. Die Reaktionszeit für eine vollständige Entschützung betrug bis zu drei Tagen. Durch eine vorherige Aufarbeitung konnte die Reaktionszeit verkürzt und die Ausbeute verbessert werden. Die Umschützung ist notwendig, da Toluoylschutzgruppen ungeeignet für die nachfolgende Stille-Kupplung sind.

Das iodierte ¹⁵N₂-markierte Nukleosid **33** ist das Schlüsselintermediat für alle Synthesen der in Abb.2.2-1 dargestellten epigenetischen Nukleoside. Während mC durch eine Grignard-Reaktion synthetisiert wurde, waren die ¹⁵N₂-markierten hmC-, fC und caC-Nukleoside durch eine Stille-Kupplung ausgehend von **33** analog zu den unmarkierten Verbindungen zugänglich.^[28]

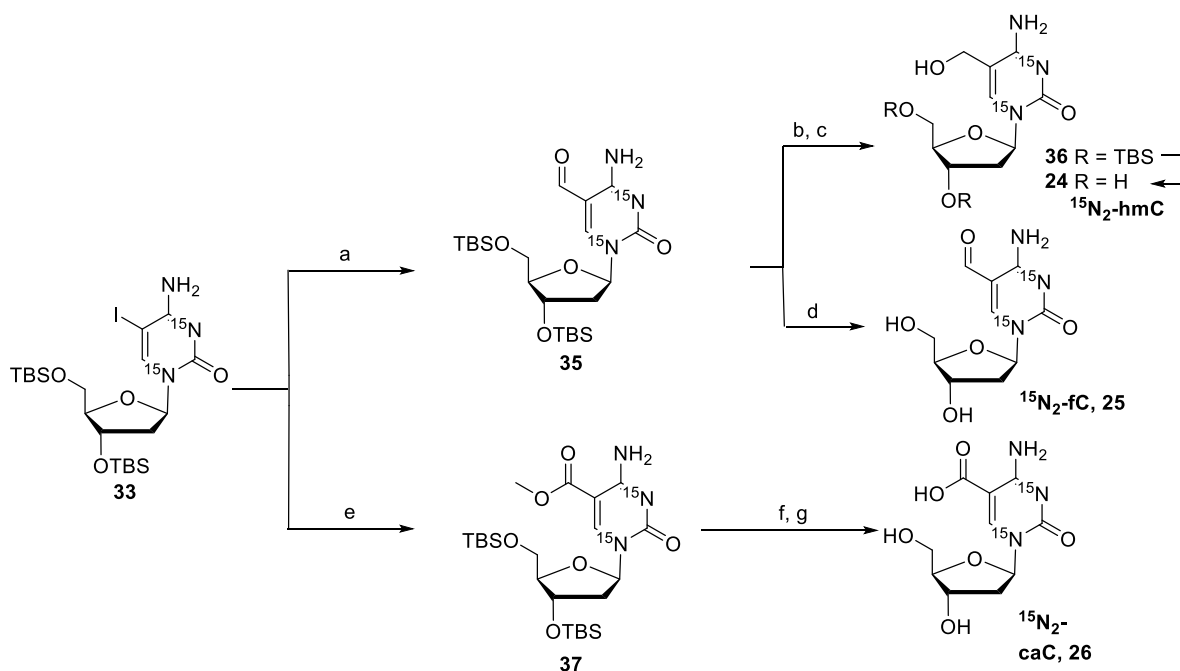
Für die Synthese von ¹⁵N₂-markiertes mC aus dem iodiertem TBS-geschützten 2'-Desoxycytidin **33** mittels einer Grignard-Reaktion wurde MeMgCl verwendet (siehe Schema 2.2-2). Ein Äquivalent des Grignard-Reagenzes wurde zunächst als Base verwendet. Die

Grignard-Lösung wurde zum Nucleosid bei $-0\text{ }^{\circ}\text{C}$ zugegeben, um die Aminogruppe in der 4-Position zu deprotonieren und so zu „schützen“ (deprotoniertes Iminotautomer). Anschließend wurde ein Pd(0)-Katalysator und CuCl als Additiv zugegeben. So wurde eine Mischung aus TBS-geschütztem Desoxycytidin **33** und TBS-geschütztem mC **34** erhalten, die durch chromatographische Methoden nicht trennbar war. Nach der anschließenden Entschützung der TBS-Gruppen mit HF-Pyridin und einer Aufreinigung mit Umkehrphasen-HPLC konnte das $^{15}\text{N}_2$ -markierte mC-Nucleosid schließlich in einer Ausbeute von 16 % über 2 Stufen gewonnen werden.



Schema 2.2-2 Synthese des ^{15}N -markierten 5-Methyl-2'-deoxycytidins. a) MeMgCl, THF, $0\text{ }^{\circ}\text{C}$, b) CuI, $\text{Pd}_2(\text{PPh}_3)_4$, THF, $0\text{ }^{\circ}\text{C}$, 3.5 h; (c) HF-Pyridin, Pyridin, EtOAc, RT, 12 h, 16 %.

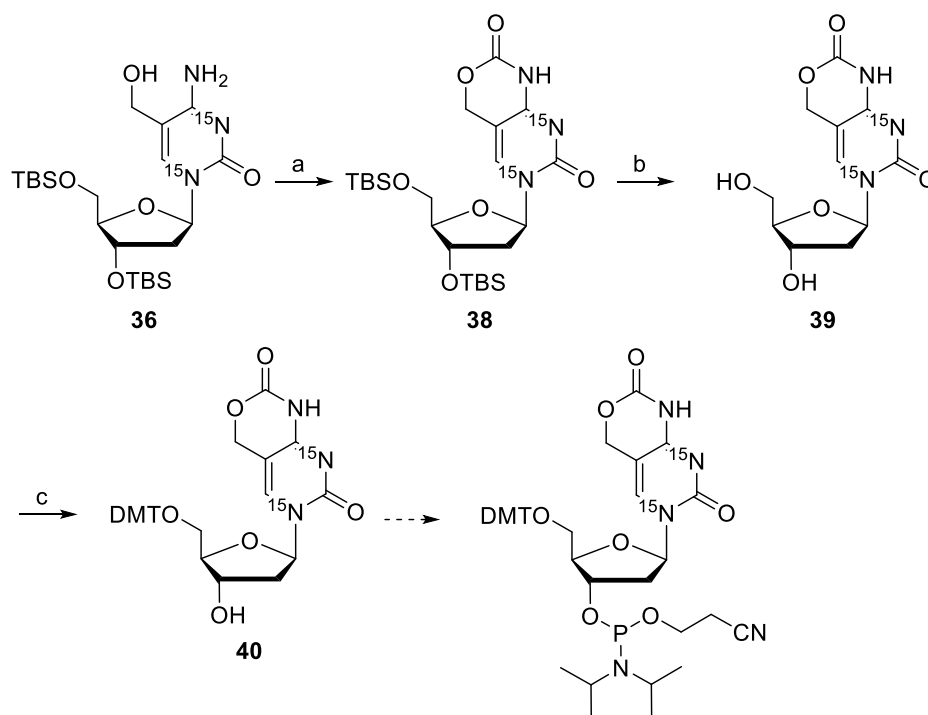
Die ^{15}N -markierten Nucleoside wurden über eine Stille-Kupplung analog zu den unmarkierten Verbindungen synthetisiert. In Schema 2.2-3 sind die Synthesen dargestellt.



Schema 2.2-3 Synthese der ^{15}N -markierten Nucleoside von hmC, fC und caC. a) CO, PPh_3 , $\text{Pd}_2(\text{dba})_3\text{-CHCl}_3$, Bu_3SnH , Toluol, 3.5 bar CO, 16 h, $65\text{ }^{\circ}\text{C}$, 75 %; b) NaBH_4 , CeCl_3 , MeOH, 30 min, $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ \rightarrow RT, 71 %; c) HF-Pyridin, Pyridin, EtOAc, RT, quant.; d) HF-Pyridin, Pyridin, EtOAc, RT, 63 %; e) $\text{PdCl}_2(\text{MeCN})_2$, DIPEA, MeOH, 3.5 bar CO, 16 h, $65\text{ }^{\circ}\text{C}$; f) HF-Pyridin, Pyridin, EtOAc, RT, 30 %; g) LiOH, THF/ H_2O , RT, 44 %.

Ausgehend von $^{15}\text{N}_2$ -markiertem, TBS-geschützten 5-Iodcytidin **33** wurde in einer CO-Insertation TBS-5-Formyl-2'-desoxycytidin **35** in 75 % Ausbeute hergestellt. Bei einer TBS-Entschützung unter Standardbedingungen wurde das freie fC-Nukleosid **25** erhalten. Die Formylgruppe des TBS-geschützten $^{15}\text{N}_2$ -Cytidins wurde durch eine Luche-Reduktion zum TBS-geschützten hmC **36** in einer sehr guten Ausbeute von 71 % reduziert. Eine Silyletherabspaltung in HF·Pyridin ergab das freie $^{15}\text{N}_2$ -hmC-Nukleosid. Der TBS-geschützte ^{15}N -markiertes Methylester **37** wurde von *Dr. Stefan Schießer* bereitgestellt. Die TBS-Schutzgruppen wurden mit HF·Pyridin abgespalten und der Methylester in einer Ausbeute von 44 % unter basischen Bedingungen zu **26** verseift.

Die Synthese einer Vorstufe des $^{15}\text{N}_2$ -hmC-Phosphoramidits wurde ebenfalls durchgeführt (siehe Schema 2.2-4).



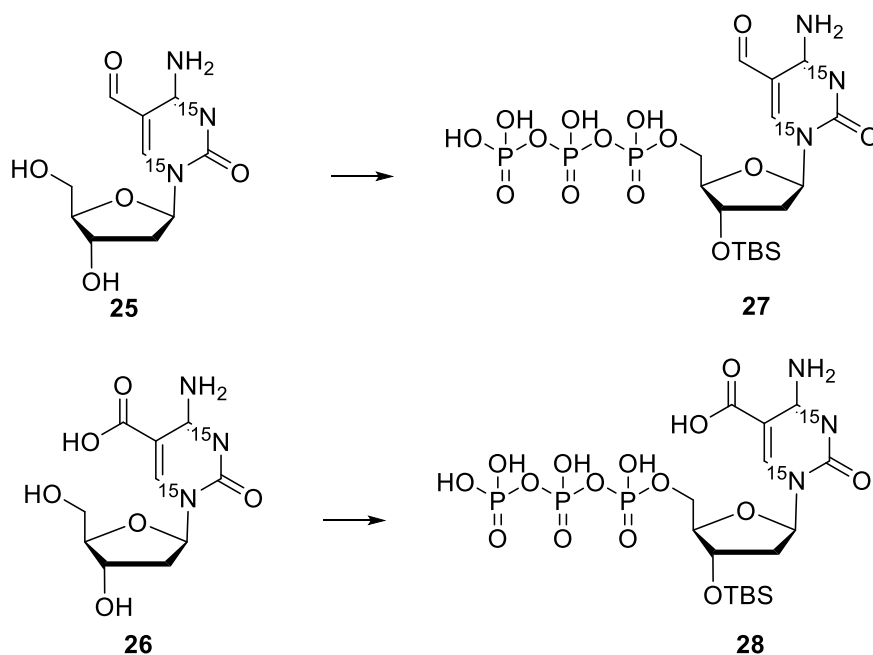
Schema 2.2-4 Synthese des $^{15}\text{N}_2$ -markierten hmdC Phosphoramidits a) NaBH_4 , CeCl_3 , MeOH, $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$, 30 min, 71 %, b) 4-Nitrophenylchloroformiat, DIPEA, THF, RT, 14 h, 76 %, d) HF·Pyridin, Pyridin, EtOAc, RT, 44 %, e) DMTCI, Pyridin, RT, 16 h, 86 %.

Durch Umsetzung des TBS-geschützten $^{15}\text{N}_2$ -hmC **36** mit 4-Nitrochlorformiat und Hünigbase wurde das zyklische Carbamat **38** in einer Ausbeute von 76 % Ausbeute gebildet. Dabei wird Amino- und Hydroxyfunktionalität gleichzeitig geschützt. Die TBS-Schutzgruppen wurden mit HF·Pyridin entfernt. Im Gegensatz zu den bisherigen TBS-Entschützung von Cytidin-Derivaten mit HF·Pyridin fiel das Produkt **39** nicht als Feststoff aus. Daher musste das Rohprodukt durch Säulenchromatographie gereinigt werden. Anschließend wurde in einer

ERGEBNISTEIL

Ausbeute von 86 % eine DMT-Schutzgruppe an der 5'-Position zu **40** eingeführt, die für die Festphasen-DNA-Synthese benötigt wird. Der hergestellte Baustein **40** kann in einem weiteren Schritt ins Phosphoramidit umgewandelt werden und ermöglicht damit die Synthese von $^{15}\text{N}_2$ -markierter hmC-haltiger DNA. Für biologische Studien, die an der Nachweisgrenze liegen, sollten außerdem Triphosphate mit stabilen Isotopenmarkierungen synthetisiert werden. Die $^{15}\text{N}_2$ -markierten Triphosphate von hmC und caC wurden erstmals von *Dr. Stefan Schiesser* synthetisiert. Das $^{15}\text{N}_2$ -markierten caC wurde für einen Einbau in PCR-Produkte im Rahmen dieser Doktorarbeit reproduziert und optimiert. Zusätzlich wurde die Synthese des $^{15}\text{N}_2$ -fC-Derivats etabliert.

Im Folgenden soll auf die Synthesen des $^{15}\text{N}_2$ -markierten fCTP und caCTP eingegangen werden (siehe Schema 2.2-5)



Schema 2.2-5 i) Salicylchlorphosphit, $(\text{Bu}_3\text{NH})_2(\text{H}_2\text{O}_7\text{P}_2)$, Bu_3N , DMF, RT, 2.5 h; ii) Iod, Pyridin, H_2O , iii) H_2O . Für das $^{15}\text{N}_2$ -fCTP wurde eine Ausbeute von 12 % und für das $^{15}\text{N}_2$ -caCTP eine Ausbeute von 7 % erzielt.

Für die Triphosphatsynthesen wurden die ^{15}N -Nukleoside präparativ mittels Umkehrphasen-HPLC aufgereinigt. $^{15}\text{N}_2$ -fC **25** und $^{15}\text{N}_2$ -caC **26** wurden hiernach durch die Eintopfsynthese von *Caton-Williams et al.* isoliert.^[104a] Das fC **25** wurde in einer Ausbeute von 12 % in das Triphosphat **27** überführt und für das caC **26** wurde das Triphosphat **28** in einer Ausbeute von 7 % erhalten. Die Triphosphate wurden als Tetrakis(triethylammonium)salze isoliert. Die $^{15}\text{N}_2$ -markierten Triphosphate konnten analog zu den nicht markierten Triphosphaten von fC und caC enzymatisch in PCR-Produkte eingebaut werden.

In Abb. 2.2-2 ist die Gelelektrophorese für die PCR-Produkte der $^{15}\text{N}_2$ -markierten Triphosphate dargestellt. Die Bande bei 150 bp zeigt, dass das PCR-Produkt erhalten wurde, wenn dCTP durch $^{15}\text{N}_2$ -fCTP oder $^{15}\text{N}_2$ -caCTP ersetzt wurde.

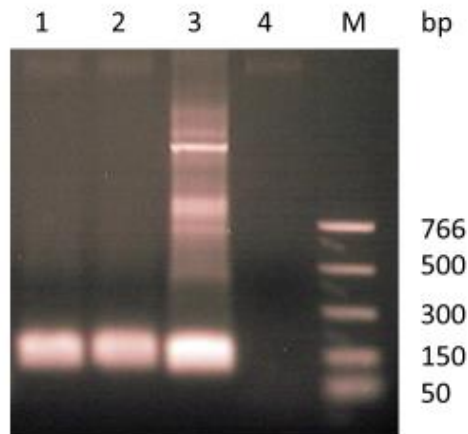


Abb.2.2-2 Agarosegel von PCR-Produkten. Reihe 1: $^{15}\text{N}_2$ -fCTP, Reihe 2: $^{15}\text{N}_2$ -caCTP, Reihe 3: mit dCTP, Reihe 4: ohne dC Derivat, Marker.

2.3 Synthese von Antigenen zur Entwicklung von polyklonalen Antikörpern

Zur gewebespezifischen Markierung und Visualisierung epigentischer Basen sowie zur Anreicherung, zum Beispiel für die Sequenzierung, werden spezifische Antikörper benötigt. Da kleine Moleküle als Haptene zu schnell verstoffwechselt werden und daher nicht immunogen genug sind, müssen diese kovalent an größere Trägermoleküle gekuppelt werden. Das Kupplungsprodukt aus Träger und Hapten ist ein vollständiges Antigen, was eine Immunreaktion auslösen kann.

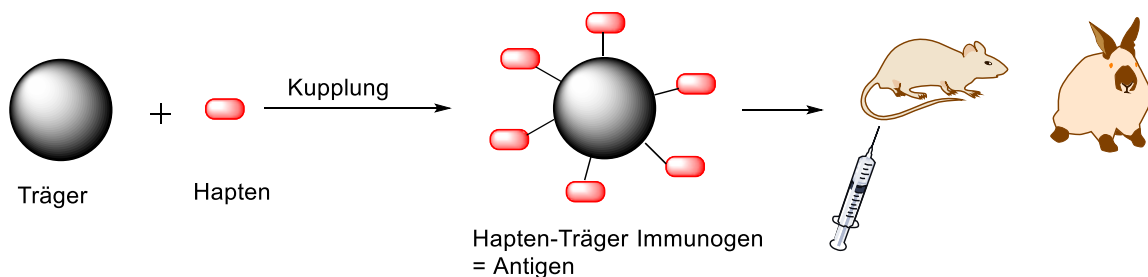


Abb. 2.3-1 Herstellung von polyklonalen Antikörpern für ein Hapten.

Hiernach werden sie typischerweise für die Generierung polyklonaler Antikörper in Kaninchen oder Ratten injiziert, die gegen das Antigen eine Immunreaktion entwickeln (siehe Abb. 2.3-1). Nach einigen Wochen können erste Antikörperseren gewonnen werden, die aus einer Mischung aller generierten Immunglobuline bestehen und an verschiedene Epitope des Antigens binden.

Als Träger werden normalerweise hoch immunogene Makromoleküle, wie Proteine, Liposomen, synthetische oder natürliche Polymere (Partikel aus Dextran, Agarose, Poly-L-Lysin) oder synthetische Makromoleküle verwendet. Diese Träger müssen immunogen sein, sowie funktionelle Gruppen besitzen, die eine Konjugation mit dem kleinen Molekül (Hapten) ermöglichen. Bei einer typischen Immunantwort produzieren Plasmazellen (im Zusammenspiel mit T-Helferzellen und Antigen-präsentierenden Zellen) IgG-Antikörper, die spezifisch für Epitope des Haptens sowie Epitope des Trägerproteins sind. Um Hapten-spezifische Antikörper in einem ersten *Screening* zu identifizieren, ist es daher üblich Konjugate mit verschiedenen Träger herzustellen.^[69]

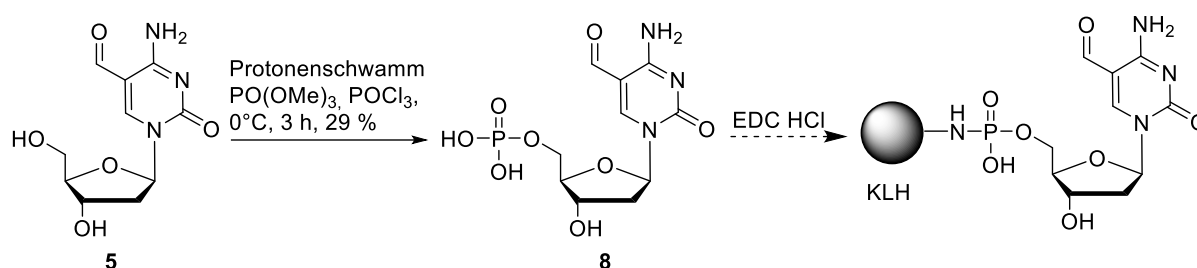
Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden Proteine, wie KLH, BSA und OVA als Träger verwendet. Keyhole Limpet Hemocyan (KLH) eignet sich als Trägerprotein aufgrund seiner hohen molekularen Masse (4.5×10^5 - 8.0×10^6 kDa Aggregate bestehend aus 350 und 390 kDa Untereinheiten) und der vielen frei verfügbaren Lysine, Cysteine und Tyrosine, die zur Kupplung genutzt werden können. Im basischem oder sauerem Medium dissoziiert das Protein in fünf Untereinheiten, die immunogener sind als das komplett assoziierte Protein.^[111] Bovine Serum Albumin (BSA) ist mit einem Molekulargewicht von 67 kDa weitaus kleiner als KLH, aber dennoch sehr immunogen. Es ist sehr gut wasserlöslich und besitzt insgesamt 59 Lysine, von denen 30 – 35 für eine Kupplung zugänglich sind. Desweiteren sind zahlreiche Carboxylgruppen vorhanden, die BSA seine negative Gesamtladung geben ($pI = 5.1$).^[112] BSA wird als gut etablierter und charakterisierter Standard für Immunoassays meist als sekundärer Träger bei einer Immunisierung mit KLH-Konjugaten verwendet. Ovalbumin (45 kDa, $pI = 4.63$) wird ebenso oft als Sekundärträger verwendet. Es besitzt 20 Lysine, 14 Aspartate und 33 Glutamate.^[113]

2.3.1 Synthese eines Antigens für polyklonale Antikörpers gegen fC

Nukleoside werden standardmäßig an Proteine über eine Aktivierung von Carboxylgruppen oder Phosphatgruppen mit wasserlöslichem EDC·HCl gekuppelt. Die aktivierten Carbonsäuren oder Phosphate bilden mit den primären Aminen der Lysine stabile Amid- bzw.

Phosphoramiditbindung aus.^[114] Eine weitere gebräuchliche Kupplungsstrategie für Nucleoside ist eine oxidative Periodatspaltung nach *Erlanger und Beiser*. Hierbei werden die *cis*-Diolgruppen von RNA-Zuckern durch Behandlung mit Natriumperodat zu den Aldehyden umgesetzt. Durch eine reduktive Aminierung können die Aldehyde mit der primären Aminogruppe von Lysinen kovalent verknüpft werden.^[115]

Zur Generierung eines polyklonalen Antikörpers gegen fC wurde das Monophosphat des fCs synthetisiert (Schema 2.3-1). Anschließend wurde das Monophosphat durch Aktivierung mit EDC·HCl an die primären Lysine des Trägerproteins KLH gekuppelt.



Schema 2.3-1 Herstellung eines fCMP-Antigens aus KLH und fCMP. Synthese des 5'-fC-Monophosphats aus dem freien fC-Nucleosid. Nach der Phosphorylierung an der 5'-Position mit POCl₃ in PO(OMe)₃ kann das Monophosphat über eine EDC-Kupplung an das Trägerprotein angebracht werden.

Die Synthese des freien fC-Nucleosids **5** erfolgte wie bereits beschrieben ausgehend von TBS-geschütztem 5-Iod-dC **2** durch eine Stille-Kupplung und anschließender TBS-Entschützung.^[39] Das Monophosphat **8** wurde aus dem freien Nucleosid mit Hilfe des Protonenschwamms POCl₃ in PO(OMe)₃ als Lösungsmittel nach *Yoshikawa et al.* synthetisiert.^[99] Nach Aufreinigung mittels Umkehrphasen-HPLC konnte das Monophosphat in 29 %-iger Ausbeute isoliert werden.

Die Kupplung an KLH und Immunisierung von Hasen wurde durch die Firma *Diogenode* durchgeführt. Die finalen Antikörper-Seren wurden gegen synthetisierte Oligonucleotide, die die Modifikationen dC, mC, hmC, fC und caC enthielten, in einem *Dot-Blot Assay* getestet. Hierfür wurden die Oligonucleotide bei 80°C an eine Membran „gebacken“, die Membran mit Milchpulver geblockt und mit dem Antikörperserum behandelt. Nach anschließender Behandlung mit einem sekundären Antikörper sollte die Chemilumineszenz visualisiert werden. Abb. 2.3-2 zeigt das Ergebnis eines solchen Antikörpertests. Als Ergebnis bleibt festzuhalten, dass das Antikörperserum unspezifisch mit den getesteten Oligonucleotiden reagierte.

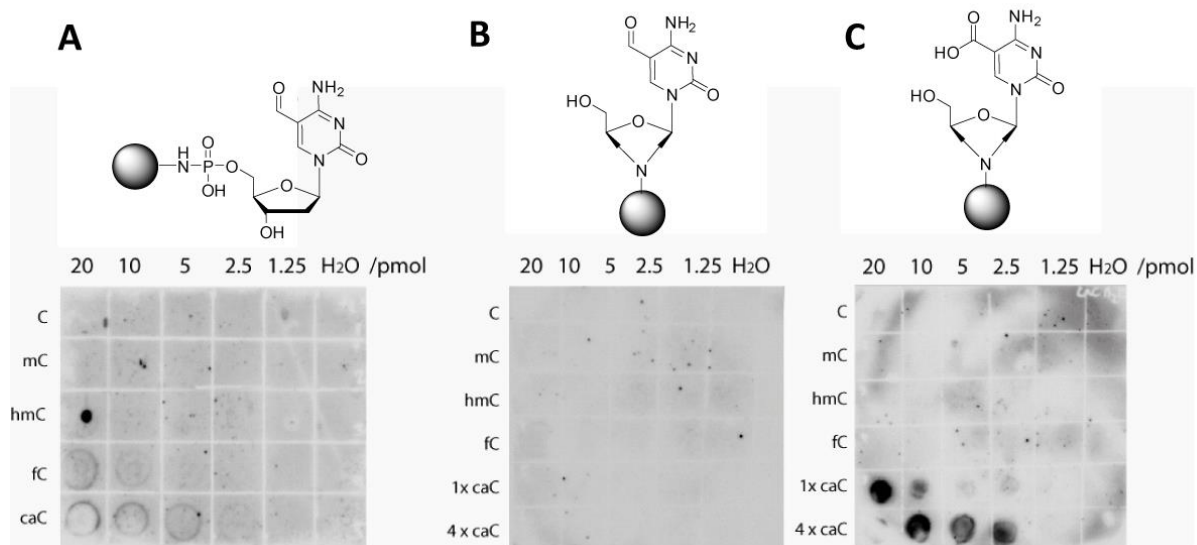


Abb. 2.3-2 Darstellung des *Dot-blot assays* mit synthetischen Oligonukleotiden (38 mer, Sequenz: 3'-GTA GCC AGG TCG CAC GCG TGC TAX GAT GCG AGACTG C-5'), die je einmal die Modifikation X (C, mC, hmC, fC und caC) enthalten. In einem weiteren Oligonukleotid der gleichen Sequenz wurde caC viermal eingebaut (4 x caC). Die verwendeten ssDNA-Mengen sind in [pmol] angegeben. (A) *Dot blot assay* mit fC-Monophosphat-Antikörper-Serum. (B) und (C) *Dot blot assay* mit Antikörpern der Frima *Active Motif*, die als Antigen die Ribose-Form der Nucleoside fC (B) und caC (C) verwendet haben.

Gleichzeitig wurden zum Vergleich kommerziell erhältliche Antikörper gegen fC und caC von *Active Motif* getestet. Die Nucleoside wurden hier durch Periodatspaltung der Ribose-Form der Nucleoside und anschließende reduktive Aminierung an die primären Amine gekuppelt.^[21b] Während der caC-Antikörper eine gute Spezifität und Reaktion mit den caC-enthaltenden Oligonukleotiden zeigte, reagierte das kommerziell erhältliche fC-Antikörperserum nicht mit den fC-enthaltenden Oligonukleotiden (siehe Abb. 2.3-2 B). Das caC trägt eine negative Ladung, die offenbar immunogen ist. Man sieht in Abb. 2.3-2 C, dass der caC-Antikörper mit Oligonukleotiden, welche ein caC (1 x caC) beinhalten reagiert. Auch mit einem Oligonukleotid, welches mehrere caC (4 x caC) enthält, zeigte sich eine Bindung. Es lässt sich ein Dosis-Effekt erkennen. Durch einen Mehrfacheinbau von caC wird auch ein stärkeres Antikörper-Signal erhalten. Im Vergleich dazu stellt die fC-Base mit der ungeladenen Aldehydgruppe offenbar kein ausreichend immunogenes Hapten dar. Ein ähnliches Problem tritt auch mit hmC auf. Für die Generierung eines hmC-Antikörpers wurde daher zum Beispiel eine Strategie entwickelt, bei der die ungeladene Hydroxylgruppe mit einer geladenen Sulfonsäuregruppe maskiert wurde, um sie in ein stärkeres Immunogen zu verwandeln.^[46, 116] Ebenso könnte die Entfernung der fC-Base vom Trägerprotein eine entscheidende Rolle

spielen. So könnte eventuell der Einbau eines Linkers zwischen fC und Trägerprotein eine bessere Immunantwort hervorrufen.

Für das fC wurde zunächst versucht, die Aldehydgruppe in ein stärkeres, geladenes Antigen zu verwandeln (siehe Abb. 2.3-3). Im Arbeitskreis stand ein Hydroxylamin-Reagenz „*Superfly*“ von *Dr. Toni Pfaffeneder* zur Derivatisierung von Aldehydgruppe von abasischen Stellen in DNA zur Verfügung. Dieses Reagenz trägt eine permanente positive Ladung, die höchst immunogen wirken sollte und aufgrund des negativ geladenen Phosphatrückgrats gut mit Aldehydgruppen in DNA reagieren sollte.

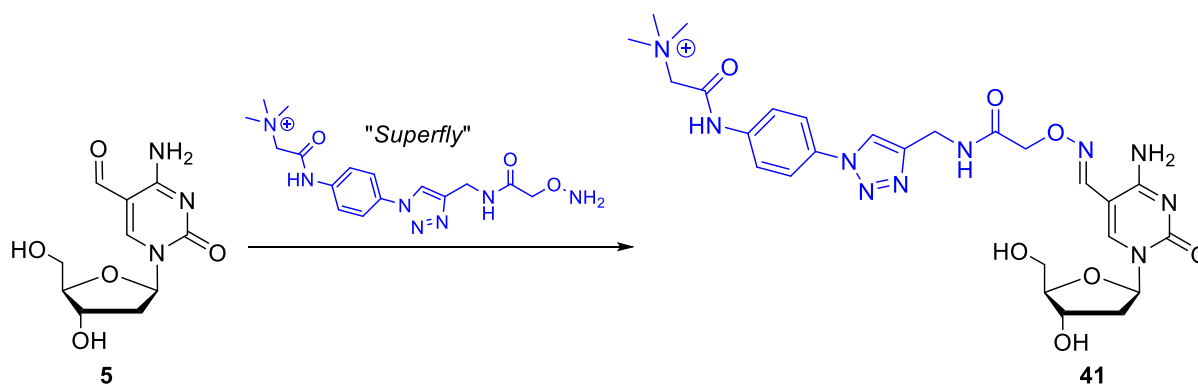
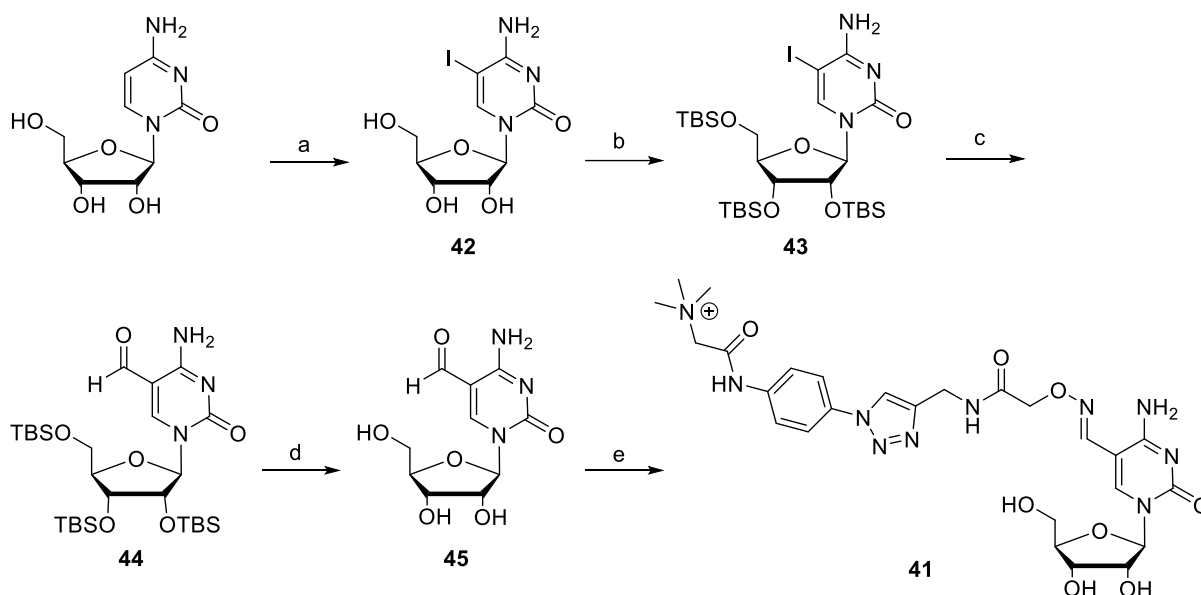


Abb. 2.3-3 Derivatisierung der Formylgruppe des fC mit dem Hydroxylamin-haltigem *Superfly* Reagenz.

Für die Anwendung eines solchen Reagenzes muss das zu untersuchende Gewebe bzw. die DNA zunächst mit diesem Reagenz und anschließend mit dem Antikörperserum behandelt werden.

Zur Immunisierung wurde eine entsprechend derivatisiertes fC-Nukleosid **41** synthetisiert. Als Kupplungsstrategie an Trägerproteine wurde eine Periodatspaltung nach *Erlanger* und *Beiser* gewählt, die über die ribo-Form des Nukleosids realisiert wurde.^[117] Die entsprechende Synthese ist in Schema 2.3-2 dargestellt.

ERGEBNISTEIL



Schema 2.3-2 Synthese eines derivatisierten ribo-fC-Nucleosids. Als Reagenz für die Derivatisierung wurde das „*Superfly*-Reagenz“ verwendet. a) *m*CPBA, I₂, DMF/Pridin, RT, 2 h, 43 %, b) TBSCl, Imidazol, DMF, RT, 16 h, 74 %, c) Pd₂(dba)₃·CHCl₃, PPh₃, Bu₃SnH, 3.5 bar CO, Toluol, 60°C, 60 %, d) HF-Pyridin, Pyridin, RT, 16 h, 95 % e) Hydroxylamin-*Superfly*, 2 mM Anillin, H₂O, RT, 16 h, 23 %.

Das Ribonucleosid wurde über analoge, vom 2`-Desoxynucleosid bekannte Syntheseschritte (siehe Schema 2.3-2) hergestellt. Ausgehend von Cytidin wurde die 5-Position in einer Ausbeute von 43 % oxidativ iodiert. Das Produkt **42** wurde in einer Ausbeute von 43 % erhalten. Die Schützung der Alkoholgruppen wurde mit TBSCl durchgeführt. Es wurde ein Gemisch aus zweifach und dreifach geschützten Nucleosid **43** erhalten, wobei mehr zweifach geschütztes Nucleosid entstand. Eine vollständige Schützung war vermutlich aus sterischen Gründen nicht möglich. Die kombinierte Ausbeute des geschützten Nucleosids **43** betrug dennoch 74 %. Sie könnte vermutlich durch die Verwendung einer Silylklammer an der 2`-und 3`-Hydroxygruppe verbessert werden. Anschließend wurde die Stille-Kupplung durchgeführt, die das Aldehyd-Nucleosid **44** in 60 %-iger Ausbeute generierte. Anschließend wurden die TBS-Schutzgruppen zu **45** unter Standardbedingungen abgespalten. Hiernach wurde die Aldehydgruppe mit dem Hydroxylaminreagenz *Superfly* unter Anilin-Katalyse irreversibel zu dem Zielmolekül **41** umgesetzt und über Umkehrphasen-HPLC aufgereinigt. Hierbei war es wichtig, ein gepuffertes Laufmittelsystem zu verwenden, um eine Elution des Produkts zu gewährleisten. Die Konjugation an KLH durch eine Periodatspaltung und die Immunisierung wurde durch *Active Motif* durchgeführt. Zuvor wurde getestet, ob das Antigen die Bedingungen für die Kupplung an das Trägerprotein übersteht. Hierzu wurde das synthetisierte fC-*Superfly*-Konjugat **41** mit den für die Periodat-Kupplung erforderlichen Bedingungen inkubiert. HRMS-ESI und eine analytische HPLC-Analyse zeigten, dass die derivatisierte Base bei diesen

Bedingungen nicht beschädigt wird. Die polyklonalen Antikörperseren wurden von *Active Motif* bereitgestellt.

Für die Validierung mittels *Dot Blot* Assays wurden synthetische Oligonukleotide hergestellt, die unterschiedliche Anzahlen an fC-Basen (1xfC, 4xfC, 6xfC) enthielten. Diese Oligonukleotide wurden mit *Superfly* umgesetzt und überschüssiges Reagenz wurde durch ein von *Dr. Toni Pfaffender* entwickeltes Protokoll, das mehrere Wasch- und Fällungsschritte beinhaltet, entfernt. Der dazugehörige *Dot Blot* Assay ist in Abb. 2.3-4-A dargestellt. Das polyklonale Serum reagiert selektiv nur mit Oligonukleotiden, die fC beinhalten, dass mit *Superfly* behandelt wurde.

In dem nächsten Validierungsschritt wurden als Kontrollen nicht fC-haltige Oligonukleotide (38 mere) mit *Superfly* behandelt (siehe Abb. 2.3-4-B). Diese zeigten ebenso eine Reaktion mit dem Serum, obwohl das Reagenz vollständig entfernt wurde (Analytik mittels TripleQuad). In Abb. 2.3-4-C ist dargestellt, dass der Antikörper mit unbehandelter synthetischer DNA, die fC enthält, nicht reagiert. Abb. 2.3-4-C, zeigt, dass im gleichem Maße DNA, die mit *Superfly* behandelt wurde, die aber kein fC enthält (S-C, Sa-C) mit dem Antikörper reagiert.

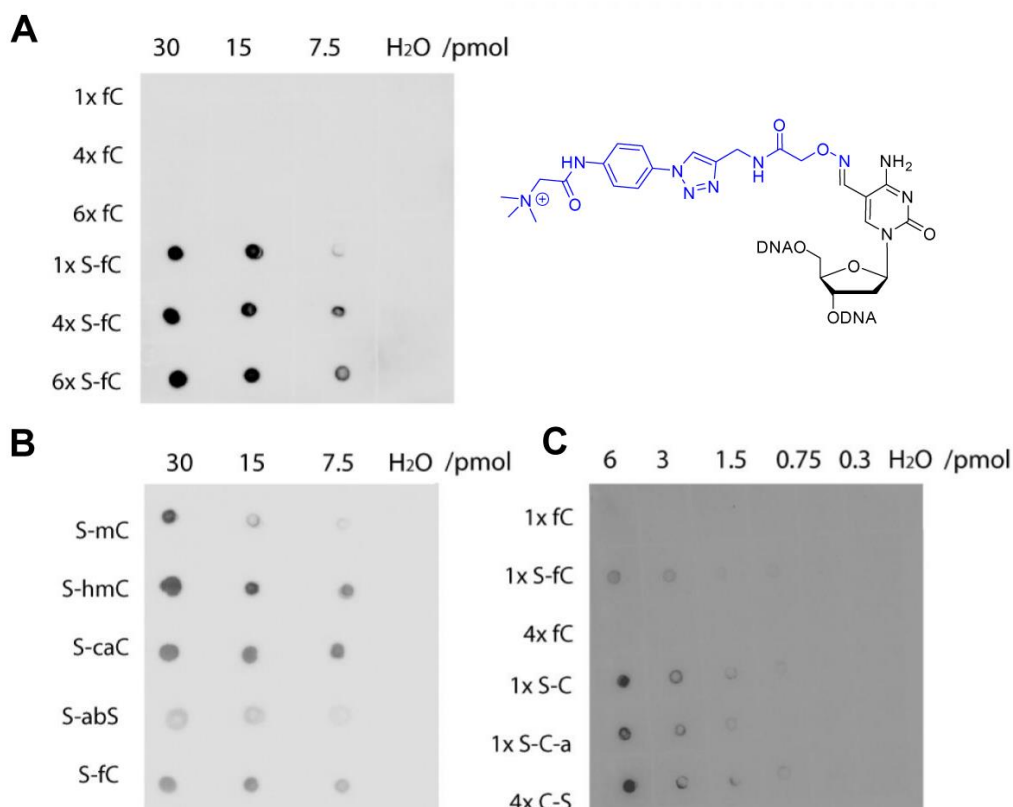


Abb. 2.3-4 Ergebnisse des *Dot-blot assays* mit synthetischen Oligonukleotiden (38 mer, Sequenz: 3'- TTA-GAG-CAT-XTA-TXT-ATX-TAT-XTA-TXT-ATX-TAC-AAA-GG-5'), die je einmal oder mehrmals die Modifikation X (C, mC, hmC, fC und caC) enthielten. Einige Oligonukleotide wurden mit dem Hydroxylamin-Reagenz *Superfly*

ERGEBNISTEIL

umgesetzt, das die Formylgruppe von fC markieren soll. Die verwendeten ssDNA-Mengen sind in [pmol] angegeben. (A) *Dot blot assay* mit fC-*Superfly*-Antikörper-Serum und fC-Oligonukleotiden bzw. fdC-Nukleosiden, die mit *Superfly* umgesetzt wurden. (B) und (C) *Dot blot assay* mit Antikörpern der Firma *Active Motif*, die als Antigen die Ribo-Form der Nukleoside fC (B) und caC (C) verwendet haben.

Eine Erklärung hierfür könnten die oxidativen Bedingungen bei der synthetischen Festphasen-DNA-Synthese sein, die in kleinsten, durch MALDI und HPLC nicht mehr nachweisbaren Mengen Aldehydgruppen an der DNA erzeugt.

Um dies zu vermeiden, wurden enzymatisch PCR-Produkte (150 bp) mit unterschiedlichem fC-Gehalt generiert. Hierfür wurde das dCTP in der PCR-Reaktion teilweise durch fCTP ersetzt (siehe Abb. 2.3-5).

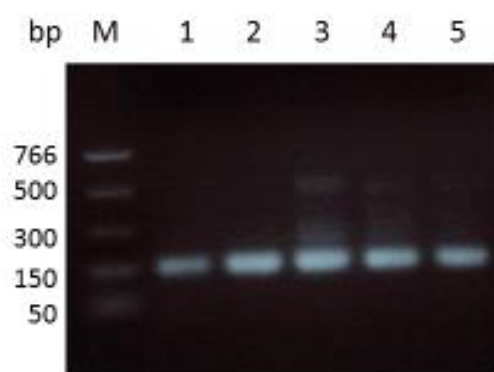


Abb. 2.3-5 Darstellung der Gelelektrophorese der PCR Produkte (150 bp) von fC und dC. Reihe 0: PCR-Marker, Reihe 1 bis 5 PCR-Produkte mit abnehmenden Gehalt an fdC. (1) 45 % fC, (2) 30 % fC, (3) 13 % fC, (4) 6 % fC, (5) 2.4 % fC.

Anschließend wurde der hypothetische Wert mit dem realen Wert an fC verglichen. Hierfür wurden die PCR-Produkte zu Nukleosiden verdaut und der fC-Gehalt durch quantitative LC-MS-Messungen bestimmt.

Tab. 2.1 PCR-Produkte aus Reaktionen mit verschiedenen fCTP:dCTP Verhältnis und Vergleich des theoretischen mit den tatsächlichen Prozenten von fC an dC-Modifikationen im PCR-Produkt.

PCR	fdC Gehalt theor. [%]	fdC Gehalt [%]
1	80	45
2	50	30
3	25	13
4	12.5	6
5	6.25	2.4

Die Abweichung des theoretischen mit dem realen Gehalt an fC zeigt, dass offenbar dC bevorzugt von der verwendeten Polymerase eingebaut wird. Der prozentuale Wert von 2.4 %

fC im PCR-Produkt 5 bedeutet, dass sich in dem 150 mer insgesamt nur ca. 2 fC-Modifikationen befinden.

Kontroll-PCR Produkte ohne fC wurden gleichermaßen mit *Superfly* behandelt. Überschüssiges Reagenz wurde mit 1-Naphthaldehyd abgefangen und mit Waschschrinen nach dem Protokoll von *Dr. Toni Pfaffeneder* entfernt. Der erhaltene *Dot-Blot Assay* ist in Abb. 2.3-6 dargestellt. Während der Antikörper sehr stark mit fC-haltigen PCR-Produkten reagiert, zeigte er keine Reaktion mit dC-haltigen Kontroll-PCR Produkten.

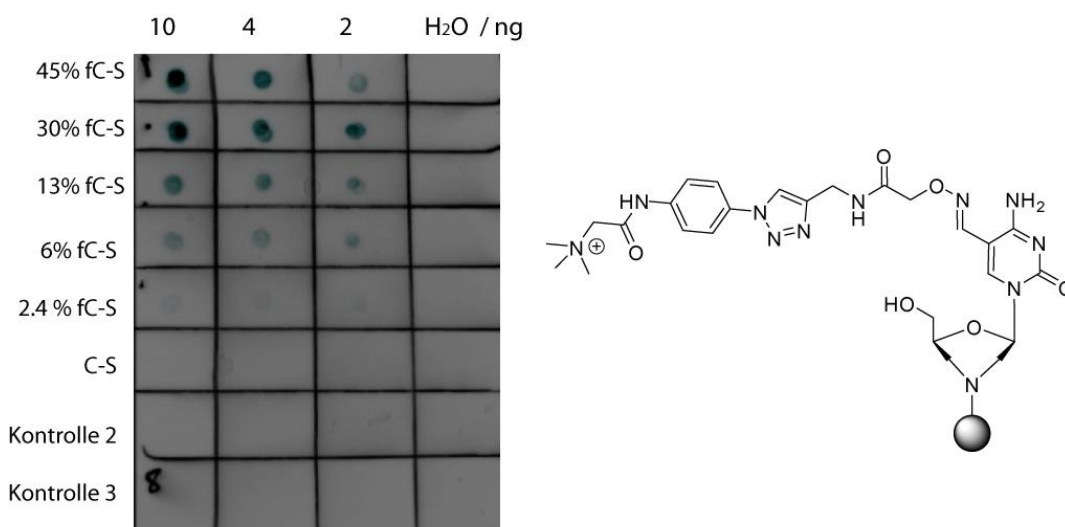


Abb. 2.3-6 Darstellung des *Dot-blot assays* mit PCR-Produkten (150 bp, Oct4-Promotor) mit unterschiedlichen Gehalt an fC (xx % fC). Diese PCR-Produkte wurden z.T. mit dem Hydroxylamin-Reagenz *Superfly* umgesetzt (S). Die verwendeten DNA-Mengen sind in [ng] angegeben. Das mutmaßliche Antigen (fC-Protein-Superfly-Konjugat) ist rechts im Bild dargestellt. C-S: Kontroll-PCR-Produkt ohne fdC, das mit *Superfly* umgesetzt wurde. Kontrolle 1: fC-PCR-Produkt, das mit einem unreaktiven, mit 1-Naphthaldehyd abgefangenen Hydroxylamin-Reagenz *Superfly* umgesetzt wurde. Kontrolle 2: dC-PCR-Produkt, das mit einem unreaktiven, mit 1-Naphthaldehyd abgefangenen Hydroxylamin-Reagenz *Superfly* umgesetzt wurde.

Da das *Superfly*-Reagenz neben mit fC auch mit abasischen Stellen in der DNA reagiert, müssen für weitere Validierungen PCR Produkte hergestellt werden, die abasische Stellen enthalten. So kann eine Kreuzreaktion des Antikörpers mit DNA, die mit *Superfly* abgesättigte abasische Stellen enthält auszuschließen. Für deren Herstellung könnte dUTP in vergleichbaren Mengen zu den fCTP-Produkten in PCR-Produkte eingebaut und diese mit der Glykosylase UDG ausgeschnitten werden. Anschließend müssten diese Produkte mit *Superfly* behandelt und überschüssiges Reagenz mit Waschschrinen entfernt werden.

2.3.2 Synthese eines Antigens für einen monoklonalen Antikörper gegen hmU

Da hmU in nur sehr geringen Mengen vorhanden ist,^[20] muss ein Antikörper in der Anwendung höchst spezifisch sein. Hierfür eignen sich monoklonale Antikörper, die aus einer Zelllinie produziert werden. Diese Zelllinie besteht aus nur einem B Lymphozyt und richtet sich hochspezifisch gegen ein einzelnes Epitop.^[118] Zur Generierung des Antikörpers gegen hmU, sollte das Immunogen über einen kurzen PEG-Linker an ein Trägerprotein gekuppelt werden, um im MHC-Komplex der Zellen gut präsentiert werden zu können. Als Kupplungsstrategie wurde eine Kupplung von freien Aminen und Carbonsäuren mit EDC·HCl als Aktivierungsreagenz gewählt. Dazu wurden Antigene synthetisiert, die an dem Linker eine freie Amin-Gruppe oder eine freie Carboxylgruppe (siehe Abb. 2.3-7) enthalten, die mit Lysinen oder Carboxylgruppen an den Trägerproteinen reagiert.

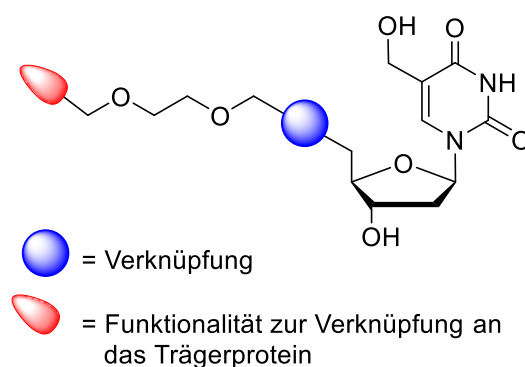
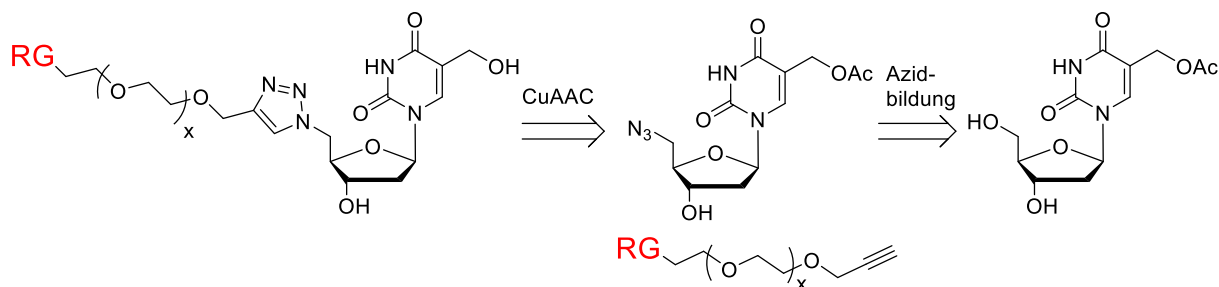


Abb. 2.3-7 Darstellung eines hmU-Haptens mit PEG-Linker zur Konjugation an Trägerproteine.

Zunächst wurde eine Verknüpfung des hmU-Nukleosids mit einem PEG-Linker über eine Williamson'sche Ethersynthese getestet. Hierzu wurde entweder das hmU-Nukleosid an der 5'-Position oder der PEG-Linker mit einer Tosylgruppe modifiziert. Mit NaH als Base in THF wurde eine Etherbindung mit dem 5'-Alkohol hergestellt. Es stellte sich jedoch heraus, dass die Ausbeuten (8 %) sehr gering waren. Eine weitere Möglichkeit war die Verknüpfung über einen Ester oder Amid. Eine Esterbindung mit einem Säure-haltigen PEG-Linker ist in guten Ausbeuten möglich, stellte sich jedoch als zu labil heraus. Zur Bildung einer Amidbindung muss an die 5'-Position ein Amin angebracht werden. Dies kann über eine Azidierung^[119] und eine anschließende Staudinger-Reduktion mit PPh₃ realisiert werden. Die Gesamtausbeute war jedoch bei dieser Strategie sehr gering.

