

Nucleotidmarkierung

Deutsche Ausgabe: DOI: 10.1002/ange.201508893
Internationale Ausgabe: DOI: 10.1002/anie.201508893

Fluorogene Markierung von 5-Formylpyrimidin-Nucleotiden in DNA und RNA

Biswajit Samanta, Jan Seikowski und Claudia Höbartner*

Abstract: 5-Formylcytosin (5fC) und 5-Formyluracil (5fU) sind natürliche modifizierte Nucleobasen, die durch Oxidation aus 5-Methylcytosin und Thymin (oder 5-Methyluracil) entstehen. Hier beschreiben wir die chemoselektive Markierung von 5-Formylpyrimidinnucleotiden in DNA und RNA mithilfe fluorogener Aldolkondensationsreaktionen mit 2,3,3-Trimethylindolderivaten. Unter milden und spezifischen Reaktionsbedingungen entstehen aus 5fU und 5fC Hemicyanin-artige Chromophore mit charakteristischen photophysikalischen Eigenschaften. Die Reaktionsbedingungen wurden an DNA-Oligonucleotiden optimiert und konnten direkt auf RNA übertragen werden. Der positionsspezifische Nachweis gelang durch Fluoreszenzmessung und Primerverlängerungsexperimente. Diese Methode der direkten Markierung von 5-Formylpyrimidinen wird zur Untersuchung von Vorkommen, enzymatischen Transformationen und biologischen Funktionen von epigenetischen/epitranskriptomischen Modifikationen von Nucleobasen in DNA und RNA beitragen.

Verschiedenartige chemische Modifikationen von Nucleobasen in DNA und RNA gehen mit elementaren biologischen Vorgängen einher.^[1] Um das Vorkommen und die Bedeutung der Modifikationen aufzuklären, sind spezifische chemische Reaktionen notwendig.^[2] In jüngster Zeit haben Formyl-Modifikationen an der 5-Position von Pyrimidin-Nucleobasen besonderes Interesse auf dem Gebiet der chemischen Biologie von Nucleinsäuren gefunden. In DNA ist 5-Formylcytosin (5fC) eine epigenetische Veränderung, die durch Oxidation von 5-Methylcytosin (5mC) mithilfe von Dioxygenasen der TET-Enzymfamilie katalysiert wird.^[3] Es wird vermutet, dass 5fC ein Zwischenprodukt bei der enzymatischen Demethylierung von 5mC ist, zusätzlich aber auch eine regulatorische Rolle in der Zelldifferenzierung spielt.^[4] In RNA ist 5fC eine post-transkriptionale Modifikation unbekannten biosynthetischen Ursprungs, die in mitochondrialer tRNA auftritt und

die Codon-Anticodon-Erkennung moduliert.^[5] Außer 5mC kann auch die Methylgruppe von Thymin leicht oxidiert werden, jedoch weniger aufgrund der Aktivität von Enzymen, durch die 5-Hydroxymethyluracil (5hmU) entsteht,^[6] als vielmehr durch reaktive Sauerstoffverbindungen (ROS), die in DNA die Bildung von mutagenem 5-Formyluracil (5fU) begünstigen.^[7] Während 5-Methyluracil (5mU) eine bekannte Basenmodifikation in tRNA und rRNA ist, wurden die Oxidationsprodukte 5hmU und 5fU bisher nicht als natürliche Modifikationen von RNA beschrieben. Kürzlich erschienene Veröffentlichungen über die enzymatische Oxidation von 5mC zu 5hmC in RNA^[8] lassen jedoch erwarten, dass in RNA auch 5hmU und 5fU vorkommen können. Synthetisch eingeführtes 5fU wurde in mehreren Arbeiten verwendet, welche die oxidative Schädigung,^[9] virale Abwehrmechanismen^[10] und Affinitätsmarkierung von Nucleinsäuren untersuchten.^[11]

Aldehydgruppen wurden vielfach verwendet, um Nucleinsäuren mit spektroskopischen Markern oder Affinitätsmarkern zu versehen.^[12] Amine, Hydrazide und Aminoxylderivate wurden zur Markierung von 5fC-modifizierter DNA mit fluoreszierenden Molekülen^[13] oder mit Biotin^[3a,4b,14] zur Anreicherung und Sequenzierung verwendet. Kürzlich wurden ähnliche Reaktionen auch zur Markierung von 5fU-modifizierter DNA eingesetzt.^[15] Durch die Bildung von Benzimidazol-, Benzoxazol- oder Benzothiazol-Heterocyclen nach Reaktion von 5fU mit 1,2-Phenyldiamin oder *ortho*-Amino(thio)phenolen entstanden fluoreszierende oder Spin-markierte Nucleoside.^[16] Benzothiazol-Chromophore ließen sich so an 5fU in DNA synthetisch einführen, während ähnliche Reaktionen an 5fC nicht erfolgreich waren.^[16a] Daher sollten weitere typische organische Reaktionen von Aldehyden als alternative Strategien in Betracht gezogen werden, um diese biologisch bedeutsamen Nucleosid-Modifikationen nachweisen zu können.^[17]

