

Barcoding von genomischer DNA und Anwendung im Bereich des DNA-Mappings

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
der RWTH Aachen University zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften genehmigte Dissertation

vorgelegt von
Felix Maximilian Schilcher
aus Köln

Berichter:

Prof. Dr. sc. nat. Elmar Weinhold

Prof. Dr. rer. nat. Dominik Wöll

Tag der mündlichen Prüfung: 23.06.2021

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Universitätsbibliothek verfügbar.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass diese Dissertation und die darin dargelegten Inhalte die eigenen sind und selbstständig, als Ergebnis der eigenen originären Forschung, generiert wurden. Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass diese Arbeit vollständig oder größtenteils in der Phase als Doktorand dieser Fakultät und Universität angefertigt wurde; Sofern irgendein Bestandteil dieser Dissertation zuvor für einen akademischen Abschluss oder eine andere Qualifikation an dieser oder einer anderen Institution verwendet wurde, wurde dies klar angezeigt; Wenn immer andere eigene- oder Veröffentlichungen Dritter herangezogen wurden, wurden diese klar benannt; Wenn aus anderen eigenen- oder Veröffentlichungen Dritter zitiert wurde, wurde stets die Quelle hierfür angegeben. Diese Dissertation ist vollständig meine eigene Arbeit, mit der Ausnahme solcher Zitate; Alle wesentlichen Quellen von Unterstützung wurden benannt; Wenn immer ein Teil dieser Dissertation auf der Zusammenarbeit mit anderen basiert, wurde von mir klar gekennzeichnet, was von anderen und was von mir selbst erarbeitet wurde; Teile dieser Arbeit wurden zuvor veröffentlicht (s. nächste Seite).

Aachen, 06.07.2021

Felix Maximilian Schilcher

Beiträge zu Veröffentlichungen und wissenschaftlichen Kooperationen

Teile der in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse wurden bereits veröffentlicht.

Ionic Current-Based Mapping of Short Sequence Motifs in Single DNA Molecules Using Solid-State Nanopores, K. Chen, M. Juhasz, F. Gularek, E. Weinhold, Y. Tian, U. F. Keyser, N. A. W. Bell, *Nano Lett.* **2017**, *17*, 5199–5205.

Die Durchführung der einstufigen Biotin-Modifikation der ϕ X174- und M13mp18-Plasmide mit M.TaqI und AdoYnBiotinII, sowie die zugehörige Analytik mittels Modifikations-Restriktions-Assay wurden von mir durchgeführt (Abs. 3.3.2.1 und 5.5.2.1). Die Synthese des Cofaktors erfolgte durch Dr. Michael Martin. Die Linearisierung, Aufreinigung, Probenvorbereitung und die gesamte elektrische Analyse der Biotin-modifizierten DNA mittels Nanoporen wurde von Dr. Kaikai Chen (Cavendish Laboratories, Cambridge, UK) durchgeführt.

Long-Read Single-Molecule Maps of the Functional Methylome, H. Sharim, A. Grunwald, T. Gabrieli, Y. Michaeli, S. Margalit, D. Torchinsky, R. Arielly, G. Nifker, M. Juhasz, F. Gularek, M. Almalvez, B. Dufault, S. S. Chandra, A. Liu, S. Bhattacharya, Y.-W. Chen, E. Vilain, K. R. Wagner, J. Pevsner, J. Reifenger, E. T. Lam, A. R. Hastie, H. Cao, H. Barseghyan, E. Weinhold, *Genome Res.* **2019**, *29*, 646–656.

Neben der Synthese der literaturbekannten Verbindung AdoYnTAMRA (Abs. 5.3.2.2), wurde die Fluoreszenzmikroskopie von teilweise methylierter und anschließend mit M.TaqI und AdoYnTAMRA modifizierter Lambda-DNA von mir durchgeführt (SI Abb. S3D). Weiterhin wurde eine von mir entwickelte Computersimulation genutzt, um theoretisch ermittelte Fragmentverteilungen mit denen der agarosegelelektrophoretischen Analyse zu vergleichen (SI Abb. S3C).

Label As You Fold: Methyltransferase-Assisted Functionalization of DNA Nanostructures, C. Heck, D. Torchinsky, G. Nifker, F. Gularek, Y. Michaeli, E. Weinhold, Y. Ebenstein *Nanoscale* **2020**, *12*, 20287-20291.

Einzig die Synthese der literaturbekannten Verbindung AdoYnCF640R wurde von mir durchgeführt (Abs. 3.1.2 und 5.3.2.4).

Electrical DNA Sequence Mapping Using Oligodeoxynucleotide Labels and Nanopores, K. Chen, F. Gularek, B. Liu, E. Weinhold, U. Kaiser *Nanoscale* **2021**, DOI 10.1021/acsnano.0c07947.

Die Synthese (Abs. 3.1.3 bzw. 5.3.3.1) von, sowie der EMSA-Assay (Abs. 3.2.4 bzw. 5.4.5) und die einstufige Modifikationsreaktion (Abs. 3.3.2.2 bzw. 5.5.2.2) mit dem ODN-modifizierten AdoMet-Analogon AdoYnODN11 wurden von mir durchgeführt. Die Linearisierung, Aufreinigung und Analyse der ODN-modifizierten DNA wurde von Dr. Kaikai Chen durchgeführt.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Optisches DNA-Mapping	1
1.2	Fluoreszenzmarkierung von genomischer DNA	3
1.2.1	Sequenzspezifische kovalente DNA-Modifikationen	3
1.2.2	Kovalente DNA-Modifikationen zur Analyse von Nukleobasenmodifikationen	5
1.3	Streckung von genomischer DNA	5
1.3.1	Non-fluide Systeme	6
1.3.2	Fluidale Systeme	7
2	Zielsetzung	9
3	Allgemeiner Teil	11
3.1	Synthesen doppeltaktivierter AdoMet-Analoga	11
3.1.1	Synthesen reaktiver AdoMet-Analoga	11
3.1.2	Synthesen fluoreszierender AdoMet-Analoga	13
3.1.3	Synthesen ODN-modifizierter AdoMet-Analoga	15
3.2	Aktivität doppeltaktivierter AdoMet-Analoga	20
3.2.1	Aktivitätstests von M.TaqI mit AdoYnYn/AdoYnTAMRA (kurz und lang)	21
3.2.2	Aktivitätstests von M.TaqI/M.BseCI mit AdoYnATTO532 und AdoYnAF640R	22
3.2.3	Aktivitätstests von M.TaqI mit ODN-modifizierten AdoMet-Analoga	23
3.2.4	EMSA mit M.TaqI und AdoYnODN11	26
3.3	Einstufige DNA-Modifikationen	29
3.3.1	DNA-Modifikation mit fluoreszierenden Reportergruppen	30
3.3.2	DNA-Modifikation mit sterisch anspruchsvollen Gruppen	37
3.4	DNA-Modifikation mittels DNA-Blocking	42
3.4.1	Grundlagen des DNA-Blockings	43
3.4.2	Voruntersuchungen mit Restriktionsendonukleasen	44
3.4.3	Voruntersuchungen mit DNA-MTasen	46
3.4.4	Anwendung von DNA-Blocking mit Plasmid-DNA	47
3.4.5	Anwendung von DNA-Blocking mit genomischer DNA	49
3.5	In-Gel DNA-Modifikation	52
3.6	Auswertung des optischen DNA-Mappings	54
4	Zusammenfassung	60
5	Experimenteller Teil	64

5.1	Verwendete Materialien	64
5.1.1	Chemikalien	64
5.1.2	Pufferlösungen	66
5.1.3	Marker-, Phagen- und Plasmid-DNA	68
5.1.4	Oligonukleotide	68
5.1.5	Enzyme	69
5.1.6	Geräte	70
5.2	Instrumentelle Methoden	71
5.2.1	<i>rp</i> -HPLC	71
5.2.2	UV/VIS-Spektroskopie	73
5.2.3	Agarosegelelektrophorese	73
5.2.4	Fluoreszenzmikroskopie	73
5.3	Synthesen doppeltaktivierter AdoMet-Analoga	74
5.3.1	Synthesen reaktiver AdoMet-Analoga	75
5.3.2	Synthesen fluoreszierender AdoMet-Analoga	82
5.3.3	Synthesen ODN-modifizierter AdoMet-Analoga	87
5.4	Aktivität doppeltaktivierter AdoMet-Analoga	103
5.4.1	Aktivitätstests von M.TaqI mit AdoYnYn/AdoYnTAMRA (kurz und lang)	103
5.4.2	Aktivitätstests von M.TaqI/M.BseCI mit AdoYnATTO532 und AdoYnAF640R	103
5.4.3	Aktivitätstests von M.TaqI mit AdoYnODN11	104
5.4.4	Aktivitätstests mit weiteren ODN-modifizierten AdoMet-Analoga	104
5.4.5	EMSA von M.TaqI mit AdoYnODN11	104
5.5	Einstufige DNA-Modifikation	105
5.5.1	DNA-Modifikation mit fluoreszierenden Reportergruppen	105
5.5.2	DNA-Modifikation mit sterisch anspruchsvollen Gruppen	106
5.6	DNA-Modifikation mittels DNA-Blocking	107
5.6.1	Voruntersuchungen mit Restriktionsendonukleasen	107
5.6.2	Voruntersuchungen mit DNA-Methyltransferasen	107
5.6.3	Anwendung von DNA-Blocking mit Plasmid-DNA	108
5.6.4	Anwendung von DNA-Blocking mit genomischer DNA	108
5.7	In-Gel DNA-Modifikation	109
5.7.1	In-Gel DNA-Modifikation mit M.TaqI	109
5.7.2	In-Gel DNA-Modifikation mit M.BseCI	110
	Literatur	110
	A Anhang	I
A.1	Agarosegelelektrophorese	I
A.2	<i>rp</i> -HPLC Chromatogramme	II
A.3	¹ H-NMR-Spektren	IX
A.4	ESI-MS-Spektren	XII
A.5	MALDI-TOF-Spektren	XV

1 Einleitung

Diese Arbeit befasst sich mit der Weiterentwicklung einer Methode zur sequenzspezifischen Modifikation von genomischer DNA mittels DNA-Methyltransferasen (DNA-MTasen). Wichtige Anwendungen des *methyltransferase-directed Transfer of Activated Groups* (mTAG) finden sich im Bereich des optischen DNA-Mappings. In den folgenden Abschnitten sollen daher sowohl die wichtigsten bisherigen Entwicklungen, als auch der aktuelle Stand der Forschung des optischen DNA-Mappings beschrieben werden. Einer allgemeinen Einleitung folgt eine Übersicht der in diesem Zusammenhang wesentlichen Methoden zur kovalenten Fluoreszenzmarkierung genomischer DNA, sowie die für das Auslesen der Signale essentielle Streckung der DNA mittels non-fluider und fluider Systeme.

1.1 Optisches DNA-Mapping

Seit den Pionierarbeiten im Bereich des optischen DNA-Mappings vor über 25 Jahren von Schwartz *et al.*,^[1] konnten stetige Weiterentwicklungen auf dem Gebiet zu richtungsweisen Erkenntnissen in der Genomforschung beitragen. Optisches DNA-Mapping zeichnet sich dadurch aus, dass es mittels entsprechender Methoden möglich ist, Strukturinformationen zu DNA-Einzelmolekülen mit Leselängen (engl. *contigs*) im Bereich von Kilo- (kB) bis Megabasen (MB) zu erhalten.^[2] Der Analysebereich liegt demnach im Bereich gesamter Gene und somit weit über der Größenordnung von Leselängen klassischer Sequenzierungsmethoden. Beim optischen DNA-Mapping werden im Vergleich zur Sequenzierung keine vollständigen Basensequenzen erhalten, sondern Repräsentationen selbiger anhand von sequenzspezifisch eingebrachten Markierungen analysiert. Anfänglich wurden dafür Restriktionsendonukleasen eingesetzt.^[1] Weiterhin ist bis heute die Markierung mittels *fluorescence in-situ hybridization* (FISH) verbreitet.^[3-5]

In neueren Veröffentlichungen werden hingegen vermehrt kurze Basenpaarfolgen (engl. *short sequence motifs*) bzw. Erkennungssequenzen von den Enzymen mit kovalenten Reporter-molekülen kovalent markiert.^[6-9] Aufgrund der kurzen Leselängen klassischer Sequenzierungsmethoden, und damit einhergehenden Problemen bei der Auflösung repetitiver Basensequenzen, konnte optisches DNA-Mapping von Beginn an einen essentiellen Beitrag bei der Aufklärung sogenannter *long range structural variants* (LRSV) leisten.^[10-12] Unter LRSVs versteht man strukturelle Variationen wie Inversionen, Deletionen, Kopienzahlvariationen (engl. *copy number variations*, CNVs) und Translokationen, die Genbereiche von mehreren hundert kb umfassen können. Strukturelle Variationen dieser Art konnten mit Krankheiten in Verbindung gebracht werden,^[13,14] und nehmen daher eine besonders wichtige Rolle in der Genomforschung ein. Eine klinische Anwendung des optischen DNA-Mappings in Verbindung mit strukturellen Variationen findet sich unter anderem bei der Diagnose von Fazio-skapulo-humeraler Muskeldystrophie (FSHD).^[15,16]

Die zuvor beschriebene Problematik der kurzen Leselängen gilt weiterhin auch für Methoden des *next generation sequencing* (NGS),^[17,18] da diese ebenso auf der computergestützten Zusammenstellung von Sequenzen (engl. *alignment*) mit kurzer bzw. mittlerer Leselänge

basieren um Informationen zu nachträglich zusammengesetzten Genabschnitten (engl. *scaffolds*) zu erhalten. Dies macht NGS-Methoden, insbesondere in Genomregionen mit repetitiven Basensequenzen anfällig für systematische Fehler,^[19,20] deren Ursprung durch die notwendige Vervielfältigung des DNA-Substrats (Replikation) verstärkt wird.^[21,22] Mit neueren Sequenzierungsmethoden die sich durch deutlich längere Leselängen und der Analyse von DNA-Einzelmolekülen auszeichnen, wie dem *single molecule real-time sequencing* (SMRT, Pacific Biosciences, Menlo Park, USA)^[23,24] und *linked-read sequencing* (10x genomics, Pleasanton, USA),^[25] wurde die Qualität von Genomzusammenstellungen (engl. *assemblies*) auf Basis entsprechender *contigs* zwar erhöht,^[26] jedoch konnte gezeigt werden, dass erst die Kombination der erhaltenen Sequenzinformationen mit Strukturinformationen des optischen DNA-Mappings den Durchbruch in Bezug auf Genomassemblies einzelner Individuen bzw. Population bringt.^[27]

So konnte der Median der Länge von *scaffolds*, die zur Generierung von *assemblies* genutzt werden, durch die Kombination der Ergebnisse von SMRT-Sequenzierung (N50 = 0.9 Mb) und optischem DNA-Mapping mithilfe der Irys-Plattform^[28–30] (N50 = 4.6 Mb, Bionano Genomics, San Diego, USA) drastisch erhöht werden (N50 > 28 Mb). Dies übersteigerte den bis dato auf Basis von NGS-Methoden erreichten Median (N50 = 11.5 Mb), und somit auch die Qualität der generierten Genomassemblies deutlich. Die immense Steigerung der Qualität wird dadurch begründet, dass sich die systematischen Limitierungen in Bezug auf die Länge der *scaffolds* der unterschiedlichen Analysemethoden grundlegend unterscheiden, und sich diese daher besonders gut ergänzen bzw. zu erweiterten *scaffolds* zusammenfassen lassen. Bei SMRT-Sequenzierung befinden sich die Enden einzelner *scaffolds* vermehrt in Regionen repetitiver Basensequenzen,^[31–33] bei der verwendeten Variante des optischen Mappings hingegen in sogenannten fragilen Regionen.^[34,35] In letzteren befindet sich die Erkennungssequenz der Nicking-Enzyme, die zur Markierung von Sequenzmotiven genutzt wurden, in unmittelbarer Nähe auf den gegenüberliegenden Strängen der analysierten DNA-Einzelmoleküle, was wiederum zu Doppelstrangbrüchen führt.

Auf diesen Ergebnissen aufbauend, wurden in weiterführenden Studien mittels *linked-read* Sequenzierung erhaltene *contigs* mit denen des optischen DNA-Mappings von über 150 Individuen aus 26 Populationen angereichert.^[36] Dabei konnte der Median der *scaffold*-Länge weiter, auf bis zu 35 Mb, gesteigert werden. Zusätzlich konnten auf diese Weise nicht-repetitive Basensequenzen einer Gesamtlänge von 60 Mb identifiziert werden, die in aktuellen Genomassemblies bisher vollständig fehlten. Die wichtigste Erkenntnis war jedoch die Entdeckung populationspezifischer phylogenetischer Ausprägungen struktureller Variationen in Genomregionen, die über 86 % des menschlichen Genoms ausmachen, und deren Auftreten bzw. Verteilungen zudem mit denen von Einzelnukleotidpolymorphismen (engl. *single nucleotide polymorphisms*, SNPs) vergleichbar sind. Zusätzlich zu dem Gebiet der strukturellen Variationen, ist die schnelle Genotypisierung von Bakterien und Viren eine weitere Anwendung von optischem DNA-Mapping.^[37–39] Weitere kürzlich erschienene Arbeiten zeigen ein weiteres Potential des optischen DNA-Mappings deutlich auf, nämlich genetische Informationen mit epigenetischen Analysen zu ergänzen. (engl.: *multiplexing*).^[40] Dazu zählen insbesondere Nukleobasenmodifikationen,^[16,41,42] wie der Methylierung sogenannter CpG-islands.^[31] Im Folgenden soll

nun näher auf spezifische Methoden aus dem Bereich des optischen DNA-Mappings eingegangen werden. Zum einen handelt es sich dabei um Methoden die zur kovalenten Markierung von genomischer DNA mit fluoreszierenden Reportergruppen geeignet sind, und mit denen sowohl genetische als auch epigenetische Informationen kenntlich gemacht werden. (Abs. 1.2) Zum anderen handelt es sich um Methoden zur Streckung von DNA-Einzelmolekülen, die das Auslesen entsprechender Fluoreszenzsignale (Abs. 1.3) ermöglichen. Letztere können dabei in non-fluide und fluide Systeme unterteilt werden.

1.2 Fluoreszenzmarkierung von genomischer DNA

Die im Folgenden thematisierten Methoden ermöglichen die Markierung von genomischer DNA mit fluoreszierenden Reportermolekülen und finden Anwendung beim optischen DNA-Mapping. Da sich die vorliegende Arbeit mit kovalenter Markierung von DNA beschäftigt, ist diese zentraler Bestandteil der nachfolgenden Übersicht (Abs. 1.2.1). Mittels kovalenter DNA-Modifikationen können neben genetischen Informationen, aber auch Fluoreszenzsignale in Abhängigkeit von epigenetischen Merkmalen des DNA-Substrats eingebracht werden (Abs. 1.2.2).

Methoden zur nicht-kovalenten Fluoreszenzmarkierung von genomischer DNA finden ebenfalls Anwendung beim optischen DNA-Mapping. Zu den relevanten Methoden zählt unter anderem die Hybridisierung von FISH-Markern, die kombiniert mit der fluoreszenzmikroskopischen Analyse von DNA-Einzelmolekülen (engl. *fiber FISH*) schon früh zum optischen DNA-Mapping genutzt wurde.^[3-5] Ein Unterschied ist die im Vergleich zu den enzymatischen Methoden deutlich höhere Spezifität, was aufgrund der damit einhergehend geringeren Informationsdichte nachteilig sein kann. Weiterhin kann DNA auch mittels Denaturierung und anschließender Inkorporation von Interkalatoren sequenzspezifisch markiert werden (engl. *denaturation mapping*). Dazu wird die DNA zunächst thermisch oder unter Verwendung entsprechender Reagenzien wie Formamid denaturiert.^[43,44] Nachfolgend werden Interkalatoren eingesetzt die eine erhöhte Spezifität für CG- bzw. AT-reiche Genabschnitte aufweisen, um sequenzspezifische Intensitätsprofile zu erhalten.

1.2.1 Sequenzspezifische kovalente DNA-Modifikationen

Zu den auf dem Gebiet des optischen DNA-mappings relevanten Methoden zur kovalenten sequenzspezifischen Fluoreszenzmarkierung von genomischer DNA zählt einerseits das sogenannte *nick labelling*, bei dem Nickasen und DNA-Polymerasen mit fluoreszierenden Desoxyribonukleotiden (dNTPs) genutzt werden (Abs. 1.2.1.1). Andererseits kann auch die in dieser Arbeit verwendete mTag-Methode, bei der DNA-MTasen und synthetische Analoga des natürlichen Cofaktors AdoMet (1) eingesetzt werden, zur DNA-Markierung dienen (Abs. 1.2.1.2).

1.2.1.1 Sequenzspezifische Modifikation mittels Nickasen

Sogenanntes *nick labelling* (auch *nick translation* genannt) basiert auf der aufeinanderfolgenden enzymatischen Modifikation doppelsträngiger DNA mittels Nickasen und DNA-Polymerasen.^[45] Im ersten Schritt werden sequenzspezifische Einzelstrangbrüche (engl. *nicks*) durch die Nickase hervorgerufen, an denen im folgenden Schritt fluoreszierende Desoxyribonukleotide (dNTPs) durch DNA-Polymerasen mit Hydrolysefunktionalität in 5'-3'-Richtung inkorporiert werden. Die Methode wurde auf verschiedene Arten erweitert, um sowohl die Selektivität als auch die Spezifität der Fluoreszenzmarkierung weiter zu erhöhen. Dazu können unter anderem Ligasen eingesetzt werden, um sowohl etwaige unspezifische Einzelstrangbrüche vor Zugabe der Nickasen,^[45] als auch die spezifischen Einzelstrangbrüche der Nickasen nach erfolgtem *nick labelling*, zu schließen.^[46] Außerdem werden Didesoxyribonukleotide (ddNTPs) verwendet,^[45] um den Einbau der dNTPs durch die DNA-Polymerase zu steuern bzw. statistisch zu beenden. Eine weitere Variante des *nick labelling* nutzt DNA-Polymerasen mit *strand displacement* Funktionalität.^[47] Dadurch entstehen an der Erkennungssequenz der Nickase angrenzende Überhänge, die im weiteren Verlauf mittels fluoreszenzmarkierten Oligodesoxynukleotiden (ODNs) markiert werden können.^[48] Weiterhin wurden Nickasen genutzt, die zwei benachbarte Einzelstrangbrüche auf dem selben Strang verursachen. Der Zwischenraum wird daraufhin mit modifizierten Oligonukleotiden aufgefüllt und diese wiederum durch DNA-Ligasen kovalent eingebaut.^[46] Eine Herausforderung hinsichtlich der Verwendung des *nick labelling* beim optischen DNA-Mapping besteht darin, dass die Länge des resultierenden *scaffolds* wie bereits beschrieben eine systematische Limitierung in sogenannten fragilen Bereichen aufweist.^[34,35]

1.2.1.2 Sequenzspezifische Modifikation mittels DNA-MTasen (mTAG)

Bei der mTAG-Methode wird die Seitenkette am Sulfoniumzentrum eines synthetischen AdoMet-Analogons sequenz-, basen- und regiospezifisch auf doppelsträngige DNA übertragen (Abb. 3.15).^[9] Entsprechende doppeltaktivierte AdoMet-Analoga weisen eine Doppel- oder Dreifachbindung in β -Position der zu übertragenden Seitenkette auf, und lassen sich in verschiedene Klassen unterteilen. Zum einen handelt es sich um AdoMet-Analoga mit reaktiven Endgruppen,^[49,50] die Anwendung bei der bioorthogonalen Funktionalisierung von DNA finden.^[51] Einige DNA-MTasen katalysieren hingegen auch die direkte Übertragung von langen Seitenketten mit Reportergruppen wie Fluorophoren,^[38,52,53] sterisch anspruchsvollen Gruppen wie Cyclodextrinen,^[54] oder auch biotechnologisch relevante Affinitätsmarkierungen wie Biotin.^[55] DNA-MTasen weisen palindromische Erkennungssequenzen mit einer Länge von 2 bp–8 bp auf.^[9] Die meisten der bisher im Rahmen der mTAG-Methode verwendeten DNA-MTasen alkylieren die N6-Position eines spezifischen Adenins innerhalb der Erkennungssequenz (z.B. M.TaqI - 5'-TCGA-3'), während andere die C5-Position eines spezifischen Cytosins modifizieren (z.B. M.HhaI - 5'-GCGC-3'). Die sequenzspezifische Fluoreszenzmarkierung mittels mTAG-Methode wurde bereits beim optischen DNA-Mapping genutzt.^[38,39] Der Vorteil der DNA-Modifikation mit DNA-MTasen gegenüber Nickasen besteht darin, dass bisher keine systematischen Limitierungen in Bezug auf die Übertragungsreaktion bekannt sind. Dadurch sollten statistisch verteilte *contigs*, längere *scaffolds* und somit Genomassemblies von höherer Qualität erhalten werden können. Nähere Informationen zu Restriktions-Modifikations-Assays,

mit denen die Aktivität von doppeltaktivierten AdoMet-Analoga ermittelt werden kann, folgen in Abschnitt 3.2. Einstufige DNA-Modifikation zur direkten Übertragung von Reportergruppen werden in Abschnitt 3.3 behandelt.

1.2.2 Kovalente DNA-Modifikationen zur Analyse von Nukleobasenmodifikationen

Ein wichtiger Aspekt der aktuellen Forschung auf dem Gebiet des optischen DNA-Mappings ist die Analyse von epigenetischen Merkmalen. Beim *multiplexing* werden genetische und epigenetischen Informationen simultan analysiert. Dies könnte einen wichtigen Beitrag im Bezug auf neue Verfahren auf dem Gebiet der klinischen Diagnostik leisten. Einen besonderen Stellenwert nehmen Methoden zur optischen Analyse von Nukleobasenmodifikationen ein. Neueste Veröffentlichungen verdeutlichen in diesem Zusammenhang das Potential der mTAG-Methode, genomische DNA CpG-methylierungssensitiv zu modifizieren. Die Analyse erfolgt indirekt, da die verwendete Adenin-N6 spezifische DNA-MTase M.TaqI, die auch in dieser Arbeit verwendet wurde, eine Selektivität gegenüber der Modifikation des Cytosins innerhalb der Erkennungssequenz (5'-TCGA-3') aufweist. Die Modifikation des Adenins erfolgt dementsprechend nur, wenn das benachbarte CpG keine Methylierung aufweist. Anfangs wurden so kurze DNA-Einzelmoleküle mittels Nanoporen analysiert.^[56] In einer späteren Veröffentlichung wurden dann parallele Nanokanäle verwendet, um die CpG-Methylierung gesamter Genome (engl. *methylome*) zu untersuchen.^[16] Um die potentiellen Anwendungen zu verdeutlichen, wurden die hochgradig repetitiven D4Z4-Wiederholungen auf dem Chromosom 4 zugleich auf struktureller Variationen, als auch der Methylierung von CpG-*islands* untersucht. Ein weiteres Beispiel kovalenter Fluoreszenzmarkierung von Nukleobasenmodifikationen ist die Analyse von 5-Hydroxymethylcytosin (5hmC) mittels β -Glycosyltransferasen (β GT) und azidfunktionalisierter Uridindiphosphoglucose (UDPG).^[57,58]

1.3 Streckung von genomischer DNA

Beim optischen DNA-Mapping müssen Fluoreszenzmarkierungen auf langer genomischer DNA ausgelesen werden. Die Qualität des optischen DNA-Mappings hängt dabei von vielen Faktoren ab. Zu den wichtigsten Faktoren beim Auslesen jedoch zählen Auflösung und Durchsatz bei der Fluoreszenzmikroskopie, die Länge und der Streckfaktor der analysierten DNA-Einzelmoleküle, sowie die Gleichmäßigkeit der Streckung.^[2] Wie bereits erwähnt, können Methoden zum Strecken genomischer DNA in non-fluide und fluide Systeme unterteilt werden. In ersteren wird genomische DNA in einem Fluss bzw. an einer Phasengrenze gestreckt und auf einer Oberfläche immobilisiert (Abs. 1.3.1). Bei den verschiedenen Methoden unterscheidet sich neben der direkten Vorgehensweise zur Streckung auch die Beschaffenheit der Oberfläche und somit auch die Art der DNA-Bindung. In fluiden Systemen werden die DNA-Einzelmoleküle in Lösung analysiert. Die Streckung (Abs. 1.3.2) basiert auf der Einschränkung entropischer Freiheitsgrade. Dies wird erreicht, indem die zu analysierende DNA-Lösung durch Kanäle (engl. *nano channels*) oder vergleichbare Strukturen im Nanometerbereich geleitet wird. Zu

den fluiden Systemen können weiterhin auch Systeme mit elektrophoretischer Streckung und Methoden zur Analyse von an den Enden funktionalisierter DNA gezählt werden. Die nun folgende Betrachtung beschränkt sich bei den fluiden Systemen jedoch einzig auf Nanokanäle, da diese im Vergleich zu anderen Methoden die mit Abstand wichtigste Rolle spielen.

1.3.1 Non-fluide Systeme

Mittels non-fluider Methoden wird genomische DNA in gestrecktem Zustand auf Oberflächen immobilisiert. Solche Methoden zeichnen sich unter anderem durch hohe Streckfaktoren und die geringen Kosten der entsprechenden Verfahren aus. Die Grundlage der Streckung von DNA auf Oberflächen bildeten Experimente in Agarosegelen.^[1] Unterschiedliche Limitierungen, insbesondere der geringe Streckfaktor sowie der dreidimensionale Charakter und niedrige Vernetzungsgrad der Agarose führten dazu, dass sich die weitere Entwicklung auf chemisch modifizierte Glas- oder Kunststoffoberflächen fokussierte. In den ersten Varianten wurden Glasoberflächen entweder mit Polylysin^[59] oder Aminosilanen^[60] modifiziert, wodurch die Auflösung trotz geringer Selektivität deutlich gesteigert werden konnte. Der Durchbruch bei der Streckung genomischer DNA auf Oberflächen war die Einführung des sogenannten *DNA combing*.^[61] Bei dieser Methode werden vinylfunktionalisierte silanisierte Glasoberflächen verwendet, um die 5'-Enden von DNA-Doppelsträngen selektiv zu binden. Während die zunächst vollständig eingetauchte modifizierte Glasplatte aus der DNA-Lösung herausgezogen wird, werden auch die gebundenen DNA-Einzelmoleküle aus der Lösung entfernt. Die Linearisierung erfolgt an der Phasengrenze (Meniskus), woraufhin die DNA-Einzelmoleküle letztlich vollständig auf der Oberfläche gebunden werden. Diese Methode ermöglichte kurz darauf erstmalig das Mapping vollständiger Chromosome mittels optischem DNA-Mapping in non-fluide Systemen.^[3] Erfolge hingegen, den Durchsatz der Methode mittels Arrays kleiner Tropfen in Kombination mit Verdunstung (*coffee stain effect*) zu erhöhen, beschränkten sich auf kurze DNA-Einzelmoleküle.^[62]

Neuere Methoden nutzen neben silanisierten Glasoberflächen mit verschiedenen Funktionalitäten auch andere Oberflächen wie Zeonex®, einem Blockcopolymer mit zyklischen olefinischen Einheiten, das ebenfalls zur selektiven Bindung von 5'-Enden eingesetzt werden kann.^[63] Auch die der Streckung zugrunde liegende Methodik wurde weiterentwickelt. Beispiele hierfür sind der Kapillarfluss zwischen zwei Glasplatten,^[64] sowie die manuelle^[63] oder mechanische^[65] Bewegung von Tropfen (engl. *rolling drop*). Die gemeinsamen Nachteile der beschriebenen Methoden sind, im Vergleich zu fluiden Systemen, neben dem geringen Durchsatz auch die Ungleichmäßigkeit der Streckung und die Überlappung von DNA-Einzelmolekülen. In weiteren Veröffentlichungen konnten diese Probleme jedoch umgangen werden: Zum einen wurden Kanäle im Mikrometerbereich eingesetzt, um einen möglichst laminaren Fluss auf der DNA-bindenden Oberfläche zu gewährleisten und sowohl die Streckung, als auch die Ausrichtung der gebundenen DNA-Einzelmoleküle, zu vereinheitlichen.^[66] Weiterhin wurden kürzlich lineare dem Fluss entgegengesetzte Mikrostrukturen einer Octenyl-Oberflächenmodifikation eingesetzt, mithilfe derer die Orientierung der DNA-Einzelmoleküle auch ohne Mikrokanäle

drastisch verbessert werden konnte.^[67] Ein zusätzlicher Vorteil der zuletzt genannten Methode ist die Möglichkeit das DNA-Substrat nachträglich enzymatisch zu modifizieren.

1.3.2 Fluidale Systeme

Nanokanäle zeichnen sich durch eine gleichmäßige Streckung, die Analyse langer DNA-Einzelmoleküle und einen hohen Durchsatz aus. Die Streckung genomischer DNA in Nanokanälen basiert wie bereits erwähnt auf der Einschränkung entropischer Freiheitsgrade. Die Voraussetzung dabei ist, dass die Dimensionen der verwendeten Kanäle kleiner sind als der Trägheitsradius des DNA-Einzelmoleküls in der zu analysierenden Lösung.^[68] In frühen Untersuchungen, wurden die biophysikalischen Eigenschaften der Streckung von Lambda-Konkatameren in Kanälen mit einer Dimension von 100 nm untersucht, wobei ein Streckfaktor von 0.38 erreicht wurde.^[69] Der Streckfaktor entspricht dem Verhältnis der gemessenen Länge zur Konturlänge^[70] des DNA-Einzelmoleküls, und konnte im Folgenden immer weiter gesteigert werden.^[71] Dabei konzentrierten sich die verschiedenen Untersuchungen größtenteils auf die Variation der Dimensionen des Nanokanals^[72,73] oder der Ionenstärke der zu analysierenden DNA-Lösungen.^[74,75] Die umfassenden Untersuchungen der Streckung von DNA in Nanokanälen haben dazu geführt, dass klassische Theorien über die physikalischen Eigenschaften von Polymeren von de Gennes^[76] und Odijk^[77] über die Zeit erweitert wurden.^[78] Dadurch konnten die meisten Phänomene, die beim Strecken von DNA in Nanokanälen beobachtet wurden, mittlerweile erklärt werden. Trotzdem sind die biophysikalischen Eigenschaften von in Nanokanälen gestreckter DNA weiterhin Inhalt aktueller Forschung.^[79]

Nanokanäle eröffnen vielseitige Möglichkeiten genomische DNA zu strecken und entsprechend zu analysieren..^[80] Mit der Entwicklung von Methoden zur Herstellung von Nanokanälen mit Dimensionen < 50 nm,^[81] sowie der Entwicklung von Systemen mit graduell dichter werdenden Strukturen aus zylindrischen Säulen zwischen mikro- und nano-fluiden Bereichen,^[82] wurde der Grundstein in Bezug auf die Kommerzialisierung von Nanokanälen zum Strecken genomischer DNA gelegt. Bei einem Großteil der mittlerweile großen Anzahl an Verfahren zur Herstellung von Nanokanälen kommt die sogenannte *direct-write* Nanolithographie zum Einsatz.^[83,84] Die erhaltenen Nanokanäle können dann als Vorlage zur kostengünstigeren Vervielfältigung mittels *nanoimprint* Lithografie genutzt werden.^[81] Ein System mit parallelen Nanokanälen (engl. *nano channel array*) wurde von der Firma Bionano Genomics (San Diego, USA) kommerzialisiert und ist in der aktuellen Forschung weit verbreitet.^[28-30] Die Dimension der Nanokanäle beträgt hierbei etwa 50 x 50 nm².

Daneben finden außerdem spezialisiertere Systeme mit zusätzlichen Funktionen Anwendung. Ein Beispiel für ein solches System nutzt graduell enger werdende Nanokanäle, um die Auswirkungen der Veränderung entropischer Einschränkungen an DNA-Einzelmolekülen zu untersuchen.^[85] Ein weiteres System ermöglicht optisches DNA-Mapping mittels thermischer Denaturierung in Kombination mit DNA-Interkalatoren.^[43] Dazu wird der gesamte Chip mitsamt Nanokanal aufgeheizt und anschließend schnell abgekühlt wird. Eine weitere Vorrichtung mit einem gewundenen Nanokanal ermöglicht die Analyse von besonders langen DNA-Einzelmolekülen in einzelnen Bildabschnitten.^[86] So war es möglich, das gesamte

Chromosom eines Hefepilzes (*S. pombe*, 5.7 Mbp, 1 μ m) in einem einzelnen Bildausschnitt festzuhalten. Eine kürzlich veröffentlichte Vorgehensweise kombiniert optisches und elektrisches DNA-Mapping miteinander. Dazu wurde eine Nanopore mittels Laserstrahlung in einen Nanokanal inkorporiert. Die DNA-Einzelmoleküle wurden so erst optisch in einem Nanokanal, und dann elektrisch während der Translokation durch eine Nanopore, untersucht.^[87] Schließlich sei noch zu erwähnen, dass auch das Durchleiten eines DNA-Einzelmoleküls durch eine Nanopore als eine temporäre Streckung angesehen werden kann. Es kommen biologische Nanoporen oder Festkörpernanoporen, z.B. aus Glaskapillaren oder Siliciumnitrid, zum Einsatz

2 Zielsetzung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die mTAG-Methode zur sequenzspezifischen Modifikation von DNA mittels DNA-Methyltransferasen (DNA-MTasen) weiterentwickelt werden. Hauptziel war es, neue Anwendungen im Bereich des optischen und elektrischen DNA-Mappings zu erschließen.

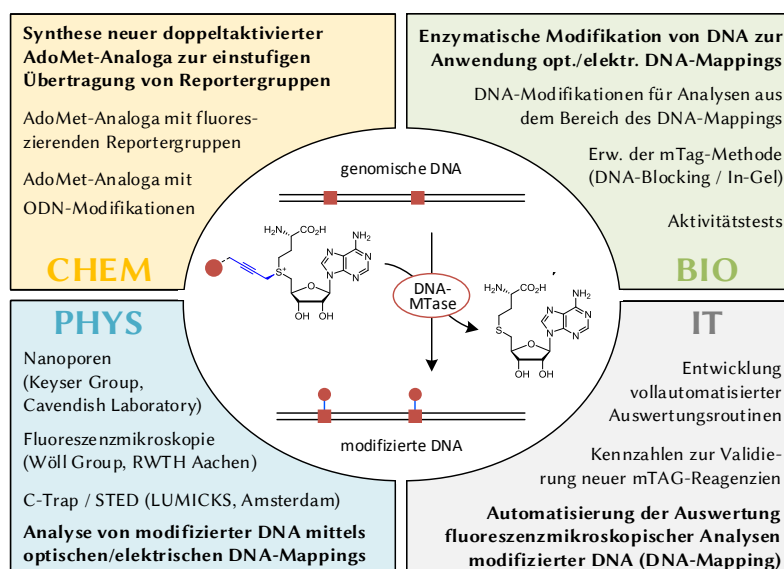


Abbildung 2.1: Schematische Übersicht der interdisziplinären Aufgabenstellung. Die einzelnen Aufgaben wurden dazu den Disziplinen Chemie, Biologie, Physik und IT zugeordnet. Zentraler Bestandteil ist die mTAG-Methode.

Das Hauptaugenmerk der vorliegenden Arbeit sollte unter anderem auf der Darstellung neuer Analoga des natürlichen Cofaktors AdoMet (**1**) für DNA-MTasen liegen. Es sollten doppelt-aktivierte AdoMet-Analoga mit fluoreszierenden und sterisch anspruchsvollen Seitenketten synthetisiert werden. Diese eignen sich zur einstufigen Übertragung von Reportergruppen mittels mTAG-Methode. Entsprechend modifizierte genomische DNA kann wiederum mit Verfahren aus dem Bereich des DNA-Mappings analysiert werden.^[38,39] Die chemischen Synthesen sollten zunächst ausgehend von den literaturbekannten doppeltaktivierten AdoMet-Analoga AdoYnAzid (**3**) und AdoYnYn (**4**) erfolgen.^[50] Während die Synthesen der neuen fluoreszierenden AdoMet-Analoga an die bereits literaturbekannten Verbindungen AdoYnTAMRA (**6b**)^[16,38] und AdoYnCF640R (**6c**)^[53] angelehnt wurden, sollten die ODN-modifizierten AdoMet-Analoga eine Neuentwicklung darstellen und die Klasse der Analoga mit sterisch anspruchsvollen Seitenketten zur Verwendung beim elektrischen DNA-Mapping erweitern.

Weiterhin sollte die Aktivität sämtlicher neuer AdoMet-Analoga zunächst in Modifikations-Restriktions-Assays mit den DNA-MTasen M.TaqI und M.BseCI getestet werden. Anschließend sollten die neuen AdoMet-Analoga in mTAG-Modifikationen von, den jeweiligen Analysemethoden angepassten, DNA-Substraten eingesetzt werden. Letztlich sollte die so modifi-

zierte DNA durch Kooperationspartner sowohl in literaturbekannten, aber teilweise auch neuen Verfahren zum DNA-Mapping analysiert werden. Dazu wurden sowohl einzelne mTAG-Reagenzien, als auch Proben von sequenzspezifisch mittels mTAG-Methode modifizierte DNA, den Kooperationspartnern bereitgestellt. Zu nennen wären an dieser Stelle insbesondere die Kooperationen mit der Ebenstein Group (Tel Aviv University, IL), Keyser Group (Cavendish Laboratories, UK), Meller Group (Technion, IL) sowie LUMICKS (Amsterdam, NL).

Zusätzlich war die Weiterentwicklung der experimentellen Vorgehensweise in Bezug auf die mTAG-Methode ein weiteres Augenmerk dieser Arbeit. Unter anderem sollte das zuvor entwickelte DNA-Blocking^[54] genutzt werden, um neue Sequenzspezifitäten einzuführen. Dadurch sollte die Modifikationsdichte hinsichtlich der Anforderungen des optischen DNA-Mappings von humaner DNA optimiert werden. Außerdem sollte die mTAG-Methode angepasst werden, sodass die zu modifizierende genomische DNA während der Modifikation sowie der anschließenden Aufreinigung und Probenvorbereitung besser vor Fragmentierung, z.B. durch beim Pipettieren auftretende Scherkräfte, geschützt ist. Dazu sollten die Reaktionsbedingungen so verändert werden, dass die mTAG-Methode auf in Agarose eingebettete DNA angewendet werden kann.

In Kooperation mit der Wöll Group (IPC, RWTH Aachen University) sollte die fluoreszenzmarkierte DNA durch Fluoreszenzmikroskopie abgebildet und letztlich ein standardisiertes Verfahren entwickelt werden, welches zur Validierung neuer mTAG-Komponenten bzw. dem Vergleich unterschiedlicher experimenteller Vorgehensweisen genutzt werden kann. Dazu sollte die Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Analyse modifizierter genomischer DNA zunächst optimiert werden. Im Zuge dieser Arbeit wurde dieses Ziel auf die vollständige Automatisierung der Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Analyse ausgeweitet. Zur Streckung der DNA für das DNA-Mapping, wurde eine Variante des DNA *combings*, bei der die DNA im Kapillarfluss zwischen zwei silanisierten Glasplatten gestreckt und immobilisiert wird, eingesetzt.^[64]

erweitert (Abb. 3.1). Dadurch sollte auch der Abstand zwischen dem sterisch anspruchsvolleren Triazolring der weiter funktionalisierten AdoMet-Analoga auf Basis von **5** und dem reaktiven Zentrum in DNA-MTase katalysierten Übertragungsreaktionen erhöht werden. Das übergeordnete Ziel dahinter war es, die einstufige DNA-Modifikation mit fluoreszierenden Reportergruppen auf DNA-MTasen auszuweiten, für die bei derartigen Modifikationsreaktionen bisher keine Aktivität beobachtet werden konnte. Erste dahingehende Experimente wurden zum Zeitpunkt dieser Arbeit bereits von Larissa Käver (AK Weinhold, RWTH Aachen University) durchgeführt.

Die Durchführung der Synthese von AdoYnYn (lang) (**5**) orientierte sich an denen der literaturbekannten AdoMet-Analoga **3** und **4**. Alle Reaktionen wurden in saurem Milieu durchgeführt (Ameisensäure/Essigsäure/Wasser, 1:1:1), um die nukleophilen Zentren von AdoHcy (**2**), mit Ausnahme des Schwefels, zu protonieren. Dadurch kann die regioselektive Alkylierung unter Ausbildung des Sulfoniumzentrums gewährleistet werden. Die nukleophile Substitution unter Beteiligung der Mesylate **9a-c** erfolgt dabei nicht diastereoselektiv, weshalb die Trennung der entstehenden Diastereomere im Anschluss an die Reaktion mittels *rp*-HPLC erforderlich ist. Der Reaktionsverlauf wurde für alle Verbindungen ebenfalls mittels *rp*-HPLC verfolgt. Dabei wurde die Absorption bei 260/272 nm aufgezeichnet, um AdoHcy (**2**) und die Produktverbindungen **3**, **4** und **5** zu identifizieren. Die entsprechenden Chromatogramme der HPLC-Läufe bei Reaktionsstart bzw. -ende sind für **5** exemplarisch in Abbildung 3.2 gezeigt. Die Reaktionsverfolgungen der anderen reaktiven AdoMet-Analoga unterscheiden sich nur unwesentlich und können dem Anhang entnommen werden (Abb. A.3 und A.4).

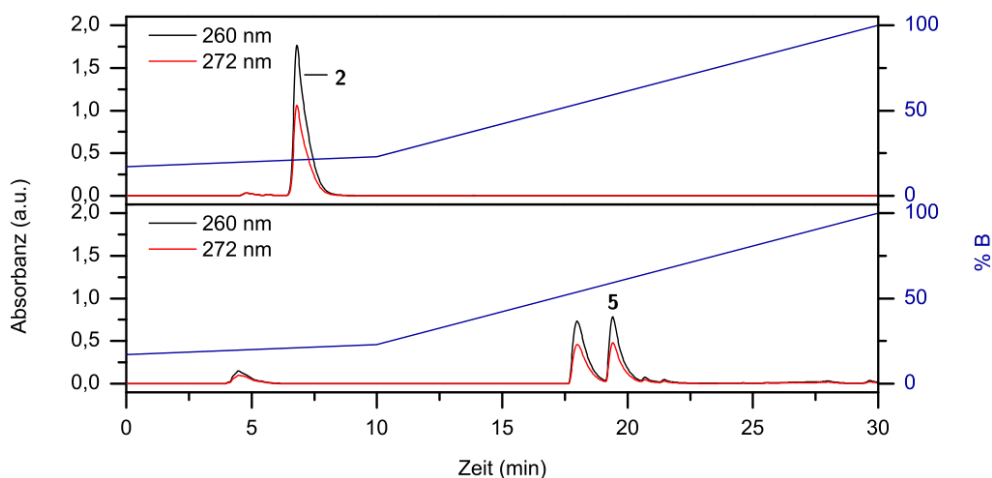


Abbildung 3.2: Reaktionsverfolgung der Synthese von AdoYnYn (lang) (**5**). Das obere Chromatogramm entspricht dem Reaktionsstart ($t = 0$ h), das untere dem Reaktionsende ($t = 16$ h).

Zu Beginn der Reaktion ist ausschließlich das Signal von AdoHcy (**2**) vorhanden. Nach vollständigem Ablauf der Reaktion (16 h) ist neben dem Signal des aktiven Epimers, der Zielverbindung **5**, auch das des inaktiven Epimers zu erkennen. Da es sich bei den beiden Epimeren um Diastereomere handelt und sich die Retentionszeit wie bei allen im Rahmen dieser Arbeit

dargestellten reaktiven AdoMet-Analoga ausreichend unterscheidet, konnte die Zielverbindung **5** anschließend mittels *rp*-HPLC isoliert werden. In Aktivitätstests (3.2) konnte gezeigt werden, dass das Epimer mit der größeren Retentionszeit der aktive Cofaktor ist. Nach der Reinigung wurden die AdoMet-Analoga mittels Gefriertrocknung eingengt, in wässriger Lösung (0,01 % TFA) aufgenommen und bis zur Verwendung in selbiger bei -20°C gelagert. Die Reinheit der Produkte wurde im Nachhinein erneut mittels *rp*-HPLC verifiziert (Einzelinjektionen). Zusätzlich wurde das Absorptionsspektrum der dargestellten Verbindungen aufgenommen und das spezifische Absorptionsverhältnis bei 260/272 nm erneut überprüft. Die so ermittelten Ausbeuten variierten zwischen 30 % und 32 %. Die eindeutige Charakterisierung der reaktiven AdoMet-Analoga **3**, **4** und **5** erfolgte mittels ESI-MS. Die zugehörigen Spektren sind im Anhang aufgeführt (Abb. A.24 bis A.25). Neben der massen- und absorptionsspektroskopischen Charakterisierung wurde die Aktivität der reaktiven AdoMet-Analoga in Bezug auf die DNA-MTase katalysierte enzymatischen Modifikationsreaktion in Aktivitätstests untersucht (3.2). Dabei wurde in allen Fällen die DNA-MTase M.TaqI verwendet.