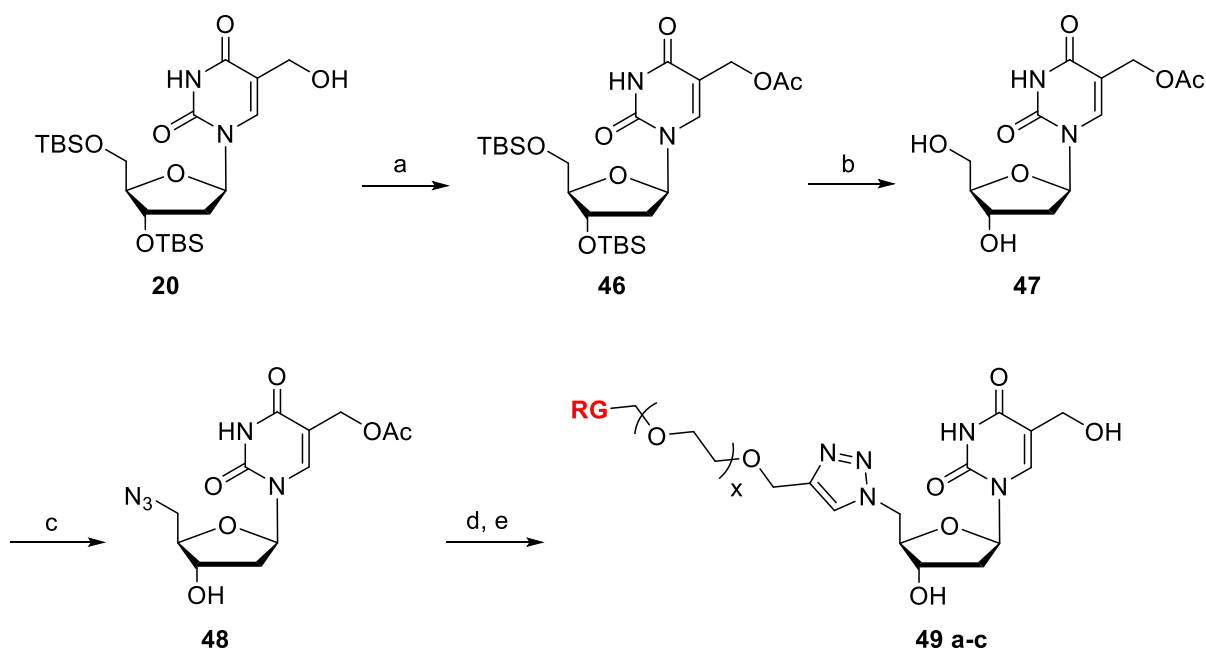
Eine weitere Möglichkeit war die Verknüpfung eines PEG-Linkers mit dem Nukleosid über eine 1,3-dipolare Cycloaddition (CuAAC) zwischen einem Azid und einem Alkin (siehe

Retrosynthese in Schema 2.3-3). Hierfür sollte die Hydroxylgruppe an die 5'-Position durch ein Azid substituiert werden. Um eine Kreuzreaktion zu vermeiden, musste die Hydroxymethylgruppe an der Base daher mit einer Schutzgruppe versehen werden. Hierzu wurde eine Acetylschutzgruppe gewählt. Bei der CuAAC sollte dann ein Alkin-haltiger PEG-Linker mit der Azid-haltigen Nukleosid verknüpft werden.



Schema 2.3-3 Retrosynthese eines hmU-Antigens mit NHS-Ester-Funktionalität. An 5'-Position sollte ein Azid angebracht werden, das eine Verknüpfung mit einem PEG-Linker ermöglicht. RG = Reaktivgruppe.

Die Synthese des Immunogens ist in Schema 2.3-4 dargestellt. Als Reaktivgruppen für die Verknüpfung wurden eine Amin-, eine Säure- und eine NHS-Esterfunktionalität gewählt.

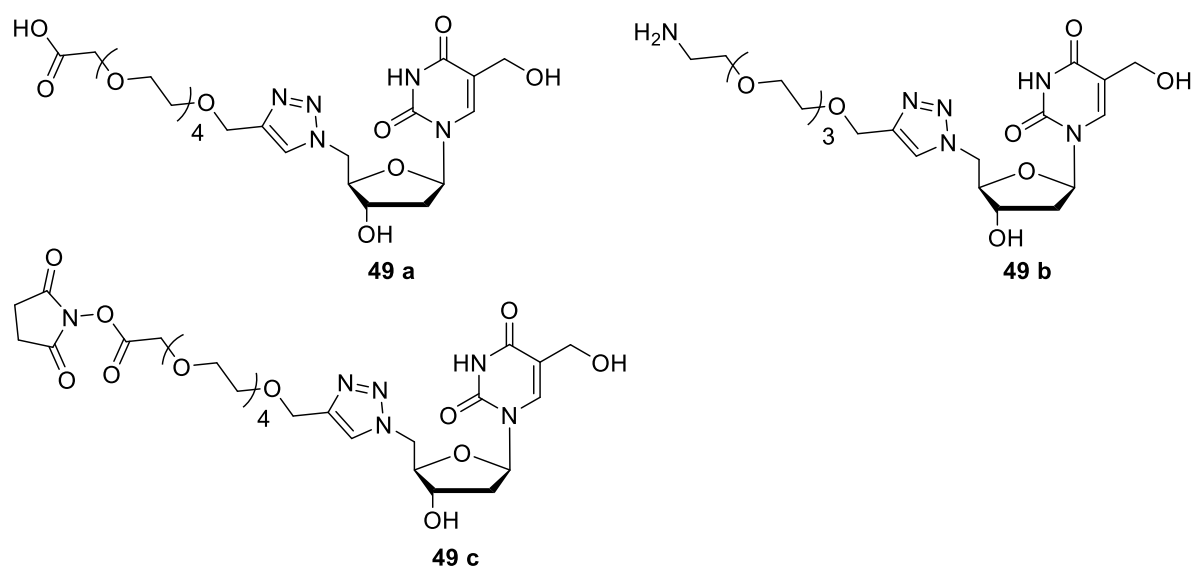


Schema 2.3-4 Synthese des hmU-Antigens. a) Ac_2O , Pyr, DMAP, RT, 16 h, 92 % b) HF-Pyridin, Pyridin, EtOAc, RT, 16 h, 90 % c) PPh_3 , CBr_4 , NaN_3 , DMF, MeOH, RT, 16 h, 64 % d) CuSO_4 , Natriumascorbat, THF/ H_2O 4:1, PEG-Linker, RT, 16 h, 50 % e) KOH, MeOH/ H_2O , RT, 16 h, quantitativ.

Zunächst wurde TBS-geschütztes hmU **20** durch eine Stille-Kupplung mit CO-Gas und einer Reduktion der Aldehydfunktionalität in vier Stufen in guten Ausbeuten dargestellt (Beschreibung der Synthese in Kapitel 2.1, Schema 2.1-5). Anschließend wurde die

ERGEBNISTEIL

Alkoholfunktionalität mit Acetanhydrid in Pyridin und DMAP als Katalysator in einer Ausbeute von 92 % zu **46** geschützt und die Silylschutzgruppen mit HF·Pyridin zu Verbindung **47** abgespalten. In Anlehnung an *Yamamoto et al.* für Thymidin, wurde unter Appel-Reaktionsbedingungen die 5'-Hydroxyposition mit PPh₃ und CBr₄ aktiviert und dem Reaktionsgemisch NaN₃ zugegeben, wodurch eine Azidfunktionalität in guten Ausbeuten selektiv an die 5'-Position eingeführt wurde.^[119-120] Dabei wurden 64 % des 5'-Azids **48** isoliert, das 3'-Azid entstand nicht. Bei dieser Methode entsteht ein 5'-Brommethylintermediat, das mit NaN₃ substituiert wird. Diese Methode ist eleganter als eine vorherige Tosylierung, da bei der Tosylierung sowohl das mono- als auch das ungewünschte zweifach tosylierte Produkt gebildet wurden. Anschließend konnten an die Azidfunktionalität Säure-PEG-Alkine oder Amin-PEG-Alkine **49 a-c** in verschiedener Länge durch eine 1,3-dipolaren Clickreaktion angebracht werden. Nach basischer Acetyl-Entschützung und Aufreinigung mittels Umkehrphasen-HPLC wurden PEG-Triazol-modifizierte hmU-Derivate erhalten. Für eines dieser Derivate wurde außerdem die Säurefunktionalität zum NHS-Ester umgesetzt. Als Reagenz wurde hierfür frisch hergestelltes NHS-TFA verwendet. Die synthetisierten Verbindungen sind in Schema 2.3-5 dargestellt.



Schema 2.3-5 Synthetisierte hmU-Derivate für die Konjugation an Trägerproteine.

Im Anschluss daran wurden diese Verbindungen an die Trägerproteine KLH, BSA und OVA gekuppelt. Amin- und Carboxylhaltige Antigene sollten über eine EDC-Kupplung angebracht werden. Diese Kupplungsstrategie erzeugte jedoch Proteinaggregate. Ein definiertes Kupplungsprodukt konnte weder durch Gelelektrophorese noch durch Massenspektrometrie nach einem Verdau in Peptide nachgewiesen werden. Wurde die NHS-Ester-Verbindung **49c**

ERGEBNISTEIL

anschließend zur Reaktion mit dem Trägerprotein gebracht, so zeigten UV-Vis-Messungen einen deutlichen Anstieg der Absorption bei 260 nm im Vergleich zur Absorption bei 280 nm. In Abb. 2.3-8 sind Gelelektrophorese-Bilder für die Protein-hmU-Konjugate der Trägerproteine OVA und BSA dargestellt. Die neu entstandenen Banden bzw. die Abnahmen der Bande < 80 kDa zeigt, dass Konjugate gebildet wurden. Da die Konjugation mittels NHS-Ester-Chemie unspezifisch ist, werden schmierige Banden erhalten. Die Reaktion scheint trotz Zugabe des Antigens in equimolaren Mengen nicht quantitativ zu sein. Aufgrund der Hydrolyseempfindlichkeit der NHS-Ester im Wässrigen wurde der pH-Wert des Puffersystems optimiert. Die besten Ergebnisse für eine Kupplung wurden bei pH = 7.2 in einem PBS-Puffer erhalten.

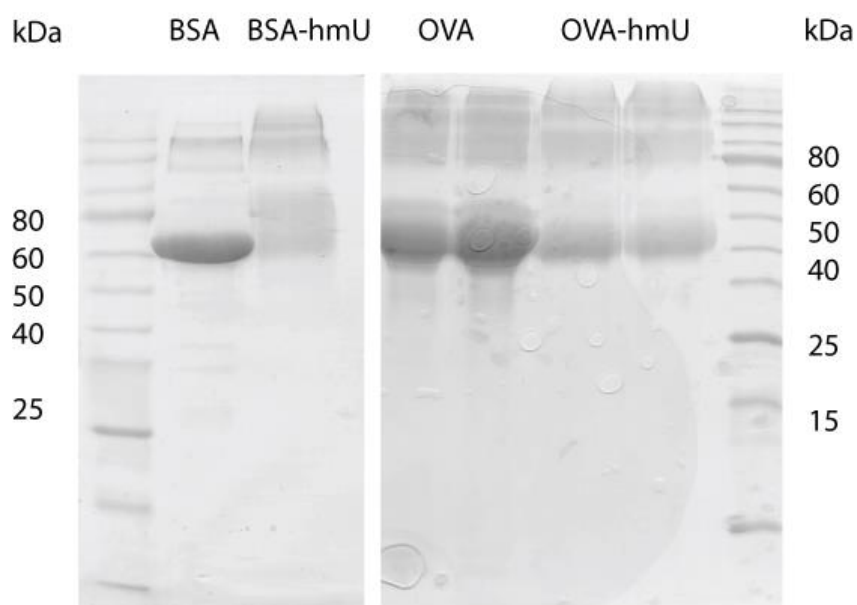


Abb. 2.3-8 Gelbilder der Konjugate von BSA (69 kDa) und OVA (43 kDa) mit hmU.

Die Bildung von hmU-Konjugaten wurde mittels LC-MS (Q Exactive HF, Orbitrap) untersucht. Hierzu wurden die Protein-Konjugate von BSA, KLH und OVA tryptisch verdaut. Die hmU-Modifikation wurde an vielen Lysin-haltigen Peptiden von BSA, OVA und KLH gefunden. Abb. 2.3-9 und Abb. 2.3-10 zeigen eine Übersicht über identifizierte Peptide der Konjugate. Das Ergebnis für KLH ist nicht dargestellt.

Im Rahmen einer Kooperation mit *Merck Millipore* wurden insgesamt 22 mg eines KLH-hmU-Konjugats und 8 mg eines BSA-hmU-Konjugats hergestellt. Desweiteren wurde ein BSA- und

ERGEBNISTEIL

OVA-Konjugat wurden im Maßstab von 1 mg für die Generierung von monoklonalen Antikörpern im Labor von *Prof. E. Kremmer* hergestellt.

Momentan werden die Konjugate für die Antikörpergenerierung eingesetzt. Zur Anreicherung von spezifischen Antikörpern und zur Generierung von monoklonalen Antikörpern, die hmU binden, wurden zudem Oligonukleotide (13mere) synthetisiert, die ein Biotin an der 5`-Position tragen. Das hmU befindet sich in den synthetisierten Oligonukleotiden in einer degenerierten Umgebung.

	1	11	21	31	41	51	61	71	81	91	101																																																																																																		
1	M	G	S	I	G	A	A	S	M	E	F	C	F	D	V	F	K	E	L	K	V	H	A	N	E	N	I	F	Y	C	P	I	A	I	M	S	A	L	A	M	V	Y	L	G	A	K	D	S	T	R	T	Q	I	N	K	V	V	R	F	D	K	L	P	G	F	G	D	S	I	E	A	Q	C	G	T	S	V	N	V	H	S	S	L	R	D	I	L	N	Q	I	T	K	P	N	D	V	V	S	F	S	L	A	S	R	L	Y	A	E	
111	R	P	I	L	P	E	Y	L	Q	C	V	K	E	L	Y	R	G	L	E	P	I	N	F	Q	T	A	A	D	Q	A	R	E	L	I	N	S	W	E	S	O	T	N	G	I	I	R	N	V	L	Q	P	S	S	V	D	S	Q	T	A	M	V	L	N	A	I	V	F	K	G	L	W	E	K	A	F	K	D	E	D	T	Q	A	M	P	F	R	V	T	E	Q	E	S	K	F	V	Q	I	M	V	Q	I	G	L	F	R	V			
221	A	S	M	A	S	E	K	I	K	I	L	E	L	P	F	A	S	G	T	M	S	M	L	V	L	L	P	D	E	V	S	G	L	E	Q	L	E	S	I	I	N	F	E	K	L	T	E	W	T	S	S	N	V	M	E	E	R	K	I	K	V	Y	L	P	R	M	R	M	E	E	K	Y	N	L	T	S	V	L	M	A	M	G	I	T	D	V	F	S	S	S	A	N	L	S	G	I	S	S	A	E	S	L	K	I	S	Q	A	V	H
331	A	H	A	E	I	N	E	A	R	G	R	E	V	V	G	S	A	E	A	R	G	V	D	A	A	S	V	S	E	E	F	R	A	D	H	P	F	L	F	C	I	K	H	I	A	T	N	A	V	L	F	G	R	C	V	S	P																																																				

Abb. 2.3-9 Übersicht über identifizierte Peptide des hmU-OVA-Konjugats. Die Sequenzabdeckung beträgt 54.15 %. Dynamische Modifikationen: C Cation: Na, M = 21.9819 (E, D), D Carbamidomethyl (C), M = 57.021, O Oxidation (M), M = 15.9994, h hmU-Modifikation (K), M= 569.2344.

	1	11	21	31	41	51	61	71	81	91	101																																																																																																	
1	M	K	W	I	F	I	S	L	L	F	S	S	A	Y	S	R	G	V	F	R	D	T	H	K	S	E	I	A	H	R	F	K	D	L	G	E	E	H	F	K	L	V	L	I	A	F	S	Q	Y	L	Q	C	P	F	D	E	H	V	K	L	V	N	E	L	T	E	F	A	K	T	C	V	A	D	E	S	H	A	G	C	E	K	S	L	H	T	L	F	G	D	E	L	C	K	V	A	S	L	R	E	T	Y	G	D				
111	M	A	D	C	C	E	K	Q	E	P	E	R	N	E	C	F	L	S	H	K	D	D	S	P	L	P	K	L	K	P	D	P	N	L	C	D	E	F	K	A	D	E	K	K	F	W	G	K	Y	L	E	I	A	R	R	H	P	Y	F	A	P	E	L	L	Y	A	N	K	Y	N	G	V	F	Q	E	C	Q	A	E	D	K	G	A	C	L	L	P	K	I	E	T	M	R	E	K	V	L	A	S	S	A	R	Q	R				
221	L	R	C	A	S	I	Q	K	F	G	E	R	A	L	K	A	W	S	V	A	R	L	S	Q	K	F	P	K	A	E	F	V	E	V	T	K	L	V	T	D	L	T	K	V	H	E	C	C	H	G	D	L	L	E	C	A	D	D	R	A	D	L	A	K	Y	I	C	D	N	Q	D	T	I	S	S	K	L	K	E	C	C	D	K	P	L	L	E	K	S	H	C	I	A	E	V	E	K	D	A	I	P	E	N	L	P	L	T	A
331	D	F	A	E	D	K	V	C	K	N	Y	Q	E	A	K	D	A	F	L	G	S	F	L	E	Y	S	R	R	H	P	E	Y	A	V	S	V	L	L	R	A	K	E	Y	E	A	I	L	E	E	C	C	A	K	D	D	P	H	A	C	Y	S	T	V	F	D	K	L	K	H	L	V	D	E	P	Q	N	L	I	K	Q	N	C	D	Q	F	E	K	L	G	E	Y	G	F	Q	N	A	L	I	V	R	Y	T	R	K	V	P	Q	
441	V	S	T	P	T	L	V	E	V	S	R	L	S	L	G	K	V	G	T	R	C	C	T	K	P	E	S	E	R	M	P	C	T	E	D	Y	L	S	L	L	N	R	L	C	V	L	H	E	K	T	P	V	S	E	K	V	T	K	C	T	E	S	L	V	N	R	R	P	C	F	S	A	L	I	P	D	E	T	Y	V	P	K	A	F	D	E	K	L	F	T	F	H	A	D	I	C	T	L	P	D	T	E	K	Q	I	K	Q	T
551	A	L	V	E	L	L	K	H	K	P	K	A	T	E	E	Q	L	K	T	V	M	E	N	F	V	A	F	V	D	K	C	C	A	A	D	D	K	E	A	C	F	A	V	E	G	P	K	L	V	V	S	T	Q	T	A	L																																																				

Abb. 2.3-10 Übersicht über identifizierte Peptide des hmU-BSA-Konjugats. Die Sequenzabdeckung beträgt 60.46 %. Modifikationen: C Cation: Na, M = 21.9819 (E, D), D Carbamidomethyl (C), M = 57.021, O Oxidation (M), M = 15.9994, h hmU-Modifikation (K), M= 569.2344.

2.4 Synthese und Entwicklung von Reagenzien für die Proteomanalytik

2.4.1 Entwicklung einer DNA-Protein-*pull down* Sonde

Um die biologische Rolle und Relevanz der neu entdeckten epigenetischen Basen zu erforschen, müssen DNA-basierte *pull down* Sonden für proteomische Interaktionsstudien mit Proteinen entwickelt werden. Mithilfe dieser DNA-Sonden sollen Proteine, die epigenetische Basen binden, identifiziert werden.

DNA-Protein-Wechselwirkungsstudien mit *pull down* Proben wurden bereits in einem anderen Kontext von *Dr. Malte Winnacker* durchgeführt. Bei diesen Studien wurden Sondenmoleküle, die Photoreaktivgruppen wie 5-Iod-2'-desoxyuridin, Diazirine, Benzophenone oder Arylazide enthielten verwendet.^[121] Auch andere Gruppen verfolgen diesen Ansatz.^[122] Diese Reaktivgruppen bilden bei Bestrahlung mit UV-Licht reaktive Intermediate, welche kovalente Bindungen mit Proteinen eingehen. Diese Bindung ist jedoch recht unspezifisch, da diese Reaktivgruppen mit vielen Aminosäuren reagieren. Aus diesem Grund ist die massenspektrometrische Identifikation des „verlinkten“ Peptids schwierig.

Daher sollten neuartige doppelsträngige DNA-Sonden für *fishing*-Experimente in Zellextrakten entwickelt werden, die die zu untersuchende nicht-kanonische epigenetische DNA-Base enthalten sollten und eine Affinitätsaufreinigung ermöglichen sollten. Dieses sollte durch ein entweder an der 5'- oder 3'-Position angebrachtes Biotin ermöglicht werden. Direkt bindende Proteine sollen kovalent durch einen spaltbaren DNA-Protein-Linker eingefangen werden.

Zunächst wurden hierzu mittels DNA-Festphasensynthese DNA-Oligonukleotide synthetisiert, die die zu untersuchenden epigenetischen Basen von hmC, fC, caC und hmU an einer definierten Stelle enthielten (siehe Abb. 2.4.1-1)

ERGEBNISTEIL

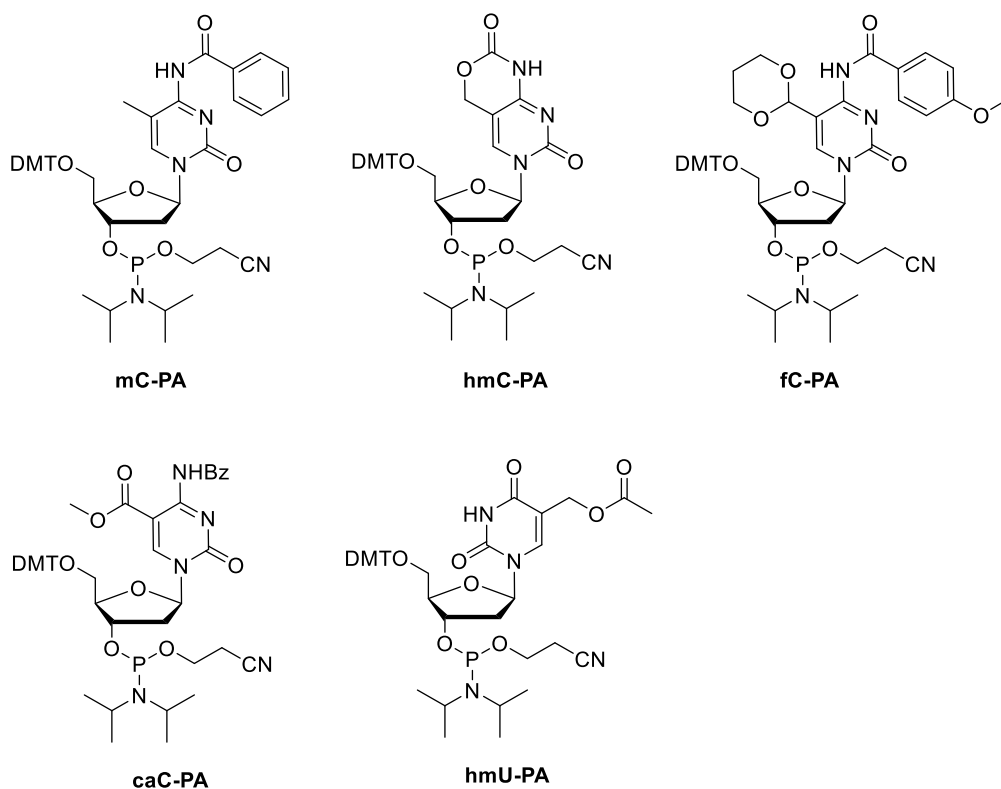


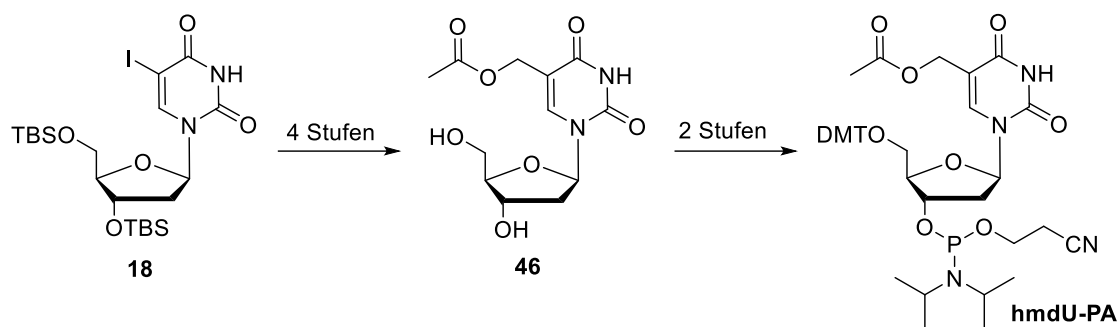
Abb. 2.4.1-1 Darstellung der für den DNA-Einbau benötigten Phosphoramidite von mC, hmC, fC, caC und hmU. Die Phosphoramiditbausteine für hmC, fC und caC wurden in der *Carell*-Gruppe entwickelt und synthetisiert. Die Phosphoramidite von fC und caC sind seit Kurzem auch kommerziell über *Glen Research* erhältlich.

Die für den DNA-Einbau benötigten Phosphoramidite von hmC, fC und caC wurden in der Arbeitsgruppe Carell entwickelt, optimiert und synthetisiert.^[28, 39, 41] Das hmU-PA wurde aus an 5'-Position iodiertem TBS-geschütztem dU **18** durch eine Pd-katalysierte Stille-Kupplung, anschließende Reduktion, Acetylierung und TBS-Entschützung mit nachfolgender Standard-Schutzgruppenchemie in sechs Stufen synthetisiert (Schema 2.4.1-1). Die Synthese bis zum Acetyl-geschützten hmU-Baustein **46** ist in Kapitel 2.3 (Schema 2.3-4) genauer beschrieben. Ausgehend von dem 5'-DMT-geschützten Nukleosid kann das hmU-Phosphoramidite unter Standardbedingungen gewonnen werden.

Die folgende DNA-Sequenz wurde verwendet, um Oligonukleotide mit epigenetischen Modifikationen für *fishing*-Studien herzustellen:

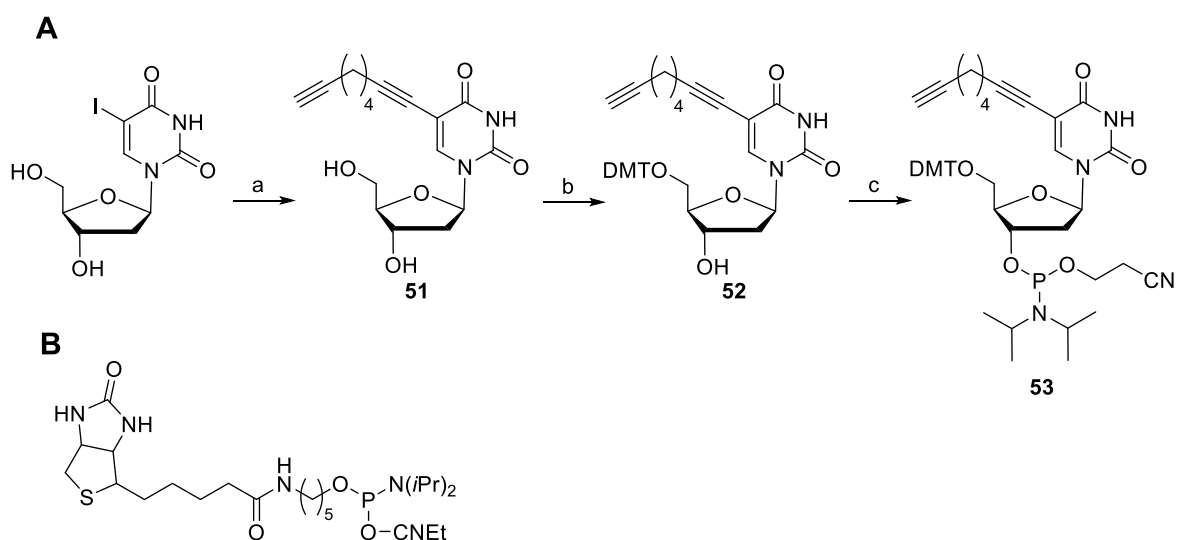
3'-CGT-AGG-CCA-GTA-GXA-AAG-CCT-5', X = C, mC, hmC, fC, caC oder hmU

ERGEBNISTEIL



Schema 2.4.1-1 Darstellung der Synthese des hmdU-Phosphoramidits.

Die komplementären Gegenstränge sollten ein Biotin zur Affinitätsaufreinigung, sowie an unterschiedlichen Positionen eine Alkin-haltige Base enthalten, die den Gegenstrang für Modifizierungen mittels *Click*-Chemie durch einen Protein-*Crosslinker* vorbereitet. Als Alkin-haltige Base wurde das Octadiinyl-dU **51** gewählt, in der das Alkin sterisch weniger abgeschirmt ist und ein effizientes Substrat für eine *Click*-Reaktion ist. Das 5-Octadiinyl-dU-Phosphoramidit wurde aus kommerziell erhältlichem 5-Iod-2'-desoxyuridin in drei Stufen zunächst über eine Sonogashira-Reaktion zu **52** gefolgt von Standard-Schutzgruppen-Chemie über die DMT-geschützte Verbindung **52** zu **53** synthetisiert. Abweichend von *Gierlich et al.* wurde hierbei die Sonogashira-Reaktion zu **53** ohne eine vorherige Schützung der 3'- und 5'-OH-Gruppen durch TBSCl durchgeführt.^[123]



Schema 2.4.1-2 (A) Synthese des 5-Octadiinyl-2'-desoxyuridinphosphoramidits nach *Gierlich et al.*^[123] über eine Sonogashira-Kupplung. a) Octadiin, Pd(PPh₃)₄, CuI, Hünigbase, RT, 12 h, 40 %, b) DMTCl, DMAP, Pyridin, 16 h, RT, 80 %, c) DIAT, CNEtP(NiPr₂)₂, DCM, RT, 16 h, 94 %. (B) Struktur des kommerziell erhältlichen 5'-Biotinphosphoramidits.

ERGEBNISTEIL

Biotinphosphoramidite wurde käuflich erworben und in 5'-Position in das Oligonukleotid oder in 3'-Position durch direkte Kupplung an den Träger eingebaut. Hierbei stellte sich heraus, dass die Modifizierung an der 5'-Position weitaus höhere Ausbeuten liefert. Bei einem Einbau in 5'-Position musste jediglich die Zeit für die DMT-Spaltung verlängert werden.

Mit diesen Phosphoramiditen wurden Oligonukleotide mit der folgenden Sequenz hergestellt:

5'-Biotin-GCA-TCC-GGT-CAY-CZT-TCC-GGA-3',

5'-Biotin-GCA-TCC-GGT-CAT-CZT-YCC-GGA-3', Y = 5-Octadiinyl-dU, Z = dA oder dG.

Des Weiteren wurde für die DNA-Protein-Interaktions-Sonde ein PEG-basierender trifunktionaler Crosslinker **54** entworfen und synthetisiert, der einen *label transfer* ermöglicht (siehe Abb. 2.4.1-2).

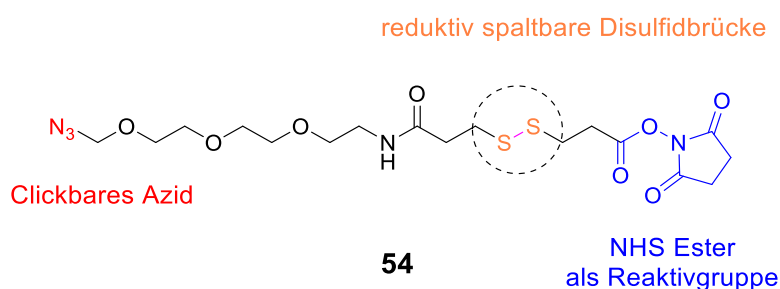


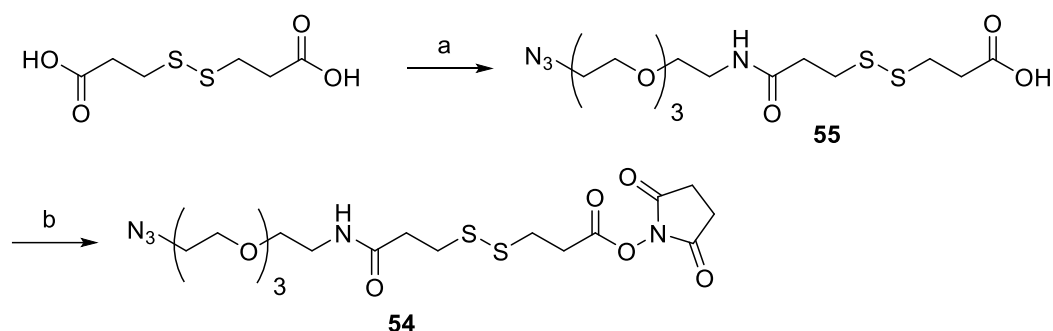
Abb. 2.4.1-2 Darstellung des *label transfer* PEG-basierten *Crosslinkers* **38** mit einer Azidfunktionalität und einem NHS-Ester.

Eine solcher *label transfer* wird durch einen spaltbaren Linker realisiert, der eine Markierung auf das kovalent reagierte Protein überträgt. Als spaltbare Funktionalität wurde im Rahmen der Dissertation eine Disulfidgruppe eingeführt, die reduktiv gespalten werden kann. Vor dem tryptischen Verdau der Proteinen in Peptide können die Disulfidbrücken der Proteine reduziert und alkyliert werden. Das bedeutet, dass die Spaltung des Linkers und dessen Alkylierung des *Crosslinkers* in einem Schritt geschehen kann und somit ein *Label* mit definierter Masse auf dem Peptid hinterlassen wird.

Für die Reaktion des *Crosslinkers* mit dem Protein wurde eine NHS-Ester-Funktionalität als Reaktivgruppe eingeführt, die bevorzugt mit den ϵ -Aminogruppen von Lysinen reagiert. Lysine gehören zu den häufigsten vorkommenden Aminosäuren auf der Oberfläche von Proteinen. Zwar besitzen NHS-Ester eine vorteilhafte, hohe Reaktivität, welche für effizientes *Labelling* wichtig ist, allerdings sind sie auch hochgradig hydrolyseempfindlich. Das schließt den Einbau des aktivierten Linkers in ein Oligonukleotid aus. Daher wurde eine Azidgruppe in den Linker

eingeführt, die es ermöglicht den Linker post-synthetisch mittels *click*-Chemie an die Oligonukleotide anzubringen, wodurch die NHS-Ester-Funktionalität intakt bleibt.^[123-124]

Im Folgenden ist die Synthese des neuartigen *Crosslinking*-Reagenzes dargestellt (Schema 2.4.1-3) Zunächst wurde Dithiopropionsäure unter Steglich-Bedingungen mit EDC·HCl und DMAP als Aktivierungsreagenz und 11-Azido-3,6,9-trioxaundecan-1-amin in DMF zu **55** amidiert. Aufgrund der Difunktionalität der Dithiopropionsäure musste die Säure im hohen Überschuss zugegeben werden. Das amidierte Produkt konnte in einer Aubeute von 43 % gewonnen werden. Anschließend wurde der NHS-Ester durch Umsetzung der Säure mit frisch hergestelltes TFA-NHS^[125] eingeführt. Der *Crosslinker* **54** konnte so in sehr guter Reinheit und 60 %-iger Ausbeute durch Fällung mit Diisopropylether isoliert werden.

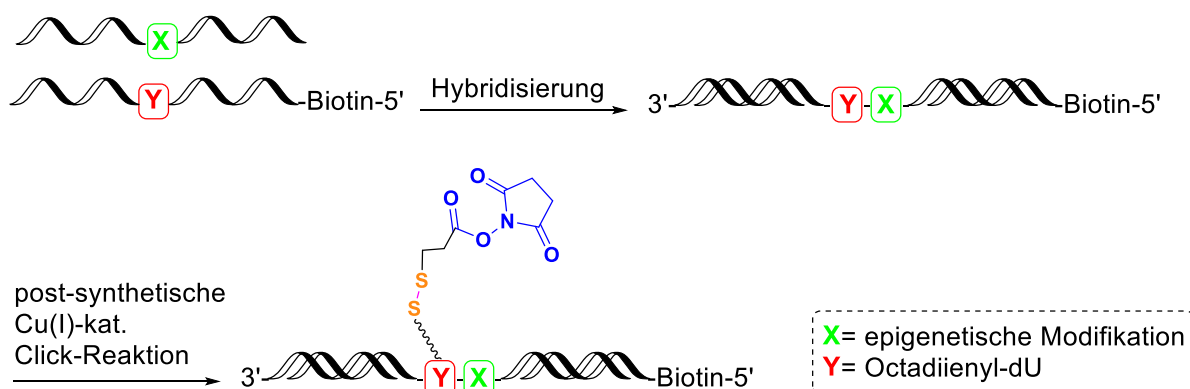


Schema 2.4.1-3 a) EDC·HCl, DMAP, 11-Azido-3,6,9-trioxaundecan-1-amin, RT, 17 h, 43 %. b) NHS-TFA, Pyridin, DMF, 16 h, RT, 60 %.

In anschließenden Schritten wurden die einzelnen Bausteine der DNA-Protein-Interaktions-Sonde zusammengesetzt (siehe Abb. 2.4.1-3). Hierzu wurden beide DNA-Stränge hybridisiert und eine *Click*-Reaktion am Doppelstrang durchgeführt. Die *Click*-Reaktion musste post-synthetisch am Doppelstrang durchgeführt werden, da eine HPLC-Aufreinigung wegen der Hydrolyseempfindlichkeit des NHS-Esters nicht möglich war. Die zugegebenen Äquivalente an Azid mussten für einen effizienten *Click* optimiert werden. In Abb. 2.4.1-4 ist ein MALDI-Spektrum vor und nach der *Click*reaktion zu sehen. Man kann eine deutliche Massenveränderung um das Molekulargewicht des Linkers erkennen, welche einer Modifikation mit dem *Crosslinker* **54** entspricht. Anschließend wurde die DNA-Sonde gefällt und mit EtOH gewaschen, um unreaktierten Linker abzutrennen. Die so gewonnene DNA konnte nun in *fishing*-Experimenten eingesetzt werden.^[20]

ERGEBNISTEIL

A



B

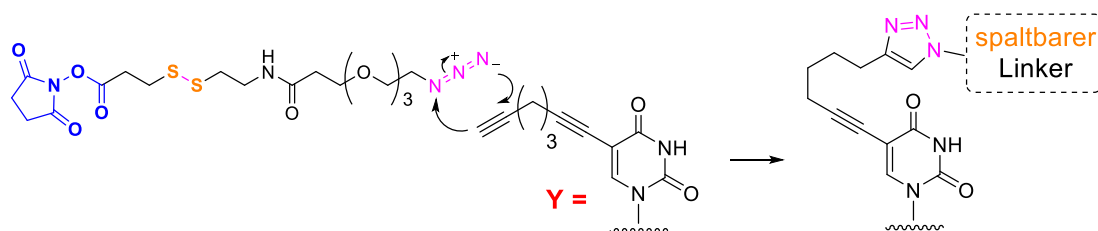


Abb. 2.4.1-3 Synthese der DNA-Protein-Crosslinker-Sonde. (A) Nach Hybridisierung der einzelsträngigen Oligonukleotide, die die epigenetische Modifikation und die Alkin-haltige Base enthalten wird der Doppelstrang post-synthetisch modifiziert. (B) Darstellung der *click*-Reaktion an der Alkin-haltigen Base.

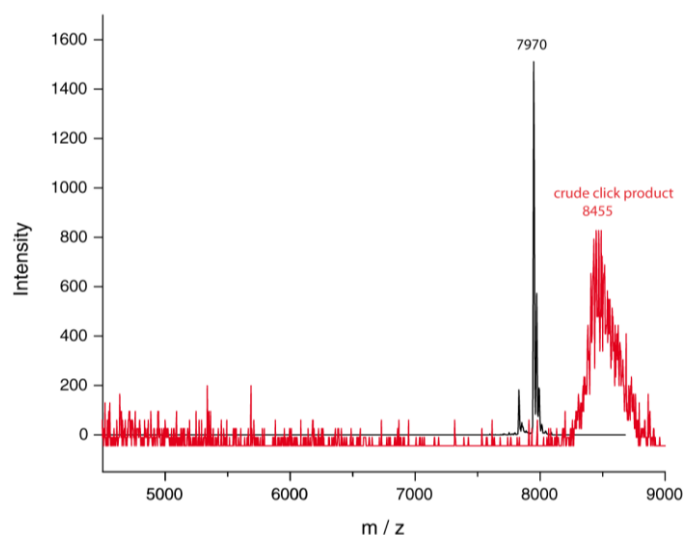
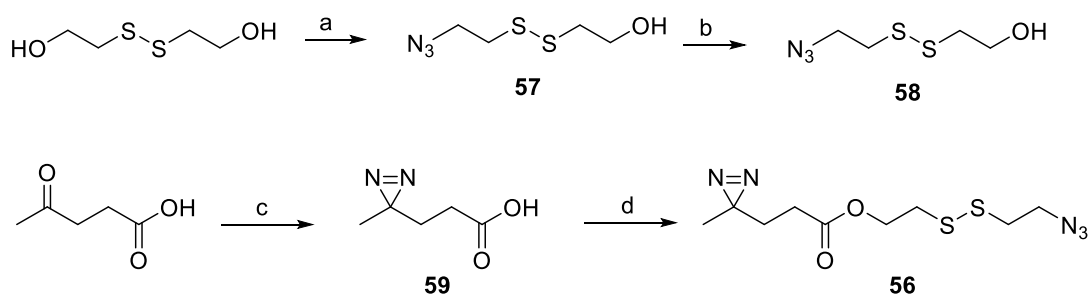


Abb. 2.4.1-4 Überlagerung des eines Maldis vor (schwarz) und nach (rot) der *Click*-Reaktion des Crosslinkers an die DNA.

Alternativ wurde ebenso ein reduktiv spaltbarer *Crosslinker* mit einer Photoreaktiv-Gruppe **40** synthetisiert. Die Synthese des Zielmoleküls **56** ist in Schema 2.4.1-4 dargestellt. Nach einer Monobromierung der Hydroxyfunktionalität unter Appel-Bedingungen zu **57** wurde eine nukleophile Substitution mit Natriumazid durchgeführt, um ein Azid-funktionalisiertes Disulfid **58** zu erhalten. Während die Monobromierung mit geringen Ausbeuten von 13 % abläuft, kann mit einer Ausbeute von 79 % das substituierte Azid erhalten werden. Das Diazirin **58** wurde nach einem Protokoll von *Bond et al.* synthetisiert.^[126] Hierbei wurde von kommerziell erhältlicher Lävulinsäure ausgegangen, die zur Diaziridin-Säure umgesetzt wurde. Anstatt wie in früheren Protokollen beschrieben, flüssigen Ammoniak zu verwenden, wurde die Reaktion in methanolischen Ammoniak durchgeführt. Dies vereinfacht die Synthese beträchtlich, da keine Einkondensation des Ammoniaks nötig ist. Nach einer Aufarbeitung ohne Säulenchromatographie wurde das Diaziridin zum Diazirin **59** mit Iod oxidiert. Nach einer Extraktion kann das Diazirin in einer Ausbeute von 60 % isoliert werden. Der Diazirin- und der Disulfidbaustein wurden anschließend durch Aktivierung mit EDC·HCl gekuppelt.



Schema 2.4.1-4 Synthese eines photoreaktiven, reduktiv spaltbaren Linkers. a) PPh_3 , CBr_4 , DCM, $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$, 22 h, 13 %, b) NaN_3 , DMF, RT, 22 h, 79% c) i) $\text{NH}_2\text{SO}_3\text{H}$, NH_3 , MeOH, RT, 3 h, ii) NEt_3 , I_2 , MeOH, d) EDC·HCl, DMAP, **42**, DMF, RT, 16 h, 50 %.

Die Konjugation mit dem Alkin-Strang geschah vor der Hybridisierung mittels Click-Chemie. Das MALDI-MS zeigte einen Massenshift von $m/z = 7951$ auf $m/z = 8234$ m/z (theoretisch: $m/z = 8240$). Anschließend wurde das Oligonukleotid mit dem Gegenstrang, welcher die Modifikation von Interesse enthält hybridisiert, anschließend zur Aufreinigung gefällt und war somit für proteomische Studien bereit, bei denen ein zeitunabhängiger Reaktionsstart von Interesse ist.

In Abb. 2.4.1-5 ist der Ablauf eines *fishing*-Experiments mit den neuartigen DNA-Protein-Interaktionssonden dargestellt, welches von *Silvia Laube* durchgeführt wurde.

ERGEBNISTEIL

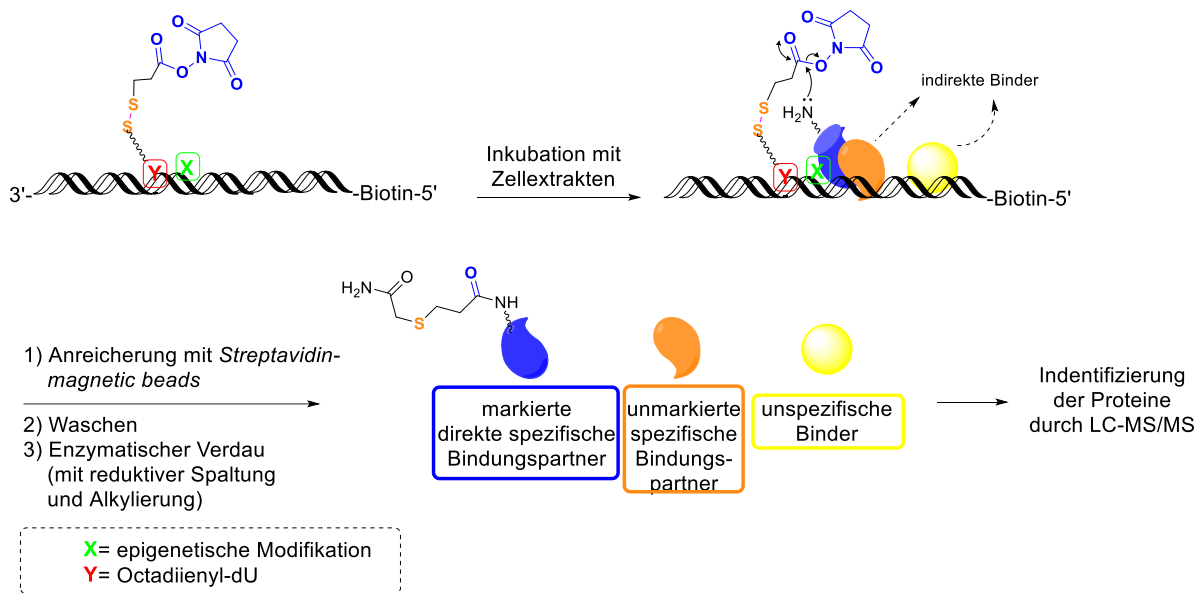


Abb. 2.4.1-5 Darstellung des *fishing*-Experiments mit einer spaltbaren DNA-Protein-Interaktionssonde.

Die DNA-Protein-Interaktionssonde wird mit Zellextrakt inkubiert. Freie Lysine an der Oberfläche von interagierenden Proteinen können mit dem Reaktivester, der sich in der Nähe zur epigenetischen Modifikation befindet, reagieren. Anschließend kann die DNA und ihre interagierenden Proteine mit *Streptavidin-magnetic beads* angereichert werden. Waschschritte können nicht-kovalent gebundene Proteine entfernen. Eine reduktive Spaltung und Alkylierung des Crosslinkers (z.B. mit TCEP und IAA) hinterlässt eine spezifische Markierung auf direkt interagierenden Proteinen und nach dem Verdau auf den Peptiden. Durch LC-MS/MS und Datenbanksuche können die Proteine identifiziert werden.

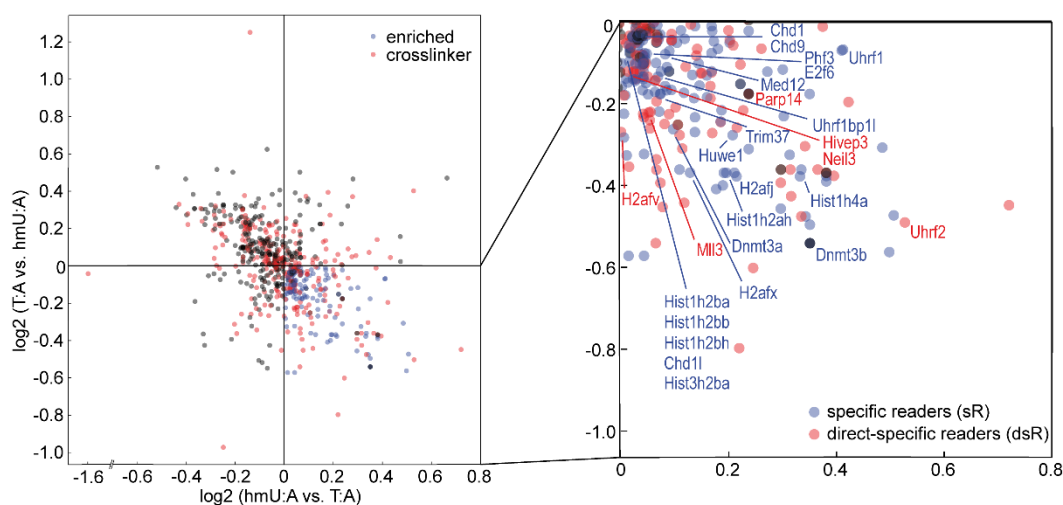
Zur Erfassung von unspezifischen Interaktionspartnern wird gleichzeitig ein Kontrollexperiment mit einer analogen, C- oder T-Base enthaltenden Sonde durchgeführt.

Man kann so zwischen drei Gruppen von interagierenden Proteinen unterscheiden:

1. Unspezifische Bindungspartner, die ebenso in der dC- oder dT-haltigen Kontrolle enthalten sind.
2. Unmarkierte, indirekte Bindungspartner, die nicht in der Kontrolle enthalten sind.
3. Markierte direkte Bindungspartner, die mit der epigenetischen Modifikation direkt interagieren und nicht in der Kontrolle enthalten sind.

Diese neuartige Sonde wurde unter anderem in proteomischen Studien angewendet, welche die Interaktionspartner der epigenetischen Base hmdU binden.^[20]

A



B

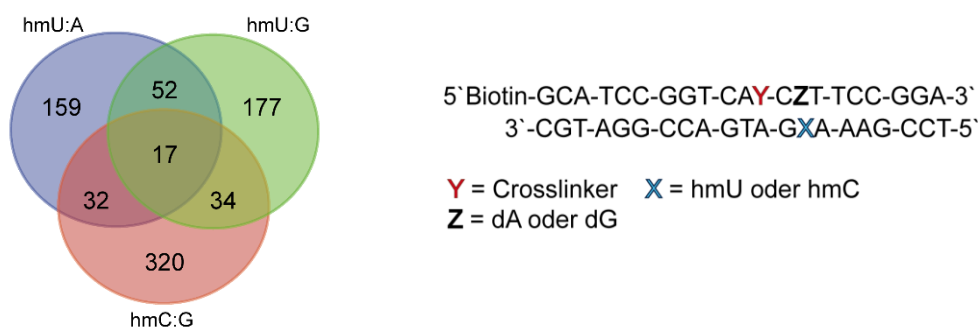


Abb. 2.4.1-6 (A) Vergrößerter Ausschnitt der Proteine, die mit dem hmU:A-Oligomer angereichert wurden. Spezifische Binder sind in blau markiert. Direkte spezifische Binder, die ein Label tragen sind in rot markiert. (B) Venn-Diagramm der Binder für hmU:A, hmU:G und hmC:G und Darstellung des DNA-Duplexes.

Für diese Studie wurden DNA-Duplexe verwendet, in denen hmdU gegenüber von dA und gegenüber von dG eingebaut wurde. Als Kontrollstränge wurden dementsprechend DNA-Duplexe mit den kanonischen Basen dA:dT und dC:dG verwendet. Die kovalent eingefangenen Proteine wurden nach der Inkubation mit der DNA-Protein *Pull-down* Sonde tryptisch verdaut, reduziert, alkyliert und mit TMT (*tandem mass tag*) markiert, um Proteine zu identifizieren und quantifizieren zu können. Ein Ausschnitt des *Scatter Plots* ist in Abb. 2.4.1-6 dargestellt und zeigt, dass 250 Proteine das hmU:dA-Basenpaar spezifisch binden. Von diesen spezifischen Bindern waren insgesamt 99 Protein mit dem *Label* markiert. Daher können diese als direkte Binder zugeordnet werden. Eine *Gene Ontology* Analyse zeigte, dass 64 Proteine der 250 spezifischen Bindern Nukleotid-Binder sind, während 25 Proteine in Chromatin Organization involviert sind.^[20]

Nichtsdestotrotz lieferte die NHS-Ester-Strategie nicht immer reproduzierbare Daten. Es zeigte sich, dass oft Proteine markiert wurden, die in keinem biologischen Kontext zu den untersuchten epigenetischen Basen stehen. Offenbar sind NHS-Ester zu reaktiv und verknüpfen alle Proteine in unmittelbarer Nähe zu der epigenetischen Base. Da die Reaktion mit den Lysinen sehr schnell abläuft, können sich keine spezifischen Bindungen ausbilden.