In der hier vorgestellten Arbeit nutzten wir eine Reaktion vom Typus der Aldolkondensation von 5fU und 5fC in synthetischen DNA- und RNA-Oligonucleotiden mit 2,3,3-Trimethylindol-Derivaten, um Hemicyanin(Hcy)-ähnliche Chromophore zu bilden (Abbildung 1). Die unterschiedlichen molekülspezifischen elektronischen Eigenschaften von Cytosin- und Uracil-Nucleobasen ermöglichten uns, zwei fluoreszierende Nucleotide mit verschiedenen photophysikalischen Eigenschaften zu synthetisieren, die den positionsspezifischen Nachweis von 5-Formylpyrimidinen in DNA und RNA ermöglichen. Darüber hinaus können auf diese Weise fluoreszierende Nucleotide eingebaut werden, deren Eigenschaften sich mit den Umgebungsbedingungen ändern und die als Sonden für das Faltungsverhalten von Nucleinsäuren

[*] Dr. B. Samanta, Prof. Dr. C. Höbartner
Institut für Organische und Biomolekulare Chemie
Georg-August-Universität Göttingen
Tammannstraße 2, 37077 Göttingen (Deutschland)
und
Exzellenzcluster Mikroskopie im Nanometerbereich und
Molekularphysiologie des Gehirns (CNMPB)
Göttingen (Deutschland)
E-Mail: claudia.hoebartner@chemie.uni-goettingen.de

Dr. B. Samanta, J. Seikowski, Prof. Dr. C. Höbartner
Forschungsgruppe Nukleinsäurechemie
Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie
Am Fassberg 11, 37077 Göttingen (Deutschland)

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201508893> zu finden.

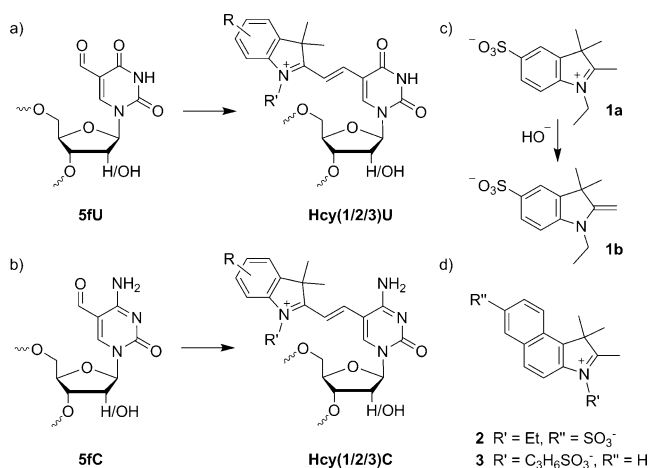


Abbildung 1. a) 5-Formyluridin(5fU)- und b) 5-Formylcytidin(5fC)-(Oligo)nucleotide und deren Umwandlung zu Hemicyanin(Hcy)-modifizierten Oligonucleotiden mittels c) *N*-Ethyl-2,3,3-trimethylindoleninium-5-sulfonat (**1**) oder d) Benzo[*e*]indoleninium-Reagenzien **2** und **3**.

sowie die Bindung von kleinen Liganden oder Proteinen fungieren können.

Zur Ausarbeitung der vorgeschlagenen Markierungsstrategie untersuchten wir zuerst die Kondensation von 5-Formyl-2'-desoxyuridin mit dem Sulfonylindol **1a**, wodurch das neue Hemicyanin-Nucleosid Hcy1dU gebildet wurde (Abbildung 2