3.1.2 Synthesen fluoreszierender AdoMet-Analoga

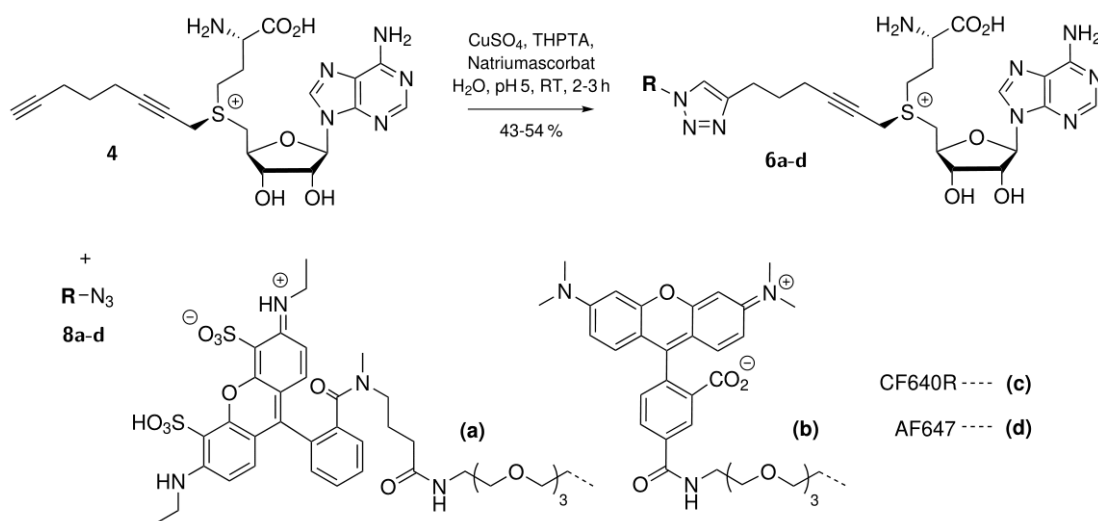


Abbildung 3.3: Übersicht von Synthesen der fluoreszierenden AdoMet-Analoga **6a-d**. Bei den Fluorophoren CF640R und AF647 handelt es sich um geschützte Verbindungen, deren Strukturen nicht eindeutig ermittelt werden konnten.

Neben den literaturbekannten AdoMet-Analoga AdoYnTAMRA (kurz) (**6b**)^[16,38] und AdoYnCF640R (**6c**)^[53] wurden mit AdoYnATTO532 (**6a**) und AdoYnAF647 (**6d**) zwei doppeltaktivierte AdoMet-Analoga mit neuen fluoreszierenden Reportergruppen dargestellt. Dazu wurden die Azid-funktionalisierten Fluorophore **8a-d** in wässriger Lösung (pH 5-6) mit dem Alkin **4** in kupferkatalysierten Azid-Alkin=[3+2]-Cycloadditionen (CuAAC) umgesetzt (Abb. 3.3). Das Azid **8b** wurde zusätzlich mit **5** umgesetzt, wobei AdoYnTAMRA (lang) (**7**) erhalten wurde, welches im Vergleich zu **6b** eine um drei Kohlenstoffatome verlängerte Seitenkette aufweist.

Das Ziel der Darstellung unterschiedlicher fluoreszierender AdoMet-Analoga war es zum einen, verschiedene Wellenlängenbereich abzudecken, und zum anderen den experimentellen Anforderungen unterschiedlicher Methoden aus dem Bereich des optischen DNA-Mappings gerecht zu werden. Dies gilt einerseits in Bezug auf Konflikte der optischen Eigenschaften eines Fluorophors (z.B. dem Absorptionsmaximum) und Limitierungen eines experimentellen Aufbaus (z.B. Laser und Filter). Andererseits gilt dies auch hinsichtlich der Eignung von Fluorophoren bei spezifischen fluoreszenzmikroskopischen Methoden, wie CF640R bei STED^[91] (engl.: *stimulated emission depletion*) bzw. AF647 bei der dSTORM-Technik^[92] (engl.: *direct stochastic optical reconstruction microscopy*). Das Ziel der Darstellung von Verbindungen mit gleichem Fluorophor, aber unterschiedlicher Kohlenstoffketten war wie bereits beschrieben, den Abstand zwischen dem sterisch anspruchsvolleren Triazolring und dem aktiven Zentrum der DNA-MTase zu erhöhen.

In allen Reaktionen wurden die Alkine **4** bzw. **5** epimerenrein eingesetzt, sodass auch die fluoreszierenden AdoMet-Analoga epimerenrein erhalten wurden. Die Reaktionsverläufe wurden zunächst mittels *rp*-HPLC verfolgt, und die Zielverbindungen **6a-d** und **7** anschließend ebenso mittels *rp*-HPLC isoliert. Entsprechende Chromatogramme der HPLC-Läufe bei Reaktionsstart bzw. -ende sind für das neue fluoreszierende AdoMet-Analogon **6a** exemplarisch in Abbildung 3.4 gezeigt. Die Reaktionsverfolgungen der anderen fluoreszierenden AdoMet-Analoga unterscheiden sich, wie bereits bei den reaktiven AdoMet-Analoga, nur unwesentlich und können dem Anhang entnommen werden (Abb. A.5 bis A.8).

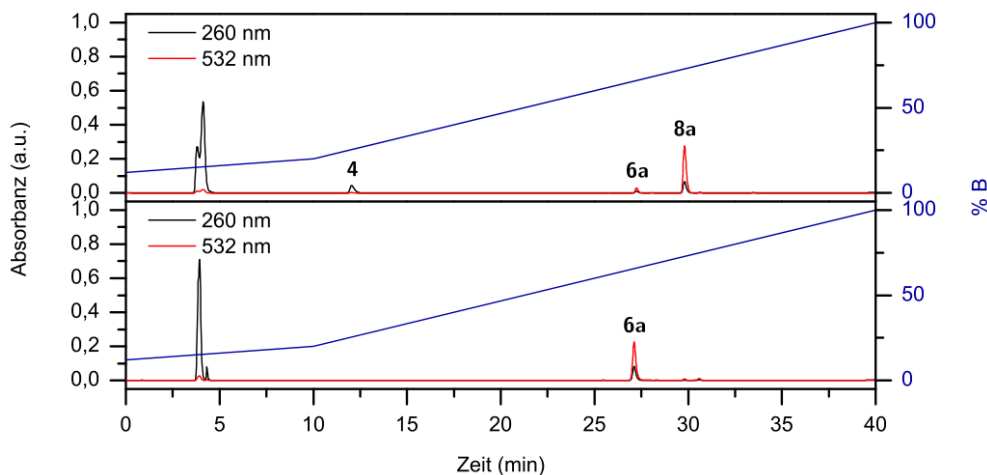


Abbildung 3.4: Reaktionsverfolgung der Synthese von AdoYnATTO532 **6a**. Das obere Chromatogramm entspricht dem Reaktionsstart ($t = 0$ h), das untere dem Reaktionsende ($t = 2$ h).

Bei den Reaktionsverfolgungen der fluoreszierenden AdoMet-Analoga wurde immer das Absorptionsmaximum des Fluorophors neben der Standardwellenlänge (260 nm) aufgezeichnet. Zu Beginn der hier gezeigten Reaktion ($t < 2$ min) sind bereits geringe Mengen des Reaktionsprodukts vorhanden. Neben dem Produktsignal sind weiterhin das Alkin **4** und der Azid-funktionalisierte Fluorophor **8a** zu beobachten. Nach Ablauf der Reaktion ($t = 2$ h) war das Azid

vollständig zum Reaktionsprodukt umgesetzt. Auffällig war in einigen Fällen zum einen, dass bereits kurz nach Reaktionsbeginn nur noch geringe Mengen des jeweils eingesetzten Alkins beobachtet werden konnten. Dies kann anhand der Komplexbildung durch das katalytische Kupfer(II) erklärt werden. Zum anderen wurden teilweise geringe Mengen eines hydrophoberen Nebenproduktes beobachtet (0-8 %). Dabei handelt es sich der Erfahrung nach um den stabilen Thioether, der bei den leicht sauren Reaktionsbedingungen entsteht, wenn die deprotonierte Carboxylgruppe der Aminosäure nukleophil am γ -Kohlenstoff der Methioninseitenkette angreift und sich diese als α -Amino- γ -butyrolacton abgespalten.^[50] Nach Isolierung der fluoreszierenden AdoMet-Analoga **6a-d** bzw. **7**, wurden diese anschließend mittels Gefriertrocknung eingeeengt, in wässriger Lösung (0,01 % TFA) aufgenommen und bis zur Verwendung in selbiger bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die geringe Löslichkeit des Analogons **6d** kann dabei als Besonderheit festgehalten werden. So war es nicht möglich eine Konzentration von 0,3 mM zu überschreiten. Die Reinheit der Produkte wurde mittels *rp*-HPLC verifiziert (Einzelinjektionen, Abb. A.16), wobei jeweils Spuren des Thioethers beobachtet wurden.

Die Charakterisierung der fluoreszierenden AdoMet-Analoga mit bekannter Struktur erfolgte mittels ESI-MS und die entsprechenden Spektren sind dem Anhang zu entnehmen (Abb. A.26 bis A.29). Zusätzlich wurde von allen fluoreszierenden AdoMet-Analoga Absorptions- und Fluoreszenzspektren aufgenommen (Abb. 3.5), welche zusammen mit denen des beim optischen DNA-Mappings verwendeten DNA-Interkalators YOYOTM-1 gezeigt sind. Die Farbgebung der jeweiligen Spektren verdeutlicht dabei die drei Wellenlängenbereiche bzw. Laser, die bei der fluoreszenzmikroskopischen Analyse genomischer DNA mittels DNA-Combing genutzt wurden. Die anhand UV/VIS-Absorption ermittelten Ausbeuten variierten zwischen 43 % und 54 %. Weiterhin wurden, wie auch für die reaktiven AdoMet-Analoga, Aktivitätstests mit der DNA-MTase M.TaqI und teilweise zusätzlich mit M.BseCI durchgeführt, um die enzymatische Aktivität der neuen Verbindungen zu verifizieren bzw. quantifizieren.

3.1.3 Synthesen ODN-modifizierter AdoMet-Analoga

ODN-modifizierte AdoMet-Analoga bilden eine neue Klasse von Cofaktoren zur Übertragung von sterisch anspruchsvollen Seitenketten. Entsprechende DNA-Modifikationen mittels DNA-MTasen eignen sich zur elektrischen Analyse unter Anwendung von Nanoporen. Ein weiteres AdoMet-Analogon dieser Klasse ist AdoYnBiotinII (**15**). Biotin-Modifikationen werden dabei erst durch die spezifische nicht-kovalente Bindung von Streptavidin zu sterisch anspruchsvollen Gruppen. Die Entwicklung der ODN-modifizierten AdoMet-Analoga erfolgte auf Basis verschiedener Überlegungen. Zum einen sollte der sterische Anspruch der Seitenkette gut eingestellt werden können und die Übertragung der sterisch anspruchsvollen Gruppe einstufig erfolgen. Gleichzeitig mussten weitere Bedingungen, wie eine ausreichend hohe Verfügbarkeit der Ausgangsmaterialien mit entsprechender Funktionalisierung, sowie gute Wasserlöslichkeit und Stabilität, erfüllt werden. Da Oligonukleotide sämtliche der genannten Bedingungen erfüllen, sollten eine Reihe von ODN-modifizierten AdoMet-Analoga synthetisiert werden. Das Hauptaugenmerk lag dabei zunächst auf zwei unterschiedlichen Aspekten. Einerseits sollten Verbindungen mit unterschiedlich langen ODN-Sequenzen synthetisiert werden. Anderer-

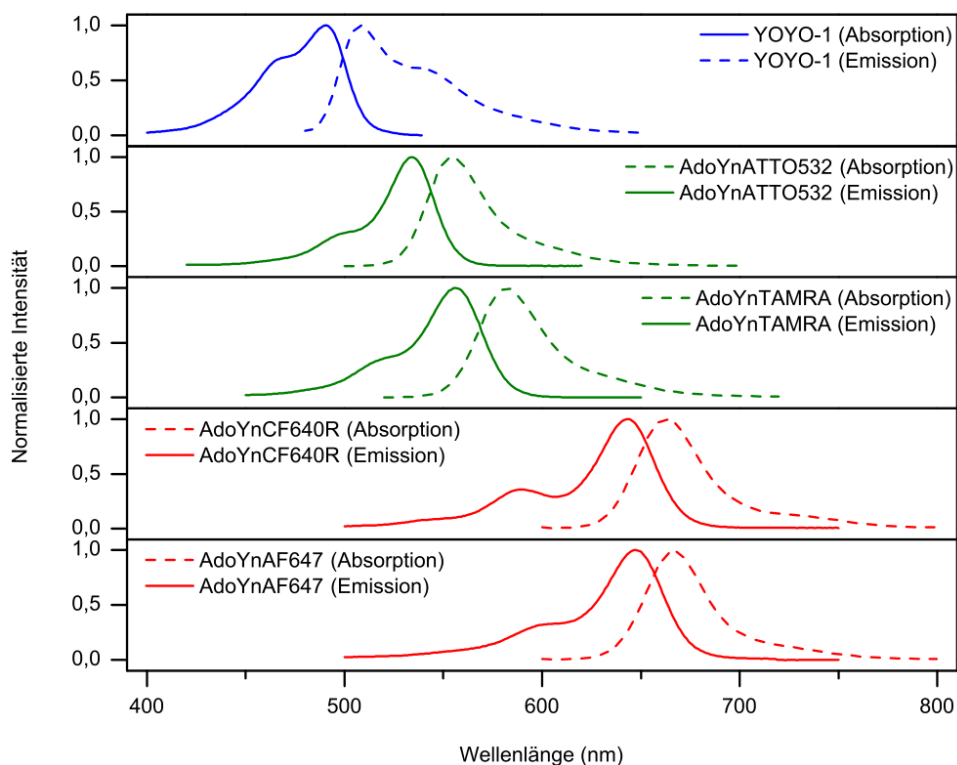


Abbildung 3.5: Absorptions- und Fluoreszenzspektren der fluoreszierenden AdoMet-Analoga **6a-d** sowie dem DNA-Interkalator YOYOTM-1.

seits sollte die Länge des Linkers zwischen ODN und Sulfoniumzentrum variiert werden. Auf diese Weise kann sowohl der Einfluss des ODNs, als auch der des Linkers hinsichtlich der DNA-MTase katalysierten Übertragungsreaktion untersucht werden.

Die Synthese aller ODN-modifizierten AdoMet-Analoga erfolgte auf gleiche Weise. Zunächst wurden die unterschiedlichen Amino-funktionalisierten ODNs **10a-h** durch Umsetzung mit dem bifunktionellen Linker **11** in einer NHS-Kupplung umfunktionalisiert. Die Reaktionsverläufe wurden mittels *rp*-HPLC verfolgt und die Zielverbindungen **13a-h** anschließend ebenso mittels *rp*-HPLC isoliert. Dabei wurden im Vergleich zu den Synthesen fluoreszierender AdoMet-Analoga stets neutrale Bedingungen in Kombination mit TEAAc-Puffern verwendet. So sollte die Depurinierung der ODNs unterdrückt werden. Durch Verwendung von TEAAc können C18-Säulen im Rahmen der Ionenpaarchromatographie von Oligonukleotiden eingesetzt werden.^[93] Weiterhin ist TEAAc flüchtig, sodass es mittels Gefriertrocknung entfernt werden kann und den Bedarf an weiterer Entsalzung eliminiert. Entsprechenden Chromatogramme der HPLC-Läufe bei Reaktionsstart bzw. -ende sind für das neue ODN-modifizierte AdoMet-Analogon **14a** exemplarisch in Abbildung 3.7 gezeigt. Alle anderen Reaktionsverläufe unterscheiden sich nur bedingt und sind im Anhang zu finden (Abb. A.9 bis A.15), wobei die beobachteten Unterschiede an dieser Stelle diskutiert werden. Bei allen Reaktionsverläufen

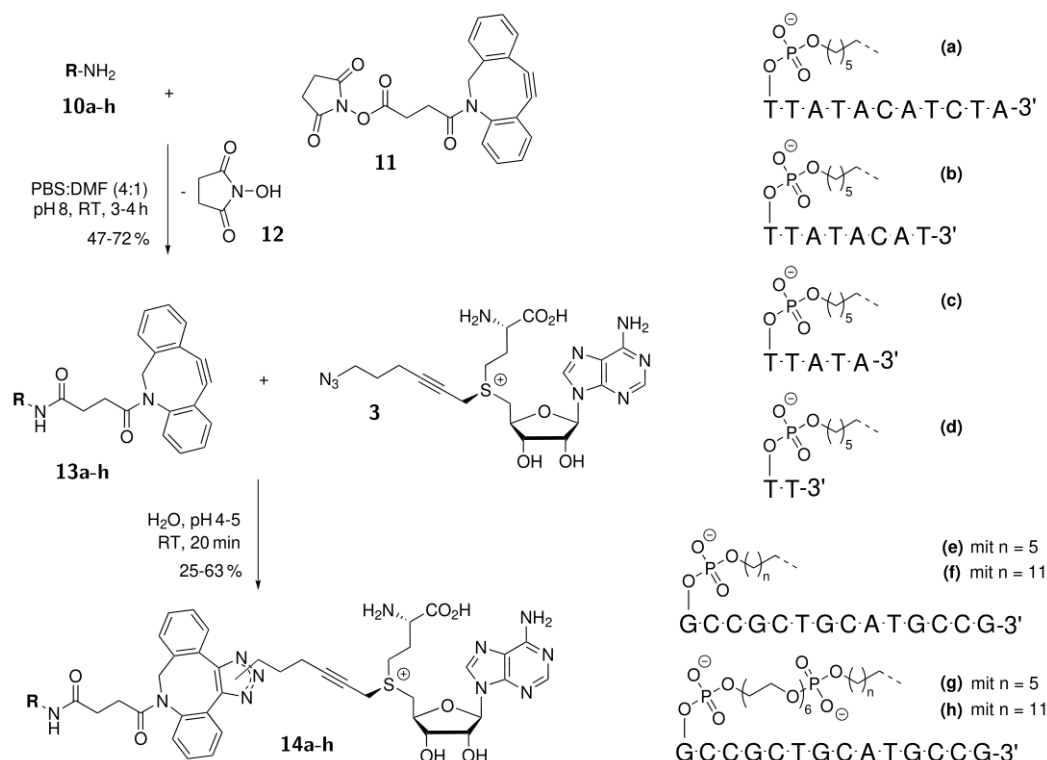


Abbildung 3.6: Übersicht der Synthesen ODN-modifizierter AdoMet-Analoga. Zunächst erfolgt die Einführung der DBCO-Gruppe mittels NHS-Kupplung der Amin-funktionalisierten ODNs **10a-h** und dem bifunktionellen Linker **11**. Es folgt die Umsetzung der nun DBCO-funktionalisierten ODNs **13a-h** mit **3** in einer SPAAC-Reaktion zu den Produktverbindungen **14a-h**.

wurde die Absorption bei 260/300 nm aufgezeichnet. Dies ermöglichte sowohl die eindeutige Identifikation der Oligonukleotide (260 nm) als auch die der Kupplungsprodukte.

Bereits kurz nach Beginn der Reaktion (< 5 min) war der eingesetzte bifunktionelle DBCO-NHS-Ester (**11**, RT = 22,6 min) bereits nahezu vollständig umgesetzt. Zwar wurde der Linker überstöchiometrisch eingesetzt, das Oligonukleotid jedoch nur teilweise umgesetzt. Deshalb konnte darauf geschlossen werden, dass ein großer Teil des Linkers bei den vorliegenden Reaktionsbedingungen schnell hydrolysiert, wobei sich NHS (**12**) und die Carbonsäure des Esters ausbildet. Daher wurde dazu übergegangen weitere Äquivalente des Linkers **11** in regelmäßigen Abständen zuzugeben und den Umsatz wiederholt zu verfolgen. Leider konnte die Effizienz der Kupplungsreaktion auch durch Anpassung der Reaktionsbedingungen, unter anderem des pH-Werts, im Verlauf der Arbeit nicht wesentlich verbessert werden, sodass die oben beschriebene Vorgehensweise beibehalten wurde. Nach Ablauf der Reaktionszeit (3 h) waren insgesamt 15 Äq. von DBCO-NHS-Estern (**11**) zugegeben worden. Bei allen Reaktionsverfolgungen und den anschließenden Isolierungen der DBCO-modifizierten ODNs **13a-h** wurde ein gewisses Maß an *Tailing* bis hin zur vollständigen Aufspaltung des Produktsignals

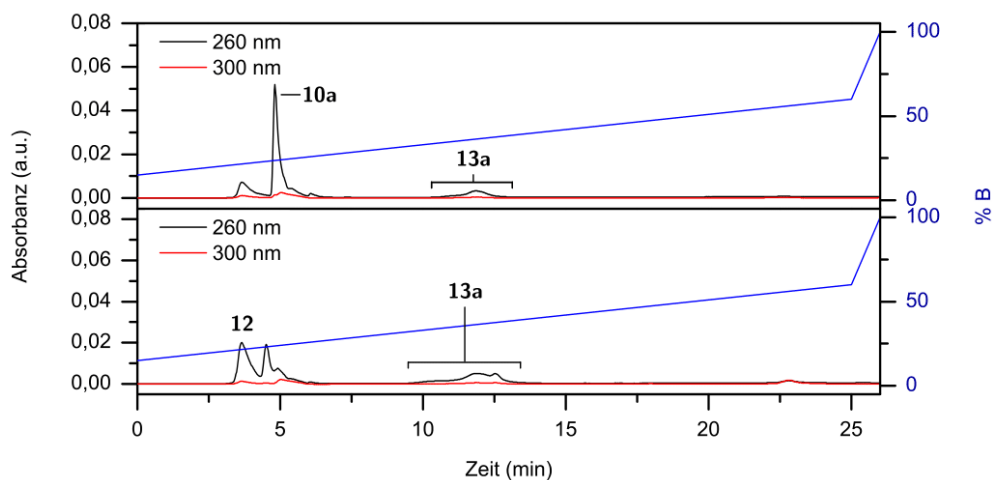


Abbildung 3.7: Reaktionsverfolgung der Synthese von ODN11-DBCO (**13a**). Das obere Chromatogramm entspricht dem Reaktionsstart ($t = 0$ h), das untere dem Reaktionsende ($t = 3$ h).

beobachtet. Dieses Phänomens war unterschiedlich stark ausgeprägt, wobei testweise Veränderungen der experimentellen Vorgehensweise in Bezug auf die Chromatographie, z.B. des TEAAc-Gehalts oder der verwendeten Säule, nur geringfügige Unterschiede bewirkten. Es wurde vermutet, dass die Amphiphilie der Produktverbindungen Ursache dieses Phänomens ist. So kann die Retentionszeit einerseits durch Bindung der DBCO-Funktion, andererseits der ODN-TEAAc-Ionenpaare an die C18-Ketten der verwendeten Säule beeinflusst werden. Dadurch, so wurde vermutet, wird die Ausbildung unterschiedlicher Populationen des selben Moleküls begünstigt. Diese Argumentation wird dadurch bekräftigt, dass das Phänomen bei den Verbindungen mit 14 bp-langen ODNs deutlich stärker ausgeprägt war, als dies in absteigender Reihenfolge bei denen mit 11, 8, 5 und 2 bp-langen ODNs beobachtet wurde. Nach Isolierung der umfunktionalisierten ODNs **13a-h** wurden diese mittels Gefriertrocknung eingengt und die Konzentration anhand von Einzelinjektionen gemessen. Dazu wurde zunächst die Summe der Extinktionskoeffizienten der beteiligten Chromophore gebildet. Die Ausbeuten variierten zwischen 47 % und 72 %. Anschließend wurden alle Verbindungen bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

Im zweiten Schritt erfolgte die Umsetzung der DBCO-funktionalisierten ODNs **13a-h** mit AdoYnAzid (**3**) in spannungsinduzierten Azid-Alkin-[3+2]-Cycloadditionen (SPAAC, "Klick-Chemie") unter Ausbildung eines Triazolrings.^[88,94] Anzumerken ist hierbei, dass sich in Folge der Reaktion zwei unterschiedliche Isomere ausbilden können. Diese unterscheiden sich hinsichtlich der Ausrichtung des Triazolrings in Bezug auf den Stickstoff des angrenzenden Heterozyklus. Zunächst wurde versucht, auch diese Reaktion mittels *rp*-HPLC zu verfolgen, jedoch gelang dies aufgrund der hohen Reaktionsgeschwindigkeit nicht. Bereits direkt nach Beginn der Reaktion waren höchstens noch Spuren des Signals der DBCO-funktionalisierten ODNs vorhanden. Die Produktverbindungen **14a-h** hingegen konnten auf Grundlage der ver-

änderten Retentionszeit und des Absorptionsverhältnisses bei 260 nm bzw. 300 nm identifiziert werden. Nach Isolierung der ODN-modifizierten AdoMet-Analoga **14a-h** mittels *rp*-HPLC, wurden diese wie zuvor eingengt. Dabei wurde der pH-Wert im Vergleich zu bisherigen Reaktionen immer wieder überprüft und mit Essigsäure angepasst (pH = 4), um den Zerfall zum Thioether zu unterdrücken.

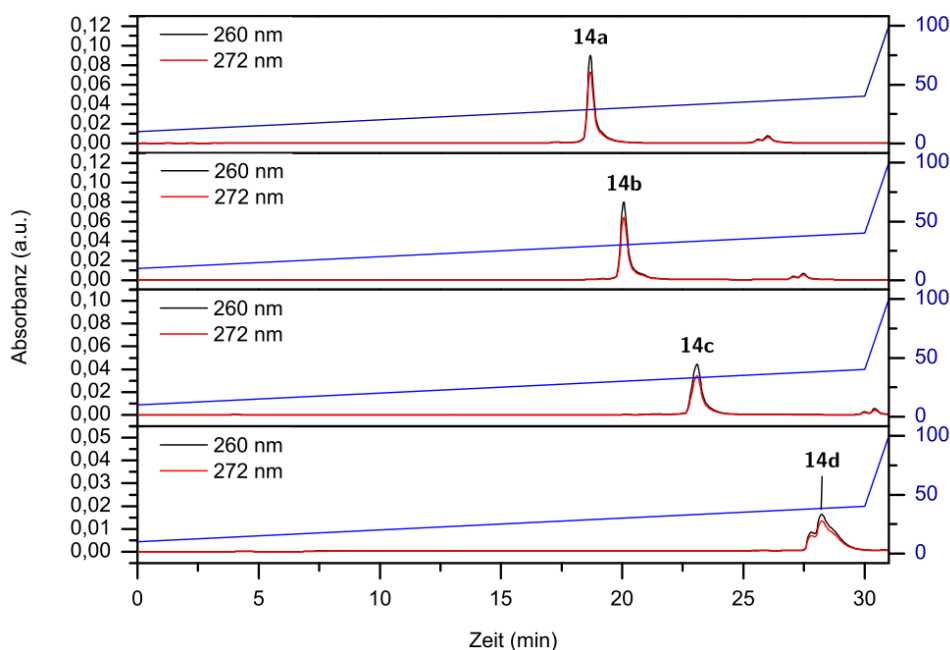


Abbildung 3.8: Einzelinjektionen (*rp*-HPLC) der ODN-modifizierten AdoMet-Analoga **14a-d**.

Nachdem die erhaltenen Lösungen ausreichend eingengt worden waren, erfolgte die Messung der Konzentration erneut im Rahmen von Einzelinjektionen, die zusätzlich dazu genutzt wurden die Reinheit der Verbindungen zu verifizieren. Die entsprechenden Chromatogramme der ODN-modifizierten AdoMet-Analoga **14a-d** sind in Abbildung 3.8 gezeigt, die der Analoga **14e-h** sind im Angang zu finden (Abb. A.17). Bei AdoYnODN2 **14d** wurde eine Aufspaltung des Produktsignals beobachtet. Dies kann dadurch erklärt werden, dass die strukturellen Unterschiede der ausgebildeten Isomere im Vergleich zu den anderen Verbindungen hier einen größeren Anteil an der Gesamtstruktur und somit dem Laufverhalten haben könnten. In einigen Fällen konnten geringe Mengen einer hydrophoberen Verunreinigung beobachtet werden, die wie auch bei den fluoreszierenden AdoMet-Analoga, erfahrungsgemäß den jeweiligen Thioethern zugeordnet wurden. Auch hier konnte die Aufspaltung des Signals, welches wahrscheinlich durch die beiden Isomere hervorgerufen wird, beobachtet werden. Die Ausbeuten der ODN-modifizierten AdoMet-Analoga variierten zwischen 25 % und 63 %, wobei letztere eher eine Ausnahme bildete und keine generellen Korrelationen identifiziert werden konnten. Die eindeutige Charakterisierung der Verbindungen erfolgte massenspektroskopisch durch Dr. André Krause (Jena Bioscience GmbH, Jena) mittels MALDI-TOF (*matrix assisted laser*

desorption ionization - time of flight),^[95] wobei die entsprechenden Spektren dem Anhang zu entnehmen sind (Abb. A.30-A.37). Weiterhin erfolgte die Charakterisierung hinsichtlich der enzymatischen Aktivität DNA-MTase katalysierter Übertragungsreaktionen in Aktivitätstests mit M.TaqI.

3.2 Aktivität doppeltaktivierter AdoMet-Analoga

Inwiefern ein neues AdoMet-Analogon in einer durch eine spezifische DNA-Methyltransferase (DNA-MTase) katalysierten Modifikationsreaktion aktiv ist, wird in sogenannten Modifikations-Restriktions-Assays, im Folgenden auch Aktivitätstests genannt, ermittelt. Dieser besteht aus zwei nacheinander durchgeführten enzymatischen Reaktionen. Im ersten Schritt wird die Modifikation eines DNA-Substrats unter Verwendung einer spezifischen Kombination aus DNA-MTase und AdoMet-Analogon durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine sequenz-, basen- und regiospezifische Alkylierungsreaktion. Im zweiten Schritt erfolgt die Zugabe einer Restriktionsendonuklease (REase), wobei größtenteils kognate REasen des Typs II, mit in Bezug auf die verwendete DNA-MTase identischer Erkennungssequenz, eingesetzt werden. Grundvoraussetzung ist eine Sensitivität der REase hinsichtlich der zuvor eingeführten DNA-Modifikation. Diese kann aus der Sensitivität gegenüber der natürlichen Methylierung der DNA-MTase abgeleitet und der Literatur entnommen werden.^[96]

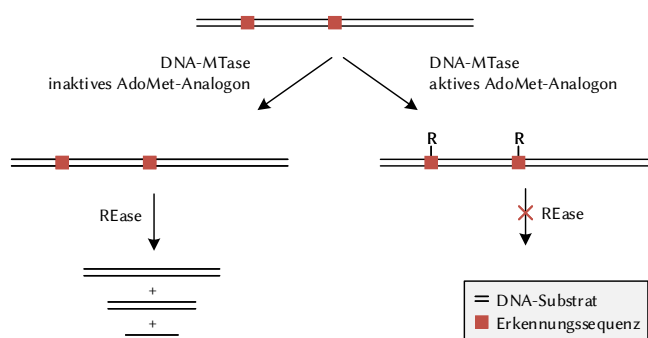


Abbildung 3.9: Schematische Darstellung eines Modifikations-Restriktions-Tests.

Der schematischen Darstellung eines Aktivitätstests (Abb. 3.9) ist zu entnehmen, dass bei Verwendung eines inaktiven AdoMet-Analogons keine Modifikationsreaktion stattfindet, während die Erkennungssequenzen bei aktiven AdoMet-Analoga modifiziert werden. Im zweiten Schritt folgt bei inaktiven Analoga eine Hydrolyse innerhalb oder in unmittelbarer Umgebung der Erkennungssequenzen durch die REase. Die modifizierten Erkennungssequenzen bleiben hingegen unberührt. Dieser Effekt lässt sich mittels Agarosegelelektrophorese untersuchen. Wird nur eine einzelne Bande beobachtet, welche dem ursprünglichen Substrat zugeordnet werden kann, war die Modifikation erfolgreich. Im Umkehrschluss deutet die Fragmentierung des Substrats auf eine unvollständige Modifikation hin. Im Extremfall gleicht das Muster der

beobachteten Banden dem Fragmentierungsmuster, welches bei quantitativer Hydrolyse durch die REase erwartet wird. In diesem Fall hat keine Modifikation des Substrats stattgefunden.

3.2.1 Aktivitätstests von M.TaqI mit AdoYnYn (kurz), AdoYnYn (lang), AdoYnTAMRA (kurz) und AdoYnTAMRA (lang)

Zu Beginn wurde die Aktivität von M.TaqI (5'-TCGA-3')^[96,97] mit den bereits publizierten AdoMet-Analoga AdoYnYn^[50] (4) und AdoYnTAMRA^[16,38] (6b) und den der Variante 5 bzw. 7 mit verlängerter Seitenkette sowohl untereinander als auch mit der des natürlichen Cofaktors AdoMet (1) verglichen. In der nachfolgenden Restriktionsreaktion wurde die REase R.TaqI^[96-98] (5'-T↓CGA-3') verwendet. Die Reaktionszeit betrug jeweils 1 h, wobei die Cofaktoren im Vergleich zu durchgeführten Aktivitätstests früherer Publikationen in geringerer Konzentration (10 µM) eingesetzt wurden. Die Konzentration wurde verringert um die Reinigung des DNA-Substrats in Hinblick auf die spätere Anwendungen im Bereich des optischen DNA-Mappings zu vereinfachen. Die Seitenketten am Sulfoniumzentrum der jeweiligen Cofaktoren sind innerhalb der ersten sechs Atomen identisch, sodass kein größerer elektronischer Einfluss auf die S_N²-Übertragungsreaktion bzw. den Übergangszustand zu erwarten ist.

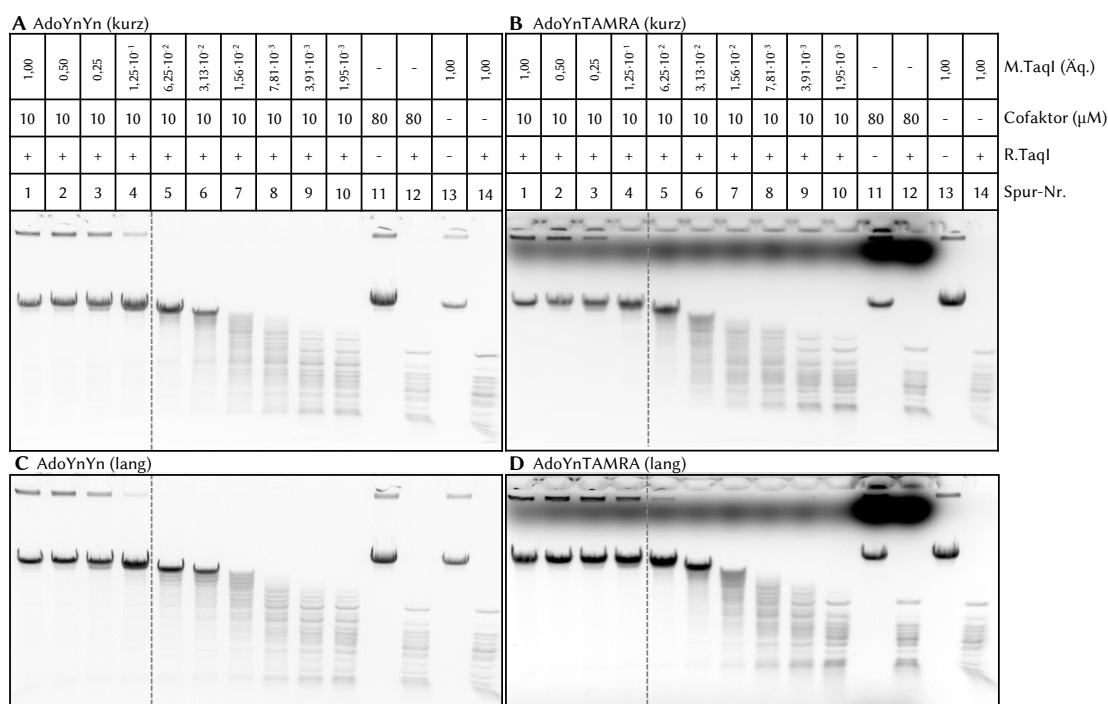


Abbildung 3.10: Gelelektrophoretische Analyse der Aktivitätstests von M.TaqI mit AdoYnYn (kurz) (4, A), AdoYnYn (lang) (5, B), AdoYnTAMRA (kurz) (6b, C) und AdoYnTAMRA (lang) (7, D). Alle getesteten AdoMet-Analoga weisen dieselbe Aktivität auf (TON = 8 h⁻¹).

Die vier untersuchten AdoMet-Analoga **4**, **5**, **6b** und **7** unterscheiden sich für die untersuchten Reaktionsbedingungen nicht in ihrer Aktivität (Abb. 3.10, $\text{TON} = 8 \text{ h}^{-1}$). Dies deutet darauf hin, dass die strukturellen Unterschiede der Verbindungen und damit einhergehend der sterische Anspruch sowie das Vorkommen von Ladungen und deren Abstand zum reaktiven Zentrum keinen signifikanten Einfluss auf die Übertragungsreaktion von M.TaqI haben. Unter Rücksichtnahme der Kristallstruktur des Komplexes aus M.TaqI, DNA und Cofaktor-Analogon^[99] ist dies dadurch zu erklären, dass die Seitenkette aus dem reaktiven Zentrum des Enzyms herausragt. Somit sind keine ungünstigen sterischen Effekte der sich unterscheidenden Teilstrukturen zu erwarten und Wechselwirkungen dieser mit dem Enzym zu vernachlässigen. Alle hier untersuchten AdoMet-Analoga eignen sich somit gleichermaßen zur Anwendung in Modifikationsreaktionen der DNA-MTase M.TaqI, wobei die Aktivität im Vergleich zum natürlichen Cofaktor AdoMet (**1**) grundsätzlich deutlich verringert ist (Abb. A.1, $\text{TON} = 512 \text{ h}^{-1}$). Aktivitätstests mit weiteren DNA-MTasen, insbesondere Mutanten der Cytosin-spezifischen DNA-MTasen M.SssI und M.MpeI, wurden zum Zeitpunkt der Veröffentlichung dieser Arbeit bereits durch Frau Larissa Käver und Frau Leonie Schütz (Weinhold Group, RWTH Aachen University) durchgeführt.

3.2.2 Aktivitätstests von M.TaqI/M.BseCI mit den neuen fluoreszierenden AdoMet-Analoga AdoYnATTO532 und AdoYnAF647

Neben AdoYnTAMRA (**6b**) wurden eine Reihe weiterer fluoreszierender AdoMet-Analoga im Rahmen von Aktivitätstests untersucht. Die Ergebnisse aller Aktivitätstests mit M.TaqI und fluoreszierenden AdoMet-Analoga ($10 \mu\text{M}$) waren nahezu identisch. Eine Besonderheit der Aktivitätstests mit AdoYnATTO532 (**6a**) war die hohe Intensität und die Überlappung eines zusätzlichen Signals mit dem der DNA während der gelelektrophoretischen Analyse, welches dem Analogon zuzuordnen ist. Dadurch musste die Belichtungszeit stark reduziert werden, wodurch die schwachen Kontraste der Aufnahmen zu erklären sind. Im Prinzip war ein ähnliches Phänomen bereits mit AdoYnTAMRA (**6b**) aufgetreten (Abb. 3.10 B/D), führte dort aber nicht zu einer Überlappung der Signale. Im Folgenden sind unter anderem die Aktivitätstests der neuen fluoreszierenden AdoMet-Analoga AdoYnATTO532 (**6a**, Abb. 3.11 A-C) und AdoYnAF647 (**6d**, Abb. 3.11 D-E) gezeigt. Für beide Analoga ergeben sich mit M.TaqI vergleichbare Aktivitäten ($\text{TON} = 16 \text{ h}^{-1}$) wie für AdoYnTAMRA (**6b**). Dies kann wiederum erneut durch die ähnlichen strukturellen und elektronischen Eigenschaften, sowie der Tatsache, dass die Seitenkette aus dem aktiven Zentrum des Enzyms herausragt, erklärt werden. Die unterschiedlichen Strukturen und Ladungen der Fluorophore scheinen ebenso keinen entscheidenden Einfluss zu haben. Ein Aktivitätstest mit M.BseCI und AdoYnATTO532 (**6a**) zeigt, wie frühere Aktivitätstests auch, dass die DNA-MTase mindestens stöchiometrisch eingesetzt werden muss, um alle Erkennungssequenzen zu modifizieren ($\text{TON} = 0,8 \text{ h}^{-1}$). Außerdem wurde die Aktivität der fluoreszierenden AdoMet-Analoga mittels weiterer Verdünnungsreihen untersucht. Dabei war die M.TaqI-Konzentration konstant ($1 \text{ } \mu\text{M}$), während die des jeweiligen AdoMet-Analogons von Probe zu Probe halbiert wurde. Auch bei den sogenannten Cofaktorverdünnungen waren die Ergebnisse untereinander ähnlich. Für die Analoga **6a** und **6d** ergeben sich Grenzkonzentrationen von $1,3$ bzw. $2,5 \mu\text{M}$. Interessanterweise gleichen die Ergebnisse damit denen die

in einer Verdünnungsreihe des natürlichen Cofaktors AdoMet (**1**) erhalten wurde und dem Anhang zu entnehmen ist (Abb. A.2).

3.2.3 Aktivitätstests von M.TaqI mit ODN-modifizierten AdoMet-Analoga

Auch die neue Klasse ODN-modifizierter AdoMet-Analoga zur Übertragung von sterisch anspruchsvollen Gruppen wurde mittels Aktivitätstests charakterisiert. Die dabei untersuchten ODN-modifizierten Verbindungen unterscheiden sich in vielerlei Hinsicht von denen mit fluoreszierenden Reportergruppen, deren Aktivitätstests in vorherigen Abschnitten behandelt wurden. Zum einen wurden die ODN-modifizierten Analoga ausgehend von AdoYnAzid (**3**), anstelle des Alkins **4** synthetisiert. Dadurch unterscheiden sich die Reaktionsprodukte bereits ab dem siebten Atom der Seitenkette am Sulfoniumzentrum und infolgedessen auch in Bezug auf die Ausrichtung des Triazolrings. Weiterhin erfolgte die Kupplung der Reportergruppe mittels SPAAC-Reaktion der DBCO-Funktion des ODNs, wodurch sich im Vergleich zu CuAAC-Reaktionen eines terminalen Alkins, sterisch deutlich anspruchsvollere Strukturen, mit insgesamt vier zusammenhängenden Ringen, ausbilden. Somit kann festgehalten werden, dass sich sowohl die elektronischen als auch die sterischen Eigenschaften der Seitenkette unterscheiden, wodurch sich wiederum Aktivitätsunterschiede ergeben könnten.

Des Weiteren unterscheidet sich die Reportergruppe neben ihrer Funktion, sterischer Anspruch anstelle von Fluoreszenz, zusätzlich darin, dass sich die Größe der Strukturen und die elektronischen Eigenschaften innerhalb der Klasse stärker voneinander unterscheiden als dies bei den fluoreszierenden AdoMet-Analoga der Fall ist. Ein Vergleich des Molekulargewichts der kleinsten und größten Verbindung innerhalb der Klasse ODN-modifizierter AdoMet-Analoga verdeutlicht diesen Unterschied besonders (**14d**: $1519,46 \text{ g mol}^{-1}$; **14h**: $5642,28 \text{ g mol}^{-1}$). Damit handelt es sich bei **14h** gleichzeitig um eine der Seitenketten mit dem höchsten Molekulargewicht, die in einer einstufigen DNA-Modifikation mittels doppelaktiviertem AdoMet-Analagon übertragen wurde. Aufgrund der wachsenden Anzahl an Phosphatgruppen bei zwei, fünf, acht, elf bzw. 14 Nukleotiden, steigt auch die Ladung des Oligonukleotids. Weiterhin ist anzumerken, dass es sich bei DNA-MTasen um - zwar doppelsträngige - aber nichtsdestotrotz DNA-bindende Enzyme handelt. Wechselwirkungen zwischen ODN und DNA-Bindungstasche sowie Inhibition können daher nicht ausgeschlossen werden.

In den ersten Aktivitätstests wurde das AdoMet-Analagon AdoYnODN11 (**14a**) mit M.TaqI untersucht (Abb 3.12 A-C). Dabei wurde zunächst die DNA-MTase-Konzentration bei konstanter Cofaktorkonzentration ($40 \mu\text{M}$) variiert. Vollständiger Schutz vor Restriktion durch R.TaqI konnte dabei erst ab stöchiometrischen Mengen der DNA-MTase beobachtet werden. ($\text{TON} = 0,8 \text{ h}^{-1}$). Damit ist die Aktivität im Vergleich zu fluoreszierenden AdoMet-Analoga trotz höherer Cofaktorkonzentration um ein zehnfaches geringer. Im weiteren Verlauf wurde die Grenzkonzentration des AdoMet-Analogons bei zwei verschiedenen DNA-MTase-Konzentrationen untersucht. Für die höhere M.TaqI-Konzentration 10 Åq , ergab sich eine Grenzkonzentration von $5 \mu\text{M}$. Damit ist die erforderliche Konzentration deutlich höher als bei den vorher betrachteten doppelaktivierten Verbindungen. In weiteren Aktivitätstests wurde zunächst die Abhängigkeit der Aktivität von der Länge des zu übertragenden ODNs untersucht. In den entsprechenden

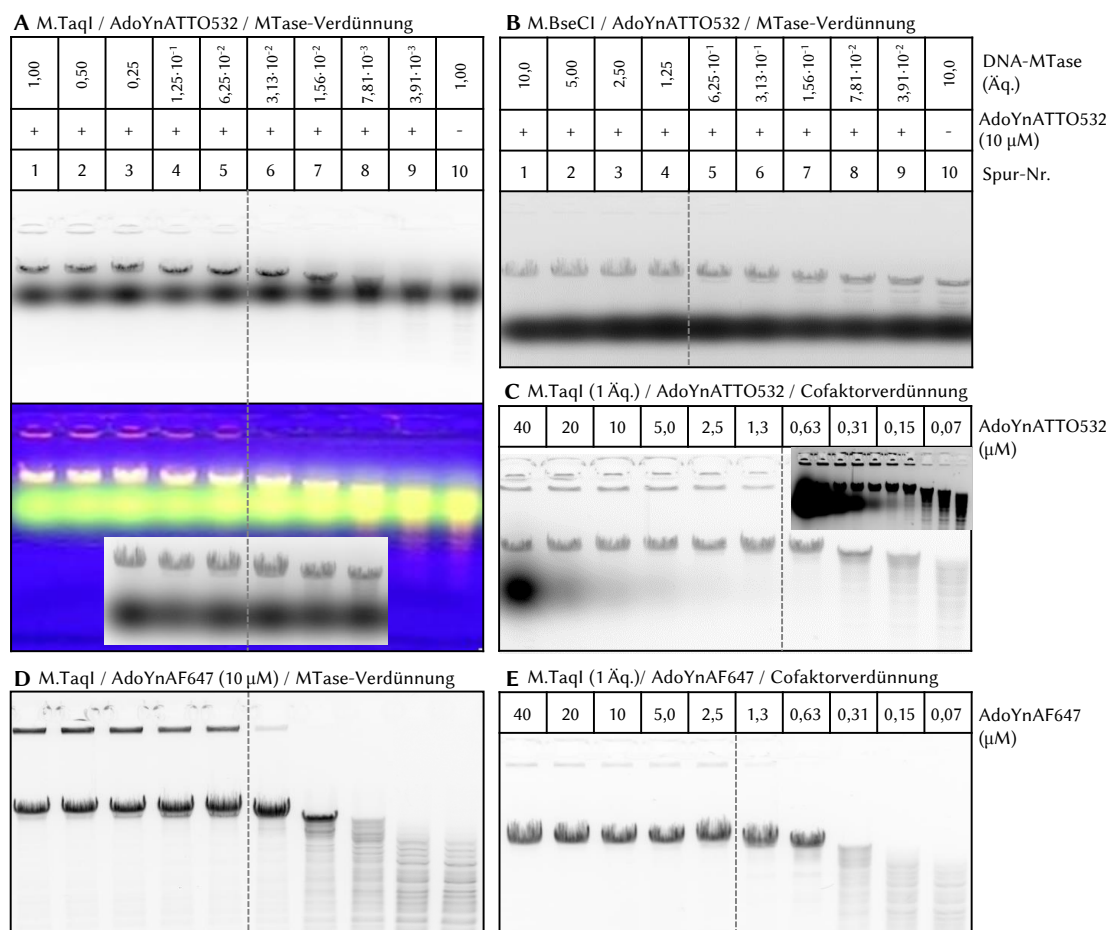


Abbildung 3.11: Gelelektrophoretische Analyse der Aktivitätstests von M.TaqI bzw. M.BseCI mit AdoYnATTO532 (**6a**) und AdoYnAF647 (**6d**). Bei den Aktivitätstests mit AdoYnATTO532 (**A-C**) ist ein Signal aus der Cofaktorsynthese eindeutig neben dem der DNA zu erkennen. Zur Veranschaulichung, ist neben einer farbigen Version der M.TaqI-Verdünnung (**A**, untere Hälfte) zusätzlich eine Version der Cofaktorverdünnung mit regulärer Belichtungszeit gezeigt (**C**, obere rechte Ecke). Bei der M.BseCI-Verdünnung erfolgte zudem eine zweite, längere elektrophoretische Trennung zur besseren Unterscheidung der Signale. Die ermittelten Aktivitäten der fluoreszierenden AdoMet-Analoga mit M.TaqI ($\text{TON} = 16 \text{ h}^{-1}$) unterscheiden sich bei Betrachtung der MTase-Verdünnungsreihen zwar nicht untereinander, jedoch deutlich von der des natürlichen Cofaktors. Die Grenzkonzentration der beiden Analoga und AdoMet (**1**) bei konstanter DNA-MTase-Konzentration (1 Äq.) sind hingegen vergleichbar.