2.4.2 Entwicklung eines Cystein-reaktiven Redoxensors

Cysteine können posttranslational durch Oxidationen der reaktiven Thiolseitenkette modifiziert werden.^[127] Diese Modifikationen können in Signaltransduktionswegen als Sensor oder Schalter dienen. Zwischen dem jeweiligen reduzierten und oxidierten Zustand kann in Abhängigkeit von den vorhandenen reaktiven Sauerstoffspezies (ROS *reactive oxygen species*) oder reaktiven Stickstoffspezies (RNS *reactive nitrogen species*) gewechselt werden kann.^[128] Je nach lokaler Konzentration können ROS oder RNS, wie in Abb.2.4.2-1 dargestellt mit der Thiolseitenkette von Cystein reagieren. Dabei entstehen verschiedene reversible Modifikationen, wie z.B. S-Nitrosylierung [SNO], S-Glutathionylierung, Oxidation zur Sulfensäure oder die Bildung von inter- und intramolekularen Disulfidbrücken. Ferner gibt es auch irreversible Modifikationen, wie z.B. die Oxidation zur Sulfin- oder Sulfonsäure,^[127, 129] die die zelluläre Signaltransduktionswege beeinflussen.^[130]

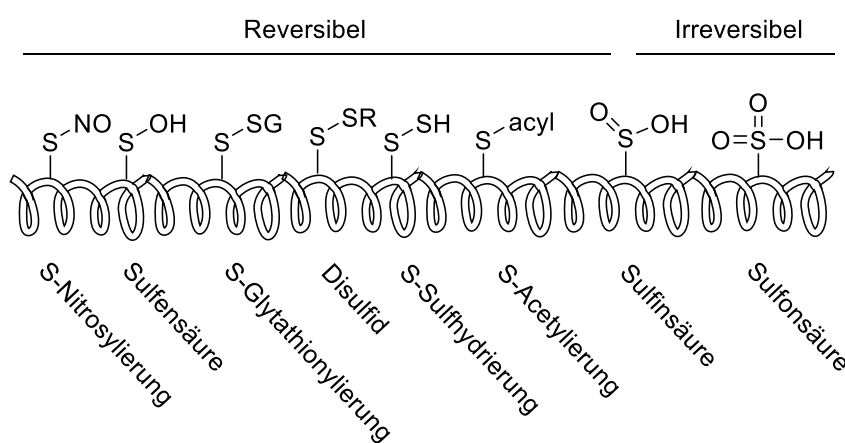


Abb. 2.4.2-1 Oxidative Modifikationen an Cysteinen. Dargestellt sind bekannte physiologisch reversible und irreversible oxidative posttranslationale Modifikationen, die an der Thiolseitenkette eines Cysteins (Cys) entstehen können.^[131]

ERGEBNISTEIL

Diese Modifikationen können zum Beispiel mit dem von *Jaffrey et al.* vorgestelltem *Biotin Switch Assay* in einer komplexen Mischung detektiert und angereichert werden (siehe Abb. 2.4.2-2).^[132]

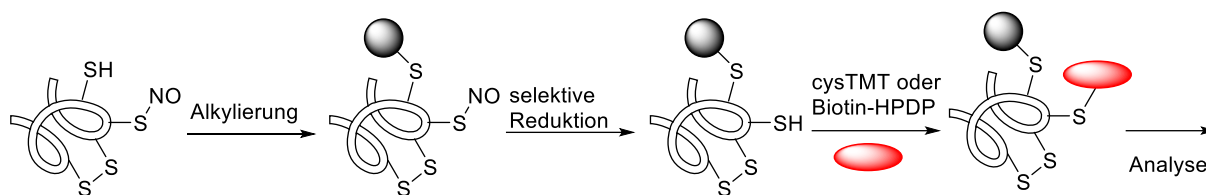
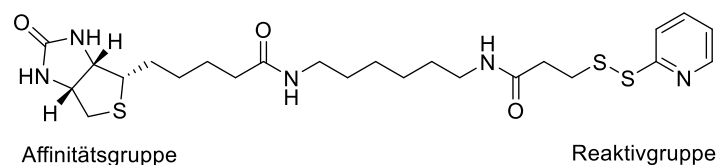


Abb. 2.4.2-2 Durchführung des *Biotin-Switch Assays* zur Detektion von Nitrosylierungen an Cysteinen.

Hierbei werden freie Thiole zunächst durch Alkylierung blockiert (z.B. mit N-Ethylmaleimide, S-Methylmethanethiosulfonate oder Iodacetamid). Die oxidierten Modifikationen der Cysteine werden mild reduziert und mit einem Thiol-reaktiven Biotin-Reagenz umgesetzt, das eine Detektion und Anreicherung mit Streptavidin ermöglicht. In seiner ursprünglichen Form handelte es sich hierbei um eine Pyridyldithiol-Reaktivgruppe (Biotin-HPDP, N-[6-(Biotinamido)hexyl]-3'-(2'-pyridyldithio)-propionamid), wie sie in Abb.2.4.2-3(A) dargestellt ist. Diese bildet eine reversible Disulfidbrücke mit Cystein, welche zur Elution nach der Bindung an Streptavidin reduziert werden muss. Somit geht der spezifische Massentag am eingefangenen Cystein verloren.

A Biotin-HPDP



B

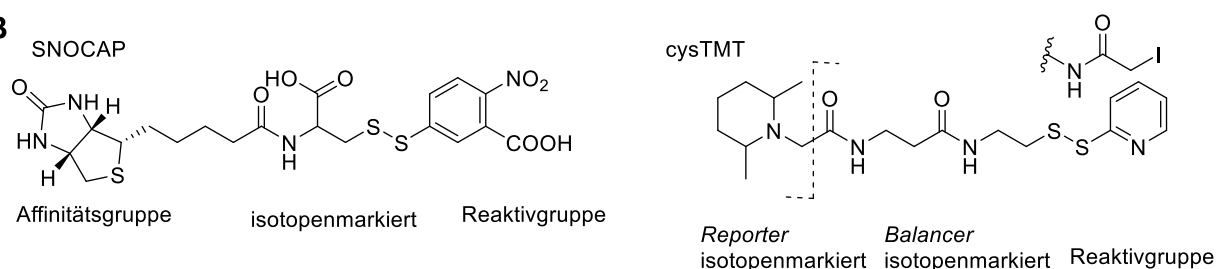


Abb. 2.4.2-3 (A) Strukturformeln des Biotin-HPDP, welches als Reagenz für den *Biotin Switch Assay* verwendet wird. (B) Quantifizierungsreagenzien für die Identifizierung reaktiver Cysteine. Strukturformel des SNOCAP-Reagenz mit Affinitätsgruppe, isotopenmarkiertem Bereich und Reaktivgruppe sowie Strukturformel des cysTMT mit Reporter, Balancer und Reaktivgruppe (Dipyridyl- oder Iodacetamidgruppe). Die MS/MS-Bruchstelle ist im cysTMT eingezeichnet.

Weiterentwicklungen dieses Reagenzes benutzen deshalb Maleimid-Reaktiv-Gruppen, die eine irreversible kovalente Bindung mit Thiolen eingehen und eine Markierung nach der Anreicherung hinterlassen.^[133] Eine anschließende relative Quantifizierung der angereicherten Thiole ist durch bekannte Quantifizierungsmethoden (chemische Markierung mit isobaren Reagenzien, SILAC *stable isotope labeling with amino acids in cell culture* oder durch labelfreie Quantifizierung) möglich. Mit diesen Methoden kann zwischen verschiedenen Zuständen unterschieden werden. Eine direkte Kombination aus Markierung, Anreicherung und Quantifizierung ermöglichen isotopenmarkierte Reagenzien wie ICAT (*Isotope-coded affinity*, nicht dargestellt) und SNO-*capture* (SNOCAP, Abb. 2.4.2-3 B), die in einer leichten und einer schweren Variante einsetzbar sind.

Die neueste quantitative Methode sind thiolreaktive Versionen des TMT-Reagenzes, die in Abb.2.4.2-3 (B) dargestellt sind. Es handelt sich um Cystein-reaktive *Tandem Mass Tags* (cysTMT). Eine erste Variante benutzt eine Pyridyldithiol-Reaktivgruppe, während eine Weiterentwicklung dieser Reagenzien eine Iodacetamid-Reaktivgruppe verwendet. Dadurch wird eine irreversible kovalente Bindung mit den Protein-SH-Gruppen ausgebildet. Die cysTMT-Reagenzien sind kommerziell in sechs isotopenmarkierten Varianten erhältlich. Nach der MS-Fragmentierung werden *Reporter*-Ionen zwischen 126-131 Da freigesetzt, die eine Quantifizierung ermöglichen. Durch einen *Massbalancer* sind die markierte Peptide vor der Fragmentierung isobar und zeigen gleiche Eigenschaften in der LC. Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Reagenzien (Biotin-HPDP, SNO-RAC, ICAT, SNOCAP) können diese Reagenzien nicht über eine Affinitätsgruppe angereichert werden.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte daher ein wasserlösliches Reagenz entwickelt werden, welches reaktive Cysteine kovalent markiert und eine Anreicherung ermöglicht. Des Weiteren sollte die Markierung in der späteren MS-Analyse bestehen bleiben und eine zusätzliche, im Massenspektrometer entstehende *Reporter*-Gruppe die Identifizierung aus einer komplexen Mischung erleichtern. Eine erste Version eines solchen Reagenzes **60** ist in Abb. 2.4.2-4 dargestellt. Als Affinitätsgruppe wurde Desthiobiotin gewählt. Desthiobiotin ist eine modifizierte Form von Biotin, die weniger stark an Avidin oder Streptavidin bindet und das unter milderem, nicht denaturierenden Bedingungen eluiert werden kann. Als Reaktivgruppe wurde ein Iodacetamid gewählt, mit der Cysteine eine kovalente Verknüpfung über eine nukleophile Substitution eingehen. Eine PEG-Gruppe sollte zur Wasserlöslichkeit des Reagenzes beitragen. Des Weiteren sollte das Reagenz während der Gasphasen-MS-

Fragmentierung einen Reporter freisetzen. Darüberhinaus sollte es eine feste Markierung im Peptid hinterlassen.

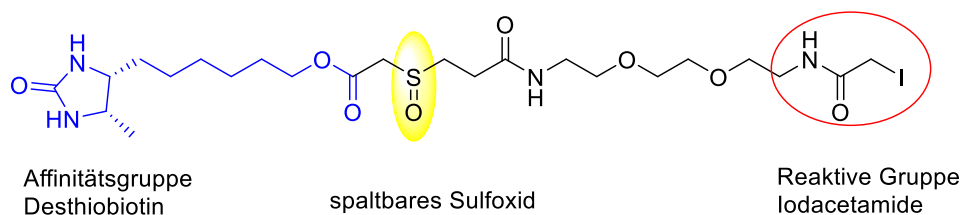


Abb.2.4.2-4 Darstellung des Reagenzes **60** zur Markierung und Anreicherung von reaktiven, reduzierten –SH-Gruppen.

Als spaltbare Gruppe wurde ein Sulfoxid gewählt, das unter CID- oder SID-Bedingungen bei niedrigeren Energien als Peptide fragmentiert. Der literaturbekannte symmetrische Protein-Protein-Crosslinker Disuccinimidylsulfoxid (DSSO) diene als Ausgangspunkt für diese Überlegung.

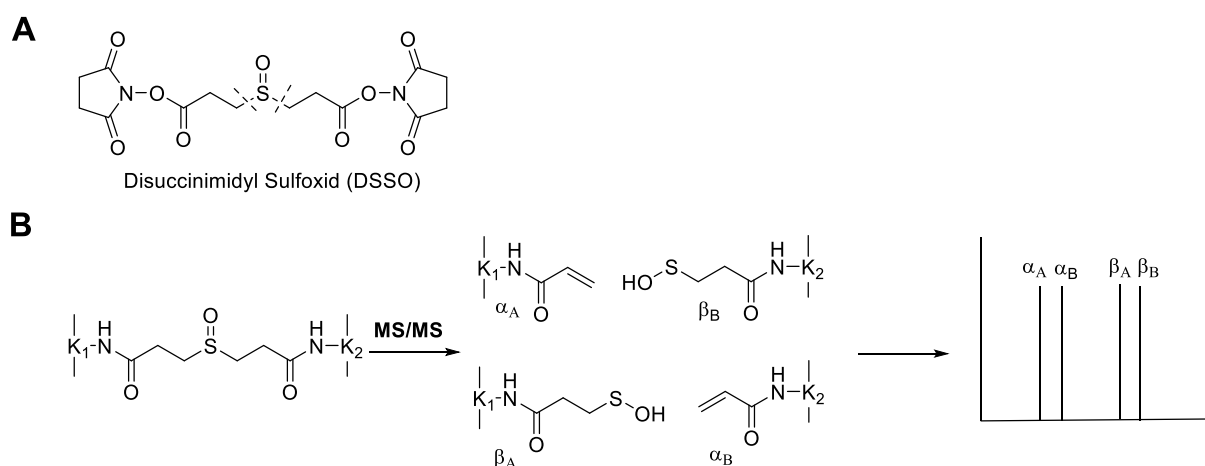


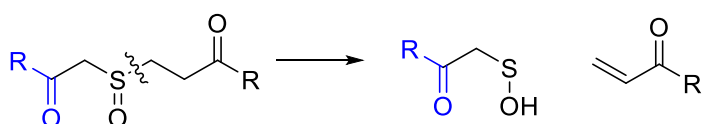
Abb. 2.4.2-5 (A) Strukturformel des Protein-Protein-Crosslinkers DSSO mit den symmetrischen Bruchstellen. (B) MS/MS-Fragmente, die sich bei einem *inter-link* Crosslink bilden. K = Lysin im Peptid.

DSSO bricht nach dem Mechanismus einer Sulfoxidpyrrolyse. Während für diese Umlagerung normalerweise auf hohe Temperaturen ($>200^{\circ}\text{C}$) erhitzt werden muss, findet die Sulfoxidpyrrolyse als Fragmentierung in der Gasphase im Massenspektrometer (CID, HCD, SID etc.) bereits bei niedrigen Temperaturen statt. Über einen 5-gliedrigen Übergangszustand wird ein acides β -H-Atom eliminiert und die C-S-Bindung gebrochen. Im Fall des symmetrischen DSSO-Linker entstehen bei einem erfolgtem *Cross-Link* zwischen zwei Peptiden vier verschiedene Fragmente (siehe Abb.2.4.2-5 B). Es handelt sich hierbei um das Alken-Fragment α und ein Sulfensäure-Fragment β . Aus dem Sulfensäure-Fragment β kann anschließend sogar noch ein Wassermolekül eliminiert werden. So entstehen vier bis sechs Fragmente, welche zur

ERGEBNISTEIL

Identifizierung der verknüpften Peptide herangezogen werden können. Mit dieser Strategie kann zwischen Monolinks, interpeptid-Links und intrapeptid-Links unterschieden werden, da unterschiedlich viele der jeweiligen Fragmente im MS/MS entstehen.

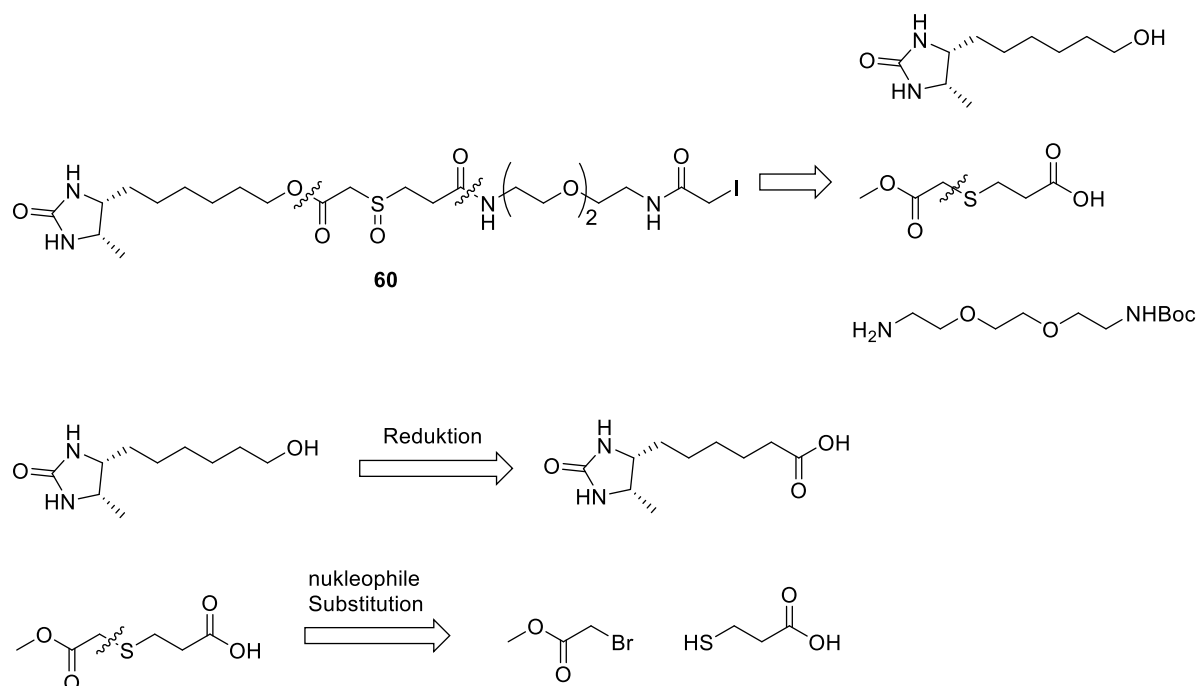
Für ein Cystein-reaktives Reagenz, welches schlicht nur mit einer RSH-Funktionalität reagieren soll, ist die Entstehung von vielen Fragmenten allerdings ungünstig, da die Signalintensität verringert wird. Daher wurde ein Cystein-reaktives Reagenz mit einer asymmetrischen Fragmentierungsstelle entworfen (siehe Schema 2.4.2-1). Aufgrund des Designs können nur zwei Fragmentierungsprodukte gebildet werden, nämlich eine α,β -ungesättigte Carbonylverbindung und ein Sulfensäurefragment. Ebenso kann aus diesem Grund aus dem Sulfensäurefragment kein Wasser abgespalten werden. Daher ist kein Intensitätsverlust im Massenspektrometer durch die Bildung mehrerer Fragmente zu erwarten.



Schema 2.4.2-1 Potentielle Fragmentierung eines asymmetrischen Sulfoxid-Kerns.

2.4.2.1 Synthese von Reagenzien zur Identifizierung von reaktiven Cysteinen

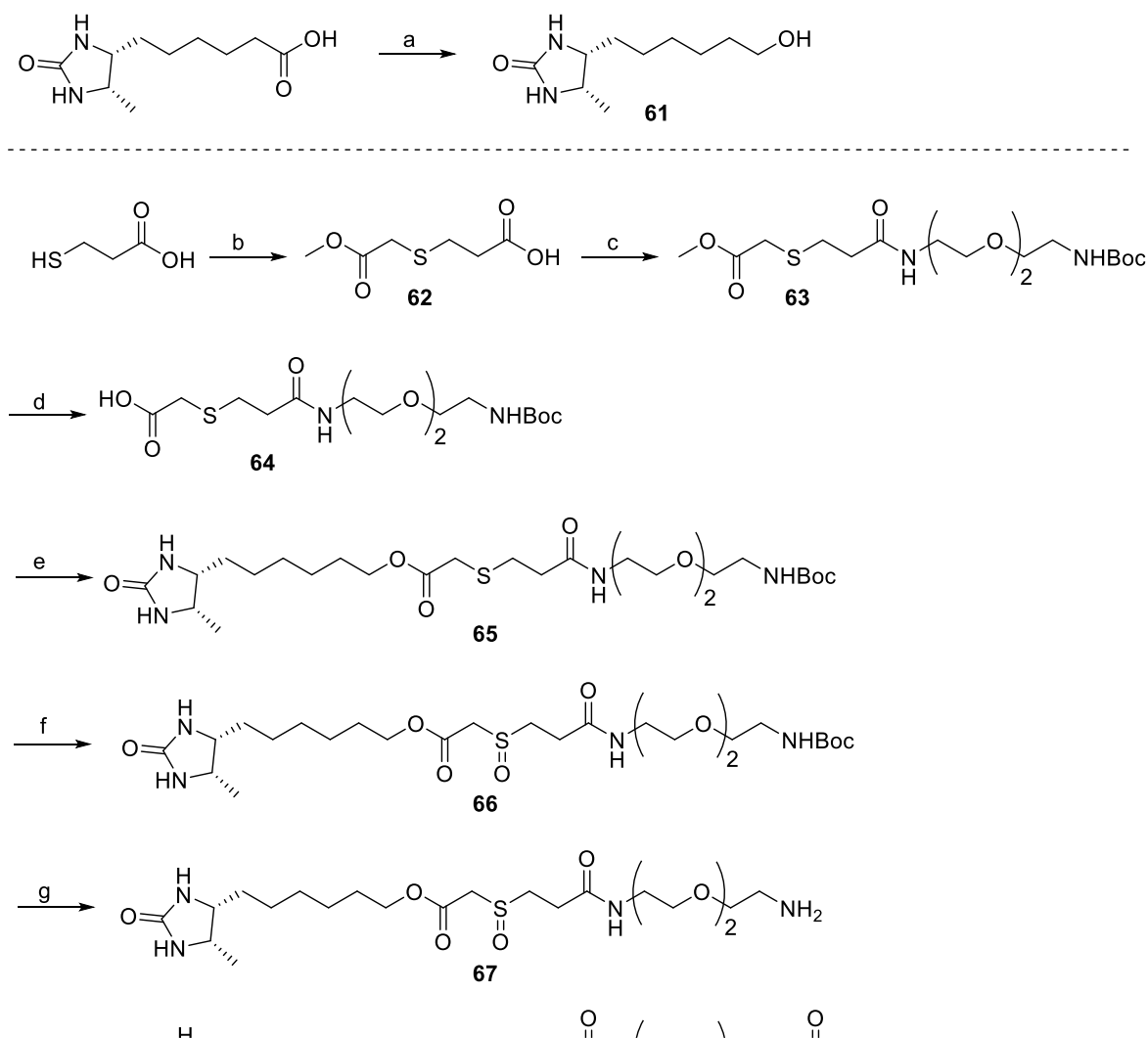
Ein erster Entwurf eines solchen Linkers **60** und dessen Retrosynthese ist in Schema 2.4.2-2 dargestellt.



Schema 2.4.2-2 Retrosynthese eines Cystein-reaktiven Linkers.

Das Reagenz kann ausgehend von Desthiobiotin, einem einfach Boc-geschütztem PEG-Diamin und einem durch nukleophile Substitution zugänglichem Thioether dargestellt werden. Die Reaktivgruppe und die Affinitätsgruppe können durch Amidierung bzw. Veresterung an das Zentralmolekül angeknüpft werden.

Zunächst wurde Desthiobiotin zum Alkohol **61** reduziert (Schema 2.4.2-3). Dies wurde anfänglich durch eine Veresterung mit Thionylchlorid in Methanol und anschließender Reduktion mit LiAlH_4 realisiert. Das Produkt konnte jedoch bei einer direkten Reduktion mit LiAlH_4 in einem Pyridin/THF-Gemisch in weitaus besseren Ausbeuten erhalten werden.



Schema 2.4.2-3 Synthese eines ersten Cystein-reaktiven, spaltbaren Reagenzes. a) LiAlH_4 , Pyridin, THF, 80 % b) Bromessigsäuremethylester, NEt_3 , THF, $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$, 14 h, 79 %; c) *N*-Boc-ethyldiamin, EDC·HCl, DMAP, DMF, RT, 16 h, 74 %; d) LiOH, THF/ H_2O , RT, 30 min, 92 %; e) **61**, EDC·HCl, DMAP, DMF, RT, 16 h, 50 %; f) *m*CPBA, CHCl_3 , 0°C , 15 min, 90 %; g) TFA, DCM, 5 h, RT, quant.; h) Iodessigsäureanhydrid, Hünigbase, DMF, 14 h, RT.

Die zentrale Thioether des Reagenzes **62** wurde durch eine $\text{S}_\text{N}2$ -Reaktion mit Thioglykolsäure und Bromessigsäuremethylester mit NEt_3 als Base in THF dargestellt. Die Reaktion verlief nahezu quantitativ und nach Waschen und Abtrennung des ausgefallenen Triethylammoniumbromids konnte der Thioether **62** in guter Reinheit gewonnen werden. Anschließend wurde unter Steglich-Bedingungen mit *N*-Boc-ethyldiamin und EDC·HCl als Aktivierungsreagenz unter Zusatz von DMAP amidiert. Das Amidierungsprodukt **63** konnte in einer Ausbeute von 74 % gewonnen werden. Spätere Experimente mit ähnlichen Bausteinen zeigten, dass diese Veresterung unter Zusatz von HOBt noch weitaus höhere Ausbeuten erzielt.

ERGEBNISTEIL

Nach quantitativer basischer Verseifung von Verbindung **63** mit LiOH konnte die freie Säure **64** direkt mit dem Desthiobiotin-Alkohol **61** unter Ausbildung einer Esterbindung zu Verbindung **65** verknüpft werden. Hierfür wurden die gleichen Bedingungen, wie für die vorherige Amidierung verwendet. Im Anschluss daran wurde der Thioether **65** mit *m*CPBA unter Eiskühlung zum Sulfoxid **66** oxidiert. Hierbei war es wichtig, äquimolar zu arbeiten und die Reaktion nach einer bestimmten Zeit zu stoppen, da sonst das zweifach oxidierte Produkt entsteht. Das Nebenprodukt Benzoesäure konnte durch Waschen der organischen Phase mit gesättigter wässriger NaHCO₃-Lösung komplett entfernt werden. Bei der Synthese bis zu diesem Schritt wurde vor allem die Reaktionsreihenfolge optimiert. Wurde bei einer Oxidation vor der basischen Verseifung oxidiert, so war die anschließende basische Hydrolyse des Methylesters nicht mehr quantitativ möglich. In einem weiteren Schritt wurde die Boc-Schutzgruppe unter sauren Bedingungen mit TFA entfernt. Eine Fällung mit Et₂O ergab das Amin **67** in ausreichender Reinheit, so dass die Einführung der Reaktivgruppe „Iodacetamid“ durch Umsetzung mit Iodessigsäureanhydrid und Hünigbase in DCM möglich war. Das Reagenz **60** wurde mittels Umkehrphasen-HPLC gereinigt. Als Laufmittel wurde 100 % Wasser mit 0.1 % FA und 30 % Wasser in Acetonitril mit 0.1 % FA verwendet.

Mit Reagenz **60** wurden erste Tests mit synthetischen Peptiden und einem BSA-Verdau durchgeführt, die das Reaktionsvermögen mit Cysteinen und die Fragmentierungseigenschaften überprüfen sollte. Nach Inkubation des BSA-Verdau mit dem Reagenz wurden bei der massenspektrometrischen Untersuchung insgesamt 25 modifizierte, Cystein-haltigen Peptide gefunden. Von diesen Peptiden fragmentierte nur ein Peptid (DEVK) bei einer CID-Energie von 40 eV, während alle anderen Peptide intakt blieben. Die Bildung der vorhergesagten Fragmente (siehe Abb. 2.4.2-6) konnte bestätigt werden. Aufgrund des asymmetrischen Sulfoxids, das nur eine CH₂-Gruppe mit β-ständigen H-Atomen zur Eliminierung besitzt, hat Reagenz **60** nur eine Fragmentierungsstelle. Es wurde ein Alkenfragment **60a**, das mit dem Peptid verbunden ist und ein *Reporter*-Fragment **60b** mit einer Sulfensäuregruppe gebildet.

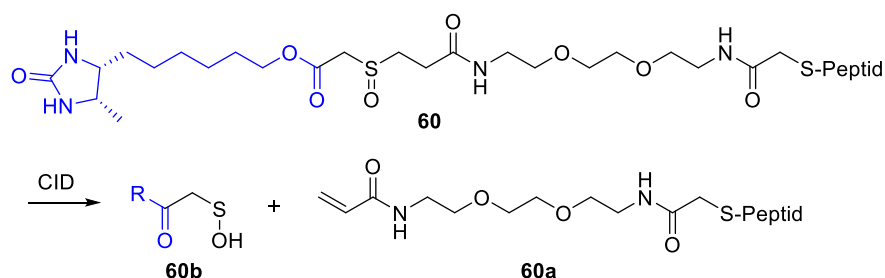
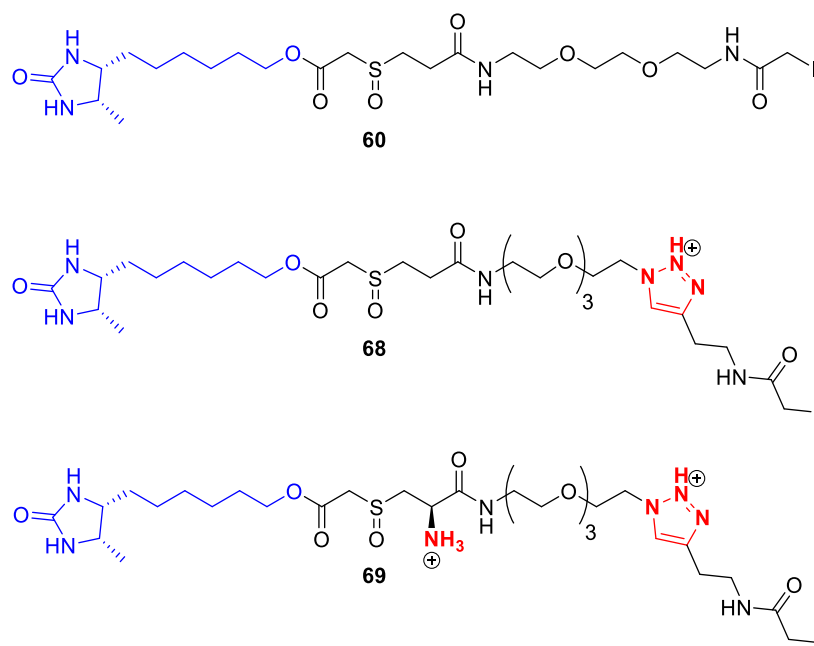


Abb. 2.4.2-6 Gefundene Fragmente für das derivatisierte Peptid DEVK.

Der Unterschied zwischen Peptid DCKV und den anderen Peptiden ist das Vorhandensein einer positiven Ladung innerhalb der Seitenkette eines Lysins. Dieses Lysin befindet sich in unmittelbarer Nachbarschaft zu dem Cystein, welches mit dem Reagenz reagiert hatte. Daher kann angenommen werden, dass die Fragmentierung stark von der Aminosäurezusammensetzung des markierten Peptids und damit vom Ladungszustand sowie der Protonenmobilität abhängt. Ein optimales Reagenz sollte unabhängig von der Aminosäurezusammensetzung fragmentieren. Daher wurde versucht ein analoges Reagenzes zu entwickeln, das leicht protonierbare Funktionalitäten besitzt.

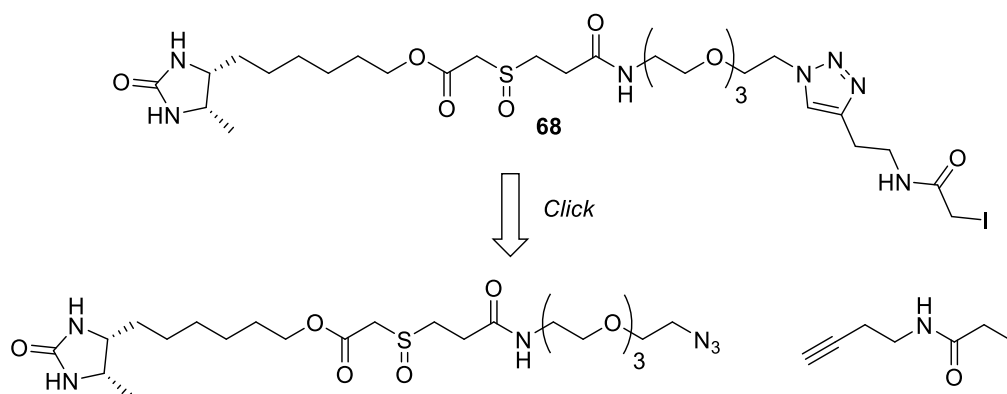
Schema 2.4.2-4 zeigt die im Rahmen dieser Doktorarbeit entwickelten Reagenzien. In diese Reagenzien wurden als protonierbare Gruppen eine Triazol-und/oder eine Amin-Funktionalität (Verbindung **68** und **69**) eingebaut. Im Folgenden soll zunächst auf die Synthese der Verbindungen **68** und **69** eingegangen werden. Anschließend werden die neuen Reagenzien im Bezug auf Ladungszustand und Fragmentierungseigenschaften evaluiert.



Schema 2.4.2-4 Reagenzien zur Optimierung der Fragmentierungseigenschaften mittels des Ladungszustandes. Hierzu wurden Reagenzien mit Triazol- und Aminfunktionalitäten entwickelt, die leicht protoniert werden können.

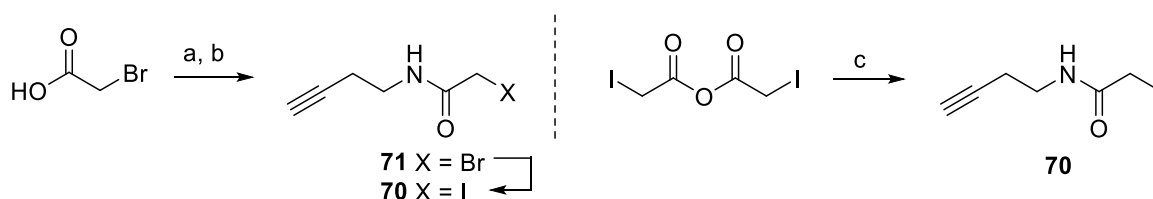
Zunächst wurde ein Markierungsreagenz synthetisiert, welches eine protonierbare Triazol-Funktionalität **68** enthält. Triazole sind biokompatibel und imitieren Peptidbindungen.^[134] Diese Funktionalität sollte über die Verknüpfung eines Azid mit einem Alkin *via* einer 1,3-dipolaren Cycloaddition realisiert werden (siehe Retrosynthese in Schema 2.4.2-5).

ERGEBNISTEIL



Schema 2.4.2-5 Retrosynthese eines Cystein-reaktiven Reagenzes mit Triazolfunktionalität.

Hierzu wurde der Iodacetamid-Baustein **70** über eine Amidierung aus kommerziell erhältlichen 3-Amin-but-1-in und Bromessigsäure synthetisiert (siehe Schema 2.4.2-6). Erste Amidierungsversuche mit EDC·HCl oder DCC als Aktivierungsreagenz unter Zusatz von DMAP lieferten allerdings kein Produkt.

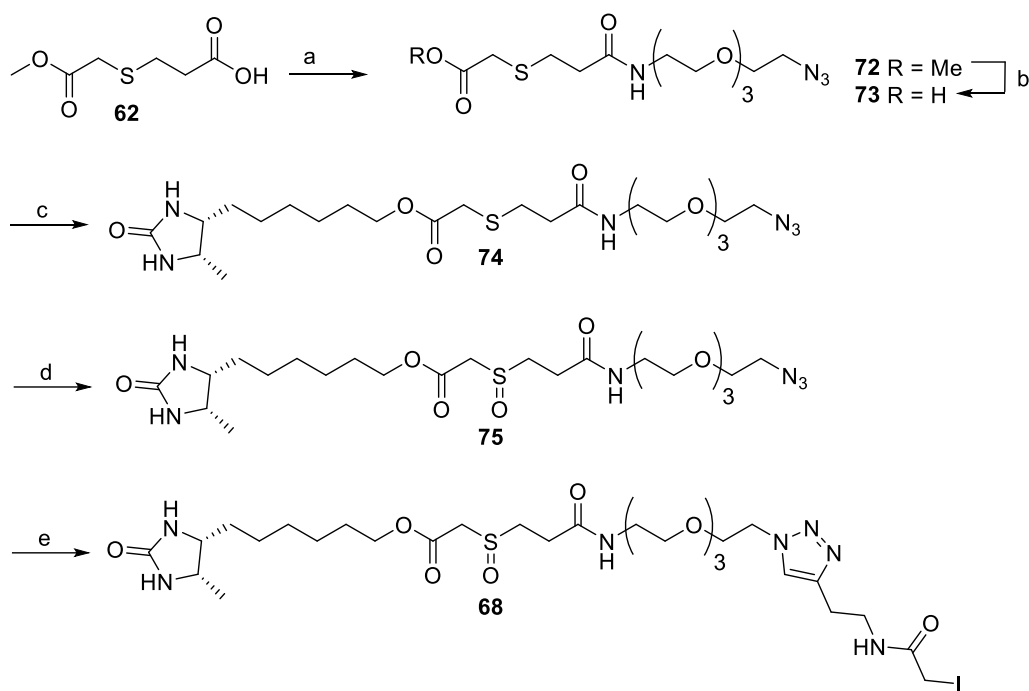


Schema 2.4.2-6 Synthesewege zu einem Alkin-modifizierten Iodacetamid. a) Bromessigsäure, *N*-Methylmorpholin, Chlorameisensäureisopropylether, THF, RT, 16 h, 35 % b) NaI, Aceton, 45°C→RT, 2 d, 88% c) 4-Aminobut-1-in, DIPEA, DMF, RT, 4 h.

Im Gegensatz dazu ergaben Amidierungsbedingungen mit *N*-Methylmorpholin und Chlorameisensäureisopropylether als Aktivierungsreagenz in THF das Produkt in 35 % Ausbeute. Anschließend konnte das Bromid **71** gegen ein Iodid über eine Finkelsteinreaktion zu Verbindung **70** ausgetauscht werden. Alternativ konnte das Alkin **70** auch durch Umsetzung von 3-Amin-but-1-in mit Iodessigsäureanhydrid in DMF unter Zusatz von Hünigbase hergestellt werden.

Eine Azidfunktionalität wurde durch eine Amidierung von **62** mit kommerziell erhältlichem 11-Azido-3,6,9-trioxaundecan-1-amin unter Aktivierung mit EDC·HCl eingeführt (siehe Schema 2.4.2-7). Dabei entsteht Verbindung **72**.

ERGEBNISTEIL

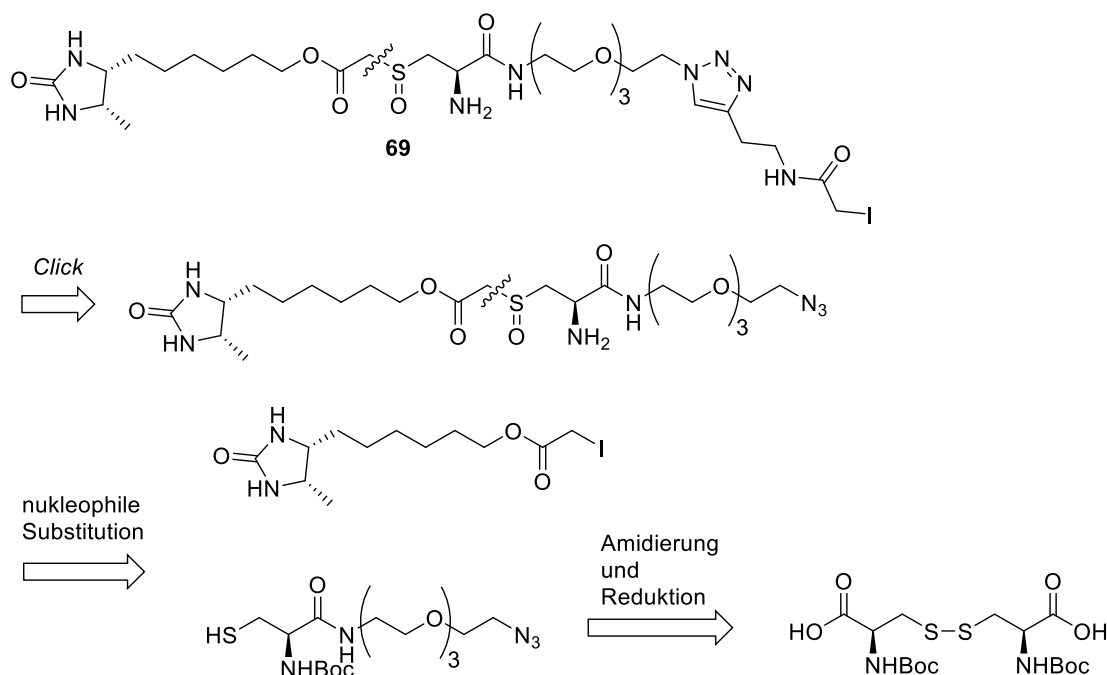


Schema 2.4.2-7 Synthese eines triazol-haltigen Reagenzes. a) EDC-HCl, DMAP, Azido(PEG)₃Amin, RT, 16 h, 56 %; b), LiOH (1M), THF, RT, 4 h, 70 %; c) EDC-HCl, DMAP, **61**, RT, 16 h, 60 % d) *m*CPBA, CHCl₃, 0°C, 15 min, 70 % e) **70**, CuSO₄, Natriumascorbat, THF/H₂O.

In ersten Syntheseversuchen wurde auf dieser Stufe das Sulfid zum Sulfoxid **75** oxidiert. Die nachfolgende Entschützung des Methylesters war aber unter allen getesteten Bedingungen unvollständig und die freie Säure konnte nur in sehr schlechten Ausbeuten isoliert werden. Daher wurde der Methyl ester **72** bereits vor der Oxidation zu der Verbindung **73** hydrolysiert. Die Entschützung verlief bei RT mit LiOH innerhalb von 30 min in quantitativer Ausbeute. Anschließend wurde die freie Säure mit Desthiobiotin-Alkohol **61** verestert. Daraufhin wurde das Sulfid **74** mit *m*CPBA in guten Ausbeuten bei 0 °C zum Sulfoxid **75** oxidiert. Im letzten Schritt wurde das Azid an den Alkinbaustein über eine kupferkatalysierte *Click*-Reaktion zu **68** gekoppelt. Beste Bedingungen hierfür waren die Verwendung von CuSO₄ und Natriumascorbat in THF/H₂O. Das Rohprodukt konnte über Umkehrphasen-HPLC (0→80% 0.25 M NH₄COOH in 80:20 MeCN/H₂O) aufgereinigt werden.

Basierend auf einer Testsynthese mit Methioninsulfoxid als Ausgangsmaterial (nicht dargestellt) wurde für die Darstellung eines Triazol-Reagenzes, das zusätzlich ein Amin enthält, ein konvergenter Syntheseweg entwickelt. Hierbei werden zwei Bausteine zu einem Thioether kombiniert (siehe Schema 2.4.2-8, Retrosynthese).

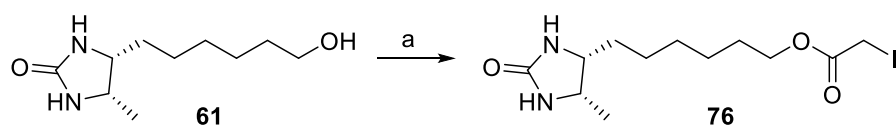
ERGEBNISTEIL



Schema 2.4.2-8: Retrosynthese eines Reagenzes mit Triazol- und Aminfunktionalitäten.

Als Edukte sollte ein Desthiobiotin mit einem Iodacetamid und ein N_{α} - und an der SH-Gruppe geschütztes Cystein-Azid dienen. Beide sollten über eine nukleophile Substitution verknüpft werden (siehe Schema 2.4.2-8). Die freie Säurefunktionalität des Cysteins sollte vorweg mit kommerziell erhältlichem 11-Azido-3,6,9-trioxaundecan-1-amin in einer Amidierung zur Reaktion gebracht werden.

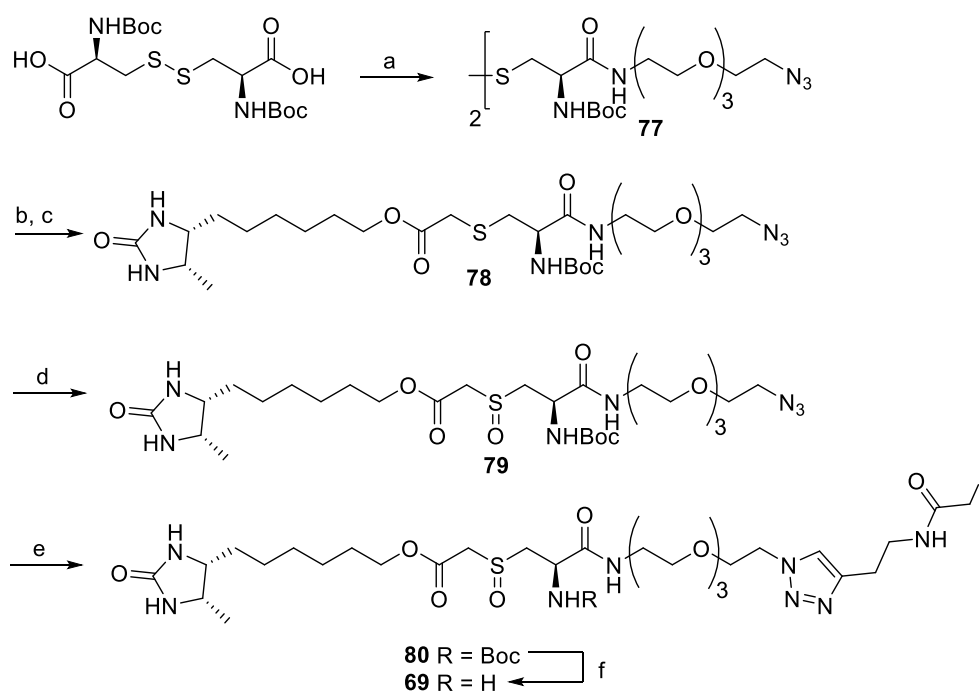
Für die Synthese des Desthiobiotin-haltigen Ausgangsbaustein **76** wurde Desthiobiotin-Alkohol **61** mit Iodessigsäure und DCC in einer Ausbeute von 60 % verestert (Schema 2.4.2-9).



Schema 2.4.2-9 a) DCC, DMAP, Iodessigsäure, DMF, RT, 16h, 60 %.

Als Edukt für den Cystein-Baustein wurde zunächst anhand eines Testsystems (Cystein oder Methioninsulfoxid) die optimale Schutzgruppe für das N_{α} des Cysteins ermittelt. Es wurden eine Fmoc-, Acetyl- und eine Boc-Schutzgruppe getestet. Dabei zeigte sich, dass weder die Fmoc- noch die Acetylschutzgruppe nach der Oxidation des Thioethers zum Sulfoxid unter den getesteten Bedingungen geschützt werden konnte. Demgegenüber konnte die Boc-Schutzgruppe unter Standardbedingungen mit TFA geschützt werden, weshalb diese Gruppe gewählt wurde. Zunächst wurde als Boc-haltiger Baustein ein N_{α} -Boc-Cystein verwendet, das

am Thiol mit einer Tritylschutzgruppe versehen war. Bei der sauren Entschützung der Tritylfunktionalität entstanden jedoch nicht abtrennbare Nebenprodukte. Daher wurde ein N_{α},N_{α}' -geschützten *L*-Cystin verwendet, bei dem das für die nukleophile Substitution benötigte Thiol als Disulfid maskiert ist. Die Säurefunktionalitäten des N_{α},N_{α}' -di-Boc-*L*-cystins wurden mit PyBOP und DIPEA aktiviert und mit 11-Azido-3,6,9-trioxaundecan-1-amin zum Amid **77** umgesetzt (siehe Schema 2.4.2-9). Die Disulfidbrücke wurde mit TCEP zum Thiol reduziert. *In situ* konnte dann das freie Thiol mit dem Iodacetamid **76** in einer nukleophilen Substitution zum Thioether **78** umgesetzt werden. Im nächsten Schritt wurde unter bekannten Bedingungen zum Sulfoxid **79** oxidiert. Anschließend konnte das Azid-haltige Sulfoxid **79** an das Alkin **70** unter Cu(I)-Katalyse geklickt werden, um so das Triazol **80** zu erhalten. Verbindung **80** konnte durch Umkehrphasen-HPLC gereinigt werden und durch eine saure Boc-Entschützung zum Reagenz **69**, mit einer freien Amin-Gruppe, umgesetzt werden.



Schema 2.4.2-9 Synthese des Amin- und Triazolhaltigen Linkers **69**. a) EDC·HCl, HOBT, Azido(PEG₃)Amin, THF, RT, 16h, 70 %, b) TCEP, NaHCO₃, H₂O/DMF, RT, 2h, c) **76**, DIPEA, DMF, 2h, RT, 68 %, d) *m*CPBA, CHCl₃, 0°C, 3h, 83 %, e) **70**, CuSO₄, NaAscorbat, THF/H₂O, f) TFA, DCM, RT, 3 h, quantitativ.

2.4.2.2 Evaluierung der synthetisierten Cystein-reaktiven Reagenzien

Zur Evaluierung der Fragmentierungseigenschaften der synthetisierten Cystein-reaktiven Reagenzien wurden zum einen Experimente mit den synthetisierten Reagenzien alleine, und zum anderen Experimente mit einem Cystein-enthaltenden Peptid (Sequenz: EQWSNCPRTWGQIR), welches über die Iodacetamidreaktivgruppe mit den Reagenzien verknüpft wurde, durchgeführt.

Es sollte hierbei getestet werden, ob durch die Kontruktion von Reagenzien mit protonierbaren Funktionalitäten der Ladungszustand (z) erhöht wird und ob die Erhöhung des Ladungszustandes die Fragmentierung im Massenspektrometer erleichtert.

Zunächst sollte der Ladungszustand der Reagenzien **60**, **68** und **69** (Abb. 2.4.2-7-B) ohne *in-source* CID bei einem Ameisensäuregehalt von 0.1 % (Standardbedingung) ermittelt werden.

Wie in Abb. 2.4.2-7-A/C zu sehen befindet sich Linker **60** zu 97 % im Ladungszustand $z = 1$, während sich Linker **68** mit einer protonierbaren Triazol-funktionalität zu 50 % in $z = 1$ und zu 50 % in $z = 2$ befindet. Durch das Einführen eines Amins als weitere protonierbare Funktionalität liegt Linker **69** lediglich zu 25 % in $z = 1$ vor, wohingegen 75 % als $z = 2$ vorliegen. Somit kann festgehalten werden, dass das Hinzufügen von protonierbaren Funktionalitäten den Ladungszustand im Massenspektrometer erhöht.

Analog dazu wurden die Ladungszustände für die Reagenzien nach einer Konjugation an ein Testpeptid ermittelt. Hierzu wurden die Reagenzien **60**, **68** und **68** mit dem Testpeptid für 30 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend an einer *QExactive* vermessen. Für Linker **60** befinden sich 25 % des Konjugats in Ladungszustand $z = 2$ und 75 % in Ladungszustand $z = 3$. Ähnliche Ergebnisse werden für Linker **68** mit einer Triazol-funktionalität erhalten. Hier findet man 22 % des Linkers in $z = 2$, während 73 % des Linkers im $z = 3$ und 4.4 % in $z = 4$ vorliegen. Für den Amin-haltigen Linker **69** liegen jeweils 49 % im Ladungszustand $z = 3$ und $z = 4$ vor, während nur ein geringer Anteil von 1.7 % im Ladungszustand $z = 2$ vorliegt. Somit erhält man für Linker **69** die höchsten Ladungszustände.

Insgesamt ist erkennbar, dass es durch die Konjugation des Reagenz an Peptid zu einer generellen Erhöhung des Ladungszustands kommt. Desweiteren wird die Hypothese bestätigt, dass durch das Hinzufügen von protonierbaren Funktionalitäten die Ladungszustände erhöht wird.

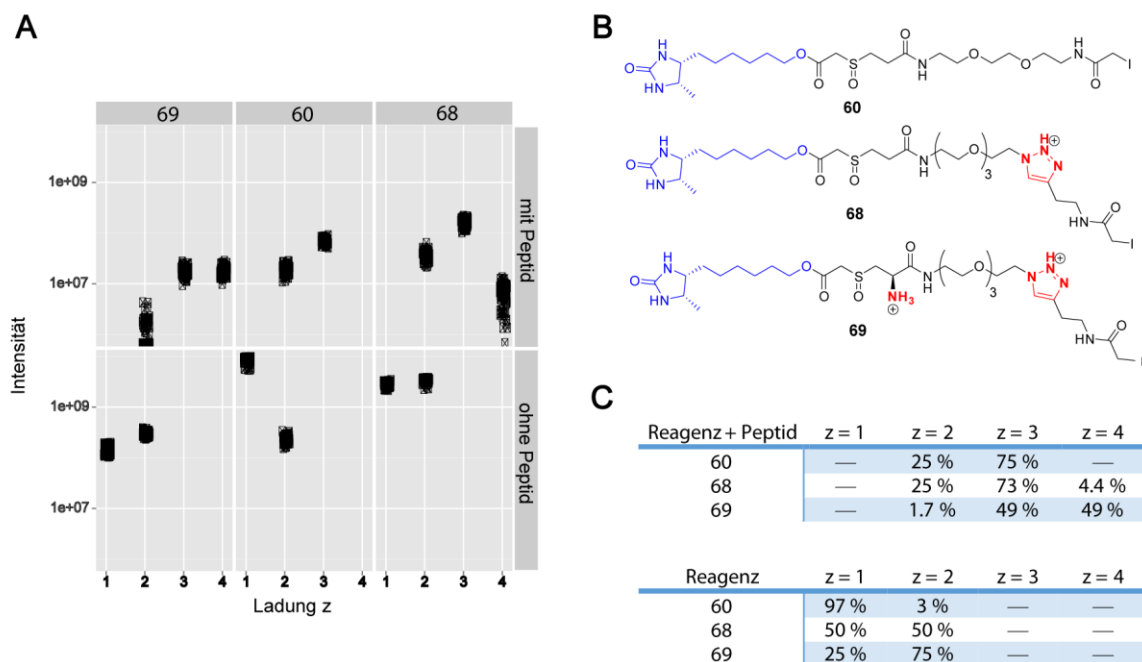


Abb. 2.4.2-7. (A) Häufigkeiten des Ladungszustandes $z = 1, 2, 3, 4$. Reagenz ohne Peptid (unten); Reagenz mit Peptid (oben). Die Messungen wurden bei einem Standardgehalt von 0.1 % FA durchgeführt. (B) Strukturformeln der untersuchten Cystein-reaktiven Reagenzien. Sequenz des Peptids: EQWSNCPRTWGQIR. (C) Tabellen zur prozentualen Ladungsverteilung von Reagenz-Peptid-Konjugaten (oben) und dem Reagenzien (unten). Diese Messungen wurden von *Dr. Felix Meissner*, MPI für Biochemie in München und *Sebastian Virreira-Winter*, MPI für Infektionsbiologie, Berlin durchgeführt.

In weiteren Experimenten sollte die Fragmentierungsenergie für die Sulfoxidreagenzien **60**, **68** und **69** unter *in-source*-CID-Bedingungen ermittelt werden (siehe Abb. 2.4.2-8-A). Hierzu wurden die *in source*-CID-Energie im Experiment kontinuierlich erhöht und die Intensitäten der verschiedenen Ladungsspezies ($z = 1, 2, 3$ oder 4) des Reagenzes oder des Peptid-konjugierten Reagenzes gemessen. Bei einer Abnahme der Intensität ist anzunehmen, dass die Sulfoxide fragmentieren.

Bei einem Ladungszustand von $z = 1$ beträgt die *in-source* CID-Energie ca. 75 eV für alle Reagenzien. Demgegenüber fragmentieren die Reagenzien bei $z = 2$ bei SID-Energien von ca. 25 eV (siehe Abb. 2.4.2-8-A). Für einen Bindungsbruch ist folglich der Ladungszustand der Reagenzien entscheidend. Eine ähnliche Beobachtung macht man bei dem Vergleich der kovalent mit einem Peptid verknüpften Reagenzien. Während für $z = 2$ der Bindungsbruch bei sehr hohen Energien auftritt, erniedrigt sich die Energie für eine Fragmentierung mit Erhöhung des Ladungszustandes. Für $z = 3$ beträgt die SID-Energie für den Bruch ca. 50 eV und für $z = 4$ ca. 25 eV.