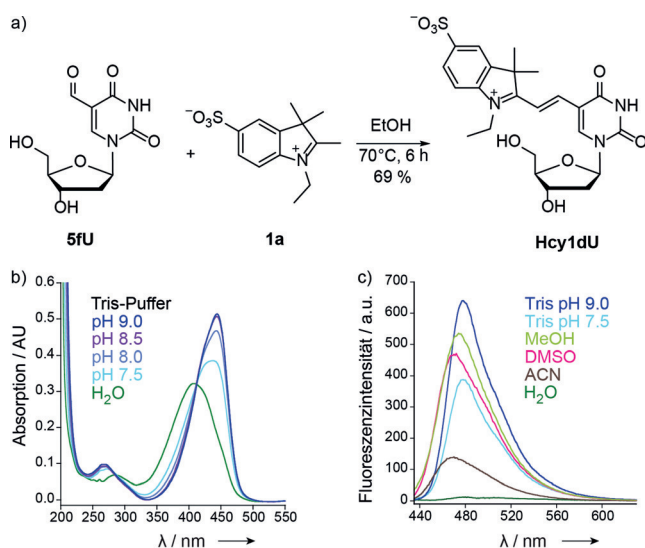


Abbildung 2. a) Synthese des Hcy1dU-Nucleosids. b) UV/Vis-Absorptionsspektren von 10 µM Hcy1dU in wässriger Lösung. c) Fluoreszenzemissionsspektren von Hcy1dU in verschiedenen Lösungsmitteln (0.25 µM, Anregung bei $\lambda = 418$ nm).

und Abbildung S1 der Hintergrundinformationen). Die Absorptions- und Emissionseigenschaften von Hcy1dU nahmen in wässrigen Pufferlösungen mit steigendem pH-Wert zu (Abbildung 2b). Die Maxima der Fluoreszenzemission in Methanol und DMSO zeigten gegenüber denen in wässriger alkalischer Lösung eine leichte Verschiebung zu kürzeren Wellenlängen bei nahezu unveränderter Intensität; die

Emissionsintensität in Acetonitril und in salzfreier wässriger Lösung war hingegen stark verringert (Abbildung 2c).

Zur Markierung der 5fU-Modifikation in DNA wurden analoge Kondensationsreaktionen mit **1a** unter verschiedenen Bedingungen mit den 5fU-haltigen DNA-Oligonucleotiden D1–D5 getestet, die durch Festphasensynthese hergestellt wurden (Tabelle 1, Abbildung S2).^[18] Die Analyse der

Tabelle 1: 5fU- und 5fC-modifizierte Oligonucleotide.

Name	5'-Sequenz-3' ^[a]
D1	CTCTTGAG (fU) GTTATG
D2	CTCTTGAA (fU) ATTATG
D3	CTCTTGAC (fU) CTTATG
D4	CTCTTGAT (fU) TTTATG
D5	GACTCAA (fU) AGCCGTG
D6	CTCTTGAG (fC) GTTATG
D7	CTCTTGAA (fC) ATTATG
D8	CTCTTGAC (fC) CTTATG
D9	CTCTTGAT (fC) TTTATG
D10	CATAG (fC) GCTCAAGAGAAATCTCGATGG ^a
D11	CG (fC) GGAGCTCGCTTGTCG
R1	r (GGAAGAGA (fU) GGCGACGG)
R2	r (GGAAGAGA (fC) GGUGAUGG)

[a] Die Primerbindestelle ist unterstrichen.

Markierungsreaktionen durch RP-HPLC (Messung der Absorption bei $\lambda = 260$ und 445 nm) und ESI-MS zeigte die effiziente Bildung der Hcy1U-markierten DNA (80% nach 6 h bei 45°C, pH 6.0; Abbildung 3a). Die Analyse der Markierungsreaktion durch Anionenaustauschchromatographie unter denaturierenden Bedingungen (pH 8, 6M Harnstoff, 80°C) zeigte jedoch nur etwa 40-prozentige Umsetzung zu neuen Produkten, von denen nur ein sehr geringer Anteil bei $\lambda = 445$ nm detektierbar war (Abbildung S3). Diese Beobachtung lässt sich durch reversible Anlagerung von Harnstoff an die Michael-Akzeptor-Struktur von Hcy1U und einen signifikanten Anteil der Retro-Aldolreaktion erklären. Das Harnstoff-Additionsprodukt wurde nach PAGE-Reinigung durch ESI-MS identifiziert. Durch Behandlung mit Essigsäure wurden die gewünschten Hcy1U-markierten DNAs wiederhergestellt (Abbildung S4). Nach präparativen Markierungsreaktionen wurde überschüssiges Reagens **1a** durch Präzipitation, Ultrafiltration oder Gelfiltrations-Chromatographie entfernt, und die Identitäten der Hcy1U-markierten DNAs D1–D5 wurden durch ESI-MS bestätigt (Tabelle S2).