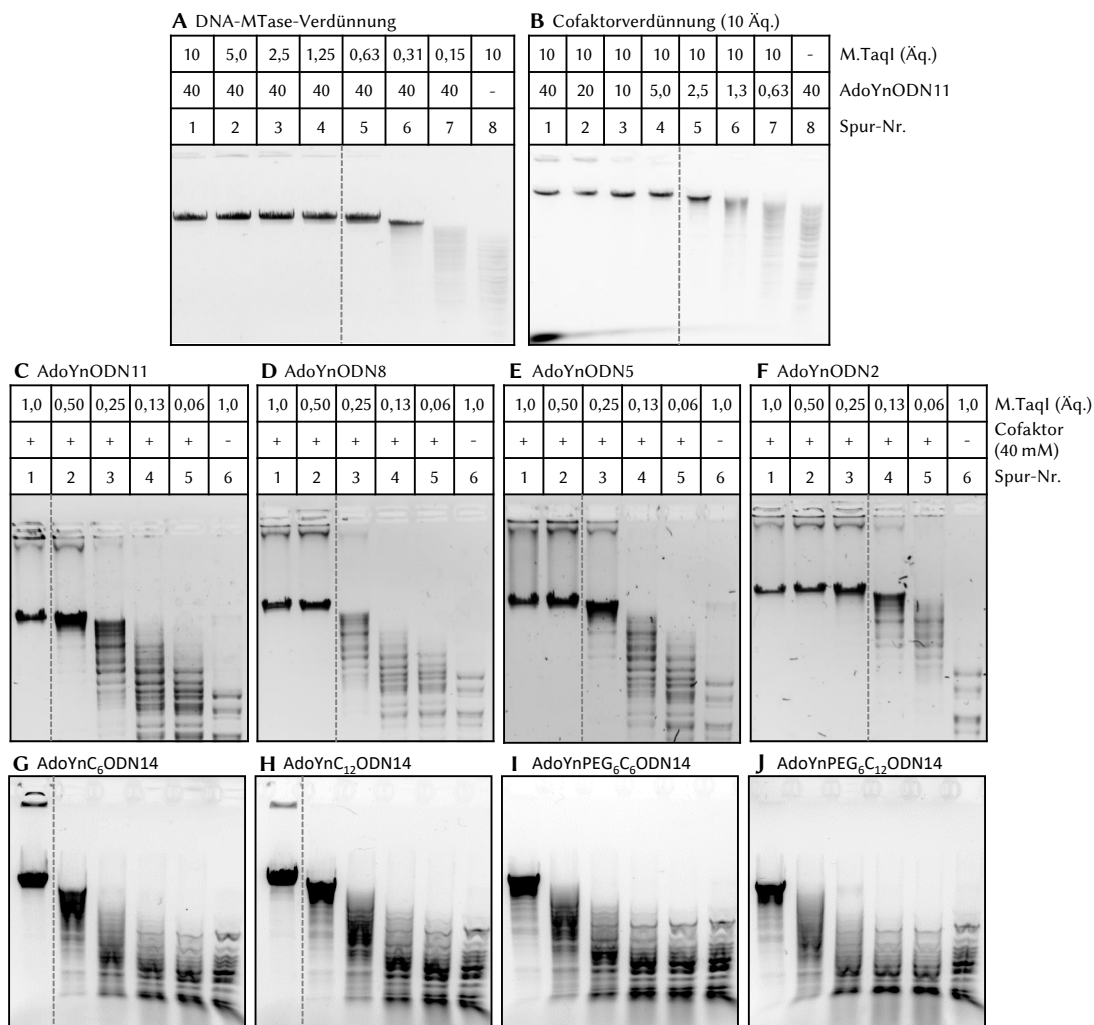


Abbildung 3.12: Gelelektrophoretische Analyse der Aktivitätstests von M.TaqI mit den ODN-modifizierten AdoMet-Analoga **14a-h**. Zunächst wurde AdoYnODN11 (**14a**) gesondert betrachtet (**A-B**). Während im ersten Aktivitätstest die DNA-MTase-Konzentration variiert wurden ($\text{TON} = 0,8 \text{ h}^{-1}$), wurde daraufhin die Grenzkonzentration des AdoMet-Analogons untersucht. Im Anschluss erfolgte erst die Untersuchung der AdoMet-Analoga mit unterschiedlich langen ODN-Modifikationen (**14a-d**, **C-F**, $\text{TON} = 1\text{-}4 \text{ h}^{-1}$), und dann derer mit gleichem ODNs aber unterschiedlichen Linkern (**14e-h**, **G-J**, $\text{TON} \leq 1 \text{ h}^{-1}$). Es zeigt sich, dass die Länge des Linkers einen geringen Einfluss hat, wohingegen die Länge des ODNs für die Aktivität entscheidend ist. Insgesamt ist die Aktivität der ODN-modifizierten AdoMet-Analoga deutlich geringer als die des natürlichen Cofaktor AdoMet(**1**).

Aktivitätstests wurden die AdoMet-Analoga **14a-d** mit der DNA-MTase M.TaqI umgesetzt (Abb 3.12 D-G). Im Vergleich zu den vorherigen Aktivitätstests wurde die Konzentration der DNA-MTase reduziert (1 Äq. in der ersten Spur), die des AdoMet-Analogs jedoch nicht verändert. Die gelelektrophoretische Analyse der Versuchsreihe zeigt eine eindeutige Abhängigkeit zwischen Aktivität und der Länge des ODNs (11 nt: TON = 1 h^{-1} ; 5-8 nt: TON = 2 h^{-1} ; 2 nt: TON = 4 h^{-1}). Da die quarternäre Ringstruktur, als Resultat der SPAAC-Reaktion, und die restlichen Teilstrukturen, mit Ausnahme des ODNs selbst, bei allen vier AdoMet-Analoga identisch ist, scheinen die Aktivitätsunterschiede im direkten Zusammenhang mit der Länge des ODNs zu stehen. Ob dies jedoch, wie bereits beschrieben, auf ungünstige elektrostatische Wechselwirkungen zwischen gebundenem Cofaktor und gebundener DNA oder verstärkte Inhibition der DNA-Bindungstasche des Enzyms zurückzuführen ist, bleibt ungewiss.

Zuletzt wurde die Aktivität unterschiedlicher ODN-modifizierter AdoMet-Analoga mit gleicher Basensequenz untersucht (Abb 3.12 H-K). Die AdoMet-Analoga **14e-h** weisen alle die selbe 14 nt-lange Sequenz auf und unterscheiden sich ausschließlich in der Länge bzw. dem Aufbau des Linkers zwischen ODN und Sulfoniumzentrum. Während sich **14i** und **14j** ausschließlich hinsichtlich der Kohlenstoffkette (6 bzw. 12 Atome) der ursprünglichen 5'-Aminomodifikation unterscheiden, weisen die beiden Varianten **14g** und **14h** zusätzlich einen internen PEG-Linker mit sechs Wiederholungseinheiten zwischen ODN und der ursprünglichen 5'-Aminomodifikation auf. Bei gleicher Vorgehensweise wie auch schon bei den ODN-modifizierten AdoMet-Analoga mit unterschiedlich langen ODNs zeigen sich nur minimale Unterschiede. So ist die Aktivität der Varianten mit internen PEG-Linker etwas geringer (TON < 1), während sich die der AdoMet-Analoga ohne PEG-Linker aber mit unterschiedlich langer Kohlenstoffkette nicht unterscheiden (TON = 1). Erneut ist eine vollständige Modifikation nur bei stöchiometrischem Einsatz der DNA-MTase zu beobachten.

Naturgemäß ist es schwierig zu klären, welche Ursache hinter den schwachen Effekten steht. Auffällig bei allen hier gezeigten Aktivitätstests mit ODN-modifizierten AdoMet-Analoga ist die Unschärfe der Banden von nicht-vollständig modifizierten DNA-Proben. Dies ist insbesondere bei den längeren Fragmenten der letzten Versuchsreihe zu beobachten. Die Einführung der ODN-Modifikationen verändert das Laufverhalten (elektrophoretische Mobilität) aufgrund der unterschiedlichen Anzahl an Modifikationen. Das Phänomen der veränderten elektrophoretischen Mobilität sollte im weiteren Verlauf dazu genutzt werden, die tatsächliche Übertragung von ODNs im Rahmen von *Electrophoretic Mobility Shift Assays* (EMSA) zu verifizieren.

3.2.4 EMSA mit M.TaqI und AdoYnODN11 sowie R.PvuII bzw. R.Hpy188III

Um einen klaren Hinweis auf die tatsächlich erfolgte enzymatische Übertragung von ODNs zu erhalten, wurden zusätzlich zu den Aktivitätstests auch EMSA-Experimente durchgeführt. Dabei werden Verschiebungen einzelner Banden im Fragmentierungsmuster der gelelektrophoretischen Analyse untersucht und diese einzelnen spezifischen Modifikationen zugeordnet. Dies ist möglich, da bei der Übertragungsreaktion im Falle der AdoMet-Analoga mit ODN-modifizierten Seitenketten zum Teil deutlich höhermolekulare Modifikationen eingeführt werden als dies z.B. bei den reaktiven oder fluoreszierenden AdoMet-Analoga der Fall ist.

Dadurch verändert sich auch die elektrophoretische Mobilität des modifizierten Fragments. Der experimentelle Unterschied im Vergleich zu den bereits diskutierten Aktivitätstests liegt unter anderem darin, dass keine kognaten REasen, sondern solche deren Erkennungssequenzen sich von denen der DNA-MTasen unterscheiden, verwendet werden. Einzelne Modifikationen werden also nicht durch den Schutz vor Restriktion, sondern indirekt durch die bereits genannte Bandenverschiebung nachgewiesen. Der Informationsgewinn liegt dabei darin, dass eine hochmolekulare Modifikation angezeigt wird. Durch die Auswahl einer in Hinblick auf das DNA-Substrat und -MTase geeigneten REase wird gewährleistet, dass Fragmente auf denen Modifikationen erwartet werden eindeutig einzelnen nicht-überlagernden Banden zugeordnet werden können. Darüber hinaus sollten die Parameter der gelelektrophoretischen Analyse so gewählt werden, dass die zu analysierenden Fragmente nicht zu groß sind. Um zusätzlich nachzuweisen, dass es sich bei der Modifikation um ein ODN handelt, wurde nach dem eigentlichen EMSA ein zusätzlicher Verdau mittels Exonuklease I durchgeführt, welche eine Spezifität gegenüber einzelsträngiger DNA aufweist. Die Nukleaseaktivität erfolgt dabei ausschließlich in Richtung 3'→5', wobei 5'-terminale Dinukleotide intakt bleiben.^[100] Das nachfolgende Reaktionsschema in Abbildung 3.13 A verdeutlicht die Veränderung des Molekulargewichts und sterischen Anspruchs durch die Modifikationsreaktion und den nachfolgenden Verdau durch die Exonuklease I.

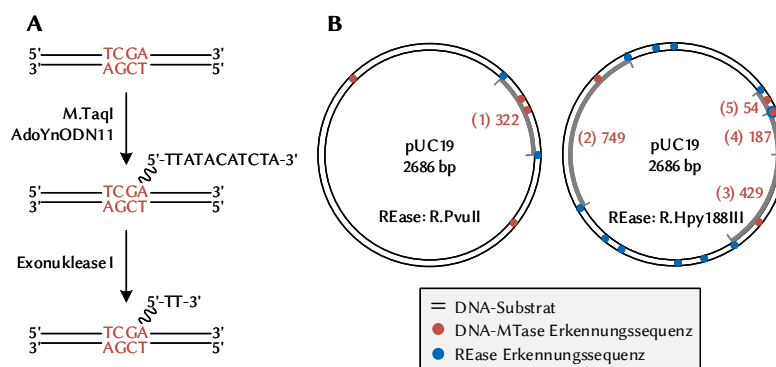


Abbildung 3.13: Schematische Darstellung der EMSA-Experimente mit M.TaqI und AdoYnODN11 sowie anschließendem Verdau mittels Exonuklease I (A). Plasmidkarten zu den durchgeführten EMSA-Experimenten mit den zu analysierenden DNA-Fragmenten (B).

Für die Kombination aus AdoYnODN11 (**14a**) und M.TaqI wurde das Substrat pUC19 gewählt. Es kamen die REasen R.PvuII^[96,101] (5'-CAG↓CTG-3') und R.Hpy188III^[96,102] (5'-TC↓NNGA-3') zum Einsatz. Bei letzterer ist eine Überschneidung mit einer Erkennungssequenz von M.TaqI möglich, jedoch ist dies für das gewählte Substrat nicht gegeben. Auf den in Abbildung 3.13 B gezeigten Plasmidkarten sind sowohl die Erkennungssequenzen von M.TaqI als auch die der jeweiligen REase gezeigt. Es ergeben sich insgesamt fünf Fragmente bei denen eine Veränderung der elektrophoretischen Mobilität aufgrund der Zunahme des sterischen Anspruchs durch die ODN-Modifikationen zu erwarten wäre. Bis auf Fragment (1) weisen alle untersuchten Fragmente genau eine Erkennungssequenz der DNA-MTase M.TaqI auf.

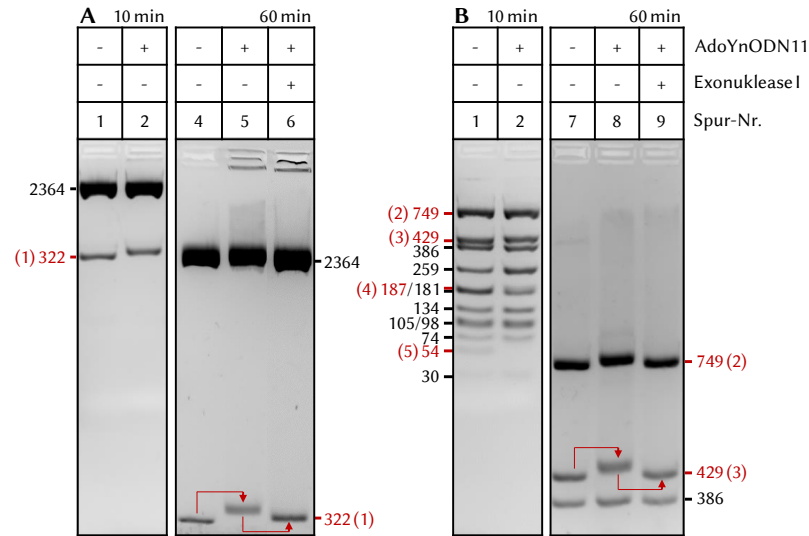


Abbildung 3.14: Gelelektrophoretische Analyse des EMSA-Experiments mit AdoYnODN11 (**14a**), M.TaqI und R.PvuII (**A**) bzw. R.Hpy188III (**B**). Die Elektrophorese wurde jeweils 10 min als auch 60 min durchgeführt.

Die gelelektrophoretische Analyse des Experimentes mit R.PvuII (Abb. 3.14 A) zeigt bereits nach 10 min eine verringerte elektrophoretische Mobilität für das ODN-modifizierte Fragment (1). Nach 60 min Elektrophorese ist dieser Effekt noch stärker zu beobachten. Die Spur mit Exonuklease I weist hingegen keine veränderte elektrophoretische Mobilität im Vergleich zum selben Fragment der unmodifizierten Probe auf. Ein ähnliches Ergebnis ist für die REase R.Hpy188III zu beobachten (Abb. 3.14 B), wobei hier zusätzliche Effekte zu erkennen sind. Zum einen wird der Einfluss der Größe des zu analysierenden Fragments auf die Veränderung der Mobilität deutlich. Während Fragment (3) eine kleine aber deutlich erkennbare Veränderung der elektrophoretische Mobilität aufweist, zeigt sich für Fragment (2) nach 10 min noch kein Effekt. Bei Fragment (4) und (5) ist eine Besonderheit zu beobachten, da die Erkennungssequenzen von M.TaqI und R.Hpy188III auf Fragment (4) nur ein Basenpaar voneinander entfernt liegen. Die ODN-Modifikation liegt damit in Bezug auf die REase innerhalb der als *flanking bases* bezeichneten Region. Dadurch scheint die Hydrolyse dieser Position durch die REase weitestgehend unterdrückt zu werden, wodurch ein Doppelfragment (4 + 5) mit einer Länge von 241 bp und zwei ODN-Modifikationen entsteht. Zum einen verschwinden dadurch die Banden der Fragmente (4) und (5). Des Weiteren ist eine Erhöhung der Intensität der Bande des unmodifizierten 259 bp großen Fragments aufgrund von Überlappung mit dem neuentstandenen Fragment zu beobachten. Nach 60 min ist die verringerte elektrophoretische Mobilität des modifizierten Fragments (3) verstärkt zu beobachten. Auch für Fragment (2) ist jetzt eine kleine Veränderung der elektrophoretischen Mobilität zu erkennen. In beiden Fällen lässt sich der Effekt durch den Einsatz von Exonuklease I weitestgehend rückgängig machen. Somit wurde für die Fragmente (1), (2) und (3) eine Bandenverschiebung beobachtet die der ODN-Modifikation

zugeordnet werden kann. Durch Zugabe von Exonuklease I ließ sich der Effekt in allen Fällen rückgängig machen.

3.3 Einstufige DNA-Modifikationen

In den nachfolgenden Abschnitten werden von DNA-MTasen katalysierte einstufige DNA-Modifikationen zur Anwendung im Bereich des DNA-Mappings behandelt. Bei den hier diskutierten einstufigen Modifikationsreaktionen wird ein Reportermolekül innerhalb der Seitenkette eines doppeltaktivierten AdoMet-Analogons sequenz-, basen- und regiospezifisch direkt auf doppelsträngige DNA übertragen (Abb. 3.15), und kann allgemein der Methode des *methyltransferase-directed Transfer of Activated Groups* (mTAG) zugerechnet werden.^[9,49,50,52] In dieser Arbeit lassen sich zwei Kategorien von Reportermolekülen unterscheiden. Zum einen sind das Fluorophore zur Anwendung im Bereich des optischen DNA-Mappings. Zum anderen wurden sterisch anspruchsvolle Gruppen verwendet, die Anwendung im elektrischen DNA-Mapping finden. In beiden Fällen wurde das bereits in Abschnitt 3.2 beschriebene Prinzip der kognaten REasen genutzt, um die quantitative Alkylierung der Erkennungssequenzen durch die DNA-MTasen mithilfe der Sensitivität der REasen gegenüber Basenmodifikationen zu verifizieren.

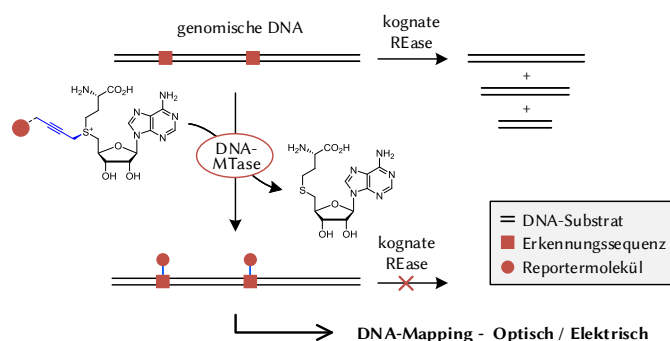


Abbildung 3.15: Schematische Darstellung einstufiger DNA-Modifikationen. Die Seitenkette eines doppeltaktivierten AdoMet-Analogons wird sequenz-, basen- und regiospezifisch auf genomische DNA übertragen. Die Verifizierung der Alkylierungsreaktion erfolgt mittels kognater REasen in Kombination mit agarosegelelektrophoretischer Analyse.

Im Gegensatz zur DNA-MTase M.BseCI^[96,103] (5'-ATCGAT-3', n = 6 bp, m = 4096 bp) wurde M.TaqI^[96,97] (5'-TCGA-3', n = 4 bp, m = 256 bp) in bereits veröffentlichten einstufigen DNA-Modifikationsreaktionen mit doppeltaktivierten AdoMet-Analoga, sowohl zur Anwendung von optischem als auch elektrischem DNA-Mapping, eingesetzt.^[16,38,53,55] Aufgrund der unterschiedlichen statistischen Vorkommen der Erkennungssequenzen können die jeweiligen Alkylierungen mit hoher oder niedriger Dichte eingebracht werden. Grundsätzlich gilt es die Dichte der eingebrachten Reportergruppen in Hinblick auf die spätere Analyse-methode zu optimieren. Die Modifikationsdichte ist von der spezifischen Häufigkeit der

DNA-MTase-Erkennungssequenz auf dem zu modifizierenden DNA-Substrat abhängig. Neben natürlichen Über- bzw. Unterrepräsentationen der Erkennungssequenz bei spezifischen DNA-MTase/Substrat-Kombinationen, ist die Länge der Sequenz ausschlaggebend für die Modifikationsdichte. Der statistische Abstand von Basenpaarmotiven innerhalb theoretischer DNA-Substrate mit vollständig randomisierten Basenpaarsequenzen errechnet sich aus $m = 4^n$ (mit m = durchschnittlicher Abstand in bp und n = Länge der Erkennungssequenz in bp). Weiterhin können bereits vorhandene substratspezifische Basenmodifikationen, wie CpG-, Dam- oder Dcm-Methylierung, Einfluss auf die Alkylierungsreaktion der DNA-MTasen haben.

3.3.1 DNA-Modifikation mit fluoreszierenden Reportergruppen

Die aus den Modifikationsreaktionen mit fluoreszierenden AdoMet-Analoga erhaltenen Analyseproben wurden unter anderem in Kooperation mit dem AK Wöll (IPC, RWTH Aachen University) fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Dazu wurde genomische Lambda- und T7-DNA mittels einer Methode aus dem Bereich des DNA-Combings gestreckt und immobilisiert.^[64] Die automatisierte Auswertung der Aufnahmen anhand von selbst entwickelten Auswertungsroutinen wird in Abschnitt 3.6 vorgestellt. Dadurch können die Ergebnisse der einstufigen DNA-Modifikation direkt mit denen des später in Abschnitt 3.4 behandelten DNA-Blockings verglichen werden. Weiterhin wurde Lambda-DNA, an deren Enden zuvor Biotin-Modifikationen eingebracht worden waren, fluoreszenzmarkiert und in Kooperation mit Dr. Philipp Rauch und Dr. Rosalie Driessen von der Firma LUMICKS (Amsterdam, NL) in der sogenannten *C-Trap*^[104] analysiert. Die Immobilisierung und Streckung erfolgte dabei durch das Einspannen einzelner DNA-Stränge zwischen Streptavidin-beschichteten Partikeln (*beads*) in Kombination mit der Anwendung des Prinzips der optischen Pinzette. Neben konfokaler Fluoreszenzmikroskopie kam dabei auch supraauflösende *stimulated emission depletion* Mikroskopie (STED)^[91] zum Einsatz.

3.3.1.1 TAMRA-/CF640R-/AF647-Modifikation zur Analyse mittels DNA-Combing

Zur optischen Analyse genomischer Lambda- und T7-DNA mittels DNA-Combing in Kombination mit Fluoreszenzmikroskopie wurde das jeweilige Substrat unter anderem mit M.BseCI (5'-ATCGAT-3', 15 bzw. 3 Erkennungssequenzen) und verschiedenen fluoreszierenden AdoMet-Analoga modifiziert. Dabei handelt es sich um Modifikationsreaktionen mit geringer Dichte. In allen Ansätzen wurde die selbe Konzentration an DNA-MTase (10 Äq. in Bezug auf die 5'-ATCGAT-3' Erkennungssequenzen) und AdoMet(-Analogon) (10 μ M) eingesetzt, welche von zuvor durch Matyas Juhasz (AK Weinhold, RWTH Aachen University) sowie eigens durchgeführten Aktivitätstests abgeleitet wurden. Zur Verifikation der Alkylierung der N⁶-Position des zweiten Adenins innerhalb der Erkennungssequenz wurde die kognate REase R.ClaI (5'-AT↓CGAT-3')^[96,97,105] verwendet. Die agarosegelelektrophoretische Analyse der Modifikations-Restriktions-Assays zweier Experimente sind in Abbildung 3.16 gezeigt. Während im ersten Experiment zunächst der Cofaktor variiert wurde, war die Variation des DNA-Substrats Ziel des zweiten Versuchs. Bei sämtlichen Spuren der Proben mit M.BseCI und AdoMet (**1**) bzw. einem fluoreszierenden Analogon ist nur eine Bande zu erkennen, die

dem jeweiligen vollständig geschützten DNA-Substrat zugeordnet werden kann (Spuren A.1-4 bzw. B.1-2). In allen Kontrollen mit REase aber ohne Cofaktor oder DNA-MTase hingegen ist eine vollständige Fragmentierung der DNA zu beobachten (Spuren A.5-6 bzw. B.3-4). Eine Besonderheit dabei ist, dass die Banden der Kontrollen mit DNA-MTase aber ohne Cofaktor trotz Verwendung von Proteinase K nach der Restriktionsreaktion deutlich weniger definiert sind. Dieses Phänomen wurde häufig bei Modifikationsreaktionen mit M.BseCI bzw. R.ClaI beobachtet und kann auf geringe Mengen an **1** in der M.BseCI-Präparation zurückgeführt werden. Bei den Proben mit AdoYnTAMRA (**6b**) ist neben den DNA-Banden ein weiteres Fluoreszenzsignal, das durch den Cofaktor bzw. dessen etwaigen Zerfallsprodukte (z.B. Thioether) hervorgerufen wird, zu beobachten.

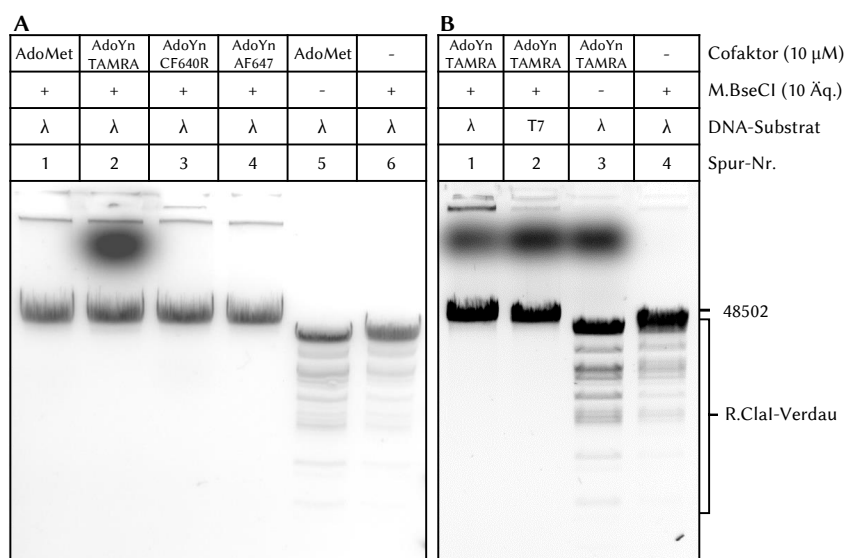


Abbildung 3.16: Gelelektrophoretische Analyse der TAMRA-, CF640R- und AF647-Modifikation mit M.BseCI zur fluoreszenzmikroskopischen Analyse mittels DNA-Combing.

Neben M.BseCI wurde auch die DNA-MTase M.TaqI (5'-TCGA-3', 121 bzw. 111 Erkennungssequenzen auf Lambda-/T7-DNA) zur einstufigen Übertragung fluoreszierender Reportergruppen verwendet. Dabei handelt es sich im Vergleich um Modifikationsreaktionen mit hoher Dichte. Es wurde stets die selbe Konzentration an DNA-MTase (1 Äq. in Bezug auf die 5'-TCGA-3' Erkennungssequenzen) und AdoMet(-Analogon) (10 μM) eingesetzt. Zur Verifikation der Alkylierung der N⁶-Position des Adenins der Erkennungssequenz wurde die kognate REase R.TaqI (5'-T↓CGA-3') verwendet.^[96-98] Die agarosegelelektrophoretische Analyse erfolgte analog zu den Experimenten M.BseCI. Nach erfolgreicher Verifikation der Übertragungsreaktionen folgte die fluoreszenzmikroskopische Analyse der modifizierten genomischen DNA. Im ersten Schritt der dafür notwendigen Probenvorbereitung wurde die DNA zunächst mittels Agarose-Plugs aufgereinigt, um die Proben von überschüssigen Fluorophoren zu befreien und somit ein möglichst hohes Signal-Rausch-Verhältnis bei der Fluoreszenzmikroskopie zu gewährleisten. Die Aufreinigung mit Agarose-Plugs wurde der in früheren Arbeiten genutzten

Tropfendialyse aufgrund des geringeren mechanischen Stresses und der höheren Ausbeute vorgezogen. Die weitere Probenvorbereitung beinhaltete neben einer Verdünnung der DNA ($0,5 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$) die Zugabe des Interkalators YOYOTM-1 und des Reduktionsmittels DTT. Letzteres wurde zugegeben um die Oxidation der zu untersuchenden Fluorophore durch Luftsauerstoff zu unterdrücken und somit deren Lebensdauer während der Analyse zu erhöhen. Bei YOYOTM-1 (Abb. 3.17 B) handelt es sich um ein Dimer des Cyaninfarbstoffs Oxazolgelb,^[106] welches mit einem biskationischen Linker verbrückt ist. Oxazolgelb ist ein Interkalator und bindet DNA und RNA unspezifisch mittels π - π -Wechselwirkungen (*base stacking*). Die Bildung des Einlagerungskomplexes wird im Falle des Dimers YOYOTM-1 sowohl durch einen Chelateffekt als auch durch elektrostatische Wechselwirkung zwischen DNA-/RNA-Rückgrat und dem kationischen Linker begünstigt. Zusätzlich führt die Einlagerung des Interkalators zu einer Überstreckung des gebundenen DNA Substrats.^[107] Die maximale Sättigung wird bei einem Verhältnis von 1:4 YOYOTM-1 zu Basenpaaren erreicht. Hervorzuheben ist, dass die Intensität des Fluorophorsignals bei Einlagerung in doppelsträngiger DNA um das 3200-fache ansteigt. Dies ermöglicht die Abbildung der Konturen einzelner DNA-Stränge, wodurch die Auswertung hinsichtlich der sequenzspezifischen Modifikationen stark vereinfacht wird.

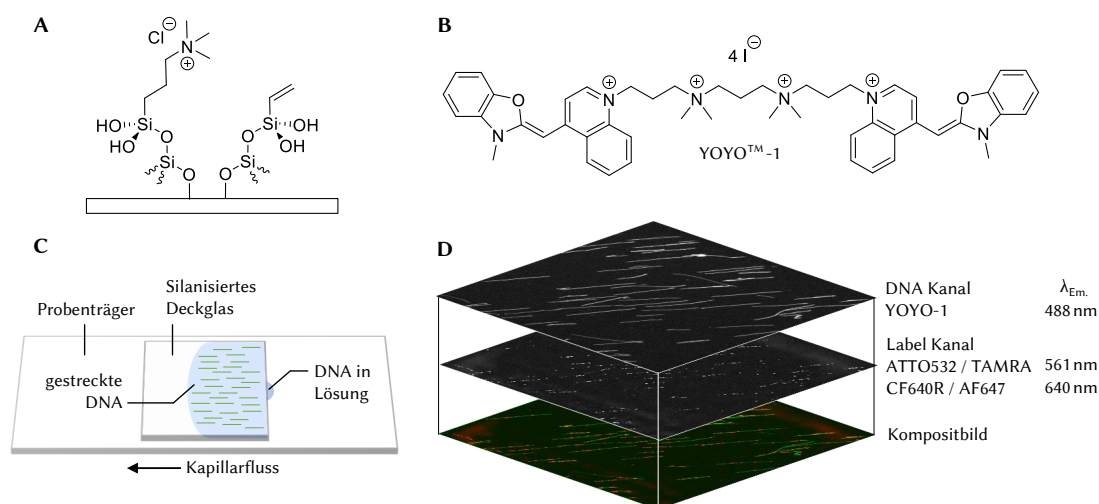


Abbildung 3.17: Übersichtsgrafik zum optischen DNA-Mapping mittels DNA-Combing. Molekulare Strukturen der zur Immobilisierung von DNA-Einzelmolekülen verwendeten Silanmodifikationen (A) sowie des DNA-Interkalators YOYOTM-1 (B). Aufbau und experimentelle Umsetzung des DNA-Combing's genomischer DNA (C). Prinzip der Visualisierung modifizierter DNA mithilfe der Aufnahmen unterschiedlicher Kanäle sowie deren Überlagerung zur Zuordnung von Reporter- und DNA-Einzelmolekülen (D).

Damit die Fluoreszenzmodifikationen sowohl einzeln aufgelöst als auch DNA-Einzelmolekülen zugeordnet werden können, muss die zu untersuchende DNA gestreckt vorliegen. Dies wurde mittels einer Methode aus dem Bereich des DNA-Combing's realisiert. Dazu wurden Mikroskopie-Deckgläser mit zwei verschiedenen Reagenzien silanisiert, wobei es sich um eine gemischt hydrophobe-hydrophile Oberflächenmodifikation handelt (Abb. 3.17 A). Die eingesetzten Si-

lane werden in wässriger Lösung zunächst hydrolysiert und reagieren daraufhin in einer Kondensationsreaktion mit der ebenfalls hydrolysierten Glasoberfläche der Deckgläser. Die verwendete Methode wurde von der Ebenstein Group (TAU, Tel Aviv, Israel) übernommen und wurde in ähnlicher Form zuvor von Sidorova *et al.* publiziert.^[64] Abbildung 3.17 C zeigt die experimentelle Umsetzung der Methode. Die Streckung der DNA-Einzelmoleküle erfolgt im Kapillarfluss zwischen einem Probenträger und silanisierten Deckglas, neben das ein Teil der Probenlösung (0,5–1,0 µL) aufgebracht wird. Durch Bindung des Phosphatrückgrats der DNA an die positiv geladenen Ammoniumgruppen sowie der Nukleobasen an die hydrophoben Vinylgruppen wird die DNA immobilisiert und kann wie bei ähnlichen Methoden im Anschluss fluoreszenzmikroskopisch untersucht werden.^[67]

Die nachfolgende fluoreszenzmikroskopische Analyse wurde anfänglich mit großer Unterstützung durch Dr. Oleksii Nevskiy (AK Wöll, IPC, RWTH Aachen University) durchgeführt. Die in DNA-MTase katalysierten Übertragungsreaktionen eingebrachten Fluorophore wurden so ausgewählt, dass sie bei der Nutzung entsprechender Laser sowie Bandpass- und Emissionsfilter unabhängig vom unspezifisch gebundenen YOYOTM-1 Interkalator abgebildet werden können (Abb. 3.17 D). Durch die Überlagerung der Aufnahmen der sequenzspezifischen Signale (*Label Kanal*) und des Interkalatorsignals (*DNA Kanal*) in einem sogenannten Kompositbild können die fluoreszierenden Reportergruppen spezifischen Positionen auf DNA-Einzelmolekülen zugeordnet werden (DNA-Barcode). Beispiele dieser Zuordnung sind für Proben mit unterschiedlichen DNA-MTasen, AdoMet-Analoga und Substraten in Abbildung 3.18 gezeigt. Die Vorgehensweise beim optischen DNA-Mappings mittels klassischer fluoreszenzmikroskopischer Methoden unterscheidet sich grundlegend für mit niedriger oder hoher Dichte modifizierte Substrate. Während bei ersteren einzelne Reportermoleküle analysiert werden, ist es im Falle der Modifikationen mit hoher Dichte aufgrund von Limitierungen der Fluoreszenzauflösung erforderlich Intensitätsprofile entlang eines DNA-Einzelmoleküls zu analysieren.^[38,39] Eine umfassende Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen mittels selbst entwickelter automatisierter Auswertungsroutinen erfolgt zusammen mit der Analyse der Aufnahmen des DNA-Blockings (Abschnitt 3.4.5) in Abschnitt 3.6.

3.3.1.2 CF640R-Modifikation und Analyse mittels C-Trap

Zur optischen Analyse von Lambda-DNA, deren Enden zuvor Biotin-modifiziert wurden,^[108] mittels *C-Trap*^[104] in Kombination mit konfokaler sowie supraauflösender STED-Fluoreszenzmikroskopie wurde das Substrat sowohl mit M.BseCI (10 Äq. in Bezug auf 15 5'-ATCGAT-3' Erkennungssequenzen) als auch M.TaqI (1 Äq. in Bezug auf 121 5'-TCGA-3' Erkennungssequenzen) und AdoYnCF640R (**6c**) (40 µM) modifiziert. Im Vergleich zu den bisher in diesem Kapitel diskutierten einstufigen Modifikationsreaktionen wurde eine höhere Konzentration des AdoMet-Analogons verwendet, da es für die Analyse mittels *C-Trap* nicht zwingend erforderlich ist den überschüssigen Cofaktor vollständig zu entfernen. Das Substrat, die Analyse und Auswertung wurde von dem Unternehmen LUMICKS (Amsterdam, NL) bereitgestellt.

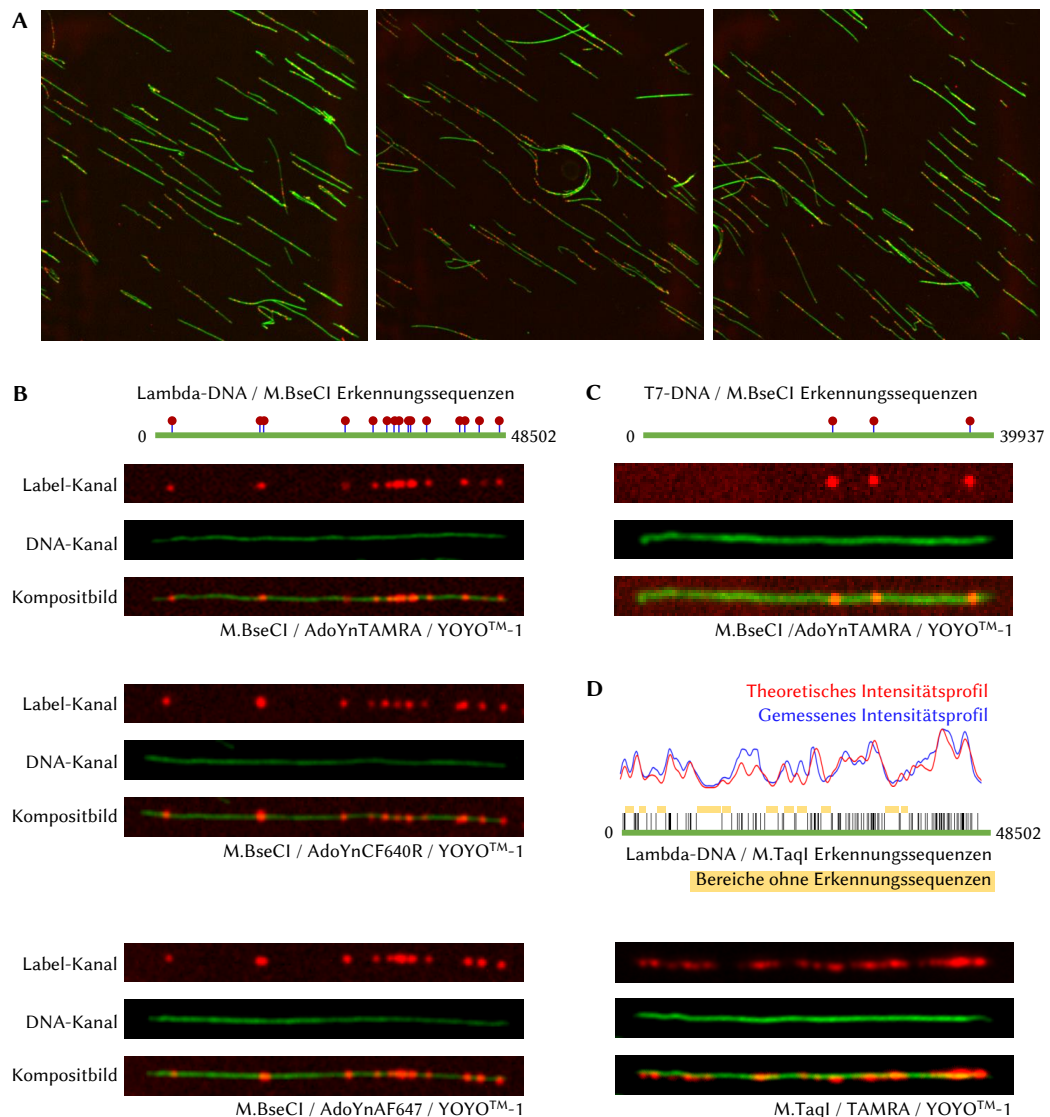


Abbildung 3.18: Übersicht der Fluoreszenzmikroskopie einstufig modifizierter DNA und mittels DNA-Combing gestreckter genomischer DNA. Vollständige Kompositbildausschnitte TAMRA-modifizierter Lambda-DNA (**A**). Die meisten DNA-Einzelmoleküle liegen gestreckt und einheitlich gerichtet vor. Übersicht der Erkennungssequenzen und Ausschnitte von Lambda-DNA Einzelmolekülen aus Modifikationsreaktionen mit M.BseCI (niedrige Dichte) und unterschiedlichen fluoreszierenden AdoMet-Analoga (**B**). Übersicht der Erkennungssequenzen und Ausschnitt eines T7-DNA Einzelmoleküls aus der Modifikationsreaktion mit AdoYnTAMRA (**6b**) und M.BseCI (**C**). Übersicht der Erkennungssequenzen und Ausschnitt eines Lambda-DNA Einzelmoleküls aus der Modifikationsreaktion mit M.TaqI (hohe Dichte) und AdoYnTAMRA (**6b**) sowie der Vergleich des gemessenen und theoretisch berechneten Intensitätsprofils (**D**).

Zur Verifikation der Alkylierung der N^6 -Position des zu modifizierenden Adenins innerhalb der Erkennungssequenzen wurden erneut die kognaten REasen R.TaqI (5'-T↓CGA-3') bzw. R.ClaI (5'-AT↓CGAT-3') verwendet. Die agarosegelelektrophoretische Analyse der Modifikations-Restriktions-Assays zweier Experimente sind in Abbildung 3.19 gezeigt. In den Spuren der Proben mit REase sowie einer der beiden DNA-MTasen und AdoYnCF640R (**6c**) ist nur eine Bande zu erkennen, die der vollständig modifizierten und somit geschützten biotinylierten Lambda-DNA zugeordnet werden kann (Spuren A.6 bzw. B.6). In allen Kontrollen mit REase ohne Cofaktor hingegen, ist die der eingesetzten REase entsprechenden Fragmentierung des Substrats zu beobachten (Spuren A.2/4 bzw. B.2/4). In Spuren mit Proben biotinylierter Lambda-DNA ist nicht wie sonst für das nicht-biotinylierte Substrat üblich Fluoreszenz in den Taschen des Agarosegels zu beobachten. Dies lässt darauf schließen, dass die Hybridisierung der sogenannten *sticky ends* unter den Bedingungen der Agarosegelelektrophorese durch die Biotinylierung unterdrückt wird.

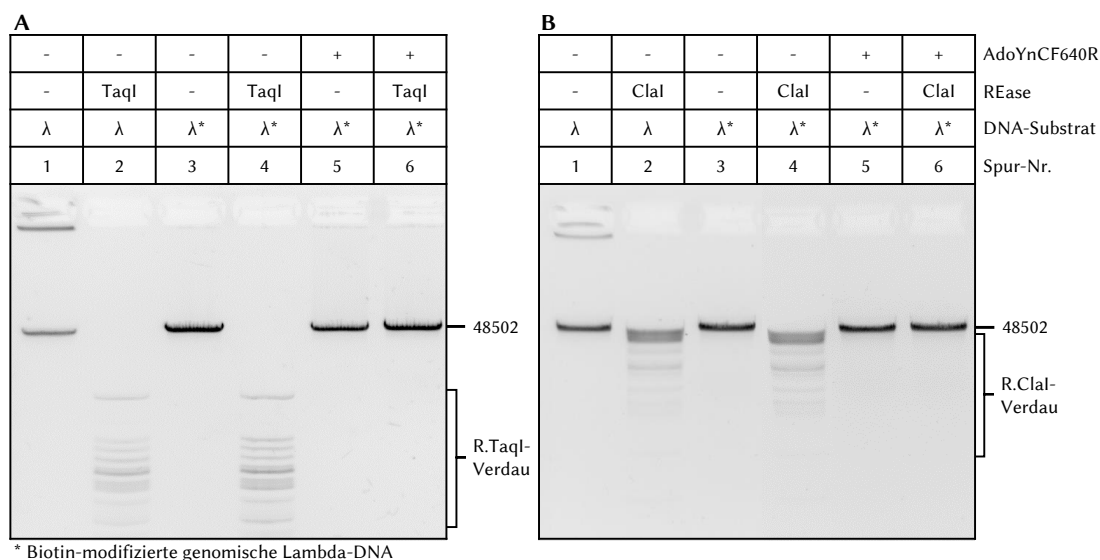


Abbildung 3.19: Gelelektrophoretische Analyse der einstufigen DNA-Modifikation mit AdoYnCF640R (**6c**) und M.TaqI (**A**) bzw. M.BseCI (**B**) zur Anwendung optischen DNA-Mappings mittels *C-Trap*.

Nach erfolgreicher Verifikation der Übertragungsreaktionen folgte die fluoreszenzmikroskopische Analyse der Biotin- und fluoreszenzmodifizierten genomischen DNA. Im Gegensatz zu den eigenen optischen Analysen mittels DNA-Combing, wurde hier der DNA-Interkalator SYBR® Gold genutzt. Dabei handelt es sich um einen asymmetrischen Cyaninfarbstoff mit einem Excitationsmaximum bei 495 nm, dessen Fluoreszenzsignal bei Einlagerung in doppelsträngiger DNA um das 1000-fache ansteigt.^[109] Das Grundprinzip der *C-Trap* ist das einer optischen Pinzette,^[110] welche in Kombination mit konfokaler sowie suprauflösender STED-Fluoreszenzmikroskopie angewendet wird. Eine Lösung sequenzspezifisch fluoreszenzmodifizierter, sowie an den Enden Biotin-modifizierter, Lambda-DNA wird durch eine Fluss-

zelle geleitet. Dort binden die Biotin-Reste des Substrats zwei in der Flusszelle befindliche Streptavidin-beschichtete *beads* über nicht kovalente Wechselwirkungen. Das Ziel dabei ist, dass ein einzelnes DNA-Molekül an beide *beads* bindet und diese somit verbrückt (Abb.3.20 A/B). Im Anschluss können zunächst etwaig vorhandene überschüssige Fluorophore durch das Einleiten einer Waschlösung entfernt werden. Im Folgenden wird Laserstrahlung verwendet, um eine gerichtete Kraft auf einen der beiden *beads* auszuüben und diesen vom anderen (stationären) *bead* weg zu bewegen. Dabei wird der gebundene DNA-Strang zunächst linearisiert und letztlich überstreckt. Während die Intensität des Laserstrahls und somit die ausgeübte Kraft weiter variiert werden kann, erfolgt die fluoreszenzmikroskopische Analyse des DNA-Einzelmoleküls.

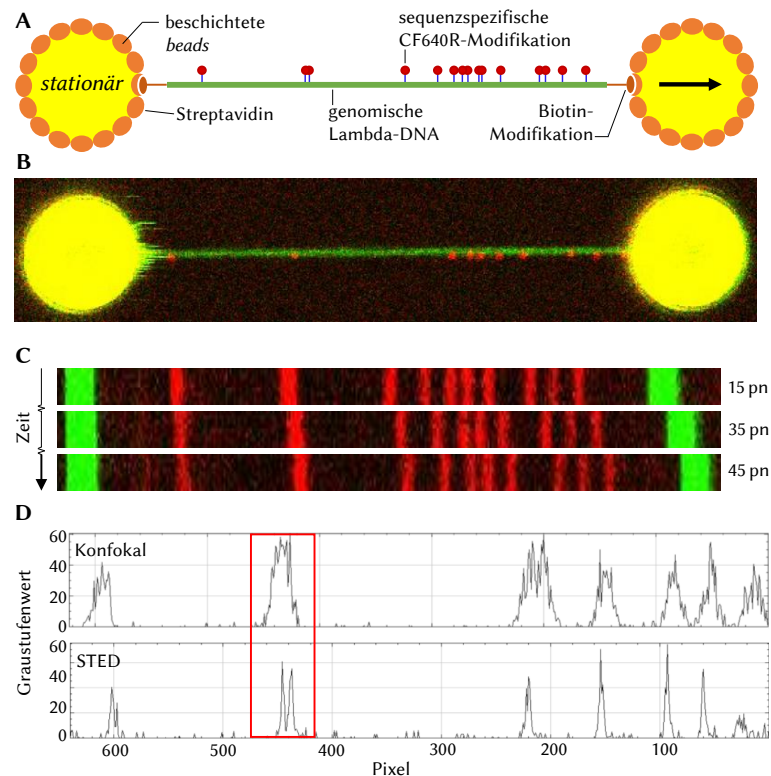


Abbildung 3.20: Übersichtsgrafik zum Funktionsprinzip (A) und Ergebnissen des optischen Mappings mittels *C-Trap* und Fluoreszenzmikroskopie. Kompositaufnahme eines zwischen zwei magnetischen *beads* eingespannten fluoreszenzmodifizierten DNA-Einzelmoleküls (B). Kymografische Darstellung des *Label Kanals* einer Messung, während der die Laserintensität bzw. Kraft der optischen Pinzette variiert wurde (C). Vergleich der eindimensionalen Intensitätsprofile entlang eines mittels *C-Trap* gestreckten DNA-Einzelmoleküls mit und ohne Einsatz der STED-Technik. Einige Signale sind bereits verblasst (D).