ERGEBNISTEIL

Bei einem Bindungsbruch wurde die Entstehung von zwei Fragmenten, wie in Schema 2.4.2-1 prognostiziert, beobachtet. Bei einem Fragment handelt es sich um den *Reporter*, bei dem anderen Fragment um ein Alken-haltiges Fragment, welches das Peptid trägt und der Identifizierung des Peptids dient. In Abb.2.4.2-8 sind die Intensitäten des Alken-haltige Fragments mit und ohne Peptid gegen die *in source*-CID-Energie aufgetragen. Die Entstehung der Fragmente geht mit dem Bindungsbruch einher (siehe Abb. 2.4.2-8-B). Ohne Peptid entstehen für die Reagenzien Fragmente mit $z = 1$. Ein zweites Maximum indiziert, dass später auch geringere Ladungszustände ($z = 1$) fragmentieren und sich so das aufgetragene Fragment bildet. Wenn die Reagenzien an ein Peptid gekuppelt sind, dann entstehen bei diesem Peptid Fragmente mit einer Ladung von $z = 3$.

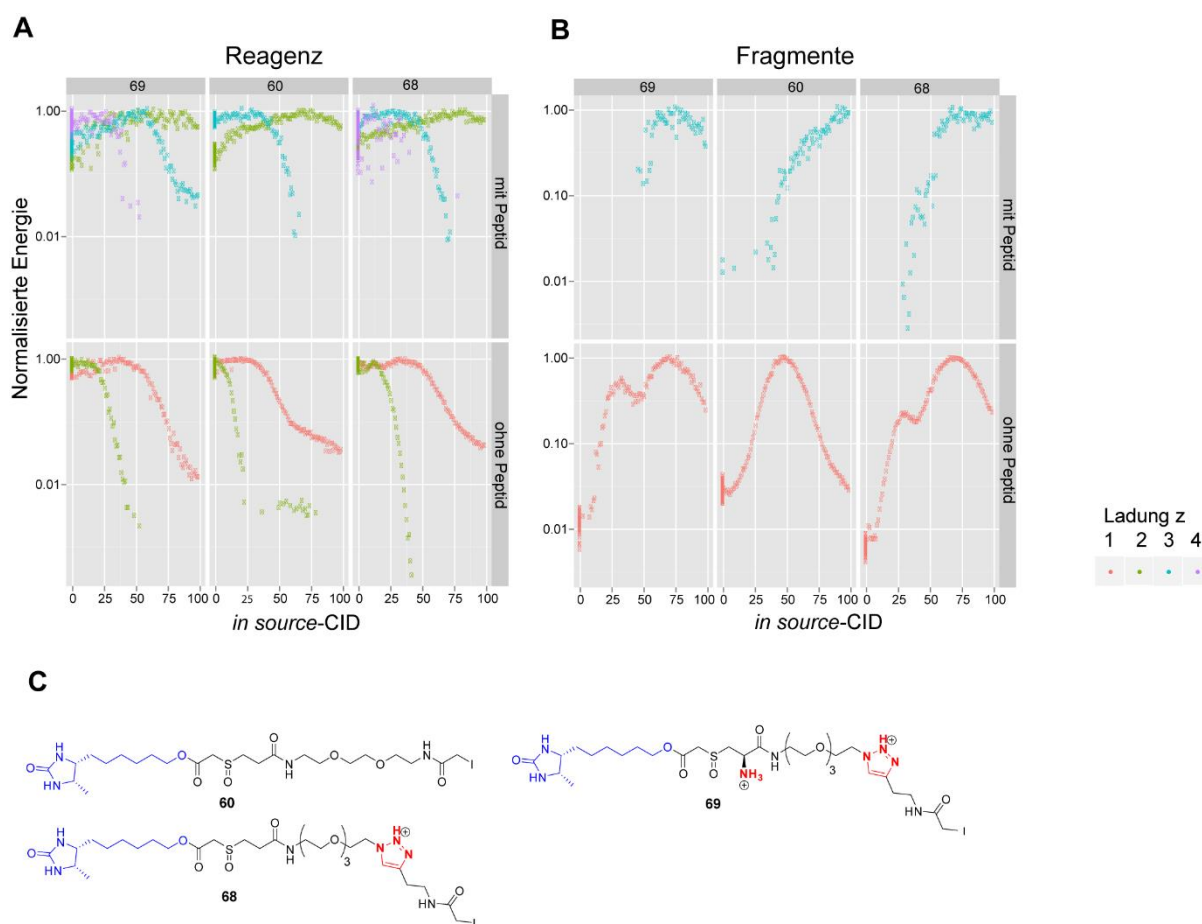


Abb 2.4.2-8 Aufnahme der Signalintensitäten unter steigenden *in-source* CID-Energien (A) links: Reagenzien ohne Peptid, links: Reagenzien mit Peptid. Die Ladung ist durch unterschiedliche Farben kodiert. Sequenz des Peptids: EQWSNCPRTWGQIR.

Ausblick

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden Reagenzien für epigenetische und proteomische Untersuchungen entwickelt.

Unter anderem wurden natürliche und isotonenmarkierte Triphosphatbausteine synthetisiert und in DNA eingebaut, sodass lange Oligonukleotide für Aktivitätsassay und proteomische Studien zur Verfügung stehen.

Desweiteren wurde eine DNA-basierte *pull down*-Sonde entwickelt, die es ermöglicht bindene Proteine von DNA-Modifikationen zu identifizieren. Hierbei wurden bindende Proteine kovalent über einen NHS-Ester als Reaktivgruppe mit der Sonde verknüpft. Mit dieser Strategie wurden recht unspezifische Ergebnisse erhalten, vermutlich weil die NHS-Ester zu reaktiv sind. Daher müssen wohl in zukünftigen Studien Sonden mit anderen Reaktivgruppen verwendet werden. Die ebenso im Rahmen dieser Doktorarbeit synthetisierte photoreaktive Diazirin-*pull down*-Sonde könnte hier zum Einsatz kommen.

Für potentielle Sequenzierungen sollten Antikörper gegen hmU und fC entwickelt werden. Es wurde eine Synthese für 5'-modifizierte Nukleoside entwickelt, um diese *via* Click-Chemie an immunogene Trägerproteine anzubringen. Die aus diesen Konjugaten erhaltenen Antikörper müssen zukünftig auf ihre Spezifität hin getestet werden.

Ein weiteres Projekt war die Entwicklung eines Cystein-reaktiven MS-spaltbaren Reagenzes, das die Identifizierung von reaktiven Cysteinen in komplexen Proteinmischungen erlaubt.

Ein für die Anwendung optimiertes Reagenz wurde entwickelt und steht nun für Studien in Kooperation mit dem MPI München (Prof. Mann) und MPI Berlin (Prof. Zyklinsky) zur Verfügung. Eine Weiterentwicklung könnte das Einführen von Isotopenmarkierungen sein, um eine Quantifizierung der reaktiven Cysteine zu ermöglichen.

Experimenteller Teil

3.1 Materialien und Methoden

3.1.1 Chemische Materialien und Methoden

Alle Reaktionen mit wasser- und sauerstoffempfindlichen Edukten und Produkten wurden in mehrmals ausgeheizten Schlenkcolben und unter Inertgasatmosphäre (Stickstoff- oder Argonatmosphäre) durchgeführt.

Druckautoklav: Eine Kohlenmonoxidatmosphäre von 3.5 bar wurde über den *Miniclave*-Glas-Druckreaktor mit einem Borosilikat-Glas 3.3 Einsatz der Firma *Büchi Glas Uster AG* erzeugt.

Doppelt destilliertes Wasser: Für biochemische Untersuchungen und zur Herstellung flüssiger Phasen für die HPLC wurde doppelt destilliertes Wasser (Bidestwasser) mit Hilfe einer *Milli-QPlus*-Anlage mit einer *QPAK®2* Kartusche erzeugt.

Dünnschichtchromatographie (DC) wurde auf Aluminiumfertigplatten *Kieselgel 60 F254* oder auf Alox-Fertigplatten *Aluminiumoxyd 60 F254* der Firma *Merck* durchgeführt. Die aufgetragenen Substanzen wurden unspezifisch durch UV-Lichteinstrahlung (254 nm bzw. 366 nm), Anfärben mit einer Vanillin-Schwefelsäure-Lösung oder Cer-Molybdat-Lösung sichtbar gemacht. Waren Amine vorhanden, wurde mit einer Ninhydrin-Lösung angefärbt. Azide wurden in einem Tauchbad aus PPh_3 (20 % in DCM) und anschließendem Anfärben mit Ninhydrin sichtbar gemacht.

Festphasen-DNA-Synthese erfolgte nach den Standardprotokollen des Geräteherstellers mittels CE-Phosphoramidit-Chemie an einem *ABI 394 DNA synthesizer (Applied Biosystems)*. Als Festphasenmaterial wurde LV-Polystyrol-Träger (Beladung 21 μmol) von *Glen Research* oder *Link Technologies* oder CPG-Träger von (500 Å, *Glen Research*) verwendet. Die Standardphosphoramidite von dA (Bz-dA), dC (Bz-dC oder Ac-dC), dG (*i*Bu-dG) und dT wurden von *Link Technologies* und trockenes Acetonitril (*Rotidry*, $\geq 99.9\%$, < 10 ppm Wasser) wurde von *Roth* bezogen. Die verwendeten Reagenzien und Lösungen für Kupplung, *Deblocking*, *Capping* und Oxidation sind im Folgenden aufgelistet:

EXPERIMENTELLER TEIL

1. **Kupplung:** 0.25 M BTT in MeCN (≤ 10 ppm H₂O), hergestellt nach Welz *et al.* oder Aktivator 42[®] (0.25 M in MeCN, ≤ 30 ppm H₂O, *Sigma Aldrich*)
2. **Deblocking:** 3% Dichloressigsäure in DCM
3. **Capping A:** Ac₂O (20 % Vol.), 2,6-Lutidin (30% Vol.) in MeCN (≤ 10 ppm H₂O)
4. **Capping B:** *N*-Methylimidazol (16 % Vol.) in MeCN (≤ 10 ppm H₂O)
5. **Oxidation:** 25 mM Iod in 2,6-Lutidin/ H₂O/MeCN (6/65/30)

Standardphosphoramidite und Sonderphosphoramidite wurden als 0.1 M Lösungen in MeCN (≤ 10 ppm H₂O) eingesetzt. Während Standardphosphoramidite für 45 s gekuppelt wurden, wurden die Kupplungszeiten bei Sonderphosphoramiditen auf 165 s verlängert. Bei kürzeren Oligonukleotiden wurde eine „DMT-off“ Synthese (Abspaltung der 5'-DMT-Schutzgruppe am Träger) und für längere Oligonukleotide wurde eine „DMT-on“ Synthese (keine Abspaltung der 5'-DMT-Schutzgruppe am Träger) durchgeführt.

Die Entschützungsbedingungen sind an die jeweils verwendeten Sonderphosphoramidite angepasst und im Folgenden aufgelistet:

- hmC-PA, cadC-PA: Inkubation in 1 mL einer Lösung aus 0.4 M NaOH in MeOH/H₂O (4:1) bei 27 °C und 1250 rpm. Nach Zugabe von 0.6 mL einer 1 M Triethylammoniumacetat-Lösung (pH 7.0) wurde das Trägermaterial abzentrifugiert, und mit Wasser nachgewaschen. Der das Oligonukleotid enthaltende Überstand wurde über Umkehrphasen-HPLC gereinigt.
- mC-PA, 5'-Biotin-PA, hmdU-PA, 5-Octadienyl-dU, 5'-Fluorescein-PA dU-PA: Inkubation mit 1 mL AMA-Lösung (MeNH₂/NH₃aq. 1:1) bei 65 °C für 10 min. Nach Abuhlen auf Eis wurde abzentrifugiert, mit Wasser nachgewaschen und der, das Oligonukleotid enthaltende Überstand über Umkehrphasen-HPLC gereinigt.
- fC-PA: Inkubation in 1 mL einer Lösung aus 0.4 M NaOH in MeOH/H₂O (4:1) bei 25 °C und 1250 rpm. Nach Zugabe von 0.6 mL einer 1 M Triethylammoniumacetat-Lösung (pH 7.0) zur Neutralisation wurde das Trägermaterial abzentrifugiert, mit Wasser nachgewaschen und das Oligonukleotid getrocknet.

Die Acetylschutzgruppe wurde durch Inkubation mit 80 % Essigsäure in Wasser für 6 h bei 20 °C abgespalten. Anschließend wurde eine Ethanol-fällung durchgeführt.

Falls eine *DMT-on* Synthese erfolgte, wurde nach der ersten präparativen Aufreinigung die terminale DMT-Gruppe durch Inkubation mit einer 30 %igen HOAc-Lösung (100µL) bei 23°C und 1250 rpm abgespalten. Es folgte eine EtOH-Fällung.

EXPERIMENTELLER TEIL

Bei der Synthese von 5'-Biotin enthaltenen Oligodesoxynukleotiden wurde die terminale DMT-Schutzgruppe durch das Standardprogramm des Geräteherstellers nicht vollständig entfernt. Daher wurde anschließend eine DMT-Entschützung in 80 %iger AcOH und anschließender EtOH-Fällung durchgeführt. Bei einem Trockenziehen an der *SpeedVac* konnte entfiel dieser Schritt, da durch Anreicherung von im Puffer enthaltener AcOH, die DMT-Schutzgruppe bereits abgespalten wurde.

Die Konzentration der synthetisierten Oligodesoxynukleotide wurde mittels UV/Vis-Spektroskopie bei 260 nm (Nanodrop ND-1000 von *PreQlab*) bestimmt und mit dem Extinktionsfaktoren der Basen korrigiert: (dA: 15 L/(mmol·cm), dC: 7 L/(mmol·cm), dG: 12 L/(mmol·cm) und dT: 8 L/(mmol·cm), hmdC: 9 L/(mmol·cm), fdC: 11 L/(mmol·cm), cadC: 7 L/(mmol·cm). Die Identität der synthetisierten Oligodesoxynukleotide wurde mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie bestätigt.

Nach erfolgter präparativer Reinigung durch Umkehrphasen-HPLC und analytischer Charakterisierung wurde das Wasser an einer *SpeedVac* oder an einer Lyophylle entfernt und die Oligodesoxynukleotide bei 0 °C oder -20 °C gelagert.

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

Infrarot-Spektren (IR) von flüssigen und festen Verbindungen wurden mit einem *Bruker IF 25* Spektrometer mit einer ATR-Einheit aufgenommen. Die Wellenzahl wurde in cm^{-1} und die Intensität der Signale wurden mit den Symbolen *ss* (sehr stark), *s* (stark), *m* (mittel), und *w* (schwach) angegeben.

Kernresonanzspektren (^1H -, ^{13}C -, ^{31}P -NMR) wurden bei RT auf den Geräten *Varian Oxford 200*, *Bruker AMX 300*, *Varian XL 400*, *Bruker AMX 500* und *Bruker ARX 600* aufgenommen. Die Messfrequenz (in MHz), die gemessenen Kerne, als auch das verwendete deuterierte Lösungsmittel sind jeweils angegeben. Messungen auf Geräten höherer Frequenz (600 MHz, 800 MHz) wurden durch die NMR-Abteilung der Ludwig-Maximilian-Universität, Department Chemie (Haus F) durchgeführt. Die chemische Verschiebung δ wurde in ppm relativ zum internen Standard TMS angegeben. Die Kopplungskonstante *J* wurde in Hz angegeben. Die Signalmultiplizität wurde mit den Symbolen *s* (Singulett), *d* (Duplett), *t* (Triplett), *q* (Quartett), *m* (Multipllett), oder deren Kombination benannt.

EXPERIMENTELLER TEIL

Lösungsmittel und Chemikalien wurden in höchster Reinheit gekauft und von den Firmen *Fluka*, *Sigma-Aldrich*, *Acros* oder *Merck* bezogen. Trocken erworbenes Lösungsmittel wurde für empfindliche Synthesen zusätzlich entgast. Bidestilliertes Wasser (Impedanz 18.2 M Ω) wurde mit einer *Milli-QPlus-Anlage* der Firma *Millipore* erzeugt. Die Lösungsmittel für Extraktion und Säulenchromatographie waren von technischer Qualität und wurden vor der Verwendung destilliert.

Massenspektrometrie (MS, HRMS) wurde auf dem Spektrometer *Finnigan LTQ-FT* (ESI) oder *Thermo Finnigan MAT 95* (EI) von der MS-Abteilung der Ludwig-Maximilians-Universität, Department Chemie (Haus F) durchgeführt.

MALDI-TOF Spektren wurden an einem *Bruker autoflex II* Unit mit einem *MTP AnchorChip var/384* Target aufgenommen. Vor der Messung wurden die Proben mit einem *MF-Millipore* Membranfilter (0.025 μ M) entsalzt. Entsalzungszeiten waren von dem Molekulargewicht der zu untersuchenden Substanz abhängig (4000 Da: 30 min, 12000 Da: mehrere Stunden).

Als MALDI-Matrix für Oligonukleotide wurde *HPA* (50 mg von 3-Hydroxypicolinic acid, 10 μ l von Krone-5, 10 mg von Ammoniumhydrogencitrat in 500 μ L ddH₂O und 500 μ L MeCN) verwendet. Für die Analyse von kleinen Molekülen wurde eine ATT-Matrix (10 mg von 6-Aza-2-Thiothymin in 500 μ L ddH₂O, 500 μ L MeCN und 0.1% Vol TFA).

Für **Säulenchromatographie** wurde *Kieselgel 60* und *Aluminiumoxid 90 aktiv basisch Aktivitätsstufe III* der Firma *Merck* verwendet.

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

Umkehrphasen-HPLC wurde auf *Waters* Systemen durchgeführt. Bei diesen handelt es sich im Detail um: analytische HPLC: *Waters Alliance* (2695 Separation Module, 2996 Photodiode Array Detector), präparative HPLC: *Waters Breeze* (2487 Dual λ Array Detector, 1525 Binary HPLC Pump). Für analytische HPLC wurden Nucleosil 120-3 C18-Säulen von *Macherey Nagel* und für präparative HPLC wurden Nucleosil 100-7 C18, VP 250/10 C18 und VP 250/32 C18 von *Macherey Nagel* verwendet.

Als Puffersystem wurde, falls nicht anders vermerkt, 0.1 M Triethylammoniumacetat, pH 7, verwendet.

EXPERIMENTELLER TEIL

Puffer A: 0.1 M Triethylammoniumacetat, pH 7, in 100 % H₂O

Puffer B: 0.1 M Triethylammoniumacetat, pH 7, in 20 % H₂O und 80% MeCN

3.1.2. Biochemische Materialien und Methoden

Agarose-Gelelektrophorese: Zur Kontrolle der Polymerase-Kettenreaktion wurden 16 µL der Reaktionslösung mit 4 µL eines 5 × Ladepuffers (*New England BioLabs*) versetzt und mit Hilfe eines 1.5 %igen Agarose-Gels (750 mg Agarose, 50 mL 1 × TAE-Puffer (4.86 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan, 0.744 g Na₂EDTA·2H₂O, 57.1 mL HOAc), 8 µL Ethidiumbromid) in einer Gelapparatur von *PreQlab* mit einer *Power Pak basic* Spannungsquelle von *BioRad* (90 V) mit 0.5 × TAE Laufpuffer für 30 min entwickelt. Zur Visualisierung wurde ein *Raytest Image Documentation Analysis Imager* verwendet.

Antikörpercharakterisierung mittels *Dot Blot*

Die einzelsträngige DNA wurde in unterschiedlichen Konzentrationen auf eine Nylon-Membran aufgebracht und bei 80°C für eine Stunde im Ofen gebacken. Anschließend wurde für eine Stunde in 5 % Magermilch in TBS-T bei Raumtemperatur (TBS mit 0.1 % Tween 20) blockiert und zweimal mit TBS-T und einmal mit TBS gewaschen. Anschließend wurden die zu testenden Antikörperseren in einer 1:2000 bis 1:20000 Verdünnung aufgebracht und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem zweimal mit TBS-T und einmal mit TBS gewaschen wurde, wurde die Membran in einer 1:10000 Verdünnung des sekundären Antikörpers (z.B. HRP-anti-rabbit) in 5% Magermilch in TBS-T für 30 min bis eine Stunde inkubiert. Es war auch möglich über Nacht bei 0°C zu inkubieren. Anschließend wurde zweimal mit TBS-T und einmal mit TBS gewaschen und die Membran mit ECL entwickelt und auf einem LAS3000 *image reader* (*Raytest*) sichtbar gemacht.

Derivatisierung von fC-PCR-Produkten mit dem Hydroxylamin-Reagenz „*Superfly*“

In einem Reaktionsvolumen von 40 µL wurden das PCR-Produkt (500 ng, 12 µL) mit PBS-Puffer, EDTA (0.1 mM) und Hydroxylamin (1.5 mM) in H₂O für 30 min bei 37 °C und 800 rpm in einem Thermomixer (*Eppendorf comfort*) inkubiert. Die Reaktion wurde mit der

EXPERIMENTELLER TEIL

Zugabe von 133 μL einer 2 M-Lösung von 1-Naphthylaldehyd in *iPrOH* (abs.) und weiteren 30 min bei 37 °C und 1400 rpm beendet. Anschließend wurden 6.7 μL einer 3 M-Lösung von NaOAc zugegeben, bei 37 °C und 1400 rpm inkubiert und 133 μL *iPrOH* (abs.) zugegeben. Hiernach wurde die DNA bei 15000 rpm und 10 °C für 30 min mit einer *Eppendorf*-Zentrifuge (5427 R) pelletiert, einmal mit *iPrOH* (75% v/v, 200 μL) und zweimal mit EtOH (75% v/v, 200 μL) gewaschen (15000 rpm, 30 min, 4 °C). Der Überstand wurde abgenommen und das DNA-Pellet wurde ohne Lufttrocknung in 50 μL H_2O aufgenommen und bei -20°C gelagert.

Enzymatische Inkorporation der Triphosphate: Für die Inkorporation der Triphosphate mittels PCR, wurde dessen Einbau in das PGL3_pOct4_eGFP-Plasmid366 (von Prof. Dr. *Heinrich Leonhart*, Ludwig-Maximilians-Universität München zu Verfügung gestellt), das einen Ausschnitt der Oct4-Promotorsequenz beinhaltet, untersucht. Folgende kommerziell erworbene *Primer* (von *Metabion* bezogen) wurden hierbei verwendet:

Forward primer: 5'-d(TCC CGT CCT AAG GGT TGT CCT GTC)-3'

Reverse primer: 5'-d(ACC CTC TAG CCT TGA CCT CTG GC)-3'

Hierdurch wurde ein 150 bp langes DNA-Fragment erzeugt. Thermostable Pyrophosphatasen und natürliche Triphosphate wurden von *New England Biolab* bezogen. KOD XL-Polymerase wurde von *Novagen*, und Vent (exo⁻) von *New England Biolabs* erworben. Polymerase-Ketten-Reaktionen wurden in einem *Eppendorf realplex* Thermocycler im vom jeweiligen Anbieter der Polymerasen empfohlenen Puffer durchgeführt und mit 1 – 1.5 % Agarose Gelen analysiert, die man auf einer horizontal Zelle (Sub-Cell *Bio-Rad*) bei 110 V mit Ethidiumbromid zum Anfärben laufen ließ. Das somit erhaltene PCR-Fragment wurde mit Hilfe eines *Nucleo Spin*[®] clean up Kit von *Machery Nagel* vor der Analyse gereinigt.

Eine typische PCR mit einem Gesamtvolumen von 50 μl enthielt 5 ng des Templates, je 0.25 μM der Primer, 2.5 U KOD XL-Polymerase für caCTP und 2.0 U Vent (exo⁻) für fCTP, 2.0 U der thermostabilen Pyrophosphatase und 200 μM von jedem dNTP (das korrespondierende natürliche dNTP wurde durch das modifizierte Triphosphat ersetzt oder im entsprechenden Verhältnis eingesetzt). Diese Reaktionsmischung wurde nach den folgenden Protokollen inkubiert:

EXPERIMENTELLER TEIL

Tabelle 3.1 PCR Programm für die Amplifizierung von fCTP

Schritt	Dauer	Temperatur
Initiale Denaturierung	2 min	95 °C
30 Zyklen	Denaturierung	15 s
	Primerhybridisierung	15 s
	Elongation	15 s
Finale Elongation	5 min	75 °C

Table 3.2 PCR Programm für die Amplifizierung von caCTP

Schritt	Dauer	Temperatur
Initiale Denaturierung	2 min	95 °C
31 Zyklen	Denaturierung	30 s
	Primerhybridisierung	20 s
	Elongation	15 s
Finale Elongation	5 min	72 °C

Kupplung an Trägerproteine: hmU-Antigene wurden über NHS-Ester an Trägerproteine gekuppelt. Hierzu wurden 1 mg des hmU-Antigens in 200 µL ddH₂O gelöst. Diese Lösung wurde zu 200 µL des Trägerproteins (10 mg/mL) in PBS-Puffer gegeben und für 3 h bei RT inkubiert. Falls sich ein Präzipitat ausbildete, wurde dieses abzentrifugiert. Die Aufreinigung des Konjugats erfolgte mit *Zeba Spin Desalting Columns*, (5 mL, *Thermo Scientific*).

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

Protein pull-down Sonde: Ein Oligonukleotid mit der epigenetischen Modifikation wurde mit einem passendem Gegenstrang, der ein 5'-Biotin und ein 5-Octadienyl-dU enthält hybridisiert. Zu 10 nmol der dsDNA wurden 0.5 µL einer 200 mM Lösung des Crosslinkers in DMSO zugegeben. In einem getrenntem Reaktionsgefäß wurde CuBr in eine TBTA-Lösung (DMSO/tBuOH 3:1, 100 mM) gegeben. Es resultiert ein 1:1 Verhältnis Cu(I):TBTA. Von dieser Suspension wurden 30 µL zu dem DNA/Aizid-Gemisch gegeben. Desweiteren wurden 45 µL DMSO/tBuOH (3:1) zugegeben und die Mischung wurde bei 37°C, 1250 rpm für 3 h inkubiert. Anschließend wurde die DNA durch Ethanol-Präzipitation gefällt.

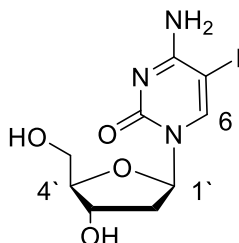
EXPERIMENTELLER TEIL

Verdau der Protein-hmU-Konjugaten: 10 µg Protein wurden in 10 µL ABC ((NH₄)₂CO₃)-Puffer gelöst und mit 2 µL TCEP (1 M) bei 60°C und 400 rpm für 45 min inkubiert. Anschließend wurden 16 µL IAA (55 mM in H₂O) zugegeben und für 30 min im Dunkeln bei RT und 400 rpm inkubiert. Der pH-Wert wurde durch Zugabe von 300 µL TEAB-Puffer (50 mM) auf pH 8 - 9 eingestellt. Das Lösungsmittel wurde an der Lyophylle entfernt und der Rückstand wieder in 80 µL TEAB-Puffer gelöst. Anschließend wurden 5 µL Trypsin (0.2 µg/µL) zugegeben und für 1 h bei RT inkubiert. Vor der massenspektrometrischen Analyse wurden an der Lyophylle eingeeengt und dann über *stage tips* (C18) entsalzt.

3.2 Chemische Synthesevorschriften

3.2.1 Synthese von epigenetischen Triphosphaten

5-Iod-2'-desoxycytidin (**1**)



Zu einer Lösung aus 2'-Desoxycytidin (6.0 g, 26.4 mmol) in DMF (70 mL) wurden Iod (4.0 g, 15.8 mmol, 0.6 eq) und *m*CPBA (77 %, 4.8 g, 27.8 mmol, 1.05 eq) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 2 h bei RT gerührt. Dann wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt durch Säulenchromatographie (DCM/MeOH/H₂O/NH₃ 190:10:0.6:0.6 → 90:10:0.6:0.6) gereinigt. Man erhielt 5-Iod-2'-desoxycytidin **1** (7.42 g, 21.0 mmol) als orangefarbenen Feststoff in einer Ausbeute von 79 %.

$R_f = 0.1$ (DCM/MeOH 10:1)

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 8.28 (s, 1H, C6H), 6.08 (t, ³*J* = 6.4 Hz, 1H, C1'H), 4.20 (dt, ³*J* = 7.1 Hz, ³*J* = 3.7 Hz, 1H, C3'H), 3.80 – 3.76 (m, 1H, C4'H), 3.69 – 3.46 (m, 2H, C5'H₂), 2.14 (ddd, ³*J* = 4.8, ³*J* = 6.3 Hz, ²*J* = 13.7 Hz, 1H, 1x C2'H₂), 2.04 – 1.89 (m, 1H, 1x C2'H₂).

¹³C-NMR (101 MHz, DMSO) δ (ppm) = 163.66 (C4), 153.85 (C2), 147.26 (C6), 87.34 (C4'), 85.24 (C1'), 69.91 (C3'), 60.83 (C5'), 56.49 (C-I), 40.81 (C2').

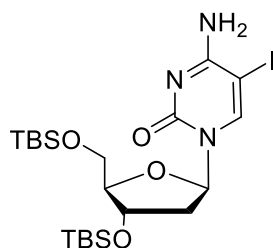
HRMS (ESI+) ber. für C₉H₁₃IN₃O₄⁺ [M+H]⁺: 353.9945, gef.: 353.9944.

Schmelzbereich: 133 – 135 °C (Zersetzung).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3191 (w), 1718 (m), 1642 (s), 1286 (m), 1087 (s), 957 (s), 750 (m).

EXPERIMENTELLER TEIL

5-Iod-3', 5'-(*O*-*tert*-butyl-dimethylsilyl)-2'-desoxycytidin (**2**)



5'-Iod-2'-desoxycytidin **1** (2.0 g, 5.66 mmol) wurde in einer Mischung aus DMF und Pyridin (3:2, 40 mL) gelöst. Imidazol (1.7 g, 25.5 mmol, 4.5 eq.) und TBSCl (2.6 g, 16.9 mmol, 3 eq.) wurden zugegeben und das Reaktionsgemisch für 18 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde in 150 mL EtOAc gelöst und mit 150 mL gesättigter wässriger NaHCO₃-Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit EtOAc (2 x 50 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit gesättigter wässriger NH₄Cl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Nach einer säulenchromatographischen Aufreinigung (DCM/MeOH 40:1) erhielt man 5-Iod-3', 5'-(*O*-*tert*-butyl-dimethylsilyl)-2'-desoxycytidin **2** (2.77 g, 4.76 mmol) als farblosen Feststoff in einer Ausbeute von 84 %.

$R_f = 0.4$ (DCM/MeOH 20:1)

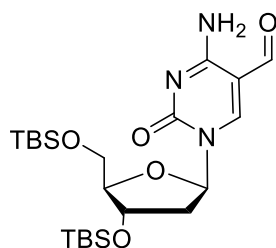
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 8.06 (s, 1H, C6H), 6.25 – 6.19 (m, 1H, C1'H), 4.34 (dt, ³J = 2.9 Hz, ³J = 5.9 Hz, 1H, C3'H), 3.97 (dt, ³J = 2.6 Hz, 1H, C4'H), 3.87 (dd, ³J = 2.6 Hz, ²J = 11.4 Hz, 1H, 1xC5'H₂), 3.74 (dd, ³J = 2.6, ²J = 11.4 Hz, 1H, 1x C5'H₂), 2.44 (ddd, ³J = 3.0 Hz, ³J = 5.9 Hz, ²J = 13.3, 1H, 1xC2'H₂), 2.00 – 1.90 (m, 1H, 1xC2'H₂), 0.92 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 0.87 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 0.13 (s, 3H, SiCH₃), 0.12 (s, 3H, SiCH₃), 0.06 (s, 3H, SiCH₃), 0.05 (s, 3H, SiCH₃).

¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 163.84 (C4), 154.78 (C2), 146.58 (C6), 88.33 (C4'), 86.86 (C1'), 72.32 91 (C3'), 62.96 (C5'), 56.44 (C-I), 42.72 (C2'), 26.25 (3 x SiC(CH₃)₃), 25.85 (3 x SiC(CH₃)₃), 18.59 (SiC(CH₃)₃), 18.09 (SiC(CH₃)₃), -4.49 (SiCH₃), -4.77 (SiCH₃), -5.03 (SiCH₃), -5.15 (SiCH₃);

HRMS (ESI⁺): ber. für C₂₁H₄₁IN₃O₄Si₂⁺ [M+H]⁺: 582.1675, gef.: 582.1683

Schmelzbereich: 196 °C - 198 °C

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 2929 (w), 2857 (w), 1649 (m), 1470 (m), 1256 (m), 1086 (m), 829 (s), 776 (s).

5-Formyl-3', 5'-(*O*-*tert*-butyl-dimethylsilyl)-2'-desoxycytidin (3)

In einem Hochdruckautoklaven wurde 5-Iod-3',5'-(*O*-*tert*-butyl-dimethylsilyl)-2'-desoxycytidin **2** (3.50 g, 6.02 mmol, 1.0 eq), PPh₃ (947 mg, 3.61 mmol, 0.6 eq) und Pd₂(dba)₃·CHCl₃ (623 mg, 0.60 mmol, 0.1 eq) in trockenem Toluol (90 mL) gelöst. Die Reaktionsmischung wurde bei einem CO Druck von 3.5 bar bei 60 °C gerührt. Über eine Spritzenpumpe wurde über ein Septum Bu₃SnH (2.02 mL, 7.22 mmol, 1.2 eq) mit einer Geschwindigkeit von 0.15 mL pro Stunde zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde nach beendeter Zugabe noch für 12 h bei 60 °C gerührt. Das CO-Gas wurde abgelassen und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (*i*Hex/EtOAc 4:1→2:1→1:1) und man erhielt das Produkt **3** (2.50 g, 5.17 mmol) als gelb-orangen Feststoff in einer Ausbeute von 85 %.

R_f = 0.4 (DCM/MeOH 20:1)

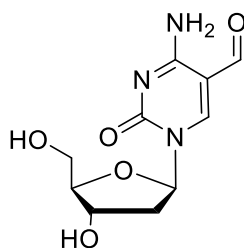
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 9.51 (s, 1H, CHO), 8.57 (s, 1H, C5H), 8.37 (s, 1H, 1xNH₂), 7.46 (s, 1H, 1xNH₂), 6.19 (t, ³J = 6.1 Hz, 1H, C1'H), 4.40 – 4.32 (m, 1H, C3'H), 4.08 – 4.02 (m, 1H, C4'H), 3.95 (dd, ³J = 2.7 Hz, ²J = 11.7 Hz, 1H, 1x C5'H₂), 3.78 (dd, ³J = 2.6 Hz, ²J = 11.6 Hz, 1H, 1x C5'H₂), 2.59 (ddd, ³J = 3.6 Hz, ³J = 5.8 Hz, ²J = 10.3, 1H, C2'H₂), 2.20 – 2.08 (m, 1H, C2'H₂), 0.89 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 0.88 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 0.10 (s, 3H, SiCH₃), 0.08 (s, 6H, SiCH₃), 0.07 (s, 3H, SiCH₃).

¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 187.27 (CHO), 162.83 (C4), 153.41 (C2), 153.11 (C6), 105.11 (C5), 87.88 (C1'), 71.70 (C4'), 62.74 (C5'), 43.09 (C2'), 26.10 (3 x SiC(CH₃)₃), 25.87 (3 x SiC(CH₃)₃), 18.58 (SiC(CH₃)₃), 18.12 (SiC(CH₃)₃), -4.38 (SiCH₃), -4.75 (SiCH₃), -5.11 (SiCH₃), -5.18 (SiCH₃).

HRMS (ESI⁺): ber. für C₂₂H₄₂N₃O₅Si₂⁺ [M+H]⁺: 484.2658, gef: 484.2654.

Schmelzbereich: 150 – 152 °C.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3360 (w), 2953 (w), 2929 (w), 2857 (w), 1651 (s), 1245 (m), 1085 (s), 829 (s), 776 (s).

5-Formyl-2'-deoxy-cytidin (5)

In einem Polypropylenreaktionsgefäß wurde 5-Formyl-3',5'-(*O*-*tert*-butyl-dimethylsilyl)-2'-deoxycytidin **3** (400 mg, 0.83 mmol) in EtOAc (13.5 mL) gelöst. Zusätzlich wurden 0.33 mL Pyridin (4.13 mmol, 5 eq.) zugegeben. Nach der Zugabe von HF·Pyridin (0.26 mL, 12.36 mmol, 15 eq.) wurde für 12 h bei RT gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2.1 mL TMSOMe beendet und für 30 min bei RT gerührt. Der ausgefallene Feststoff wurde abzentrifugiert (4000 rpm, 15 min, 4 °C) und der Überstand abdekantiert. So wurde ohne weitere Aufarbeitung 5-Formyl-2'-desoxy-cytidin **5** (190 mg, 0.74 mmol) als helloranger Feststoff in einer Ausbeute von 89 % gewonnen.

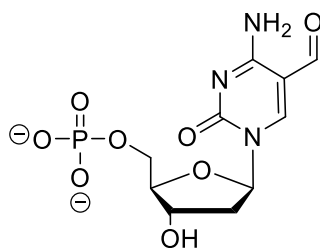
¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ (ppm) = 9.53 (s, 1H, *CHO*), 8.89 (s, 1H, *C6H*), 6.17 (t, ³*J* = 6.0 Hz, 1H, *C1'H*), 4.48 (dt, ³*J* = 4.6, ³*J* = 6.6 Hz, 1H, *C3'H*), 4.09 (dd, ³*J* = 4.6, ³*J* = 8.0 Hz, 1H, *C4'H*), 3.91 (dd, ³*J* = 3.2 Hz, ²*J* = 12.5 Hz, 1H, 1x *C5'H*), 3.84 (dd, ³*J* = 4.3 Hz, ²*J* = 12.5 Hz, 1H, 1x *C5'H*), 2.62 (ddd, ³*J* = 4.8 Hz, ³*J* = 6.5 Hz, ²*J* = 14.1 Hz, 1H, 1x *C2'H*), 2.32 – 2.26 (m, 1H, 1x *C2'H*).

¹³C-NMR (101 MHz, D₂O) δ (ppm) = 190.85 (*CHO*), 163.71 (*C4*), 155.85 (*C2*), 155.58 (*C6*), 106.58 (*C5*), 88.59 (*C1'*), 70.86 (*C4'*), 61.75 (*C5'*), 41.76 (*C2'*).

HRMS (ESI⁺): ber. für C₁₀H₁₄N₃O₅⁺ [M+H]⁺: 256.0928, gef.: 256.0928.

Schmelzbereich: > 250 °C Zersetzung

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3311 (br, w), 2929 (m), 1641 (m), 1507 (w), 1063 (s), 957 (m), 784 (m).

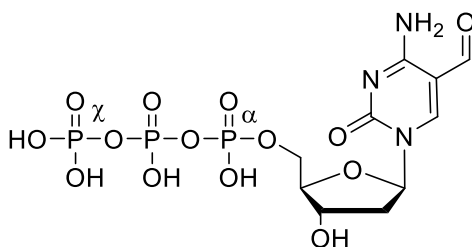
5-Formyl-2'-desoxycytidin-5'-monophosphat (8)

Als Vorbereitung für die Reaktion wurde Protonenschwamm am Hochvakuum über Nacht getrocknet und Trimethylphosphat für mehr als 14 h über Molsieb gerührt. 5-Formyl-2'-desoxycytidin **5** (13 mg, 0.051 mmol, 1.0 eq.) und Protonenschwamm (16.4 mg, 0.076 mmol, 1.5 eq.) wurden in trockenem Trimethylphosphat (1 mL) gelöst. Die Lösung wurde auf 0 °C gekühlt und frisch destilliertes Phosphoroxychlorid (5.4 µL, 0.061 mmol, 1.2 eq.) zugegeben. Nach 3 h Rühren wurde die Reaktion durch Zugabe von Triethylammoniumbicarbonatpuffer (3 mL, pH 8) beendet. Durch Reinigung mit RP-HPLC (0 → 20 % B in 45 min) wurde das 5'-Monophosphat **8** als farbloses Triethylammoniumsalz (4.9 mg, 0.014 mmol, 29 %) gewonnen.

¹H-NMR (200 MHz, D₂O): δ (ppm) = 9.49 (s, 1H, CHO), 8.79 (s, 1H, C6H), 6.17 (t, *J* = 6.1 Hz, 1H, C1'H), 4.39–4.42 (m, 1H, C3'H), 4.10–4.12 (m, 1H, C4'H), 3.71–3.87 (m, 2H, C5'H₂), 2.24–2.61 (m, 1H, 1x C2'H₂), 2.39–2.46 (m, 1H, 1x C2'H₂).

³¹P-NMR (162 MHz, D₂O, protonenentkoppelt): δ (ppm) = 0.2 (s)

HRMS (ESI⁻): ber. für C₁₀H₁₃O₈N₃P⁻ [M-H]⁻: 334.0446, gef.: 334.0449.

5-Formyl-2'-desoxycytidin-5'-triphosphat (10)

Trockenes Tributylamin (13 µL, 56 µmol, 4.7 eq.) und nach einer Vorschrift von *Mohamady et al.*^[101] hergestelltes 1-Methyl-3-benzol-sulfonylimidazoliumtriflat (5.3 mg, 14 µmol, 1.2 eq.) wurden zu einer Lösung aus 5-Formyl-2'-desoxy-cytidin-5'-monophosphat **8** (4 mg, 12.0 µmol, 1.0 eq.) in trockenem DMF (0.45 mL) bei 0 °C gegeben. Die erhaltene gelbliche

EXPERIMENTELLER TEIL

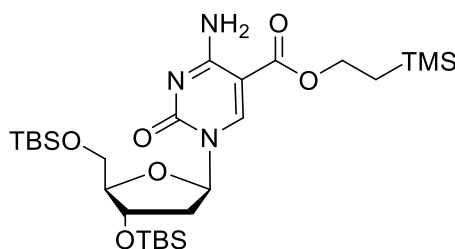
Lösung wurde zu TBA-Pyrophosphat (8.7 mg, 24 μmol , 2.0 eq.) in trockenem DMF (0.45 mL) gegeben. Das Eisbad wurde entfernt und die Reaktionsmischung für 3 h bei RT gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von Triethylammoniumacetatpuffer (1 M, pH 7) beendet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Das Triphosphat wurde durch Ionenaustauschchromatographie mit einem Gradient von 100 % Wasser auf Triethylammoniumbicarbonatpuffer (0.5 M, pH 7.5) unter Verwendung einer DEAE-Cellulose Säule bei 4 °C gereinigt. Eine weitere Ionenaustauschchromatographie (0.1 M, 1 M TEAB, 0-100% TEAB in 30 min) unter Verwendung einer MonoQ 5/50 GL Anionenaustausch-Säule (GE) erhielt man fCTP **10** als farblosen Feststoff in Form des Triethylammoniumsalz (4.3 mg, 8.4 μmol , 70 % über UV-Vis bestimmt).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O): δ (ppm) = 9.53 (s, 1H, *CHO*), 8.74 (s, 1H, *C6H*), 6.11 (t, $^3J=5.9$ Hz, 1H, *C1'H*), 4.48 – 4.58 (m, 1H, *C3'H*), 4.13–4.19 (m, 3H, *C4'H*, *C5'H₂*), 2.26 – 2.46 (m, 2H, *C2'H₂*);

$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, D_2O , ppm): δ (ppm) = -10.5 (m, P_γ), -11.7 (d, $J=19.8$ Hz, P_α), -23.3 (t, $J=16.4$ Hz, P_β);

HRMS (ESI⁻): ber. für $\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{P}_3\text{O}_{14}$ [M-H]⁻: 493.9927, gef.: 493.9920.

5-(2-(Trimethylsilyl)ethoxycarbonyl)-3',5'-(*O-tert-butyl-dimethylsilyl*)-2'-desoxycytidin (15)



Ein Hochdruck-Glasautoklav wurde mit 5-Iod-3',5'-(*O-tert-butyl-dimethylsilyl*)-2'-desoxycytidin **2** (1.0 g, 1.72 mmol, 1.00 eq.) und $\text{PdCl}_2(\text{MeCN})_2$ (49 mg, 0.19 mmol, 11 mol-%) befüllt. Anschließend wurden DIPEA (0.6 mL, 3.44 mmol, 2.0 eq.) und TMSEtOH (10.0 mL, 8.25 g, 69.7 mmol, 40.5 eq.) hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde auf 3.5 bar CO-Druck gesetzt und für 24 h auf 60 °C erhitzt. Eine Verfärbung der Reaktionslösung von orange nach schwarz, die die Reduktion des Katalysators indiziert, konnte beobachtet werden. Die

EXPERIMENTELLER TEIL

Reaktion wurde am nächsten Tag gestoppt, das Reaktionsgefäß belüftet und die Reaktionslösung auf Kieselgel aufgetragen. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (*i*-Hex/EtOAc, 4:1 → 2:1) und das geschützte 5-Carboxy-2'-desoxycytidin-Derivat **15** wurde als gelber Feststoff (472 mg, 0.789 mmol) in einer Ausbeute von 46 % isoliert.

$R_f = 0.4$ (DCM/MeOH 10:1)

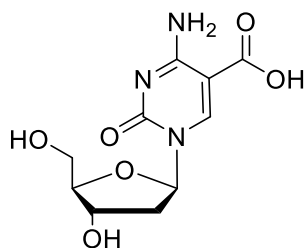
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 8.57 (s, 1H, C6H), 7.95 (d, ²J = 4.2 Hz, 1H, NH), 6.16 (dd, ³J = 7.2 Hz, ³J = 5.8 Hz, 1H, C1'H), 5.82 (s, 1H, NH), 4.39 – 4.20 (m, 3H, CO-O-CH₂-CH₂-Si, C3'H), 4.06 (q, ³J = 6.0 Hz, 1H, C4'H), 3.76 (d, ³J = 3.7 Hz, 2H, C5'H), 2.64 (ddd, ²J = 13.7 Hz, ³J = 5.8 Hz, ³J = 2.3 Hz, 1H, 1 x C2'H), 1.95 (ddd, ²J = 13.6 Hz, ³J = 5.9 Hz, ³J = 2.3 Hz, 1H, 1x C2'H), 1.08 – 1.04 (m, 2H, CO-O-CH₂-CH₂-Si), 0.87 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 0.85 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 0.06 – 0.05 (m, 18H, CH₂SiC(CH₃)₃, SiCH₃), 0.03 (s, 3H, SiCH₃).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 165.65 (C4), 164.16 (COO), 154.68 (C2), 147.93 (C6), 95.89, 89.40 (C1'), 88.65 (C4'), 73.52 (C3'), 63.94 (CO-O-CH₂), 63.86 (C5'), 43.19 (C2'), 26.39 (3C (CCH₃)), 26.31 (3C (CCH₃)), 18.84, 18.58, 18.28, -0.99 (3C, SiCH₃), -4.08 (SiCH₃), -4.89 (SiCH₃), -5.03 (SiCH₃).

HRMS (ESI+): ber. für C₂₇H₅₄N₃O₆Si₃⁺ [M+H]⁺: 600.3315, gef: 600.3308.

Schmelzbereich: 190 - 192 °C

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3293 (w), 2937 (m), 2863 (w), 1733 (s), 1446 (m), 1433 (m), 1371 (w), 1330 (w), 1299 (w), 1252 (m), 1195 (s), 1170 (s), 1151 (s), 1077 (m), 1053 (m), 978 (w), 927 (w), 848 (w), 750 (m), 628 (s).

5-Carboxy-2'-desoxycytidin (7)

In einem 50 mL Schlenkkolben wurde das TBS-geschütztes TMS-Carboxycytidin **15** (200 mg, 340 μmol , 1.0 eq.) in 20 mL DCM gelöst. Eine Lösung von TBAF in THF (1 M, 1 mL, 1.0 mmol, 3 eq.) wurde hinzuge tropft und die Reaktionslösung bei RT gerührt. Nach 4 h wurden weitere 0.5 mL (0.5 mmol, 1.5 eq.) TBAF hinzuge tropft und die Reaktionslösung für eine weitere Stunde bei RT gerührt. Durch Zugabe von TMSOMe (2 mL, 14.5 mmol, 44 eq.) wurde die Reaktion gestoppt und nochmals für 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösemittel wurde *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt mittels RP-HPLC gereinigt (0 \rightarrow 25 % MeCN, 0.1 % AcOH). Nach Entfernen des Lösungsmittels an der Lyophylle wurde 5-Carboxy-2'-desoxycytidin als farbloser Feststoff **7** (37.7 mg, 140 μmol , 41 %) erhalten.

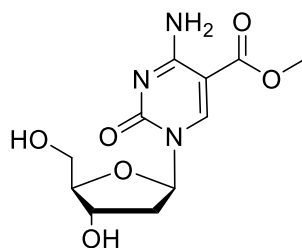
$R_f = 0.1$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 10:1)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O) δ (ppm) = 8.81 (s, 1H, C6H), 6.30 (t, $^3J = 6.23$ Hz, 1H, C1'H), 4.54 – 4.50 (m, 1H, C4'H), 4.18 – 4.15 (m, 1H, C3'H), 3.92 (dd, $^2J = 12.65$ Hz, $^3J = 3.42$ Hz, 2H, C5'H₂), 2.60 – 2.40 (m, 2H, C2'H₂).

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, D_2O): δ (ppm) = 167.9 (CO-O), 159.6 (C4), 149.7 (C2), 148.2 (C6), 101.2 (C5), 87.2 (C4'), 86.9 (C1'), 70.1 (C3'), 60.8 (C5'), 39.5 (C2').

HRMS (ESI⁻): ber. für $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_3\text{O}_6^-$ $[\text{M}-\text{H}]^-$: 270.0732, gef: 270.0732.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3254 (m), 2934 (m), 1718 (s), 1653 (m), 1540 (m), 1437 (s), 1363 (s), 1279 (s), 1235 (m), 1198 (s), 1090 (s), 1050 (ss), 995 (s), 869 (m), 783 (s), 758 (s), 732 (s), 684 (ss);

5-Carboxymethyl-2'-desoxycytidin (6)

In einem Polypropylengefäß wurde 5-Carboxymethyl-3',5'-(*O*-*tert*-butyl-dimethylsilyl)-2'-desoxycytidin (266 mg, 520 μ mol, 1.0 eq.) in 30 mL EtOAc gelöst und HF·Pyridin (70% HF, 270 μ L, 7.80 mmol, 5.7 eq.) zugegeben. Nach Rühren für 14 h bei Raumtemperatur wurde zusätzliches HF·Pyridin (100 μ L, 1.10 mmol, 2.0 eq.) zugegeben und die Reaktionsmischung für 5 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von TMSOMe (2.0 mL, 14.0 mmol, 27.0 eq.) beendet. Nach Rühren für 30 min bei Raumtemperatur wurde der ausgefallene Feststoff durch Zentrifugation (4500 rpm, 0°C, 20 min) gesammelt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (DCM/MeOH, 10:1 \rightarrow 4:1) gereinigt und 5-Carboxymethyl-2'-desoxycytidin **7** konnte als farbloser Feststoff (109 mg, 380 μ mol, 73%) gewonnen werden.

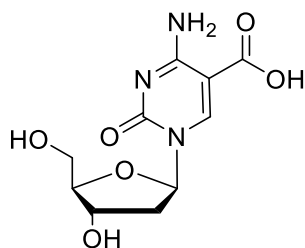
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ (ppm) = 9.13 (s, 1H, C6H), 6.19 (t, $J = 5.9$ Hz, 1H, C1'H), 4.36 – 4.39 (m, 1H, C3'H), 4.06 (q, $J = 6.8$ Hz, C4'H), 3.92 – 3.88 (m, 5H, C5'H₂, OCH₃), 2.44 – 2.49 (m, 1H, C2'H), 2.18 – 2.25 (m, 1H, C2'H₂).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD) δ (ppm) = 166.6 (COO), 165.2 (C4), 156.5 (C2), 149.9 (C6), 96.9 (C5), 89.2 (C1'), 88.5 (C4'), 71.2 (C3'), 62.28 (C5'), 52.4 (OCH₃), 42.6 (C2').

HRMS (ESI⁺): ber. für $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_6$, $[\text{M}+\text{H}]^+$: 286.1034, gef.: 286.1032.

Schmelzbereich: 160 – 170 °C.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3402 (m), 2924 (m), 1712 (s), 1632 (ss), 1501 (s), 1438 (s), 1319 (s), 1256 (s), 1191 (s), 1092 (ss), 1059 (ss), 991 (s), 991 (s), 870 (m), 790 (ss), 721 (s), 693 (s).

5-Carboxyl-2'-deoxycytidin (7)

5-Carboxymethyl-2'-desoxycytidin **6** (139 mg, 487 μmol , 1.0 eq.) wurde in einer Mischung aus Wasser (7.2 mL) und MeCN (38.0 mL) gelöst. LiOH (139 mg, 5.8 mmol, 12.0 eq.) wurde zugegeben und die Reaktionsmischung für 19 h bei RT gerührt. Der pH-Wert der Reaktionslösung wurde mit 2 M HCl auf pH 4 eingestellt, wobei das entschützte Produkt als fäbloser Feststoff **7** (58 mg, 210 μmol , 44 %) ausfiel und isoliert werden konnte.

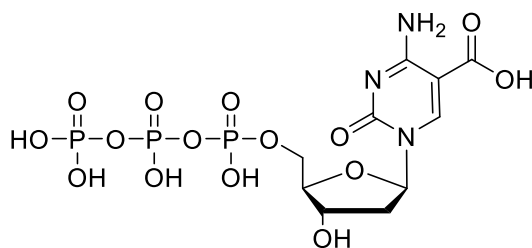
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O): δ (ppm) = 8.81 (s, 1H, C6H), 6.30 (t, $J = 6.2$ Hz, 1H, C1'H), 4.51 – 4.53 (m, 1H, C3'H), 4.18 – 4.15 (m, 1H, C4'H), 3.92 (dd, $J = 12.7$ Hz, 3.4 Hz, 2H, C5'H₂), 2.60 – 2.40 (m, 2H, C2'H₂).