Die Fluoreszenzemission von Hcy1U-markierten DNA-Oligonucleotiden wurde untersucht und mit jener der oben beschriebenen Hcy1dU-Nucleoside verglichen. Die Wellenlängen der Anregungs- und Emissionsmaxima lagen bei $\lambda = 445$ bzw. 480 nm. Die Emissionsintensität von Hcy1U-markierten DNA-Oligonucleotiden hing auch vom pH-Wert der Lösung ab (Abbildung S5): Sie war nahezu viermal größer, wenn der pH-Wert von 8.0 auf 9.0 erhöht wurde. Auch wurde die Intensität durch die das markierte Nucleotid umgebenden Basensequenzen beeinflusst (Abbildung 3b). Benachbarte Guanosine können durch Photonen-induzierten Elektronentransfer zu teilweiser Fluoreszenzlöschung beitragen, wodurch die Emission von D1 herabgesetzt wurde. Die höchste

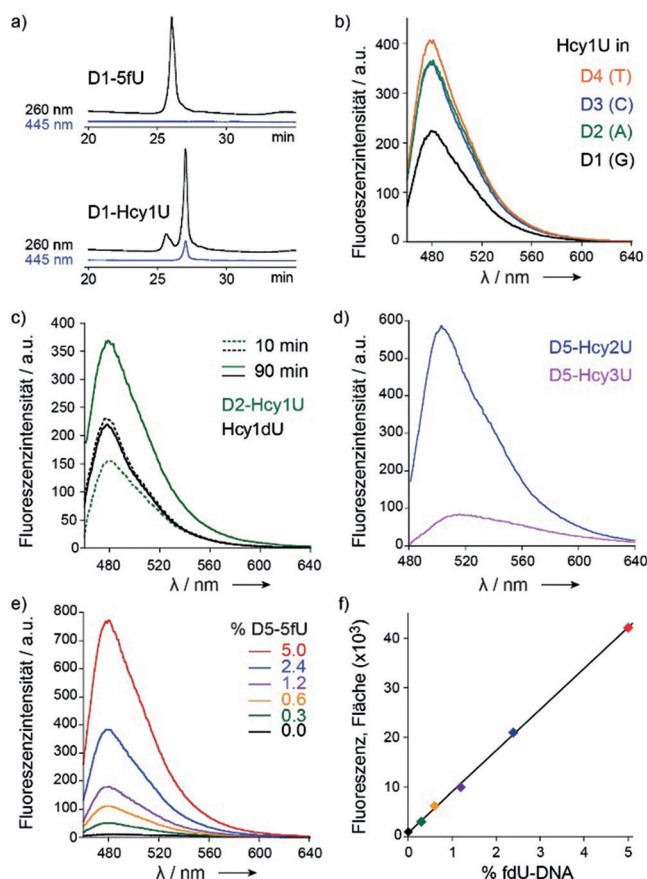


Abbildung 3. a) RP-HPLC-Analyse bei $\lambda = 260$ (schwarz) und 445 nm (blau) von 5fU-modifizierter DNA (D1) und D1-Hcy1U, gebildet durch Reaktion mit **1a** bei pH 6.0, 45°C , 6 h. b)–d) Fluoreszenzemissionsspektren von HcyU-markierten DNAs D1–D5. c) $0.25\ \mu\text{M}$ in 10 mM Tris, pH 9.0, 150 mM NaCl, 25°C , Anregung bei $\lambda = 445$ (Hcy1U), 465 nm (Hcy2U und Hcy3U). e) Fluoreszenzintensität bei unterschiedlichem Gehalt an 5fU in der DNA. f) Analyse der in (e) gezeigten Daten.

Intensität wurde für D4 beobachtet, in der Hcy1U von Thyminen umgeben ist. Auffälligerweise erreichte das Fluoreszenzsignal sein Maximum nach Inkubation bei pH 9 nur sehr langsam, mit beobachteten Geschwindigkeitskonstanten im Bereich von 0.05 bis $0.1\ \text{min}^{-1}$ (Abbildung S5). Im Unterschied dazu wurde unter gleichen Bedingungen kein zeitabhängiger Anstieg der Fluoreszenz des Hcy1dU-Mononucleosids beobachtet (Abbildung 3 c). Die molekulare Ursache für den langsamen Fluoreszenzanstieg im Oligonucleotid ist nicht leicht zu erklären; sie könnte auf eine Kombination von Faktoren zurückzuführen sein, die durch lokale elektrostatische oder Lösungsmittel-abhängige Effekte bedingt sind. Kovalente Veränderungen der markierten DNA wurden durch mehrstündige Inkubation bei pH 9 und anschließende HPLC- und ESI-MS-Analysen ausgeschlossen.