Abbildung 3.20 C zeigt eine kymografische Darstellung des *Label Kanals* einer fluoreszenzmikroskopischen Messung mit der *C-Trap*, während der die gerichtete Kraft der optischen Pinzette zwischen 15–45 pN variiert wurde. Es handelt sich um eine zeitliche Aufzeichnung

einer eindimensionalen Fluoreszenzmessung entlang des zu analysieren DNA-Einzelmoleküls, wobei jeder Ausschnitt einer Messung über 10 s entspricht. Zunächst, ohne die Nutzung der optischen Pinzette, sind die Signale der fluoreszierenden Reportermoleküle nicht zu detektieren. Ohne die Wirkung einer Kraft sind noch ausreichend Freiheitsgrade vorhanden, sodass die einzelnen Fluorophore nicht lokalisiert vorliegen (nicht gezeigt). Sobald jedoch eine Kraft mithilfe des Laserstrahl auf den *bead* ausgeübt wird, liegt das DNA-Einzelmolekül überstreckt vor und die Signale sind detektierbar. Es zeigt sich weiterhin, dass der Abstand zwischen den Signalen einzelner sequenzspezifischer Modifikationen bei höherer Laserintensität bzw. Kraft größer wird, während die relativen Positionen unverändert bleiben. Bei der höchsten Kraft (45 pN) beträgt die Gesamtlänge des analysierten DNA-Strangs 16,5 μm und entspricht somit exakt der theoretisch Länge des DNA Moleküls ($48\,502\text{ bp} \times 0,34\text{ nm bp}^{-1} = 16,5\text{ }\mu\text{m}$). Des Weiteren wurden erste Versuche mit der supraauflösenden STED-Technik durchgeführt (Abb. 3.20 D). Auch wenn etliche sequenzspezifische Signale des analysierten DNA-Moleküls fehlen, zeigt sich im rot markierten Bereich, dass zuvor nicht differenzierbare Signale durch den Einsatz der STED-Technik einzeln aufgelöst werden können. Der Abstand dieser beiden modifizierten Adenine beträgt 537 bp bzw. 182 nm. Dies verdeutlicht die Umgehung des durch Ernst Abbe formulierten Limits klassischer lichtmikroskopischer Methoden.

3.3.2 DNA-Modifikation mit sterisch anspruchsvollen Gruppen

Die aus den Modifikationsreaktionen mit sterischen AdoMet-Analoga erhaltenen Proben wurden in Kooperation mit der Keyser Group (Cavendish Laboratories, Cambridge, UK) elektrisch mittels Festkörpernanoporen analysiert. Die verwendeten Nanoporen bestehen aus maschinell hergestellten Glaskapillaren, deren Durchmesser bis auf wenige Nanometer runter reicht.^[111] Die Durchführung der elektrischen Analyse sowie die anschließende Auswertung wurde von Dr. Kaikai Chen durchgeführt. Die elektrische Detektion von sterisch anspruchsvollen Gruppen auf DNA-Einzelmolekülen erfolgt während sogenannten Translokationsevents, deren Grundprinzip in Abbildung 3.21 gezeigt ist.

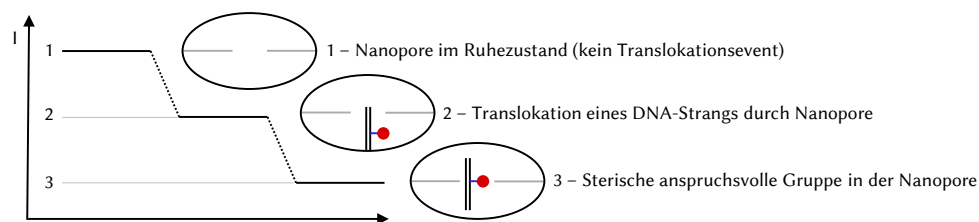


Abbildung 3.21: Schematische Darstellung der Translokation eines mit sterischen Gruppen modifizierten DNA-Strangs durch eine Nanopore sowie resultierende Stromstärke I .

Während der Translokation wandern DNA-Einzelmoleküle durch eine Nanopore, nachdem eine elektrische Spannung angelegt wurde. Im Ruhezustand wird bei der eingestellten Spannung zunächst ein Ionenstrom gemessen (1), der auf die elektrische Leitfähigkeit der Elektrolytlösung zurückzuführen ist. Sobald sich ein DNA-Einzelmolekül in der Nanopore befindet (2), sinkt

der gemessene Strom aufgrund der geringeren Ladungsträgerkonzentration innerhalb der Nanopore. Im Falle, dass sich neben dem DNA-Doppelstrang zusätzlich ein sterisch anspruchsvolles Reportermolekül in der Nanopore befindet (3), sinkt der gemessene Strom entsprechend weiter ab. Auf Grundlage der unterschiedlichen Ionenströme lassen sich zunächst Start- und Endzeitpunkt der Translokation bestimmen. Unter der Voraussetzung, dass die Wanderungsgeschwindigkeit während eines Translokationsevents annähernd konstant ist, können auch die relativen Positionen einzelner Modifikationen bestimmt werden.

3.3.2.1 Biotin-Modifikation zur Analyse mittels Festkörpernanoporen^[55]

Die agarosegelelektrophoretische Analyse einer einstufigen Modifikations-/Restriktionsreaktion mit M.TaqI (1 Äq., 5'-TCGA-3', M13mp18: 12; Φ X174: 10; pBR322: 7 Erkennungssequenzen), AdoYnBiotinII (15, 80 μ M, Abb. 3.23 A) sowie unterschiedlicher Plasmid-DNA sind in Abbildung 3.22 gezeigt. Das eingesetzte AdoMet-Analogon kann zur Übertragung eines Biotin-Restes verwendet werden. Das Bandenmuster sämtlicher Spuren mit AdoMet-Analogon und in Bezug auf die verwendete DNA-MTase kognate REase R.TaqI (5'-T↓CGA-3', Spuren 3, 5 und 6) gleichen denen des jeweiligen Substrates ohne REase (Spuren 2, 4 und 7). Es ist jeweils eine Bande für die superspiralisierte (engl. *supercoiled*) und entwundene Form (mit Einzelstrangbruch, engl. *nicked*) des Substrats zu beobachten. Die Intaktheit der Plasmid-DNA zeigt, dass die Biotin-Modifikation quantitativ erfolgte. Eine Besonderheit beim pBR322-Substrat liegt in einer Verschiebung der Intensität hin zur Bande der nicked Konformation bei der Probe mit AdoMet-Analogon und REase. Dies deutet darauf hin, dass die Zugabe von R.TaqI zur Hydrolyse einzelner Stränge des Substrats führte. Eine genaue Zuordnung zu einer der Erkennungssequenzen ist anhand dieses Experimentes nicht möglich. Eine Kontrolle mit der REase aber ohne AdoMet-Analogon weist das spezifische Bandenmuster der vollständigen Fragmentierung des Substrats auf (Spur 8). Neben den zu erwartenden Fragmenten ist eine zusätzliche Bande zu erkennen, die durch teilweisen Schutz einer mit einem Dam-Motiv überlappenden Erkennungssequenz (5'-TCGATC-3') hervorgerufen wird.

Biotinylierte DNA ist in der Lage Streptavidin über nicht-kovalente Wechselwirkungen zu binden. Diese Bindung kann genutzt werden, um die sequenzspezifische Biotin-Modifikation um sterisch deutlich anspruchsvolleres monovalentes Streptavidin zu erweitern. Da auf die kovalente DNA-Modifikation noch die nicht-kovalente Bindung eines Proteins folgt, kann diese Methodik auch als zweistufige oder nur pseudo-einstufige DNA-Modifikation verstanden werden. Im Vergleich zu zweistufigen Modifikationsreaktionen nach der mTAG-Methode fehlt jedoch die zweite kovalente Reaktionsstufe. Die mit M.TaqI und AdoYnBiotinII (15, Abb. 3.23 A) modifizierten Substrate wurden anschließend, nachdem die quantitative Alkylierung erfolgreich verifiziert wurde, durch Dr. Kaikai Chen (Cavendish Laboratories, Cambridge, UK) weiter aufbereitet. Zunächst wurde die aus den Modifikationsreaktionen erhaltene DNA linearisiert (M13mp18: R.MscI; Φ X174: R.BaeI; pBR322: R.AhdI) sowie mittels *QIAquick PCR purification* Kit (QIAGEN, Hilden) aufgereinigt und verdünnt (0,2 nM–2,0 nM, 4 M LiCl, TE-Puffer, pH 8,0). Daraufhin folgte die elektrische Analyse der Proben mittels Festkörpernanoporen ($d = 14$ nm), deren Durchführung in Abbildung 3.23 B schematisch dargestellt ist.^[55] Das dabei erhaltene

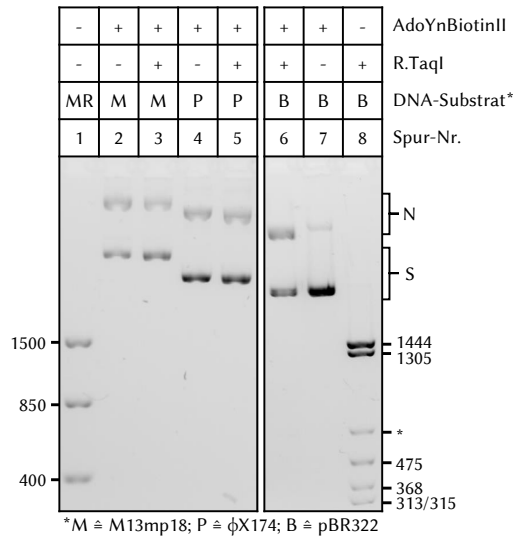


Abbildung 3.22: Gelelektrophoretische Analyse der einstufigen DNA-Modifikation mit M.TaqI und AdoYnBiotinII (15) zum elektrischen DNA-Mapping mittels Festkörpernanoporen.

elektrische Profil (DNA-Barcode, Abb. 3.23 C) wurde zum Mapping der einzelnen Modifikationen bzw. Erkennungssequenzen genutzt.

Die elektrischen Profile, die aus den Nanoporexperimenten erhalten wurden, konnten anschließend zum DNA-Mapping genutzt werden.^[55] Dabei wurden die Minima der elektrischen Profile einzelner Translokationsevents spezifischen Biotin-Modifikationen bzw. DNA-MTase-Erkennungssequenzen zugeordnet. Dabei konnte ein Auflösungslimit von ca. 200 bp (68 nm) definiert werden, welches damit deutlich unter dem des optischen DNA-Mappings mittels klassischer Fluoreszenzmikroskopie und den Ergebnissen der C-Trap unter Verwendung der STED-Technik liegt. Im folgenden sind die weiteren Ergebnisse des elektrischen DNA-Mappings mittels kanonischer Festkörpernanoporen zusammengefasst. 50 % der analysierten pBR322-Einzel-moleküle wiesen die dem Auflösungs-limit entsprechende Anzahl an Ionenstromminima auf. Weiterhin konnten zehn der insgesamt zwölf M.TaqI-Erkennungssequenzen des M13mp18-Plasmids eindeutig zugeordnet werden (83 %). Es war für alle drei der verwendeten Substrate möglich die Orientierung der DNA-Einzel-moleküle während einzelner Translokationsevents zu identifizieren. Über den Zeitraum, sowohl eines einzelnen Events als auch der gesamten Messung, konnte keine signifikante Veränderung der Translokationsgeschwindigkeit festgestellt werden. Auch die Biotin-Streptavidin-Modifikationen hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Translokationsgeschwindigkeit. In einer weiteren Messung wurde die Eignung der verwendeten Methode in Hinblick auf eine Anwendung zur Genotypisierung veranschaulicht. Dazu wurde eine Mischung der modifizierten Proben genutzt und die DNA-Einzel-moleküle den entsprechenden Substraten zugeordnet.

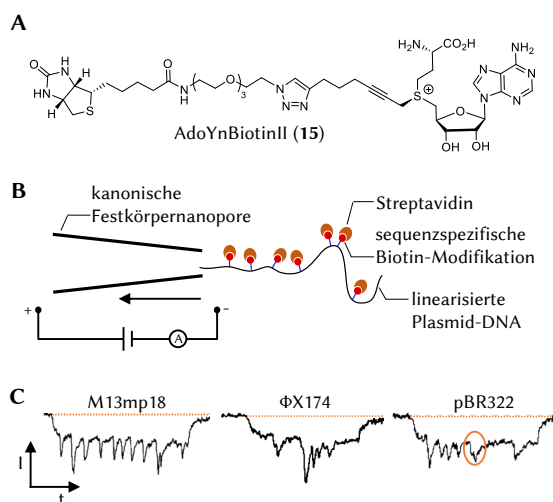


Abbildung 3.23: Übersichtsgrafik zur Funktionsweise und Ergebnissen des elektrischen Mapings von Biotin-Streptavidin-Modifikationen mittels Festkörpernanoporen. Struktur von AdoYn-BiotinII (**15**, **A**) und Versuchsaufbau (**B**). Elektrische Profile unterschiedlicher DNA-Substrate. Die Minima des gemessenen Ionenstroms können spezifischen Biotin-Modifikationen bzw. DNA-MTase-Erkennungssequenzen zugeordnet werden (**C**). Der Porendurchmesser der verwendeten Glasnanopore betrug 15 nm.

3.3.2.2 ODN-Modifikation zur Analyse mittels Festkörpernanoporen

Die agarosegelelektrophoretische Analyse einer weiteren einstufigen Modifikationsreaktion mit M.TaqI (10 Äq., 5'-TCGA-3', 7 Erkennungssequenzen) und dem AdoMet-Analogen AdoYn-ODN11 (**14a**, 10 μ M) sowie pBR322-Plasmid-DNA ist in Abbildung 3.24 gezeigt. Das eingesetzte AdoMet-Analogen kann zur sequenzspezifischen Übertragung eines Oligonukleotids und somit sterisch anspruchsvollem Rest verwendet werden. Grundsätzlich weist dieser Ansatz gegenüber der bereits diskutierten Biotin-Streptavidin-Modifikation mehrere Vorteile auf. Zum einen handelt es sich um eine vollständig kovalente und somit stabilere Modifikation. Zum Anderen ist es möglich, den sterischen Anspruch über die Länge des zu übertragenden ODNs einzustellen. Dadurch kann die Modifikation den Anforderungen einer größeren Bandbreite an Methoden zum elektrischen DNA-Mapping entsprochen werden. Das Bandenmuster der Spuren mit AdoYnODN11 und R.TaqI (5'-T↓CGA-3') ohne weitere REase (A.4 und B.7), gleichen den entsprechenden Spuren ohne REase (A.3 und B.5), wobei der bereits bei den Experimenten mit AdoYnBiotinII beobachtete Effekt der Intensitätsverschiebung hin zur *nicked*-Bande hier wesentlich stärker ausgeprägt ist. Um sicherzustellen, dass die beobachtete Bande tatsächlich der *nicked* und nicht der linearisierten Form zuzuordnen ist, wurden weitere Kontrollen unter Verwendung der REase R.NdeI (5'-CA↓TATG-3', 1 Erkennungssequenz) durchgeführt. Dadurch konnte bestätigt werden dass es sich bei der Hauptbande der Spuren A.4 und B.7 tatsächlich um die *nicked*-Konformation handelt, da sich die Spuren nur mit NdeI (B.6) sowie R.NdeI und R.TaqI (B.8) nicht unterscheiden. Hätte es sich um die linearisierte Form gehandelt, müsste die

Kombination der beiden REasen in einem veränderten Bandenmuster resultieren. Die Tatsache, dass ein großer Teil des Plasmids durch die Verwendung der REase in die *nicked*-Form überführt wird, wurde für pBR322 auch schon in vorherigen Experimenten mit anderen AdoMet-Analoga beobachtet. Die hemimethylierte Sequenz sollte genauso gut modifiziert werden. Wenn nicht, sollte R.TaqI beide Stränge schneiden. Warum *nicking* mit R.TaqI erfolgt, ist unklar und müsste daher gesondert untersucht werden. Nichtsdestotrotz zeigt die Intaktheit der Plasmid-DNA aller Spuren mit dem AdoMet-Analogon, dass die ODN-Modifikation quantitativ erfolgte.

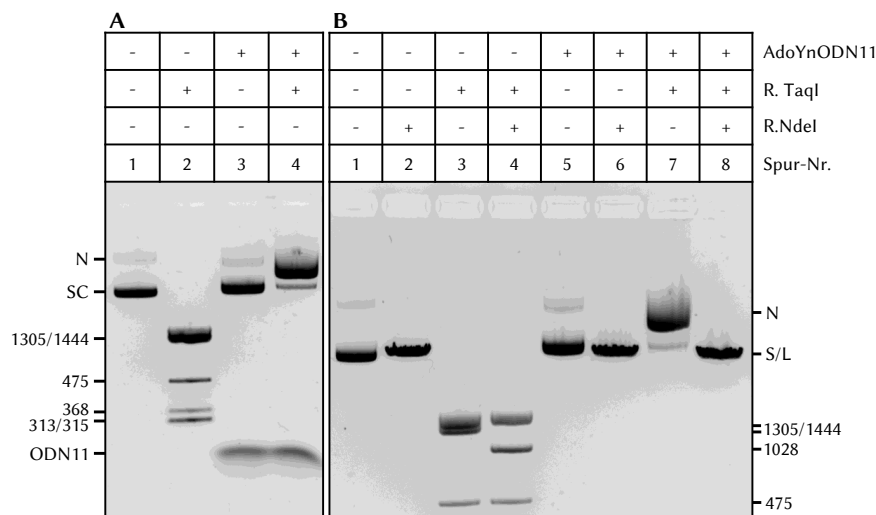


Abbildung 3.24: Gelelektrophoretische Analyse der einstufigen DNA-Modifikation mit M.TaqI und AdoYnODN11 (**14a**) zum elektrischen DNA-Mapping mittels Festkörpernanoporen.

Auch die mit M.TaqI und AdoYnODN11 (**14a**) modifizierten Substrate wurden anschließend, nachdem die quantitative Alkylierung verifiziert wurde, wie bereits beschrieben (Abs. 3.3.2.1) durch Dr. Kaikai Chen (Cavendish Laboratories, Cambridge, UK) aufbereitet. Daraufhin hat er die elektrische Analyse mittels Festkörpernanoporen, deren Durchführung in Abbildung 3.25 A schematisch dargestellt ist, vorgenommen. Das dabei erhaltene elektrische Profil (DNA-Barcode, Abb. 3.25 B) kann erneut zum Mapping der einzelnen Modifikationen bzw. Erkennungssequenzen genutzt werden. Im Folgenden sind einige der vorläufigen Ergebnisse zusammengefasst. Im Vergleich zu den Biotin-Streptavidin modifizierten Substraten zeichnet sich die ODN-Modifikation durch einen deutlich geringeren sterischen Anspruch aus. Dies zeigt ebenfalls bei einem Vergleich der beiden elektrischen Profile. Während der gemessene Ionenstrom im Moment der Translokation einer Biotin-Streptavidin-Modifikation noch sehr deutlich abfällt, ist der Unterschied zum Grundniveau beim ODN-Ansatz viel geringer. Dadurch war es vereinzelt möglich sämtliche Modifikationen bzw. Erkennungssequenzen aufzulösen. Dies umfasst auch die beiden benachbarten Modifikationen mit einem Abstand von nur 141 bp (orange Markierung). Im Vergleich zu den bereits publizierten Ergebnissen der Biotin-Streptavidin-Modifikation kamen auch Nanoporen mit bis auf wenige Nanometer verringertem Durchmesser zum Einsatz. Im allgemeinen sollte die Methode jedoch weiter optimiert werden um die ideale Kombination

aus Porendurchmesser und ODN-Länge zu ermitteln. Auch sollte die generelle Methodik dahingehend verbessert werden sodass die Analyse von deutlich längeren Substraten ermöglicht wird.

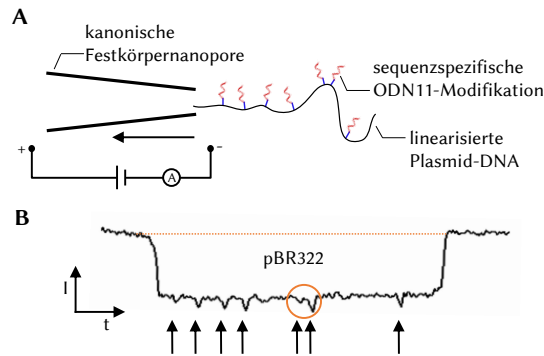


Abbildung 3.25: Übersichtsgrafik zur Funktionsweise und Ergebnissen des elektrischen Mapings von ODN11-Modifikationen mittels kanonischer Festkörperringnanoporen. Versuchsaufbau (A) und elektrisches Profil eines mit M.TaqI und AdoYnODN11 (14a) modifizierten linearen pBR322-Einzelmoleküls (B). Die Minima des gemessenen Ionenstroms können spezifischen ODN-Modifikationen bzw. DNA-MTase-Erkennungssequenzen zugeordnet werden. Der Porendurchmesser der verwendeten Glasnanopore betrug 5 nm.

3.4 DNA-Modifikation mittels DNA-Blocking

In den nachfolgenden Abschnitten werden spezielle von DNA-MTasen katalysierte DNA-Modifikationen behandelt, die dem Bereich des DNA-Blockings zuzuordnen sind. Wie auch bei den bereits diskutierten DNA-Modifikation des vorherigen Abschnitts 3.3, ist das Ziel Reportermoleküle von doppeltaktivierten AdoMet-Analoga sequenz-, basen- und regiospezifisch auf doppelsträngige DNA zu übertragen. Im Gegensatz zu den vorherigen DNA-Modifikation werden jedoch nicht alle, sondern nur ein spezifischer Teil der DNA-MTase-Erkennungssequenzen adressiert. Dadurch wird die Modifikationsdichte verringert und diese so den Anforderungen spezifischer Anwendungen bzw. Analysemethoden angepasst.

Als Beispiel kann hier die Modifikationsdichte bei einstufigen DNA-Modifikationen des menschlichen Genoms, insbesondere in Bezug auf die Analyse mittels klassischer Fluoreszenzmikroskopie, genannt werden. Um den Informationsgehalt sequenzspezifisch fluoreszenzmodifizierter DNA leicht ablesen zu können, sollte die Modifikationsdichte idealerweise an das allgemeine Auflösungslimit (ABBE-Limit) angepasst werden. Aufgrund der natürlichen Unterrepräsentation und dem gruppierten Vorkommen des 5'-CG-3'-Motivs in CpG-islands,^[31] eignet sich die DNA-MTase M.BseCI (5'-ATCGAT-3'), welche bei den einstufigen DNA-Modifikationen des vorherigen Abschnitts verwendet wurde, daher nur bedingt zur Markierung menschlicher DNA in Hinblick auf Anwendungen im Bereich des optischen DNA-Mappings. Weiterhin kann es nützlich sein auf eine große Auswahl an unterschiedlichen Sequenzspezifitäten zurückgreifen

zu können, um spezifische Anwendungsbeispiele abzudecken. Ein Beispiel dafür ist die Aufklärung der Erbkrankheit FSHD mittels der DNA-MTase M.TaqI. Da die Erkennungssequenz innerhalb einer spezifischen Wiederholungseinheit (D4Z4-Lokus) vorliegt, dessen Kopienzahl im direkten Zusammenhang mit der phänotypischen Ausprägung steht, kann die DNA-MTase in Kombination mit klassischer Fluoreszenzmikroskopie zur Aufklärung der Erbkrankheit genutzt werden.^[16] Beide Beispiele zeigen, dass es nützlich sein kann, eine Auswahl verschiedener Spezifitäten zur Verfügung zu haben, um einer möglichst großen Zahl an potentiellen Anwendungen bzw. Analysemethoden entsprechen zu können.

Beim DNA-Blocking wird im ersten Schritt zunächst nur ein spezifischer Teil der DNA-MTase-Erkennungssequenzen methyliert. Dabei werden sogenannte Blocking-REasen als spezifische DNA-Binder verwendet, deren eigene Erkennungssequenz mit der DNA-MTase-Erkennungssequenz überlappt. Blocking-REasen können prinzipiell als transiente DNA-Schutzgruppe verstanden werden. Die Aktivität der Blocking-REasen in Bezug auf die natürlich katalysierte Hydrolyse doppelsträngiger DNA wird während des Blockings gehemmt, indem die Magnesiumionen im Reaktionspuffer durch zweiwertige Calciumionen ersetzt werden. Dadurch bleibt die Bindungsspezifität einer Vielzahl an REasen erhalten, wohingegen die Hydrolyseaktivität vollständig inhibiert ist.^[112,113] Dieses Phänomen wurde bereits vielfach genutzt um Kristallstrukturen verschiedener REase-DNA-Komplexe zu erhalten.^[114]

3.4.1 Grundlagen des DNA-Blockings

Das grundlegende Konzept des Blockings soll nun anhand eines konkreten Beispiels erläutert werden. Die Spezifität der Methylierungsreaktion der DNA-MTase M.TaqI^[96,97] (5'-TCGA-3') kann durch den Einsatz der Blocking-REase R.Hpy188III^[102] (5'-TC↓NNGA-3') erhöht werden. Grundvoraussetzung ist, dass die Erkennungssequenzen der DNA-MTase und Blocking-REase teilweise überlappen (Abb. 3.26 A). Aufgrund der spezifische Bindung des DNA-Substrats durch die Blocking-REase, sind nur noch die DNA-MTase-Erkennungssequenzen zugänglich und somit für die Methylierungsreaktion verfügbar, die *nicht* mit denen der REase überlappen. Im konkreten Beispiel sind das genau die 5'-TCGA-3'-Motive denen kein 5'-TC-3' vorangestellt ist bzw. kein 5'-GA-3' folgt (primäre Blocking-Sequenzen). In früheren Experimenten konnte gezeigt werden, dass zusätzlich die Methylierung der DNA-MTase-Erkennungssequenzen blockiert ist, die bis zu fünf Basenpaare von einer Erkennungssequenz der Blocking-REase entfernt liegen (sekundäre Blocking-Sequenzen).^[54] Dies liegt daran, dass die Abschirmung durch die REase nicht auf die gebundene Erkennungssequenz beschränkt ist, sondern aufgrund des hohen sterischen Anspruchs des Enzyms, über diese hinaus reicht. Im ersten Schritt werden nun DNA-MTase-Erkennungssequenzen, die keiner Blocking-Sequenz (primär oder sekundär) entsprechen, methyliert (3.26 B). Nach Inaktivierung der Blocking-REase und Aufreinigung des DNA-Substrats, sind die nicht-methylierten Blocking-Sequenzen für weitere (einstufige) DNA-Modifikationen verfügbar. Zusätzlich zur Inaktivierung der Blocking-REase mittels Protease oder Hitze, muss der natürliche Cofaktor AdoMet (1) dabei quantitativ entfernt werden. Im Beispiel folgt die Modifikation der verbleibenden DNA-MTase-Erkennungssequenzen mit

einem doppeltaktivierten AdoMet-Analogon zur direkten Übertragung einer Reportergruppe und anschließender Analyse im Kontext des Mappings genomischer DNA.

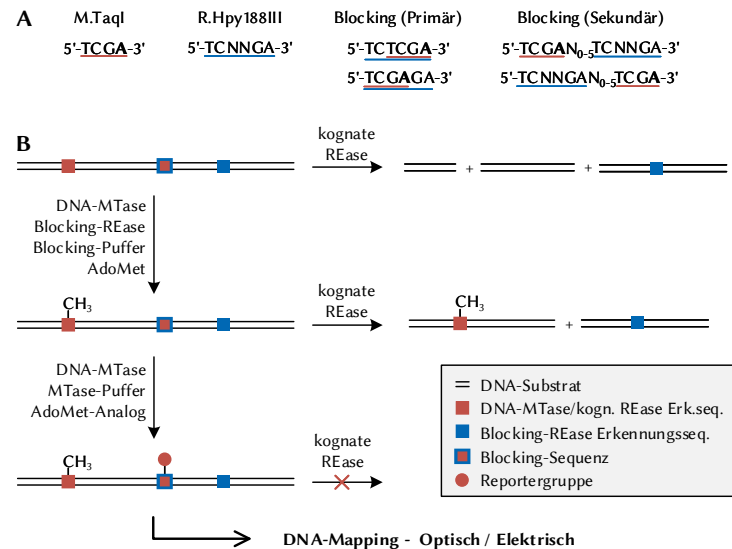


Abbildung 3.26: Schematische Darstellung zu DNA-Blocking und Blocking-Sequenzen. Primäre und sekundäre Blocking-Sequenzen am Beispiel der DNA-MTase M.TaqI und der Blocking-REase R.Hpy188III (A). Konzept des DNA-Blockings zur Veränderung der Spezifität von DNA-MTasen-katalysierten sequenzspezifischen Übertragung von Reportergruppen doppeltaktivierter AdoMet-Analoga (B).

Die Verifikation der Modifikationsreaktionen eines DNA-Blocking-Ansatzes erfolgt analog zu den einstufigen DNA-Modifikationen mittels Agarosegelelektrophorese. Erneut werden dabei in Bezug auf die DNA-MTase kognate REasen eingesetzt. Im Gegensatz zu den einstufigen DNA-Modifikationen erfolgt die Analyse jedoch mehrstufig. Nach eingeschränkter Methylierung des ersten Schrittes, kann die Hydrolyse durch die REase ausschließlich an den zuvor durch die Blocking-REase abgeschirmten Sequenzen erfolgen. Daraus resultiert ein spezifisches Bandenmuster, dessen Banden sogenannten Blocking-Fragmenten zugeordnet werden können. Jedes Blocking-Fragment wird dabei entweder von zwei benachbarten Blocking-Sequenzen (primär und sekundär) oder einer Blocking-Sequenz und einem benachbarten Ende des DNA-Doppelstrangs definiert. Nach der im zweiten Schritt erfolgten einstufigen Modifikation der verbleibenden, im ersten Schritt blockierten, DNA-MTase-Erkennungssequenzen mittels DNA-MTase und doppeltaktiviertem AdoMet-Analogon, ist das Substrat vollständig vor der Hydrolyse durch die kognate REase geschützt. Dies entspricht einer einzelnen Bande, die bei der gelelektrophoretische Analyse beobachtet wird.

3.4.2 Voruntersuchungen mit Restriktionsendonukleasen

Um als Blocking-REase eingesetzt werden zu können, ist es unabdingbar, dass die enzymatische Aktivität der REase vollständig inhibiert wird. Zu Beginn erfolgten deshalb zunächst einige

Voruntersuchungen. Dazu wurden verschiedene REasen sowohl im eigentlichen Reaktionspuffer, als auch im Blocking-Puffer mit pUC19 Plasmid-DNA umgesetzt (10-facher Überverdau). Die eingesetzten REasen weisen dabei zwischen ein und 13 Erkennungssequenzen auf. Der verwendete Blocking-Puffer enthält im Vergleich zu den unterschiedlichen Reaktionspuffern kein Magnesium(II) (10 μ M), sondern Calcium(II) (1 μ M). Die restliche Zusammensetzung des Blocking-Puffers ist an den REase-Universalreaktionspuffer NEB4 (New England Biolabs, Ipswich, USA) angelehnt. Die jeweiligen Ansätze mit Reaktions- bzw. Blocking-Puffer wurden agarosegelelektrophoretisch untersucht.

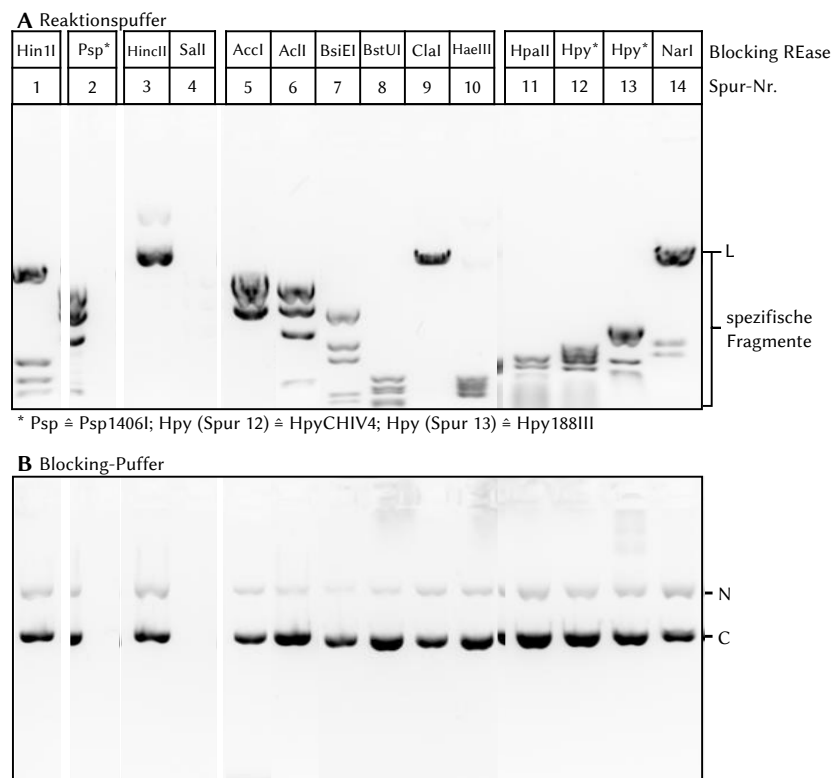


Abbildung 3.27: Gelelektrophoretische Analyse der Voruntersuchungen hinsichtlich der Verwendung von Restriktionsendonukleasen in Blocking-Puffer. Ansätze der verschiedenen REasen mit Reaktionspuffer (**A**) und Blocking-Puffer (**B**). Die einzelnen Blöcke entsprechen den eingesetzten Reaktionspuffern Buffer G, Buffer R, NEBuffer 3.1 und CutSmart (v.l.n.r.).

Während die Banden bei Verwendung des jeweiligen Reaktionspuffers in allen Ansätzen der enzymespezifischen Fragmentierung zugeordnet werden können (Abb. 3.27 A, Spuren 1-14), ist bei Verwendung des Blocking-Puffers keine Reaktion zu beobachten (3.27 B, Spuren 1-14). Die Fragmentierung im Reaktionspuffer reicht von Linearisierung (R.Sall, R.ClaI, R.NarI) bis hin zur Entstehung von insgesamt 13 Fragmenten (R.Hpy188III). Bei den Ansätzen mit Blocking-Puffer sind hingegen ausschließlich die Banden der superspiralisierten (C) und der *nicked* Form (N) zu beobachten. In keinem Fall hingegen ist eine Bande auszumachen, die der linearisierten

Form zugeordnet werden kann. Zusätzlich ist das Verhältnis zwischen superspiralisierter und *nicked* DNA bei allen Ansätzen ähnlich. Dies zeigt zum einen, dass die spezifische Hydrolyse durch den Austausch des Metallions quantitativ unterdrückt wurde. Zum anderen zeigt das Experiment, dass die Lagerpuffer der kommerziell erworbenen REasen, wie von den Herstellern angegeben, keine signifikanten Mengen an Magnesiumionen enthalten bzw. die REasen keinen Cofaktor gebunden hatten.

3.4.3 Voruntersuchungen mit DNA-MTasen

Im weiteren Verlauf wurde die Aktivität der DNA-MTasen M.TaqI und M.CviBIII^[115] unter Blocking-Bedingungen getestet. Dabei kam das selbe Prinzip wie bei den Aktivitätstests der doppeltaktivierten AdoMet-Analoga in Abschnitt 3.2 zum Einsatz (Verdünnungsreihe). Die sogenannten Blocking-Bedingungen umfassen einerseits die Verwendung des im vorherigen Abschnitt beschriebenen Blocking-Puffers. Andererseits wurde die Konzentration des natürlichen Cofaktors AdoMet (**1**, 10 μM) verringert, um dessen Entfernung bei der Aufreinigung des Substrats zu erleichtern. Auch die Konzentration des DNA-Substrats (20 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$) wurde verringert, um höhere Verhältnisse von Blocking-REase zu Substrat zu ermöglichen und gleichzeitig die Verschleppung von Glycerol zu minimieren. Zuletzt wurde die Reaktionstemperatur der DNA-MTase M.TaqI von ursprünglich 65 °C auf 37 °C reduziert. Dies diente dazu, die Stabilität des Komplexes aus Blocking-REase und DNA zu erhöhen. Dadurch soll sichergestellt werden, dass die Methylierung der Blocking-Sequenzen über die gesamte Reaktionszeit hinweg blockiert wird. Im Folgenden wurde die in Bezug auf beide DNA-MTasen kognate REase R.TaqI verwendet um anzuzeigen, bei welcher DNA-MTase-Konzentration die Methylierung nicht mehr quantitativ erfolgen konnte.

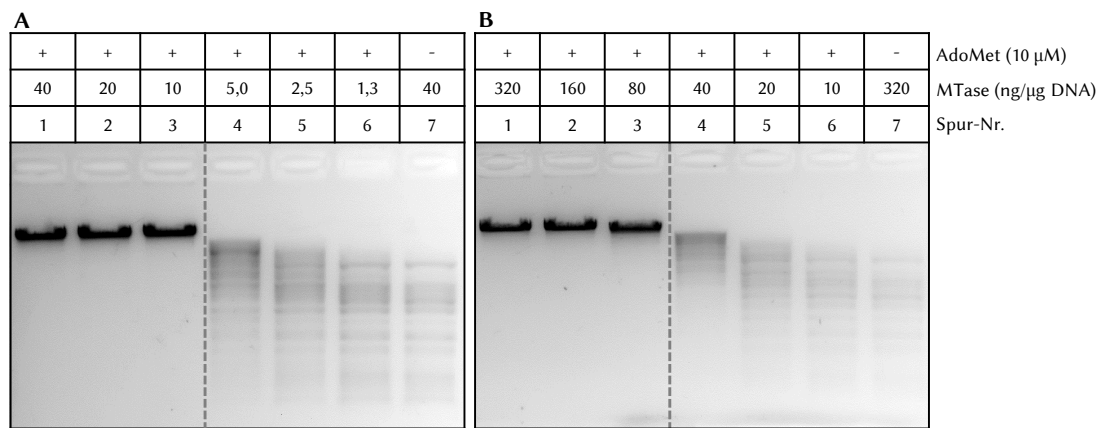


Abbildung 3.28: Gelelektrophoretische Analyse der Voruntersuchungen zur Verwendung von DNA-MTasen unter Blocking-Bedingungen. Aktivitätstests von M.TaqI mit einer Grenzkonzentration von 10 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ (**A**) und M.CviBIII mit 80 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ (**B**).

Beide DNA-MTasen zeigen Aktivität unter den bereits beschriebenen Blocking-Bedingungen (1 h, 37 °C, 20 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ DNA, 10 μM AdoMet und Blocking-Puffer mit 1 μM Ca^{2+}). Für M.TaqI

ergibt sich eine Grenzkonzentration von $10 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ (Spur A.3, entspricht $1/16 \text{ } \ddot{\text{A}}\text{q.}$), unterhalb derer das DNA-Substrat nach Ablauf der Reaktionszeit noch fragmentiert wird. Für M.CviBIII ergibt sich hingegen eine Grenzkonzentration von $80 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ (Spur B.3, entspricht $0,5 \text{ } \ddot{\text{A}}\text{q.}$). Die Spuren ohne AdoMet weisen das spezifische Fragmentmuster von R.TaqI auf. Bei einem Vergleich der unter Blocking-Bedingungen erhaltenen Konzentrationen mit denen aus Abschnitt 3.2 als auch denen aus früheren Arbeiten zeigt sich, dass die Aktivität der DNA-MTasen jedoch reduziert ist.

3.4.4 Anwendung von DNA-Blocking mit Plasmid-DNA

Um die Eignung verschiedener REasen als Blocking-REase weiter zu untersuchen, wurden verschiedene Ansätze mit Plasmid-DNA durchgeführt. Die im Folgenden diskutierten Experimente dienen in erster Linie der Veranschaulichung des Konzepts des DNA-Blockings. Es wurden die beiden DNA-MTasen M.TaqI und M.CviBIII, die potentiellen Blocking-REasen R.AccI^[116] (5'-GTMKAC-3'), R.HincII^[117] (5'-GTYRAC-3') und R.Hpy188III^[102] (5'-TCNNGA-3') sowie die Plasmide pBR322 und pUC19 verwendet. Die Blocking-Sequenzen bzw. Plasmidkarten der jeweiligen Kombination aus DNA-MTase, Blocking-REase und Substrat sind in Abbildung 3.29 gezeigt. Drei der Blocking-Sequenzen setzten sich aus überlappenden Erkennungssequenzen von DNA-MTase und Blocking-REase zusammen (Primär, R.HincII-pUC19/pBR322, und AccI-pBR322). Bei einem Ansatz handelt es sich hingegen um eine sekundäre Blocking-Sequenz, also benachbarte Erkennungssequenzen (pUC19-R.Hpy188III). Zwar unterscheidet sich die Erkennungssequenz der beiden REasen R.HincII und R.AccI, jedoch sind die primären Blocking-Sequenzen in Kombination mit den verwendeten DNA-MTasen grundsätzlich identisch (5'-GTCGAC-3').

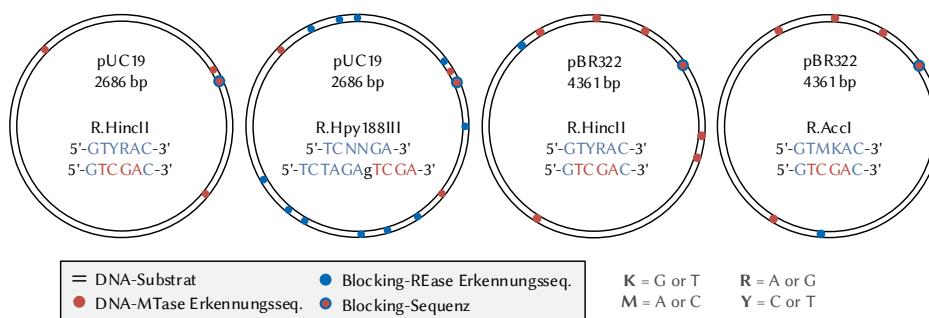


Abbildung 3.29: Plasmidkarten zu den Blocking-Experimenten mit pUC19- und pBR322-DNA. Gezeigt sind die Erkennungssequenzen der Blocking-REase (blau) bzw. DNA-MTase (rot) und den daraus resultierenden Blocking-Sequenzen.

Nach der Methylierungsreaktion wurde erneut die kognate REase R.TaqI eingesetzt. Diesmal jedoch zur Hydrolyse von ausschließlich der Erkennungssequenz, deren Methylierung durch eine der Blocking-REase unterdrückt wurde. Die Auswertung der Experimente erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese. Die Inaktivierung der Enzyme in den Ansätzen mit M.CviBIII erfolgte mittels Hitzeinaktivierung, für die Ansätze mit M.TaqI mittels Proteinase K. In beiden

Fällen folgte eine Aufreinigung mittels *QIAquick PCR Purification Kit* (QIAGEN, Hilden). Die Methylierung der zuvor geblockten Erkennungssequenzen nach Ablauf der Reaktionszeit konnte so jeweils unterbunden werden. Von einer anschließenden Modifikation der geblockten Erkennungssequenz wurde bei diesen Experimenten abgesehen. Daher war es auch nicht nötig die DNA-Substrate nach der Methylierung aufzureinigen bzw. den natürlichen Cofaktor zu entfernen.

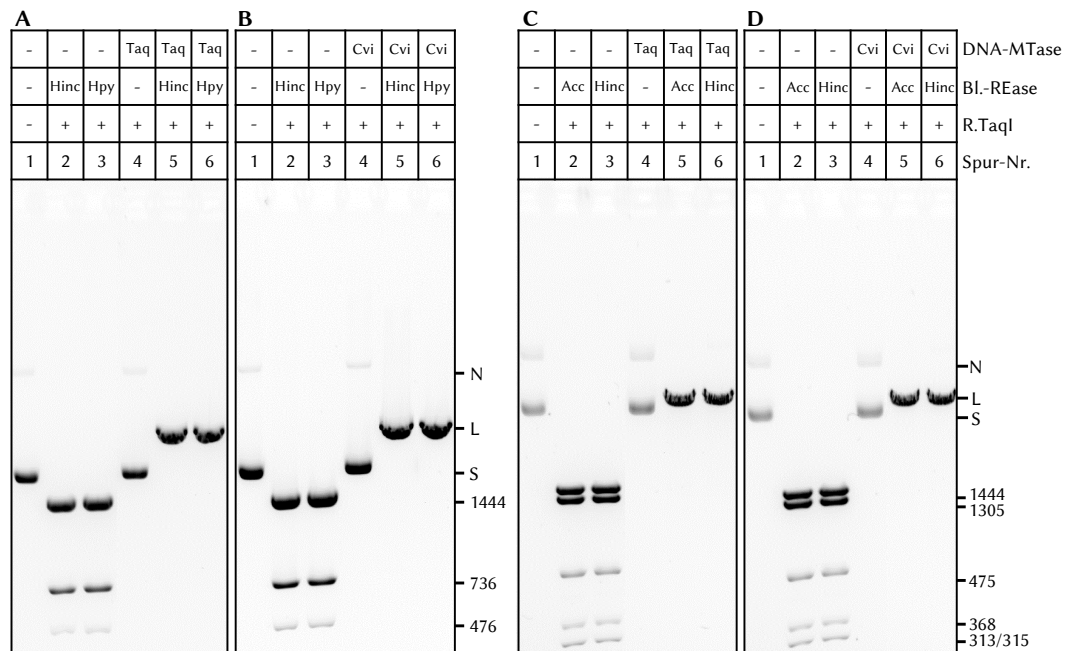


Abbildung 3.30: Gelelektrophoretische Analyse der Blocking-Experimente mit Plasmid-DNA. M.TaqI und M.CviIII wurden mit den Blocking-REasen R.HincII und R.Hpy188III (pUC19 Plasmid-DNA, A/B) bzw. R.AccI und R.HincII (pBR322 Plasmid-DNA, C/D) umgesetzt.

Sämtliche Spuren der Proben mit Blocking-REase und der kognaten REase R.TaqI weisen nur ein einziges Fragment auf, welches der linearisierten Form des Substrats zugeordnet werden kann (Abb. 3.30, Spuren A.5/6-D.5/6). Dies zeigt, dass nur eine der spezifischen Erkennungssequenzen der REase hydrolysiert wurde. Dadurch kann auf die erfolgreiche Methylierung der verbleibenden Sequenzen geschlossen werden. Die Spuren der Proben ohne Blocking-REasen mit R.TaqI (Spuren A.4-D.4) sind vollständig geschützt, sodass deren Banden mit denen des unverdauten Substrats (Spuren A.1-D.1) übereinstimmen. Die Proben ohne DNA-MTase aber mit Blocking-REase und kognater REase weisen das spezifische Fragmentmuster von letzterer auf. Da keine weitere unspezifische Fragmentierung zu erkennen ist, kann etwaige Hydrolyseaktivität einer der verwendeten Blocking-REasen ausgeschlossen werden. Abschließend zeigt das durchgeführte Experiment, dass das Konzept des DNA-Blockings auf unterschiedliche Blocking-REasen und DNA-MTasen sowie verschiedene Substrate anwendbar ist.

3.4.5 Anwendung von DNA-Blocking mit genomischer DNA

Der nächste Abschnitt behandelt DNA-Blocking in Kombination mit genomischer Bakteriophagen-DNA. Die im Folgenden vorgestellten Experimente veranschaulichen die mittels DNA-Blocking erreichte Spezifitätserhöhung und der damit einhergehenden Optimierung der Modifikationsdichte für optische Analysen im Kontext von DNA-Mapping. Im ersten Reaktionsschritt wurde die DNA-MTase M.TaqI (5'-TCGA-3') mit dem natürlichen Cofaktor AdoMet (**1**), der Blocking-REase R.Hpy188III und zwei unterschiedlichen genomischen DNA-Substraten (Abb. 3.31 A), Lambda-DNA (121 5'-TCGA-3', 13 Blocking-Sequenzen - davon 7 primär) und T7-DNA (111 5'-TCGA-3', 14 Blocking-Sequenzen - davon 11 primär), eingesetzt. Die Reaktionen wurden unter den bereits vorgestellten Blocking-Bedingungen durchgeführt (1 h, 37 °C, 20 ng μL^{-1} DNA, 10 μM AdoMet (**1**) und Blocking-Puffer mit 1 μM Ca^{2+}). Die Methylierung der primären und sekundären Blocking-Sequenzen (Abb. 3.31 B) ist dabei im Vergleich zu den restlichen unterdrückt. Für beide DNA-Substrate wurde die DNA-MTase-Konzentration variiert, wobei sich diese an der zuvor in Aktivitätstests unter Blocking-Bedingungen ermittelten Grenzkonzentration orientierte. Die Konzentration der Blocking-REase wurde im Vergleich zu den Blocking-Reaktionen mit Plasmid-DNA nicht verändert.

Daraufhin folgte die Zugabe von EDTA und anschließende Hitzeinaktivierung. Durch die Zugabe von EDTA sollte der Blocking-REase-DNA-Komplex destabilisiert und die Denaturierung des Enzyms begünstigt werden. Im nächsten Schritt folgte eine Aufreinigung des DNA-Substrats mittels Agarose-Plugs zur quantitativen Entfernung des natürlichen Cofaktors AdoMet (**1**). Daraufhin folgte der zweite Reaktionsschritt, in dem die verbleibenden 5'-TCGA'-3-Sequenzen fluoreszenzmodifiziert wurden. Dazu wurde das teilweise methylierte und aufgereinigte Substrat in einer einstufigen Modifikationsreaktion mit M.TaqI und AdoYnTAMRA (**6b**) umgesetzt. Die Analyse beider Reaktionsstufen erfolgte separat mittels Agarosegelelektrophorese.

Im Gegensatz zu herkömmlichen Modifikations-Restriktions-Assays wird beim DNA-Blocking wie bereits beschrieben nicht zwischen quantitativem Verdau aller Erkennungssequenzen sowie entsprechendem Schutz unterschieden, da nur ein spezifischer Teil der Erkennungssequenzen methyliert wird und somit vor einer Restriktion geschützt ist. Nach dem ersten Reaktionsschritt können für beide Substrate vielmehr spezifische Fragmentierungsmuster beobachtet werden. Dabei gilt für beide Versuchsreihen, dass die Banden innerhalb des untersuchten Konzentrationsbereichs definierter werden, je mehr DNA-MTase eingesetzt wurde (Abb. 3.32 A, Lambda: Spuren A.4-7, T7: Spuren A.8-11). Viele der beobachteten Fragmente können, unter Zuhilfenahme des Markers (Spur A.1) sowie den bekannten Fragmenten des quantitativen REase-Verdaus der Probe ohne Blocking-REase (Spur A.3), eindeutig Blocking-Fragmenten zugeordnet werden. Jedes Blocking-Fragment wird dabei entweder durch zwei, sowohl primäre als auch sekundäre, Blocking-Sequenzen bzw. einem Ende des DNA-Doppelstrangs definiert.