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, D_2O): δ (ppm) = 167.9 (CO-O), 159.6 (C4), 149.7 (C2), 148.2 (C6), 101.2 (C5), 87.2 (C4'), 86.9 (C1'), 70.1 (C3'), 60.8 (C5'), 39.5 (C2').

HRMS (ESI⁻): ber. für $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_3\text{O}_6^-$ [M-H]⁻: 270.0732, gef.: 270.0732.

Schmelzbereich: > 250 °C (Zersetzung)

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3254 (m), 2934 (m), 1718 (s), 1653 (m), 1540 (m), 1437 (s), 1363 (s), 1279 (s), 1235 (m), 1198 (s), 1090 (s), 1050 (ss), 995 (s), 869 (m), 783 (s), 758 (s), 732 (s), 684 (ss).

5-Carboxyl-2'-desoxycytidin-5'-triphosphat (14)

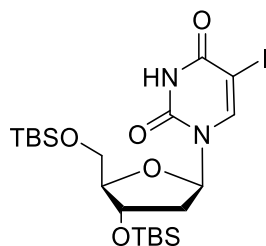
Als Vorbereitung für die Reaktion wurden Tributylammoniumpyrophosphat und das Nucleosid **7** über Nacht am Hochvakuum getrocknet und Tributylamin über Nacht über Molsieb (3 Å) gerührt. Das Reagenz 2-Chloro-1,3,2-Benzodioxaphosphorin-4-on wurde für eine Stunde am Hochvakuum getrocknet.

TBA-Pyrophosphat (37.5 mg, 80 μmol , 2.0 eq.) wurde in trockenem DMF (0.10 mL) gelöst und Tributylamin (0.15 mL) wurde zugegeben. Die erhaltene Mischung wurde zu 2-Chloro-1,3,2-Benzodioxaphosphorin-4-on (16.0 mg, 80 μmol , 2.0 eq.) in DMF (0.11 mL) gegeben. Nach 30 min Rühren bei RT wurde diese Lösung zu 5-Carboxyl-2'-desoxycytidin (10.5 mg, 38.4 μmol , 1.0eq.) zugegeben. Nach Rühren bei RT für 2.5 h wurde eine Lösung aus 3 % Iod in einem Pyridin/Wasser-Gemisch (9:1, ca. 0.3 mL) zutitriert und bei RT für 1.5 h gerührt. Anschließend wurden 2 mL Wasser zugegeben. Das Rohprodukt wurde durch Zugabe einer 3 M NaCl-Lösung (0.8 mL) und Ethanol (15 mL) bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 14 h gefällt. RP-HPLC Reinigung (0 \rightarrow 15 % B in 75 min) ergab caCTP **14** als farblosen Feststoff (1.5 mg, 2.7 μmol , 8 %) in Form eines Triethylammoniumsalzes.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O): δ (ppm) = 8.32 (s, 1H, C6H), 6.11 (t, $J=5.6$ Hz, 1H, C1'H), 4.46 – 4.47 (m, 1H, C3'H), 4.29 – 4.23 (m, 3H, C4'H, C5'H₂), 2.52 – 2.39 (m, 2H, C2'H₂).

$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, D_2O): δ (ppm) = -10.1 (d, $J = 19.6$ Hz, P_γ), -11.4 (d, $J = 19.8$ Hz, P_α), -23.4 (t, $J = 19.8$ Hz, P_β).

HRMS (ESI⁺): ber. für $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{P}_3\text{O}_{15}^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 511.9867, gef.: 511.9861.

5-Iod-3',5'-(*O*-*tert*-butyl-dimethylsilyl)-2'-desoxyuridin (18)

5-Iod-2'-desoxyuridin (5.00 g, 14.1 mmol, 1.0 eq.) wurde in 45 mL Pyridin gelöst und Imidazol (4.33 g, 63.5 mmol, 4.5 eq) und TBSCl (6.46 g, 42.3 mmol, 3.0 eq.) zugegeben. Die Reaktion wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand in 200 mL DCM gelöst. Die organische Phase wurde mit einer gesättigten NaHCO₃-Lösung (3 x 130 mL) und mit einer gesättigten NH₄Cl-Lösung (3 x 130 mL) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH 60:1 → 30:1 → 15:1) wurde das Produkt **18** als farbloser Feststoff (8.11 g, 13.9 mmol, 99 %) erhalten.

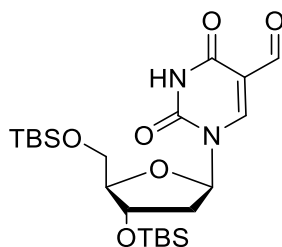
$R_f = 0.7$ (DCM/MeOH 20:1)

¹H-NMR (599 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 10.49 (br. s, 1H, NH), 8.00 (s, 1H, C6H), 6.20 (t, ³J = 6.2 Hz, 1H, C1'H), 4.33 (m, 1H, C3'H), 3.90 (d, ³J = 2.3 Hz, 1H, C4'H), 3.81 (dd, ²J = 11.5 Hz, ³J = 2.4 Hz, 1H, C5'H), 3.69 (dd, ²J = 11.5 Hz, ³J = 2.3 Hz, 1H, C5'H), 2.25 (m, 1H, C2'H), 1.94 (m, 1H, C2'H), 0.82 – 0.87 (m, 18 H, SiC(CH₃)₃), 0.01 – 0.09 (m, 12 H, 2 x Si(CH₃)₂)

¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 160.5 (C4), 150.3 (C2), 144.2 (C6), 88.3 (C4'), 85.7 (C1'), 72.4 (C3'), 68.7 (C5), 63.0 (C5'), 41.9 (C2'), 25.7 (Si(CCH₃)₃), 26.1 (Si(CCH₃)₂), 17.9 (SiC_{tert}), 18.4 (SiC_{tert}), -5.5 (Si(CH₃)₂), -3.6 (Si(CH₃)₂)

HRMS (ESI⁻): ber. für C₂₁H₃₈O₅N₂Si₂⁻ [M-H]⁻: 581.1369, gef.: 581.1354.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3173 (vw), 3060 (vw), 2952 (m), 2927 (m), 2884 (w), 2855 (w), 1697 (m), 1609 (w), 1471 (w), 1462 (w), 1442 (w), 1388 (vw), 1361 (vw), 1320 (vw), 1274 (w), 1254 (m), 1195 (vw), 1122 (w), 1103 (m), 1069 (m), 1028 (w), 1005 (w), 968 (w), 938 (vw), 918 (vw), 810 (vs), 813 (m), 775 (s), 733 (vw), 703 (vw), 668 (w).

5-Formyl-3',5'-(O-tert-butyl-dimethylsilyl)-2'-desoxyuridin (19)

In einem mit CO-Gas gespülten Hochdruck-Glasautoklaven wurden $\text{Pd}_2(\text{dba})_3 \cdot \text{CHCl}_3$ (0.62 g, 0.6 mmol, 0.1 eq) und PPh_3 (0.95 g, 3.6 mmol, 0.6 eq) vorgelegt. TBS-geschütztes 5-Iod-2'-desoxyuridin **18** (3.50 g, 6.0 mmol, 1.0 eq) wurde in 15 mL Toluol gelöst zugegeben. Bei einem CO-Druck von 3.5 bar wurde der Reaktionsansatz bei 65 °C gerührt, während mit einer Spritzenpumpe Bu_3SnH (2 mL, 2.20 g, 7.6 mmol, 1.3 eq.) durch ein Septum zugetropft wurde. Die Zutropfgeschwindigkeit betrug 0.15 mL pro Stunde. Nach vollständiger Zugabe wurde die Reaktionslösung für 12 h bei 65 °C gerührt. Das CO-Gas wurde ausgelassen und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (*i*Hex/EtOAc 10:1 → 8:1 → 4:1 → 1:1) und das Produkt **19** als oranger Feststoff (2.59 g, 5.3 mmol) in einer Ausbeute von 89 % isoliert.

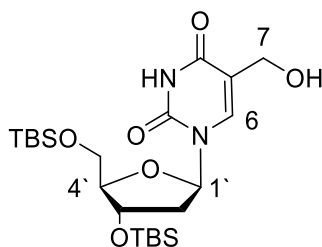
$R_f = 0.3$ (*i*Hex/EtOAc 3:1)

$^1\text{H-NMR}$ (599 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 9.99 (s, 1H, CHO), 8.52 (s, 1H, C6H), 6.21 (t, $^3J = 6.7$ Hz, 1H, C1'H), 4.39 (m, 1H, C3'H), 4.04 (s, 1H, C4'H), 3.81 (d, $^2J = 11.5$ Hz, 1H, C5'H), 3.76 (d, $^2J = 11.6$ Hz, 1H, C5'H), 2.43 (dd, $^2J = 13.3$ Hz, $^3J = 5.7$ Hz, 1H, C2'H), 2.04 (m, 1H, C2'H), 0.86 – 0.88 (m, 18H, 2 x $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$), 0.06 – 0.09 (m, 12H, 2 x $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 185.7 (CHO), 162.44 (C6), 150.3 (C2), 145.4 (C4), 110.9 (C5), 89.1 (C4'), 87.1 (C1'), 72.8 (C3'), 63.0 (C5'), 42.4 (C2'), 25.7 ($\text{Si}(\text{CCH}_3)_3$), 25.9 ($\text{Si}(\text{CCH}_3)_3$), 18.0 (SiC_{tert}), 18.4 (SiC_{tert}), -5.7 ($\text{Si}(\text{CH}_3)_2$), -4.7 ($\text{Si}(\text{CH}_3)_2$).

HRMS (ESI⁻): ber. für $\text{C}_{22}\text{H}_{39}\text{O}_6\text{N}_2\text{Si}_2^-$ $[\text{M}-\text{H}]^-$: 483.2352, gef.: 483.2343.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3176 (w), 3039 (w), 2954 (m), 2930 (m), 2886 (w), 2856 (m), 1725 (m, (C=O)), 1676 (s), 1604 (m), 1591 (m), 1472 (m), 1462 (m), 1437 (w), 1392 (w), 1375 (w), 1360 (w), 1346 (w), 1323 (w), 1280 (m), 1255 (m), 1196 (w), 1160 (w), 1142 (w), 1120 (w), 1092 (m), 1071 (m), 1032 (m), 1005 (m), 986 (w), 963 (m), 932 (w), 903 (w), 886 (w), 829 (s), 814 (vs), 776 (s), 719 (w), 671 (w)

5-Hydroxymethyl-3',5'-(*O*-*tert*-butyl-dimethylsilyl)-2'-desoxyuridin (20**)**

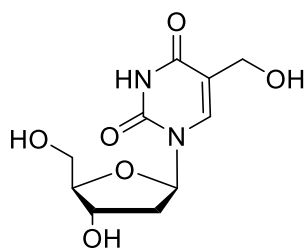
Zu einer gelben Lösung von TBDMS-5fdU **19** (1.65 g, 3.4 mmol, 1.0 eq) und $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (4.62 g, 12.4 mmol, 3.7 eq) in MeOH (trocken, 30 mL) wurde im Argon-Gegenstrom NaBH_4 (0.16 g, 4.1 mmol, 1.2 eq) bei 0°C zugegeben. Nach 10 min Rühren bei 0°C wurde die Reaktion durch Zugabe einer gesättigten NH_4Cl -Lösung beendet. Die Reaktionsmischung wurde mit EtOAc (3×100 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit gesättigter NH_4Cl -Lösung (2×200 mL) gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Anschließend wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer und am Hochvakuum entfernt. Das erhaltene gelbliche Öl wurde auf Kieselgel gegeben und über Säulenchromatographie gereinigt (*i*Hex/EtOAc 8:1 \rightarrow 1.5:1 \rightarrow 1:1). TBDMS-5hmdU **20** konnte als farbloser Feststoff (0.33 g, 0.7 mmol) in einer Ausbeute von 21 % erhalten werden.

$R_f = 0.2$ (*i*Hex/EtOAc 1:1)

$^1\text{H-NMR}$ (599 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 10.24 (br s, 1H, **NH**), 7.63 (s, 1H, **C6H**), 6.25 (t, $^3J = 6.8$ Hz, 1H, **C1'H**), 4.36 (m, 1H, **C7H₂**), 4.35 (m, 1H, **C3'H**), 4.28 (dd, $^2J = 12.9$ Hz, $^3J = 5.6$ Hz, 1H, **C7H₂**), 3.89 (d, $^3J = 2.3$ Hz, 1H, **C4'H**), 3.80 (dd, $^2J = 11.3$ Hz, $^3J = 2.5$ Hz, 1H, **C5'H**), 3.72 (m, $^2J = 11.2$ Hz, $^3J = 2.1$ Hz, 1H, **C5'H₂**), 3.55 (br s, 1H, OH), 2.25 (m, 1H, **C2'H**), 1.99 (m, 1H, **C2'H**), 0.83 – 0.87 (m, 18H, 2 x $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$), 0.02 – 0.05 (m, 12H, 2 x $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 164.3 (**C4**), 150.3 (**C2**), 137.4 (**C6**), 113.9 (**C5**), 87.8 (**C4'**), 85.2 (**C1'**), 72.1 (**C3'**), 62.9 (**C5'**), 58.4 (**C7**), 41.3 (**C2'**), 25.7 ($\text{Si}(\text{CCH}_3)_3$), 25.9 ($\text{Si}(\text{CCH}_3)_3$), 17.9 (SiC_{tert}), 18.4 (SiC_{tert}), -5.5 ($\text{Si}(\text{CH}_3)_2$), -4.7 ($\text{Si}(\text{CH}_3)_2$).

HRMS (ESI⁻): ber. für $\text{C}_{22}\text{H}_{41}\text{O}_6\text{N}_2\text{Si}_2^-$ [$\text{M}-\text{H}$]⁻: 485.2509, gef.: 485.2501.

5-Hydroxymethyl-2'-desoxy-uridin (21)

TBDMS-5hmdU **20** (0.33 g, 0.7 mmol, 1.0 eq) wurde in 10 mL EtOAc in einem Polypropylengefäß gelöst und mit HF·Pyridin (70 %, 318 μ L, 17.5 mmol, 24.9 eq.) versetzt. Die Reaktion wurde für 16 h bei Raumtemperatur gerührt und durch Zugabe von TMSOMe (2 mL, 14.5 mmol, 20.0 eq.) beendet. Das Rohprodukt wurde über RP-HPLC (0 \rightarrow 25% MeCN in 45 min) aufgereinigt. Das hmdU-Nukleosid **21** (103 mg, 0.4 mmol) konnte als farbloser Feststoff in einer Ausbeute von 54 % erhalten werden.

R_t = 25.1 min (0 \rightarrow 25 % MeCN in 45 min)

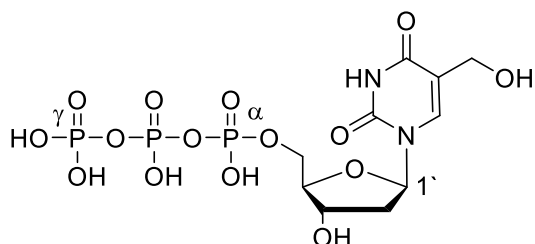
$^1\text{H-NMR}$ (599 MHz, D_2O): δ (ppm) = 7.92 (s, 1H, C6H), 6.32 (t, $^3J = 6.7$ Hz, 1H, C1'H), 4.51 (m, 1H, C3'H), 4.40 (s, 2 H, C7H₂), 4.08 (m, 1H, C4'H), 3.89 (dd, $^2J = 12.5$ Hz, $^3J = 3.5$ Hz, 1H, C5'H), 3.80 (dd, $^2J = 12.5$ Hz, $^3J = 4.9$ Hz, 1 H, C5'H), 2.43 (m, 2 H, C2'H₂).

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, D_2O): δ (ppm) = 164.9 (C4), 151.5 (C2), 139.5 (C6), 113.6 (C5), 86.6 (C4'), 85.4 (C1'), 70.3 (C3'), 61.1 (C5'), 56.5 (C7), 38.7 (C2').

HRMS (ESI⁻): ber. für $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{O}_6\text{N}_2^-$ [M-H]⁻: 257.0779, gef.: 257.0774.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3432 (w), 3275 (br, s), 2932 (w), 1695 (s), 1683 (s), 1463 (m), 1273 (m), 1211 (m), 1077 (s), 1001 (s), 917 (m).

Schmelzbereich: 186 - 187 °C

5-Hydroxymethyl-2'-desoxy-uridin-5'-triphosphat (22)

Als Vorbereitung wurden über Nacht ausreichende Mengen des Nucleosids hmU, TBA-Pyrophosphat und 2-Chlor-1,3,2-benzodioxaphosphorin-4-on getrocknet. TBA wurde über Nacht über Molsieb (3 Å) getrocknet

TBA-Pyrophosphat (231 mg, 0.26 mmol, 1.0 eq.) wurde in 1.24 mL trockenem DMF gelöst und 0.8 mL des getrockneten Tributylamin zugegeben. Diese Mischung wurde zu 2-Chlor-1,3,2-benzodioxaphosphorin-4-on (92 mg, 0.45 mmol, 2.0 eq.) in 1.24 mL DMF gegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 30 min bei RT gerührt. Getrocknetes hmdU **21** (59 mg, 0.23 mmol, 1.0 eq.) wurde in 0.5 mL DMF vorgelegt und mit 2.39 mL der angesetzten Reaktionslösung versetzt. Nach 2 h Rühren bei RT wurde der Reaktionsansatz mit einer 3 %-igen Lösung von Iod in Pyridin/H₂O 9:1 titriert, bis keine Entfärbung mehr eintrat (ca. 1.5 mL). Anschließend erfolgte die Zugabe von 4.72 mL ddH₂O und nach 1 h Rühren bei RT wurden 1/10 Vol. NaCl-Lsg. (3 M) und 3 Vol. abs. EtOH hinzugefügt und das Triphosphat bei -80 °C für 10 h gefällt. Nach Zentrifugation des Niederschlages bei 4°C und 4000 rpm für 15 min wurde der Überstand abdekantiert und der Niederschlag an der Lyophylle getrocknet.

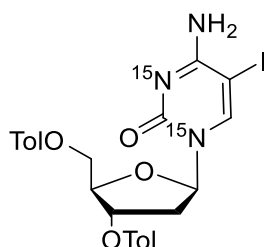
Nach Aufreinigung mittels Umkehrphasen-HPLC (0 → 6 % Puffer B in 45 min) wurde das Triphosphat **22** als farblose Feststoff in Form eines Tetrakis(triethylammonium)-Salz erhalten.

$R_t = 24.0$ min (0 → 10% Puffer B in 45 min).

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ (ppm) = 8.03 (s, 1H, C6H), 6.38 (t, ³J = 6.8 Hz, 1H, C1'H), 4.72 (s, 1H, C3'H), 4.43 (s, 2 H, C7H₂), 4.26 (m, 3H, C4'H, C5'H₂), 2.44 (m, 2 H, C2'H₂).

³¹P-NMR (162 MHz, D₂O): δ (ppm) = -10.81 (d, J = 19.9 Hz, P_γ), -11.62 (d, J = 20.2 Hz, P_α), -23.4 (t, J = 20.0 Hz, P_β).

HRMS (ESI⁻): ber. für C₁₀H₁₆O₁₅N₂P₃⁻ [M-H]⁻: 496.9769, gef.: 496.9762.

3.2.2 Synthese von ^{15}N -markierten epigenetischen Bausteinen3',5'-(Toluoyl)-5-iodo-2'-deoxy-(N^1 , N^3 - ^{15}N)-cytidin (**31**)

In einem Schlenkkolben wurden 60 mL MeCN und Triazol (1.80 g, 26.09 mmol, 9.0 eq.) vorgelegt und im Ultraschallbad gelöst. Die Lösung wurde auf 0 °C abgekühlt. Dann wurden POCl_3 (0.53 mL, 0.90 g, 5.80 mmol, 2.0 eq.) unter Rühren zugegeben, wobei sich ein farbloser Niederschlag bildete. Im Anschluss wurde frisch destilliertes NEt_3 (3.23 mL, 2.52 g, 24.92 mmol, 8.6 eq.) tropfenweise zugegeben und für weitere 20 min bei 0 °C gerührt. Dann wurden 3',5'-(Toluoyl)-5-Iod-2'-deoxy-(N^1 , N^3 - ^{15}N)-uridin **30** (1.71 g, 2.90 mmol, 1.0 eq.), das nach einer Vorschrift von *Schießer et al.* synthetisiert wurde,^[24a] zugegeben und bei RT über Nacht gerührt. Zur gelben Lösung wurde NEt_3 (2.25 mL, 1.76 g, 17.38 mmol) und H_2O (0.87 mL) zugegeben und es wurde für weitere 10 min bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde zweimal mit DCM (2 x 150 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit einer eisgekühlten Mischung aus gesättigter NaHCO_3 -Lösung und gesättigter NaCl -Lösung (1:1, 150 mL) gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt in 50 mL Dioxan gelöst. Dazu wurde konzentrierter NH_4 (aq) (13.52 mL) gegeben und für 10 min bei RT gerührt. Nach Zugabe von gesättigter NH_4Cl -Lösung wurde die Reaktionsmischung mit DCM (1 x 200 mL) extrahiert und die organische Phase über MgSO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und das erhaltene Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (DCM/MeOH, 100:1 \rightarrow 60:1) aufgereinigt. Man erhielt 3',5'-(Toluoyl)-5-Iod-2'-deoxy-(N^1 , N^3 - ^{15}N)-cytidin **31** (1.22 g, 2.12 mmol) als farblosen Feststoff in einer Ausbeute von 73 %.

$R_f = 0.42$ (DCM/MeOH, 20:1).

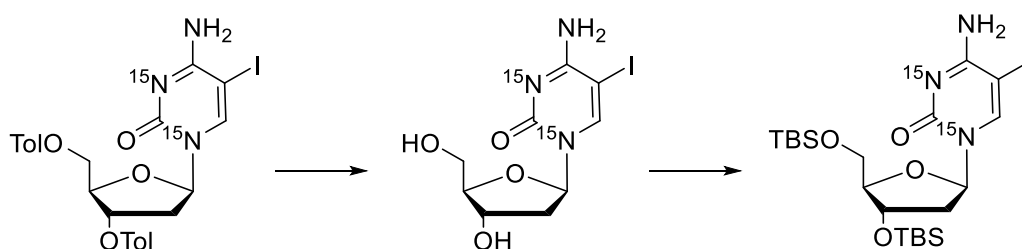
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 7.97 (s, 1H, C6H), 7.94 (d, $^3J = 7.8$ Hz, 2H, Ph-H), 7.90 (d, $^3J = 7.8$ Hz, 2H, Ph-H), 7.27 - 7.24 (m, 4H, Ph-H), 6.36 (dd, $^3J = 5.7$ Hz, $^3J = 8.1$ Hz, 1H, C1'H), 5.58 (d, $^3J = 6.0$ Hz, 1H, C3'H), 4.76 (dd, $^3J = 3.0$ Hz, $^2J = 12.6$ Hz, 1H, C5'H),

EXPERIMENTELLER TEIL

4.68 (dd, $^3J = 3.3$ Hz, $^2J = 12.3$ Hz, 1H, C5'*H*), 4.59 (dd, $^3J = 3.0$ Hz, $^3J = 5.4$ Hz, 1H, C4'*H*), 2.96 (dd, $^3J = 6.0$ Hz, $^2J = 14.4$ Hz, 1H, C2'*H*), 2.42 (s, 3H, PhMeOCH₃), 2.41 (s, 3H, PhMeOCH₃), 2.20 - 2.15 (m, 1H, C2'*H*).

HRMS (ESI⁺): ber. für C₂₅H₂₅O₆N¹⁵N₂I⁺ [M+H]⁺: 592.0729, gef.: 592.0720.

3',5'-(*tert*-Butyl-dimethylsilyl)-5-iodo-2'-deoxy-(N¹, N³-¹⁵N)-cytidin (**33**)



3',5'-(Toluoyl)-5-iodo-2'-deoxy-(N¹, N³-¹⁵N)-cytidin **31** (3.04 g, 5.27 mmol, 1.0 eq.) wurde in trockenem MeOH (350 mL) gelöst und auf 45 °C erhitzt. Anschließend wurde K₂CO₃ (3.64 g, 26.33 mmol, 5 eq.) zugegeben und für 45 min bei 45°C gerührt. Nach Abkühlen der Reaktionsmischung, wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer und am Hochvakuum entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde in einer 3:2-Mischung aus Pyridin und DMF (50 mL) bei Raumtemperatur gelöst. Zu dieser Lösung wurde Imidazol (4.30 g, 63.19 mmol, 12.0 eq.) und TBSCl (9.52 g, 63.19 mmol, 12.0 eq.) gegeben und für 2.5 h gerührt. Im Anschluss wurde weiteres TBSCl (1.58 g, 10.53 mmol, 2.0 eq.) zur Reaktionsmischung gegeben und man ließ die Reaktionsmischung über Nacht bei Raumtemperatur rühren. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Eis und 160 mL gesättigter NaHCO₃-Lösung gestoppt und mit DCM (2 x 330 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden gesättigter NaHCO₃-Lösung (4 x 400 mL) und H₂O (8 x 250 mL) gewaschen. Es wurde über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das so erhaltene Rohprodukt wurde auf Silicagel adsorbiert und mittels Säulenchromatographie (DCM/MeOH, 60:1) aufgereinigt. Man erhielt 3',5'-(*O*-*tert*-Butyl-dimethylsilyl)-5-Iod-2'-deoxy-(N¹, N³-¹⁵N)-cytidin **33** (1.89 g, 3.20 mmol, 61 %) in Form eines farblosen Feststoffes.

R_f = 0.4 (DCM/MeOH, 20:1).

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 8.10 (s, 1H, C6*H*), 6.23 (t, $^3J = 5.8$ Hz, 1H, C1'*H*), 4.34 (m, 1H, C3'*H*), 3.98 (q, $^3J = 2.8$ Hz, 1H, C4'*H*), 3.89 (dd, $^3J = 2.6$ Hz, $^2J = 11.4$ Hz, 1H, C5'*H*), 3.75 (dd, $^3J = 2.6$ Hz, $^2J = 11.4$ Hz, 1H, C5'*H*), 2.54 – 2.44 (m, 1H, C2'*H*),

EXPERIMENTELLER TEIL

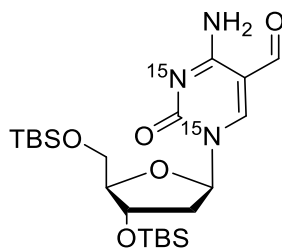
2.03 – 1.88 (m, 1H, C2'**H**), 0.91 (s, 18H, 2 x SiC(CH₃)₃), 0.09 (s, 12H, 2 x Si(CH₃)₂);

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 163.72 (C4), 146.56 (C2), 146.48 (C6), 88.21 (C4'), 86.78 (C1'), 72.17 (C3'), 63.82 (C5'), 56.12 (C5-I), 42.60 (C2'), 26.11 (3C, SiC(CH₃)₃), 25.72 (3C, SiC(CH₃)₃), 18.46 (SiC(CH₃)₃), 17.96 (SiC(CH₃)₃), -4.63 (Si(CH₃)₂), -5.17 (Si(CH₃)₂), -5.29 (Si(CH₃)₂).

HRMS (ESI+): ber. für C₂₁H₄₁O₄N¹⁵N₂Si₂I⁺ [M+H⁺]: 584.1621, gef.: 584.1607.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 2929 (w), 2857 (w), 1645 (m), 1472 (w), 1252 (m), 830 (s), 770 (s) cm⁻¹.

5-Formyl-(*tert*-butyl-dimethylsilyl)-2'-desoxy-(N¹,N³-¹⁵N)-cytidin (**35**)



5-Iod-3',5'-(*O-tert*-butyl-dimethylsilyl)-2'-desoxy-(N¹,N³-¹⁵N)-cytidin **33** (1.40 g, 2.37 mmol, 1.0 eq.), Pd₂(dba)₃·CHCl₃ (0.25 g, 0.24 mmol, 0.1 eq.) und PPh₃ (0.37 g, 1.42 mmol, 0.6 eq.) wurden in einem Hochdruckautoklaven gegeben und in trockenem Toluol gelöst (40 mL). Der Autoklav wurde mit CO-Gas geflutet, und nach Aufheizen auf 60 °C wurde der CO-Druck auf 3.5 bar eingestellt. BuSnH₃ (0.87 mL, 0.83 g, 2.84 mmol, 1.2 eq.) wurde innerhalb von 4 h mit einer Spritzenpumpe zugetropft und die Reaktion wurde zusätzliche 14 h bei 60 °C und 3.5 bar CO-Druck gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt, das Rohprodukt wurde auf Silicagel adsorbiert und mittels Säulenchromatographie (*i*-Hex/EtOAc, 4:1 → 2:1 → 1:1) aufgereinigt. Es wurde 5-Formyl-3',5'-(*O-tert*-butyl-dimethylsilyl)-2'-desoxy-(N¹, N³-¹⁵N)-cytidin **35** (0.86 g, 1.77 mmol, 75 % Ausbeute) in Form eines gelben Feststoffs erhalten.

R_f = 0.6 (DCM/MeOH, 20:1).

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 9.43 (s, 1H, CHO), 8.46 (s, 1H, C6**H**), 8.17 (br s, 1H, NH₂), 7.96 (s, br, 1H, NH₂), 6.15 (t, ³J = 6.3 Hz, 1H, C1'**H**), 4.31 (dt, ³J = 5.8 Hz, ³J = 6.2 Hz, 1H, C3'**H**), 4.02 - 3.99 (m, 1H, C4'**H**), 3.91 (dd, ³J = 2.3 Hz, ²J = 11.6 Hz, 1H, C5'**H**), 3.73 (dd, ³J = 2.3 Hz, ²J = 11.6 Hz, 1H, C5'**H**), 2.60 - 2.48 (m, 1H, C2'**H**), 2.10 - 1.97 (m, 1H,

EXPERIMENTELLER TEIL

C2'H), 0.84 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 0.83 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 0.04 (s, 3H, SiCH₃), 0.03 (s, 6H, Si(CH₃)₂), 0.02 (s, 3H, SiCH₃);

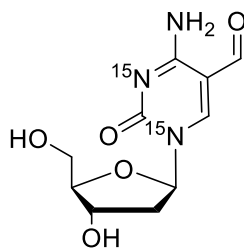
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 186.90 (CHO), 163.76 (d, ²J = 6.8 Hz, C4), 153.1 (d, ²J = 14.3 Hz, C2), 104.91 (C5), 88.61 (C4'), 87.7 (d, ³J = 9.6 Hz, C1'), 71.53 (C3'), 62.57 (C5'), 56.12 (C5-I), 42.91 (C2'), 25.92 (SiC(CH₃)₃), 25.70 (SiC(CH₃)₃), 18.40 (SiC), 17.95 (SiC), -4.54 (SiCH₃), -4.93 (SiCH₃), -5.28 (SiCH₃), -5.36 (SiCH₃).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 2953 (w), 2929 (w), 2857 (w), 1666 (s), 1251 (m), 830 (s), 775 (s) cm⁻¹.

HRMS (ESI+): ber. für C₂₂H₄₁O₅N¹⁵N₂Si₂Na⁺ [M+Na]⁺: 508.2423, gef.: 508.2410.

Schmelzbereich: 150 – 152 °C.

5-Formyl-2'-desoxy-(N¹,N³-¹⁵N)-cytidin (25)



In einem Polypropylenreaktionsgefäß wurde 5-Formyl-(*O*-*tert*-butyl-dimethylsilyl)-2'-desoxy-(N¹,N³-¹⁵N)-cytidin **20** (493 mg, 0.84 mmol, 1.0 eq.) in 20 mL EtOAc gelöst und HF·Pyridin (70 % HF, 325 μ L, 3.6 mmol, 4.2 eq.) wurde zugegeben. Die Reaktion wurde 17 h bei Raumtemperatur gerührt und durch Zugabe von TMSOMe (2.0 mL, 14.5 mmol, 17 eq.) gestoppt. Nachdem für 30 min bei Raumtemperatur gerührt wurde, wurde das Präzipitat abzentrifugiert (4500 rpm, 20 min). Das Rohprodukt wurde durch RP-HPLC (0 \rightarrow 20% MeCN in 45 min) gereinigt und 5-Formyl-2'-desoxy-(N¹,N³-¹⁵N)-cytidin (190 mg, 0.52 mmol, 63 %) als leicht oranger Feststoff gewonnen.

¹H-NMR (200 MHz, D₂O): δ (ppm) = 9.58 (d, ⁴J = 0.4 Hz, 1H, CHO), 8.87 (s, 1H, C6H), 6.26 (t, ³J = 6.1 Hz, 1H, C1'H), 4.49 (dd, ³J = 11.2, 4.7 Hz, 1H, C3'H), 4.20 (dd, ³J = 8.7, 4.3 Hz, 1H, C4'H), 3.97 (dd, ²J = 12.6 Hz, ³J = 3.3 Hz, 1H, C5'H₂), 3.85 (dd, ²J = 12.6 Hz, ³J = 4.9 Hz, 1H, C5'H), 2.66 – 2.60 (m, 1H, C2'H), 2.47 – 2.40 (m, 1H, C2'H₂).

EXPERIMENTELLER TEIL

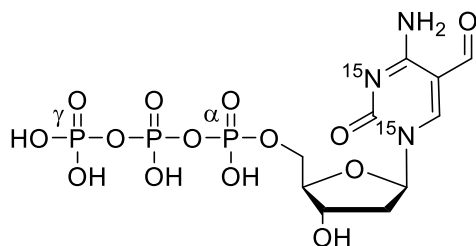
^{13}C -NMR (100 MHz, D_2O): δ (ppm) = 190.4 (d, $^2J = 2.0$ Hz, CHO), 162.3 (d, $^2J = 1.4$ Hz, C4), 154.5 (d, $^2J = 6.4$ Hz, C2), 105.6 (C6), 87.4 (C5), 87.3 (C1'), 86.1 (C4'), 69.7 (C3'), 60.6 (C5'), 40.0 (C2').

HRMS (ESI+): ber. für $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2^{15}\text{N}_2\text{O}_5$ $[\text{M}+\text{H}^+]^+$: 258.0869, gef.: 258.0867;.

Schmelzbereich: 150 – 152 °C.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 2952 (w), 2928 (w), 2855 (w), 1757 (m), 1658 (m), 1553 (m), 1471 (m), 1253 (m), 1112 (m), 1064 (m), 1028 (m), 832 (s), 774 (s).

5-Formyl-2'-desoxy-(N^1, N^3 - ^{15}N)-cytidin-5'-triphosphat ($^{15}\text{N}_2$ -fCTP)



Eine Lösung aus Tributylammoniumpyrophosphat (42.0 mg, 77.46 μmol , 2.0 eq.) in DMF (0.15 mL) und Tributylamin (0.20 mL) wurde zu 2-Chloro-1,3,2-Benzodioxaphosphorin-4-on (15.7 mg, 77.5 μmol , 2.0 eq.) in DMF (0.11 mL) gegeben. Nach Rühren für 30 min bei Raumtemperatur wurde diese Lösung zu 5-Formyl-2'-desoxy-(N^1, N^3 - ^{15}N)-cytidin (10 mg, 38.8 μmol , 1.0 eq.) gegeben und 3.5 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde eine Lösung aus 3 % Iod in einem Pyridin/Wasser-Gemisch (9:1, 0.5 mL) zutitriert bis keine Entfärbung der Lösung mehr auftrat. Die Reaktion wurde für 1.5 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend wurden 2 mL Wasser zugegeben und die Reaktionsmischung 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Rohprodukt wurde durch Zugabe einer NaCl-Lösung (3M, 0.8 mL) und absolutem Ethanol (15 mL) bei -80 °C für 14 h gefällt. Der Überstand wurde nach Zentrifugation verworfen und das Pellet durch Ionenaustauschchromatographie bei 4 °C unter Verwendung einer DEAE-Zellulosesäule mit einem Gradienten von 100 % Wasser auf 0.5 M TEAB (pH 7.5). Eine weitere Ionenaustauschreinigung (0.1 M, 1 M TEAB, 0 – 100% TEAB in 30 min) mit einer MonoQ 5/50 GL (GE) ergab das Triphosphat als TEA-Salz (1.28 mg, 2.5 μmol , 12 %) als TEA-Salz.

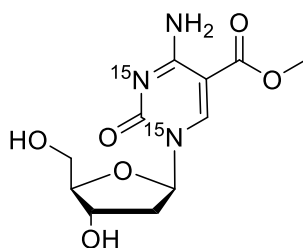
EXPERIMENTELLER TEIL

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ (ppm) = 9.69 (s, 1H, **CHO**), 8.90 (s, 1H, **C6H**), 6.27 (t, ³*J* = 6.3 Hz, 1H, **C1'H**), 4.66 – 4.69 (m, 1H, **C3'H**), 4.29 – 4.37 (m, 3H, **C4'H**, **C5'H₂**), 2.42 – 2.64 (m, 2H, **C2'H₂**).

³¹P-NMR (162 MHz, D₂O), δ (ppm) = –10.3 (m, P _{γ}), –11.7 (d, *J* = 20.2 Hz, P _{α}), –23.3 (t, *J* = 19.3 Hz, P _{β});

HRMS (ESI–): ber. für C₁₀H₁₇N₃P₃O₁₅ [M-H][–]: 495.9713, gef.: 495.9713.

5-Carboxymethyl-2'-desoxy-(^N¹,^N³-¹⁵N)-cytidin (**37**)



Eine Lösung aus 3',5'-(*O*-*tert*-Butyl-dimethylsilyl)-5-carboxymethyl-2'-desoxy-(^N¹,^N³-¹⁵N)-cytidin^[135] (170 mg, 0.33 mmol, 1.0 eq.), HF·Pyridin (70% HF, 0.13 mL, 4.94 mmol, 15.0 eq.) und Pyridin (0.13 mL, 1.60 mmol, 4.8 eq.) in EtOAc (10.7 mL) wurde für 21 h bei RT gerührt. Dann wurde zusätzliches HF·Pyridin (70 % HF, 0.09 mL, 3.42 mmol, 10.4 eq.) und Pyridin (0.09 mL, 1.11 mmol, 3.4 eq.) zugegeben und für 26 h bei RT gerührt. Die Reaktion wurde mit TMSOMe (2.7 mL, 19.59 mmol, 59.4 eq.) beendet und für 30 min bei RT gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* wurde das Carboxylcytidin **37** durch Säulenchromatographie (DCM:MeOH 50:1 → 5:1) als farbloser Feststoff erhalten (30 mg, 0.10 mmol, 30 %).

¹H-NMR (200 MHz, D₂O): δ (ppm) = 8.96 (s, 1H, **C6H**), 6.16 (t, ³*J* = 5.8 Hz, 1H, **C1'H**), 4.45 – 4.36 (m, 1H, **C3'H**), 4.08 – 4.02 (m, 1H, **C4'H**), 3.94 – 3.71 (m, 2H, **C5'H**), 3.83 (s, 3H, **OCH₃**), 2.58 – 2.43 (m, 1H, **C2'H**), 2.39 – 2.25 (m, 1H, **C2'H₂**).

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O): δ (ppm) = 166.0 (d, *J* = 1.6 Hz, **OCOMe**), 163.5 (dd, ²*J* = 6.2, 1.4 Hz, **C4**), 155.8 (dd, ²*J* = 11.8, 8.3 Hz, **C2**), 148.8 (d, *J* = 14.0 Hz, **C6**), 96.8 (d, ²*J* = 1.0 Hz, **C5**), 86.9 (d, *J* = 9.7 Hz, **C1'**), 86.7 (**C4'**), 69.2 (**C3'**), 60.1 (**C5'**), 52.3 (**OCH₃**), 39.9 (**C2'**).

¹⁵N-NMR (40 MHz, D₂O): δ (ppm) = –179.7, –212.2.

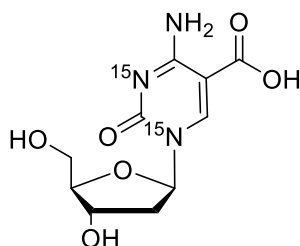
EXPERIMENTELLER TEIL

HRMS (ESI+): ber. für $C_{11}H_{16}N^{15}N_2O_6^+$ $[M+H]^+$: 288.0974, gef.: 288.0977.

Schmelzbereich: 169 – 171 °C.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 1713 (m), 1635 (s), 1480 (s), 1321 (s), 1097 (s), 1062 (s), 786 (s).

5-Carboxyl-2'-desoxy-(N^1, N^3 - ^{15}N)-cytidin (**26**)



Eine Lösung aus 5-Carboxymethyl-2'-desoxy-(N^1, N^3 - ^{15}N)-cytidin **37** (25 mg, 87.0 μ mol, 1.0 eq.) und LiOH (25 mg, 1.04 mmol, 12.0 eq.) in Wasser (1.3 mL) und MeCN (7.0 mL) wurde bei Raumtemperatur für 19 h gerührt. Die Reaktionsmischung wurde auf pH 4.0 mit 2 M HCl (0.5 mL) eingestellt und der Feststoff abfiltriert und mit Wasser gewaschen. So wurde 5-Carboxyl-2'-desoxy-(N^1, N^3 - ^{15}N)-cytidin **26** als farbloser Feststoff erhalten (11 mg, 40.3 μ mol, 46 %).

1H -NMR (400 MHz, D_2O): δ (ppm) = 8.79 (s, 1H, C6H), 6.29 (dt, J = 6.5, 1.3 Hz, 1H, C1H), 4.53 – 4.49 (m, 1H, C3'H), 4.16 (dd, J = 8.1, 4.2 Hz, 1H, C4'H), 3.92 (dd, J = 12.4, 3.5 Hz, 1H, C5'H), 3.83 (dd, J = 12.5, 5.3 Hz, 1H, C5'H), 2.59 – 2.53 (m, 1H, C2'H), 2.46 – 2.38 (m, 1H, C2'H).

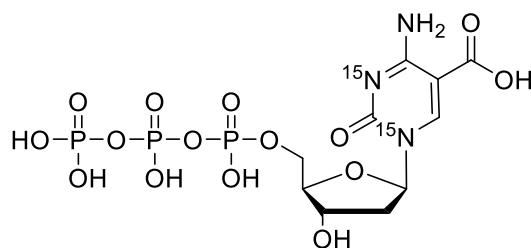
^{13}C -NMR (101 MHz, D_2O): δ (ppm) = 168.0 (COOH), 159.8 (d, 2J = 13.3 Hz, C4), 150.0 (C2), 148.0 (d, 2J = 13.1 Hz, C6), 101.3 (C5), 87.2 (C4'), 86.9 (d, 2J = 10.2 Hz, C1'), 70.1 (C3'), 60.8 (C5'), 39.5 (C2').

^{15}N -NMR (41 MHz, d_6 -DMSO): δ (ppm) = -171.6, -212.1.

HRMS (ESI+): ber. für $C_{10}H_{14}N^{15}N_2O_6^+$ $[M+H]^+$: 274.0818, gef.: 274.0818.

Schmelzbereich: >250 °C (Zersetzung).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3402 (m), 3274 (br, m), 1661 (s), 1627 (m), 1448 (m), 1291 (m), 1202 (m), 1093 (s), 1003 (s), 816 (m).

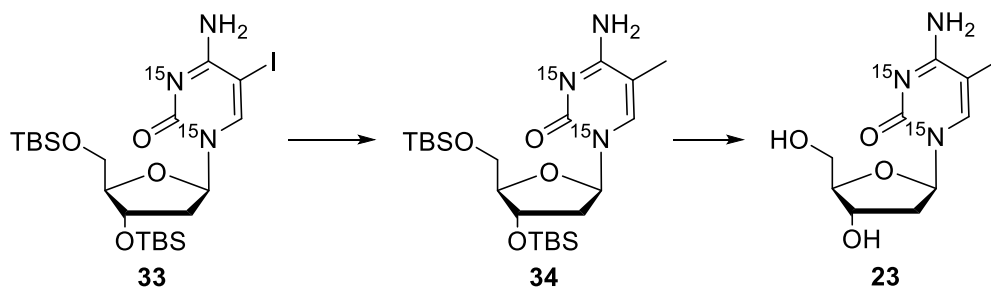
5-Carboxyl-2'-desoxy-(N^1, N^3 - ^{15}N)-cytidin-5'-triphosphat (28**)**

Eine Lösung aus Tributylammoniumpyrophosphat (42.5 mg, 77.46 μmol , 2.0 eq.) in DMF (0.15 mL) und Tributylamin (0.20 mL) wurde zu 2-Chlor-1,3,2-benzodioxaphosphorin-4-on (15.7 mg, 77.5 μmol , 2.0 eq.) in DMF (0.11 mL) gegeben. Nach Rühren für 30 min bei Raumtemperatur wurde diese Lösung zu 5-Carboxyl-2'-desoxy-(N^1, N^3 - ^{15}N)-cytidin **26** (10.5 mg, 38.4 μmol , 1.0 eq.) gegeben. Nachdem für 20 h bei Raumtemperatur gerührt wurde, wurde Iod (34.8 mg, 0.14 mmol, 3.6 eq.) in einem Gemisch aus Pyridin (1.08 mL) und Wasser (0.12 mL) zutitriert bis eine bräunliche Färbung bestehen blieb. Es wurde für weitere 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 2 mL Wasser zugegeben und das Reaktionsgemisch für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Rohprodukt wurde durch Zugabe von einer 3 M Natriumacetatlösung (0.65 mL) und Ethanol (12 mL) bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ für 1 h gefällt. RP-HPLC Reinigung (0 \rightarrow 6 % Puffer B in 45 min) ergab das Triphosphat **28** (1.28 mg, 2.5 μmol , 7 %) als TEA-Salz.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O): δ (ppm) = 8.44 (t, $^2J=1.3$ Hz, 1H, C6 H), 6.29 (t, $^2J=6.7$ Hz, 1H, C1' H), 4.65 – 4.61 (m, 1H, C3' H), 4.29 – 4.20 (m, 3H, C4' H , C5' H_2), 2.51 – 2.36 (m, 2H, C2' H_2).

$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, D_2O): δ (ppm) = -10.7 (d, $J = 19.8$ Hz, P_γ), -11.0 (d, $J = 19.8$ Hz, P_α), -23.4 (t, $J = 19.8$ Hz, P_β).

HRMS (ESI $^-$): ber. für $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}^{15}\text{N}_2\text{O}_{15}\text{P}_3^-$ [$\text{M}+\text{H}$] $^-$: 511.9662, gef.: 511.9661.

5-Methyl-2'-deoxy-(N¹, N³-¹⁵N)-cytidin (¹⁵N₂-mC)


Zu einer eisgekühlten Lösung des TBS-5-Iodcytidin **33** (300 mg, 0.51 mmol) in entgastem THF (30 mL) wurde MeMgCl (0.2 mL, 0.51 mmol, 1.0 eq.) zugegeben und für 1.5 h gerührt. Danach wurde weiteres MeMgCl (1.0 mL, 2.57 mmol, 5.0 eq.), CuI (489 mg, 2.57 mmol, 5.0 eq.) und Pd₂(PPh₃)₄ (59 mg, 0.051 mmol, 0.1 eq.) hinzugefügt und für weitere 1.5 h bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde das Eisbad entfernt und für 30 min bei RT gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von gesättigter wässriger NH₄Cl-Lösung (15 mL) beendet. Es wurde mit EtOAc (3 x 70 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter wässriger NH₄Cl-Lösung (3 x 300 mL) gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Nach einer Aufreinigung über Säulenchromatographie (DCM/MeOH 50:1 → 25:1, R_f = 0.2 in DCM/MeOH, 20:1) wurde eine untrennbare Mischung aus dem Produkt **23** und 3',5'-(*tert*-Butyl-dimethylsilyl)-2'-desoxy-(N¹,N³-¹⁵N)-cytidin in Form eines gelbraunen Feststoffes (293 mg) erhalten.

In einem Polypropylenreaktionsgefäß wurde dieses Produktgemisch (239 mg, 0.507 mmol, 1.0 eq.) in 20 mL EtOAc gelöst. Zu der gelben Lösung wurde HF·Pyridin (70 % HF, 197 μL, 7.61 mmol, 15.0 eq.) zugegeben und für 10 h bei Raumtemperatur gerührt, wobei ein amorpher, farbloser Farbstoff ausfiel. Es erfolgte eine weitere Zugabe von HF·Pyridin (70 % HF, 100 μL, 3.87 mmol, 7.6 eq.) und es wurde für weitere 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Durch Zugabe von TMSOMe (2.41 mL, 17.34 mmol, 34.0 eq.) und Rühren für eine Stunde bei RT wurde die Reaktion beendet. Der ausgefallene Feststoff wurde abzentrifugiert (4500 rpm, 25 min, 4 °C), der Überstand abdekantiert und der Feststoff an der Lyophylle getrocknet. Die so erhaltene Mischung aus 2'-Desoxy-(N¹,N³-¹⁵N)-cytidin und 5-Methyl-2'-desoxy-(N¹,N³-¹⁵N)-cytidin wurde mittels RP-HPLC aufgereinigt, wobei man 5-Methyl-2'-desoxy-(N¹,N³-¹⁵N)-cytidin (19.45 mg, 0.08 mmol) in einer Ausbeute von 16 % erhielt.

R_f = 0.5 (DCM/MeOH, 10:1)

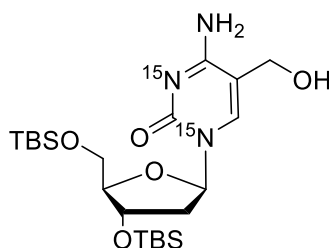
¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ (ppm) = 7.51 (s, 1H, C6H), 6.12 (t, ³J = 6.6 Hz, 1H, C1'H), 4.30 (dt, ³J = 3.7 Hz, ³J = 7.1 Hz, C3'H), 3.89 (m, 1H, C4'H), 3.71 (dd, ³J = 3.7 Hz, ²J = 12.5 Hz,

EXPERIMENTELLER TEIL

1H, C5`H), 3.61 (dd, $^3J = 4.9$ Hz, $^2J = 12.5$ Hz, 1H, C5`H), 2.32 – 2.06 (m, 2H, C2`H), 1.82 (s, 3H, C5-CH₃).

HRMS (ESI+): ber. für C₁₀H₁₆N¹⁵N₂O₄⁺ [M+H]⁺: 244.1082, gef.: 244.1074.

5-Hydroxymethyl 3',5'-(*O*-*tert*-butyl-dimethylsilyl)-2'-desoxy-(N¹,N³-¹⁵N)-cytidin (**24**)



Zu einer Lösung aus TBS-geschützten 5-Formyl-2'-desoxy-(N¹,N³-¹⁵N)-cytidin **35** (300 mg, 0.62 mmol, 1.0 eq.) in MeOH (trocken, 30 mL) wurde wasserfreies CeCl₃ (0.62 g, 1.86 mmol, 3.0 eq.) zugegeben und auf 0 °C gekühlt. Dann wurde NaBH₄ (23 mg, 0.62 mmol, 1.0 eq.) zugegeben und für 10 min bei RT gerührt, wobei eine Schwarzfärbung der orangen Lösung auftrat. Die Reaktion wurde durch Zugabe einer gesättigten wässrigen NH₄Cl-Lösung (120 mL) beendet. Nach Extraktion mit EtOAc (3 × 100 mL) wurden die vereinigten organische Phasen mit gesättigter wässriger NH₄Cl (1 x 100 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH 20:1 → 10:1) wurde das TBS-geschützte 5-Hydroxymethyl-2'-desoxycytidin **24** (213 mg, 0.44 mmol, 71 %) als farbloser Schaum erhalten.

R_f = 0.4 (DCM/MeOH 10:1).

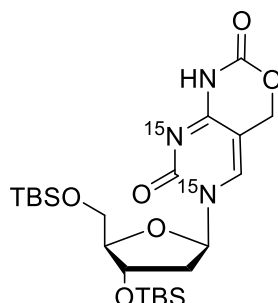
¹H-NMR (200 MHz, Chloroform-*d*): δ (ppm) = 7.69 (d, 1H, C6`H), 6.51 (s, br, 1H, OH), 6.21 (t, 1H, C1`H), 4.30 (dt, $^2J = 6.5$ Hz, $^3J = 3.5$ Hz, 1H, C3`H), 3.93 (m, 1H, C4`H), 3.86 (dd, $^2J = 11.2$ Hz, $^3J_{H,H} = 3.2$ Hz, 1H, C5`H), 3.76 (dd, $^2J = 11.2$ Hz, $^3J = 3.0$ Hz, 1H, C5`H), 2.48 – 2.35 (m, 1H, C2`H), 2.03 – 1.88 (m, 1H, C2`H), 0.91 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 0.88 (s, 9H, 3 × SiC(CH₃)₃), 0.10 (s, 3H, SiCH₃), 0.09 (s, 3H, SiCH₃), 0.06 (s, 3H, SiCH₃), 0.05 (s, 3H, SiCH₃).

¹⁵N-NMR (40 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = -173.6, -223.3.

HRMS (ESI+): ber. für C₂₂H₄₄N¹⁵N₂O₅Si₂⁺ [M+H]⁺: 488.2760, gef.: 488.2750.

Schmelzbereich: 93 – 97 °C.

3',5'-(*O*-*tert*-Butyl-dimethylsilyl-4,5-(1,3-[1*H*,6*H*]oxazin-2-on)-2`-desoxy-(N¹,N³-¹⁵N)-cytidin (38**)**



Zu einer Lösung von TBS-¹⁵N₂-hmdU **36** (408 mg, 0.84 mmol, 1 eq.) in THF (trocken, 100 mL) wurde 4-Nitrophenylchlorformiat (202 mg, 1.00 mmol, 1.2 eq.) und DIPEA (364 µL, 2.09 mmol, 2.5 eq.) gegeben. Nach 4 h Rühren bei Raumtemperatur wurden weiteres 4-Nitrophenylchlorformiat (33 mg, 0.17 mmol, 0.2 eq.) und DIPEA (65 µL, 0.37 mmol, 0.5 eq.) zugegeben und für weitere 10 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde anschließend *in vacuo* entfernt und das geschützte Nukleosid **38** (327 mg, 0.64 mmol) nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH 100:1) als farbloser Schaum in einer Ausbeute von 76 % gewonnen.