Um die Fluoreszenzeigenschaften markierter DNAs gezielt zu beeinflussen, wurden für analoge Kondensationsreaktionen die molekular größeren Benzo[e]indoleninium-Agentien **2** und **3** verwendet. Das ausgedehnte π -System verursachte in beiden Fällen die erwartete Rotverschiebung des Emissionsmaximums (Abbildung 3 d). Die Sulfonylgruppe am aromatischen Ring in Hcy2U führte zu einer signifi-

kant stärkeren Fluoreszenz gegenüber der des Sulfonats am *N*-Alkyl-Substituenten in Hcy3U. Dieser Befund zeigt, dass das Substitutionsmuster die Leuchtstärke des Fluorophors wesentlich verändert, wahrscheinlich auch durch den Einfluss auf Stapel-Wechselwirkungen mit benachbarten Nucleotiden.

Nachfolgend zeigten wir, dass die neuen fluorogenen Reaktionen verwendet werden können, um quantitative Informationen über das in DNA-Proben vorhandene 5fU zu erhalten. Mehrere 5fU-Nucleotide wurden enzymatisch unter Verwendung von 5fdUTP in DNA eingebaut. Die Intensität der Emission der mit **1a** markierten DNA korrelierte mit der Anzahl der darin enthaltenen 5fU-modifizierten Nucleotide (Abbildung S6). Die Empfindlichkeit des Nachweises von 5fU bestimmten wir modellhaft mithilfe einer Eichkurve, die mit Proben definierter Anteile von 5fU-modifizierter DNA (0.3 – 5%) erhalten wurde. Die Fluoreszenzintensität nach der Reaktion mit **1a** zeigte eine lineare Abhängigkeit vom prozentualen Anteil der in der Mischung enthaltenen 5fU-DNA (Abbildung 3 e,f). Die niedrigste Konzentration markierter DNA, die in diesem Experiment getestet wurde, war $25\ \text{nm}$, was einem Anteil von 0.02% 5fU-Nucleotiden in der DNA-Probe entspricht.

Analog zur Markierung von 5fU-DNA untersuchten wir ähnliche fluorogene Reaktionen in 5fC-modifizierten Oligonucleotiden (Tabelle S1, Abbildung S2). Die für 5fU-DNA etablierten optimalen Markierungsbedingungen lieferten nur 24% Umwandlung von 5fC-DNA (Abbildung S7). Wurde der pH-Wert auf 7.5 bei 45°C erhöht, betrug die Ausbeute des neuen Produktes 65% . Inkubation bei 70°C und pH 7.5 führte zur Bildung eines zweiten Produktes. Die massenspektrometrische Analyse zeigte, dass das erste Produkt durch Aldoladdition von **1a** entstand, die Kondensation jedoch nicht vollständig ablief, d.h. Wasser nicht eliminiert wurde. Nach den ESI-MS-Daten enthielt das zweite Produkt ein zusätzliches Molekül **1a**. Vermutlich wurde an der Nucleobase eine partiell konjugierte, Cyanin-ähnliche Modifikation gebildet, deren Struktur jedoch noch nicht eindeutig bestimmt werden konnte. Wir richteten unser Augenmerk daher auf die Optimierung der Reaktionsbedingungen zur Herstellung der Hcy1C-markierten DNA. Die Ergebnisse der Reaktionsführung unter zahlreichen pH- und Pufferbedingungen mit ^{32}P -markierter 5fC-DNA deuteten darauf hin, dass das gewünschte Produkt bevorzugt bei pH 7.5 gebildet wird (Abbildung S8). Um die nucleophilen Eigenschaften des Indol-Reagens weiter zu verbessern, wurde **1a** mit NaOH umgesetzt und anschließend mit Dowex- H^+ neutralisiert, um die Enamin-Verbindung **1b** mit einer exocyclischen Doppelbindung zu bilden (überprüft durch NMR-Spektroskopie). Verwendung von **1b** bei pH 7.5 und 45°C lieferte ein einziges Additionsprodukt in 80% Ausbeute (Abbildung S9). Die massenspektrometrische Analyse des isolierten Produktes identifizierte das nicht-dehydrierte Zwischenprodukt, das weiter zum Kondensationsprodukt umgesetzt wurde. Die Dehydrierung gelang bei 45°C unter Verwendung von 3% Essigsäure. Das gewünschte Produkt war stabil und konnte durch denaturierende Gelelektrophorese in reiner Form erhalten werden (Abbildung 4).