Bei den niedriger konzentrierten Proben ist aufgrund unzureichender Methylierung der nicht geblockten Erkennungssequenzen die Ausbildung von kleineren unspezifischen Fragmenten begünstigt, die keinen Blocking-Fragmenten zugeordnet werden können. Bei der Probe mit T7-DNA und der höchsten DNA-MTase-Konzentration sind neben den Blocking-Fragmenten

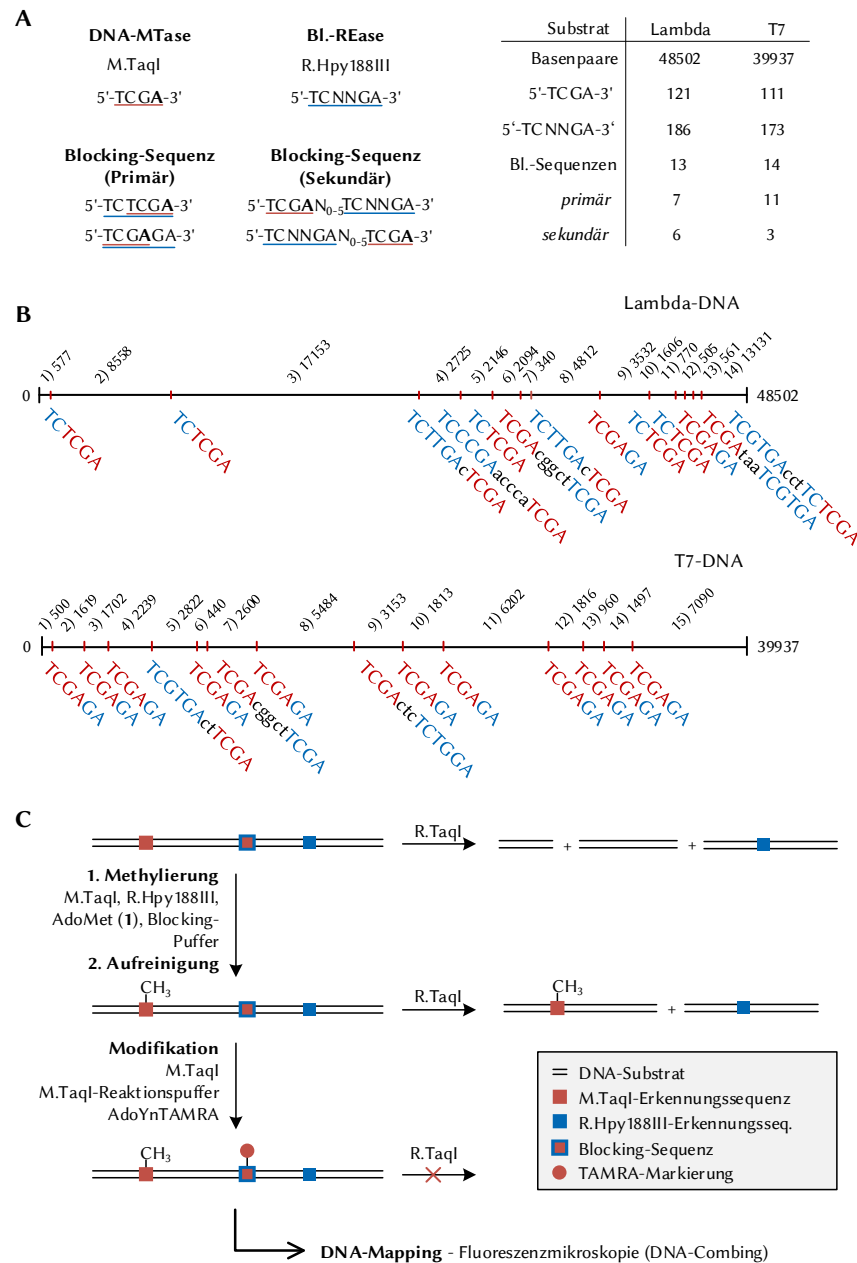


Abbildung 3.31: Übersichtsgrafik zur Modifikation genomischer DNA mittels DNA-Blocking. Primäre und sekundäre Blocking-Sequenzen (A) und Blocking-Fragmente (B) der Kombination aus M.TaqI, R.Hpy188III und Lambda- bzw. T7-DNA. Schematische Darstellung der Modifikation genomischer DNA mittels DNA-Blocking (C). M.TaqI wurde im ersten Schritt mit der Blocking-REase R.Hpy188III und AdoMet (1) umgesetzt. Nach Aufreinigung des Substrats folgte die Modifikation mit M.TaqI und AdoYnTAMRA (6b) im zweiten Schritt.

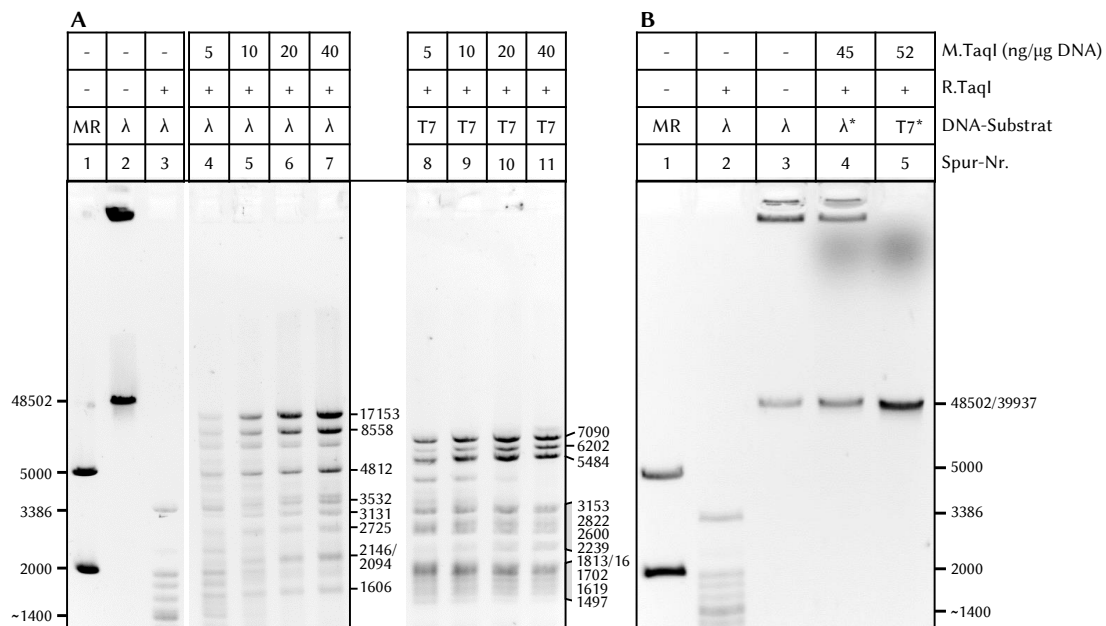


Abbildung 3.32: Gelelektrophoretische Analyse der Blocking-Experimente mit genomischer DNA zur optischen Analyse mittels DNA-Combing. Methylierung (A) sowie anschließende Modifikation mit AdoYnTAMRA (B). Die mit einem Stern markierten DNA-Substrate entsprechen der teilweise methylierten DNA mit jeweils 1/16 Äq. M.TaqI

hingegen keine weiteren Banden mehr zu identifizieren (Spur A.11), bei der Probe mit Lambda-DNA wiederum nur eine Weitere (Spur A.7). Die zusätzliche Bande weist eine ungefähre Länge von 7000 bp auf, wobei keine direkte Erklärung für das Auftreten gefunden werden konnte. Es ist auffällig, dass bei beiden Substraten keine spezifischen Banden zu beobachten sind, die größer sind als die untersuchten Blocking-Fragmente. Dies spricht dafür, dass die Methylierung der Blocking-Sequenzen tatsächlich vollständig unterdrückt wurde. Ansonsten wären Fragmente zu erwarten, die der Länge von zweier benachbarter Blocking-Fragmente entsprechen. Bei beiden Substraten wurden daher die Proben mit der höchsten DNA-MTase-Konzentration für die anschließende Modifikation mit fluoreszierenden Reportergruppen ausgewählt.

Die gelelektrophoretische Analyse des zweiten Reaktionsschritts unterscheidet sich zunächst nicht von den einstufigen DNA-Modifikationen der vorherigen Kapitel. In beiden Fällen ist das Substrat vollständig vor Restriktion durch die REase geschützt (Lambda: Spur B.4, T7: Spur B.5), wohingegen eine Kontrollprobe mit unmodifizierter Lambda-DNA vollständig fragmentiert wurde. Der Unterschied zu einstufigen DNA-Modifikationen liegt jedoch darin, dass der Schutz vor dem REase-Verdau teilweise durch die Methylierung der im ersten Schritt geblockten Erkennungssequenzen, sowie zusätzlich durch die Fluoreszenzmodifikation der Blocking-Sequenzen zustande kommt, welche im zweiten Reaktionsschritt erfolgte.

Die fluoreszenzmodifizierten Proben wurden im weiteren Verlauf entsprechend der in Abschnitt 3.3.1.1 beschriebenen Vorgehensweise aufbereitet (u.a. erneute Plug-Aufreinigung und Zugabe von YOYO™-1) und fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Eine umfassende Analyse der Aufnahmen mittels selbst entwickelter automatisierter Auswertungsroutinen folgt in Abschnitt 3.6, zusammen mit denen der einstufigen Modifikationsreaktionen.

3.5 In-Gel DNA-Modifikation

Ein wichtiges Augenmerk bei Anwendungen im Bereich des DNA-Mappings genomischer DNA liegt auf der Länge der zu untersuchenden DNA-Einzelmoleküle. Dies trifft insbesondere bei der Analyse von weitreichenden strukturellen Variationen (LRSV, engl. *long range structural variations*) zu.^[16,20,118] In diesem Zusammenhang gilt es die Reaktionsbedingungen sowie Durchführung der Aufreinigung und Probenvorbereitung möglichst zu Gunsten der Stabilität genomischer DNA anzupassen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Methode zur einstufigen DNA-Modifikation mittels DNA-MTasen und doppeltaktivierten AdoMet-Analoga daher mit dem Ziel weiterentwickelt, die zu modifizierende DNA vor mechanischem Stress zu schützen,^[119] jedoch gleichzeitig die quantitative Entfernung des überschüssigen AdoMet-Analogons zu gewährleisten.

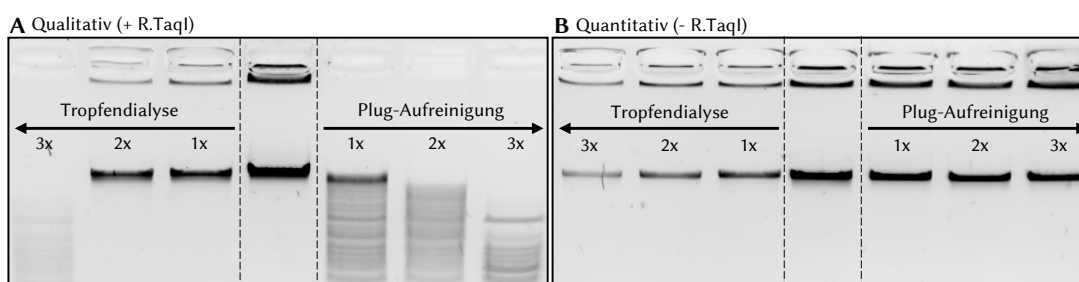


Abbildung 3.33: Vergleich der Aufreinigung mittels Tropfendialyse und Agarose-Plugs. Restaktivität von AdoMet (1, A, Qualitativ), sowie Ausbeute genomischer DNA (B, Quantitativ) nach 1-3 Waschrunden für beide Methoden. Zur Bestimmung der Restaktivität von AdoMet (1) wurde die isolierte Lambda-DNA mit M.TaqI und anschließend mit R.TaqI behandelt. In Abwesenheit des Cofaktors wird die DNA nicht methyliert und daher von R.TaqI fragmentiert.

Bei Voruntersuchungen wurden in diesem Zusammenhang neben verschiedener Varianten von Agarose-Plugs^[120] auch Tropfendialyse,^[121] Ethanolpräzipitation^[122] und unterschiedliche kommerziell erhältliche Säulen zur Aufreinigung genomischer DNA getestet. Dabei wurden mit Agarose-Plugs in Kombination mit Bakteriophagen DNA die besten Ergebnisse erzielt. Dies kann durch gute Entfernung des überschüssigen AdoMet-Analogs (3.33 A), die reproduzierbar hohe Ausbeute (3.33 B) sowie der einfachen Handhabung begründet werden. Im ersten Schritt der Aufreinigung mittels Agarose-Plugs erfolgt die Einbettung der DNA in ein Agarosegel, wodurch diese im weiteren Verlauf vor etwaig auftretenden Scherkräften geschützt wird. Vor der Analyse wird die DNA durch Zugabe von β -Agarase I wieder in Lösung

gebracht. Um die genomische DNA bereits früher, und im Idealfall über sämtliche Reaktions- bzw. Aufreinigungsschritte hinweg, zu schützen, sollte die vorgeschaltete enzymatische Modifikationsreaktion nun ebenfalls an in Agarose eingebettetem DNA-Substrat erfolgen. Dazu wurde die genomische DNA zunächst zusammen mit einer der verwendeten DNA-MTasen (M.TaqI oder M.BseCI) mit Agaroselösung (1:1, SeaPlaque™-Agarose) versetzt. Das ausgehärtete Agarose-Plug wurde daraufhin in eine Modifikationslösung mit AdoMet-Analogon überführt und inkubiert. Nachdem das überschüssige AdoMet-Analogon durch Waschen des Agarose-Plugs entfernt, und dieser mittels Zugabe von β -Agarase I aufgelöst wurde, erfolgte die Restriktion und Analyse mittels Agarosegelelektrophorese. Dabei unterscheidet sich die grundsätzliche Methodik nicht von derer, welche für einstufige DNA-Modifikationen in Kapitel 3.3 vorgestellt wurde.

Für beide untersuchten DNA-MTasen wurden jeweils drei konsekutive Versuchsreihen durchgeführt. Im ersten Schritt wurde zunächst die Konzentration des AdoMet-Analogon AdoYnYn (**4**) konstanter DNA-MTase Stoffmenge variiert. Im zweiten Schritt folgte dann die Ermittlung der DNA-MTase-Grenzkonzentration bei der geringsten Konzentration des AdoMet-Analogons. In abschließenden Versuchsreihe erfolgte letztlich ein Screening der fluoreszierenden AdoMet-Analoga **6a-d** auf Basis der vorher ermittelten Grenzkonzentrationen.

Die Analyse der Versuchsreihen mittels Agarosegelelektrophorese zur Ermittlung der Aktivität des AdoMet-Analogons (Abb. 3.34 A/D) zeigt jeweils, dass die Restriktion des DNA-Substrats bei allen Proben mit AdoMet-Analogon vollständig unterdrückt wurde. Daraus ergibt sich, dass bei der gewählten DNA-MTaseStoffmenge auch die niedrigste Cofaktorkonzentration ausreichte, alle Erkennungssequenzen vollständig zu modifizieren (Spuren A/D.5). In den nachfolgenden Versuchsreihen bei Variation der DNA-MTase-Stoffmenge und konstanter Konzentration des AdoMet-Analogons (Abb. 3.34 B/E) wurden Grenzkonzentrationen von 2,5 Äq. (M.TaqI, Spur B.4) bzw. 5,0 Äq. (M.BseCI, Spur E.3) in Bezug auf die jeweiligen Erkennungssequenzen festgestellt. Die Analyse des nachfolgenden Screenings zeigt, dass die zuvor ermittelten Konzentrationen auch auf verschiedene fluoreszierende AdoMet-Analoga angewendet werden können (Abb. 3.34 C/F). Dabei ist die benötigte Cofaktorkonzentration im Vergleich zu den Modifikationsreaktionen in Lösung nahezu identisch, wohingegen deutlich höhere Stoffmengen bzw. Äquivalente der DNA-MTase nötig sind um das Substrat vollständig zu modifizieren. Dies könnte unter anderem mit der eingeschränkten Mobilität des DNA-MTasen bzw. Zugänglichkeit des Substrats zusammenhängen. Anzumerken ist, dass sämtliche Kontrollen ohne AdoMet-Analogon nach Restriktion durch die verwendeten REasen vollständig fragmentiert wurden. Zusätzlich zu den vorgestellten Ergebnissen konnte in vorangegangenen Kontrollexperimenten gezeigt werden, dass die Entfernung des AdoMet-Analogons während der Waschschrte tatsächlich quantitativ erfolgt. Dazu wurde die DNA-MTase M.TaqI nicht zu Beginn, sondern erst nach Durchführung der Waschschrte, zugegeben, woraufhin die vollständige Fragmentierung des DNA-Substrats zu beobachten war. Letztlich konnte somit eine neue experimentelle Variante zur Modifikation von DNA mittels DNA-MTase etabliert werden, bei der die Exposition des DNA-Substrats gegenüber Scherkräften im Vergleich zum standardmäßig durchgeführten Verfahren deutlich reduziert sein sollte.

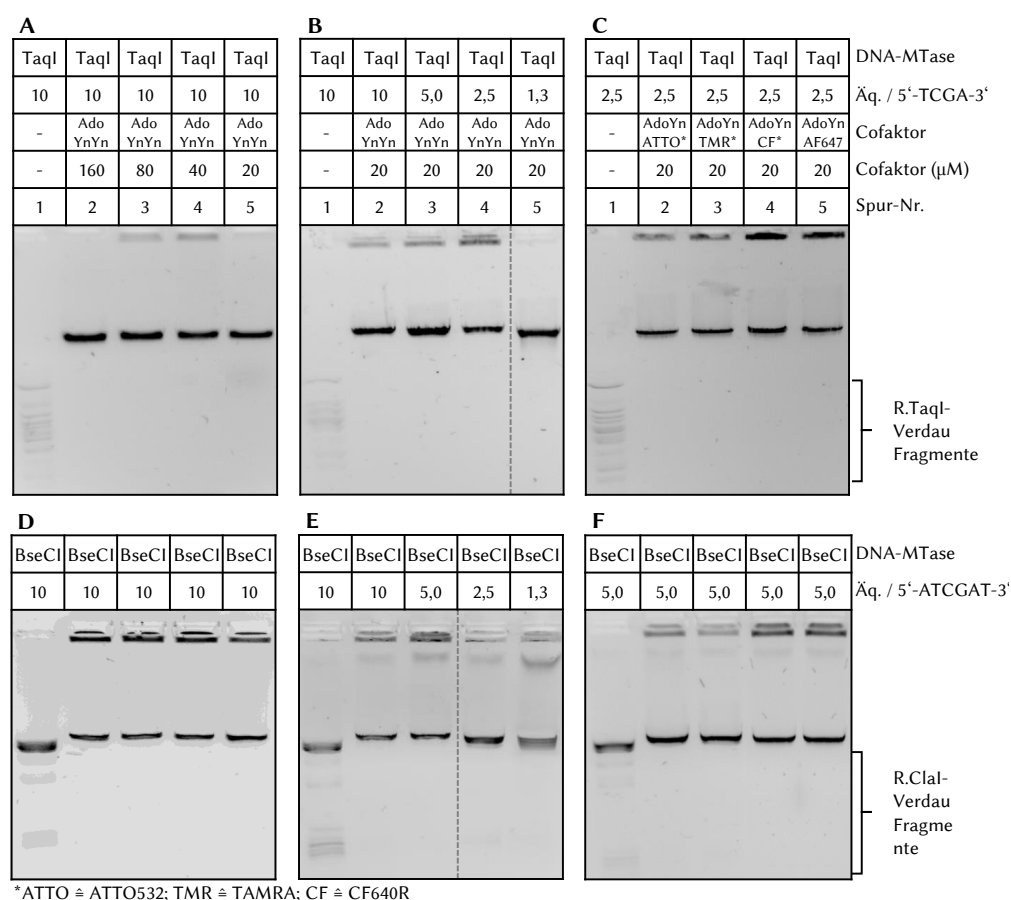


Abbildung 3.34: Agarosegelelektrophoretische Analyse der In-Gel-Modifikationsreaktionen. In den Versuchsreihen wurde jeweils für M.TaqI (A-C) und M.BseCI (D-F) zunächst die Grenzkonzentrationen des AdoMet-Analogon AdoYnYn (4) und der jeweiligen DNA-MTase ermittelt. In der nachfolgenden Versuchsreihe erfolgte ein Screening der fluoreszierenden AdoMet-Analoga **6a-d** unter Verwendung der ermittelten Grenzkonzentrationen.

3.6 Auswertung des optischen DNA-Mappings

Dieses Kapitel behandelt die standardisierte und automatisierte Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Analyse gestreckter und immobilisierter DNA. Ziel dieser Auswertungen war die Quantifizierung mittels mTAG-Methode sequenzspezifisch fluoreszenzmodifizierter genomischer DNA. Es wurden Gütekennzahlen ermittelt, die für einen direkten Vergleich verschiedener Proben herangezogen werden können. In den im Folgenden analysierten Modifikationsreaktionen wurde das AdoMet-Analogon AdoYnTAMRA (**6b**), entweder in einstufigen Modifikationsreaktionen mit M.BseCI (3.3), oder in Kombination mit DNA-Blocking und M.TaqI, (3.4) umgesetzt. Der DNA-Interkalator YOYO™-1 wurde bei allen fluoreszenzmikroskopischen Analysen verwendet, um die Konturen der DNA-Einzelmoleküle sichtbar zu machen. Die

automatisierte Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen kann in zwei grundlegende Bereiche unterteilt werden (Abb. 3.35). Auf der einen Seite wurden literaturbekannte Bilderkennungsalgorithmen, die mittels *ImageJ Macro Language* (IJM) als Teil des Programms ImageJ (v1.51k Fiji)^[123,124] eingebunden wurden, zur Lokalisation von DNA-Einzelmolekülen (*Ridge Detection* Plugin v1.4)^[125] sowie den Signalen einzelner DNA-Modifikationen (Label, *Thunderstorm* Plugin v1.3)^[126] verwendet. Auf der anderen Seite handelt es sich um selbst entwickelte *Alignment*-Algorithmen, welche in der Programmiersprache *Lua*^[127] umgesetzt und zum DNA-Mapping verwendet wurden.

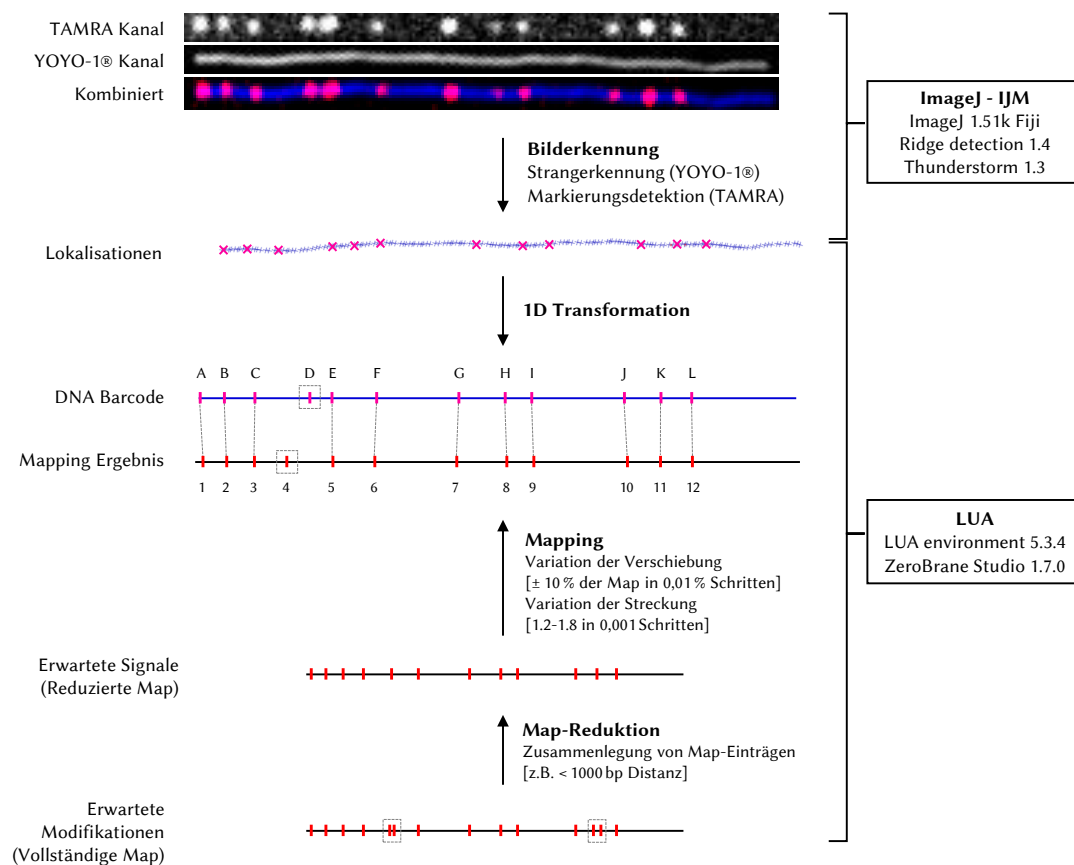


Abbildung 3.35: Übersicht der Auswertungsroutine fluoreszenzmikroskopischer Analysen mittels mTAG-Methode modifizierter sowie gestreckter und immobilisierter DNA.

Vor dem eigentlichen Mapping wurden die zweidimensionalen Koordinaten von Strang- bzw. Label-Lokalisationen in einen eindimensionalen DNA-Barcode transformiert. Dazu wurden die Distanzen aller benachbarten Lokalisationen eines DNA-Einzelmoleküls aufsummiert und letztlich die relativen Positionen der Label (Abb. 3.35: A-L) ermittelt. Dabei wurden grundsätzlich nur DNA-Einzelmoleküle berücksichtigt, die sich nicht überschneiden und eine Mindestlänge aufweisen, die einem Streckfaktor von mindestens dem 1,2-fachen der theoretischen Länge des

eingesetzten DNA-Moleküls entsprechen. Im zweiten Schritt folgte das eigentliche Mapping durch Variation bzw. Optimierung der sogenannten *Map*. Bei den einstufigen Modifikationsreaktionen entspricht diese den Erkennungssequenzen der verwendeten DNA-MTase, beim DNA-Blocking hingegen den sogenannten Blocking-Sequenzen (vgl. Abschnitt 3.4). In beiden Fällen entsprechen die Einträge der *Map* den erwarteten Label-Positionen. Benachbarte Positionen die weniger als 1000 bp voneinander entfernt liegen wurden aufgrund des Auflösungslimits bei klassischer Fluoreszenzmikroskopie zusammengelegt (Abb. 3.35: **5** und **10**). Der *Alignment*-Algorithmus, auf dem das Mapping basiert, ist an den Needleman-Wunsch-Algorithmus angelehnt.^[128] Mithilfe einer Punktematrix (*scoring matrix*) wurde dabei die größte Übereinstimmung zwischen *Map* und DNA-Barcode iterativ in Form einer maximal zu erreichenden Punktzahl (*similarity score*) bestimmt. Dazu wurde die *Map* bei unterschiedlichen Streckfaktoren (**SF**, 1,2-1,8 in 0,001 Schritten) relativ zum DNA-Barcode verschoben (engl. *shift*, **SH**, -10 % bis +10 % in 0,01 % Schritten). Der Streckfaktor bezieht sich dabei auf die theoretische Länge der DNA-Doppelstränge,^[70] da diese beim DNA-Combing deutlich überschritten wird. Insgesamt wurden somit 1 200 000 Variationen der *Map* mit jedem DNA-Barcode und somit jedem DNA-Einzelmolekül verglichen.

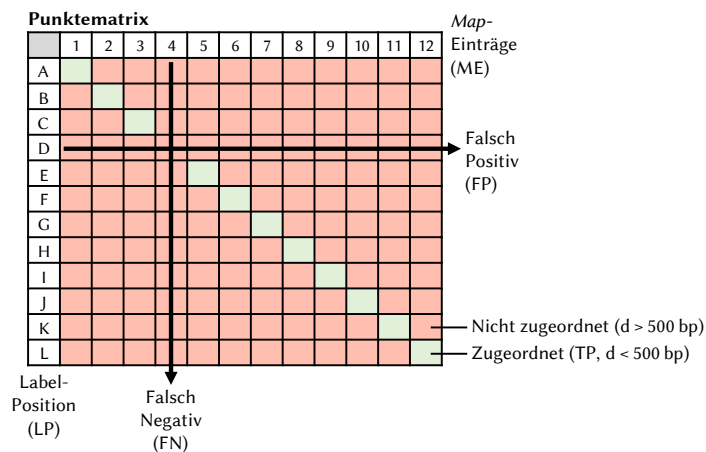


Abbildung 3.36: Matrix zur Ermittlung der Übereinstimmung zwischen *Map* und DNA-Barcode.

Das Ergebnis bzw. die Punktzahl einer jeden *Map*-Variation in Bezug auf ein spezifisches DNA-Einzelmolekül kann wie bereits erwähnt mithilfe einer Punktematrix ermittelt bzw. dargestellt werden (Abb. 3.36). Jede Spalte der Matrix entspricht einem *Map*-Eintrag (**ME**), und somit einem theoretisch erwarteten Label. Jede Zeile entspricht einer relativen Label-Position (**LP**), die zuvor fluoreszenzmikroskopisch detektiert und anschließend mathematisch ermittelt wurden. Alle relativen Label-Positionen eines DNA-Einzelmoleküls bilden zusammen den jeweiligen DNA-Barcode. Die einzelnen Matrixelemente wiederum entsprechen den Abständen (d_{ME-LP} in bp) der jeweils beteiligten Label-Positionen bzw. *Map*-Einträge einer spezifischen *Map*-Variation. Unterhalb eines Grenzwerts, der bei den im Folgenden gezeigten Auswertungen bei 500 bp lag, wurde von einer erfolgreichen Zuordnung eines Label ausgegangen (*true positive*, **TP**, Abb. 3.36: A1, B2, ...). Konnte hingegen keine Label-Position zugeordnet werden, wurde

der Grenzwert somit für sämtliche Abstände in Bezug auf die *Map*-Einträge überschritten (*false positive*, **FP**, Abb. 3.36: LP-D). Im Falle, dass einem *Map*-Eintrag wiederum keine Label-Position zugeordnet werden konnte, gilt das entsprechende Label als fehlend (*false negative*, **FN**, Abb. 3.36: ME-4). Aufgrund des gewählten Grenzwertes in Kombination mit der Zusammenlegung benachbarter *Map*-Einträge, kann einem *Map*-Eintrag maximal eine Label-Position zugeordnet werden und umgekehrt. Die absolute Punktzahl (S_{abs} , Gl. 3.1) einer spezifischen *Map*-Variation kann mittels der zuvor beschriebenen Größen berechnet werden. Grundsätzlich wurde jeweils die *Map*-Variation eines jeden DNA-Einzelmoleküls mit der höchsten Punktzahl zur weiteren Auswertung berücksichtigt. Bei gleicher Punktzahl wurde die *Map*-Variation mit dem geringsten durchschnittlichen Abstand aller erfolgreich zugeordneten Label-Positionen in Bezug auf den entsprechenden *Map*-Eintrag ausgewählt.

$$S_{abs} = ME - FN - FP = TP - FP \quad (3.1)$$

Um die Ergebnisse zwischen verschiedenen DNA-Substraten bzw. unterschiedlichen Modifikationsstrategien und -dichten besser miteinander vergleichen zu können, wurde zudem eine relative Punktzahl (S_{rel}) ermittelt (Gl. 3.2), indem die absolute Punktzahl durch die Anzahl der *Map*-Einträge geteilt wurde.

$$S_{rel} = \frac{ME - FN - FP}{ME} = \frac{TP - FP}{ME} \quad (3.2)$$

In Tabelle 3.1 sind die Ergebnisse verschiedener Modifikationsreaktionen zusammengefasst. Neben einigen allgemeinen Analyseparametern, wie der Anzahl an fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen und der Anzahl für die Auswertung relevanter DNA-Einzelmoleküle, sind sowohl die durchschnittlichen Kenngrößen, als auch die daraus resultierenden Punktzahlen aufgeführt. Unter den analysierten Proben befinden sich zwei einstufige Modifikationsreaktion mit M.BseCI, die stark voneinander abweichende Modifikationsdichten aufweisen. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Erkennungssequenz der DNA-MTase in Bezug auf T7-DNA, analog zur menschlichen DNA, eine starke statistische Unterrepräsentation aufweist. Mittels der computergestützten Analyse und der zuvor beschriebenen Vorgehensweise, kann ein Vergleich der Güte von Modifikationsreaktionen mit derselben DNA-MTase hinsichtlich eben jener Unterschiede in Bezug auf die Modifikationsdichte erfolgen. Wie in Kapitel 3.4 veranschaulicht, kann die Modifikationsdichte weiterhin mittels DNA-Blocking reduziert, bzw. auf eine spezifische Applikation abgestimmt werden. Bei der Verwendung von DNA-Blocking wird die Spezifität jedoch neben dem direkten Einfluss der eigentlichen Modifikationsreaktion zusätzlich durch die Güte der vorangegangenen Blocking-Reaktion beeinflusst. Ein Vergleich der Güte entsprechender Modifikationsreaktionen kann erfolgen, indem die Kennzahlen bzw. Punktzahlen folgender Ansätze miteinander verglichen werden: Die einstufige DNA-Modifikation von Lambda-DNA mit der DNA-MTase M.BseCI, sowie die Modifikation von T7-DNA mit M.TaqI und vorangegangenem DNA-Blocking mit R.Hpy188III als Blocking-REase. Beide Modifikationsreaktionen weisen eine vergleichbare Modifikationsdichte auf.

Tabelle 3.1: Ergebnisse des DNA-Mappings einstufiger DNA-Modifikationen mit M.BseCI und DNA-Blocking mit M.TaqI.

DNA DNA-MTase Modifikation	T7 M.BseCI einstufig	T7 M.TaqI DNA-Blocking	Lambda M.BseCI einstufig
Allg. Teil	3.3	3.4	3.3
Exp. Teil	5.5	5.6.4	5.5
Bilder	50	67	100
Einzelmoleküle	411	210	405
Erkennungsseq.	3	14	15
<i>Map</i> -Eintrag (ME)	3	12	11
Label-Position (LP)	$2,9 \pm 0,8$	$9,3 \pm 2,7$	$10,4 \pm 2,0$
<i>true positive</i> (TP)	$2,4 \pm 0,6$	$7,9 \pm 1,8$	$8,9 \pm 1,4$
<i>false negative</i> (FN)	$0,6 \pm 0,6$	$4,1 \pm 1,8$	$2,1 \pm 1,4$
<i>false positive</i> (FP)	$0,4 \pm 0,6$	$1,4 \pm 1,1$	$1,3 \pm 1,5$
Streckfaktor (SF)	$1,5 \pm 0,1$	$1,6 \pm 0,2$	$1,6 \pm 0,1$
abs. Punktzahl (S_{abs})	$2,0 \pm 0,9$	$6,5 \pm 1,4$	$7,6 \pm 2,3$
rel. Punktzahl (S_{rel})	$0,68 \pm 0,29$	$0,54 \pm 0,11$	$0,69 \pm 0,19$

Bei einem Vergleich der Ergebnisse fällt auf, dass sehr ähnliche relative Punktzahlen für die beiden einstufigen DNA-Modifikationen erhalten wurden (0,68 bzw. 0,69). Auch die entsprechenden Kennzahlen verhalten sich bezogen auf die jeweilige Anzahl an *Map*-Einträgen ähnlich. Demnach scheint die Modifikationsdichte keinen nennenswerten Einfluss auf das Ergebnis der computergestützten Analyse, und somit der zu ermittelnden Modifikationsgüte, zu haben. Im Vergleich dazu, weicht die relative Punktzahl mittels DNA-Blocking modifizierter DNA ab (0,54). Dies ist in erster Linie auf den höheren FN- bzw. damit einhergehend niedrigeren TP-Wert zurückzuführen und bedeutet, dass weniger Labels als erwartet detektiert wurden. Zum einen kann dies dadurch begründet werden, dass einige Blocking-Sequenzen bereits während der Blocking-Reaktion methyliert wurden, und somit nicht für eine Modifikation mit dem fluoreszierenden AdoMet-Analogon zur Verfügung standen. Diese Vermutung wird dadurch gestützt, dass sich der Anteil des FP-Werts im Vergleich zu den einstufigen Modifikationen nicht nennenswert unterscheidet. Ein weiterer Grund könnte zwar auch die unzureichende Entfernung des natürlichen Cofaktors nach der Methylierung beim DNA-Blocking sein, jedoch scheint dies hinsichtlich von Untersuchungen der Aufreinigung mittels qualitativer gelelektrophoretischer Analyse 3.33 unwahrscheinlich. Die vorgestellte Methode bietet Vorteile gegenüber dem *nick labelling*,^[27,36] da im Vergleich bisher keine systematischen Limitierungen der Modifikation mittels mTAG-Methode bekannt sind. Dadurch sollen statistische *contigs*, längere *scaffolds* und somit Genomassemblies von höherer Qualität erhalten werden können.



Abbildung 3.37: Grafische Darstellung der Ergebnisse des automatisierten DNA-Mappings, mit *true positives* (TP, grün) und *false positives* (FP, rot).

In Abbildung 3.37 sind jeweils die hundert DNA-Einzelmoleküle, sowohl der einstufigen Modifikation von Lambda-DNA als auch der mittels DNA-Blocking modifizierten T7-DNA, mit der höchsten relativen Punktzahlen schematisch dargestellt. Beide Proben lassen sich aufgrund ähnlicher Anzahl an Map-Einträgen und somit auch Label-Dichte gut miteinander vergleichen. Zum einen ist deutlich zu erkennen, dass sich die Anzahl an FP's (rote Markierungen) nicht maßgeblich unterscheidet, während die Anzahl an TP's (grüne Markierungen) im Falle des DNA-Blockings deutlich geringer ausfällt. Wie bereits beschrieben, kann dies unterschiedliche Ursachen haben. Bei Betrachtung einzelner Map-Einträge fällt zudem auf, dass bei beiden Proben die Positionen bei denen zwei ursprüngliche Label-Positionen zusammengelegt wurden tendenziell den höheren Anteil an TP's liefern. Dies kann durch die erhöhte Wahrscheinlichkeit, dass zumindest an einer der beiden Positionen mindestens ein Label übertragen bzw. dessen Fluoreszenzsignal aufgenommen wurde, erklärt werden. An dieser Stelle sei nochmals darauf hingewiesen, dass bei entsprechenden Positionen aufgrund der allgemein stark abweichenden Intensität einzelner Signale nicht zwischen einfacher und doppelter Modifikation unterschieden werden konnte. Zusammengefasst wurden bessere Mapping-Ergebnisse für die einstufigen Modifikationsreaktionen erhalten, wobei sich diese nach weiterer Optimierung der experimentellen Durchführung weiter angleichen könnten.

4 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die sequenzspezifische Modifikation von DNA mittels *methyltransferase-directed Transfer of Activated Groups* (mTAG) weiterentwickelt. Ein Fokus dieser Arbeit lag auf der Synthese von Analoga des natürlichen Cofaktors AdoMet (**1**). Darunter fallen sowohl AdoMet-Analoga zur Übertragung von reaktiven als auch fluoreszierenden und sterisch anspruchsvollen Gruppen. Weiterhin wurde die enzymatische Aktivität der neuen AdoMet-Analoga in Aktivitätstests mit den DNA-MTasen M.TaqI und M.BseCI untersucht. Darauf aufbauend folgten einstufige DNA-Modifikationsreaktionen mit den neu dargestellten AdoMet-Analoga. Die modifizierte DNA wurde mit unterschiedlichen Methoden aus dem Bereich des optischen und elektrischen DNA-Mappings analysiert. Darunter fällt die von externen Kooperationspartnern durchgeführte Analyse mit *C-Trap* und Nanoporen, aber auch die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von gestreckter genomischer DNA (DNA-Combing), im Haus. Ein weiteres Augenmerk der vorliegenden Arbeit war die methodische Weiterentwicklung der DNA-Modifikation anhand von mTAG. Dies bezieht sich zum einen auf die Einführung neuer Spezifitäten durch den Einsatz von DNA-Blocking, zum anderen auf die Ausweitung der Methode auf in Agarose eingebettete DNA. Um die einstufigen DNA-Modifikationen mit fluoreszierenden AdoMet-Analoga quantifizieren bzw. in Hinblick auf die Verwendung von DNA-Blocking vergleichen zu können, wurde eine automatisierte Routine zur standardisierten Auswertung und Bildung von Kennzahlen entwickelt.

Synthesen Es wurden unterschiedliche Klassen von AdoMet-Analoga dargestellt (Abb. 4.1). Reaktive AdoMet-Analoga können zur sequenzspezifischen Funktionalisierung von DNA eingesetzt werden. Die Synthese des neuen reaktiven AdoMet-Analogen AdoYnYn (lang) (**5**), mit verlängerter Seitenkette und terminalem Alkin, wurde analog zu der des literaturbekannten AdoYnYn (kurz) (**4**) durchgeführt. Die Alkylierungsreaktion mit der aktivierten Seitenkette **9c** und AdoHcy (**2**) erfolgte mit einer Ausbeute von 32 %. Fluoreszierende AdoMet-Analoga finden Anwendung im Bereich des optischen DNA-Mappings. Sämtliche Analoga dieser Art, wie auch die neuen Verbindungen AdoYnATTO532 (**6a**) und AdoYnAF647 (**6d**), wurden mittels kupferkatalysierter Azid-Alkin-[3+2]-Cycloaddition (CuAAC) des jeweiligen Azid-funktionalisierten Fluorophors und AdoYnYn (kurz oder lang) dargestellt, wobei die Ausbeuten zwischen 43 % und 54 % variierten. Sowohl die Charakterisierung der reaktiven als auch der fluoreszierenden AdoMet-Analoga erfolgte mittels ESI-MS. ODN-modifizierte AdoMet-Analoga bilden eine neue Klasse von Cofaktoren zur einstufigen Übertragung sterisch anspruchsvoller Gruppen, welche beim elektrischen DNA-Mapping genutzt werden können. Die Darstellung der ODN-modifizierten AdoMet-Analoga **14a-h** erfolgte zweistufig. Im ersten Schritt wurden die Amino-funktionalisierten ODNs **10a-h** mit dem bifunktionellen DBCO-NHS-Ester **11** in NHS-Kupplungen, und im zweiten Schritt die umfunktionalisierten ODNs **13a-h** in spannungsinduzierten Azid-Alkin-[3+2]-Cycloadditionen (SPAAC) mit AdoYnAzid **3** umgesetzt. Die Ausbeuten der ersten Stufe variierten zwischen 47 % und 72 %, die der zweiten Stufe zwischen 25 % und 63 %. Die Charakterisierung der ODN-modifizierten AdoMet-Analoga erfolgte mittels MALDI-TOF. Sämtliche der beschriebenen Reaktionen wurden mittels *rp*-HPLC verfolgt, und die Produkte anschließend ebenso isoliert.

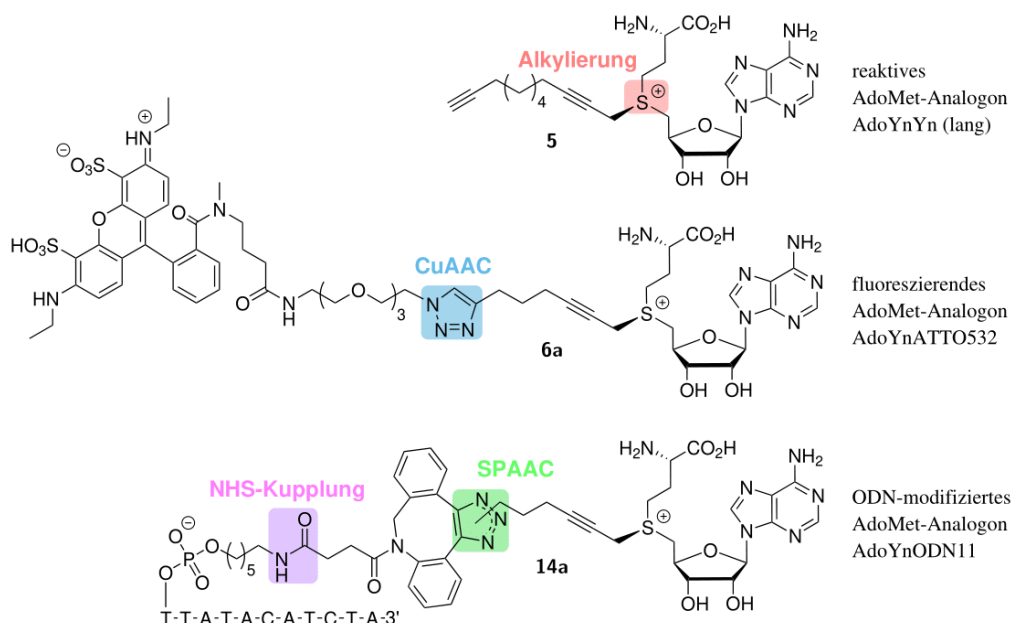


Abbildung 4.1: Beispiele neuer AdoMet-Analoga der Klasse reaktiver, fluoreszierender und ODN-modifizierter AdoMet-Analoga: AdoYnYn (5), AdoYnATTO532 (6a) und AdoYnODN11 (14a).

Aktivitätstests Im weiteren Verlauf wurde in erster Linie die enzymatische Aktivität der DNA-Methyltransferase M.TaqI mit den dargestellten AdoMet-Analoga untersucht. Die Ergebnisse der Aktivitätstests sind im Folgenden tabellarisch zusammengefasst (Tab. 4.1). Im Vergleich zu den Aktivitäten reaktiver und fluoreszierender AdoMet-Analoga, die sich nur geringfügig voneinander unterscheiden ($\text{TON} = 8\text{-}16\text{ h}^{-1}$), weisen die ODN-modifizierten AdoMet-Analoga grundsätzlich geringere Aktivitäten auf, die außerdem stärker voneinander abweichen. Die nahezu identischen Aktivitäten der reaktiven und fluoreszierenden AdoMet-Analoga können anhand der ähnlichen strukturellen bzw. elektronischen Eigenschaften in der Nähe des Sulfoniumzentrums erklärt werden. Die Ursachen der Aktivitätsunterschiede bei ODN-modifizierten AdoMet-Analoga können nicht eindeutig bestimmt werden. Jedoch konnten Korrelationen zwischen Aktivität und Länge der ODNs festgestellt werden (ODN11: $\text{TON} = 1$; ODN2: $\text{TON} = 4$). Abstoßende elektronische Wechselwirkungen zwischen ODN und aktiven Zentrum, aber auch die Inhibition der DNA-bindenden Domäne, sind mögliche Ursachen. In EMSA-Experimenten konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Übertragung der Seitenkette von AdoYnODN11, die elektrophoretische Mobilität von DNA-Fragmenten mit entsprechender Modifikation verringert. Nach Zugabe von Exonuklease I ließ sich dieser Effekt umkehren, wodurch der Nachweis einer ODN-Modifikation gelang.

Tabelle 4.1: Übersicht der in Aktivitätstests ermittelten TONs.

Analogon	#	Typ ¹	c _{Cof} (μM)	DNA-MTase	TON (h ⁻¹)
AdoMet	1	N	10	M.TaqI	512
AdoYnYn (kurz)	4	R	10	M.TaqI	8
AdoYnYn (lang)	5	R	10	M.TaqI	8
AdoYnATTO532	6a	F	10	M.TaqI	16
AdoYnATTO532	6a	F	10	M.BseCI	0,8
AdoYnTAMRA (kurz)	6b	F	10	M.TaqI	8
AdoYnAF647	6d	F	10	M.TaqI	16
AdoYnTAMRA (lang)	7	F	10	M.TaqI	8
AdoYnODN11	14a	O	40	M.TaqI	1
AdoYnODN8	14b	O	40	M.TaqI	2
AdoYnODN5	14c	O	40	M.TaqI	2
AdoYnODN2	14d	O	40	M.TaqI	4
AdoYnC ₆ ODN14	14e	O	40	M.TaqI	1
AdoYnC ₁₂ ODN14	14f	O	40	M.TaqI	1
AdoYnPEG ₆ C ₆ ODN14	14g	O	40	M.TaqI	<1
AdoYnPEG ₆ C ₁₂ ODN14	14h	O	40	M.TaqI	<1

¹ N: natürlich; R: reaktiv; F: fluoreszierend; O: ODN-modifiziert

DNA-Modifikationen Das übergeordnete Ziel der sequenzspezifischen Modifikation von genomischer, aber auch Plasmid-DNA, mittels mTAG-Methode war es, neue Anwendungen im Bereich des optischen und elektrischen DNA-Mappings zu erschließen. Dazu wurden einige der neuen AdoMet-Analoga zusammen mit den Adenin-spezifischen DNA-MTasen M.TaqI und M.BseCI in meist einstufigen Modifikationsreaktionen eingesetzt. Für die elektrische Analyse mittels Nanoporen durch Dr. Kaikai Chen (Cavendish Laboratories, Cambridge, UK) erfolgte die Modifikation von Plasmid-DNA mit den AdoMet-Analoga AdoYnBiotinII (**15**) und AdoYnODN11 (**14a**), zur Übertragung von sterisch anspruchsvollen Gruppen, sowie der DNA-MTase M.TaqI. Für die optische Analyse mit der *C-Trap* (Lumicks, Amsterdam, NL), wurde an den Enden Biotin-funktionalisierte Lambda-DNA sowie das fluoreszierenden AdoMet-Analoga AdoYnCF640R (**6c**) und M.BseCI verwendet. Für die fluoreszenzmikroskopische Analyse von gestreckter genomischer DNA kamen unterschiedliche fluoreszierende AdoMet-Analoga sowie die beiden MTasen M.TaqI und M.BseCI zum Einsatz. Zusätzlich zu den genannten einstufigen DNA-Modifikationen wurde die mTAG-Methode durch sogenanntes DNA-Blocking erweitert. Dadurch konnten neue Spezifitäten erhalten werden. Die Güte der Modifikationsreaktionen mit und ohne Einsatz von DNA-Blocking sollten im Anschluss vergleichend analysiert werden.