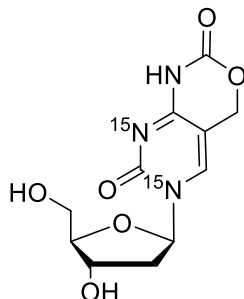
$R_f = 0.4$ (DCM/MeOH 20:1)

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*): δ (ppm) = 8.14 (s, 1H, C6H), 6.21 (td, $J = 6.0, 1.3$ Hz, 1H, C1'H), 5.14 – 5.02 (m, 2H, ArCH₂OH), 4.33 (dt, $^3J = 6.1, ^3J = 4.0$ Hz, 1H, C3'H), 3.99 (q, $^3J = 2.7$ Hz, 1H, C4'H), 3.92 (dd, $^2J = 11.6, ^3J = 2.6$ Hz, 1H, C5'H), 3.80 – 3.69 (m, 1H, C5'H), 2.58 – 2.51 (m, 1H, C2'H), 2.07 – 2.00 (m, 1H, C2'H), 0.88 (d, $J = 11.6$ Hz, 18H, 2 x SiC(CH₃)₃), 0.07 (dd, $J = 15.2, 4.9$ Hz, 12H, 2xSi(CH₃)₂).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 159.76 (d, $J = 5.9$ Hz, C4), 154.63 (d, $J = 12.0$ Hz, C2), 150.00 (d, $J = 2.9$ Hz, O=CO), 138.62 (d, $J = 13.5$ Hz, C6), 96.35 (d, $J = 2.1$ Hz, C5), 88.41 (C4'), 87.53 (d, $J = 9.8$ Hz, C1'), 71.24 (C3'), 64.80 (C5'), 62.44 (ArCH₂), 42.63 (C2'), 26.01 (C_{tert}), 25.82 (C_{tert}), 18.48 (SiC(CH₃)₃), 18.07 (SiC(CH₃)₃), -4.41 (SiCH₃), -4.80 (SiCH₃), -5.23 (SiCH₃), -5.27 (SiCH₃).

HRMS (ESI⁺): ber. für C₂₃H₄₂O₆N¹⁵N₂Si₂⁺ [M+H]⁺: 514.2547, gef. 514.2547

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3312 (br), 2928, 1754, 1666, 1557, 1470, 1120, 1047, 888, 831, 774, 754

4,5-(1,3-[1H,6H]oxazin-2-on)-2'-desoxy-(N¹,N³-¹⁵N)-cytidin (**39**)

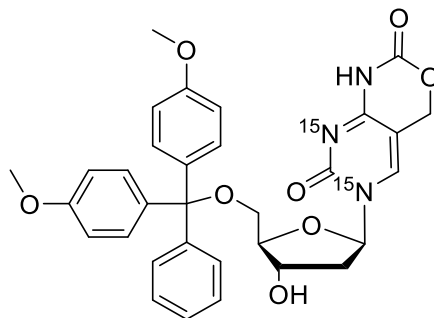
Zu einer Lösung des TBS-geschützten ¹⁵N₂-hmdU **38** (330 mg, 0.63 mmol, 1.0 eq.) in EtOAc (15 mL) wurde Pyridin (246 µL, 3.05 mmol, 4.8 eq.) und HF·Pyridin (70 % HF, 234 µL, 8.64 mmol, 13.0 eq.) zugegeben und 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von TMSOMe (1.0 mL, 756 mg, 7.15 mmol, 11.4 eq.) beendet und für 30 min bei RT gerührt. Nach Entfernen des Lösemittels *in vacuo* und säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH 10:1 → 5:1) wurde das Nucleosid **39** (80 mg, 0.28 mmol) als farbloser Feststoff in einer Ausbeute von 44 % erhalten.

R_f = 0.4 (DCM/MeOH 5:1).

¹H-NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄): δ (ppm) = 8.38 (s, 1H, C6H), 6.18 (td, *J* = 6.3, 1.3 Hz, 1H, C1'H), 5.18 (s, 2H, ArCH₂), 4.36 – 4.33 (m, 1H, C3'H), 3.99 – 3.97 (m, 1H, C4'H), 3.87 – 3.64 (m, 2H, C5'H₂), 2.51 – 2.44 (m, 1H, C2'H), 2.18 – 2.11 (m, 1H, C2'H).

HRMS (ESI⁺): ber. für C₁₁H₁₃O₆N¹⁵N₂⁺ [M+H]⁺: 286.0818, gef. 286.0817.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3361 (w, -O-H), 3270 (w, -O-H), 3161 (w, -N-H), 1749 (m, -C=O), 1667 (s, -C=O, -C=C, -C=N), 1627 (s, Ringschwingung, -N-H), 1557 (m, -N-H), 1476 (m, Ringschwingung), 1282 (s, -C-N, -C-O-C), 1268 (s, -C-N, -C-O-C), 1101 (s, -C-O-C), 1082 (s, -C-O-C), 1067 (s, -C-O-C), 1060 (s, -C-O-C), 794 (s, =C-H), 775 (s, =C-H).

4,5-(1,3-[1H,6H]Oxazin-2-on)-5'--(dimethoxytrityl)-2'-desoxy-(N¹,N³-¹⁵N)-cytidin (40)

Zu einer Lösung des ¹⁵N₂-hmdU-Nukleosid **39** (71 mg, 0.24 mmol, 1.0 eq.) in trockenem Pyridin (2 mL) wurde im Argongegenstrom DMTCl (95 mg, 0.28 mmol, 1.2 eq.) zugegeben und die Reaktion für 19 h bei RT gerührt. Anschließend wurde weiteres DMTCl (40 mg, 0.119 mmol, 0.5 eq.) zugegeben und Reaktion für 5 h bei RT gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* und säulenchromatographischer Aufreinigung erhielt man so das DMT-geschützte Nukleosid **40** (123 mg, 0.204 mmol) als gelblichen Schaum in einer Ausbeute von 86 %.

R_f = 0.4 (DCM/MeOH 10:1).

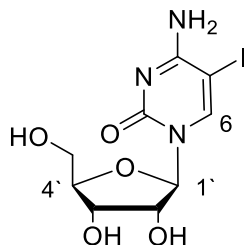
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 8.37 (s, 1H, C6H), 7.35 – 7.29 (m, 4H, ArH), 7.24 – 7.20 (m, 4H, ArH), 6.85 – 6.76 (m, 4H, ArH), 6.29 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H, C1'H), 4.69 – 4.60 (m, 1H, C3'H), 4.34 (d, *J* = 13.9 Hz, 1H, ArCH₂OH), 4.15 (dt, *J* = 5.1, 2.7 Hz, 1H, C4'H), 4.07 (d, *J* = 13.9 Hz, 1H, ArCH₂OH), 3.77 (s, 6H, 2 x OCH₃), 3.46 (ddd, *J* = 34.2, 10.8, 2.7 Hz, 2H, C5'H₂), 2.79 – 2.69 (m, 1H, C2'H), 2.40 – 2.27 (m, 1H, C2'H).

HRMS (ESI⁻): ber. für C₃₂H₃₀O₈N¹⁵N₂⁻ [M+H]⁻: 586.1979, gef. 586.1977.

3.2.3 Synthese von Hapten-Molekülen für die Antikörpergenerierung

3.2.3.1 Haptene für Formylcytosin

5-Iod-cytidin (**42**)



Kommerziell erhältliches Cytidin (12.0 g, 49.3 mmol, 1.0 eq.) wurde in DMF (150 mL) gelöst und Iod wurde (7.51 g, 29.6 mmol, 0.6 eq.) zugegeben. Bei 0 °C wurde *m*CPBA (8.94 g, 51.8 mmol, 1.05 eq.) portionsweise hinzugefügt und der Reaktionsansatz für 10 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung für zwei Stunden bei RT gerührt und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (DCM/MeOH/H₂O/NH₃ 190:1:0.6:0.6 → 90:1:0.6:0.6 → 40:1:0.6:0.6 → 20:1:0.6:0.6) aufgereinigt und 5-Iod-cytidin **42** (7.91 g, 21.4 mmol) als oranger Feststoff in einer Ausbeute von 43 % gewonnen.

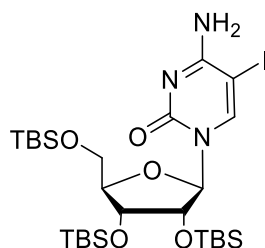
$R_f = 0.8$ (DCM/MeOH 4:1)

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 8.28 (s, 1H, C6H), 6.08 (t, ³*J* = 6.4 Hz, 1H, C1'H), 4.20 – 4.12 (m, 2H, C3'H, C2'H), 4.06 (dt, *J* = 6.3, 2.5 Hz, 1H, C4'H), 3.95 (dd, *J* = 12.3, 2.5 Hz, 1H, C5'H), 3.78 (dd, *J* = 12.3, 2.6 Hz, 1H, C5'H).

¹³C-NMR (101 MHz, MeOD) δ (ppm) = 166.03 (C4), 157.65 (C2), 139.60 (C6), 92.56 (C1'), 85.90 (C4'), 76.61 (C2'), 70.27 (C3'), 61.27 (C5'), 57.06 (C5).

HRMS (ESI⁺): ber. für C₉H₁₂O₅N₃INa⁺ [M+Na]⁺: 391.9714, gef. 391.9718.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3315 (w), 2915 (m), 2848 (m), 1644 (s), 1483 (s), 1287 (m), 1099 (s), 1028 (m), 868 (w).

5-Iod-2', 3', 5'-(*O*-*tert*-butyl-dimethylsilyl)-cytidin (43)

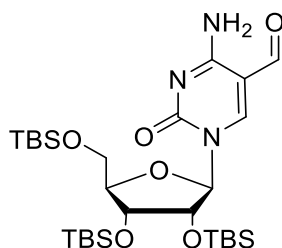
5-Iod-cytidin **42** (5.00 g, 13.5 mmol, 1 eq.) wurde in einer Mischung aus Pyridin und DMF (3:1, 120 mL) gelöst. Imidazol (7.38 g, 108.4 mmol, 8 eq.) und TBSCl (12.25 g, 81.3 mmol, 6 eq.) wurden zugegeben und die Reaktionslösung für 16 h bei RT gerührt. Durch Zugabe von halbgesättigter wässriger NaHCO₃-Lösung (1 x 600 mL) wurde die Reaktion beendet und die Lösung mit DCM (3 x 300 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit halbgesättigter wässriger NH₄Cl-Lösung (3 x 400 mL) und gesättigter wässriger NH₄Cl-Lösung (3 x 400 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (DCM/MeOH, 50:1→40:1→20:1→10:1) aufgereinigt. 5-Iod-2', 3', 5'-(*O*-*tert*-butyl-dimethylsilyl)-cytidin **43** wurde als gelbliches, hochviskoses Öl (6.32 g, 8.88 mmol) und als gelblicher Schaum (786 mg, 1.10 mmol) in einer Ausbeute von 74 % erhalten.

$R_f = 0.2$ (DCM/MeOH 20:1).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 8.06 (s, 1H, C6H), 5.96 – 5.93 (m, 1H, C1'H), 4.21 – 4.15 (m, 1H, C2'H), 4.06 – 3.97 (m, 1H, C4'H), 3.92 – 3.70 (m, 1H, C3'H), 2.87 (dd, ²J = 16.2 Hz, ³J = 13.0 Hz, 2H, C5'H₂), 0.95 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 0.89 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 0.85 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 0.16 (s, 3H, Si(CH₃)), 0.15 (s, 3H, Si(CH₃)), 0.10 (s, 3H, Si(CH₃)), 0.08 (s, 3H, Si(CH₃)), 0.05 (s, 3H, Si(CH₃)), 0.03 (s, 3H, Si(CH₃)).

HRMS (ESI⁺): ber. für C₂₇H₅₅O₅N₃ISi₃⁺ [M+H]⁺: 712.2489, gef. 712.2500.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3334 (w), 2953 (w), 2928 (w), 2856 (w), 1644 (m), 1471 (m), 1252 (m), 1163 (w), 1110 (w), 1000 (w), 967 (w), 939 (w), 799 (s), 770 (s), 666 (m).

5-Formyl-2', 3', 5'-(*O*-*tert*-butyl-dimethylsilyl)-cytidin (44)

In einem mit CO-Gas gespülten Hochdruck-Glasautoklaven wurden das TBS-geschützte 5-Iodcytidin **43** (3.50 g, 4.92 mmol, 1.0 eq.), PPh₃ (770 mg, 2.95 mmol, 0.6 eq.) und Pd₂(dba)₃·CHCl₃ (508 mg, 0.492 mmol, 0.1 eq.) in Toluol (trocken, 50 mL) gelöst. Bei einem CO-Druck von 3.5 bar wurde der Reaktionsansatz bei 65 °C gerührt, während mit einer Spritzenpumpe Bu₃SnH (1.56 mL, 5.90 mmol, 1.2 eq) durch ein Septum zugetropft wurde. Die Zutropfgeschwindigkeit betrug 150 µL pro Stunde. Nach vollständiger Zugabe wurde die Reaktionslösung für weitere 12 h bei 65 °C gerührt. Im Anschluss wurde das CO-Gas ausgelassen und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (iHex/EtOAc 4:1 → 2:1 → 1:1) erhielt man das Produkt **44** (1.823 g, 2.97 mmol) als farblosen Schaum in einer Ausbeute von 60 %.

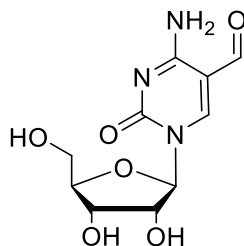
R_f = 0.3 (DCM/MeOH, 10:1).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 9.50 (s, 1H, CHO), 8.59 (s, 1H, C6H), 5.85 (d, ³J = 2.5 Hz, 1H, C1'H), 4.18 – 4.15 (m, 1H, C2'H), 4.13 – 4.08 (m, 1H, C4'H), 3.98 – 3.92 (m, 1H, C3'H), 3.84 (d, ³J = 1.9 Hz, 2H, C5'H), 3.80 (d, ³J = 2.0 Hz, 2H, C5'H), 0.95 (s, 9H, Si(CH₃)₃), 0.89 (s, 9H, Si(CH₃)₃), 0.88 (s, 9H, Si(CH₃)₃), 0.15 (s, 3H, Si(CH₃)), 0.14 (s, 3H, Si(CH₃)), 0.11 (s, 3H, Si(CH₃)), 0.09 (s, 3H, Si(CH₃)), 0.05 (s, 3H, Si(CH₃)), 0.03 (s, 3H, Si(CH₃)).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 187.07 (CHO), 162.50 (C4), 153.43 (C2), 153.20 (C6), 105.35 (C5), 90.60 (C1'), 83.84 (C4'), 76.40 (C2'), 69.81 (C3'), 61.62 (C5'), 26.31 (SiC(CH₃)), 25.86 (SiC(CH₃)), 25.83 (SiC(CH₃)), 18.87 (SiC(CH₃)₃), 18.03 (2 x SiC(CH₃)₃), -4.04 (SiCH₃), -4.23 (SiCH₃), -4.63 (SiCH₃), -5.00 (SiCH₃), -5.07 (SiCH₃), -5.38 (SiCH₃).

HRMS (ESI+): ber. für C₂₈H₅₆O₆N₃Si₃⁺ [M+H]⁺: 614.3471, gef. 614.3462.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3395 (w), 2928 (w), 2856 (w), 1666 (m), 1250 (m), 1163 (w), 1130 (m), 1066 (m), 820 (s), 775 (s).

5-Formylcytidin (45)

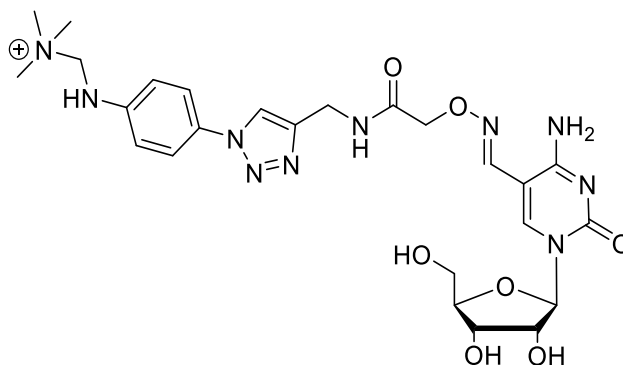
Das TBS-geschütztes Formylcytidin **44** (500 mg, 0.814 mmol, 1 eq.) wurde in einem Polypropylen-Reaktionsgefäß in 10 mL EtOAc gelöst und HF·Pyridin (70 % HF, 421 μ L, 16.3 mmol, 20 eq.) sowie Pyridin (664 μ L, 8.14 mmol, 10 eq.) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht gerührt und die Reaktion mit TMSOMe (2 mL, 14.51 mmol, 17 eq.) gestoppt. Nach 30 min Rühren bei RT wurde der ausgefallene Feststoff abzentrifugiert (4000 rpm, 0 °C, 20 min). 5-Formylcytidin **45** (218 mg, 0.801 mmol) wurde so als gelblicher Feststoff in einer Ausbeute von 98 % erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O): δ (ppm) = 9.54 (s, 1H, *CHO*), 8.95 (s, 1H, *C5H*), 5.93 (d, $^3J = 2.4$ Hz, 1H, *C1'H*), 4.38 (dd, $^3J = 4.54$, $^3J = 2.13$ Hz, 1H, *C2'H*), 4.28 – 4.22 (m, 2H, *C3'H*, *C4'H*), 4.09 (dd, $^2J = 13.2$, $^3J = 2.4$ Hz, 1H, *C5'H*), 3.91 (dd, $^2J = 13.2$, $^3J = 3.2$ Hz, 1H, *C5'H*),

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, D_2O): δ (ppm) = 190.13 (*CHO*), 162.38 (*C4*), 154.89 (*C2*), 154.69 (*C6*), 105.71 (*C5*), 91.38 (*C1'*), 83.42 (*C4'*), 74.43 (*C2'*), 68.01 (*C3'*), 59.59 (*C5'*).

HRMS (ESI⁻): ber. für $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_6\text{N}_3^-$ [*M-H*]⁻: 270.0732, gef. 270.0732.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3521 (m), 3382 (w), 1656 (s), 1635 (s), 1604 (s), 1500 (s), 1420 (s), 1327 (m), 1307 (s), 1252 (s), 1207 (m), 1128 (m), 1102 (s), 1079 (s), 1062 (s), 1028 (m), 984 (w), 966 (w), 945 (w), 912 (w), 812 (w), 789 (s), 767 (s).

5-Oxim-Cytidin (41)

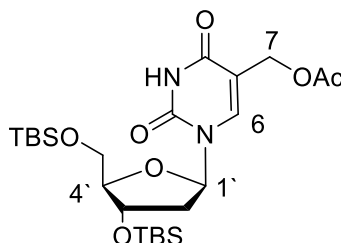
5-Formylcytidin **45** (10 mg, 39 μmol , 1.0 eq.) wurde in 9.7 mL Wasser gelöst. Anschließend wurde eine wässrige Anillin-Lösung (200 mM, 9.7 mL) und eine wässrige Lösung des Hydroxylamins (46 mM, 840 μL , 39 μmol , 1.0 eq.) zugegeben. Der entstandene pH-Wert betrug etwa 4 - 5. Die Reaktionslösung wurde für 16 h bei 40°C gerührt und anschließend mit Chloroform (1 x 20 mL) extrahiert. Die wässrige Phase, die das Produkt enthält, wurde an der Lyophylle getrocknet. Anschließend wurde das Rohprodukt über RP-HPLC (0 \rightarrow 50% B in 45 min) gereinigt. Das gereinigten fC-Hapten **41** (5.5 mg, 9 μmol) wurde in einer Ausbeute von 24 % isoliert.

$R_t = 24$ min.

HRMS (ESI+): ber. für $\text{C}_{23}\text{H}_{35}\text{N}_{10}\text{O}_7^+$ $[\text{M}]^+$: 587.2685, gef. 587.2680.

^1H NMR (400 MHz, D_2O): δ (ppm) = 8.20 (s, 1H, C5H), 8.15 (s, 1H, N=CH), 8.08 (s, 1H, Triazol-ArH), 7.67 (q, $J = 8.8$ Hz, 4H, 4 x ArH), 5.73 (s, 1H, C1'H), 4.69 – 4.58 (m, 4H, NHCH₂, NOCH₂), 4.36 (d, $J = 6.3$ Hz, 1H, C3'H), 4.14 – 4.12 (s, 3H, C4'H, CH₂N(CH₃)₃), 4.02 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H, C5'H), 3.86 (d, $J = 12.2$ Hz, 1H, C5'H), 3.45 (s, 9H, 3 x N(CH₃)₃).

3.2.3.2 Synthese eines Haptens für Hydroxymethylcytidin

5-Hydroxymethyl-7-(*O*-acetyl)-3',5'-(*O*-*tert*-butyl-dimethylsilyl)-2'-desoxyuridin (46**)**

Zu TBS-geschütztem hmdU **20** (166 mg, 0.34 mmol, 1.0 eq.) in Pyridin (trocken, 8 mL) wurde DMAP (4.1 mg, 0.03 mmol, 0.1 eq.) gegeben. Essigsäureanhydrid (52 mg, 0.51 mmol, 1.5 eq.) wurde hinzugefügt und die Reaktion für 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Entfernen des Lösungsmittels beendet und das Rohprodukt mit gesättigter wässriger NH₄Cl-Lösung (2 x 50 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Ohne weitere Aufreinigung wurden so des Acetyl-geschützten hmdU **46** (152 mg 0.29 mmol) in einer Ausbeute von 85 % erhalten.

$R_f = 0.26$ (*i*Hex:EtOAc 4:1)

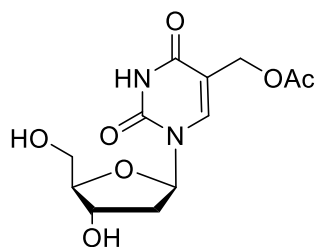
¹H-NMR (400 MHz, Chloroform-*d*): δ (ppm) = 7.82 (s, 1H, C6H), 6.28 (dd, $J = 7.8, 5.8$ Hz, 1H, C1'H), 4.89 – 4.66 (m, 2H, C7H₂), 4.40 (dt, $J = 5.5, 2.6$ Hz, 1H, C3'H), 3.96 (q, $J = 2.9$ Hz, 1H, C4'H), 3.89 – 3.67 (m, 2H, C5'H₂), 2.31 (ddd, $J = 13.2, 5.8, 2.6$ Hz, 1H, C2'H), 2.07 – 1.92 (m, 4H, COCH₃, C2'H), 0.92 – 0.83 (m, 18H, 2 x SiC(CH₃)₃), 0.14 – 0.03 (m, 12H, 2 x Si(CH₃)₂).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 170.94 (OCO), 162.50 (C4), 149.83 (C2), 141.08 (C6), 128.28 (C5), 88.26 (C4'), 85.62 (C1'), 72.45 (C3'), 63.17 (C5'), 59.26 (C7), 41.67 (C2'), 26.04 (SiC(CH₃)), 25.90 (SiC(CH₃)), 25.87 (SiC(CH₃)), 21.09 (COCH₃), 18.53 (C_{tert}), 18.14 (C_{tert}), -4.53 (SiCH₃), -4.71 (SiCH₃), -5.30 (SiCH₃), -5.35 (SiCH₃).

HRMS (ESI⁺): ber. für C₂₄H₄₄N₂O₇Si₂Na [M+Na]⁺: 551.2579, gef. 551.2578

Schmelzbereich: 203 – 205 °C

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3180 (w), 3054 (w), 2953 (m), 2930 (m), 2886 (w), 2857 (m), 2361 (w), 1721 (s), 1695 (s), 1471 (m), 1372 (w), 1249 (m), 1197 (m), 1092 (m), 1026 (m), 970 (m), 888 (w), 831 (s), 775 (s).

5-Hydroxymethyl-7-(*O*-Acetyl)-2'-desoxyuridin (47**)**

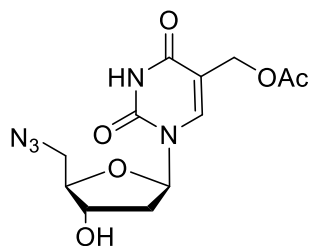
Das TBS- und acetyl-geschütztes hmdU **46** (152 mg, 0.29 mmol, 1.0 eq.) wurde in EtOAc (10 mL) in einem Polypropylengefäß gelöst und HF·Pyridin (70 % HF, 263 μ L, 5.80 mmol, 20 eq.), sowie Pyridin (37 μ L, 2.90 mmol, 10 eq.) zugegeben. Die Reaktion wurde nach 24 h Rühren bei Raumtemperatur durch Zugabe von TMSOMe (1.5 mL, 10.88 mmol, 37 eq.) beendet und der ausgefallene Feststoff durch Zentrifugation (4000 rpm, 0 °C, 15 min) abgetrennt. Man erhielt das Nukleosid **47** (73.3 mg, 0.26 mmol) in einer Ausbeute von 90 %

$R_f = 0.3$ (*i*Hex/EtOAc 1:1)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, Methanol- d_4): δ (ppm) = 8.18 (s, 1H, C6H), 6.28 (t, $^3J = 6.6$ Hz, 1H, C1'H), 4.84 – 4.79 (m, 2H, C7H₂), 4.40 (dt, $^3J = 6.6, 3.5$ Hz, 1H, C3'H), 3.94 (q, $^3J = 3.3$ Hz, 1H, C4'H), 3.82 (dd, $^2J = 12.0$ Hz, $^3J = 3.1$ Hz, 1H, C5'H), 3.74 (dd, $^2J = 12.0$ Hz, $^3J = 3.1$ Hz, 1H, C5'H), 2.32 (ddd, $^2J = 13.6$ Hz, $^3J = 6.2, 3.6$ Hz, 1H, C2'H), 2.21 (ddd, $J = 13.4, 7.1, 6.2$ Hz, 1H, C2'H), 2.04 (s, 3H, COCH₃).

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, MeOD): δ (ppm) = 172.60 (OCO), 164.79 (C4), 151.94 (C2), 142.53 (C6), 110.03 (C5), 88.80 (C4'), 86.49 (C1'), 71.89 (C3'), 62.54 (C5'), 60.25 (C7), 41.51 (C2'), 20.87 (COCH₃).

HRMS (ESI⁺): ber. für C₁₂H₁₆N₂O₇Na⁺ [M+Na]⁺: 323.9850, gef. 323.0847.

5-Hydroxymethyl-7-(*O*-acetyl)-5'-azid-2'-desoxyuridin (48)

Das Nukleosid **47** (316 mg, 1.05 mmol, 1.0 eq.) wurde in DMF (trocken, 5 mL) gelöst, bevor PPh₃ (250 µL, 1.05 mmol, 1.0 eq.), Natriumazid (328 mg, 5.04 mmol, 4.8 eq.) und CBr₄ (348 mg, 1.05 mmol, 1.0 eq.) zugegeben wurden. Nach 2 h Rühren bei RT wurde Methanol (1 mL) zugegeben und für weitere 23 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt über MgSO₄ getrocknet. Die Reinigung erfolgte säulenchromatographisch (DCM/MeOH 15:1) und man erhielt das Azid **48** (220 mg, 0.676 mmol) als farblosen Feststoff in einer Ausbeute von 64 %.

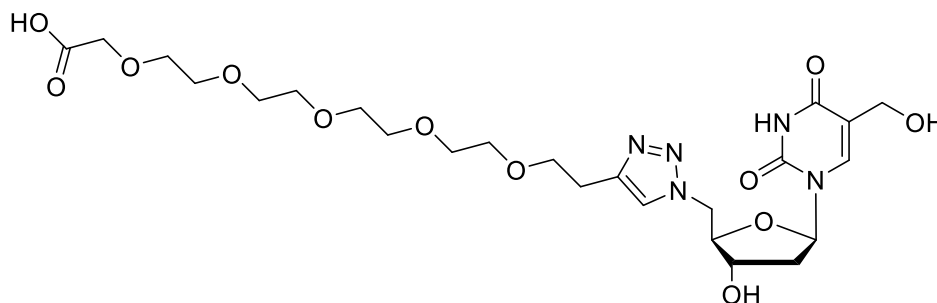
R_f = 0.5 (DCM/MeOH 10:1)

¹H-NMR (400 MHz, Chloroform-*d*): δ (ppm) = 7.75 (s, 1H, C6H), 6.16 (td, ³J = 6.5, 3.6 Hz, 1H, C1'H), 4.78 (s, 2H, C7H₂), 4.33 – 4.21 (m, 1H, C3'H), 3.93 (t, ³J = 3.9 Hz, 1H, C4'H), 3.58 (s, 1H, C5'H), 3.52 (dt, ²J = 13.3 Hz, ³J = 3.9 Hz, 1H, C5'H), 2.31 (ddd, ²J = 13.9 Hz, ³J = 6.5, 4.3 Hz, 1H, C2'H), 2.12 (ddd, ²J = 13.5, ³J = 6.6, 3.7 Hz, 1H, C2'H), 1.99 (s, 3H, COCH₃).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 171.58 (OCO), 163.02 (C4), 150.29 (C2), 140.85 (C6), 109.57 (C5), 85.20 (C4'), 84.72 (C1'), 70.77 (C3'), 58.98 (C5'), 52.06 (C7), 40.24 (C2'), 20.87 (COCH₃).

HRMS (ESI⁻): ber. für C₁₂H₁₄N₅O₆⁻ [M-H]⁻: 324.0950, gef. 324.0946.

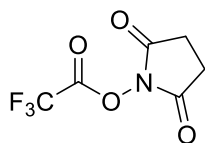
5-Hydroxymethyl-7-(*O*-acetyl)-5'-((1,2,3-triazol-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadecansäure)-2'-desoxyuridin (49 a**)**



5-Hydroxymethyl-7-(*O*-acetyl)-5'-azido- 2'-desoxyuridin **48** (27 mg, 82 μmol , 1.0 eq.) wurde in einem Gemisch aus THF und H_2O (1:1, 1mL) gelöst und einmal entgast. Anschließend wurden Alkin-PEG5-Säure (25 mg, 82 μmol , 1.0 eq.) und CuSO_4 (13 mg, 82 μmol , 1.0 eq.) zugegeben. Die Lösung wurde zweimal entgast und dann wurde Natriumascorbat (9.7 mg, 49 μmol , 0.6 eq.) hinzugefügt. Die Reaktionsmischung wurde für 14 h bei RT gerührt und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Zur Abspaltung der Acetyl-Schutzgruppe wurde anschließend eine Lösung aus KOH in MeOH und Wasser (1M, 19:1, 5 mL) zugegeben und für 4 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt über Umkehrphasen-HPLC aufgereinigt (0 \rightarrow 25 % B, Puffersystem: 0.25 M NH_4COOH , A: in Wasser, B in 80 % MeCN). So wurde das Produkt **49 a** als farbloser Feststoff (20 mg, 32 μmol , 39 %) gewonnen.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, Methanol- d_4): δ (ppm) = 8.55 (s, 1H, ArH), 8.05 (s, 1H, C6H), 6.40 – 6.28 (m, 1H, C1'H), 4.81 – 4.72 (m, 1H, C3'H), 4.70 (d, $J = 8.6$ Hz, 3H, CH_2COOH C4'H), 4.42 – 4.26 (m, 3H, C5'H, C7H₂), 4.14 (dt, $J = 7.8, 4.2$ Hz, 1H, C5'H), 3.77 – 3.48 (m, 16H, 4 x $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 2.39 (t, $^2J = 6.2$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{C}=\text{C}$), 2.30 – 2.06 (m, 2H, C2'H).

HRMS (ESI⁺): ber. für $\text{C}_{24}\text{H}_{37}\text{N}_5\text{O}_{12}\text{Na}^+$ [$\text{M}+\text{Na}$]⁺: 610.2336, gef. 610.23378.

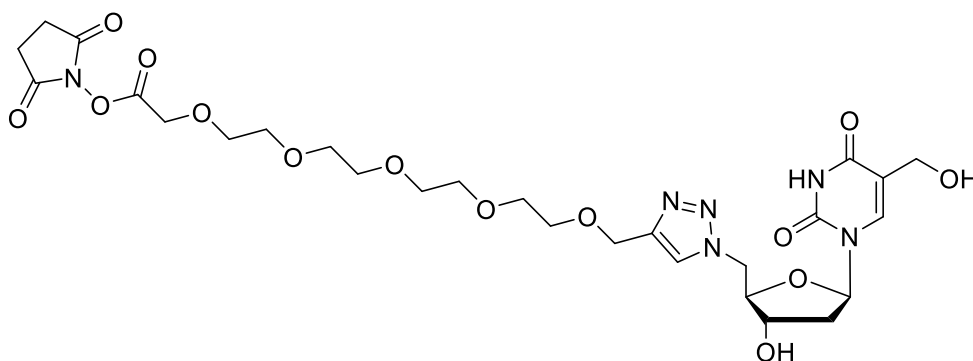
Trifluoressigsäure-*N*-hydroxysuccinimidester (TFA-NHS)

N-Hydroxysuccinimid (2.75 g, 23.89 mmol, 1 eq.) wurde im Argongegenstrom zu Trifluoressigsäureanhydrid (14 mL, 99.32 mmol, 4.16 eq.) gegeben. Nach 4 h Rühren bei RT gerührt wurde das Lösungsmittel am Hochvakuum entfernt und TFA-NHS wurde als farbloser Feststoff (4.61 g, 21.82 mmol) in einer Ausbeute von 91 % erhalten. Das TFA-NHS wurde bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ unter einer Argonatmosphäre gelagert.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 200 MHz): δ (ppm) = 2.59 (s, 4H, 2 x CH_2)

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3012.6 (w, O-H), 1843.4.1 (m), 1790.6 (m), 1737.8 (vs, C=O), 1429.0 (w), 1359.5 (w), 1319.7 (m), 1197.0 (s C-F), 1161.3 (vs C-F), 1078.6 (vs COOR), 1046.4 (vs COOR), 995.3 (m), 871.3 (m), 812.7 (m), 763.0 (m), 751.3 (s), 685.2 (w).

Schmelzbereich = $59.7 - 63.6\text{ }^{\circ}\text{C}$

5-Hydroxymethyl-7-(*O*-acetyl)-5'-(1,2,3-triazol-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadecan-NHS-ester)-2'-desoxyuridin (49 c**)**

Zu einer Lösung aus 5'-PEG-Triazol-hmdU **49 a** (20 mg, 34 μmol , 1.0 eq.) in DMF (trocken, 1.5 mL) wurde frisch hergestelltes NHS-TFA (15 mg, 74 μmol , 2.1 eq.) und Pyridin (trocken, 196 μL , 2.44 μmol , 0.1 eq.) gegeben und die Reaktionsmischung für 3 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde in 20 mL EtOAc aufgenommen und mit 20 mL gesättigter wässriger NaHCO_3 -Lösung gewaschen. Die

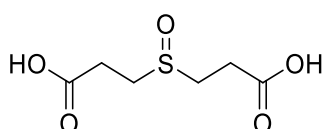
EXPERIMENTELLER TEIL

organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Den so erhaltenen NHS-Ester erhielt man als farbloses Öl in quantitativer Ausbeute. Der NHS-Ester wurde **49 c** ohne weitere Reinigung an Proteine konjugiert.

HRMS (ESI+): ber. für $\text{C}_{27}\text{H}_{39}\text{N}_6\text{O}_{14}^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 671.2519, gef. 671.2521

3.2.4 Synthese von proteomischen Reagenzien

3,3'-Sulfinyldipropionsäure



Zu einer Lösung aus 3,3'-Thiodipropionsäure (2 g, 11.22 mmol, 1 eq.) in Aceton (36.5 mL) wurde H_2O_2 (30 %, 1.26 mL, 12.34 mmol, 1.1 eq.) zugegeben die Reaktionslösung für drei Tage bei 4 °C inkubiert. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand in EtOAc gelöst. Diese Lösung wurde mit Wasser (1 x 150 mL) gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit Ethylacetat (2 x 100 mL) extrahiert. Das Lösungsmittel wurde aus der wässrigen Phase an der Lyophylle entfernt und man erhielt das Sulfoxid als farblosen Feststoff (1.88 g, 9.68 mmol, 86 %).

$R_f = 0.31$ (DCM:MeOH = 20:1).

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 200 MHz): δ (ppm) = 3.18 (m, 2H, CH_2S), 2.99 (m, 2H, CH_2S), 2.79, (t, $^3J = 7.15$ Hz, 4H, 2 x $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$) ppm.

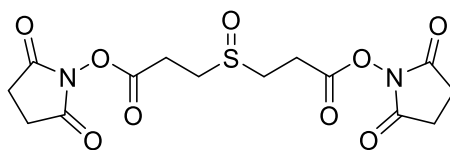
$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 100 MHz): $\delta = 174.38$ (COOH), 47.92 (CH_2S), 27.70 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$) ppm.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 2996.3 (w, O-H), 1714.1 (m, C=O), 1415.5 (w), 1343.4 (w), 1266.9 (w, S=O), 1230.3 (s, S=O), 1208.0 (m, S=O), 1187.2 (s, S=O), 1151.6 (w, S=O), 970.3 (s), 934.2 (s), 911.7 (s), 854.6 (m), 823.6 (s), 797.4 (m)

HRMS (ESI-): ber. für $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5\text{S}^-$ $[\text{M}-\text{H}]^-$: 193.0176, gef.: 193.0176.

Schmelzpunkt = 110.0 °C.

Bis(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl) 3,3'-sulfinyldipropionat (DSSO)



Unter einer Argonatmosphäre wurde zu einer Lösung des Sulfoxids (800 mg, 4.12 mmol) in 10 mL DMF Pyridin (664 μ L, 652 mg, 8.24 mmol, 2 eq.) und NHS-TFA (1.91 g, 9.06 mmol, 2.2 eq.) zugegeben und die Reaktionsmischung für 12 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt, der Rückstand in EtOAc gelöst und mit einer gesättigten wässrigen NaHCO_3 -Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde in einer minimalen Menge an DCM (oder Aceton) gelöst und das Produkt aus Diisopropylether (oder Hexan) gefällt. Man erhielt so DSSO als farblosen, kristallinen Feststoff (640 mg, 1.65 mmol, 40 %).

$R_f = 0.73$ (DCM:MeOH = 20:1).

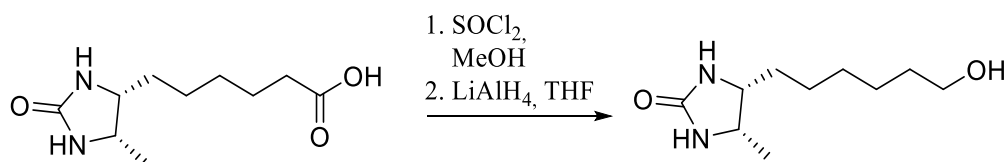
$^1\text{H-NMR}$ (DMSO, 200 MHz): δ (ppm) = 3.21 (m, 2H, 2 x $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$), 3.09 (m, 4H, 2 x $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$), 2.79 (s, 8H, 2 x CH_2CH_2) ppm.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 1779.5 (w), 1727.4 (s, C=O), 1578.6 (w), 1423.6 (w), 1405.6 (w), 1370.4 (w), 1196.8 (m, S=O), 1091.0 (m, COOR), 1065.5 (m, COOR), 1043.5 (m), 992.2 (w), 971.9 (w), 944.5 (w), 902.6 (w), 840.4 (w), 811.3 (w), 767.0 (w), 658.1 (m)

HRMS (ESI+): ber. für $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{O}_9\text{N}_2\text{S}^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 389.0649, gef.: 389.0648.

Schmelzbereich = 144.4 -146.7 $^\circ\text{C}$.

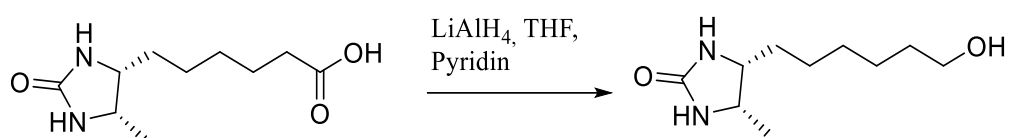
(4R, 5S)-4-(6-Hydroxyhexyl)-5-methylimidazolidin-2-on (61)



Desthiobiotin (250 mg, 1.17 mmol, 1 eq.) wurde in MeOH (trocken, 8 mL) gelöst. Thionylchlorid (250 μ L, 3.5 mmol, 3 eq.) wurde bei 0 $^\circ\text{C}$ langsam zugetropft und die Reaktionslösung für 1.5 h bei RT gerührt. Nach vollständigem Umsatz ($R_f = 0.68$ (DCM:MeOH = 4:1)) wurde die Reaktionsmischung *in vacuo* eingeeengt und

EXPERIMENTELLER TEIL

Thionylchlorid am Hochvakuum über eine zusätzliche Kühlfalle entfernt. Der so erhaltene Methylester wurde in THF (9 mL) gelöst. Anschließend wurde eine Lösung von LiAlH_4 in THF (2.4 M, 2.14 mL, 5.139 mmol, 3.90 eq.) bei 0 °C zu getropft. Die Reaktionslösung wurde für 16 h bei RT gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Methanol und Wasser (2 mL, 1:1) beendet. Na_2SO_4 wurde zugegeben und für 15 min bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde in MeOH/DCM (25 mL, 1:4) gelöst, für 10 min gerührt und abfiltriert. Nach Waschen mit MeOH/DCM (25 mL, 1:4) wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (DCM/MeOH 30:1 \rightarrow 10:1), wodurch das Produkt **61** (230 mg, 1.15 mmol, 88 %) als farbloser Feststoff erhalten wurden.



Nach einer anderen Methode wurde Desthiobiotin direkt reduziert. Hierzu wurde Desthiobiotin (1.0 g, 4.67 mmol, 1.0eq.) in 40 mL THF und 10 mL Pyridin gelöst. Zu dieser Lösung wurde eine Lösung aus LiAlH_4 in THF (2.4 M, 5.8 mL, 3.0 eq.) bei 0 °C getropft. Nach 30 min Rühren bei 0 °C wurde die Reaktionsmischung für 4 h refluxiert. Anschließend wurde die Reaktionslösung auf 0 °C abgekühlt und in ein großes Reaktionsgefäß überführt. Restliches LiAlH_4 wurde durch tropfenweise Zugabe von Wasser und MeOH vernichtet. Zusätzliches Wasser (100 mL) wurde zugegeben. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt durch Säulenchromatographie (DCM/MeOH 30:1 \rightarrow 10:1) gereinigt. Man erhielt den Alkohol **61** (200 mg, 4.49 mmol) als leicht orangenen Feststoff in einer Ausbeute von 96 %.

$R_f = 0.68$ (DCM:MeOH 4:1).

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 400 MHz): δ (ppm) = 3.81 (m, 1 H, CH_3CHCH), 3.69 (m, 1 H, CH_3CHCH), 3.54 (t, $^3J = 6.15$ Hz, 2 H, CH_2OH), 1.44 (m, 10 H, $5 \times \text{CH}_2$), 1.10 (d, $^3J = 6.35$ Hz, 3 H, CH_3) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 100 MHz): δ (ppm) = 166.24 (NCON), 62.92 ($(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH})$), 57.50 (CHCH_2), 52.53 (CHCH_3), 33.56 (CH_2), 30.85 (CH_2), 30.62 (CH_2), 27.48 (CH_2), 26.84 (CH_2), 15.61 (CH_3).

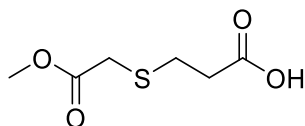
EXPERIMENTELLER TEIL

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3375.9 (m, O-H), 3271.8 (m, O-H), 2937.3 (m, CH₂), 2920.8 (m, CH₂), 2904.7 (m, CH₂), 2849.1 (m, C-H), 1679.7 (s, C=O), 1643.6 (s, C=O), 1443.8 (s, CH₂), 1059.1 (s), 1049.7 (s, C-O), 1010.1 (w, C-O), 978.3 (m), 776.1 (m), 723.8 (m, R₂CH₂), 681.0 (m).

HRMS (ESI⁺): ber. für C₁₀H₂₀N₂O₂Na⁺ [M+Na]⁺: 223.1422, gef.: 223.1422.

Schmelzbereich = 85.6 – 87.2 °C.

3-((2-Methoxy-2-oxoethyl)thio)propansäure (**62**)

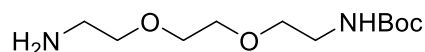


3-Mercaptopropionsäure (2.5 mL, 35 mmol, 1 eq.) wurde in THF (20 mL) gelöst und NEt₃ (3.54 mL, 35 mmol, 1 eq.) wurde zugegeben. Bromessigsäuremethylester (3.6 mL, 35 mmol, 1 eq.) wurde bei 0 °C zugetropft und die Reaktionsmischung bei RT gerührt. Nach 10 min bildete sich ein farbloser Niederschlag aus. Nach 14 h Rühren bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt, der Rückstand wurde in DCM (50 mL) gelöst und mit gesättigter NaCl-Lösung (2 x 30 mL) gewaschen. Die organische Phasen wurde über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Man erhielt so den Thioether **62** (4.01 g, 22.5 mmol) ohne weitere Aufreinigung als farbloses Öl in einer Ausbeute von 79 %.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 3.71 (s, 3H, COOCH₃), 3.21 (s, 2H, SCH₂), 2.87 (t, 2H, ³J = 7.2Hz CH₂COOH), 2.67 (t, 2H, ³J = 7.2Hz, SCH₂CH₂)

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 177.14 (COOH), 171.00 (COOMe), 52.60 (CH₃), 34.10 (SCH₂CH₂), 33.45 (CH₂S), 27.98 (SCH₂CH₂).

HRMS (ESI⁻): ber. für C₆H₉O₄S⁻ [M-H]⁻: 177.0227, gef.: 177.0227.

***N*-Boc-2,2'-(ethylenedioxy)diethylamin**

N-Boc-2,2'-(ethylenedioxy)diethylamin wurde nach einer Literaturvorschrift synthetisiert.^[136] Zu einer Lösung aus 1,2-Bis(2-aminoethoxy)ethan (2.0 g, 13.7 mmol, 3 eq.) und DIPEA (0.8 mL, 4.6 mmol, 1 eq.) in 30 mL trockenem DCM wurde eine Lösung aus Boc₂O (1.0 g, 4.6 mmol, 1 eq.) in 30 mL DCM bei 0 °C über einen Tropftrichter langsam (innerhalb von 2 h) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde bei RT über Nacht gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt über Säulenchromatographie (DCM/MeOH/NH₄OH 20:1:0.1%) gereinigt. Man erhielt so das einfach Boc-geschützte Amin als farbloses Öl (1.0 g, 4.03 mmol, 88 %).

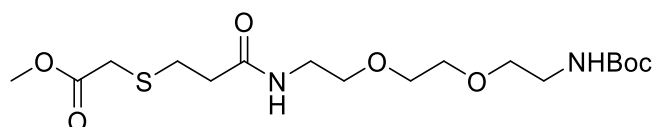
$R_f = 0.27$ (DCM:MeOH:NH₄OH = 4:1:0.1%).

¹H-NMR (400 MHz, Chloroform-*d*): δ (ppm) = 3.59 (s, 4H, OCH₂CH₂O), 3.51 (dt, $J = 8.2, 5.1$ Hz, 4H, NH₂CH₂CH₂O, OCH₂CH₂NHBoc), 3.29 (q, $J = 5.4$ Hz, 2H, CH₂NH₂), 2.86 (t, $J = 5.2$ Hz, 2H, CH₂NHBoc), 2.13 (s, 2H, NH₂), 1.41 (s, 9H, 3xCH₃).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 156.16 (NHCO), 79.28 (C_{tert}), 73.20 (CH₂CH₂NH₂, CH₂CH₂NH), 70.32 (OCH₂CH₂O), 70.25 (OCH₂CH₂O), 41.65 (CH₂NHBoc), 40.39 (CH₂NH₂), 28.50 (C(CH₃)₃).

HRMS (ESI⁺): ber. für C₁₁H₂₅O₄N₂⁺ [M+H]⁺: 349.1809, gef.: 349.18077.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3540, 2869, 1712.

3-((2-Methoxy-2-oxoethyl)thio)propansäure-*N*-Boc-2,2'-(ethylenedioxy)diethylamid (63)

Der Thioether **62** (468 mg, 2.73 mmol) wurde in DMF (trocken, 10 mL) gelöst und EDC·HCl (575 mg, 3.00 mmol, 1.1 eq.) wurde zugegeben. Die Lösung wurde für 15 min bei RT gerührt, bevor *N*-Boc-2,2'-(ethylenedioxy)diethylamin (678 mg, 2.73 mmol, 1 eq.) und DMAP (99 mg, 0.82 mmol, 0.3 eq.) hinzugegeben wurden. Nach 16 h Rühren bei RT wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt, der Rückstand in 100 mL DCM gelöst und zweimal mit 80 mL gesättigter

EXPERIMENTELLER TEIL

NaCl-Lösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH/ NEt_3 40:1:0.1%) erhielt man das Amidierungsprodukt **63** als gelbliches Öl (821 mg, 2.03 mmol) in einer Ausbeute von 74 %.

$R_f = 0.43$ (DCM:MeOH 10:1)

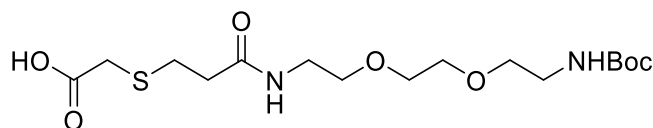
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 3.71 (s, 3H, CH_3), 3.59 – 3.58 (m, 4H, $2 \times \text{OCH}_2\text{CH}_2$), 3.55 – 3.52 (m, 4H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.48 – 3.40 (m, 2H, CH_2NHCO), 3.29 (m, 2H, CH_2NHBoc), 3.25 (s, 2H, COCH_2S), 2.91 (t, $^3J = 7.1$ Hz, 2H, $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 2.50 (t, $^3J = 7.1$ Hz, 2H, $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 1.42 (s, 9H, $3 \times \text{CH}_3$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 171.07 (CH_2CON), 162.63 (CH_2COO), 156.17 (NCOO), 79.55 (C_{tert}), 70.41 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 70.30 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 70.23 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 69.98 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$), 52.54 (COCH_3), 40.58 (CH_2NHCO), 39.49 (CH_2NHBoc), 36.19 ($\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 33.86 (COCH_2S), 28.74 ($\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 28.50 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

HRMS (ESI+): ber. für $\text{C}_{17}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{O}_7\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 409.2003, gef.: 409.2006.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3322 (br w), 2868 (m), 2102 (s), 1663 (s), 1596 (w), 1492 (s), 1444 (m), 1366 (w), 1247 (m), 1122 (s), 1030 (w), 859 (w), 733 (m), 697 (ss).

3-((Carboxymethyl)thio)propansäure-N-Boc-2,2'-(ethyldioxy)diethylamid (**64**)



Der Methylester **63** (300 mg, 0.735 mmol, 1.0 eq.) wurde in THF (trocken, 5 mL) gelöst und eine wässrige Lösung aus LiOH (1M, 1.5 mL, 1.5 eq.) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 30 min bei RT gerührt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung eingeeengt, der Rückstand mit Wasser verdünnt und mit HCl (1M) angesäuert. Anschließend wurde mit EtOAc (2 x 20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* erhielt man die freie Säure **64** (267 mg, 0.667 mmol) als gelbliches Öl in einer Ausbeute von 92 %.

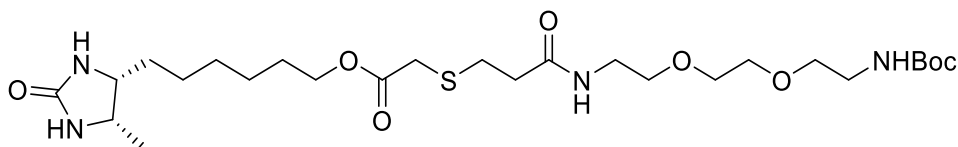
$R_f = 0.27$ (DCM/MeOH 4:1).

EXPERIMENTELLER TEIL

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*): δ (ppm) = 3.75 – 3.60 (m, 4H, 2 x OCH₂CH₂), 3.60 – 3.52 (m, 4H, OCH₂CH₂O), 3.54 – 3.45 (m, 2H, CH₂NHCO), 3.40 – 3.17 (m, 4H, COCH₂S, CH₂NHBoc), 3.00 – 2.87 (m, 2H, SCH₂CH₂CO), 2.65 – 2.45 (m, 2H, SCH₂CH₂CO), 1.46 (s, 9H, C(CH₃)₃).

HRMS (ESI⁻): ber. für C₁₆H₂₉N₂O₇S [M-H]⁺: 393.1701, gef.: 393.1707.

6-((4R,5S)-5-Methyl-2-oxoimidazolidin-4-yl)hexyl 2,2-dimethyl-4,15-dioxo-3,8,11-trioxa-18-thia-5,14-diazaicosan-20-oat (**65**)



Die freie Säure **64** (531 mg, 1.3 mmol) wurde in DMF (trocken, 5 mL) gelöst und EDC·HCl (273 mg, 1.4 mmol, 1.1 eq.) zugegeben. Nach 10 min Rühren bei RT wurde Desthiobiotin-Alkohol **61** (280 mg, 1.4 mmol, 1.1 eq.) und DMAP (47 mg, 0.39 mmol, 0.3 eq.) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 16 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in DCM (30 mL) gelöst. Es wurde mit gesättigter wässriger NaHCO₃-Lösung (2 x 50 mL) gewaschen, die organische Phase über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (DCM/MeOH/NH₄OH 40:1:0.1%). Man erhielt das veresterte Produkt **65** als farbloses bis gelbliches Öl (377 mg, 0.65 mmol, 50 %).