Die optimierten Reaktionsbedingungen (d.h. Verwendung von **1b** bei pH 7.4 und 45°C mit nachfolgender Säure-

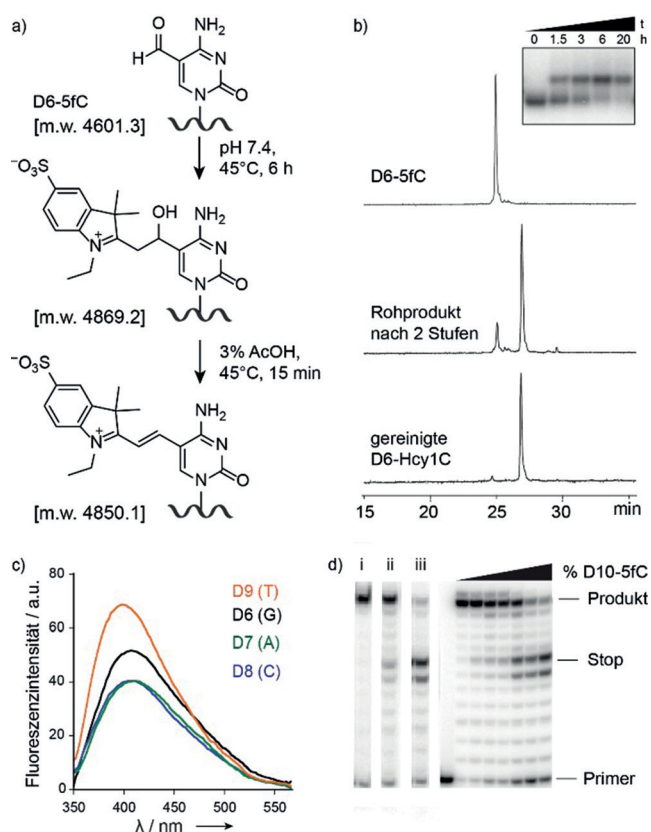


Abbildung 4. a) Reaktionsschema zur Markierung von 5fC-modifizierter DNA. b) Anionenaustausch-HPLC-Analyse bei $\lambda = 260$ nm. Einschub: PAGE-Analyse der Reaktion mit $5'$ - 32 P-markierter DNA D6. m.w. = Molekulargewicht. c) Fluoreszenzemissionsspektren von Hcy1C-markierten DNAs D6–D9; die flankierenden Nucleotide der DNA-Sequenz sind in Klammern angegeben. $5 \mu\text{M}$ DNA in K-Phosphatpuffer, pH 7, Anregung bei $\lambda = 335$ nm. d) Primerverlängerung mit Klenow-*exo*-DNA-Polymerase. Template: i) unmodifizierte DNA, ii) D10-5fC, iii) D10-Hcy1C. Rechtes Gelbild: zunehmender Anteil an 5fC im Templat (0–100%). Experimentelle Details sind in den Hintergrundinformationen zu finden.

behandlung) wurden zur Markierung präparativer Mengen der DNA-Oligonucleotide D6–D9 verwendet, in denen 5fC von verschiedenen Nucleotiden flankiert war. Die Maxima der Anregungs- und Emissionsspektren waren gegenüber jenen der analogen Hcy1U-markierten DNAs stark blauverschoben ($\lambda = 335$ bzw. 400–415 nm), und die Emissionsintensität war verringert. Trotz der verringerten Intensität zeigte der Hcy1C-Marker moderate umgebungsabhängige Empfindlichkeit im Einzel- und im Doppelstrang (Abbildungen 4c und S10). Anders als bei Hcy1U war die Emission kaum vom pH-Wert (zwischen pH 7 und 9) oder der Inkubationszeit abhängig. Wegen der unterschiedlichen Anregungs- und Emissionswellenlängen konnten Hcy1U und Hcy1C in einer einzigen Probe unterschieden werden, die beide Modifikationen enthielt (Abbildung S11).

Um das Potenzial der Aldehyd-spezifischen Reaktion nicht nur zur Fluoreszenzmarkierung zu nutzen, untersuchten wir die Möglichkeit der positionsspezifischen Analyse von 5fC-DNA mit DNA-Polymerasen. Während 5-Formyl-Modifikationen durch DNA-Polymerasen meist überlesen

werden,^[19] könnten die Hemicyanin-Nucleoside den Abbruch der Primerverlängerung auslösen, was dann den Nachweis und die Quantifizierung der zugrundeliegenden 5fC-Modifikation ermöglichen sollte. Während unmarkierte 5fC-DNA die Klenow-DNA-Polymerase nur wenig beeinflusste, beobachteten wir eine starke Blockade im Falle von markierter Hcy1C-DNA als Templat (Abbildungen 4d, S12 und S13). Der Anteil des Abbruchproduktes korrelierte mit dem bekannten 5fC-Gehalt der eingesetzten DNA-Probe (Abbildung 4d). Diese Befunde zeigen, dass die Kondensationsreaktion mit Indoleninium-Reagentien verwendet werden kann, um das Vorkommen der 5fC-Modifikationen an einer bestimmten Stelle der Ziel-DNA zu überprüfen. Dieser experimentelle Ansatz könnte mit bekannten oxidierenden und reduzierenden Reaktionen an DNA kombiniert werden, um unterschiedliche Oxidationszustände von 5mC-Modifikationen zu erkennen.^[4b,14b] Darüber hinaus hat die Hcy-Markierungsreaktion das Potenzial, für künftige Genom-weite Analysen von 5-Formylpyrimidinen eingesetzt zu werden.