DNA-Mapping Es wurden standardisierte Auswertungsroutinen entwickelt, mithilfe derer die fluoreszenzmikroskopische Analyse von gestreckter und immobilisierter DNA automatisiert wurde. Diese wurden herangezogen um die Mapping-Güte unterschiedlicher Modifikationsreaktionen mit fluoreszierenden AdoMet-Analoga und den Adenin-spezifischen DNA-MTasen M.TaqI und M.BseCI anhand von einheitlichen Kennzahlen sowie daraus berechnete Punktzahlen zu ermitteln. Dabei wurden literaturbekannte Bilderkennungsalgorithmen mit selbst entwickelten *Alignment*-Algorithmen auf Basis des Needleman-Wunsch-Algorithmus angewendet. Hierfür konnten keine nennenswerten Unterschiede für die einstufige Modifikation von T7-DNA (3 Erkennungssequenzen, niedrige Dichte) und von Lambda-DNA (15 Erkennungssequenzen, mittlere Dichte) mit M.BseCI aufgezeigt werden. Der Anteil zugeordneter Signale (*true positive*) in Bezug auf die jeweiligen *Map*-Einträge betrug jeweils 81 %, der Anteil falsch positiver Signale hingegen 10 %. Die dabei ermittelten relativen Punktzahlen waren nahezu identisch (0,68 bzw. 0,69). Im Vergleich dazu, wurde für die Modifikation mittels DNA-Blocking sowohl ein geringerer Anteil an zugeordneten Signalen (66 %), als auch eine geringere Punktzahl (0,54) erhalten. Dieser Effekt wurde damit begründet, dass ein Teil der Blocking-Sequenzen bereits methyliert wurden, und somit nicht zur weiteren Modifikation zur Verfügung standen. Diese Annahme wurde dadurch gestützt, dass der Anteil nicht zugeordneter Signale bei allen Proben vergleichbar war (12 %). Grundsätzlich konnte die Güte der Auswertung von mittels DNA-Combing gestreckter und immobilisierter sowie fluoreszenzmodifizierter genomischer DNA durch die Etablierung der beschriebenen Auswertungsroutine signifikant verbessert werden. Durch die computergestützte Analyse konnte der menschliche Faktor im Vergleich zu früherer Vorgehensweise minimiert, und der Durchsatz zur gleichen Zeit erhöht werden.

5 Experimenteller Teil

Teile der in diesem Kapitel beschriebenen Durchführungen wurden von Studierenden unter Anleitung im Rahmen von Forschungs- bzw. Abschlussarbeiten oder Laboranten durchgeführt. Dabei sind in chronologischer Reihenfolge die Arbeiten von Larissa Schilcher (M.Sc.), Alexander Schacht (B.Sc.), Lukas Reim (B.Sc.), Clara Ingelrham (B.Sc.), Mariella Bregu (B.Sc.), Lars Pritzlaff (M.Sc.), Luca Modolo (B.Sc.) und Noemi Tasca (B.Sc.) sowie Sascha Peters hervorzuheben.

5.1 Verwendete Materialien

5.1.1 Chemikalien

Alle technischen Lösungsmittel wurden vor Verwendung frisch destilliert. Wasser wurde grundsätzlich mittels Milli-Q Academic- und vorgeschalteter Elix 3 Essential-Anlage aufbereitet ($\sigma = 18,2 \text{ m}\Omega \text{ cm}^{-1}$). In Tabelle 5.1 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und deren Bezugsquelle in alphabetischer Reihenfolge aufgeführt. Alle Chemikalien wurden entsprechend der Spezifikationen des Herstellers gelagert.

Tabelle 5.1: Liste der verwendeten Chemikalien und deren Bezugsquelle.

Chemikalie	Bezugsquelle
Acetonitril (p.a.)	Thermo Fisher Scientific
AdoYnBiotinII	Dr. M. Martin (AK Weinhold)
AF647-N ₃	Thermo Fisher Scientific
Agarose	Sigma-Aldrich
Ameisensäure	Th. Geyer (ChemSolute)
Ammoniumchlorid	BASF
ATTO532-N ₃	ATTO-TEC
Borsäure	Gerbu Biotechnik
Bromphenolblau	Serva Electrophoresis
Calciumchlorid	Gerbu Biotechnik
CF640R-N ₃	Biotium
Chloroform (technisch)	Sigma-Aldrich
5-Chloropent-1-in	Sigma-Aldrich
DBCO-NHS-Ester (DBCO-NHS)	Sigma-Aldrich
Deca-1,9-diin	TCI Deutschland
Dichlormethan (99,8 %, DCM)	Acros Organics
Diethylether (technisch)	Grüssing
Dimethylformamid (99,8 %, DMF)	Acros Organics

Chemikalie	Bezugsquelle
Dimethylsulfoxid (99,7 %, DMSO)	Acros Organics
Dinatriumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich
1,4-Dithio-D,L-threitol (DTT)	Gerbu Biotechnik
Essigsäure (1 M)	Grüssing
Essigsäure (96 %)	Merck
Ethanol (p.a.)	ChemSolute
Ethylacetat (technisch, EE)	Hoesch
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Gerbu Biotechnik
GelRed™	Biotium
Glycerin	Gerbu Biotechnik
Hellmanex III	Helma Analytics
Hepta-1,6-diin	Sigma-Aldrich
Isopropanol (p.a.)	ChemSolute
Kaliumacetat	Fluka
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	J.T. Baker
Kupfersulfat	Riedel de Haën
Magnesiumchlorid Hexahydrat	J.T. Baker
Magnesiumsulfat	Merck
2-Mercaptoethanol	Serva Electrophoresis
Methanol (p.a.)	Thermo Fisher Scientific
Mesylchlorid	Merck
Natriumascorbat	Sigma-Aldrich
Natriumazid	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid	Gerbu Biotechnik
Natriumdihydrogenphosphat	Gerbu Biotechnik
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Gerbu Biotechnik
Natriumhydroxid	Sigma-Aldrich
<i>n</i> -Butyllithium	Acros Organics
<i>n</i> -Hexan (technisch)	Sigma-Aldrich
<i>N</i> -Hydroxysuccinimid (NHS)	Sigma-Aldrich
<i>n</i> -Pentan (technisch)	Sigma-Aldrich
Paraformaldehyd	Acros Organics

Chemikalie	Bezugsquelle
S-Adenosyl-L-Homocystein (AdoHcy)	Sigma-Aldrich
S-Adenosyl-L-Methionin (AdoMet)	Knoll Bioreserach
Salpetersäure (65 %)	ChemSolute
Salzsäure (37 %)	ChemSolute
Schwefelsäure (98 %)	Merck
SeaPlaque™-Agarose	Lonza
TAMRA-N ₃	Dr. S. Willnow
Tetrabutylammoniumiodid (TBAI)	Sigma-Aldrich
Tetrahydrofuran (technisch, THF)	Acros Organics
Triethylamin (TEA)	Fisher Scientific
Trifluoressigsäure (TFA)	Acros Organics
Trimethyl-[3-(trimethoxysilyl)-propyl]-ammoniumchlorid	TCI Deutschland
Tris-(3-hydroxypropyltriazolyl-methyl)-amin (THPTA)	Dr. S. Willnow (AK Weinhold)
Tris-(hydroxymethyl)-amino-methan (Tris-Base)	Gerbu Biotechnik
Tris(hydroxymethyl)-amino-methan-acetat (Tris-Acetat)	Gerbu Biotechnik
Tris-(hydroxymethyl)-amino-methan-hydrochlorid (Tris-HCl)	AppliChem
Vinyltrimethoxysilan	TCI Deutschland
YOYO™-1 Iodid	Invitrogen

5.1.2 Pufferlösungen

Alle selbst hergestellten Pufferlösungen (Tabelle 5.2) wurden mit frisch sterilisiertem und entgastem Wasser angesetzt. Hierzu wurde das Wasser vor Verwendung durch eine MF-Millipore™-Membran (0,22 µm, Burlington, USA) vakuumfiltriert. Nach Zugabe aller aufgeführten Substanzen mit Ausnahme der Reduktionsmittel wurde der pH-Wert bei 20 °C mittels NaOH_(aq) (10 bzw. 1 M) und HCl_(aq) (5 bzw. 1 M) eingestellt. Anschließend wurden die Thiolverbindungen zugegeben und die Puffer bis zu drei Monate bei 6 °C gelagert.

Tabelle 5.2: Selbst hergestellte Pufferlösungen und deren Zusammensetzung.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Blocking-Puffer (10 x)	Tris-Acetat (200 mM), K(OAc) (500 mM), CaCl ₂ (10 mM), DTT (10 mM), pH 7,9
Ladepuffer (6 x)	Glycerin (0,25 % _{v/v}), Bromphenolblau (0,25 % _{w/v})
M.BseCI-RP (10 x)	Tris-HCl (100 mM), EDTA (100 mM), 2-Mercaptoethanol (50 mM), pH 7,4
M.HhaI-RP (10 x)	Tris-HCl (100 mM), NaCl (500 mM), EDTA (50 mM), 2-Mercaptoethanol (20 mM), pH 7,4
M.SssI-RP (10 x)	Tris-HCl (100 mM), NaCl (500 mM), DTT (10 mM), pH 7,9
M.TaqI-RP (10 x)	Tris-Acetat (200 mM), K(OAc) (500 mM), Mg(OAc) ₂ (100 mM), DTT (10 mM), pH 7,9
PBS-Puffer (10 x)	KH ₂ PO ₄ (18 mM), Na ₂ HPO ₄ (100 mM), KCl (27 mM), NaCl (1,37 M), pH 7,4
TBE-Puffer (5 x)	Tris-Base (445 mM), H ₃ BO ₃ (445 mM), EDTA (10 mM), pH 8,0
TE-Puffer (10 x)	Tris-HCl (100 mM), EDTA (10 mM), pH 8,0

Zusätzlich wurden kommerzielle Puffersysteme unterschiedlicher Hersteller (Tabelle 5.3) verwendet. Alle kommerziellen Puffer wurden bei -20 °C gelagert.

Tabelle 5.3: Kommerzielle Pufferlösungen sowie Bezugsquelle und Zusammensetzung.

Bezeichnung	Bezugsquelle	Zusammensetzung
Agarasepuffer (1 x)	NEB	Bis-Tris-HCl (10 mM), EDTA (1 mM), pH 6,5 (25 °C)
Buffer G (10 x) ¹	Thermo Fisher	Tris-HCl (100 mM), NaCl (500 mM), MgCl ₂ (100 mM), BSA (1 mg mL ⁻¹), pH 7,5 (37 °C)
Buffer R (10 x) ²	Thermo Fisher	Tris-HCl (100 mM), KCl (1 M), BSA (1 mg mL ⁻¹), pH 8,5 (37 °C)
ExoI-Puffer (1 x)	NEB	Glycine-KOH (67 mM), MgCl ₂ (6,7 mM), 2-Mercaptoethanol (10 mM), pH 9,5 (25 °C)
CutSmart® (10 x) ³	NEB	Tris-Acetat (200 mM), K(OAc) (500 mM), Mg(OAc) ₂ (100 mM), BSA (1 mg mL ⁻¹), pH 7,9 (25 °C)
NEBuffer™ 3.1 (10 x) ⁴	NEB	Tris-HCl (500 mM), NaCl (1 M), MgCl ₂ (100 mM), BSA (1 mg mL ⁻¹), pH 7,9 (25 °C)

¹ R.Hin1I-Reaktionspuffer

² R.Psp1406I-Reaktionspuffer

³ R.AccI; R.AclI; R.BsiEI; R.BstUI; R.ClaI; R.HaeIII; R.HhaI; R.HpaII; R.Hpy188III;
R.HpyCH4IV; R.NarI; R.TaqI-Reaktionspuffer

⁴ R.HincII; R.PvuII; R.SalI-Reaktionspuffer

5.1.3 Marker-, Phagen- und Plasmid-DNA

Die in dieser Arbeit verwendete DNA ist in Tabelle 5.4 aufgeführt. Marker- und genomische Phagen-DNA wurde bei 6 °C, Plasmid-DNA hingegen bei –20 °C gelagert. Im Falle, dass die Phagen-DNA eine stark erhöhte Viskosität aufwies, wurde diese vor Verwendung für einige Minuten erhitzt (50 °C).

Tabelle 5.4: Liste der verwendeten DNA-Substrate und -Marker sowie deren Bezugsquelle.

DNA	Bezugsquelle
FastRuler DNA Ladder (LR)	Thermo Scientific
FastRuler DNA Ladder (MR)	Thermo Scientific
FastRuler DNA Ladder (HR)	Thermo Scientific
T7 DNA	Bioron
Lambda DNA	Thermo Scientific
biotinylierte Lambda DNA	LUMICKS
pUC19	New England Biolabs
pBR322	New England Biolabs
M13mp18	New England Biolabs
ΦX174	New England Biolabs

5.1.4 Oligonukleotide

Sämtliche DNA-Oligonukleotide (ODNs, Tabelle 5.5) wurden von Integrated DNA Technologie (Coralville, USA) in lyophilisierter Form bezogen, in TE-Puffer (1 x, 1 mM) gelöst und bis zur Verwendung bei –20 °C gelagert. Die Stoffmenge wurde anhand von Konzentrationsbestimmungen mittels UV-/VIS-Spektroskopie verifiziert und gegebenenfalls angepasst.

Tabelle 5.5: Liste der verwendeten Oligonukleotide und deren Sequenzen.

Kurzname	Sequenz
ODN2-NH ₂	NH ₂ -C ₆ -5'-TT-3'
ODN5-NH ₂	NH ₂ -C ₆ -5'-TTATA-3'
ODN8-NH ₂	NH ₂ -C ₆ -5'-TTATACAT-3'
ODN11-NH ₂	NH ₂ -C ₆ -5'-TTATACATCTA-3'
ODN14-C ₆ -NH ₂	NH ₂ -C ₆ -5'-GCCGCTGCATGCCG-3'
ODN14-C ₁₂ -NH ₂	NH ₂ -C ₁₂ -5'-GCCGCTGCATGCCG-3'
ODN14-PEG ₆ -C ₆ -NH ₂	NH ₂ -C ₆ -PEG ₆ -5'-GCCGCTGCATGCCG-3'
ODN14-PEG ₆ -C ₁₂ -NH ₂	NH ₂ -C ₁₂ -PEG ₆ -5'-GCCGCTGCATGCCG-3'

5.1.5 Enzyme

Im Folgenden sind sämtliche arbeitskreisintern hergestellten und kommerziell erworbenen Enzyme aufgelistet (Tabelle 5.6). Die Zielbase innerhalb der spezifischen palindromischen Erkennungssequenz der DNA-Methyltransferasen (DNA-MTasen) ist hervorgehoben. Bei der durch M.CviBIII, M.BseCI und M.TaqI katalysierten Reaktion handelt es sich um eine Modifikation der N⁶-Position des Adenins, bei M.HhaI und M.SssI hingegen um eine Modifikation der C⁵-Position des Cytosins. Bei letzteren handelt es sich um Mutanten des Wildtyps. Die Aminosäuren, die im Vergleich zum Wildtyp ausgetauscht wurden, sind unterhalb der Tabelle aufgeführt. Die genaue Position der Hydrolyse innerhalb der spezifischen palindromischen Erkennungssequenz der Restriktionsendonukleasen des Typs II (REasen) sind durch einen Pfeil markiert. Liegt die Schnittstelle in der Mitte der Erkennungssequenz, weist das Reaktionsprodukt sogenannte *blunt ends* auf, wohingegen es sich in anderen Fällen um *sticky ends* handelt.

Tabelle 5.6: Liste der verwendeten Enzyme sowie Klasse, Spezifität und Bezugsquelle.

Enzym	Klasse	Spezifität	Bezugsquelle
β -Agarase I	Glycano-hydrolase	-	New England Biolabs
Proteinase K	Serinprotease	-	Qiagen
M.TaqI	DNA-MTase	5'-TCGA-3'	K. Glensk (AK Weinhold)
M.CviBIII	DNA-MTase	5'-TCGA-3'	K. Glensk (AK Weinhold)
M.BseCI	DNA-MTase	5'-ATCGAT-3'	K. Glensk (AK Weinhold)
M.HhaI (tm) ¹	DNA-MTase	5'-GCGC-3'	K. Glensk (AK Weinhold)
M.SssI (dm) ²	DNA-MTase	5'-CG-3'	K. Glensk (AK Weinhold)

Enzym	Klasse	Spezifität	Bezugsquelle
R.TaqI	REase Typ II	5'-T↓CGA-3'	New England Biolabs
R.ClaI	REase Typ II	5'-AT↓CGAT-3'	New England Biolabs
R.HhaI	REase Typ II	5'-GCG↓C-3'	New England Biolabs
R.AccI	REase Typ II	5'-GT↓MKAC-3'	New England Biolabs
R.AclI	REase Typ II	5'-AA↓CGTT-3'	New England Biolabs
R.BsiEI	REase Typ II	5'-GCRY↓CG-3'	New England Biolabs
R.BstUI	REase Typ II	5'-CG↓CG-3'	New England Biolabs
R.HaeIII	REase Typ II	5'-GG↓CC-3'	New England Biolabs
R.HinI	REase Typ II	5'-GR↓CGYC-3'	New England Biolabs
R.HincII	REase Typ II	5'-GTY↓RAC-3'	New England Biolabs
R.HpaII	REase Typ II	5'-C↓CGG-3'	New England Biolabs
R.Hpy188III	REase Typ II	5'-TC↓NNGA-3'	New England Biolabs
R.HpyCH4IV	REase Typ II	5'-A↓CGT-3'	New England Biolabs
R.NarI	REase Typ II	5'-GG↓CGCC-3'	New England Biolabs
R.NdeI	REase Typ II	5'-CA↓TATG-3'	New England Biolabs
R.Psp1406I	REase Typ II	5'-AA↓CGTT-3'	New England Biolabs
R.PvuII	REase Typ II	5'-CAG↓CTG-3'	New England Biolabs
R.SalI	REase Typ II	5'-G↓TCGAC-3'	New England Biolabs

K = G/T; M = A/C; N = A/C/G/T; R = A/G; Y = C/T

¹ Q82A/Y254S/N304A

² Q142A/N370A

5.1.6 Geräte

Alle verwendeten Geräte sind in alphabetischer Reihenfolge in Tabelle 5.7 gelistet. Systeme aus mehreren Einzelkomponenten sind gruppiert aufgeführt.

Tabelle 5.7: Liste der verwendeten Geräte sowie deren Modellbezeichnung und Hersteller.

Gerät	Modellbezeichnung	Hersteller
Analysewaage	Modell B121S	Sartorius
Fluoreszenzspektrometer	Cary Eclipse	Varian
Gefriertrocknungsanlage	Alpha 1-2	Christ
Gefriertrocknungsanlage	Savant SPD111V Savant RVT100	Thermo Scientific

Gerät	Modellbezeichnung	Hersteller
Geldokumentationssystem	Gel iX System Digitale CCD-Kamera UV-Transilluminator (312 nm) Filter (540 ± 50 nm)	Intas
Gelelektrophoresekammer	Sub-Cell GT Mini	Bio-Rad
Heizblock	HLC HBT 130	Ditabis
Inkubator (37 °C)	Function Line	Heraeus
Inkubator (65 °C)	Modell Mini 10	MWG
Laborwaage	Modell LP420	Sartorius
Laborwaage	Modell TE313S	Sartorius
Mikrowelle	Micromat	AEG
pH-Meter	Calimatic 766 Elmetron IJ44C	Knick
Pipetten	Pipetman (2; 10; 20; 100; 200; 1000 µL)	Gilson
Reinstwasseranlage	MilliQ Academic Elix 3 Essential	Millipore
<i>rp</i> -HPLC	Breeze System Binäres Pumpensystem 1525 Dualer Absorbanzdetektor 2487	Waters
Schüttelinkubator	Modell 3031	GFL
Spannungsquelle	PowerPac 300	Bio-Rad
Tischzentrifuge	Centrifuge 5415 D	Eppendorf
Trockenschrank	Modell T6060	Heraeus
UV/Vis-Spektrometer	Cary 3E	Varian
Vortexer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries

5.2 Instrumentelle Methoden

5.2.1 *rp*-HPLC

Die Aufreinigung der synthetisierten AdoMet-Analoga und einiger Vorstufen erfolgte mittels *rp*-HPLC. Nachfolgend ist zunächst die Zusammensetzung der verwendeten Eluenten in Tabelle 5.8 aufgeführt. Anschließend werden die sowohl analytisch als auch präparativ genutzten Methoden tabellarisch beschrieben. Grundsätzlich kann dabei zwischen neutralen

(Tabelle 5.9 und 5.10) und sauren (Tabelle 5.11 und 5.12) Systemen unterschieden werden. Bei allen Läufen wurden ProntoSil C-18 Säulen (Bischoff, Leonberg) verwendet (Analytisch: 1 mL min⁻¹, Säule: 5,0 µm, 250 x 4,6 mm, Vorsäule: 5,0 µm, 20 x 4,0 mm; Präparativ: 10 mL min⁻¹, Säule: 5,0 µm, 250 x 20 mm, Vorsäule: 5,0 µm, 30 x 20 mm. Die verwendeten Eluenten wurden vor Verwendung mit einem Polyamid-Filter (0,2 µm, Sartorius, Göttingen) filtriert. Alle Proben wurden vor der Injektion zentrifugiert, um etwaig vorhandene feste Bestandteile abzutrennen. Die Detektion der Verbindungen erfolgte unabhängig der eingesetzten Methode bei unterschiedlichen Wellenlängen, welche daher nicht im allgemeinen Teil, sondern in der jeweiligen Synthesevorschrift angegeben sind. Vor allen Läufen wurde das HPLC-System so lange unter Startbedingungen equilibriert, bis eine stabile Basislinie zu beobachten war. Die Steuerung des HPLC-Systems erfolgte durch die Software Waters Breeze (Version 3.02).

Tabelle 5.8: Zusammensetzung der HPLC-Elutionspuffer.

Eluent	Zusammensetzung
A (neutral)	100 % v/v Wasser, TEAAc (10 mM)
B (neutral)	70 % v/v Acetonitril, 30 % v/v Wasser, TEAAc (10 mM)
A (sauer)	100 % v/v Wasser, 0,01 % v/v TFA
B (sauer)	70 % v/v Acetonitril, 30 % v/v Wasser, 0,01 % v/v TFA

Tabelle 5.9: Methode N1.

t (min)	% A	% B
0	85	15
25	40	60
26	0	100
30	0	100

Tabelle 5.10: Methode N2.

t (min)	% A	% B
0	90	10
30	60	40
31	0	100
35	0	100

Tabelle 5.11: Methode S1.

t (min)	% A	% B
0	88	12
10	80	20
40	0	100
45	0	100

Tabelle 5.12: Methode S2.

t (min)	% A	% B
0	93	7
29	75	25
30	0	100
35	0	100

5.2.2 UV/VIS-Spektroskopie

Die Konzentration der AdoMet-Analoga mit reaktiven oder fluoreszierenden Endgruppen sowie solche mit ODN-Modifikationen wurden mittels UV/Vis-Spektroskopie bestimmt. Hinzu kommt die Konzentrationsbestimmung der Ausgangsstoffe bei den Synthesen letzterer. Die Messungen wurden mithilfe der Software Cary WinUV (Version 3.0) gesteuert. In allen Fällen wurde zunächst eine Basislinie aufgenommen, indem das Pufferlösung/Wasser-Gemisch in welchem die Substanz der nachfolgenden Probe verdünnt wurde separat gemessen und von der nächsten Messung subtrahiert wurde. Sämtliche Proben wurden so verdünnt, dass die zunächst grob abgeschätzte Konzentration nach LAMBERT-BEER eine Absorbanz von 0,5 ergeben würde. Dieses Vorgehen wurde so lange wiederholt bis eine tatsächliche Absorbanz von 0,2-0,8 gemessen wurde. Dazu wurde der zunächst gewählte Verdünnungsfaktor entsprechend korrigiert und gegebenenfalls eine neue Messung der Basislinie durchgeführt. Letztlich wurde die genaue Konzentration der ursprünglichen Lösung durch Multiplikation der nach LAMBERT-BEER berechneten Konzentration des Analyts und dem jeweiligen Verdünnungsfaktor berechnet.

5.2.3 Agarosegelelektrophorese

Eine Dispersion von Agarose (0,21-0,70 g, $w = 0,7-2,0\%$) in TBE-Puffer (0,5 x, 30-35 mL) wurde in einer Mikrowelle (700 W) mehrfach zum Sieden gebracht, bis die Agarose vollständig gelöst vorlag. Daraufhin wurde das dabei verdampfte Wasser aufgefüllt, GelRed® zugegeben (3,0-3,5 μL , $\varphi = 1:10\,000$) und die Lösung ein weiteres mal zum Sieden gebracht. Anschließend wurde die Lösung zunächst mit Parafilm abgedeckt und nach 2 min bei RT in die Elektrophoresekammer überführt. Nach Erstarren des Gels ($> 30\text{ min}$) wurde die Kammer mit Laufpuffer (300 mL) gefüllt und die Analyseproben (6-40 μL , 0,05-0,2 μg DNA) in die Taschen des Gels aufgetragen. Die Elektrophorese wurde durch Anlegen einer elektrischen Spannung (50-120 V, $3-8\text{ V cm}^{-1}$, 30-90 min) gestartet. Abschließend wurden die elektrophoretisch aufgetrennten DNA-Fragmente durch Anregung des Interkalators mittels UV-Strahlung (312 nm) sichtbar gemacht und unter Verwendung des Geldokumentationssystems fotografiert. Die weitere Analyse erfolgte mittels des Grafikprogramms ImageJ (Version 1.51k, Fiji Edition) in Kombination mit bereits existierenden und selbst entwickelten Macros. Grundsätzlich wurde dabei die relative Laufdistanz einzelner Banden und deren Intensität bestimmt bzw. verglichen. Sämtliche Informationen über Erkennungssequenzen von Enzymen und Substraten wurden mithilfe des Programms NEBCutter (Version 2.0) sowie der Internetdatenbank REBASE ermittelt.

5.2.4 Fluoreszenzmikroskopie

5.2.4.1 Oberflächenmodifikation

Deckgläser (8 Stück, 22 x 22 mm, No. 1) wurden in einer Teflonhalterung platziert, in ein Becherglas mit Königswasser (60 mL, HNO_3/HCl , 1:3) überführt und 16 h bei RT inkubiert. Die Deckgläser wurden anschließend zunächst in einem Becherglas mit frischem Wasser (3 x 60 mL) gewaschen, woraufhin jedes Deckglas einzeln gründlich mit Wasser abgespült wurde. Die selben Waschschrte erfolgten daraufhin erneut unter Verwendung von Ethanol.

Zuletzt wurde die Teflonhalterung in einer wässrigen Silanlösung (200 mL) mit N-Trimethyl(3-methoxysilylpropyl)ammoniumchlorid (**16**, 330 μL) und Vinylmethoxysilan (**17**, 120 μL) 16 h bei 65 °C inkubiert. Erneut folgten die bereits beschriebenen Waschschr tte mit Wasser und Ethanol. Die modifizierten Deckgläser wurden für bis zu mehrere Wochen in Methanol (60 mL) gelagert und vor der eigentlichen Verwendung im Argonstrom getrocknet.

5.2.4.2 Probenvorbereitung

Die Herstellung der Mikroskopiel sungen erfolgte grundsätzlich unmittelbar vor der Durchführung der Fluoreszenzmikroskopie. Dabei wurden Lösungen (16 μL , TE-Puffer) mit YOYOTM-1 (0,5 bp⁻¹), aus vorangegangenen Modifikationsreaktionen (Abschnitt 5.5 und 5.6) erhaltener genomischer DNA (5 ng μL^{-1}) und DTT (200 mM) angesetzt. Die Lösungen wurden nach der Zugabe des DNA-Interkalators gründlich durchmischt und vor Zugabe des Dithiols 1 h bei 50 °C inkubiert.

5.2.4.3 Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie wurde im AK Wöll am Institut für Physikalische Chemie (RWTH Aachen University) durchgeführt. Dabei war Dr. Oleksii Nevskyi unterstützend beteiligt. Das oberflächenmodifizierte Deckglas wurde mittig auf einem weiteren nicht modifizierten mittels Luftplasma gereinigten Probenträger (24 x 50 mm, No. 1) platziert, woraufhin ein Teil der zuvor angesetzten Mikroskopiel sung (1 μL) unmittelbar neben dem oberen Deckglas auf den Probenträger pipettiert wurde. Nachdem die Probenlösung zwischen beide Glasoberflächen vorgedrungen war, wurden fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen unter Verwendung eines kommerziellen Spinning-Disk Systems (VisiScope Confocal-CSUX1, Visitron Systems, Puchheim) angefertigt. Der Probenträger wurde dafür auf einem xyz-Piezotisch (P-545.3R7, Physik Instrumente, Karlsruhe) fixiert, welcher wiederum auf einem invertierten Mikroskop (Eclipse Ti-E, Nikon, Chiyodo, Japan) montiert vorlag. Die Anregung von YOYOTM-1, TAMRA, CF640R und AF647 erfolgte entsprechend der Exzitationswellenl ngen durch einen 488 nm Laser (iBeam smart 488S-HP, 200 mW, Toptica, Gräfelfing), einen 561 nm Laser (DPSS Jive, 500 mW, Cobolt, Solna, Schweden) und einen 640 nm Laser (iBeam smart 640-CD, 200 mW, Toptica, Gräfelfing). Die Fluoreszenz wurde in einem Ölimmersionsobjektiv (HP PLAN, Nikon, Chiyodo, Japan) gesammelt, spektral mittels Strahlentrenner (Di01-T405/488/568/647, Semrock, Rochester, USA) vom Anregungslicht getrennt und durch eine EMCCD Kamera (iXON Ultra 888, Andor, Belfast, Nordirland) abgebildet. Zur Unterdrückung der restlichen, durch den Exzitationslaser verursachten Hintergrundstrahlung, wurden entsprechende Bandpassfilter (ET525/50 und ET685/70, Chroma, Bellow Falls, USA) im Emissionsgang verwendet. Alle Messungen wurden bei 20 °C durchgeführt.

5.3 Synthesen doppeltaktivierter AdoMet-Analoga

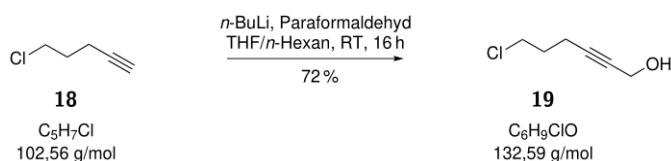
Im Folgenden sind die Synthesevorschriften sämtlicher AdoMet-Analoga und etwaige Zwischenstufen aufgeführt. Es erfolgt eine Unterteilung in reaktive, fluoreszierende und ODN-

modifizierte Verbindungen. Erstere dienen dabei als Ausgangsstoff für die Darstellung der AdoMet-Analoga mit Fluorophoren und ODNs. Bei AdoYnYn und AdoYnAzid^[50] sowie AdoYn-TAMRA^[16,38] und AdoYnCF640R^[53] handelt es sich um literaturbekannte Verbindungen. Die hier aufgeführten Durchführungen erfolgten in Anlehnung an die angegebenen Literatur.

5.3.1 Synthesen reaktiver AdoMet-Analoga

5.3.1.1 AdoYnAzid^[50]

6-Chlorohex-2-in-1-ol

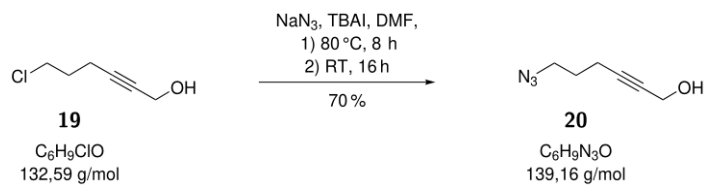


5-Chloropent-1-in (**18**, 1,10 g, 10,7 mmol, 1,0 Äq.) wurde bei -78°C unter Argonatmosphäre in trockenem THF (9,5 mL) vorgelegt und mit in *n*-Hexan gelöstem *n*-BuLi (1,6 M, 6,7 mL, 10,7 mmol, 1,0 Äq.) versetzt. Nach 10 min wurde Paraformaldehyd (0,81 g, entspricht 26,8 mmol Formaldehyd, 2,5 Äq.) zugegeben und das Gemisch über Nacht bei RT gerührt. Daraufhin wurde ges. NH_4Cl -Lösung (10 mL) und Diethylether (20 mL) zugegeben. Die Phasen wurden getrennt, die wässrige Phase mit Diethylether extrahiert (2 x 5 mL) und die vereinigten organischen Phasen mit NH_4Cl -Lösung (2 x 5 mL) und ges. NaCl-Lösung (2 x 5 mL) gewaschen. Anschließend wurde über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Reaktionsprodukt **19** wurde mittels Säulenchromatographie aufgereinigt (*n*-Pentan/EE 7:3 v/v) und als farbloses Öl erhalten.

Ausbeute: 1,02 g (7,69 mmol, 72 %)

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 1,97 (quin, 3J = 6,6 Hz, 2 H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 2,42 (tt, 3J = 6,6 Hz, 5J = 2,1 Hz, 2 H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{C}-$), 3,65 (t, 3J = 6,6 Hz, 2 H, $-\text{CH}_2\text{Cl}$), 4,25 (t, 5J = 2,1 Hz, 2 H, $-\text{CH}_2\text{OH}$) ppm.

6-Azidohept-2-yn-1-ol

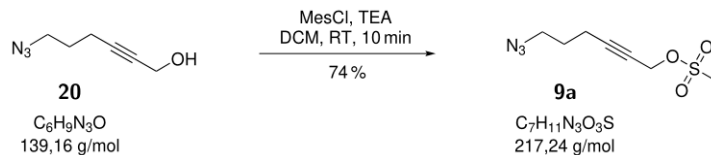


6-Chlorohept-2-yn-1-ol (**19**, 1,01 g, 7,6 mmol, 1,0 Äq.), NaN_3 (1,47 g, 22,6 mmol, 3,0 Äq.) und TBAI (0,28 g, 0,75 mmol, 0,1 Äq.) wurden in trockenem DMF (50 mL) gelöst. Die Reaktionslösung wurde zunächst für 8 h bei 80 °C und dann weitere 16 h bei RT gerührt. Der vollständige Umsatz wurde mittels 1H -NMR ($CDCl_3$) verifiziert, das Gemisch daraufhin mit Ethylacetat verdünnt (40 mL) und mit H_2O (2 x 20 mL) und ges. NaCl-Lösung (2 x 20 mL) gewaschen. Anschließend wurde über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

Ausbeute: 0,74 g (5,31 mmol, 70 %)

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 1,78 (quin, 3J = 6,7 Hz, 2 H, $-CH_2CH_2CH_2-$), 3,41 (t, 3J = 6,7 Hz, 2 H, $-CH_2N_3$), 4,25 (t, 5J = 2,2 Hz, 2 H, $-CH_2OH$) ppm.

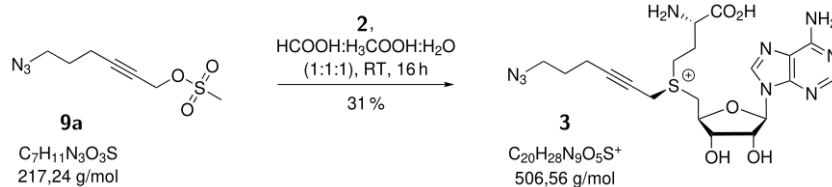
6-Azidohept-2-yn-1-ylmethansulfonat



6-Azidohept-2-yn-1-ol (**20**, 0,65 g, 4,7 mmol, 1,0 Äq.) sowie Mesylchlorid (0,47 mL, 6,1 mmol, 1,3 Äq.) und TEA (1,11 mL, 8,0 mmol, 1,7 Äq.) wurden bei 0 °C unter Argonatmosphäre in trockenem DCM (4 mL) gelöst und anschließend 10 min bei RT gerührt. Im Anschluss wurde das Reaktionsgemisch mit H_2O (2 mL) versetzt, mit verd. HCl (1 M, 1 mL) und ges. NaCl-Lösung (1 mL) gewaschen, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das erhaltene Produkt **9a** direkt in der nächsten Reaktion eingesetzt.

Ausbeute: 0,75 g (3,45 mmol, 74 %)

AdoYnAzid



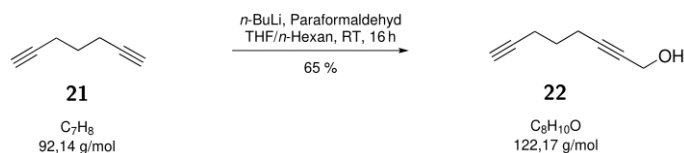
Es wurden 6-Chlorohex-2-in-1-ylmethansulfonat (**9a**, 181 mg, 833 μmol , 32,0 Äq.), und AdoHcy (**2**, 10 mg, 26 μmol , 1,0 Äq.) in einem Gemisch aus Essigsäure, Ameisensäure und Wasser (1,8 mL, 1:1:1) gelöst. Der Umsatz wurde mittels *rp*-HPLC verfolgt (analytisch, Methode S1, 260/272 nm) und das Reaktionsprodukt **3** nach vollständigem Ablauf der Reaktion (16 h) epimerenrein isoliert (präparativ, Methode S1, 260/272 nm). Nach Gefriertrocknung erfolgte die Bestimmung der Konzentration durch Messung der UV-Absorption ($\epsilon_{260} = 15\,400\text{ L mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$). Zur Überprüfung der Reinheit des Produktes **3** wurde eine Einzelinjektion durchgeführt (analytisch, Methode S1, 260/272 nm).

Ausbeute: 8,04 μmol (31 %)

MS (ESI, pos., 70 eV): m/z (%) = 506,19 $[\text{M}]^+$ (100), 405,14 $[\text{TE}+\text{H}]^+$ (15).

5.3.1.2 AdoYnYn (kurz)^[50]

Octa-2,7-diin-1-ol

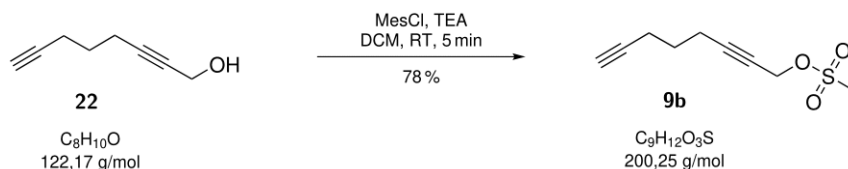


Hepta-1,6-diin (**21**, 2,0 mL, 17,7 mmol, 1,3 Äq.) wurde bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ unter Argonatmosphäre in trockenem THF (44 mL) vorgelegt und mit in n -Hexan gelöstem n -BuLi (1,6 M 8,45 mL, 13,5 mmol, 1,0 Äq.) versetzt. Nach 10 min wurde Paraformaldehyd (0,41 g, entspricht 13,6 mmol Formaldehyd, 1,0 Äq.) zugegeben und das Gemisch über Nacht bei RT gerührt. Daraufhin wurde NH_4Cl -Lösung (15 mL) und Diethylether (30 mL) zugegeben. Die Phasen wurden getrennt, die wässrige Phase mit Diethylether extrahiert (2 x 7,5 mL) und die vereinigten organischen Phasen mit NH_4Cl -Lösung (2 x 7,5 mL) und ges. NaCl-Lösung (2 x 7,5 mL) gewaschen. Anschließend wurde über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Reaktionsprodukt **22** wurde mittels Säulenchromatographie aufgereinigt (n -Pentan/EE 5:1 v/v) und als farbloses Öl erhalten.

Ausbeute: 1,08 g (8,83 mmol, 65 %)

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 1,72 (quin, 3J = 7,0 Hz, 2 H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 1,96 (t, 4J = 2,7 Hz, 1 H, $-\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$), 2,30 (td, 3J = 7,0 Hz, 4J = 2,7 Hz, 2 H, $-\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$), 2,35 (tt, 3J = 7,1 Hz, 5J = 2,1 Hz, 2 H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CCH}_2-$), 4,24 (t, 5J = 2,1 Hz, 2 H, $-\text{CH}_2\text{OH}$) ppm.

Octa-2,7-diin-1-ylmethansulfonat

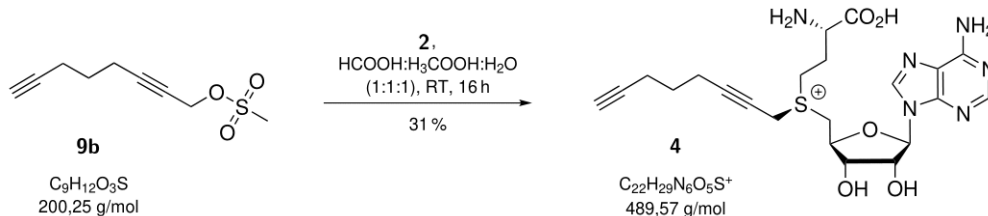


Octa-2,7-diin-1-ol (**22**, 0,60 g, 4,9 mmol, 1,0 Äq.), Mesylchlorid (0,49 mL, 6,4 mmol, 1,3 Äq.) und TEA (1,15 mL, 8,3 mmol, 1,7 Äq.) wurden bei 0 °C unter Argonatmosphäre in trockenem DCM (8 mL) gelöst und anschließend 5 min bei RT gerührt. Im Anschluss wurde das Reaktionsgemisch mit H₂O (2 mL) versetzt, mit verd. HCl (1 M, 1 mL) und ges. NaCl-Lösung (1 mL) gewaschen und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

Ausbeute: 0,76 g (3,81 mmol, 78 %)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1,75 (quin, ³J = 7,3 Hz, 2 H, -CH₂CH₂CH₂-), 1,97 (t, ⁴J = 2,4 Hz, 1 H, -CH₂C≡CH), 2,30 (td, ³J = 7,2 Hz, ⁴J = 2,4 Hz, 2 H, -CH₂C≡CH), 2,41 (tt, ³J = 7,3 Hz, ⁵J = 2,3 Hz, 2 H, -CH₂CH₂C≡CCH₂-), 3,11 (s, 3 H, -SO₂CH₃), 4,84 (t, ⁵J = 2,4 Hz, 2 H, -CH₂O-) ppm.

AdoYnYn (kurz)



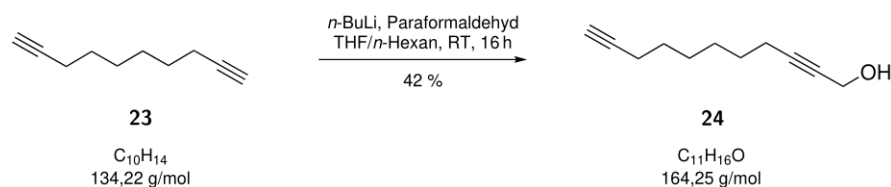
Es wurden Octa-2,7-diin-1-ylmethansulfonat (**9b**, 670 mg, 3,3 mmol, 32,0 Äq.) und AdoHcy (**2**, 40 mg, 102 µmol, 1,0 Äq.) in einem Gemisch aus Essigsäure, Ameisensäure und Wasser (7,2 mL, 1:1:1) gelöst. Der Umsatz wurde mittels *rp*-HPLC verfolgt (analytisch, Methode S1, 260/272 nm) und das Reaktionsprodukt **4** nach vollständigem Ablauf der Reaktion (16 h) epimerenrein isoliert (präperativ, Methode S1, 260/272 nm). Nach Gefriertrocknung erfolgte die Bestimmung der Konzentration durch Messung der UV-Absorption ($\epsilon_{260} = 15\,400\text{ L mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$). Zur Überprüfung der Reinheit des Reaktionsproduktes **4** wurde eine Einzelinjektion durchgeführt (analytisch, Methode S1, 260/272 nm).

Ausbeute: 40,0 µmol (31 %)

MS (ESI, pos., 70 eV): *m/z* (%) = 489,19 [M]⁺ (100), 388,14 [TE+H]⁺ (21).

5.3.1.3 AdoYnYn (lang)

Undeca-2,10-diin-1-ol

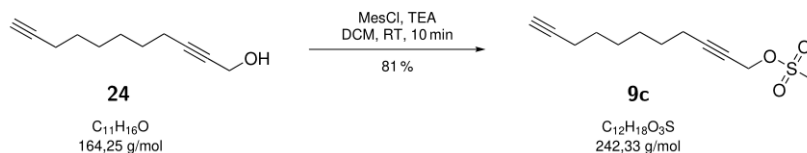


Deca-1,9-diin (**23**, 2,0 mL, 12,5 mmol, 1,3 Äq.) wurde bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ unter Argonatmosphäre in trockenem THF (35 mL) vorgelegt und mit in n -Hexan gelöstem n -BuLi (1,6 M, 5,88 mL, 9,4 mmol, 1,0 Äq.) versetzt. Nach 10 min wurde Paraformaldehyd (0,28 g, entspricht 9,4 mmol Formaldehyd, 1,0 Äq.) zugegeben und das Gemisch über Nacht bei RT gerührt. Daraufhin wurde NH_4Cl -Lösung (10 mL) und Diethylether (20 mL) zugegeben. Die Phasen wurden getrennt, die wässrige Phase mit Diethylether extrahiert (2 x 5 mL) und die vereinigten organischen Phasen mit NH_4Cl -Lösung (2 x 5 mL) und ges. NaCl-Lösung (2 x 5 mL) gewaschen. Anschließend wurde über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Reaktionsprodukt **24** wurde mittels Säulenchromatographie aufgereinigt (Pentan/EE 5:1 v/v) und als farbloses Öl erhalten.

Ausbeute: 0,65 g (3,96 mmol, 42 %)

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ = 1,38–1,44 (m, 4 H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 1,49–1,56 (m, 4 H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 1,94 (t, 4J = 2,6 Hz, 1 H, $-\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$), 2,19 (td, 3J = 7,6 Hz, 4J = 2,6 Hz, 2 H, $-\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$), 2,22 (tt, 3J = 6,9 Hz, 5J = 2,0 Hz, 2 H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CCH}_2-$), 4,25 (t, 5J = 2,1 Hz, 2 H, $-\text{CH}_2\text{OH}$ ppm).

Undeca-2,10-diin-1-ylmethansulfonat

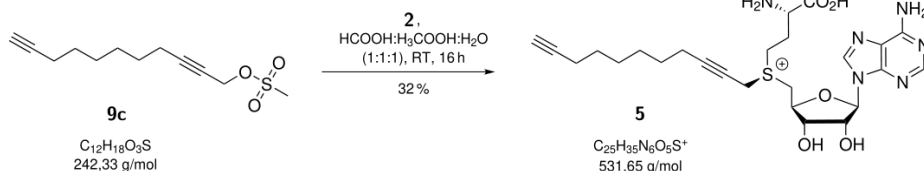


Undeca-2,10-diin-1-ol (**24**, 0,37 g, 2,3 mmol, 1,0 Äq.), Mesylchlorid (0,23 mL, 2,9 mmol, 1,3 Äq.) und TEA (0,53 mL, 3,9 mmol, 1,7 Äq.) bei 0 °C wurden unter Argonatmosphäre in trockenem DCM (4 mL) gelöst und anschließend 10 min bei RT gerührt. Im Anschluss wurde das Reaktionsgemisch mit H₂O (2 mL) versetzt, mit verd. HCl (1 M, 1 mL) und ges. NaCl-Lösung (1 mL) gewaschen und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

Ausbeute: 0,44 g (1,82 mmol, 81 %)

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 1,38–1,44 (m, 4 H, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-), 1,49–1,57 (m, 4 H, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-), 1,94 (t, ⁴J = 2,7 Hz, 1 H, -CH₂C≡CH), 2,19 (td, ³J = 7,0 Hz, ⁴J = 2,7 Hz, 2 H, -CH₂C≡CH), 2,26 (tt, ³J = 7,1 Hz, ⁵J = 2,2 Hz, 2 H, -CH₂CH₂C≡CCH₂-), 3,11 (s, 3 H, -SO₂CH₃), 4,85 (t, ⁵J = 2,2 Hz, 2 H, -CH₂O-) ppm.

AdoYnYn (lang)

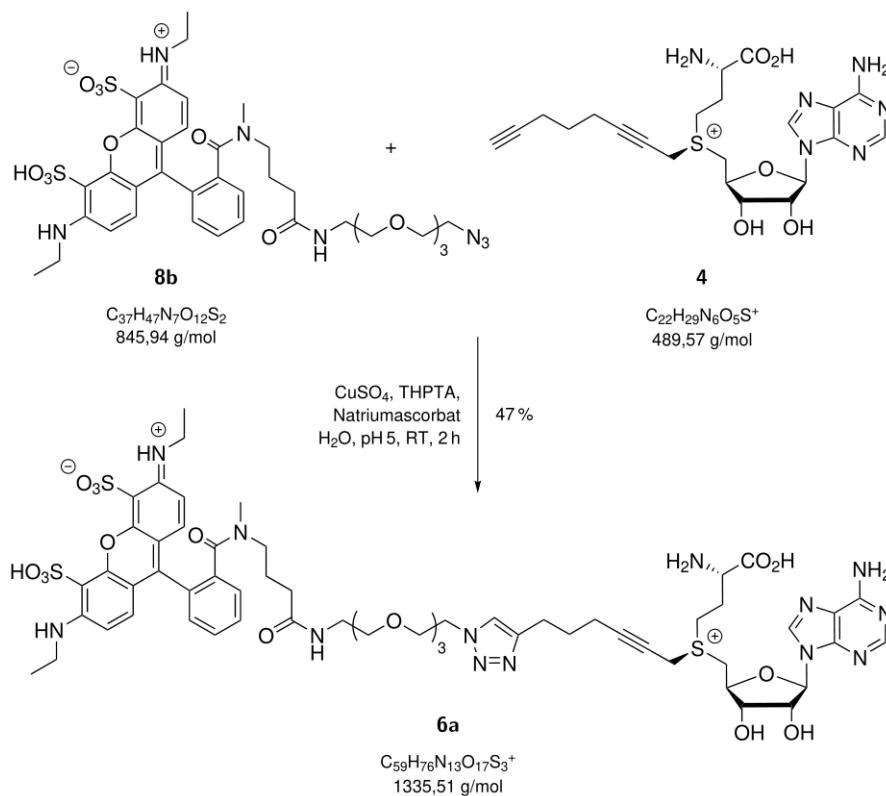


Undeca-2,10-diin-1-ylmethansulfonat (**9c**, 203 mg, 838 μ mol, 32,0 Äq.) und AdoHcy (**2**, 10 mg, 26 μ mol, 1,0 Äq.) wurden in einem Gemisch aus Essigsäure, Ameisensäure und Wasser (1,8 mL, 1:1:1) gelöst. Der Umsatz wurde mittels *rp*-HPLC verfolgt (analytisch, Methode S1, 260/272 nm) und das Reaktionsprodukt **5** nach vollständigem Ablauf der Reaktion (16 h) epimerenrein isoliert (präperativ, Methode S1, 260/272 nm). Nach Gefriertrocknung erfolgte die Bestimmung der Konzentration durch Messung der UV-Absorption ($\epsilon_{260} = 15\,400\text{ L mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$). Zur Überprüfung der Reinheit des Reaktionsproduktes **5** wurde eine Einzelinjektion durchgeführt (analytisch, Methode S1, 260/272 nm).