R_f = 0.4 (DCM:MeOH 10:1).

¹H-NMR (400 MHz, Chloroform-*d*): δ (ppm) = 4.11 (t, J = 6.6 Hz, 2H, CH₂CH₂OC=O), 3.82 (dt, 2J = 13.7, 3J = 6.7 Hz, 1H, CH₃CHCHCH₂), 3.73 – 3.65 (m, 1H, CH₃CHCHCH₂), 3.58 (s, 4H, OCH₂CH₂O), 3.56 – 3.52 (m, 4H, NHCH₂CH₂O, OCH₂CH₂NHBoc), 3.49 – 3.41 (m, 2H, CH₂NHCO), 3.33 – 3.28 (m, 2H, CH₂NHBoc), 3.24 (s, 2H, CH₂S), 2.92 (t, 3J = 7.2 Hz, 2H, SCH₂CH₂CO), 2.50 (t, 3J = 7.3 Hz, 2H, SCH₂CH₂CO), 1.68 – 1.58 (m, 2H, CH₂CH₂OCO), 1.53 – 1.18 (m, 17H, 4 x CH₂, 3xCH₃), 1.12 (d, 2J = 6.4 Hz, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 171.18 (NHCO), 170.79 (COO), 163.70 (NHCONH), 156.23 (CONH), 79.46 (C_{tert}), 70.34 (OCH₂CH₂O), 70.27 (OCH₂CH₂O), 70.23 (CH₂CH₂NHCO), 69.96 (CH₂CH₂NHBoc), 65.43 (CH₂CH₂OCO), 56.12 (CHCH₂),

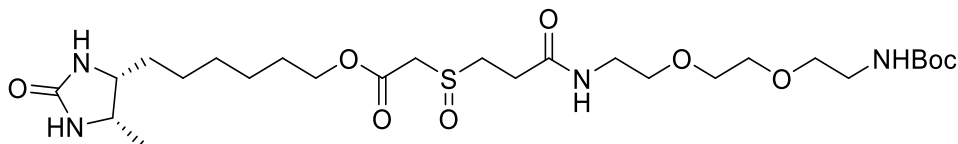
EXPERIMENTELLER TEIL

51.48 (CHCH₃), 40.39 (CH₂NHCO), 39.38 (CH₂NHBoc), 36.21 (SCH₂CH₂CO), 34.09 (CH₂S), 29.68 (CH₂CH₂OCO), 29.12 (SCH₂CH₂CO), 28.59 (CH₂), 28.45 (C(CH₃)₃), 28.35 (CH₂), 26.39 (CH₂), 25.76 (CH₂), 15.85 (CH₃).

HRMS (ESI⁺): ber. für C₂₆H₄₉N₄O₈S [M+H]⁺: 577.3266, gef.: 577.3270

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3301 (br w), 2933 (m), 1694 (s), 1526 (br m), 1452 (m), 1251 (m), 1126 (s), 1040 (w), 916 (w), 862 (w), 773 (w), 727 (s).

6-((4*R*,5*S*)-5-Methyl-2-oxoimidazolidin-4-yl)hexyl 2-((2,2-dimethyl-4,15-dioxo-3,8,11-trioxa-5,14-diazaheptadecan-17-yl)sulfinyl)acetat (**66**)



Der Thioether **65** (462 mg, 0.801 mmol, 1.0 eq.) wurde in CHCl₃ (trocken, 10 mL) gelöst und die Lösung auf 0°C gekühlt. Anschließend wurde *m*CPBA (77 %, 197 mg, 0.881 mmol, 1.1 eq.) zugegeben und die Reaktionsmischung für eine Stunde bei 0°C gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit CHCl₃ verdünnt und mit gesättigter NaHCO₃-Lösung (4 x 20 mL) und gesättigter NaCl-Lösung (1 x 30 mL) gewaschen. Die organische Phase wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie (DCM/MeOH 20:1 + 0.1 % NH₃ aq → DCM/MeOH 10:1 + 0.1 % NH₃ aq → DCM/MeOH 4:1 + 0.1 % NH₃ aq) gereinigt und das Sulfoxid **66** (285 mg, 0.480 mmol) wurde in einer Ausbeute von 60 % isoliert.

R_f = 0.4 (DCM:MeOH 10:1)

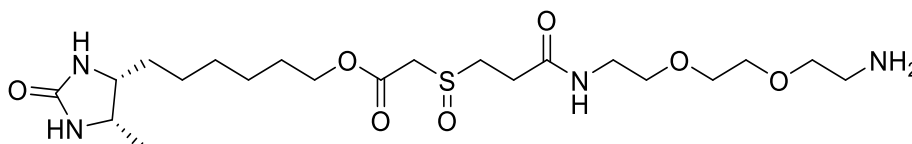
¹H-NMR (400 MHz, Chloroform-*d*): δ (ppm) = 4.19 – 4.06 (m, 2H, CH₂CH₂OC=O), 3.78 – 3.59 (m, 2H CH₃CHCH₂), 3.55 (s, 4H, OCH₂CH₂O), 3.52 – 3.48 (m, 6H, CH₂S, NHCH₂CH₂O, OCH₂CH₂NHBoc), 3.50 – 3.43 (m, 2H, CH₂NHCO), 3.30 – 3.13 (m, 3H, SCHHCH₂CO, CH₂NHBoc), 3.06 (dt, ³*J* = 12.9, 6.3 Hz, 1H, SCHHCH₂CO), 2.75 – 2.64 (m, 2H, SCH₂CH₂CO), 1.65 – 1.52 (m, 2H, CH₂CH₂OCO), 1.45 – 1.14 (m, 17H, 4xCH₂, C(CH₃)₃), 1.06 (d, ²*J* = 6.5 Hz, 3H, CH₃).

EXPERIMENTELLER TEIL

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 170.44, 170.10 (NHCO), 165.24 (COO), 163.81 (NHCONH), 156.17 (CONH), 79.32 (C_{tert}), 70.29 (OCH₂CH₂O), 70.25 (OCH₂CH₂O), 69.74 (CH₂CH₂NHCO), 66.06 (CH₂CH₂NHBoc), 65.96 (CH₂CH₂OCO), 56.14 (CHCH₂), 56.10, 51.44 (CHCH₃), 47.96 (SCH₂CH₂), 40.36 (CH₂NHCO), 39.50 (CH₂NHBoc), 29.51 (CH₂), 28.54 (SCH₂CH₂), 28.48 (C(CH₃)₃), 28.17 (CH₂), 26.25 (CH₂), 25.54 (CH₂), 15.87, 15.80 (CH₃).

HRMS (ESI+) ber. für C₂₆H₄₉N₄O₉S [M+H]⁺: 593.3215, gef.: 593.3218.

6-((4R,5S)-5-Methyl-2-oxoimidazolidin-4-yl)hexyl 2-((3-((2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)ethyl)amino)-3-oxopropyl)sulfinyl)acetat (67)



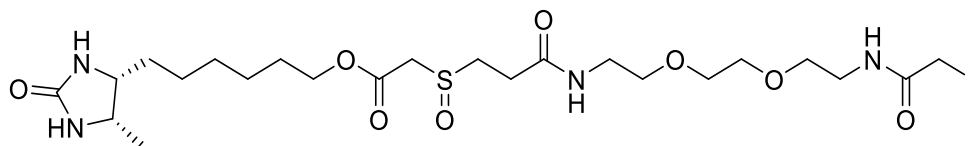
Das Sulfoxid **66** (56 mg, 0.092 mmol) wurde in DCM (trocken, 1.5 mL) gelöst und 200 μ L TFA zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 1.5 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und sorgfältig am Hochvakuum getrocknet, um restliches TFA zu entfernen. Anschließend wurde der ölige Rückstand in einer minimalen Menge an DCM gelöst und mit eisgekühltem Diethylether (mindestens 50 mL) in einem Zeitraum von 2 h bei -20 °C gefällt. Der Überstand wurde abdekantiert und das Produkt getrocknet. Man erhielt so das freie Amin **67** als farblosen Feststoff (42 mg, 0.085 mmol) in einer Ausbeute von 93 %.

R_f = 0.06 (DCM:MeOH 10:1)

¹H NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄): δ (ppm) = 4.22 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, CH₂CH₂OCO), 3.84 – 3.80 (m, 2H, CHCH), 3.74 – 3.62 (m, 8H, OCH₂CH₂O, OCH₂CH₂NH, CH₂S), 3.57 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, CH₂NHCO), 3.40 (q, *J* = 5.7 Hz, 2H, OCH₂CH₂NH₂), 3.13 – 3.06 (m, 2H, SCH₂CH₂CO), 2.72 (m, 2H, SCH₂CH₂CO), 1.70 (m, 2H, CH₂CH₂OCO), 1.55 – 1.27 (m, 8H, 4xCH₂), 1.11 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H, CH₃).

HRMS (ESI+) ber. für C₂₁H₄₁N₄O₇S [M+H]⁺: 493.2690, gef.: 493.2695.

6-((4R,5S)-5-Methyl-2-oxoimidazolidin-4-yl)hexyl 2-((1-iodo-2,13-dioxo-6,9-dioxa-3,12-diazapentadecan-15-yl)sulfinyl)acetat (60)



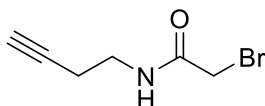
Das Amin **67** (200 mg, 0.41 mmol, 1.0 eq.) wurde in DMF gelöst, mit DIPEA (78 μ L, 0.45 mmol, 1.1 eq.) versetzt und für 10 min bei RT gerührt. Anschließend wurde Iodessigsäureanhydrid (174 mg, 0.49 mmol, 1.2 eq.) zugegeben und die Reaktionsmischung für 14 h im Dunkeln bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Nach Aufreinigung per RP-HPLC (0 \rightarrow 80 % MeCN, 0.1% FA) wurde das Iodacetamid-Reagenz **60** (80 mg, 0.121 mmol) als gelbliches Öl in einer Ausbeute von 30 % erhalten.

R_t = 26 min.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O): δ (ppm) = 4.13 (t, J = 6.4 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCO}$), 3.76 (q, J = 6.9 Hz, 1H, CHCH), 3.69 – 3.64 (m, 1H, CHCH), 3.63 (s, 2H, CH_2I), 3.56 (s, 4H, $\text{SCH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 3.51 (q, J = 5.1 Hz, 4H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.34 – 3.25 (m, 4H, $2 \times \text{CH}_2\text{NHCO}$), 3.23 – 3.04 (m, 2H, $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 2.66 (t, J = 7.2 Hz, 2H, $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 1.63 – 1.49 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCO}$), 1.32 – 1.08 (m, 8H, $4 \times \text{CH}_2$), 0.98 (d, J = 6.5 Hz, 3H, CH_3).

HRMS (ESI $^+$): ber. für $\text{C}_{23}\text{H}_{42}\text{IN}_4\text{O}_8\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 661.1763, gef.: 661.1760.

2-Brom-*N*-(but-3-yn-1-yl)acetamid (71)



Bromessigsäure (200 mg, 1.44 mmol) wurde in THF (trocken, 2 mL) gelöst und *N*-Methylmorpholin (158 μ L, 1.44 mmol, 1.0 eq.) wurde zugegeben. Anschließend wurde Chlorameisensäureisopropylether (188 μ L, 1.44 mmol, 1 eq.) langsam zugegeben, wobei eine leichte Erwärmung auftrat und sich ein milchiger Niederschlag bildete. Die Reaktionsmischung wurde für 20 min bei RT gerührt, bevor 4-Aminobut-1-in (117 μ L, 1.44 mmol, 1.0 eq.) zugegeben wurde. Die Reaktionsmischung wurde für 16 h bei Raumtemperatur gerührt und das

EXPERIMENTELLER TEIL

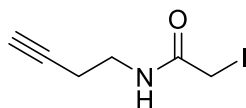
Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde in DCM (50 mL) gelöst und mit HCl (2M, 1 x 20 mL) und gesättigter wässriger NaHCO₃-Lösung (1 x 20 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Nach säulenchromatischer Aufreinigung (*i*Hex/EtOAc 3:1 → 1:1) erhielt man 2-Brom-*N*-(but-3-yn-1-yl)acetamid **71** (95 mg, 0.49 mmol, 35 %) als beigen Feststoff.

$R_f = 0.8$ (*i*Hex/EtOAc 1:1)

¹H-NMR (400 MHz, Chloroform-*d*): δ (ppm) = 3.97 (d, $^2J = 69.0$ Hz, 2H, COCH₂Br), 3.48 – 3.41 (m, 2H, CH₂NH), 2.45 – 2.41 (m, 2H, CH₂CH₂NH), 2.04 (t, $^3J = 2.6$ Hz, 1H, C≡CH).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 165.79 (d, $J = 48.8$ Hz, C=O), 80.87 (d, $J = 4.7$ Hz, C≡CH), 70.54 (C≡CH), 42.71 (CH₂NH), 38.51 (d, $J = 37$ Hz, COCH₂Br), 19.31 (CH₂CH₂NH).

2-Iod-*N*-(but-3-yn-1-yl)acetamid (**70**)



2-Iod-*N*-(but-3-yn-1-yl)acetamid **70** wurde nach zwei unterschiedlichen Vorschriften synthetisiert.

(A) 2-Brom-*N*-(but-3-yn-1-yl)acetamid **71** (41 mg, 0.218 mmol) wurde in Aceton (2 mL) gelöst und NaI (324 mg, 2.18 mmol, 10 eq.) wurde hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 4 h bei 45 °C gerührt und anschließend für 2 Tage bei RT gerührt. Ausgefallenes NaBr wurde abfiltriert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde in DCM (30 mL) gelöst und mit gesättigter wässriger NaCl-Lösung (2 x 20 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Man erhielt so das iodierte Produkt **70** (45 mg, 0.189 mmol, 88 %) als hell-braunen Feststoff.

(B) 4-Aminobut-1-in (200 μ L, 2.44 mmol, 1.0 eq.) wurde in DMF (4 mL) gelöst. DIPEA (1.6 mL, 9.76 mmol, 4 eq.) und Iodessigsäureanhydrid (863 mg, 2.44 mmol, 1.0 eq.) wurden zugegeben und die Reaktionslösung wurde für 4 h bei RT im Dunkeln gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (DCM/MeOH 80:1 → 40:1) aufgereinigt. Das Produkt **70** (506 mg, 2.1 mmol) wurde als hell-braunen Feststoff in einer Ausbeute von 87 % gewonnen.

EXPERIMENTELLER TEIL

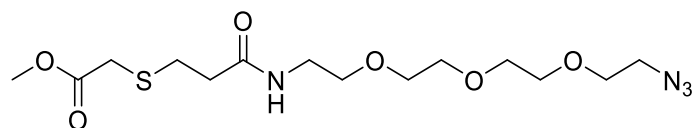
$R_f = 0.5$ (iHex/EtOAc 1:1)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, Chloroform-*d*): δ (ppm) = 3.72 (s, 2H, COCH₂I), 3.43 (q, $J = 6.3$ Hz, 2H, CH₂NH), 2.43 (td, $J = 6.4, 2.6$ Hz, 2H, CH₂CH₂NH), 2.05 (t, $J = 2.6$ Hz, 1H, C≡CH)

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 166.96 (C=O), 81.16 (C≡CH), 70.57 (C≡CH), 38.98 (CH₂NH), 19.22 (CH₂CH₂NH), -0.56 (COCH₂I)

HRMS (EI+): ber. für C₆H₈INO⁺ [M]⁺: 236.9651, gef.: 236.9961.

3-((2-Methoxy-2-oxoethyl)thio)propansäure-11-Azido-3,6,9-trioxaundecan-1-amid (72)



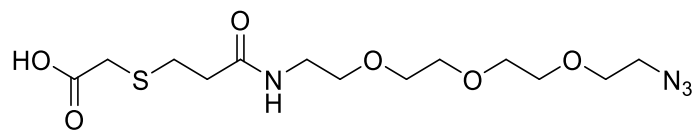
Das 3-((2-Methoxy-2-oxoethyl)thio)propansäure **62** (1 g, 5.61 mmol) wurde in DMF (trocken, 5 mL) gelöst und EDC·HCl (1.07 g, 5.61 mmol, 1 eq.) wurde zugegeben. Nach Rühren für 20 min bei RT wurden 11-Azido-3,6,9-trioxaundecan-1-amin (1.1 mL, 5.61 mmol, 1.1 eq.) und DMAP (204 mg, 1.68 mmol, 0.3 eq.) zugegeben und für 16 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt. Man erhielt so das amidierete Produkt als farbloses Öl **72** (1.2 g, 3.17 mmol, 56 %).

$R_f = 0.91$ (DCM:MeOH 4:1).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, Chloroform-*d*): δ (ppm) = 3.66 (s, 3H, CH₃), 3.63 – 3.52 (m, 10H, 2xOCH₂CH₂O, CH₂CH₂N₃), 3.50 – 3.47 (m, 2H, NHCH₂CH₂O), 3.42 – 3.34 (m, 2H, NHCH₂CH₂O), 3.32 (t, $J = 5.0$ Hz, 2H, CH₂CH₂N₃), 3.20 (s, 2H, CH₂S), 2.85 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, SCH₂CH₂), 2.42 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, SCH₂CH₂).

HRMS (ESI+) [M+H]⁺: ber. für C₁₄H₂₇N₄O₆S [M+H]⁺: 379.1646, gef.: 379.1640.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3303 (w), 2780 (m), 2100 (s), 1713 (w), 1650 (w), 1487 (w), 1442 (w), 1366 (w), 1346 (w), 1281 (m), 1101 (s), 939 (w), 851 (w), 744 (w), 701 (m), 675 (m)

1-Azido-13-oxo-3,6,9-trioxa-16-thia-12-azaoctadecan-18-onsäure (73)

Der Methylester **72** (60 mg, 0.16 mmol, 1.0 eq.) wurde in THF (trocken, 1 mL) gelöst und eine LiOH-Lösung (1M, 0.76 mL, 0.76 mmol, 4.8 eq.) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung eingeeengt, der Rückstand in EtOAc gelöst und mit Wasser (1 x 15 mL) gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit 2M HCl angesäuert und mit EtOAc (1 x 20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Man erhielt so die freie Säure **73** (40 mg, 0.109 mmol) als farbloses Öl in einer Ausbeute von 70 %.

$R_f = 0.31$ (DCM:MeOH 4:1)

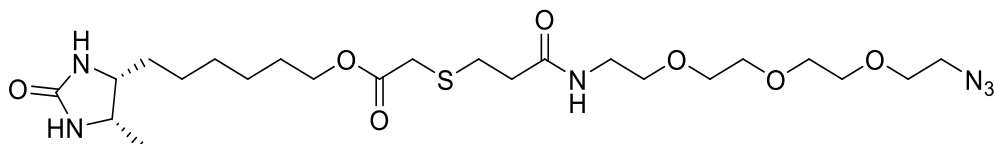
¹H-NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄): δ (ppm) = 3.59 – 3.55 (m, $J = 4.6$ Hz, 8H, 2 x OCH₂CH₂O), 3.54 – 3.50 (m, 2H, OCH₂CH₂N₃), 3.48 – 3.44 (m, 2H, NHCH₂CH₂O), 3.29 – 3.26 (m, 4H, NHCH₂CH₂O, CH₂CH₂N₃), 3.18 (s, 2H, CH₂S), 2.79 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, SCH₂CH₂), 2.43 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, SCH₂CH₂).

¹³C-NMR (101 MHz, MeOD): δ (ppm) = 173.95 (COOH), 172.82 (CONH), 71.62, 71.58, 71.47, 71.27, 71.09, 70.53 (2xOCH₂CH₂O, CH₂CH₂N₃), 51.74 (CH₂CH₂N₃), 48.36 (CH₂CH₂N₃), 40.47 (NHCH₂CH₂O), 36.63 (SCH₂CH₂), 33.93 (CH₂S), 29.30 (SCH₂CH₂).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3291 (w), 2870 (m), 2098 (s), 1646 (m), 1591 (w), 1556 (m), 1420 (w), 1346 (w), 1282 (w), 1099 (ss), 937 (w), 851 (w).

HRMS (ESI⁻): ber. für C₁₃H₂₅N₄O₆S [M-H]⁻: 363.1344, gef.: 363.1349.

6-((4R,5S)-5-Methyl-2-oxoimidazolidin-4-yl)hexyl 1-azido-13-oxo-3,6,9-trioxa-16-thia-12-azaoctadecan-18-olat (74)



Das Edukt **73** (531 mg, 1.3 mmol, 1.0 eq.) wurde in DMF (trocken, 2 mL) gelöst und EDC·HCl (273 mg, 1.4 mmol, 1.2 eq.) sowie Desthiobiotin-Alkohol **61** (280 mg, 1.4 mmol, 1.4 eq.) und DMAP (47 mg, 0.39 mmol, 0.3 eq.) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 16 h bei RT gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* wurde der Rückstand in EtOAc (50 mL) aufgenommen und mit einer gesättigten NaHCO₃-Lösung (1 x 50 mL) gewaschen. Das Produkt **74** (377 mg, 0.65 mmol, 50 %) konnte nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH/NH₄OH 40:1:0.1 %) als farbloses Öl erhalten werden.

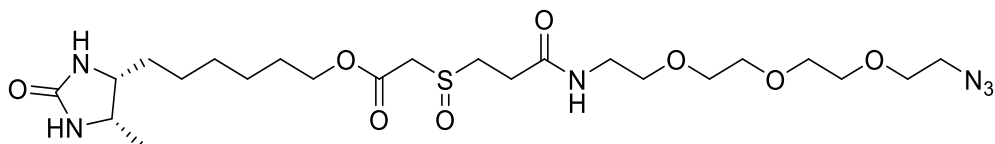
$R_f = 0.5$ (DCM:MeOH 10:1).

¹H-NMR (400 MHz, Chloroform-*d*): δ (ppm) = 6.41 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H, CONH), 5.14 (s, 1H, NH), 4.76 (s, 1H, NH), 4.15 – 4.07 (m, 2H, CH₂OCO), 3.82 (m, 1H, CH₃CHCHCH₂), 3.72 – 3.60 (m, 11H, CH₃CHCHCH₂, CH₂CH₂N₃, 2xOCH₂CH₂O), 3.56 – 3.54 (m, 2H, NHCH₂CH₂O), 3.47 – 3.42 (m, 2H, NHCH₂CH₂O), 3.38 (t, $J = 5.0$ Hz, 2H, CH₂CH₂N₃), 3.24 (s, 2H, CH₂S), 2.92 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, SCH₂CH₂), 2.49 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, SCH₂CH₂), 1.67 – 1.58 (m, 2H, CH₂CH₂OCO), 1.56 – 1.16 (m, 8H, CH₂CH₂), 1.12 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 170.92 (CONH), 170.70 (COO), 163.55 (NHCONH), 70.79, 70.70, 70.65, 70.32 (2xOCH₂CH₂O), 70.16, 69.89, (CH₂CH₂NH, CH₂CH₂N₃), 65.44 (CH₂CH₂OC=O) 56.12 (CH₃CHCHCH₂), 51.46 (CH₃CHCHCH₂), 50.75 (CH₂CH₂N₃), 39.40 (NHCH₂CH₂O), 36.23 (SCH₂CH₂), 34.14 (CH₂S), 29.71 (CH₂CH₂OC=O), 29.17 (SCH₂CH₂), 28.67 (CH₂), 28.49 (CH₂), 26.41 (CH₂), 25.77 (CH₂), 15.87 (d, CH₃).

HRMS (ESI⁺): ber. für C₂₃H₄₃N₆O₇S⁺ [M+H]⁺: 547.2908, gef.: 547.2913.

6-((4R,5S)-5-Methyl-2-oxoimidazolidin-4-yl)hexyl 2-((1-azido-13-oxo-3,6,9-trioxa-12-azapentadecan-15-yl)sulfinyl)acetat (75)



Der Thioether **74** (50 mg, 0.091 mmol, 1.0 eq.) wurde in trockenem CHCl_3 (5 mL) gelöst und die Lösung auf 0°C gekühlt. Anschließend wurde *m*CPBA (77 %, 19.7 mg, 0.091 mmol, 1.0 eq.) zugegeben und für 30 min bei 0°C gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit CHCl_3 verdünnt und mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung (5 x 15 mL) gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde über Säulenchromatographie (DCM/MeOH/ NH_4OH 30:1:0.1 % \rightarrow 10:1: 0.1%) gereinigt. Das Sulfoxid **75** (36 mg, 0.064 mmol, 70 %) wurde als farbloses Öl erhalten.

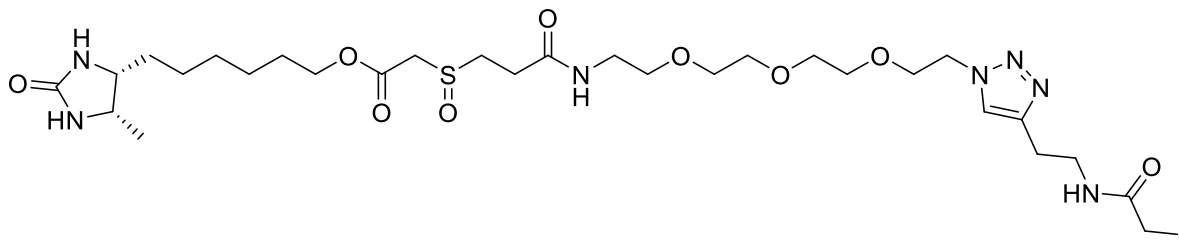
$R_f = 0.42$ (DCM:MeOH 10:1).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, Chloroform-*d*): δ (ppm) = 6.91 – 6.64 (m, 1H, CONH), 5.01 (d, $J = 15.2$ Hz, 1H, NH), 4.34 (s, 1H, NH), 4.14 (dtt, $J = 17.2, 11.4, 5.6$ Hz, 2H, CH_2OCO), 3.82 – 3.72 (m, 1H, $\text{CH}_3\text{CHCHCH}_2$), 3.70 – 3.53 (m, 13H, $\text{CH}_3\text{CHCHCH}_2$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$, 2 x $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$, SOCH_2), 3.51 (t, $J = 5.3$ Hz, 2H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.43 – 3.36 (m, 2H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.33 (t, $J = 5.0$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$), 3.25 – 3.10 (m, 1H, SOCHHCH_2), 3.10 – 2.96 (m, 1H, SOCHHCH_2), 2.75 – 2.61 (m, 2H, SOCH_2CH_2), 1.61 (p, $J = 6.3$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCO}$), 1.50 – 1.12 (m, 8H, 4 x CH_2), 1.07 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, CH_3).

HRMS (ESI⁺): ber. für $\text{C}_{23}\text{H}_{42}\text{N}_6\text{O}_8\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 563.2858, gef.: 563.2862.

EXPERIMENTELLER TEIL

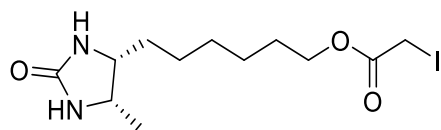
6-((4*R*,5*S*)-5-Methyl-2-oxoimidazolidin-4-yl)hexyl 2-((1-(4-(2-(2-iodoacetamido)ethyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-13-oxo-3,6,9-trioxa-12-azapentadecan-15-yl)sulfinyl)acetat (**68**)



Das Azid **75** (9 mg, 16 μmol , 1.0 eq.) wurde in einer Mischung aus THF und Wasser (1:1, 0.8 mL) gelöst. Das Alkin **70** (3.7 mg, 16 μmol , 1.0 eq.) und CuSO_4 (2.5 mg, 16 μmol , 1.0 eq.) wurden zugegeben und die Mischung zweimal sorgfältig entgast („freeze-pump-thaw“). Anschließend wurde Natriumascorbat (1.9 mg, 9 μmol , 0.6 eq.) zugegeben, wodurch sich die Reaktionsmischung schlagartig verfärbte. Die Reaktion wurde für 14 h bei RT im Dunkeln gerührt, das Lösungsmittel *in vacuo* und an der Lyophylle entfernt. Das Rohprodukt wurde über RP-HLPC (0 \rightarrow 80% 0.25M NH_4COOH in 80:20 MeCN/ H_2O) aufgereinigt und man erhielt den Linker **68** als gelbliches Öl (7.8 mg, 9.9 μmol , 62 %).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, Deuterium Oxide) δ (ppm) = 7.75 (d, $J = 14.3$ Hz, 1H, Ar*H*), 4.47 (t, $J = 5.1$ Hz, 2H, CH_2OCO), 4.12 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{I}$), 3.96 – 3.68 (m, 5H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{I}$, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}_{\text{Ar}}$, $\text{CH}_3\text{CHCHCH}_2$), 3.66 – 3.61 (m 1H, $\text{CH}_3\text{CHCHCH}_2$), 3.57 – 3.41 (m, 12H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}_{\text{Ar}}$, 2 x $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$, SOCH_2), 3.42 – 3.35 (m, 2H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.27 (t, $J = 5.5$ Hz, 2H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.23 – 3.00 (m, 2H, SOCH_2CH_2), 2.81 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{I}$), 2.64 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, SOCH_2CH_2), 1.57 – 1.52 (m, $J = 6.7$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCO}$), 1.39 – 1.34 (m, 2H, 2 x CH_2), 1.31 – 1.04 (m, 6H, 3 x CH_2), 0.96 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, CH_3).

HRMS (ESI+) ber. für $\text{C}_{29}\text{H}_{51}\text{IN}_7\text{O}_9\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 800.2508, gef.: 800.2513.

6-((4*R*,5*S*)-5-Methyl-2-oxoimidazolidin-4-yl)hexyl 2-iodoacetat (60)

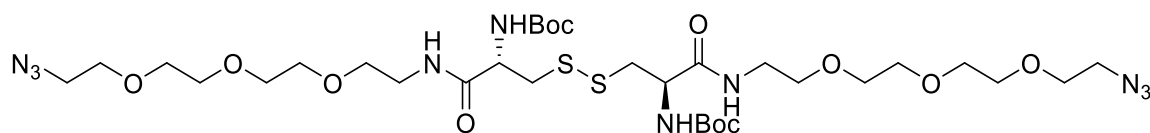
Das Desthiobiotin-Alkohol **61** (400 mg, 1.86 mmol, 1.0 eq.) wurde in DMF (trocken, 5 mL) gelöst und DCC (424 mg, 2.05 mmol, 1.1 eq.) zugeben. Nach 5 min Rühren bei RT wurden Iodessigsäure (394 mg, 1.86 mmol, 1.0 eq.) und eine Spatelspitze DMAP zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 16 h bei RT gerührt, anschließend auf 0°C gekühlt und der ausgefallene Harnstoff abfiltriert. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und die Rohprodukt säulenchromatographisch (DCM/MeOH 40:1 → 30:1 → 20:1) gereinigt. Man erhielt so das Produkt **76** als orangenen Feststoff (414 mg, 1.12 mmol, 60 %).

¹H-NMR (400 MHz, Chloroform-*d*): δ (ppm) = 3.90 – 3.80 (m, 1H, *CHCH*₃), 3.76 – 3.64 (m, 3H, *CH*₂I, *CHCH*₃), 1.65 (m, 2H, *CH*₂CH₂OCO), 1.55 – 1.18 (m, 8H, 2 x *CH*₂*CH*₂), 1.13 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, *CH*₃).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 169.05 (*CONH*), 163.57 (*COO*), 66.12 (*CH*₂OCO), 56.19 (*CHCH*₂), 51.52 (*CHCH*₃), 29.73 (*CHCH*₂), 29.24 (*CH*₂), 28.36 (*CH*₂CH₂OCO), 26.50 (*CH*₂), 25.72 (*CH*₂), 15.91 (*CH*₃), -5.19 (*CH*₂I)

HRMS (ESI⁻): ber. für C₁₂H₂₂IN₂O₃ [M+H]⁺: 369.0670, gef.: 369.0666.

Di-*tert*-butyl ((14*R*,19*R*)-1,32-diazido-13,20-dioxo-3,6,9,24,27,30-hexaoxa-16,17-dithia-12,21-diazadotriacontane-14,19-diyl)dicarbamat (77)



Boc-*L*-Cystin (1.0 g, 2.27 mmol) wurde in THF (trocken, 20 mL) gelöst. HOBt (643 mg, 4.76 mmol, 2.1 eq.) und EDC·HCl (956 mg, 4.99 mmol, 2.2 eq.) wurden zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 20 min bei RT gerührt, bevor 11-Azido-3,6,9-trioxaundecan-1-amin (741 μ L, 4.99 mmol, 2.2 eq.) zugeben wurde. Die Reaktionsmischung wurde für 16 h bei RT gerührt. Im Anschluss wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und das Produkt **77** durch Säulenchromatographie (DCM/MeOH/NH₄OH 30:1:0.1%) als farbloses Öl (1.35 g, 1.60 mmol, 70 %) isoliert.

$R_f = 0.5$ (DCM:MeOH 10:1).

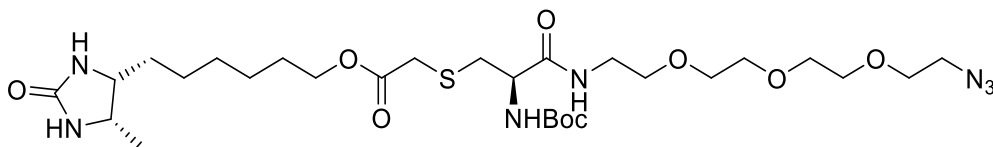
¹H-NMR (400 MHz, Chloroform-*d*): δ (ppm) = 4.48 – 4.21 (m, 2H, 2 x SCH₂CHNH₂Boc), 3.73 – 3.61 (m, 20H, 4 x OCH₂CH₂O, 2 x OCH₂CH₂N₃), 3.61 – 3.54 (m, 4H, 2 x NHCH₂CH₂O), 3.54 – 3.44 (m, 4H, 2 x NHCH₂CH₂O), 3.41 (m, 4H, 2 x OCH₂CH₂N₃), 3.13 – 3.05 (m, 2H, 2 x SCHHCHN), 2.75 (dd, ²*J* = 13.8, ³*J* = 6.0 Hz, 2H, 2 x SCHHCHN), 1.47 (s, 18H, 2 x C(CH₃)₃).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 170.61 (2 x NHC=O), 170.00 (2 x NHCO_{Boc}), 80.26 (C_{tert}), 70.80 (2 x OCH₂CH₂O), 70.74 (2 x OCH₂CH₂O), 70.71 (2 x OCH₂CH₂O), 70.66 (2 x OCH₂CH₂O), 70.41 (2 x OCH₂CH₂O), 70.14 (2 x NHCH₂CH₂O), 69.62 (2 x CH₂CH₂N₃), 50.77 (2 x OCH₂CH₂N₃), 39.52 (2 x NHCH₂CH₂O), 28.41 (2 x C(CH₃)₃), 27.43 (2 x CHNH).

HRMS (ESI⁺): ber. für C₃₂H₆₄N₁₁O₁₂S₂ [M+NH₄]⁺: 858.4176, gef.: 858.4176.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3302 (br w), 2930 (w), 2103 (m), 1662 (s), 1523 (m), 1446 (w), 1365 (w), 1248 (m), 1164 (m), 1122 (s), 1021 (w), 861 (w).

6-((4R,5S)-5-Methyl-2-oxoimidazolidin-4-yl)hexyl (R)-1-azido-14-((tert-butoxycarbonyl)amino)-13-oxo-3,6,9-trioxa-16-thia-12-azaoctadecan-18-ol (78)



Das Disulfid **77** (550 mg, 0.654 mmol) wurde in einer Mischung aus DMF und Wasser (4:1, 10 mL) gelöst und TCEP·HCl (187 mg, 0.654 mmol, 1 eq.) und NaHCO₃ (231 mg, 2.75 mmol, 4.2 eq.) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 2 h bei RT gerührt, das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und die Reaktionsmischung *in situ* weiter umgesetzt.

Der Rückstand (310 mg, 0.728 mmol) wurde in 3 mL DMF gelöst und DIPEA (119 µL, 0.738 mmol, 1.0 eq) und Desthiobiotinbromid **76** (141 mg, 0.442 mmol, 0.6 eq.) wurden zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 2 h bei RT gerührt und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH/NH₄OH 40:1:0.1 % → 30:1:0.1 %) konnte der Thioether **77** als farbloses Öl (200 mg, 0.302 mmol, 68 %) gewonnen werden.

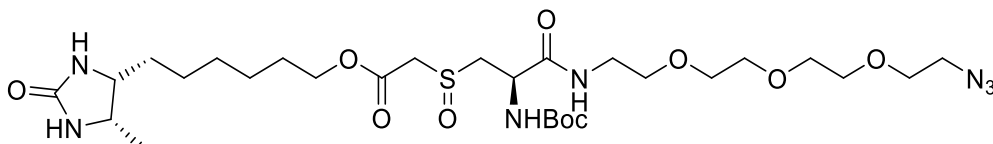
$R_f = 0.67$ (DCM:MeOH 10:1).

¹H-NMR (400 MHz, Chloroform-*d*): δ (ppm) = 4.33 – 4.31 (m, 1H, **CHNHBoc**), 4.17 – 4.11 (m, 2H, **CH₂OCO**), 3.89 – 3.82 (m, 1H, **CHCH₃**), 3.75 – 3.60 (m, 11H, **CHCH₂**, 2 x **OCH₂CH₂**, **OCH₂CH₂N₃**), 3.58 (t, ³*J* = 5.5 Hz, 2H, **NHCH₂CH₂O**), 3.48 (t, ³*J* = 5.4 Hz, 2H, **NHCH₂CH₂O**), 3.40 (t, *J* = 5.0 Hz, 2H, **OCH₂CH₂N₃**), 3.34 (s, 2H, **CH₂S**), 3.03 – 2.84 (m, 2H, **SCH₂CHNHBoc**), 1.73 – 1.54 (m, 2H, **CH₂CH₂OCO**), 1.45 (s, C(**CH₃**)₃), 1.38 – 1.24 (m, *J* = 46.7, 4.0 Hz, 5H, **CH₂CH₂**), 1.14 (d, ²*J* = 6.4 Hz, 3H, **CH₃**).

¹³C-NMR (201 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 170.98 (**CONH**), 170.46 (**COO**), 163.54 (**NHCONH**), 155.48 (**NHCOC_{tert}**), 80.24 (**C_{tert}**), 70.83 (**OCH₂CH₂O**), 70.76 (**OCH₂CH₂O**), 70.73 (**OCH₂CH₂O**), 70.46 (**OCH₂CH₂O**), 70.17 (**NHCH₂CH₂O**), 69.74 (**CH₂CH₂N₃**), 65.67 (**CH₂OCO**), 56.16 (**CHCH₂**), 53.71 (**SCH₂CHNHBoc**), 51.50 (**CH₃CH**), 50.81 (**OCH₂CH₂N₃**), 39.58 (**NHCH₂CH₂O**), 35.77 (**SCH₂CHN**), 34.45 (**CH₂S**), 29.73 (**CH₂**), 29.17 (**CH₂**), 28.45 (**CH₂CH₂OCO**), 28.45 (C(**CH₃**)₃), 26.40 (**CH₂**), 25.78 (**CH₂**), 15.88 (**CH₃**).

HRMS (ESI⁺): ber. für C₂₈H₅₂N₇O₉S [M–H]⁺: 662.3542, gef.: 662.3547.

6-((4*R*,5*S*)-5-Methyl-2-oxoimidazolidin-4-yl)hexyl 2-(((*R*)-1-azido-14-((tert-butoxy carbonyl) amino)-13-oxo-3,6,9-trioxa-12-azapentadecan-15-yl)sulfinyl)acetat (79**)**



Das Edukt **78** (220 mg, 0.332 mmol) wurde in CHCl_3 (trocken, 83 mL) gelöst, auf 0°C gekühlt und *m*CPBA (77 %, 57 mg, 0.332 mmol, 1 eq.) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde eine Stunde lang bei 0°C gerührt und weiteres *m*CPBA (77 %, 5 mg, 0.076 mmol, 0.23 eq.) zugegeben. Nach weiterem Rühren für eine Stunde bei 0°C war die Reaktion vollständig und die Reaktionsmischung wurde mit CHCl_3 verdünnt und mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung (4 x 20 mL), sowie gesättigter NH_4Cl -Lösung (1 x 20 mL) gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Man erhielt so das Oxidationsprodukt **79** ohne weitere Aufreinigung als farbloses Öl (182 mg, 0.269 mmol, 81 %).

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

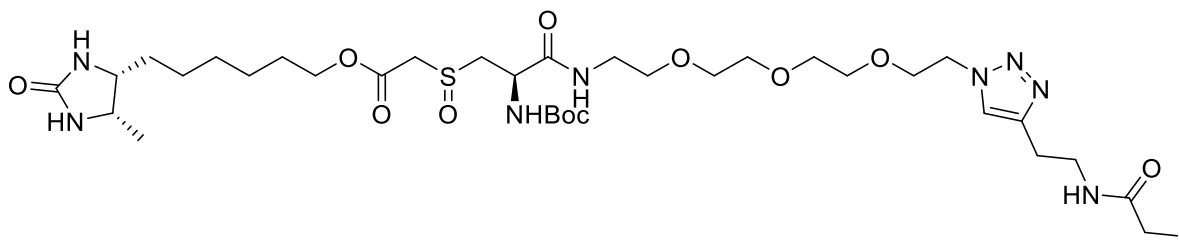
$^1\text{H-NMR}$ (800 MHz, Chloroform-*d*): δ (ppm) = 4.71 – 4.56 (m, 1H, CHNH), 4.25 – 4.14 (m, 2H, CH_2OCO), 3.87 – 3.76 (m, 1H, CHCH_3), 3.72 – 3.66 (m, 7H, CHCH_2 , 2 x OCH_2CH_2 , CH_2S), 3.66 – 3.64 (m, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$), 3.62 (m, 2H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.57 (m, 2H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.46 (m, 2H, SCH_2CHNH), 3.40 – 3.37 (m, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$), 1.70 – 1.64 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCO}$), 1.54 – 1.21 (m, 17H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$, 4 x CH_2), 1.13 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (201 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 169.82 (CONH), 164.96 (COO), 163.67 (NHCONH), 155.55 ($\text{NHCOC}_{\text{tert}}$), 80.60 (C_{tert}), 70.78 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 70.71 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 70.67 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 70.40 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 70.10 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 69.51 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$), 66.11 (CH_2OCO), 56.08 (CHCH_2), 55.96 ($\text{SCH}_2\text{CHNHBOc}$), 51.47 (CH_3CH), 50.77 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$), 39.67 (SCH_2CHN), 29.67 (CH_2), 29.66 (CH_2), 29.63, (CH_2), 28.93 (CH_2), 28.38 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 28.35 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCO}$), 28.27 (CH_2), 26.30 (CH_2), 26.28 (CH_2), 25.68 (CH_2), 25.63 (CH_2), 15.86 (CH_3).

HRMS (ESI⁻): ber. für $\text{C}_{28}\text{H}_{52}\text{N}_7\text{O}_{10}\text{S}$ $[\text{M}-\text{H}]^+$: 678.3491, gef.: 678.3497.

EXPERIMENTELLER TEIL

6-((4R,5S)-5-Methyl-2-oxoimidazolidin-4-yl)hexyl 2-(((R)-14-((tert-butoxycarbonyl)amino)-1-(4-(2-(2-iodoacetamido)ethyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-13-oxo-3,6,9-trioxa-12-azapentadecan-15-yl)sulfinyl)acetate (**80**)



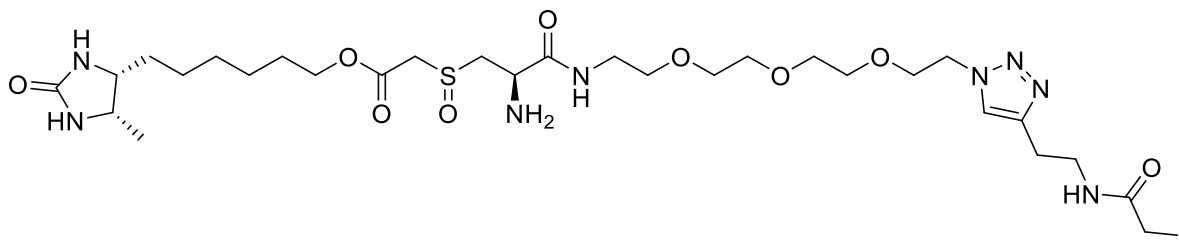
Das Azid **79** (176 mg, 0.259 mmol, 1.0 eq.) wurde in einer Mischung aus THF/H₂O (1:1, 6 mL) gelöst und zweimal entgast. Anschließend wurde das Alkin **70** (68 mg, 0.284 mmol, 1.0 eq.) und CuSO₄ (12.4 mg, 0.079 mmol, 0.3 eq.) zugegeben und nochmals einmal entgast. Nach Zugabe von Natriumascorbat (41 mg, 0.207 mmol, 0.8 eq.) wurde die Reaktionsmischung bei RT für 10 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt über RP-HPLC (0 → 100 % B in 45 min, Puffer A: 0.1 % NH₄COOH in H₂O, Puffer B: 0.1 % NH₄COOH in 80 % MeCN) aufgereinigt. Man erhielt das Triazol **80** als gelbliches Öl (171 mg, 0.186 mmol) in einer Ausbeute von 72 %.

¹H-NMR (400 MHz, D₂O) δ (ppm) = 7.78 (s, 1H, ArH), 4.48 (t, *J* = 5.0 Hz, 1H, CHNH), 4.14 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, CH₂OCO), 3.85 (dd, *J* = 8.6, 4.0 Hz, 2H, CH₂I), 3.80 – 3.70 (m, 1H, CHCH₃), 3.66 (td, *J* = 7.9, 5.9 Hz, 1H, CHCH₂), 3.60 – 3.43 (m, 12H, CH₂, 2 x OCH₂CH₂, CH₂S), 3.43 – 3.23 (m, 3H, CH₂CH₂OCO, OCH₂CH₂N₃), 3.18 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, NH), 2.82 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, CH₂), 1.56 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H, CH₂CH₂OCO), 1.44 – 1.10 (m, 15H, C(CH₃)₃, 4 x CH₂), 0.98 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, CH₃).

HRMS (ESI⁺): ber. für C₃₄H₆₀N₈O₁₁SI [M+H]⁺: 915.3141, gef.: 915.3148.

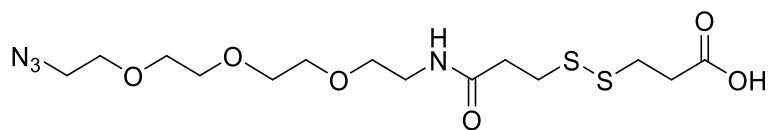
EXPERIMENTELLER TEIL

6-((4R,5S)-5-Methyl-2-oxoimidazolidin-4-yl)hexyl 2-(((R)-14-amino-1-(4-(2-(2-iodoacetamido)ethyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-13-oxo-3,6,9-trioxa-12-azapentadecan-15-yl)sulfinyl)acetat (**69**)



Das Boc-geschützte Edukt **80** (156 mg, 0.170 mmol, 1.0 eq.) wurde in DCM (4 mL) gelöst und TFA (200 μ L) wurde zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 3 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand in DCM gelöst (ca. 0.3 mL). Das Produkt wurde durch Zugabe von eisgekühlten Diethylether (ca. 100 mL) gefällt. Der Überstand wurde abdekantiert und das erhaltene Amin **69** (35 mg, 0.042 mmol, 25 %) wurde an der Lyophylle getrocknet.

HRMS (ESI⁺): ber. für C₂₉H₅₂N₈O₉S [M+H]⁺: 815.2617, gef.: 815.2621.

1-Azid-13-oxo-3,6,9-trioxa-16,17-dithia-12-azaicosanon-20-säure (54)

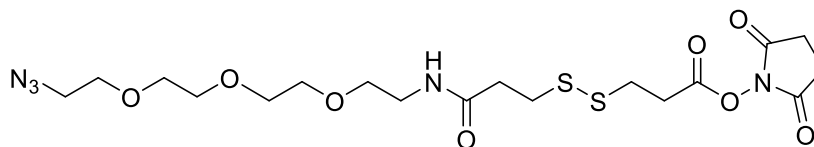
Dithiopropionsäure (2.0 g, 9.57 mmol, 4 eq.) wurde in 10 mL DMF gelöst. EDC·HCl (440 mL, 2.3 mmol, 1 eq.) wurde hinzugegeben und die Reaktionsmischung für 10 min bei RT gerührt. Anschließend wurden 11-Azido-3,6,9-trioxaundecan-1-amin (456 μ L, 2.3 mmol, 1 eq.) und DMAP zugegeben und die Reaktionsmischung für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt (DCM/MeOH/AcOH 40:1: 0.1%) und man erhielt das Produkt **54** in Form eines Öls (1.7 g, 4.14 mmol, 43 %).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, Chloroform-*d*) δ = 3.75 – 3.60 (m, 10H, 2xOCH₂CH₂O, OCH₂CH₂N₃), 3.54 – 3.51 (m, 2H, OCH₂CH₂NH), 3.43 – 3.40 (m, 2H, OCH₂CH₂NH), 3.39 (t, *J* = 5.0 Hz, 2H, OCH₂CH₂N₃), 2.95 (dt, *J* = 11.4, 7.0 Hz, 4H, 2xSSCH₂CH₂), 2.84 – 2.70 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, SSCH₂CH₂), 2.61 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, SSCH₂CH₂).

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl₃) δ 176.91 (COOH), 171.57 (CONH), 70.73 (CH₂), 70.68(CH₂), 70.55(CH₂), 70.19(CH₂), 70.13 (CH₂), 69.85 (CH₂), 50.75 (CH₂CH₃), 39.45 (OCH₂CH₂NH), 36.09 (SSCH₂CH₂), 34.14 (SSCH₂CH₂), 33.93 (SSCH₂CH₂), 33.30 (SSCH₂CH₂).

HRMS (ESI⁻): ber. für C₁₄H₂₆N₄O₆S₂ [M-H]⁻: 409.1221, gef.: 409.1220.

2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl-1-azido-13-oxo-3,6,9-trioxa-16,17-dithia-12-azaicosan-20-olat
(55)

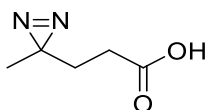


Die freie Säure **54** (149 mg, 0.363 mmol, 1.0 eq.) wurde in DMF (5 mL) gelöst. Frisch hergestelltes NHS-TFA (311 mg, 1.45 mmol, 4.0 eq.) und Pyridin (38 μ L, 0.472 mmol, 1.3 eq.) wurden zugegeben und die Reaktionslösung für 16 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde in DCM (20 mL) gelöst und mit gesättigter NaHCO₃-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Man erhielt so den NHS-Ester **54** als gelbliches Öl (92 mg, 0.181 mmol) in einer Ausbeute von 50 %.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 3.71 – 3.59 (m, 10H, 2xOCH₂CH₂O, OCH₂CH₂N₃), 3.55 (dt, J = 5.5, 2.9 Hz, 2H, OCH₂CH₂NH), 3.45 (q, J = 5.2 Hz, 2H, OCH₂CH₂NH), 3.39 (t, J = 5.0 Hz, 2H, OCH₂CH₂N₃), 3.11 – 2.91 (m, 4H, 2xSSCH₂CH₂, SSCH₂CH₂), 2.89 – 2.77 (m, 4H, COCH₂CH₂CO), 2.60 (td, J = 7.1, 1.8 Hz, 2H, SSCH₂CH₂).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 171.98 (C=O), 171.29 (C=O), 169.09 (CONH), 70.77 (CH₂), 70.71 (CH₂), 70.62 (CH₂), 70.32 (CH₂), 70.13 (CH₂), 69.85 (CH₂), 50.77 (CH₂N₃), 39.50 (OCH₂CH₂NH), 35.83 (SSCH₂CH₂), 34.02 (SSCH₂CH₂), 32.34 (SSCH₂CH₂), 31.20 (SSCH₂CH₂), 25.70 (COCH₂CH₂CO).

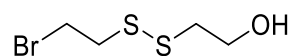
HRMS (ESI⁺): ber. für C₁₈H₂₉N₅O₈S₂Na [M+Na]⁺: 530.1355, gef.: 530.1351.

4,4'-Diazobutansäure (59)

4,4'-Diazobutansäure **59** wurde nach einem Protokoll von *Bond et al.* synthetisiert.^[126] In einem ausgeheiztem Dreihalskolben wurde Lävulinsäure (2.0 g, 17.2 mmol, 1.0 eq.) vorgelegt und unter Eiskühlung 17 mL Ammoniak in MeOH (7 M) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 3 h bei 0°C gerührt. Hydroxylamin-*O*-Sulfonsäure (2.2 g, 19.8 mmol, 1.15 eq.) wurde in 15 mL trockenem MeOH gelöst und über einen Tropftrichter langsam zur Reaktionsmischung zugegeben. Hierbei bildete sich ein farbloser Niederschlag aus. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Überschüssiger Ammoniak wurde ausgetrieben, indem Stickstoff durch die Reaktionsmischung geblasen wurde. Der ausgefallene Niederschlag wurde abfiltriert und das Filtrat bei 22°C am Rotationsverdampfer eingengt. Man erhielt nach Trocknen am Hochvakuum einen farblosen Schaum, der in 12 mL trockenem MeOH gelöst wurde. Anschließend wurden 3.6 mL Triethylamin zugegeben und insgesamt 4.3 g Iod zugegeben bis eine Braunfärbung der Lösung bestehen blieb. Die Mischung wurde mit Ethylacetat verdünnt und mit 1 M HCl (1 x 50 mL), gesättigter wässriger Na₂S₂O₈-Lösung (3 x 100 mL) und gesättigter wässriger NaCl-Lösung (1 x 50 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel bei 22°C am Rotationsverdampfer eingengt. Man erhielt das Produkt **59** als gelb-orange Flüssigkeit.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 2.26 – 2.14 (m, 2H, CCH₂CH₂), 1.69 (t, J = 7.7 Hz, 2H, CCH₂), 1.02 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 178.68 (C=O), 29.34 (C_{tert}CH₂), 28.56 (CH₃), 25.09 (C_{tert}CH₂CH₂), 19.63 (C_{tert}).