Obwohl 5-Formylpyrimidine auch in der RNA-Biologie eine bedeutsame Rolle spielen, sind die Methoden zu ihrer Analyse in RNA weit weniger entwickelt als im Falle der DNA. Wir übertrugen daher die optimierten Bedingungen zur Markierung von 5fC und 5fU in DNA auf die analog modifizierten RNA-Oligonucleotide, die durch In-vitro-Transkription hergestellt wurden (Abbildung S2). Die Bedingungen der Markierungsreaktion ließen sich leicht anpassen, und die entstandenen Produkte wurden durch HPLC und ESI-MS charakterisiert (Abbildung S14). Die Fluoreszenzeigenschaften der Hcy1U- und Hcy1C-markierten RNAs waren ähnlich jenen von markierter DNA. Diese Befunde sollten neue Wege zur weitergehenden Untersuchung von 5fC- und 5fU-Modifikationen in RNA ebnen.

Wir haben hier über die effiziente Markierung von natürlich vorkommendem 5fC und 5fU in Nucleinsäuren mithilfe einer neuen fluorogenen Reaktion vom Typus der Aldolkondensation unter milden und biokompatiblen Bedingungen berichtet. Die Nucleobasen-spezifischen Eigenschaften von Uracil und Cytosin ermöglichten die Umwandlung in fluoreszierende Reste und deren sequenzselektive Lokalisierung. Der Grad der 5fC-Modifikation an einer bestimmten Stelle einer Sequenz wurde durch Blockade der Polymerase-katalysierten Primerverlängerung analysiert. Die hier vorgestellte, neue Markierungsreaktion gibt nicht nur Einblicke in das unterschiedliche Reaktionsverhalten von 5fU und 5fC, sondern sie ermöglicht auch direkte Anwendungen bei der Detektion von Formyl-modifizierten Nucleotiden in biologisch relevanten Systemen. Die neuen Fluoreszenzmarker sollen in zukünftigen Untersuchungen auch eingesetzt werden, um die Desaminierung von 5fC zu 5fU zu verfolgen, und sie können für Anwendungen zur metabolischen Markierung und optischen Kartierung angepasst werden.

Danksagung

Diese Arbeit wurde durch Fördermittel der DFG finanziert: Exzellenzcluster Mikroskopie im Nanometerbereich und Molekularphysiologie des Gehirns (CNMPB) und DFG

Schwerpunktprogramm Chemische Biologie natürlicher Nucleinsäuremodifikationen (SPP1784).

Stichwörter: DNA · Fluoreszenz · Markierungen · Modifikationen · RNA

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 1912–1916
Angew. Chem. **2016**, *128*, 1946–1950