Ausbeute: 8,40 μ mol (32 %)

5.3.2 Synthesen fluoreszierender AdoMet-Analoga

5.3.2.1 AdoYnATTO532

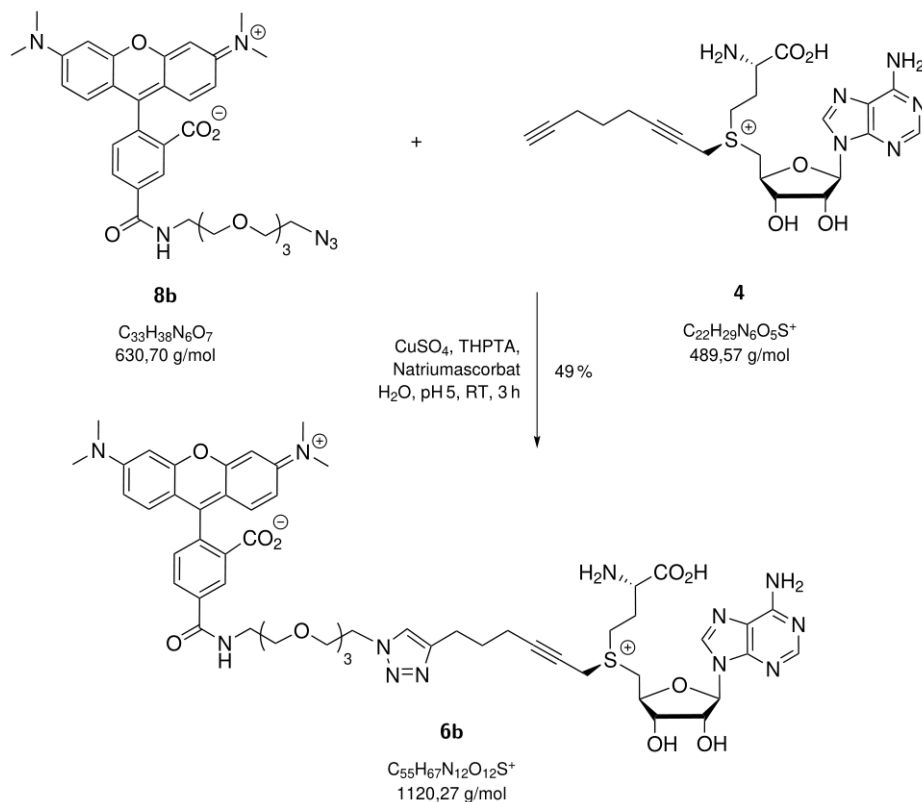


Es wurden Wasser (386,4 μ L), wässrige CuSO₄-Lösung (20,0 μ L, 25,0 mM, 500 nmol, 0,5 Äq.), THPTA-Lösung (16,7 μ L, 30,0 mM, 500 nmol, 0,5 Äq.) und Natriumascorbatlösung (83,3 μ L, 500 mM, 41,7 μ mol, 41,7 Äq.) vorgelegt und mit verdünnter Schwefelsäure (1:20, 3 μ L) auf pH 5 eingestellt. Anschließend wurden wässrige Lösungen von ATTO532-N₃ (**8a**, 94,3 μ L, 10,6 mM, 1000 nmol, 1 Äq.) und AdoYnYn (kurz) (**4**, Eluent A (sauer), 232,6 μ L, 4,3 mM, 1000 nmol, 1 Äq.) zugegeben. Der Umsatz wurde daraufhin stündlich mittels *rp*-HPLC verfolgt (analytisch, Methode S2, 260/532 nm) und das Reaktionsprodukt **6a** nach vollständigem Ablauf der Reaktion (2 h) isoliert (analytisch, Methode S2). Nach Gefriertrocknung der Lösung erfolgte die Bestimmung der Konzentration durch Messung der UV-Absorption ($\epsilon_{532} = 115\,000\text{ L mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$). Zur Überprüfung der Reinheit des Reaktionsproduktes **6a** wurde eine Einzelinjektion durchgeführt (analytisch, Methode S2, 260/532 nm).

Ausbeute: 468 nmol (47 %)

MS (ESI, pos., 70 eV): m/z (%) = 1356,45 [M-H+Na]⁺ (58), 1334,46 [M]⁺ (91), 1277,38 [TE-H+2Na]⁺ (54), 1271,37 [TE+K]⁺ (45), 689,72 [M-H+Na₂]²⁺ (43), 678,73 [M+Na]²⁺ (58), 647,18 [TE+Na+K]²⁺ (81), 636,19 [TE+H+K]²⁺ (91).

5.3.2.2 AdoYnTAMRA (kurz)^[16,38]

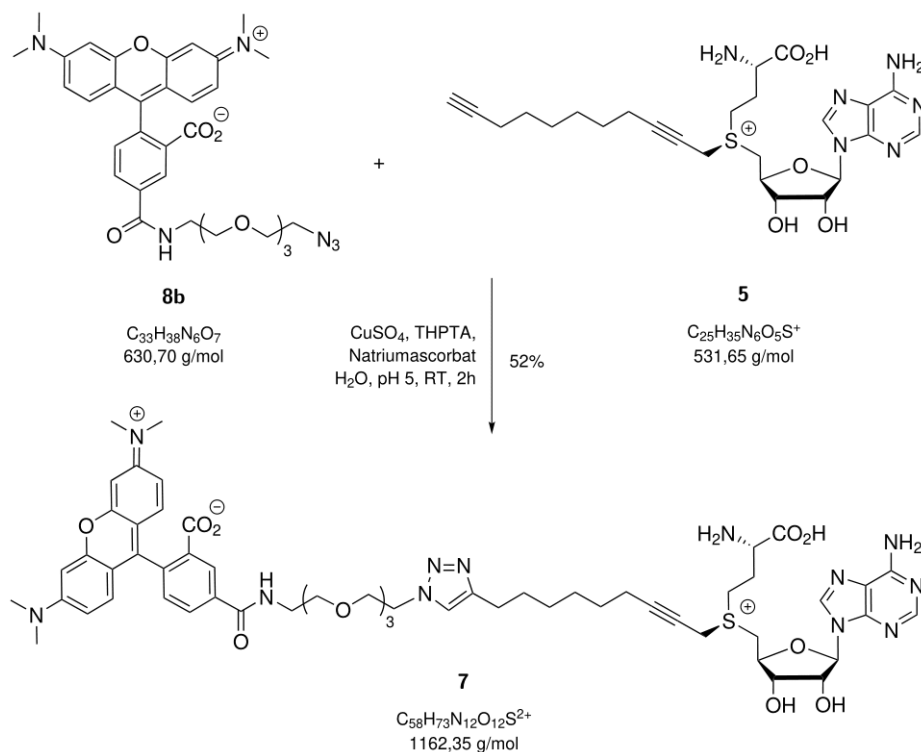


Es wurden Wasser (354,1 µL), wässrige CuSO₄-Lösung (1,6 µL, 250 mM, 400 nmol, 0,5 Äq.), THPTA-Lösung (6,7 µL, 60,0 mM, 400 nmol, 0,5 Äq.) und Natriumascorbat_(aq) (66,7 µL, 500 mM, 33,4 µmol, 41,7 Äq.) vorgelegt und mit verdünnter Schwefelsäure (1:20, 2 µL) auf pH 5 eingestellt. Anschließend wurden wässrige Lösungen von TAMRA-N₃ (**8b**, 44,5 µL, 18,0 mM, 800 nmol, 1 Äq.) und AdoYnYn (kurz) (**4**, Eluent A (sauer), 100,0 µL, 8,0 mM, 800 nmol, 1 Äq.) zugegeben. Der Umsatz wurde daraufhin stündlich mittels *rp*-HPLC verfolgt (analytisch, Methode S2, 260/555 nm) und das Reaktionsprodukt **6b** nach vollständigem Ablauf der Reaktion (3 h) isoliert (analytisch, Methode S2). Nach Gefriertrocknung der erhaltenen Lösung erfolgte die Bestimmung der Konzentration durch Messung der UV-Absorption ($\epsilon_{532} = 90\,000\text{ L mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$). Zur Überprüfung der Reinheit des Reaktionsproduktes **6b** wurde eine Einzelinjektion durchgeführt (analytisch, Methode S2, 260/555 nm).

Ausbeute: 390 nmol (49 %)

MS (ESI, pos., 70 eV): m/z (%) = 1119,47 [M]⁺ (37), 1018,42 [TE1+H]⁺ (41), 870,39 [TE2+H]⁺ (51), 560,24 [M+H]²⁺ (46).

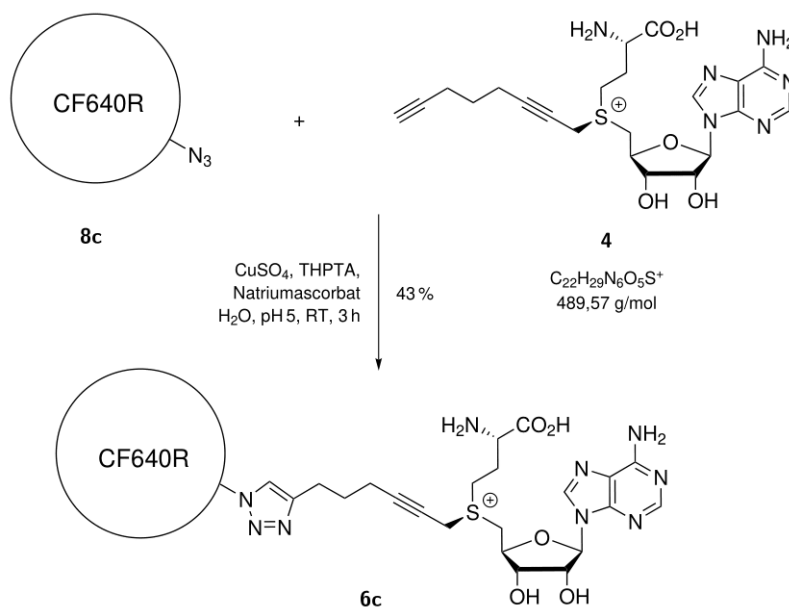
5.3.2.3 AdoYnTAMRA (lang)



Es wurden Wasser (178,5 µL), wässrige CuSO₄-Lösung (0,9 µL, 250 mM, 225 nmol, 0,5 Äq.), THPTA-Lösung (3,8 µL, 60,0 mM, 225 nmol, 0,5 Äq.) und Natriumascorbat_(aq) (37,5 µL, 500 mM, 18,8 µmol, 41,7 Äq.) vorgelegt und mit verdünnter Schwefelsäure (1:20, 2 µL) auf pH 5 eingestellt. Anschließend wurden wässrige Lösungen von TAMRA-N₃ (**8b**, 25,0 µL, 18,0 mM, 450 nmol, 1 Äq.) und AdoYnYn (lang) (**5**, Eluent A (sauer), 129,3 µL, 3,5 mM, 450 nmol, 1 Äq.) zugegeben. Der Umsatz wurde daraufhin stündlich mittels *rp*-HPLC verfolgt (analytisch, Methode S2, 260/555 nm) und das Reaktionsprodukt **7** nach vollständigem Ablauf der Reaktion (2 h) isoliert (analytisch, Methode S2). Nach Gefriertrocknung der erhaltenen Lösung erfolgte die Bestimmung der Konzentration durch Messung der UV-Absorption ($\epsilon_{532} = 90\,000\text{ L mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$). Zur Überprüfung der Reinheit des Reaktionsproduktes **7** wurde eine Einzelinjektion durchgeführt (analytisch, Methode S2, 260/555 nm).

Ausbeute: 235 nmol (52 %)

5.3.2.4 AdoYnCF640R^[53]

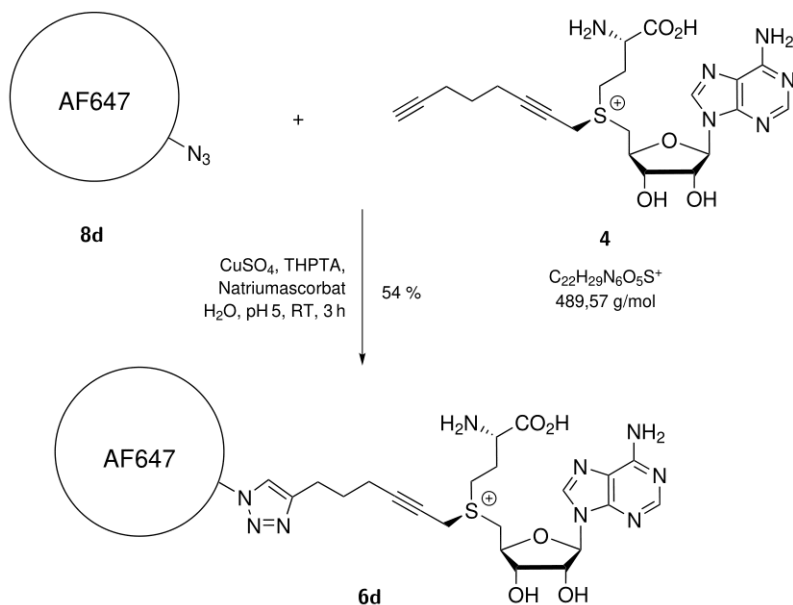


Es wurden Wasser (30,9 μ L), wässrige CuSO₄-Lösung (5,0 μ L, 25,0 mM, 125 nmol, 0,5 Äq.), THPTA-Lösung (4,2 μ L, 30,0 mM, 125 nmol, 0,5 Äq.) und Natriumascorbat_(aq) (20,8 μ L, 500 mM, 10,4 μ mol, 41,7 Äq.) vorgelegt und mit verdünnter Schwefelsäure (1:20, 2 μ L) auf pH 5 eingestellt. Anschließend wurden wässrige Lösungen von CF640R-N₃ (**8c**, 89,3 μ L, 2,8 mM, 250 nmol, 1 Äq.) sowie AdoYnYn (kurz (**4**, Eluent A (sauer), 58,2 μ L, 4,3 mM, 250 nmol, 1 Äq.) zugegeben. Der Umsatz wurde daraufhin stündlich mittels *rp*-HPLC verfolgt (analytisch, Methode S2, 260/640 nm) und das Reaktionsprodukt **6c** nach vollständigem Ablauf der Reaktion (3 h) isoliert (analytisch, Methode S2). Nach Gefriertrocknung der Lösung erfolgte die Bestimmung der Konzentration durch Messung der UV-Absorption ($\epsilon_{532} = 105\,000\text{ L mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$). Zur Überprüfung der Reinheit des Reaktionsproduktes **6c** wurde eine Einzelinjektion durchgeführt (analytisch, Methode S2, 260/640 nm).

Ausbeute: 102 nmol (43 %)

MS (ESI, pos., 70 eV): m/z (%) = 1439,82 [M]⁺ (74), 720,41 [M+H]²⁺ (100).

5.3.2.5 AdoYnAF647



Es wurden Wasser (83,5 µL), wässrige CuSO₄-Lösung (5,0 µL, 25,0 mM, 125 nmol, 0,5 Äq.), THPTA-Lösung (4,2 µL, 30,0 mM, 125 nmol, 0,5 Äq.) und Natriumascorbat_(aq) (20,8 µL, 500 mM, 10,4 µmol, 41,7 Äq.) vorgelegt und mit verdünnter Schwefelsäure (1:20, 2 µL) auf pH 5 eingestellt. Anschließend wurden wässrige Lösungen von AF647-N₃ (**8d**, 36,8 µL, 6,8 mM, 250 nmol, 1 Äq.) sowie AdoYnYn (kurz) (**4**, Eluent A (sauer), 58,2 µL, 4,3 mM, 250 nmol, 1 Äq.) zugegeben. Der Umsatz wurde daraufhin stündlich mittels *rp*-HPLC verfolgt (analytisch, Methode S2, 260/647 nm) und das Reaktionsprodukt **6d** nach vollständigem Ablauf der Reaktion (3 h) isoliert (analytisch, Methode S2). Nach Gefriertrocknung der Lösung erfolgte die Bestimmung der Konzentration durch Messung der UV-Absorption ($\epsilon_{532} = 270\,000\text{ L mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$). Zur Überprüfung der Reinheit des Reaktionsproduktes **6d** wurde eine Einzelinjektion durchgeführt (analytisch, Methode S2, 260/647 nm).

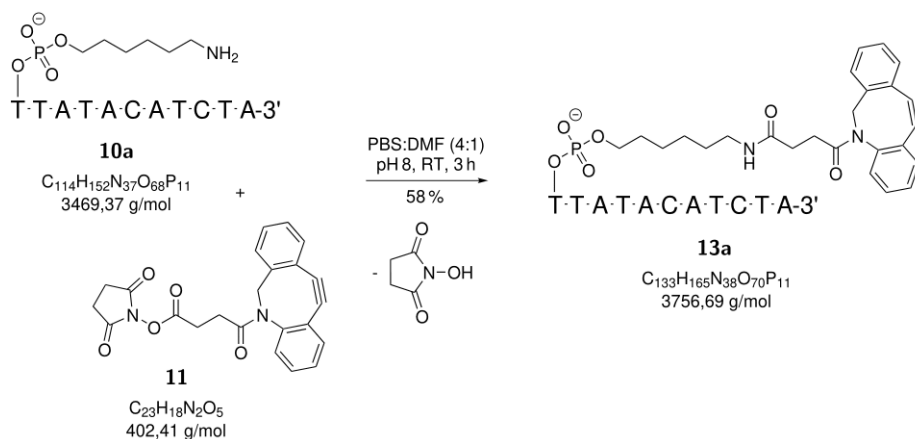
Ausbeute: 135 nmol (54 %)

MS (ESI, pos., 70 eV): m/z (%) = 1255,51 [M]⁺ (31), 628,26 [M+H]²⁺ (100), 596,71 [TE+H+K]²⁺ (35).

5.3.3 Synthesen ODN-modifizierter AdoMet-Analoga

5.3.3.1 AdoYnODN11

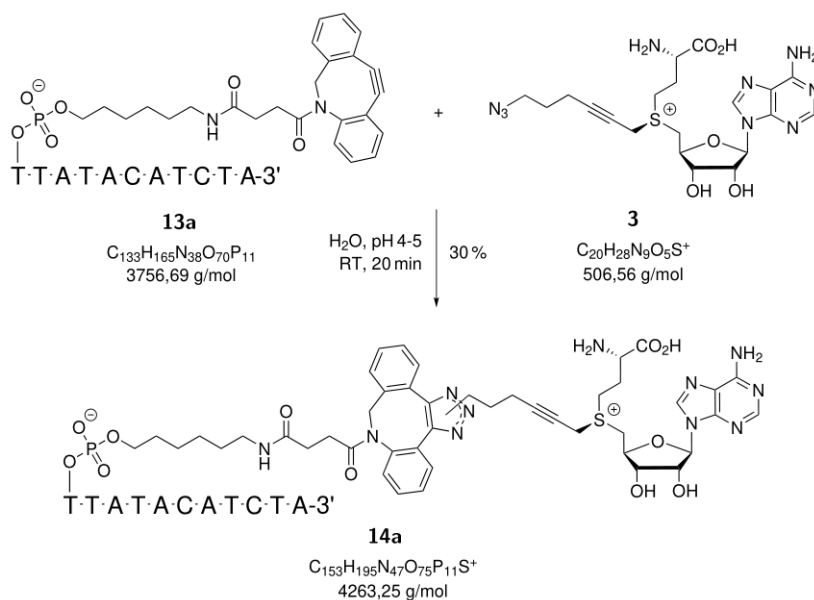
ODN11-DBCO



Zu einer Lösung von ODN11-NH₂ (**10a**, TE-Puffer, 500 μ L, 1,0 mM, 500 nmol, 1 Äq.) wurde PBS-Puffer (500 μ L) sowie in DMF gelöstes DBCO-NHS (**11**, 250 μ L, 4,0 mM, 1000 nmol, 2 Äq.) zugegeben. Daraufhin wurde stündlich weiteres in DMF gelöstes DBCO-NHS (4,0 μ L, 621,3 mM, 2500 nmol, 5 Äq.) zugegeben und der Umsatz mittels *rp*-HPLC verfolgt (analytisch, Methode N1, 260/300 nm). Nach Ablauf der Reaktion (3 h, 12 Äq. DBCO-NHS) wurde das Reaktionsprodukt **13a** mittels *rp*-HPLC aufgereinigt (analytisch, Methode N1, 260/300 nm) und die erhaltene Produktlösung durch Gefriertrocknung eingengt. Die Konzentration von Produkt **13a** wurde durch UV-Absorption ermittelt ($\epsilon_{260} = 117\,600\text{ L mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$, Summe der Extinktionskoeffizienten der im Molekül enthaltenen Chromophore, ODN11-NH₂: 110 600; DBCO: 7000 L mol⁻¹ cm⁻¹). Zur Überprüfung der Reinheit des Reaktionsproduktes **13a** wurde eine Einzelinjektion durchgeführt (analytisch, Methode N1, 260/300 nm).

Ausbeute: 290 nmol (58 %)

AdoYnODN11



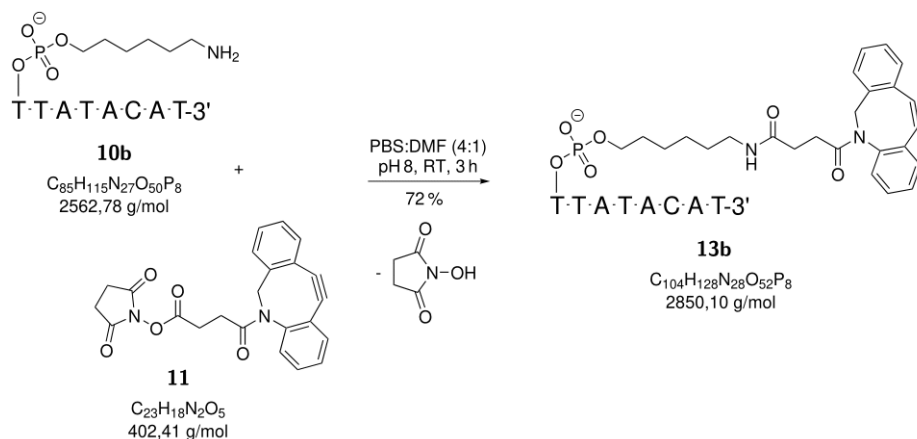
Eine wässrige Lösung von ODN11-DBCO (**13a**, Eluent A (neutral), 43,4 μL , 5,8 mM, 250 nmol, 1 Äq.) wurde mit einer wässrigen Lösung von AdoYnAzid (**3**, Eluent A (sauer), 113,6 μL , 3,3 mM, 375 nmol, 1,5 Äq.) und Wasser (155,5 μL) versetzt. Anschließend wurde der pH-Wert mit Essigsäure (0,1 M) auf 4-5 eingestellt. Daraufhin wurde der Umsatz der Reaktion unter Bildung des Isomerengemischs mit AdoYnODN11 (**14a**) verfolgt, dessen Isolation anschließend mittels *rp*-HPLC (analytisch, Methode N2, 260/272 nm) erfolgte. Die erhaltene Produktlösung wurde direkt nach Elution mit Essigsäure (0,1 M) auf pH 4 eingestellt und anschließend mittels Gefriertrocknung eingeeengt. Die Konzentration von Produkt **14a** wurde durch UV-Absorption ermittelt ($\epsilon_{260} = 133\,000\text{ L mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$, Summe der Extinktionskoeffizienten der im Molekül enthaltenen Chromophore, ODN11-NH₂: 110 600; DBCO: 7000; AdoYnAzid: 15 400 $\text{L mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$). Zur Überprüfung der Reinheit des Reaktionsproduktes **14a** wurde eine Einzelinjektion durchgeführt (analytisch, Methode N2, 260/272 nm).

Ausbeute: 75 nmol (30 %)

MS (MALDI-TOF, 3-HPA, $\text{TFA}_{(\text{aq})}$ (0,1 %)/MeCN (1:1 v/v), 10 mg mL^{-1} Ammoniumcitrat): m/z (%) = 4263,4 $[\text{M}]^+$ (100).

5.3.3.2 AdoYnODN8

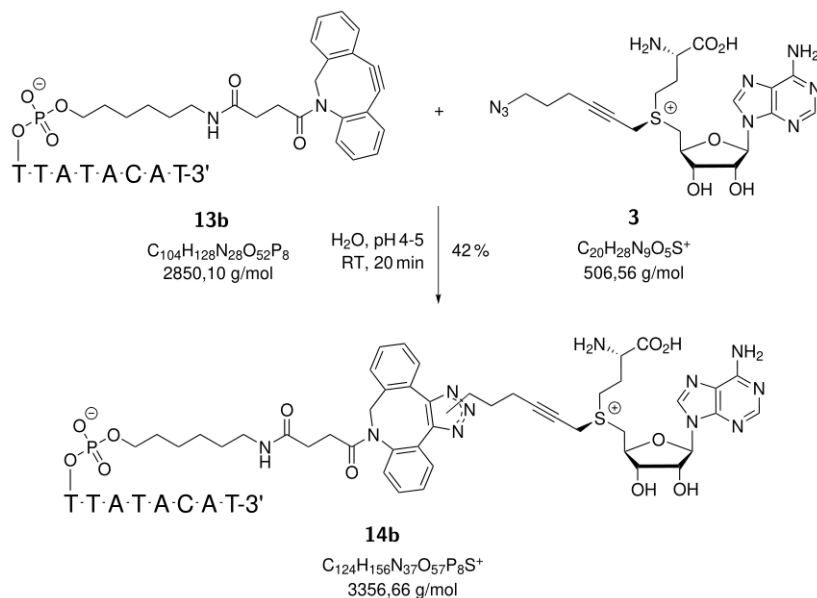
ODN8-DBCO



Zu einer wässrigen Lösung von ODN8-NH₂ (**10b**, TE-Puffer, 500 µL, 1,0 mM, 500 nmol, 1 Äq.) wurde PBS-Puffer (500 µL) sowie in DMF gelöstes DBCO-NHS (**11**, 250 µL, 4,0 mM, 1000 nmol, 2 Äq.) zugegeben. Daraufhin wurde stündlich weiteres in DMF gelöstes DBCO-NHS (4,0 µL, 621,3 mM, 2500 nmol, 5 Äq.) zugegeben und der Umsatz mittels *rp*-HPLC verfolgt (analytisch, Methode N1, 260/300 nm). Nach Ablauf der Reaktion (3 h, 12 Äq. DBCO-NHS) wurde das Reaktionsprodukt **13b** mittels *rp*-HPLC aufgereinigt (analytisch, Methode N1, 260/300 nm) und die erhaltene Produktlösung durch Gefriertrocknung eingeengt. Die Konzentration von Produkt **13b** wurde durch UV-Absorption ermittelt ($\epsilon_{260} = 87\,600\text{ L mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$, Summe der Extinktionskoeffizienten der im Molekül enthaltenen Chromophore, ODN8-NH₂: 80 600; DBCO: 7000 L mol⁻¹ cm⁻¹). Zur Überprüfung der Reinheit des Reaktionsproduktes **13b** wurde eine Einzelinjektion durchgeführt (analytisch, Methode N1, 260/300 nm).

Ausbeute: 360 nmol (72 %)

AdoYnODN8



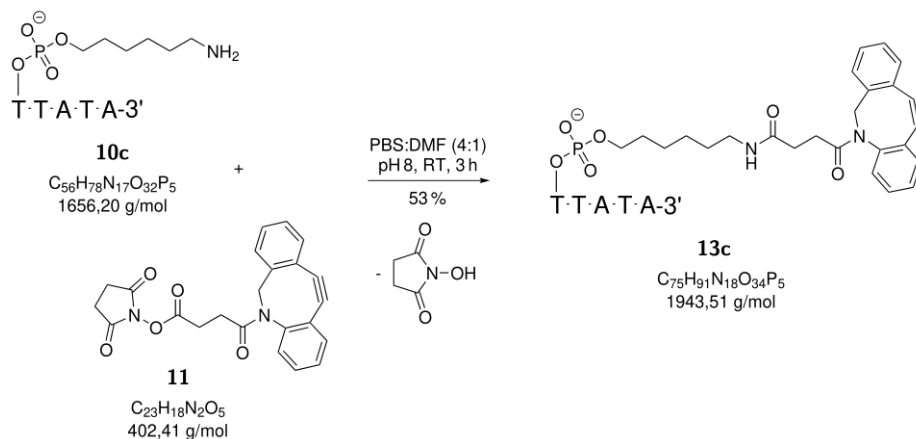
Eine wässrige Lösung von ODN8-DBCO (**13b**, Eluent A (neutral), 35,0 μL , 7,1 mM, 250 nmol, 1 Äq.) wurde mit einer wässrigen Lösung von AdoYnAzid (**3**, Eluent A (sauer), 113,6 μL , 3,3 mM, 375 nmol, 1,5 Äq.) und Wasser (163,9 μL) versetzt. Anschließend wurde der pH-Wert mit Essigsäure (0,1 M) auf 4-5 eingestellt. Daraufhin wurde der Umsatz der Reaktion unter Bildung des Isomerengemischs mit AdoYnODN8 (**14b**) verfolgt, dessen Isolation anschließend mittels *rp*-HPLC (analytisch, Methode N2, 260/272 nm) erfolgte. Die erhaltene Produktlösung wurde direkt nach Elution mit Essigsäure (0,1 M) auf pH 4 eingestellt und anschließend mittels Gefriertrocknung eingeengt. Die Konzentration von Produkt **14b** wurde durch UV-Absorption ermittelt ($\epsilon_{260} = 103\,000\text{ L mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$, Summe der Extinktionskoeffizienten der im Molekül enthaltenen Chromophore, ODN8-NH₂: 80 600; DBCO: 7000; AdoYnAzid: 15 400 $\text{L mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$). Zur Überprüfung der Reinheit des Reaktionsproduktes **14b** wurde eine Einzelinjektion durchgeführt (analytisch, Methode N2, 260/272 nm).

Ausbeute: 105 nmol (42 %)

MS (MALDI-TOF, 3-HPA, $\text{TFA}_{(\text{aq})}$ (0,1 %)/MeCN (1:1 v/v), 10 mg mL^{-1} Ammoniumcitrat):
 m/z (%) = 3356,0 $[\text{M}]^+$ (100), 1680,4 $[\text{M}^+\text{H}]^{2+}$ (91).

5.3.3.3 AdoYnODN5

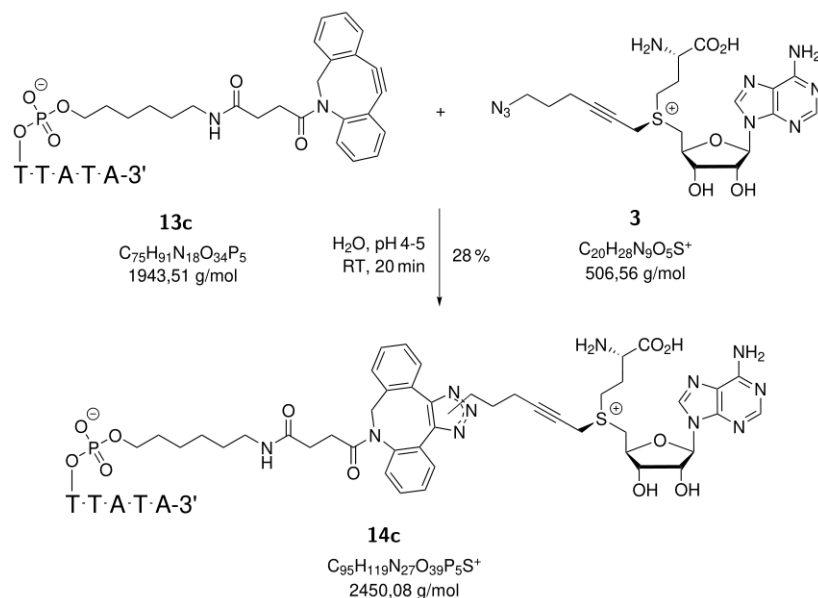
ODN5-DBCO



Zu einer wässrigen Lösung von ODN5-NH₂ (**10c**, TE-Puffer, 500 µL, 1,0 mM, 500 nmol, 1 Äq.) wurde PBS-Puffer (500 µL) sowie in DMF gelöstes DBCO-NHS (**11**, 250 µL, 4,0 mM, 1000 nmol, 2 Äq.) zugegeben. Daraufhin wurde stündlich weiteres in DMF gelöstes DBCO-NHS (4,0 µL, 621,3 mM, 2500 nmol, 5 Äq.) zugegeben und der Umsatz mittels *rp*-HPLC verfolgt (analytisch, Methode N1, 260/300 nm). Nach Ablauf der Reaktion (3 h, 12 Äq. DBCO-NHS) wurde das Reaktionsprodukt **13c** mittels *rp*-HPLC aufgereinigt (analytisch, Methode N1, 260/300 nm) und die erhaltene Produktlösung durch Gefriertrocknung eingeeengt. Die Konzentration von Produkt **13c** wurde durch UV-Absorption ermittelt ($\epsilon_{260} = 60\,600\text{ L mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$, Summe der Extinktionskoeffizienten der im Molekül enthaltenen Chromophore, ODN5-NH₂: 53 600; DBCO: 7000 L mol⁻¹ cm⁻¹). Zur Überprüfung der Reinheit des Reaktionsproduktes **13c** wurde eine Einzelinjektion durchgeführt (analytisch, Methode N1, 260/300 nm).

Ausbeute: 265 nmol (53 %)

AdoYnODN5



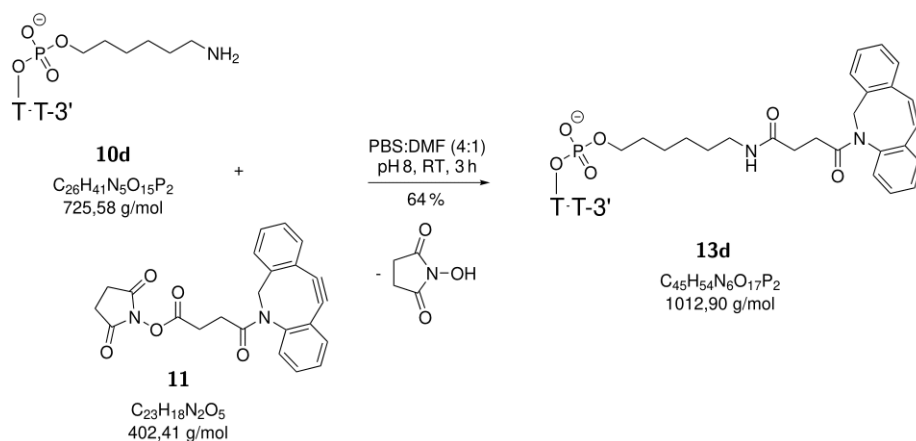
Eine wässrige Lösung von ODN5-DBCO (**13c**, Eluent A (neutral), 46,8 μL , 5,3 mM, 250 nmol, 1 Äq.) wurde mit einer wässrigen Lösung von AdoYnAzid (**3**, Eluent A (sauer), 113,6 μL , 3,3 mM, 375 nmol, 1,5 Äq.) und Wasser (152,0 μL) versetzt. Anschließend wurde der pH-Wert mit Essigsäure (0,1 M) auf 4-5 eingestellt. Daraufhin wurde der Umsatz der Reaktion unter Bildung des Isomerengemischs mit AdoYnODN5 (**14c**) verfolgt, dessen Isolation anschließend mittels *rp*-HPLC (analytisch, Methode N2, 260/272 nm) erfolgte. Die erhaltene Produktlösung wurde direkt nach Elution mit Essigsäure (0,1 M) auf pH 4 eingestellt und anschließend mittels Gefrier-trocknung eingengt. Die Konzentration von Produkt **14c** wurde durch UV-Absorption ermittelt ($\epsilon_{260} = 76\,000\text{ L mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$, Summe der Extinktionskoeffizienten der im Molekül enthaltenen Chromophore, ODN5-NH₂: 53 600; DBCO: 7000; AdoYnAzid: 15 400 $\text{L mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$). Zur Überprüfung der Reinheit des Reaktionsproduktes **14c** wurde eine Einzelinjektion durchgeführt (analytisch, Methode N2, 260/272 nm).

Ausbeute: 70 nmol (28 %)

MS (MALDI-TOF, 3-HPA, $\text{TFA}_{(\text{aq})}$ (0,1 %)/MeCN (1:1 v/v), 10 mg mL^{-1} Ammoniumcitrat):
 m/z (%) = 2452,0 $[\text{M}]^+$ (100), 2350,2 $[\text{TE}+\text{H}]^+$ (64).

5.3.3.4 AdoYnODN2

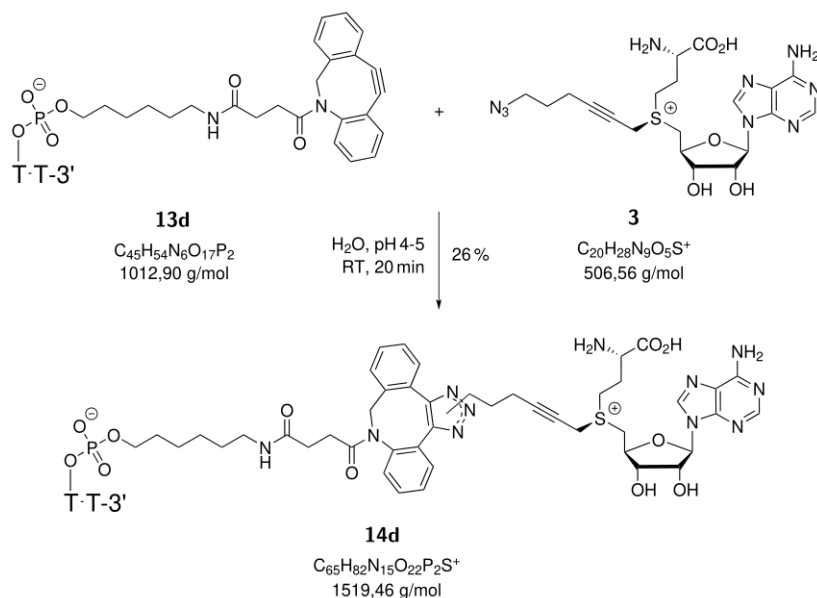
ODN2-DBCO



Zu einer wässrigen Lösung von ODN2-NH₂ (**10d**, TE-Puffer, 500 µL, 1,0 mM, 500 nmol, 1 Äq.) wurde PBS-Puffer (500 µL) sowie in DMF gelöstes DBCO-NHS (**11**, 250 µL, 4,0 mM, 1000 nmol, 2 Äq.) zugegeben. Daraufhin wurde stündlich weiteres in DMF gelöstes DBCO-NHS (4,0 µL, 621,3 mM, 2500 nmol, 5 Äq.) zugegeben und der Umsatz mittels *rp*-HPLC verfolgt (analytisch, Methode N1, 260/300 nm). Nach Ablauf der Reaktion (3 h, 12 Äq. DBCO-NHS) wurde das Reaktionsprodukt **13d** mittels *rp*-HPLC aufgereinigt (analytisch, Methode N1, 260/300 nm) und die erhaltene Produktlösung durch Gefriertrocknung eingeengt. Die Konzentration von Produkt **13d** wurde durch UV-Absorption ermittelt ($\epsilon_{260} = 23\,800\text{ L mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$, Summe der Extinktionskoeffizienten der im Molekül enthaltenen Chromophore, ODN2-NH₂: 16 800; DBCO: 7000 L mol⁻¹ cm⁻¹). Zur Überprüfung der Reinheit des Reaktionsproduktes **13d** wurde eine Einzelinjektion durchgeführt (analytisch, Methode N1, 260/300 nm).

Ausbeute: 320 nmol (64 %)

AdoYnODN2

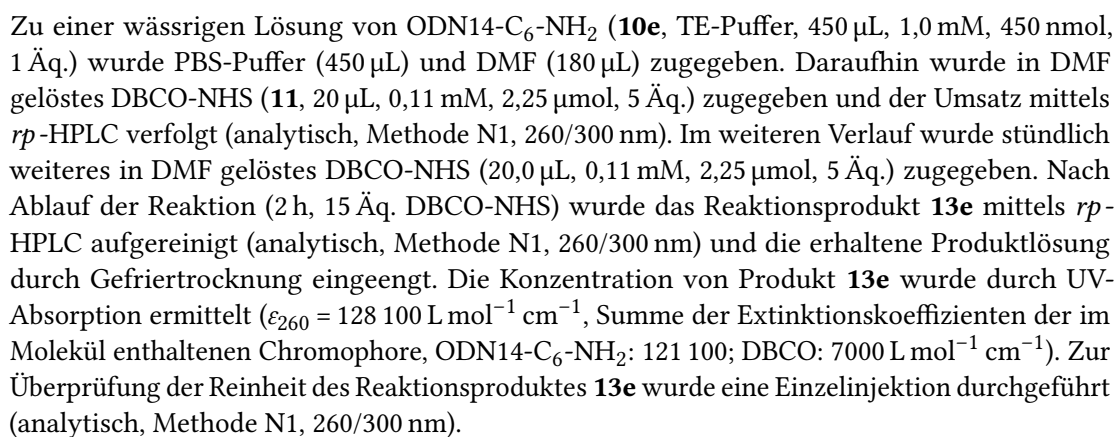


Eine wässrige Lösung von ODN2-DBCO (**13d**, Eluent A (neutral), 39,0 μ L, 6,4 mM, 250 nmol, 1 Äq.) wurde mit einer wässrigen Lösung von AdoYnAzid (**3**, Eluent A (sauer), 113,6 μ L, 3,3 mM, 375 nmol, 1,5 Äq.) und Wasser (159,9 μ L) versetzt. Anschließend wurde der pH-Wert mit Essigsäure (0,1 M) auf 4-5 eingestellt. Daraufhin wurde der Umsatz der Reaktion unter Bildung des Isomerengemischs mit AdoYnODN2 (**14d**) verfolgt, dessen Isolation anschließend mittels *rp*-HPLC (analytisch, Methode N2, 260/272 nm) erfolgte. Die erhaltene Produktlösung wurde direkt nach Elution mit Essigsäure (0,1 M) auf pH 4 eingestellt und anschließend mittels Gefriertrocknung eingengt. Die Konzentration von Produkt **14d** wurde durch UV-Absorption ermittelt ($\epsilon_{260} = 39\,200\text{ L mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$, Summe der Extinktionskoeffizienten der im Molekül enthaltenen Chromophore, ODN2-NH₂: 16 800; DBCO: 7000; AdoYnAzid: 15 400 $\text{L mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$). Zur Überprüfung der Reinheit des Reaktionsproduktes **14d** wurde eine Einzelinjektion durchgeführt (analytisch, Methode N2, 260/272 nm).

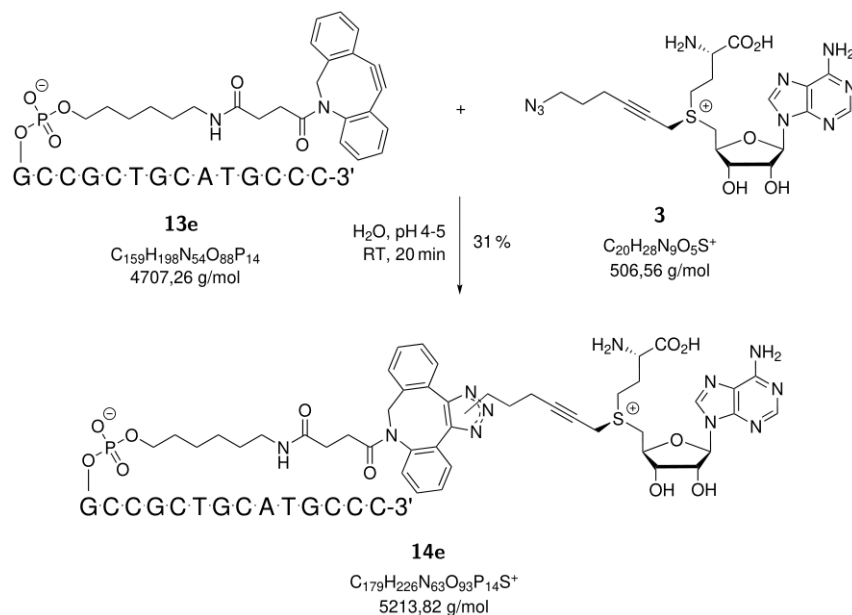
Ausbeute: 65 nmol (26 %)

MS (MALDI-TOF, 3-HPA, TFA_(aq) (0,1 %)/MeCN (1:1 v/v), 10 mg mL⁻¹ Ammoniumcitrat):
 m/z (%) = 1521,5 [M]⁺ (100), 1420,3 [TE+H]⁺ (29).

ODN14-C₆-DBCO



Ausbeute: 275 nmol (61 %)

AdoYnC₆ODN14

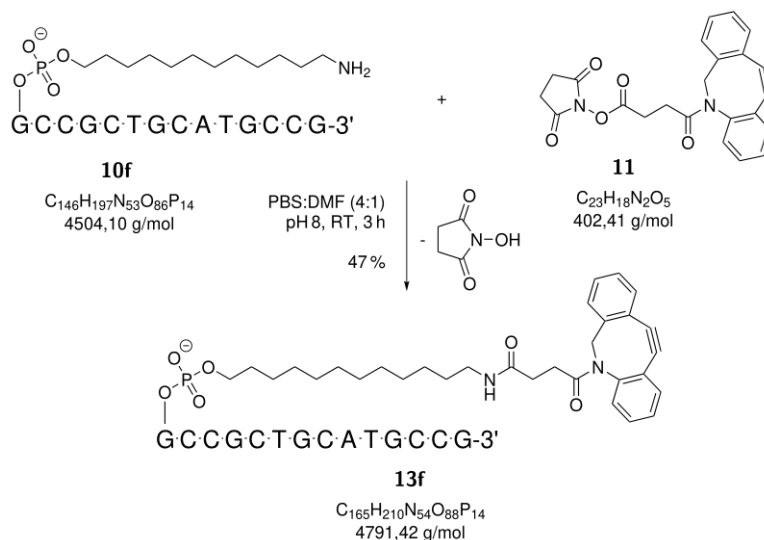
Zu einer wässrigen Lösung von ODN14-C₆-DBCO (**13e**, Eluent A (neutral), 93,1 μ L, 2,5 mM, 230 nmol, 1 Äq.) wurde eine wässrige Lösung von AdoYnAzid (**3**, Eluent A (sauer), 98,6 μ L, 3,5 mM, 345 nmol, 1,5 Äq.) und Wasser (95,8 μ L) zugegeben. Anschließend wurde der pH-Wert mit Essigsäure (0,1 M) auf 4-5 eingestellt. Daraufhin wurde der Umsatz der Reaktion unter Bildung des Isomerengemischs mit AdoYnC₆ODN14 (**14e**) verfolgt, dessen Isolation anschließend mittels *rp*-HPLC (analytisch, Methode N2, 260/272 nm) erfolgte. Die erhaltene Produktlösung wurde direkt nach Elution mit Essigsäure (0,1 M) auf pH 4 eingestellt und anschließend mittels Gefriertrocknung eingengt. Die Konzentration von Produkt **14e** wurde durch UV-Absorption ermittelt ($\epsilon_{260} = 143\,500\text{ L mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$, Summe der Extinktionskoeffizienten der im Molekül enthaltenen Chromophore, ODN14-C₆-NH₂: 121 100; DBCO: 7000; AdoYnAzid: 15 400 $\text{L mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$). Zur Überprüfung der Reinheit des Reaktionsproduktes **14e** wurde eine Einzelinjektion durchgeführt (analytisch, Methode N2, 260/272 nm).

Ausbeute: 55 nmol (31 %)

MS (MALDI-TOF, 3-HPA, TFA_(aq) (0,1 %)/MeCN (1:1 v/v), 10 mg mL⁻¹ Ammoniumcitrat):
 m/z (%) = 5213,3 [M]⁺ (100), 5111,4 [TE+H]⁺ (51).