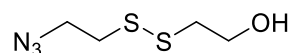
2-((2-Bromoethyl)disulfanyl)ethan-1-ol (57)

Unter Argonatmosphäre wurde 2,2'-Dithiodiethanol (771 mg, 611 μ L, 5.00 mmol, 1.0 eq.) in trockenem Dichlormethan (11.5 mL) gelöst. Die Lösung wurde auf 0 °C gekühlt und Triphenylphosphin (1.31 g, 5.00 mmol, 1.0 eq.) wurde zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 15 min gerührt und Tetrabrommethan (1.66 g, 5.01 mmol, 1.0 eq.) wurde über 30 min portionsweise zugegeben. Anschließend wurde das Kältebad entfernt und das Reaktionsgemisch wurde für 22 h bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde Dichlormethan (2 mL) zugegeben und das Reaktionsgemisch mit Wasser (2×7 mL) und gesättigter wässriger NaCl-Lösung (7 mL) gewaschen. Die organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Das gelbliche Öl wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (*i*Hex/EtOAc 5:1) und man erhielt das bromierte Produkt **57** (138 mg, 0.636 mmol, 13 %) als farbloses Öl.

$R_f = 0.15$ (*i*Hex/EtOAc, 5:1).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 3.96 – 3.85 (m, 2H, CH_2Br), 3.69 – 3.56 (m, 2H, CH_2OH), 3.17 – 3.02 (m, 2H, SCH_2), 2.95–2.83 (m, 2H, SCH_2), 2.05 (s, 1H, OH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 60.5 (CH_2OH), 41.6 (SCH_2), 40.5 (SCH_2), 29.8 (CH_2Br).

2-((2-Azidethyl)disulfanyl)ethan-1-ol (58)

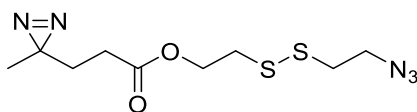
Unter Stickstoffatmosphäre wurde 2-((2-Bromoethyl)disulfanyl)ethan-1-ol **57** (133 mg, 0.602 mmol, 1.0 eq) in trockenem DMF (2 mL) gelöst. Natriumazid (49 mg, 0.76 mmol, 1.3 eq.) wurde hinzugegeben und das Reaktionsgemisch wurde für 65 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt, der Rückstand wurde in Wasser (6 mL) aufgenommen und mit Dichlormethan (10 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. So wurden ohne weitere Aufreinigung (86 mg, 0.48 mmol, 79%) an 2-((2-azidoethyl)disulfanyl)ethan-1-ol **58** als farbloses Öl erhalten.

$R_f = 0.25$ (*i*-Hex/EtOAc 5:1).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 3.93 – 3.89 (m, 2H, **CH₂OH**), 3.62 – 3.57 (m, 2H, **SCH₂**), 2.93– 2.82 (m, 4H, **CH₂N₃**, **SCH₂**), 1.96 (s, 1H, **OH**).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 60.5 (**CH₂OH**), 50.1 (**CH₂N₃**), 41.2 (**SCH₂**), 37.7 (**SCH₂**).

HRMS (EI⁺): ber. für C₄H₉ON₃S₂⁺ [M]⁺: 179.0187, gef.: 179.0179.

2-((2-Azidethyl)disulfanyl)ethyl 3-(3-methyl-3H-diazirin-3-yl)propanoat (56)

Das Diaziridin **59** (26.4 mg, 0.206 mmol, 1.0 eq.) wurde in DMF (1.5 mL) gelöst und es wurden EDC·HCl, Disulfid **58** (48 mg, 0.268 mmol, 1.3 eq.), sowie eine katalytische Menge an DMAP zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde in 20 mL EtOAc gelöst und mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Nach säulenchromatographie Aufreinigung (iHex/EtOAc 1:1) wurde das Produkt **56** (30 mg, 0.103 mmol, 50 %) als gelbliches Öl isoliert.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 4.36 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, COOCH₂), 3.60 (td, *J* = 6.8, 4.3 Hz, 2H, SCH₂), 2.96 – 2.89 (m, 2H, SCH₂), 2.89 – 2.80 (m, 2H, CCH₂CH₂), 2.21 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H, CH₂N₃), 1.73 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H, CCH₂), 1.04 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 172.20 (C=O), 62.56 (CH₂OCO), 50.13 (CH₂N₃), 37.71 (SCH₂), 37.33 (SCH₂), 29.70 (C_{tert}CH₂), 28.81 (CH₃), 25.28 (C_{tert}CH₂CH₂), 19.84 (C_{tert}).

Abkürzungsverzeichnis

DNA	Desoxyribonukleinsäure
fC	5-Formyl-2'-desoxycytidin
caC	5-Carboxy-2'-desoxycytidin
hmC	5-Hydroxymethyl-2'-desoxycytidin
hmU	5-Hydroxymethyl-2'-desoxyuridin
mC	5-Methyl-2'-desoxycytidin
Ac	Acetyl
AID	activation induced cytidine deaminase
ARP	Aldehyde reactive probe
ATR	attenuated total reflection
BER	Basenexzisionsreparatur
β -GT	β -Glucosyltransferase
Bn	Benzyl
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
BS	Bisulfitsequenzierung
BSA	bovine serum albumin
Bz	Benzoyl
CE	Cyanoethyl
CID	Collision-induced dissociation
COSY	correlated spectroscopy
CpG	dC – dG dinucleotide
CPG	controlled pore glass
dA	2'-Desoxyadenosine
dATP	2'-Desoxyadenosintriphosphat
dC	2'-Desoxycytidin
DCM	Dichloromethan
dCTP	2'-Desoxycytidine triphosphat
dG	2'-Desoxyguanosin
dGTP	2'-Desoxyguanosin
DIAD	<i>diisopropyl azodicarboxylate</i>
DIPEA	<i>N,N-Diisopropylethylamin</i> , Hünigbase
DMAP	4-(Dimethylamino)pyridin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMT	Dimethoxyltrityl
Dnmt	desoxynucleic acid methyltransferase
dNTP	Desoxyribonucleotidtriphosphat
dsDNA	double stranded DANN
dT	Thymidin
dTTP	Thymidintriphosphat

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

dU	2'-Desoxyuridin
ECL	enzymatic chemiluminescence
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EI	
ESC	Embryonale Stammzellen
ESI	Electrospray injection
Et	Ethyl
ETD	Electron-transfer dissociation
EtOAc	Ethylacetate
HPLC	high performance liquid chromatography
HCD	higher-energy collisional dissociation
HMBC	Heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy
HSQC	Heteronuclear single quantum coherence spectroscopy
HRMS	high resolution mass spectrometry
HRP	horseradish peroxidase
<i>i</i> Bu	<i>isobutyl</i>
IR	infrared
ICAT	Isotope-coded affinity tag
JBP1	J-binding protein 1
LC-MS	liquid chromatography - mass spectrometry
KLH	Keyhole limpet hemocyanin
MALDI	matrix-assisted laser desorption/ionization
MBD	methyl-CpG binding domain
<i>m</i> CPBA	<i>meta</i> -chloroperbenzoic acid
Me	methyl
MeCN	Acetonitril
MeDIP	methylated DNA immunoprecipitation
MS	Massenspektrometrie
NBS	<i>N</i> -bromo-succinimide
NMR	nuclear magnetic resonance
Oct4	octamer-binding transcription factor 4
OVA	Ovalbumin
ODN	Oligonukleotid
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PDB	protein data bank
PEX	primer extension
Ph	Phenyl
Pol	Polymerase
Pyr	Pyridin
RNA	Ribonukleinsäure
SAM	<i>S</i> -adenosylmethionine
SILAC	stable isotope labeling with amino acids in cell culture
siRNA	small interfering RNA

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

SKO	single conditional knockout
Smug1	single-strand-selective monofunctional uracil-DNA glycosylase 1
ssDNA	single stranded DNA
TBAF	tetrabutylammonium fluoride
TBE	Tris, boric acid, EDTA
TBS	<i>tert</i> butyldimethylsilyl
TBS-T	tris-buffered saline tween
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> Butyl
TET	ten-eleven translocation
TF	transcription factor
THF	Tetrahydrofuran
TMS	trimethylsilyl
TMT	Tandem isobaric mass tags
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane
Uhrf1	ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains 1 protein
UV	ultraviolet

Literaturverzeichnis

- [1] C. H. Waddington, *Nature* **1956**, *177*, 1241-1242. Embryology, Epigenetics, and Biogenetics - Reply.
- [2] G. Egger, G. Liang, A. Aparicio, P. A. Jones, *Nature* **2004**, *429*, 457-463. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy.
- [3] A. Bird, *Nature* **2007**, *447*, 396-398. Perceptions of epigenetics.
- [4] a) M. A. Dawson, T. Kouzarides, *Cell* **2012**, *150*, 12-27. Cancer epigenetics: from mechanism to therapy; b) J. C. Rice, C. D. Allis, *Nature* **2001**, *414*, 258-261. Code of silence.
- [5] a) J. A. Law, S. E. Jacobsen, *Nat. Rev. Genet.* **2010**, *11*, 204-220. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals; b) P. A. Jones, D. Takai, *Science* **2001**, *293*, 1068-1070. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics; c) A. Meissner, *Nat. Biotechnol.* **2010**, *28*, 1079-1088. Epigenetic modifications in pluripotent and differentiated cells.
- [6] J. L. Swain, T. A. Stewart, P. Leder, *Cell* **1987**, *50*, 719-727. Parental legacy determines methylation and expression of an autosomal transgene: a molecular mechanism for parental imprinting.
- [7] a) A. Jeltsch, *Chembiochem* **2002**, *3*, 274-293. Beyond Watson and Crick: DNA methylation and molecular enzymology of DNA methyltransferases; b) W. Reik, *Nature* **2007**, *447*, 425-432. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development.
- [8] T. Mohandas, R. S. Sparkes, L. J. Shapiro, *Science* **1981**, *211*, 393-396. Reactivation of an inactive human X chromosome: evidence for X inactivation by DNA methylation.
- [9] a) S. Feng, S. E. Jacobsen, W. Reik, *Science* **2010**, *330*, 622-627. Epigenetic reprogramming in plant and animal development; b) W. Reik, W. Dean, J. Walter, *Science* **2001**, *293*, 1089-1093. Epigenetic reprogramming in mammalian development.
- [10] a) M. Tahiliani, K. P. Koh, Y. Shen, W. A. Pastor, H. Bandukwala, Y. Brudno, S. Agarwal, L. M. Iyer, D. R. Liu, L. Aravind, A. Rao, *Science* **2009**, *324*, 930-935. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1; b) T. Pfaffeneder, B. Hackner, M. Truss, M. Münzel, M. Müller, C. A. Deiml, C. Hagemeyer, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 7008-7012. The discovery of 5-formylcytosine in embryonic stem cell DNA; c) M. Yu, G. C. Hon, K. E. Szulwach, C. X. Song, L. Zhang, A. Kim, X. Li, Q. Dai, Y. Shen, B. Park, J. H. Min,

LITERATURVERZEICHNIS

- P. Jin, B. Ren, C. He, *Cell* **2012**, *149*, 1368-1380. Base-resolution analysis of 5-hydroxymethylcytosine in the mammalian genome; d) S. Ito, L. Shen, Q. Dai, S. C. Wu, L. B. Collins, J. A. Swenberg, C. He, Y. Zhang, *Science* **2011**, *333*, 1300-1303. Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine.
- [11] a) M. Gardinergarden, M. Frommer, *J. Mol. Biol.* **1987**, *196*, 261-282. CpG Islands in Vertebrate Genomes; b) M. Ehrlich, M. A. Gama-Sosa, L. H. Huang, R. M. Midgett, K. C. Kuo, R. A. McCune, C. Gehrke, *Nucleic Acids Res.* **1982**, *10*, 2709-2721. Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells.
- [12] a) B. Hendrich, A. Bird, *Mol. Cell. Biol.* **1998**, *18*, 6538-6547. Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins; b) L. Lopez-Serra, M. Esteller, *Brit. J. Cancer* **2008**, *98*, 1881-1885. Proteins that bind methylated DNA and human cancer: reading the wrong words; c) A. Portela, M. Esteller, *Nat. Biotechnol.* **2010**, *28*, 1057-1068. Epigenetic modifications and human disease.
- [13] a) A. Kuroda, T. A. Rauch, I. Todorov, H. T. Ku, I. H. Al-Abdullah, F. Kandeel, Y. Mullen, G. P. Pfeifer, K. Ferreri, *PloS one* **2009**, *4*, e6953. Insulin gene expression is regulated by DNA methylation; b) J. P. Thomson, P. J. Skene, J. Selfridge, T. Clouaire, J. Guy, S. Webb, A. R. Kerr, A. Deaton, R. Andrews, K. D. James, D. J. Turner, R. Illingworth, A. Bird, *Nature* **2010**, *464*, 1082-1086. CpG islands influence chromatin structure via the CpG-binding protein Cfp1.
- [14] a) A. Bird, *Genes Dev.* **2002**, *16*, 6-21. DNA methylation patterns and epigenetic memory; b) M. G. Goll, T. H. Bestor, *Annu. Rev. Biochem.* **2005**, *74*, 481-514. Eukaryotic cytosine methyltransferases.
- [15] a) Y. Gruenbaum, H. Cedar, A. Razin, *Nature* **1982**, *295*, 620-622. Substrate and sequence specificity of a eukaryotic DNA methylase; b) R. Goyal, R. Reinhardt, A. Jeltsch, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 1182-1188. Accuracy of DNA methylation pattern preservation by the Dnmt1 methyltransferase.
- [16] M. Okano, D. W. Bell, D. A. Haber, E. Li, *Cell* **1999**, *99*, 247-257. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development.
- [17] S. Kriaucionis, N. Heintz, *Science* **2009**, *324*, 929-930. The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain.
- [18] a) K. Iqbal, S. G. Jin, G. P. Pfeifer, P. E. Szabo, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **2011**, *108*, 3642-3647. Reprogramming of the paternal genome upon fertilization involves

- genome-wide oxidation of 5-methylcytosine; b) M. Wossidlo, T. Nakamura, K. Lepikhov, C. J. Marques, V. Zakhartchenko, M. Boiani, J. Arand, T. Nakano, W. Reik, J. Walter, *Nat. Commun.* **2011**, *2*, 241. 5-Hydroxymethylcytosine in the mammalian zygote is linked with epigenetic reprogramming.
- [19] Y. F. He, B. Z. Li, Z. Li, P. Liu, Y. Wang, Q. Y. Tang, J. P. Ding, Y. Y. Jia, Z. C. Chen, L. Li, Y. Sun, X. X. Li, Q. Dai, C. X. Song, K. L. Zhang, C. He, G. L. Xu, *Science* **2011**, *333*, 1303-1307. Tet-Mediated Formation of 5-Carboxylcytosine and Its Excision by TDG in Mammalian DNA.
- [20] T. Pfaffeneder, F. Spada, M. Wagner, C. Brandmayr, S. K. Laube, D. Eisen, M. Truss, J. Steinbacher, B. Hackner, O. Kotljarova, D. Schuermann, S. Michalakis, O. Kosmatchev, S. Schiesser, B. Steigenberger, N. Raddaoui, G. Kashiwazaki, U. Müller, C. G. Spruijt, M. Vermeulen, H. Leonhardt, P. Schar, M. Müller, T. Carell, *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10*, 574-581. Tet oxidizes thymine to 5-hydroxymethyluracil in mouse embryonic stem cell DNA.
- [21] a) A. Inoue, Y. Zhang, *Science* **2011**, *334*, 194. Replication-dependent loss of 5-hydroxymethylcytosine in mouse preimplantation embryos; b) A. Inoue, L. Shen, Q. Dai, C. He, Y. Zhang, *Cell Res.* **2011**, *21*, 1670-1676. Generation and replication-dependent dilution of 5fC and 5caC during mouse preimplantation development.
- [22] A. Maiti, A. C. Drohat, *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 35334-35338. Thymine DNA glycosylase can rapidly excise 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine: potential implications for active demethylation of CpG sites.
- [23] a) J. U. Guo, Y. Su, C. Zhong, G. L. Ming, H. Song, *Cell* **2011**, *145*, 423-434. Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET1 promotes active DNA demethylation in the adult brain; b) S. Cortellino, J. Xu, M. Sannai, R. Moore, E. Caretti, A. Cigliano, M. Le Coz, K. Devarajan, A. Wessels, D. Soprano, L. K. Abramowitz, M. S. Bartolomei, F. Rambow, M. R. Bassi, T. Bruno, M. Fanciulli, C. Renner, A. J. Klein-Szanto, Y. Matsumoto, D. Kobi, I. Davidson, C. Alberti, L. Larue, A. Bellacosa, *Cell* **2011**, *146*, 67-79. Thymine DNA glycosylase is essential for active DNA demethylation by linked deamination-base excision repair.
- [24] a) S. Schiesser, B. Hackner, T. Pfaffeneder, M. Müller, C. Hagemeyer, M. Truss, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 6516-6520. Mechanism and stem-cell activity of 5-carboxycytosine decarboxylation determined by isotope tracing; b) S. Schiesser, T. Pfaffeneder, K. Sadeghian, B. Hackner, B. Steigenberger, A. S. Schröder, J. Steinbacher, G. Kashiwazaki, G. Hofner, K. T. Wanner, C. Ochsenfeld, T. Carell,

LITERATURVERZEICHNIS

- J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 14593-14599. Deamination, oxidation, and C-C bond cleavage reactivity of 5-hydroxymethylcytosine, 5-formylcytosine, and 5-carboxycytosine.
- [25] C. G. Spruijt, F. Gnerlich, A. H. Smits, T. Pfaffeneder, P. W. Jansen, C. Bauer, M. Münzel, M. Wagner, M. Muller, F. Khan, H. C. Eberl, A. Mensinga, A. B. Brinkman, K. Lephikov, U. Müller, J. Walter, R. Boelens, H. van Ingen, H. Leonhardt, T. Carell, M. Vermeulen, *Cell* **2013**, *152*, 1146-1159. Dynamic readers for 5-(hydroxy)methylcytosine and its oxidized derivatives.
- [26] M. Iurlaro, G. Ficiz, D. Oxley, E. A. Raiber, M. Bachman, M. J. Booth, S. Andrews, S. Balasubramanian, W. Reik, *Genome Biol.* **2013**, *14*, R119. A screen for hydroxymethylcytosine and formylcytosine binding proteins suggests functions in transcription and chromatin regulation.
- [27] a) J. Robertson, A. B. Robertson, A. Klungland, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2011**, *411*, 40-43. The presence of 5-hydroxymethylcytosine at the gene promoter and not in the gene body negatively regulates gene expression; b) C. You, D. Ji, X. Dai, Y. Wang, *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 7052. Effects of Tet-mediated oxidation products of 5-methylcytosine on DNA transcription in vitro and in mammalian cells.
- [28] M. Münzel, U. Lischke, D. Stathis, T. Pfaffeneder, F. A. Gnerlich, C. A. Deiml, S. C. Koch, K. Karaghiosoff, T. Carell, *Chemistry* **2011**, *17*, 13782-13788. Improved synthesis and mutagenicity of oligonucleotides containing 5-hydroxymethylcytosine, 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine.
- [29] H. Hashimoto, J. E. Pais, X. Zhang, L. Saleh, Z. Q. Fu, N. Dai, I. R. Correa, Jr., Y. Zheng, X. Cheng, *Nature* **2014**, *506*, 391-395. Structure of a Naegleria Tet-like dioxygenase in complex with 5-methylcytosine DNA.
- [30] A. Maiti, A. Z. Michelson, C. J. Armwood, J. K. Lee, A. C. Drohat, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 15813-15822. Divergent mechanisms for enzymatic excision of 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine from DNA.
- [31] S. S. Malik, C. T. Coey, K. M. Varney, E. Pozharski, A. C. Drohat, *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, 9541-9552. Thymine DNA glycosylase exhibits negligible affinity for nucleobases that it removes from DNA.
- [32] H. Hashimoto, J. E. Pais, N. Dai, I. R. Correa, Jr., X. Zhang, Y. Zheng, X. Cheng, *Nucleic Acids Res.* **2015**. Structure of Naegleria Tet-like dioxygenase (NgTet1) in complexes with a reaction intermediate 5-hydroxymethylcytosine DNA.

- [33] a) D. Globisch, M. Münzel, M. Müller, S. Michalakis, M. Wagner, S. Koch, T. Brückl, M. Biel, T. Carell, *PLoS one* **2010**, *5*, e15367. Tissue distribution of 5-hydroxymethylcytosine and search for active demethylation intermediates; b) M. Münzel, D. Globisch, T. Brückl, M. Wagner, V. Welzmler, S. Michalakis, M. Müller, M. Biel, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 5375-5377. Quantification of the sixth DNA base hydroxymethylcytosine in the brain; c) M. Münzel, D. Globisch, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 6460-6468. 5-Hydroxymethylcytosine, the sixth base of the genome; d) M. Wagner, J. Steinbacher, T. F. Kraus, S. Michalakis, B. Hackner, T. Pfaffeneder, A. Perera, M. Müller, A. Giese, H. A. Kretzschmar, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 12511-12514. Age-Dependent Levels of 5-Methyl-, 5-Hydroxymethyl-, and 5-Formylcytosine in Human and Mouse Brain Tissues.
- [34] M. Weber, J. J. Davies, D. Wittig, E. J. Oakeley, M. Haase, W. L. Lam, D. Schubeler, *Nat. Genet.* **2005**, *37*, 853-862. Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells.
- [35] a) C. E. Nestor, R. R. Meehan, *Meth. Mol. Biol.* **2014**, *1094*, 259-267. Hydroxymethylated DNA immunoprecipitation (hMeDIP); b) L. Tan, L. Xiong, W. Xu, F. Wu, N. Huang, Y. Xu, L. Kong, L. Zheng, L. Schwartz, Y. Shi, Y. G. Shi, *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, e84. Genome-wide comparison of DNA hydroxymethylation in mouse embryonic stem cells and neural progenitor cells by a new comparative hMeDIP-seq method.
- [36] a) S. Tardy-Planechaud, J. Fujimoto, S. S. Lin, L. C. Sowers, *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 553-559. Solid phase synthesis and restriction endonuclease cleavage of oligodeoxynucleotides containing 5-(hydroxymethyl)-cytosine; b) A. S. Hansen, A. Thalhammer, A. H. El-Sagheer, T. Brown, C. J. Schofield, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 1181-1184. Improved synthesis of 5-hydroxymethyl-2'-deoxycytidine phosphoramidite using a 2'-deoxyuridine to 2'-deoxycytidine conversion without temporary protecting groups.
- [37] M. de Kort, Peter C. de Visser, J. Kurzeck, Nico J. Meeuwenoord, Gijs A. van der Marel, W. Rüger, Jacques H. van Boom, *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, *2001*, 2075-2082. Chemical and Enzymatic Synthesis of DNA Fragments Containing 5-(β -D-Glucopyranosyloxymethyl)-2'-deoxycytidine – a Modified Nucleoside in T4 Phage DNA.
- [38] a) Q. Dai, C. X. Song, T. Pan, C. He, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 4182-4188. Syntheses of two 5-hydroxymethyl-2'-deoxycytidine phosphoramidites with TBDMS as the 5-

- hydroxymethyl protecting group and their incorporation into DNA; b) Q. Dai, C. He, *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem./ edited by Serge L. Beaucage ... [et al.]* **2011**, Chapter 4, Unit 4 47 41-18. Preparation of DNA containing 5-hydroxymethyl-2'-deoxycytidine modification through phosphoramidites with TBDMS as 5-hydroxymethyl protecting group.
- [39] M. Münzel, D. Globisch, C. Trindler, T. Carell, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 5671-5673. Efficient synthesis of 5-hydroxymethylcytosine containing DNA.
- [40] N. Karino, Y. Ueno, A. Matsuda, *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 2456-2463. Synthesis and properties of oligonucleotides containing 5-formyl-2'-deoxycytidine: in vitro DNA polymerase reactions on DNA templates containing 5-formyl-2'-deoxycytidine.
- [41] A. S. Schröder, J. Steinbacher, B. Steigenberger, F. A. Gnerlich, S. Schiesser, T. Pfaffeneder, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 315-318. Synthesis of a DNA promoter segment containing all four epigenetic nucleosides: 5-methyl-, 5-hydroxymethyl-, 5-formyl-, and 5-carboxy-2'-deoxycytidine.
- [42] N. Haginoya, A. Ono, Y. Nomura, Y. Ueno, A. Matsuda, *Bioconj. Chem.* **1997**, *8*, 271-280. Nucleosides and nucleotides. 160. Synthesis of oligodeoxyribonucleotides containing 5-(N-aminoalkyl)carbamoyl-2'-deoxyuridines by a new postsynthetic modification method and their thermal stability and nuclease-resistance properties.
- [43] a) K. Taghizadeh, J. L. McFaline, B. Pang, M. Sullivan, M. Dong, E. Plummer, P. C. Dedon, *Nat. Protoc.* **2008**, *3*, 1287-1298. Quantification of DNA damage products resulting from deamination, oxidation and reaction with products of lipid peroxidation by liquid chromatography isotope dilution tandem mass spectrometry; b) T. Brückl, D. Globisch, M. Wagner, M. Müller, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7932-7934. Parallel isotope-based quantification of modified tRNA nucleosides; c) Y. Yang, D. Nikolic, S. M. Swanson, R. B. van Breemen, *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 5376-5382. Quantitative determination of N7-methyldeoxyguanosine and O6-methyldeoxyguanosine in DNA by LC-UV-MS-MS.
- [44] a) H. Cao, Y. Wang, *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **2006**, *17*, 1335-1341. Collisionally activated dissociation of protonated 2'-deoxycytidine, 2'-deoxyuridine, and their oxidatively damaged derivatives; b) H. Hong, H. Cao, Y. Wang, Y. Wang, *Chem. Res. Toxicol.* **2006**, *19*, 614-621. Identification and quantification of a guanine-thymine intrastrand cross-link lesion induced by Cu(II)/H₂O₂/ascorbate.
- [45] C. X. Song, K. E. Szulwach, Y. Fu, Q. Dai, C. Yi, X. Li, Y. Li, C. H. Chen, W. Zhang, X. Jian, J. Wang, L. Zhang, T. J. Looney, B. Zhang, L. A. Godley, L. M. Hicks, B. T.

LITERATURVERZEICHNIS

- Lahn, P. Jin, C. He, *Nat. Biotechnol.* **2011**, *29*, 68-72. Selective chemical labeling reveals the genome-wide distribution of 5-hydroxymethylcytosine.
- [46] W. A. Pastor, U. J. Pape, Y. Huang, H. R. Henderson, R. Lister, M. Ko, E. M. McLoughlin, Y. Brudno, S. Mahapatra, P. Kapranov, M. Tahiliani, G. Q. Daley, X. S. Liu, J. R. Ecker, P. M. Milos, S. Agarwal, A. Rao, *Nature* **2011**, *473*, 394-397. Genome-wide mapping of 5-hydroxymethylcytosine in embryonic stem cells.
- [47] E. A. Raiber, D. Beraldi, G. Ficuz, H. E. Burgess, M. R. Branco, P. Murat, D. Oxley, M. J. Booth, W. Reik, S. Balasubramanian, *Genome Biol.* **2012**, *13*, R69. Genome-wide distribution of 5-formylcytosine in embryonic stem cells is associated with transcription and depends on thymine DNA glycosylase.
- [48] C. X. Song, K. E. Szulwach, Q. Dai, Y. Fu, S. Q. Mao, L. Lin, C. Street, Y. Li, M. Poidevin, H. Wu, J. Gao, P. Liu, L. Li, G. L. Xu, P. Jin, C. He, *Cell* **2013**, *153*, 678-691. Genome-wide profiling of 5-formylcytosine reveals its roles in epigenetic priming.
- [49] A. B. Robertson, J. A. Dahl, R. Ougland, A. Klungland, *Nat. Protoc.* **2012**, *7*, 340-350. Pull-down of 5-hydroxymethylcytosine DNA using JBP1-coated magnetic beads.
- [50] X. Lu, C. X. Song, K. Szulwach, Z. Wang, P. Weidenbacher, P. Jin, C. He, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 9315-9317. Chemical modification-assisted bisulfite sequencing (CAB-Seq) for 5-carboxylcytosine detection in DNA.
- [51] R. E. Hardisty, F. Kawasaki, A. B. Sahakyan, S. Balasubramanian, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 9270-9272. Selective Chemical Labeling of Natural T Modifications in DNA.
- [52] M. Yu, C.-X. Song, C. He, *Methods* **2015**, *72*, 16-20. Detection of mismatched 5-hydroxymethyluracil in DNA by selective chemical labeling.
- [53] a) R. Lister, R. C. O'Malley, J. Tonti-Filippini, B. D. Gregory, C. C. Berry, A. H. Millar, J. R. Ecker, *Cell* **2008**, *133*, 523-536. Highly integrated single-base resolution maps of the epigenome in Arabidopsis; b) R. Lister, J. R. Ecker, *Genome Res.* **2009**, *19*, 959-966. Finding the fifth base: genome-wide sequencing of cytosine methylation.
- [54] M. Frommer, L. E. McDonald, D. S. Millar, C. M. Collis, F. Watt, G. W. Grigg, P. L. Molloy, C. L. Paul, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **1992**, *89*, 1827-1831. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands.
- [55] Y. Huang, W. A. Pastor, Y. Shen, M. Tahiliani, D. R. Liu, A. Rao, *PloS one* **2010**, *5*, e8888. The behaviour of 5-hydroxymethylcytosine in bisulfite sequencing.

LITERATURVERZEICHNIS

- [56] a) K. Isono, K. Asahi, S. Suzuki, *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 7490-7505. Studies on polyoxins, antifungal antibiotics. 13. The structure of polyoxins; b) L. R. Johnson, R. S. Jones, D. Aures, R. Hakanson, *Am. J. Physiol.* **1969**, *216*, 1051-1053. Effect of antrectomy on gastric histidine decarboxylase activity in the rat.
- [57] M. J. Booth, M. R. Branco, G. Ficiz, D. Oxley, F. Krueger, W. Reik, S. Balasubramanian, *Science* **2012**, *336*, 934-937. Quantitative sequencing of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine at single-base resolution.
- [58] M. J. Booth, G. Marsico, M. Bachman, D. Beraldi, S. Balasubramanian, *Nat. Chem.* **2014**, *6*, 435-440. Quantitative sequencing of 5-formylcytosine in DNA at single-base resolution.
- [59] H. Wu, X. Wu, L. Shen, Y. Zhang, *Nat. Biotech.* **2014**, *32*, 1231-1240. Single-base resolution analysis of active DNA demethylation using methylase-assisted bisulfite sequencing.
- [60] B. Xia, D. Han, X. Lu, Z. Sun, A. Zhou, Q. Yin, H. Zeng, M. Liu, X. Jiang, W. Xie, C. He, C. Yi, *Nat. Methods* **2015**. Bisulfite-free, base-resolution analysis of 5-formylcytosine at the genome scale.
- [61] a) M. Karas, F. Hillenkamp, *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 2299-2301. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons; b) J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, C. M. Whitehouse, *Science* **1989**, *246*, 64-71. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules.
- [62] a) F. C. Hartman, F. Wold, *Fed. Proc.* **1966**, *25*, 527-&. Diimido Esters as Bifunctional Protein Reagents; b) F. C. Hartman, F. Wold, *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 3890-3891. Bifunctional Reagents. Cross-Linking of Pancreatic Ribonuclease with a Diimido Ester.
- [63] a) S. Madler, C. Bich, D. Touboul, R. Zenobi, *J. Mass Spectrom.* **2009**, *44*, 694-706. Chemical cross-linking with NHS esters: a systematic study on amino acid reactivities; b) A. J. Lomant, G. Fairbanks, *J. Mol. Biol.* **1976**, *104*, 243-261. Chemical probes of extended biological structures: synthesis and properties of the cleavable protein cross-linking reagent [35S]dithiobis(succinimidyl propionate).
- [64] a) G. M. Daniels, S. G. Amara, *Method. Enzymol.* **1998**, *296*, 307-318. Selective labeling of neurotransmitter transporters at the cell surface; b) J. V. Staros, *Biophys. J.* **1982**, *37*, 21-22. Membrane-impermeant, cleavable cross-linkers: new probes of nearest neighbor relationships at one face of a membrane.
- [65] P. S. Anjaneyulu, J. V. Staros, *Int. J. Pep. Protein Res.* **1987**, *30*, 117-124. Reactions of N-hydroxysulfosuccinimide active esters.

LITERATURVERZEICHNIS

- [66] O. V. Kovalenko, X. H. Yang, M. E. Hemler, *Mol. Cell. Proteomics* **2007**, *6*, 1855-1867. A novel cysteine cross-linking method reveals a direct association between claudin-1 and tetraspanin CD9.
- [67] H. Ozawa, *J. Biochem.* **1967**, *62*, 531-536. Bridging reagent for protein. II. The reaction of N,N'-polymethylene-bis(iodoacetamide) with cysteine and rabbit muscle aldolase.
- [68] a) J. J. Zara, R. D. Wood, P. Boon, C. H. Kim, N. Pomato, R. Bredehorst, C. W. Vogel, *Anal. Biochem.* **1991**, *194*, 156-162. A carbohydrate-directed heterobifunctional cross-linking reagent for the synthesis of immunoconjugates; b) E. Swanton, A. Holland, S. High, P. Woodman, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **2005**, *102*, 4342-4347. Disease-associated mutations cause premature oligomerization of myelin proteolipid protein in the endoplasmic reticulum.
- [69] G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Third edition. ed., Elsevier/AP, London ; Waltham, MA, **2013**.
- [70] T. L. Gilchrist, C. W. Rees, *Carbenes, Nitrenes and Arynes*, Wiley, Weinheim, **1969**.
- [71] C. Walling, M. J. Gibian, *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 3361-3364. Hydrogen Abstraction Reactions by Triplet States of Ketones.
- [72] R. A. G. Smith, J. R. Knowles, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 5072-5073. Aryldiazirines - Potential Reagents for Photolabeling of Biological Receptor Sites.
- [73] a) A. Sinz, *Mass Spectrom. Rev.* **2006**, *25*, 663-682. Chemical cross-linking and mass spectrometry to map three-dimensional protein structures and protein-protein interactions; b) A. Sinz, C. Arlt, D. Chorev, M. Sharon, *Protein Sci.* **2015**, *24*, 1193-1209. Chemical cross-linking and native mass spectrometry: A fruitful combination for structural biology; c) J. J. Serpa, C. E. Parker, E. V. Petrotchenko, J. Han, J. Pan, C. H. Borchers, *Eur. J. Mass.* **2012**, *18*, 251-267. Mass spectrometry-based structural proteomics; d) D. Paramelle, G. Miralles, G. Subra, J. Martinez, *Proteomics* **2013**, *13*, 438-456. Chemical cross-linkers for protein structure studies by mass spectrometry.
- [74] F. Herzog, A. Kahraman, D. Boehringer, R. Mak, A. Bracher, T. Walzthoeni, A. Leitner, M. Beck, F. U. Hartl, N. Ban, L. Malmstrom, R. Aebersold, *Science* **2012**, *337*, 1348-1352. Structural probing of a protein phosphatase 2A network by chemical cross-linking and mass spectrometry.
- [75] a) D. R. Müller, P. Schindler, H. Towbin, U. Wirth, H. Voshol, S. Hoving, M. O. Steinmetz, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 1927-1934. Isotope-tagged cross-linking reagents. A new tool in mass spectrometric protein interaction analysis; b) K. M. Pearson, L. K. Pannell, H. M. Fales, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2002**, *16*, 149-159.

LITERATURVERZEICHNIS

- Intramolecular cross-linking experiments on cytochrome c and ribonuclease A using an isotope multiplet method.
- [76] M. A. Lauber, J. P. Reilly, *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 7736-7743. Novel amidinating cross-linker for facilitating analyses of protein structures and interactions.
- [77] a) J. Luo, J. Fishburn, S. Hahn, J. Ranish, *Mol. Cell. Proteomics* **2012**, *11*, M111008318. An integrated chemical cross-linking and mass spectrometry approach to study protein complex architecture and function; b) C. H. Sohn, H. D. Agnew, J. E. Lee, M. J. Sweredoski, R. L. Graham, G. T. Smith, S. Hess, G. Czerwieniec, J. A. Loo, J. R. Heath, R. J. Deshaies, J. L. Beauchamp, *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 2662-2669. Designer reagents for mass spectrometry-based proteomics: clickable cross-linkers for elucidation of protein structures and interactions.
- [78] D. Paramelle, C. Enjalbal, M. Amblard, E. Forest, M. Heymann, S. Cantel, C. Geourjon, J. Martinez, G. Subra, *Proteomics* **2011**, *11*, 1277-1286. Solid-Phase Cross-Linking (SPCL): a new tool for protein structure studies.
- [79] K. L. Bennett, M. Kussmann, P. Bjork, M. Godzwon, M. Mikkelsen, P. Sorensen, P. Roepstorff, *Protein Sci.* **2000**, *9*, 1503-1518. Chemical cross-linking with thiol-cleavable reagents combined with differential mass spectrometric peptide mapping--a novel approach to assess intermolecular protein contacts.
- [80] A. F. Gomes, F. C. Gozzo, *J. Mass Spectrom.* **2010**, *45*, 892-899. Chemical cross-linking with a diazirine photoactivatable cross-linker investigated by MALDI- and ESI-MS/MS.
- [81] N. Geisler, *FEBS Lett.* **1993**, *323*, 63-67. Chemical crosslinking with disuccinimidyl tartrate defines the relative positions of the two antiparallel coiled coils of the desmin protofilament unit.
- [82] C. L. Jaffe, H. Lis, N. Sharon, *Biochemistry* **1980**, *19*, 4423-4429. New cleavable photoreactive heterobifunctional cross-linking reagents for studying membrane organization.
- [83] P. M. Abdella, P. K. Smith, G. P. Royer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1979**, *87*, 734-742. A new cleavable reagent for cross-linking and reversible immobilization of proteins.
- [84] D. A. Zarling, A. Watson, F. H. Bach, *J. Immunol.* **1980**, *124*, 913-920. Mapping of lymphocyte surface polypeptide antigens by chemical cross-linking with BSOCOES.

- [85] J. W. Back, A. F. Hartog, H. L. Dekker, A. O. Muijsers, L. J. de Koning, L. de Jong, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2001**, *12*, 222-227. A new crosslinker for mass spectrometric analysis of the quaternary structure of protein complexes.
- [86] F. Liu, M. B. Goshe, *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 6215-6223. Combinatorial electrostatic collision-induced dissociative chemical cross-linking reagents for probing protein surface topology.
- [87] X. Tang, G. R. Munske, W. F. Siems, J. E. Bruce, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 311-318. Mass spectrometry identifiable cross-linking strategy for studying protein-protein interactions.
- [88] W. Lambert, C. A. Soderberg, G. Rutsdottir, W. C. Boelens, C. Emanuelsson, *Protein Sci.* **2011**, *20*, 1682-1691. Thiol-exchange in DTSSP crosslinked peptides is proportional to cysteine content and precisely controlled in crosslink detection by two-step LC-MALDI MS/MS.
- [89] A. Kao, C. L. Chiu, D. Vellucci, Y. Yang, V. R. Patel, S. Guan, A. Randall, P. Baldi, S. D. Rychnovsky, L. Huang, *Mol. Cell. Proteomics* **2011**, *10*, M110 002212. Development of a novel cross-linking strategy for fast and accurate identification of cross-linked peptides of protein complexes.
- [90] B. Clifford-Nunn, H. D. Showalter, P. C. Andrews, *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **2012**, *23*, 201-212. Quaternary diamines as mass spectrometry cleavable crosslinkers for protein interactions.
- [91] S. P. Gygi, B. Rist, S. A. Gerber, F. Turecek, M. H. Gelb, R. Aebersold, *Nat. Biotechnol.* **1999**, *17*, 994-999. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags.
- [92] E. C. Yi, X. J. Li, K. Cooke, H. Lee, B. Raught, A. Page, V. Aneliunas, P. Hieter, D. R. Goodlett, R. Aebersold, *Proteomics* **2005**, *5*, 380-387. Increased quantitative proteome coverage with (13)C/(12)C-based, acid-cleavable isotope-coded affinity tag reagent and modified data acquisition scheme.
- [93] F. Lottspeich, J. Kellermann, *Methods Mol. Biol.* **2011**, *753*, 55-64. ICPL labeling strategies for proteome research.
- [94] A. Thompson, J. Schafer, K. Kuhn, S. Kienle, J. Schwarz, G. Schmidt, T. Neumann, R. Johnstone, A. K. Mohammed, C. Hamon, *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 1895-1904. Tandem mass tags: a novel quantification strategy for comparative analysis of complex protein mixtures by MS/MS.

LITERATURVERZEICHNIS

- [95] L. Dayon, A. Hainard, V. Licker, N. Turck, K. Kuhn, D. F. Hochstrasser, P. R. Burkhard, J. C. Sanchez, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 2921-2931. Relative quantification of proteins in human cerebrospinal fluids by MS/MS using 6-plex isobaric tags.
- [96] T. Werner, I. Becher, G. Sweetman, C. Doce, M. M. Savitski, M. Bantscheff, *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 7188-7194. High-resolution enabled TMT 8-plexing.
- [97] a) R. A. Fleischman, J. L. Cambell, C. C. Richardson, *J. Biol. Chem.* **1976**, *251*, 1561-1570. Modification and restriction of T-even bacteriophages. In vitro degradation of deoxyribonucleic acid containing 5-hydroxymethylctosine; b) Y. Imae, R. Okazaki, *J. Virol.* **1976**, *19*, 435-445. Replication of bacteriophage T4 DNA in vitro. I. Basic properties of the system.
- [98] C. Hwang, J. Park, J. Won, J. Kim, E. Ryu, *Arch. Pharmacol Res.* **1992**, *15*, 69-72. The oxidative iodination of pyrimidine bases and their nucleosides using iodine/dimethylformamide/ m-chloroperbenzoic acid.
- [99] M. Yoshikawa, T. Kato, T. Takenishi, *Tetrahedron Lett.* **1967**, *50*, 5065-5068. A novel method for phosphorylation of nucleosides to 5'-nucleotides.
- [100] a) T. Ikemoto, A. Haze, H. Hatano, Y. Kitamoto, M. Ishida, K. Nara, *Chem. Pharm. Bull.* **1995**, *43*, 210-215. Phosphorylation of Nucleosides with Phosphorus Oxychloride in Trialkyl Phosphate; b) I. Gillerman, B. Fischer, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2010**, *29*, 245-256. An improved one-pot synthesis of nucleoside 5'-triphosphate analogues.
- [101] S. Mohamady, A. Desoky, S. D. Taylor, *Org. Lett.* **2012**, *14*, 402-405. Sulfonyl imidazolium salts as reagents for the rapid and efficient synthesis of nucleoside polyphosphates and their conjugates.
- [102] L. R. Guan, G. W. van der Heijden, A. Bortvin, M. M. Greenberg, *ChemBiochem* **2011**, *12*, 2184-2190. Intracellular Detection of Cytosine Incorporation in Genomic DNA by Using 5-Ethynyl-2'-Deoxycytidine.
- [103] J. Ludwig, F. Eckstein, *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 631-635. Rapid and Efficient Synthesis of Nucleoside 5'-O-(1-Thiotriphosphates), 5'-Triphosphates and 2',3'-Cyclophosphorothioates Using 2-Chloro-4h-1,3,2-Benzodioxaphosphorin-4-One.
- [104] a) J. Caton-Williams, M. Smith, N. Carrasco, Z. Huang, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 4156-4159. Protection-free one-pot synthesis of 2'-deoxynucleoside 5'-triphosphates and DNA polymerization; b) J. Caton-Williams, L. Lin, M. Smith, Z. Huang, *Chem. Comm.* **2011**, *47*, 8142-8144. Convenient synthesis of nucleoside 5'-triphosphates for RNA transcription.

LITERATURVERZEICHNIS

- [105] a) G. T. Shiau, R. F. Schinazi, M. S. Chen, W. H. Prusoff, *J. Med. Chem.* **1980**, *23*, 127-133. Synthesis and biological activities of 5-(hydroxymethyl, azidomethyl, or aminomethyl)-2'-deoxyuridine and related 5'-substituted analogues; b) R. K. Grover, S. J. Pond, Q. Cui, P. Subramaniam, D. A. Case, D. P. Millar, P. Wentworth, Jr., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 2839-2843. O-glycoside orientation is an essential aspect of base J recognition by the kinetoplastid DNA-binding protein JBP1.
- [106] a) M. Hoffer, *Chem. Ber.-Recl* **1960**, *93*, 2777-2781. Alpha-Thymidin; b) A. Dierckx, F. A. Miannay, N. Gaied, S. Preus, M. Bjorck, T. Brown, L. M. Wilhelmsson, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 5987-5997. Quadracyclic Adenine: A Non-Perturbing Fluorescent Adenine Analogue.
- [107] C. H. Niu, *Anal. Biochem.* **1984**, *139*, 404-407. Synthesis of [(4-Nh₂)-N-15]Cytidine and [1,3-N-15(2)]Cytidine Derivatives for Use in Nmr-Monitored Binding Tests.
- [108] H. Vorbrüggen, B. Bennua, *Chem. Ber.* **1981**, *114*, 1279-1286. Nucleoside syntheses, XXV1) A new simplified nucleoside synthesis.
- [109] J. Asakura, M. J. Robins, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 4928-4933. Cerium(Iv)-Mediated Halogenation at C-5 of Uracil Derivatives.
- [110] A. Matsuda, K. Takenuki, M. Tanaka, T. Sasaki, T. Ueda, *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 812-819. Nucleosides and Nucleotides. 97. Synthesis of New Broad-Spectrum Antineoplastic Nucleosides, 2'-Deoxy-2'-Methylidenecytidine (Dmdc) and Its Derivatives.
- [111] a) T. T. Herskovits, *Comp. Biochem. Physiol. B* **1988**, *91*, 597-611. Recent aspects of the subunit organization and dissociation of hemocyanins; b) A. H. Bartel, D. H. Campbell, *Arch. Biochem. Biophys.* **1959**, *82*, 232-234. Some immunochemical differences between associated and dissociated hemocyanin.
- [112] E. J. Cohn, W. L. Hughes, Jr., J. H. Weare, *J. Am. Chem. Soc.* **1947**, *69*, 1753-1761. Preparation and properties of serum and plasma proteins; crystallization of serum albumins from ethanol water mixtures.
- [113] E. Harlow, D. Lane, *Using antibodies: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., **1999**.
- [114] a) M. J. Halloran, C. W. Parker, *J. Immunol.* **1966**, *96*, 373-378. The preparation of nucleotide-protein conjugates: carbodiimides as coupling agents; b) M. J. Halloran, C. W. Parker, *J. Immunol.* **1966**, *96*, 379-385. The production of antibodies to mononucleotides, oligonucleotides and DNA.

LITERATURVERZEICHNIS

- [115] S. F. Radka, C. Pasko, P. Haeberli, L. Beigelman, *Anal. Biochem.* **2002**, *307*, 40-46. The development of a monoclonal antibody specific for a 2(')-C-allyl modification of uridine, and its use in the localization of ribozymes in vivo.
- [116] M. Ko, Y. Huang, A. M. Jankowska, U. J. Pape, M. Tahiliani, H. S. Bandukwala, J. An, E. D. Lamperti, K. P. Koh, R. Ganetzky, X. S. Liu, L. Aravind, S. Agarwal, J. P. Maciejewski, A. Rao, *Nature* **2010**, *468*, 839-843. Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2.
- [117] a) B. F. Erlanger, S. M. Beiser, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **1964**, *52*, 68-74. Antibodies Specific for Ribonucleosides and Ribonucleotides and Their Reaction with DNA; b) P. Senapathy, M. A. Ali, M. T. Jacob, *FEBS letters* **1985**, *190*, 337-341. Mechanism of coupling periodate-oxidized nucleosides to proteins.
- [118] M. Berger, V. Shankar, A. Vafai, *Am. J. Med. Sci.* **2002**, *324*, 14-30. Therapeutic applications of monoclonal antibodies.
- [119] I. Yamamoto, M. Sekine, T. Hata, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1980**, 306-310. One-Step Synthesis of 5'-Azido-Nucleosides.
- [120] a) W. Bannwarth, *Helv. Chim. Acta* **1988**, *71*, 1517-1527. Solid-Phase Synthesis of Oligodeoxynucleotides Containing Phosphoramidate Internucleotide Linkages and Their Specific Chemical Cleavage; b) D. Sun, R. E. Lee, *J. Comb. Chem.* **2007**, *9*, 370-385. Solid-phase synthesis of a thymidinyl dipeptide urea library.
- [121] a) M. Winnacker, S. Breeger, R. Strasser, T. Carell, *Chembiochem* **2009**, *10*, 109-118. Novel diazirine-containing DNA photoaffinity probes for the investigation of DNA-protein-interactions; b) M. Winnacker, V. Welzmler, R. Strasser, T. Carell, *Chembiochem* **2010**, *11*, 1345-1349. Development of a DNA photoaffinity probe for the analysis of 8-OxodG-binding proteins in a human proteome.
- [122] a) M. Liebmann, F. Di Pasquale, A. Marx, *Chembiochem* **2006**, *7*, 1965-1969. A new photoactive building block for investigation of DNA backbone interactions: photoaffinity labeling of human DNA polymerase beta; b) C.-X. Song, C. He, *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 709-717. Bioorthogonal Labeling of 5-Hydroxymethylcytosine in Genomic DNA and Diazirine-Based DNA Photo-Cross-Linking Probes; c) U. K. Shigdel, J. Zhang, C. He, *Angew. Chem.* **2008**, *47*, 90-93. Diazirine-based DNA photo-cross-linking probes for the study of protein-DNA interactions; d) O. I. Lavrik, R. Prasad, R. W. Sobol, J. K. Horton, E. J. Ackerman, S. H. Wilson, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 25541-25548. Photoaffinity labeling of mouse fibroblast enzymes by a base

- excision repair intermediate. Evidence for the role of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in DNA repair.
- [123] J. Gierlich, G. A. Burley, P. M. Gramlich, D. M. Hammond, T. Carell, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3639-3642. Click chemistry as a reliable method for the high-density postsynthetic functionalization of alkyne-modified DNA.
- [124] P. M. Gramlich, C. T. Wirges, A. Manetto, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8350-8358. Postsynthetic DNA modification through the copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition reaction.
- [125] C. H. Sohn, J. E. Lee, M. J. Sweredoski, R. L. Graham, G. T. Smith, S. Hess, G. Czerwieniec, J. A. Loo, R. J. Deshaies, J. L. Beauchamp, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 2672-2680. Click chemistry facilitates formation of reporter ions and simplified synthesis of amine-reactive multiplexed isobaric tags for protein quantification.
- [126] M. R. Bond, H. Zhang, P. D. Vu, J. J. Kohler, *Nat. Protocol.* **2009**, *4*, 1044-1063. Photocrosslinking of glycoconjugates using metabolically incorporated diazirine-containing sugars.
- [127] H. J. Forman, J. M. Fukuto, M. Torres, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2004**, *287*, 246-256. Redox signaling: thiol chemistry defines which reactive oxygen and nitrogen species can act as second messengers.
- [128] a) C. C. Winterbourn, M. B. Hampton, *Free Radic. Biol.* **2008**, *45*, 549-561. Thiol chemistry and specificity in redox signaling; b) C. E. Paulsen, K. S. Carroll, *ACS Chem. Biol.* **2010**, *5*, 47-62. Orchestrating redox signaling networks through regulatory cysteine switches.
- [129] a) M. T. Forrester, J. S. Stamler, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2007**, *36*, 135-137. A classification scheme for redox-based modifications of proteins; b) D. T. Hess, A. Matsumoto, S. O. Kim, H. E. Marshall, J. S. Stamler, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2005**, *6*, 150-166. Protein S-nitrosylation: purview and parameters.
- [130] a) J. T. Hancock, *Mol. Biotechnol.* **2009**, *43*, 162-166. The role of redox mechanisms in cell signalling; b) G. Georgiou, *Cell* **2002**, *111*, 607-610. How to flip the (redox) switch.
- [131] C. I. Murray, J. E. Van Eyk, *Circ. Cardiovas. Genet.* **2012**, *5*, 591. Chasing cysteine oxidative modifications: proteomic tools for characterizing cysteine redox status.
- [132] a) S. R. Jaffrey, S. H. Snyder, *Sci. STKE* **2001**, *2001*, p11. The biotin switch method for the detection of S-nitrosylated proteins; b) S. R. Jaffrey, H. Erdjument-Bromage, C. D. Ferris, P. Tempst, S. H. Snyder, *Nat. Cell Biol.* **2001**, *3*, 193-197. Protein S-nitrosylation: a physiological signal for neuronal nitric oxide.

LITERATURVERZEICHNIS

- [133] J. S. Paige, G. Xu, B. Stancevic, S. R. Jaffrey, *Chem. Biol.* **2008**, *15*, 1307-1316. Nitrosothiol reactivity profiling identifies S-nitrosylated proteins with unexpected stability.
- [134] I. E. Valverde, A. Bauman, C. A. Kluba, S. Vomstein, M. A. Walter, T. L. Mindt, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 8957-8960. 1,2,3-Triazoles as Amide Bond Mimics: Triazole Scan Yields Protease-Resistant Peptidomimetics for Tumor Targeting.
- [135] S. Schiesser, B. Hackner, T. Pfaffeneder, M. Müller, C. Hagemeier, M. Truss, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 6516-6520.
- [136] M. Ishida, H. Watanabe, K. Takigawa, Y. Kurishita, C. Oki, A. Nakamura, I. Hamachi, S. Tsukiji, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 12684-12689. Synthetic self-localizing ligands that control the spatial location of proteins in living cells.