- [1] a) T. Carell, C. Brandmayr, A. Hienzsch, M. Müller, D. Pearson, V. Reiter, I. Thoma, P. Thumbs, M. Wagner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 7110–7131; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 7220–7242; b) M. Helm, J. D. Alfonzo, *Chem. Biol.* **2014**, *21*, 174–185.
- [2] I. Behm-Ansmant, M. Helm, Y. Motorin, *J. Nucleic Acids* **2011**, 408053.
- [3] a) 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; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 7146–7150; b) S. Ito, L. Shen, Q. Dai, S. C. Wu, L. B. Collins, J. A. Swenberg, C. He, Y. Zhang, *Science* **2011**, *333*, 1300–1303.
- [4] a) M. Wagner, J. Steinbacher, T. F. Kraus, S. Michalakakis, B. Hackner, T. Pfaffeneder, A. Perera, M. Muller, A. Giese, H. A. Kretzschmar, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 12511–12514; *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 12691–12695; b) 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.
- [5] a) J. Moriya, T. Yokogawa, K. Wakita, T. Ueda, K. Nishikawa, P. F. Crain, T. Hashizume, S. C. Pomerantz, J. A. McCloskey, *Biochemistry* **1994**, *33*, 2234–2239; b) H. Lusic, E. M. Gustilo, F. A. P. Vendeix, R. Kaiser, M. O. Delaney, W. D. Graham, V. A. Moye, W. A. Cantara, P. F. Agris, A. Deiters, *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, 6548–6557; c) Y. Bilbille, E. M. Gustilo, K. A. Harris, C. N. Jones, H. Lusic, R. J. Kaiser, M. O. Delaney, L. L. Spremulli, A. Deiters, P. F. Agris, *J. Mol. Biol.* **2011**, *406*, 257–274.
- [6] T. Pfaffeneder, F. Spada, M. Wagner, C. Brandmayr, S. K. Laube, D. Eisen, M. Truss, J. Steinbacher, B. Hackner, O. Kotljarova, D. Schuermann, S. Michalakakis, O. Kosmatchev, S. Schiesser, B. Steigenberger, N. Raddaoui, G. Kashiwazaki, U. Muller, C. G. Spruijt, M. Vermeulen, H. Leonhardt, P. Schar, M. Muller, T. Carell, *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10*, 574–581.
- [7] a) H. Kasai, A. Iida, Z. Yamaizumi, S. Nishimura, H. Tanooka, *Mutat. Res.* **1990**, *243*, 249–253; b) H. Kamiya, H. Tsuchiya, N. Karino, Y. Ueno, A. Matsuda, H. Harashima, *J. Biochem.* **2002**, *132*, 551–555.
- [8] a) L. Fu, C. R. Guerrero, N. Zhong, N. J. Amato, Y. Liu, S. Liu, Q. Cai, D. Ji, S. G. Jin, L. J. Niedernhofer, G. P. Pfeifer, G. L. Xu, Y. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 11582–11585; b) S. M. Huber, P. van Delft, L. Mendil, M. Bachman, K. Smollett, F. Werner, E. A. Miska, S. Balasubramanian, *ChemBioChem* **2015**, *16*, 752–755.
- [9] A. Klungland, R. Paulsen, V. Rolseth, Y. Yamada, Y. Ueno, P. Wiik, A. Matsuda, E. Seeberg, S. Bjelland, *Toxicol. Lett.* **2001**, *119*, 71–78.
- [10] L. F. Bonnacc, L. M. Mansky, S. E. Patterson, *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 9403–9414.
- [11] V. W. Armstrong, H. Sternbach, F. Eckstein, *Biochemistry* **1976**, *15*, 2086–2091.
- [12] T. S. Zatspepin, D. A. Stetsenko, M. J. Gait, T. S. Oretskaya, *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16*, 471–489.
- [13] a) P. Guo, S. Yan, J. Hu, X. Xing, C. Wang, X. Xu, X. Qiu, W. Ma, C. Lu, X. Weng, X. Zhou, *Org. Lett.* **2013**, *15*, 3266–3269; b) J. Hu, X. Xing, X. Xu, F. Wu, P. Guo, S. Yan, Z. Xu, J. Xu, X. Weng, X. Zhou, *Chemistry* **2013**, *19*, 5836–5840; c) L. Xu, Y.-C. Chen, J. Chong, A. Fin, L. S. McCoy, J. Xu, C. Zhang, D. Wang, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 11223–11227; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 11405–11409; d) L. Xu, Y.-C. Chen, S. Nakajima, J. Chong, L. Wang, L. Lan, C. Zhang, D. Wang, *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 567–574.
- [14] a) E.-A. Raiber, D. Beraldi, G. Ficzi, H. Burgess, M. Branco, P. Murat, D. Oxley, M. Booth, W. Reik, S. Balasubramanian, *Genome Biol.* **2012**, *13*, R69; b) N. Plongthongkum, D. H. Diep, K. Zhang, *Nat. Rev. Genet.* **2014**, *15*, 647–661.
- [15] R. E. Hardisty, F. Kawasaki, A. B. Sahakyan, S. Balasubramanian, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 9270–9272.
- [16] a) W. Hirose, K. Sato, A. Matsuda, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 8392–8394; *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 8570–8572; b) D. B. Gophane, S. T. Sigurdsson, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 999–1001; c) W. Hirose, K. Sato, A. Matsuda, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 6206–6217; d) J. Krim, C. Grunewald, M. Taourirte, J. W. Engels, *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 480–486.
- [17] Während der Fertigstellung dieser Arbeit wurde über eine Friedländer-Reaktion an 5fC berichtet: 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**, *12*, 1047–1050.
- [18] K. Sato, W. Hirose, A. Matsuda, *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* **2008**, Unit 1.21.
- [19] 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.

Eingegangen am 22. September 2015

Online veröffentlicht am 17. Dezember 2015