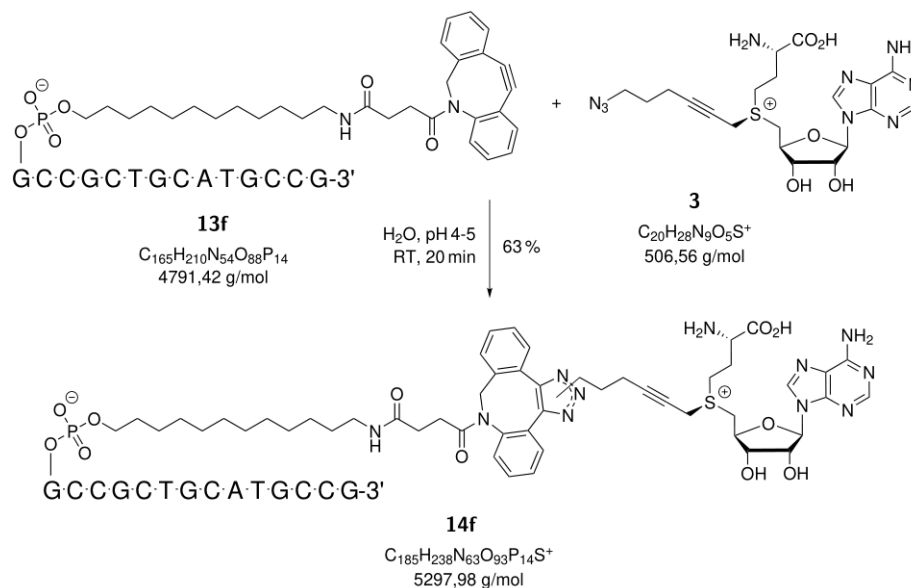
5.3.3.6 AdoYnC₁₂ODN14

ODN14-C₁₂-DBCO



Zu einer wässrigen Lösung von ODN14-C₁₂-NH₂ (**10f**, TE-Puffer, 450 µL, 1,0 mM, 450 nmol, 1 Äq.) wurde PBS-Puffer (450 µL) und DMF (180 µL) zugegeben. Daraufhin wurde in DMF gelöstes DBCO-NHS (**11**, 20 µL, 0,11 mM, 2,25 µmol, 5 Äq.) zugegeben und der Umsatz mittels *rp*-HPLC verfolgt (analytisch, Methode N1, 260/300 nm). Im weiteren Verlauf wurde stündlich weiteres in DMF gelöstes DBCO-NHS (20,0 µL, 0,11 mM, 2,25 µmol, 5 Äq.) zugegeben. Nach Ablauf der Reaktion (2 h, 15 Äq. DBCO-NHS) wurde das Reaktionsprodukt **13f** mittels *rp*-HPLC aufgereinigt (analytisch, Methode N1, 260/300 nm) und die erhaltene Produktlösung durch Gefriertrocknung eingengt. Die Konzentration von Produkt **13f** wurde durch UV-Absorption ermittelt ($\epsilon_{260} = 128\,100\text{ L mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$, Summe der Extinktionskoeffizienten der im Molekül enthaltenen Chromophore, ODN14-C₁₂-NH₂: 121 100; DBCO: 7000 L mol⁻¹ cm⁻¹). Zur Überprüfung der Reinheit des Reaktionsproduktes **13f** wurde eine Einzelinjektion durchgeführt (analytisch, Methode N1, 260/300 nm).

Ausbeute: 210 nmol (47 %)

AdoYnC₁₂ODN14

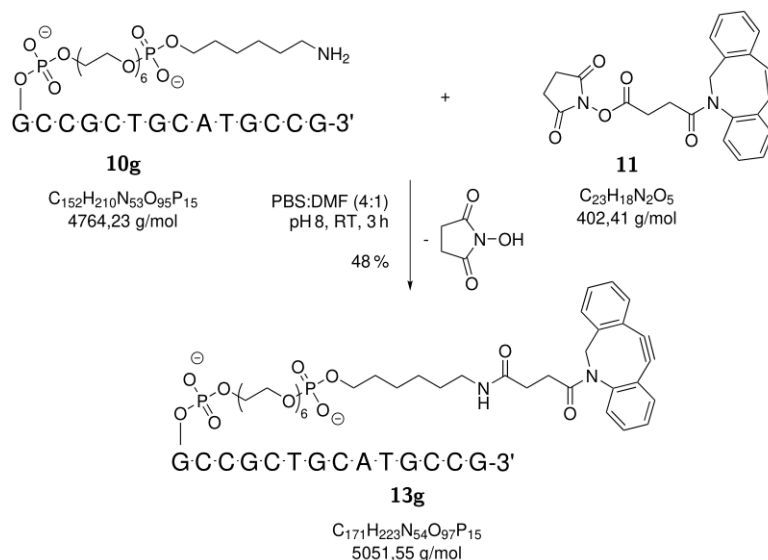
Eine wässrige Lösung von ODN14-C₁₂-DBCO (**13f**, Eluent A (neutr.), 116,1 μ L, 1,6 mM, 180 nmol, 1 Äq.) wurde mit einer wässrigen Lösung von AdoYnAzid (**3**, Eluent A (sauer), 77,1 μ L, 3,5 mM, 270 nmol, 1,5 Äq.) und Wasser (31,7 μ L) versetzt. Anschließend wurde der pH-Wert mit Essigsäure (0,1 M) auf 4-5 eingestellt. Daraufhin wurde der Umsatz der Reaktion unter Bildung des Isomerengemischs mit AdoYnC₁₂ODN14 (**14f**) verfolgt, dessen Isolation anschließend mittels *rp*-HPLC (analytisch, Methode N2, 260/272 nm) erfolgte. Die erhaltene Produktlösung wurde direkt nach Elution mit Essigsäure (0,1 M) auf pH 4 eingestellt und anschließend mittels Gefrier-trocknung eingengt. Die Konzentration von Produkt **14f** wurde durch UV-Absorption ermittelt ($\epsilon_{260} = 143\,500\text{ L mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$, Summe der Extinktionskoeffizienten der im Molekül enthaltenen Chromophore, ODN14-C₁₂-NH₂: 121 100; DBCO: 7000; AdoYnAzid: 15 400 $\text{L mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$). Zur Überprüfung der Reinheit des Reaktionsproduktes **14f** wurde eine Einzelinjektion durchgeführt (analytisch, Methode N2, 260/272 nm).

Ausbeute: 125 nmol (63 %)

MS (MALDI-TOF, 3-HPA, TFA_(aq) (0,1 %)/MeCN (1:1 v/v), 10 mg mL⁻¹ Ammoniumcitrat):
 m/z (%) = 5298,2 [M]⁺ (100), 5196,3 [TE+H]⁺ (97).

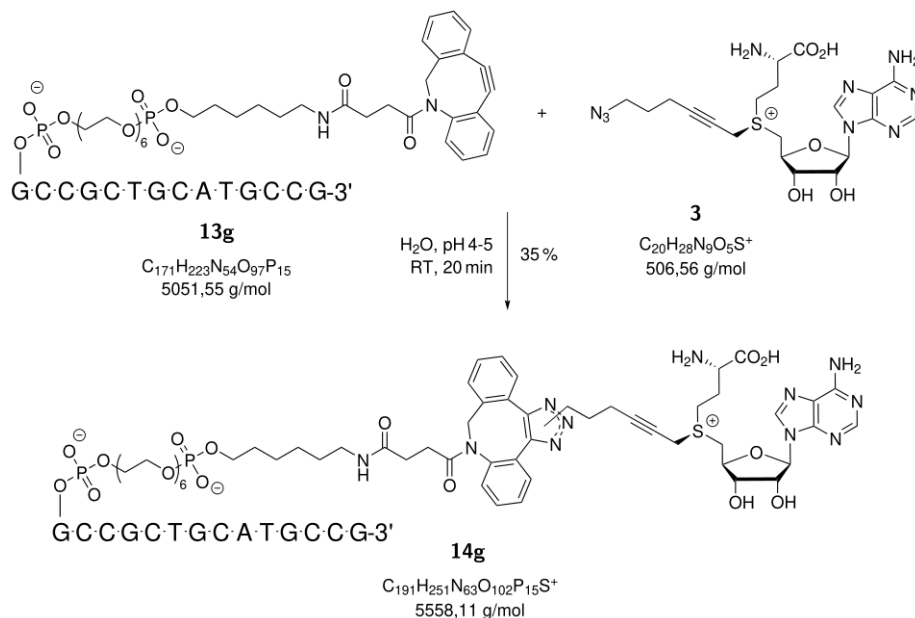
5.3.3.7 AdoYnPEG₆C₆ODN14

ODN14-PEG₆C₆-DBCO



Zu einer Lösung von ODN14-PEG₆C₆-NH₂ (**10g**, TE-Puffer, 450 µL, 1,0 mM, 450 nmol, 1 Äq.) wurde PBS-Puffer (450 µL) und DMF (180 µL) zugegeben. Daraufhin wurde in DMF gelöstes DBCO-NHS (**11**, 20 µL, 0,11 mM, 2,25 µmol, 5 Äq.) zugegeben und der Umsatz mittels *rp*-HPLC verfolgt (analytisch, Methode N1, 260/300 nm). Im weiteren Verlauf wurde stündlich weiteres in DMF gelöstes DBCO-NHS (20,0 µL, 0,11 mM, 2,25 µmol, 5 Äq.) zugegeben. Nach Ablauf der Reaktion (2 h, 15 Äq. DBCO-NHS) wurde das Reaktionsprodukt **13g** mittels *rp*-HPLC aufgereinigt (analytisch, Methode N1, 260/300 nm) und die erhaltene Produktlösung durch Gefriertrocknung eingengt. Die Konzentration von Produkt **13g** wurde durch UV-Absorption ermittelt ($\epsilon_{260} = 128\,100\,\text{L mol}^{-1}\,\text{cm}^{-1}$, Summe der Extinktionskoeffizienten der im Molekül enthaltenen Chromophore, ODN14-PEG₆C₆-NH₂: 121 100; DBCO: 7000 L mol⁻¹ cm⁻¹). Zur Überprüfung der Reinheit des Reaktionsproduktes **13g** wurde eine Einzelinjektion durchgeführt (analytisch, Methode N1, 260/300 nm).

Ausbeute: 215 nmol (48 %)

AdoYnPEG₆C₆ODN14

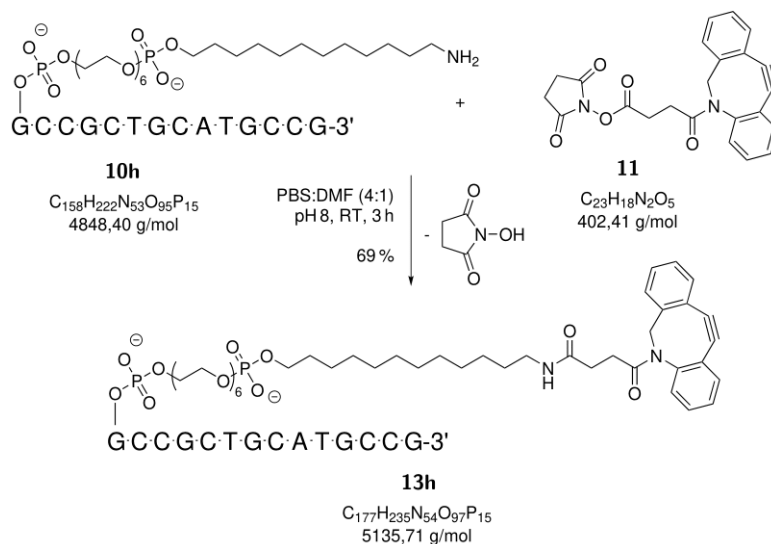
Eine wässrige Lösung von ODN14-PEG₆C₆-DBCO (**13g**, Eluent A (neutral), 132,5 µL, 1,5 mM, 200 nmol, 1 Äq.), eine wässrige Lösung von AdoYnAzid (**3**, Eluent A (sauer), 85,7 µL, 3,5 mM, 300 nmol, 1,5 Äq.) und Wasser (31,8 µL) wurden vorgelegt. Anschließend wurde der pH-Wert mit Essigsäure (0,1 M) auf 4-5 eingestellt. Daraufhin wurde der Umsatz der Reaktion unter Bildung des Isomerengemischs mit AdoYnPEG₆C₆ODN14 (**14g**) verfolgt, dessen Isolation anschließend mittels *rp*-HPLC (analytisch, Methode N2, 260/272 nm) erfolgte. Die erhaltene Produktlösung wurde direkt nach Elution mit Essigsäure (0,1 M) auf pH 4 eingestellt und anschließend mittels Gefriertrocknung eingengt. Die Konzentration von Produkt **14g** wurde durch UV-Absorption ermittelt ($\epsilon_{260} = 143\,500\text{ L mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$, Summe der Extinktionskoeffizienten der im Molekül enthaltenen Chromophore, ODN14-PEG₆C₆-NH₂: 121 100; DBCO: 7000; AdoYnAzid: 15 400 L mol⁻¹ cm⁻¹). Zur Überprüfung der Reinheit des Reaktionsproduktes **14g** wurde eine Einzelinjektion durchgeführt (analytisch, Methode N2, 260/272 nm).

Ausbeute: 70 nmol (35 %)

MS (MALDI-TOF, 3-HPA, TFA_(aq) (0,1 %)/MeCN (1:1 v/v), 10 mg mL⁻¹ Ammoniumcitrat):
 m/z (%) = 5559,8 [M]⁺ (100), 5457,7 [TE+H]⁺ (44).

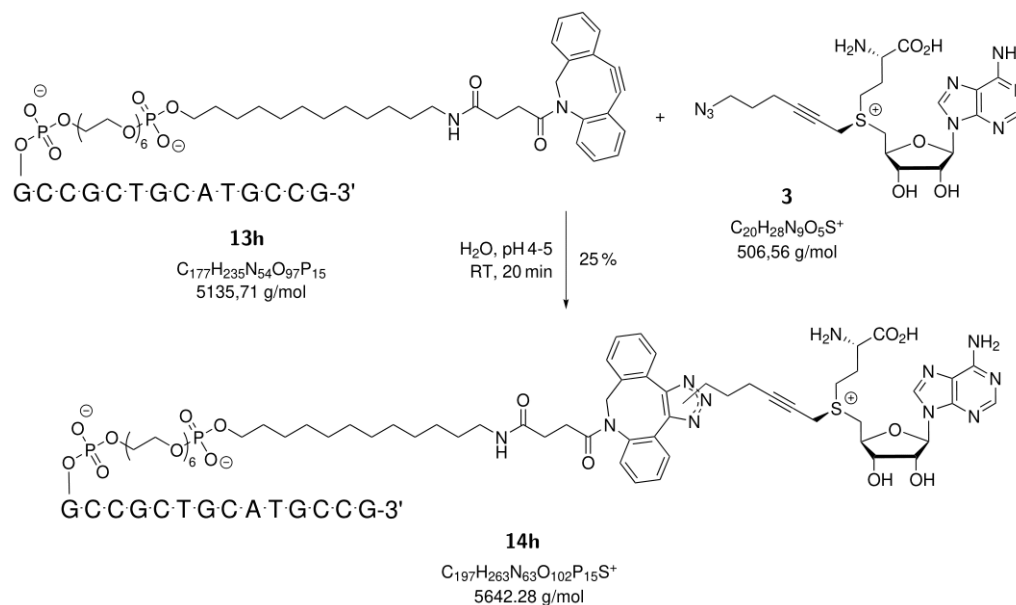
5.3.3.8 AdoYnPEG₆C₁₂ODN14

ODN14-PEG₆C₁₂-DBCO



Eine wässrige Lösung von ODN14-PEG₆C₁₂-NH₂ (**10h**, TE-Puffer, 450 µL, 1,0 mM, 450 nmol, 1 Äq.) wurde zu PBS-Puffer (450 µL) und DMF (180 µL) zugegeben. Daraufhin wurde in DMF gelöstes DBCO-NHS (**11**, 20 µL, 0,11 mM, 2,25 µmol, 5 Äq.) zugegeben und der Umsatz mittels *rp*-HPLC verfolgt (analytisch, Methode N1, 260/300 nm). Im weiteren Verlauf wurde stündlich weiteres in DMF gelöstes DBCO-NHS (20,0 µL, 0,11 mM, 2,25 µmol, 5 Äq.) zugegeben. Nach Ablauf der Reaktion (2 h, 15 Äq. DBCO-NHS) wurde das Reaktionsprodukt **13h** mittels *rp*-HPLC aufgereinigt (analytisch, Methode N1, 260/300 nm) und die erhaltene Produktlösung durch Gefriertrocknung eingeeengt. Die Konzentration von Produkt **13h** wurde durch UV-Absorption ermittelt ($\epsilon_{260} = 128\,100\,\text{L mol}^{-1}\,\text{cm}^{-1}$, Summe der Extinktionskoeffizienten der im Molekül enthaltenen Chromophore, ODN14-PEG₆C₁₂-NH₂: 121 100; DBCO: 7000 L mol⁻¹ cm⁻¹). Zur Überprüfung der Reinheit des Reaktionsproduktes **13h** wurde eine Einzelinjektion durchgeführt (analytisch, Methode N1, 260/300 nm).

Ausbeute: 310 nmol (69 %)

AdoYnPEG₆C₁₂ODN14

Es wurden eine wässrige Lösung von ODN14-PEG₆C₁₂-DBCO (**13h**, Eluent A (neutral), 109,4 µL, 2,6 mM, 280 nmol, 1 Äq.), eine wässrige Lösung von AdoYnAzid (**3**, Eluent A (sauer), 120,0 µL, 3,5 mM, 420 nmol, 1,5 Äq.) und Wasser (120,6 µL) vorgelegt. Anschließend wurde der pH-Wert mit Essigsäure (0,1 M) auf 4-5 eingestellt. Daraufhin wurde der Umsatz der Reaktion unter Bildung des Isomerengemischs mit AdoYnPEG₆C₁₂ODN14 (**14h**) verfolgt, dessen Isolation anschließend mittels *rp*-HPLC (analytisch, Methode N2, 260/272 nm) erfolgte. Die erhaltene Produktlösung wurde direkt nach Elution mit Essigsäure (0,1 M) auf pH 4 eingestellt und anschließend mittels Gefriertrocknung eingeeengt. Die Konzentration von Produkt **14h** wurde durch UV-Absorption ermittelt ($\epsilon_{260} = 143\,500\text{ L mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$, Summe der Extinktionskoeffizienten der im Molekül enthaltenen Chromophore, ODN14-PEG₆C₁₂-NH₂: 121 100; DBCO: 7000; AdoYnAzid: 15 400 L mol⁻¹ cm⁻¹). Zur Überprüfung der Reinheit des Reaktionsproduktes **14h** wurde eine Einzelinjektion durchgeführt (analytisch, Methode N2, 260/272 nm).

Ausbeute: 70 nmol (25 %)

MS (MALDI-TOF, 3-HPA, TFA_(aq) (0,1 %)/MeCN (1:1 v/v), 10 mg mL⁻¹ Ammoniumcitrat):
 m/z (%) = 5643,2 [M]⁺ (100), 5541,1 [TE+H]⁺ (26).

5.4 Aktivität doppeltaktivierter AdoMet-Analoga

5.4.1 Aktivitätstests von M.TaqI mit AdoYnYn (kurz), AdoYnTAMRA (kurz), AdoYnYn (lang) oder AdoYnTAMRA (lang)

Es wurden Lösungen (20 μL , M.TaqI-RP) mit genomischer T7-DNA (50 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$, 1 μg), AdoYnYn (kurz), AdoYnYn (lang), AdoYnTAMRA (kurz) oder AdoYnTAMRA (lang) (**4**, **5**, **6b** und **7**, 10 μM) sowie M.TaqI (1,0; 0,50; 0,25; 0,13; $6,3 \cdot 10^{-2}$; $3,1 \cdot 10^{-2}$; $1,6 \cdot 10^{-2}$; $7,8 \cdot 10^{-3}$; $3,9 \cdot 10^{-3}$; $2,0 \cdot 10^{-3}$ Äq. in Bezug auf 111 5'-TCGA-3' Erkennungssequenzen) angesetzt und 1 h bei 65 °C inkubiert. Zusätzliche Proben (20 μL , M.TaqI-RP) gleicher Konzentrationen ohne AdoMet-Analogon oder mit erhöhter Cofaktorkonzentration (80 μM) ohne M.TaqI wurden identisch behandelt. Daraufhin wurde zu jeder Probe Restriktionslösung (je 30 μL , CutSmart-Puffer) mit R.TaqI (0,33 $\text{U } \mu\text{L}^{-1}$, 10 U) zugegeben und erneut für 1 h bei 65 °C inkubiert. Anschließend wurde Proteinase K (1 μL , 0,3 mU) zugegeben und 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von Ladepuffer (10 μL) wurden die Proben mittels Agarosegelelektrophorese analysiert (0,1 μg DNA, 0,7 %, 0,5 x TBE-Puffer, 6 V cm^{-1} , 45 min).

5.4.2 Aktivitätstests von M.TaqI/M.BseCI mit neuen fluoreszierenden AdoMet-Analoga AdoYnATTO532 und AdoYnAF640R

DNA-MTase-Verdünnung Lösungen (20 μL , M.TaqI-RP oder M.BseCI-RP) mit genomischer Lambda-DNA (50 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$, 1 μg), AdoYnATTO532 oder AdoYnAF647 (**6a,d**, 10 μM) und M.TaqI (1,0; 0,50; 0,25; 0,13; $6,3 \cdot 10^{-2}$; $3,1 \cdot 10^{-2}$; $1,6 \cdot 10^{-2}$; $7,8 \cdot 10^{-3}$; $3,9 \cdot 10^{-3}$; $2,0 \cdot 10^{-3}$ Äq. in Bezug auf 121 5'-TCGA-3' Erkennungssequenzen) oder M.BseCI (10; 5,0; 2,5; 1,3; 0,63; 0,31; 0,16; $7,8 \cdot 10^{-2}$; $3,9 \cdot 10^{-2}$; $2,0 \cdot 10^{-2}$ Äq. in Bezug auf 3 5'-ATCGAT-3' Erkennungssequenzen) angesetzt und 1 h bei 65 °C inkubiert. Je eine zusätzliche Probe (20 μL , M.TaqI-RP) mit DNA-MTase (1 bzw. 10 Äq.) ohne AdoMet-Analogon wurde identisch behandelt. Daraufhin wurde zu jeder Probe mit M.TaqI Restriktionslösung (je 30 μL , CutSmart-Puffer) mit R.TaqI (0,33 $\text{U } \mu\text{L}^{-1}$, 10 U) zugegeben und erneut für 1 h bei 65 °C inkubiert. Proben mit M.BseCI wurde gleichermaßen, jedoch mit R.ClaI anstelle von R.TaqI versetzt. Anschließend wurde Proteinase K (1 μL , 0,3 mU) zugegeben und 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von Ladepuffer (10 μL) wurden die Proben mittels Agarosegelelektrophorese analysiert (0,1 μg DNA, 0,7 %, 0,5 x TBE-Puffer, 6 V cm^{-1} , 30-60 min).

Cofaktorverdünnung Zusätzliche Lösungen (20 μL , M.TaqI-RP) mit genomischer Lambda-DNA (50 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$, 1 μg), AdoYnATTO532 oder AdoYnAF647 (**6a,d**, 40; 20; 10; 5,0; 2,5; 1,3; 0,62; 0,31; 0,15; 0,07 μM) und M.TaqI (1,0 Äq. in Bezug auf 121 5'-TCGA-3' Erkennungssequenzen) wurden angesetzt und 1 h bei 65 °C inkubiert. Die weitere experimentelle Vorgehensweise unterschied sich nicht von den zuvor beschriebenen DNA-MTase-Verdünnungsreihen mit fluoreszierenden AdoMet-Analoga.

5.4.3 Aktivitätstests von M.TaqI mit AdoYnODN11

DNA-MTase-Verdünnung Es wurden Lösungen (20 μL , M.TaqI-RP) mit genomischer Lambda-DNA (50 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$, 1 μg), AdoYnODN11 (**14a**) (40 μM) sowie M.TaqI (10; 5; 2,5; 1,3; 0,63; 0,31; 0,16 Äq. in Bezug auf 121 5'-TCGA-3' Erkennungssequenzen) angesetzt und 1 h bei 65 °C inkubiert. Eine Kontrolle mit M.TaqI (10 Äq.) ohne AdoMet-Analogon wurde gleichermaßen behandelt. Zu jeder Probe wurde daraufhin Restriktionslösung (je 30 μL , CutSmart-Puffer) mit R.TaqI (0,33 $\text{U } \mu\text{L}^{-1}$, 10 U) zugegeben und erneut für 1 h bei 65 °C inkubiert. Anschließend wurde Proteinase K (1 μL , 0,3 mU) zugegeben und 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von Ladepuffer (10 μL) wurden die Proben mittels Agarosegelelektrophorese analysiert (0,1 μg DNA, 0,7 %, 0,5 x TBE-Puffer, 6 V cm^{-1} , 30-60 min).

Cofaktorverdünnung Weitere Lösungen (20 μL , M.TaqI-RP) mit genomischer Lambda-DNA (50 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$, 1 μg), AdoYnODN11 (**14a**, 40; 20; 10; 5,0; 2,5; 1,3; 0,62; 0,31; 0,15; 0,07 μM) sowie M.TaqI (10 bzw. 5,0 Äq. in Bezug auf 121 5'-TCGA-3' Erkennungssequenzen) wurden angesetzt und 1 h bei 65 °C inkubiert. Kontrollen ohne DNA-MTase mit AdoYnODN11 (**14a**, 40 μM) wurden gleichermaßen behandelt. Die weitere experimentelle Vorgehensweise unterschied sich nicht von den zuvor beschriebenen DNA-MTase-Verdünnungsreihen mit AdoYnODN11.

5.4.4 Aktivitätstests mit weiteren ODN-modifizierten AdoMet-Analoga

Zusätzlich wurden Lösungen (20 μL , M.TaqI-RP) mit genomischer DNA (**14a-d**: Lambda; **14e-h**: T7, 50 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$, 1 μg), einer der ODNmodifizierten AdoMet Analoga **14a-h** (40 μM) sowie M.TaqI (1,0; 0,5; 0,25; 0,13; 0,06 Äq. in Bezug auf 121 5'-TCGA-3' Erkennungssequenzen) angesetzt und 1 h bei 65 °C inkubiert. Je eine zusätzliche Probe (20 μL , M.TaqI-RP) mit DNA-MTase (10 Äq.) ohne AdoMet-Analogon wurde identisch behandelt. Daraufhin wurde zu jeder Probe mit M.TaqI Restriktionslösung (je 30 μL , CutSmart-Puffer) mit R.TaqI (0,33 $\text{U } \mu\text{L}^{-1}$, 10 U) zugegeben und erneut für 1 h bei 65 °C inkubiert. Anschließend wurde Proteinase K (1 μL , 0,3 mU) zugegeben und 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von Ladepuffer (10 μL) wurden die Proben mittels Agarosegelelektrophorese analysiert (0,1 μg DNA, 0,7 %, 0,5 x TBE-Puffer, 6 V cm^{-1} , 30-60 min).

5.4.5 EMSA von M.TaqI mit AdoYnODN11 und R.PvuII bzw. R.Hpy188III

Lösungen (80 μL , M.TaqI-RP) mit pUC19 Plasmid-DNA (100 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$, 8 μg), AdoYnODN11 (**14a**, 10 μM) und M.TaqI (10 Äq. in Bezug auf 4 5'-TCGA-3' Erkennungssequenzen) wurden 1 h bei 65 °C inkubiert. Eine zusätzliche Probe (80 μL) gleicher Konzentrationen ohne AdoYnODN11 wurde identisch behandelt. Anschließend wurden die Proben aufgeteilt (je 20 μL , 2 μg DNA), mit Restriktionslösungen (30 μL , R.Hpy188III: CutSmart-Puffer; R.PvuII: NEB3.1-Puffer) mit R.Hpy188III oder R.PvuII (je 0,66 $\text{U } \mu\text{L}^{-1}$, 20 U) versetzt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Alle Restriktionsansätze wurden erneut aufgeteilt (je 12,5 μL , 0,5 μg DNA) und mit ExoI-Puffer (1 x, 37,5 μL) entweder mit oder ohne Exonuklease I (0,3 μL , 3 U) versetzt, woraufhin alle

Proben bei 37 °C inkubiert wurden. Nach Zugabe von Ladepuffer (10 µL) wurden alle Proben mittels Agarosegelelektrophorese analysiert (0,1 µg DNA, 1,0–2,0 %, 0,5 x TBE-Puffer, 6 V cm⁻¹, 60 min).

5.5 Einstufige DNA-Modifikation

5.5.1 DNA-Modifikation mit fluoreszierenden Reportergruppen

5.5.1.1 M.BseCI mit AdoYnTAMRA sowie Lambda- und T7-DNA zur Analyse mittels Fluoreszenzmikroskopie

Lösungen (40 µL, M.BseCI-RP) mit genomischer Lambda- oder T7-DNA (50 ng µL⁻¹, 2,0 µg), M.BseCI (Lambda: 234 nM, 9,4 pmol, 10 Äq. in Bezug auf 5'-ATCGAT-3' Erkennungssequenzen; T7: 58 nM, 2,3 pmol, 10 Äq. in Bezug auf 5'-ATCGAT-3' Erkennungssequenzen) und AdoYnTAMRA (**6b**, 10 µM) wurden 1 h bei 55 °C inkubiert. Zusätzliche Proben (20 µL, M.BseCI-RP) gleicher Konzentrationen mit Lambda-DNA jedoch ohne AdoYnTAMRA oder M.BseCI wurde identisch behandelt. Zu Teilen aller Proben (je 10 µL) wurde Restriktionslösung (15 µL, CutSmart-Puffer, +6,7 mM Mg(OAc)₂) mit R.ClaI (0,33 U µL⁻¹, 0,5 U) oder eine Kontrolllösung ohne Restriktionsendonuklease zugegeben, woraufhin 1 h bei 37 °C inkubiert wurde. Anschließend wurde Proteinase K (1 µL, 0,3 mU) zugegeben und 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von Ladepuffer (5 µL) wurden die Proben mittels Agarosegelelektrophorese analysiert (0,1 µg DNA, 0,7 %, 0,5 x TBE-Puffer, 6 V cm⁻¹, 45 min).

Ein Teil der ursprünglichen Proben ohne Restriktionslösung wurde daraufhin mittels Agarose-Plugs aufgereinigt. Dazu wurden die Lösungen zunächst bei 43 °C mit Agaroselösung (2 %, SeaPlaque™-Agarose, TE-Puffer) versetzt (1:1), in Plug-Formen (*disposable plug molds*, Biorad, Hercules, USA) überführt und anschließend 30 min bei 6 °C gelagert. Die ausgehärteten Agarose-Plugs wurden in Falcons (15 mL) überführt und gewaschen (7 x 10 min, 10 mL, TE-Puffer). Nach jedem Waschgang wurde der verwendete Puffer abdekantiert und ersetzt. Anschließend wurden alle Plugs in Eppendorf-Gefäße überführt und zunächst 10 min bei 75 °C und dann 10 min bei 43 °C inkubiert. Nach Zugabe von β-Agarase I (2,0 U) wurden die geschmolzenen Plugs für 1 h bei 43 °C inkubiert. Anschließend wurde Proteinase K (1 µL, 0,3 mU) zugegeben und 1 h bei 37 °C inkubiert. Die weitere Probenvorbereitung erfolgte wie allgemein im Abschnitt 5.2.4.2 beschrieben.

5.5.1.2 M.BseCI mit AdoYnAF647/AdoYnCF647/AdoYnTAMRA und Lambda-DNA zur Analyse mittels Fluoreszenzmikroskopie

Lösungen (40 µL, M.BseCI-RP) mit genomischer Lambda-DNA (50 ng µL⁻¹, 2,0 µg), M.BseCI (58 nM, 2,3 pmol, 10 Äq. in Bezug auf 5'-ATCGAT-3' Erkennungssequenzen) sowie AdoMet, AdoYnTAMRA, AdoYnCF647 oder AdoYnAF647 (**1**; **6b-d**, 10 µM) wurden 1 h bei 55 °C inkubiert. Zusätzliche Proben (20 µL, M.BseCI-RP) gleicher Konzentrationen ohne Cofaktor oder ohne M.BseCI mit AdoMet wurden identisch behandelt. Zu Teilen aller Proben (je 10 µL) wurde Restriktionslösung (15 µL, CutSmart-Puffer, +6,7 mM Mg(OAc)₂) mit R.ClaI (0,33 U µL⁻¹, 0,5 U)

oder eine Kontrolllösung ohne Restriktionsendonuklease zugegeben, woraufhin 1 h bei 37 °C inkubiert wurde. Anschließend wurde Proteinase K (1 µL, 0,3 mU) zugegeben und 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von Ladepuffer (5 µL) wurden die Proben mittels Agarosegelelektrophorese analysiert (0,1 µg DNA, 0,7 %, 0,5 x TBE-Puffer, 6 V cm⁻¹, 45 min).

Ein Teil der ursprünglichen Proben ohne Restriktionslösung (je 20 µL) wurde daraufhin mittels Agarose-Plugs aufgereinigt. Dazu wurden die Lösungen zunächst bei 43 °C mit Agaroselösung (2 %, SeaPlaque™-Agarose, TE-Puffer) versetzt (1:1), in Plug-Formen (*disposable plug molds*, Biorad, Hercules, USA) überführt und anschließend 30 min bei 6 °C gelagert. Die ausgehärteten Agarose-Plugs wurden in Falcons (15 mL) überführt und gewaschen (7 x 10 min, 10 mL, TE-Puffer). Nach jedem Waschgang wurde der verwendete Puffer abdekantiert und ersetzt. Anschließend wurden alle Plugs in Eppendorf-Gefäße überführt und zunächst 10 min bei 75 °C und dann 10 min bei 43 °C inkubiert. Nach Zugabe von β -Agarase I (2,0 U) wurden die geschmolzenen Plugs für 1 h bei 43 °C inkubiert. Anschließend wurde Proteinase K (1 µL, 0,3 mU) zugegeben und 1 h bei 37 °C inkubiert. Die weitere Probenvorbereitung erfolgte wie allgemein im Abschnitt 5.2.4.2 beschrieben.

5.5.1.3 M.BseCI mit AdoYnCF640R und biotinylierter Lambda-DNA zur Analyse mittels *C-Trap* (LUMICKS, Amsterdam, NL)

Reaktionslösungen (60 µL, M.BseCI-RP) mit genomischer Lambda-DNA oder biotinylierter genomischer Lambda-DNA (10 ng µL⁻¹, 0,6 µg), M.BseCI (47 nM, 2,8 pmol, 10 Äq. in Bezug auf 5'-ATCGAT-3' Erkennungssequenzen) und AdoYnCF640R (**6c**, 40 µM) wurden 1 h bei 55 °C inkubiert. Eine zusätzliche Probe gleicher Konzentrationen (10 µL, M.BseCI-RP) mit biotinylierter Lambda-DNA ohne AdoYnCF640R wurde identisch behandelt. Zu Teilen aller Proben (je 5 µL) wurde Restriktionslösung (5 µL, CutSmart-Puffer, +10 mM Mg(OAc)₂) mit R.ClaI (0,20 U µL⁻¹, 1 U) oder eine Kontrolllösung ohne Restriktionsendonuklease zugegeben, woraufhin 1 h bei 37 °C inkubiert wurde. Nach Zugabe von Ladepuffer (2 µL) wurden die Proben mittels Agarosegelelektrophorese analysiert (50 ng DNA, 0,7 %, 0,5 x TBE-Puffer, 6 V cm⁻¹, 45 min). In Kooperation mit dem Unternehmen LUMICKS wurde der Teil der Probe biotinylierter Lambda-DNA mit AdoYnCF640R zu dem keine Restriktions- bzw. Kontrolllösung zugegeben wurde fluoreszenzmikroskopisch in Kombination mit Streptavidin-modifizierten Beads und optischer Pinzette (*C-Trap*) analysiert. Dabei kam sowohl ein konfokales als auch ein supraauflösendes STED-Mikroskop zum Einsatz.

5.5.2 DNA-Modifikation mit sterisch anspruchsvollen Gruppen

5.5.2.1 M.TaqI mit AdoYnBiotinII und Plasmid-DNA zur Analyse mittels Festkörpernanoporen (Keyser Group, Cambridge, UK)

Lösungen (100 µL, M.TaqI-RP) mit Φ X174 oder M13mp18 Plasmid-DNA (50 ng µL⁻¹, 5 µg), M.TaqI (Φ X174: 0,14 µM, 14,3 pmol, 1 Äq. in Bezug auf 5'-TCGA-3' Erkennungssequenzen; M13mp18: 0,13 µM, 12,6 pmol, 1 Äq. in Bezug auf 5'-TCGA-3' Erkennungssequenzen) und AdoYnBiotinII (**15**, 80 µM) wurden 1 h bei 65 °C inkubiert. Zu Teilen aller Proben (je 20 µL) wurde

Restriktionslösung (30 μL , CutSmart-Puffer) mit R.TaqI ($0,33 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$, 1 U) zugegeben, woraufhin 1 h bei 65°C inkubiert wurde. Nach Zugabe von Ladepuffer (10 μL) wurden die Proben mittels Agarosegelelektrophorese analysiert (100 ng DNA, 1,0 %, 0,5 x TBE-Puffer, 6 V cm^{-1} , 45 min). Die ursprünglichen Proben ohne Restriktionslösung wurden nach Anleitung des Herstellers mittels *QIAquick PCR purification Kit* (QIAGEN, Hilden) aufgereinigt. In Kooperation mit der Keyser Group (Camebridge, UK) wurden die aufgereinigten Proben anschließend elektrisch mittels Festkörpernanoporen analysiert.

5.5.2.2 M.TaqI mit AdoYnODN11 und Plasmid-DNA zur Analyse mittels Festkörpernanoporen (Keyser Group, Camebridge, UK)

Eine Reaktionslösungen (110 μL , M.TaqI-RP) mit pBR322 Plasmid-DNA ($100 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$, 11 μg), M.TaqI (2,43 μM , 267 pmol, 10 $\text{\AA}$ q. in Bezug auf 5'-TCGA-3' Erkennungssequenzen) und AdoYnODN11 (**14a**, 10 μM) wurde 1 h bei 65°C inkubiert. Eine Kontrolllösung gleicher Konzentrationen ohne AdoYnODN11 wurde identisch behandelt. Zu einem Teil der Proben (10 μL) wurde Restriktionslösung (15 μL , CutSmart-Puffer) mit R.TaqI ($0,66 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$, 10 U) zugegeben, woraufhin 1 h bei 65°C inkubiert wurde. Nach Zugabe von Ladepuffer (5 μL) wurde die Proben mittels Agarosegelelektrophorese analysiert (100 ng DNA, 1,0 %, 0,5 x TBE-Puffer, 6 V cm^{-1} , 45 min). Zu weiteren Teilen der Probe (10 μL) wurden anschließend verschiedene Restriktionslösungen (15 μL , CutSmart-Puffer) mit R.TaqI und/oder R.NdeI (je $0,66 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$, 10 U) zugegeben, woraufhin 2 h bei 37°C inkubiert wurde. Nach Zugabe von Ladepuffer (5 μL) wurden die Proben erneut mittels Agarosegelelektrophorese analysiert (100 ng DNA, 1,0 %, 0,5 x TBE-Puffer, 6 V cm^{-1} , 45 min). Die ursprünglichen Proben ohne Restriktionslösung wurden nach Anleitung des Herstellers mittels *QIAquick PCR purification Kit* (QIAGEN, Hilden) aufgereinigt. In Kooperation mit der Keyser Group (Camebridge, UK) wurden die aufgereinigten Proben anschließend elektrisch mittels Festkörpernanoporen analysiert.

5.6 DNA-Modifikation mittels DNA-Blocking

5.6.1 Voruntersuchungen mit Restriktionsendonukleasen

Es wurden Reaktionslösungen (20 μL , Reaktionspuffer der jeweiligen REase oder Blocking-Puffer) mit pBR322 Plasmid-DNA ($50 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$, 1,0 μg) und einer Restriktionsendonuklease ($0,5 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$, 10 U, R.AccI; R.AclI; R.BsiEI; R.BstUI; R.ClaI; R.HaeIII; R.Hin1I; R.HincII; R.HpaII; R.Hpy188III; R.HpyCH4IV; R.NarI; R.Psp1406I; R.SalI) angesetzt und 1 h bei der jeweiligen Reaktionstemperatur inkubiert. Anschließend wurde Proteinase K (1 μL , 0,3 mU) zugegeben und 1 h bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von Ladepuffer (4 μL) wurden die Proben mittels Agarosegelelektrophorese analysiert (0,1 μg DNA, 1,0 %, 0,5 x TBE-Puffer, 6 V cm^{-1} , 45 min).

5.6.2 Voruntersuchungen mit DNA-Methyltransferasen

Reaktionslösungen (20 μL , Blocking-Puffer) mit genomischer Lambda-DNA ($20 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$, 0,4 μg), M.TaqI (40; 20; 10; 5,0; 2,5; 1,3 $\text{ ng } \mu\text{g}^{-1}$ DNA) oder M.CviBIII (320; 160; 80; 40; 20; 10 $\text{ ng } \mu\text{g}^{-1}$ DNA)

und AdoMet (**1**, 10 μM) sowie Kontrolllösungen mit M.TaqI (40 $\text{ng } \mu\text{g}^{-1}$ DNA) oder M.CviBIII (320 $\text{ng } \mu\text{g}^{-1}$ DNA) ohne AdoMet wurden angesetzt. Alle Proben wurden daraufhin 1 h bei 37 °C inkubiert. Zu den Proben wurde Restriktionslösung (30 μL , CutSmart-Puffer, +6,67 mM $\text{Mg}(\text{OAc})_2$) mit R.TaqI (0,13 $\text{U } \mu\text{L}^{-1}$, 4 U) zugegeben und 1 h bei 65 °C inkubiert. Anschließend wurde Proteinase K (1 μL , 0,3 mU) zugegeben und 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von Ladepuffer (10 μL) wurden die Proben mittels Agarosegelelektrophorese analysiert (0,1 μg DNA, 1,0 %, 0,5 x TBE-Puffer, 6 V cm^{-1} , 45 min).

5.6.3 Anwendung von DNA-Blocking mit Plasmid-DNA

Lösungen (50 μL , Blocking-Puffer) mit pUC19 oder pBR322 Plasmid-DNA (20 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$, 1,0 μg), M.TaqI (0,4 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$, 20 ng) oder M.CviBIII (3,2 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$, 160 ng) und AdoMet (**1**, 10 μM) sowie R.HincII oder R.Hpy188III (1,0 $\text{U } \mu\text{L}^{-1}$, 50 U) wurden 1 h bei 37 °C inkubiert. Zusätzliche Proben ohne Restriktionsendonuklease oder eine der Methyltransferasen wurden gleichermaßen behandelt. Zu sämtlichen Proben mit M.TaqI wurde daraufhin Proteinase K (1 μL , 0,3 mU) zugegeben und 1 h bei 37 °C inkubiert. Alle anderen Proben wurden 30 min bei 75 °C hitzeinaktiviert. Alle Proben wurden daraufhin mittels *QIAquick PCR Purification* Kit (QIAGEN, Hilden) aufgereinigt. Zu einem Teil aller Proben (20 μL) wurde daraufhin Restriktionslösung (30 μL , CutSmart-Puffer, +6,67 mM $\text{Mg}(\text{OAc})_2$) mit R.TaqI (0,13 $\text{U } \mu\text{L}^{-1}$, 4 U) zugegeben, woraufhin 1 h bei 65 °C inkubiert wurde. Anschließend wurde Proteinase K (2 μL , 0,6 mU) zugegeben und 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von Ladepuffer (10 μL) wurden die Proben mittels Agarosegelelektrophorese analysiert (0,1 μg DNA, 1,0 %, 0,5 x TBE-Puffer, 6 V cm^{-1} , 45 min).

5.6.4 Anwendung von DNA-Blocking mit genomischer DNA

Methylierung Lösungen (40 μL , Blocking-Puffer) mit genomischer T7- oder Lambda-DNA (20 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$, 0,8 μg), AdoMet (**1**, 10 μM), M.TaqI (40; 20; 10; 5,0 $\text{ng } \mu\text{g}^{-1}$ DNA) und R.Hpy188III (1,0 $\text{U } \mu\text{L}^{-1}$, 40 U) wurden 1 h bei 37 °C inkubiert. Kontrollen ohne M.TaqI oder R.Hpy188III wurden gleichermaßen behandelt.

Die Proben wurden daraufhin mittels Agarose-Plugs aufgereinigt. Dazu wurden die Lösungen zunächst bei 43 °C mit Agaroselösung (2 %, SeaPlaque™-Agarose, Blocking-Puffer) versetzt (1:1), in Plug-Formen (*disposable plug molds*, Biorad, Hercules, USA) überführt und anschließend 30 min bei 6 °C gelagert. Die ausgehärteten Agarose-Plugs wurden in Falcons (15 mL) überführt und gewaschen (7 x 10 min, 10 mL, Blocking-Puffer). Nach jedem Waschgang wurde der verwendete Puffer abdekantiert und ersetzt. Anschließend wurden alle Plugs, in Eppendorf-Gefäße überführt und zunächst 10 min bei 75 °C und dann 10 min bei 43 °C inkubiert. Nach Zugabe von β -Agarase I (2,0 U) wurden die geschmolzenen Plugs für 1 h bei 43 °C inkubiert. Zu einem Teil aller erhaltenen Lösungen (62,5 μL) wurde EDTA-Lösung (0,25 μL , 500 mM) zugegeben, woraufhin 30 min bei 75 °C hitzeinaktiviert wurde.

Zu Aliquots sämtlicher Proben (10 μL) wurde Restriktionslösung (10 μL , CutSmart-Puffer, +10 mM $\text{Mg}(\text{OAc})_2$) mit R.TaqI (0,1 $\text{U } \mu\text{L}^{-1}$, 1,0 U) zugegeben, woraufhin 1 h bei 65 °C inkubiert wurde. Die Reaktionslösungen wurden anschließend mit Proteinase K (1 μL , 0,3 mU) versetzt

und 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von Ladepuffer (4 µL) wurden die Proben mittels Agarosegelelektrophorese analysiert (0,1 µg DNA, 0,7 %, 0,5 x TBE-Puffer, 6 V cm⁻¹, 45 min).

Modifikation Zu einem weiteren Teil der ursprünglichen Reaktionslösungen (20 µL, DNA: 10 ng µL⁻¹; 0,2 µg), wurde Modifikationslösung (20 µL, Blocking-Puffer) mit M.TaqI (2,0 Äq. in Bezug auf die im ersten Reaktionsschritt blockierten 5'-TCGA-3' Erkennungssequenzen, Lambda: 45 ng µg⁻¹ DNA; T7: 52 ng µg⁻¹ DNA) und AdoYnTAMRA (**6b**, 20 mM) zugegeben, woraufhin 1 h bei 65 °C inkubiert wurde.

Erneut wurden zu Aliquots sämtlicher Proben (20 µL) Restriktionslösung (20 µL, CutSmart-Puffer, +10 mM Mg(OAc)₂) mit R.TaqI (0,05 U µL⁻¹, 1,0 U) zugegeben, woraufhin 1 h bei 65 °C inkubiert wurde. Die Reaktionslösungen wurden anschließend mit Proteinase K (2 µL, 0,6 mU) versetzt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von Ladepuffer (8 µL) wurden die Proben erneut mittels Agarosegelelektrophorese analysiert (0,5 µg DNA, 0,7 %, 0,5 x TBE-Puffer, 6 V cm⁻¹, 45 min).

Die übrigen Modifikationslösungen (20 µL, DNA: 5,0 ng µL⁻¹, 0,1 µg) wurden mit Proteinase K (1 µL, 0,3 mU) versetzt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Aufreinigung erneut mittels Agarose-Plugs, analog zu der bereits beschriebenen Durchführung. Dabei wurde TE-Puffer als Waschpuffer verwendet. Die vom überschüssigen Cofaktor befreiten Proben (40 µL, DNA: 2,5 ng µL⁻¹, 0,1 µg) wurden wie in Abschnitt 5.2.4.2 beschrieben vorbereitet und anschließend fluoreszenzmikroskopisch analysiert.

5.7 In-Gel DNA-Modifikation

5.7.1 In-Gel DNA-Modifikation mit M.TaqI

Lösungen (20 µL, M.TaqI-RP) mit genomischer Lambda-DNA (10 ng µL⁻¹) mit M.TaqI (1,9 pmol, 0,09 µM, 2,5 Äq. in Bezug auf 5'-TCGA-3'-Erkennungssequenzen) wurden bei 45 °C mit SeaPlaque™-Agaroselösung (2 %, M.TaqI-RP) gemischt (1:1, 40 µL, 5 ng µL⁻¹ DNA) und in Einwegformen (*disposable plug molds*, Biorad, Hercules, USA) überführt. Die SeaPlaque™-Agarose wurde dazu zuvor 20 min bei 75 °C gelöst. Nach Erstarren der Lösungen (20 min, 6 °C) wurden die Agarose-Plugs aus den Formen entfernt und in Modifikationslösungen (100 µL, M.TaqI-RP) mit AdoYnATTO532, AdoYnTAMRA, AdoYnCF640R oder AdoYnAF647 (**6a-d**, 20 µM) überführt und 2 h bei 50 °C inkubiert. Zusätzlich wurde ein Kontrollansatz ohne AdoMet-Analogon angesetzt und identisch behandelt. Anschließend wurden die Agarose-Plugs entnommen und gewaschen (CutSmart-Puffer, 10 mL, 3 x 20 min). Zwischen den einzelnen Waschschritten wurde der Puffer abdekantiert und ersetzt. Zum erneuten Lösen der SeaPlaque™-Agarose wurden die Agarose-Plugs zunächst 10 min bei 75 °C und dann 10 min bei 45 °C inkubiert, woraufhin β-Agarase I (3,5 µL, 3,5 U) zugegeben und 1 h bei 45 °C inkubiert wurde. Zu Teilen der Ansätze (20 µL) wurde Restriktionslösung (20 µL, CutSmart-Puffer) mit R.TaqI (0,1 U µL⁻¹, 2 U) zugegeben und 1 h bei 65 °C inkubiert, woraufhin Proteinase K (2 µL, 0,6 mU) zugegeben

und 1 h bei 55 °C inkubiert. Nach Zugabe von Ladepuffer (8 µL) wurden die Proben mittels Agarosegelelektrophorese analysiert (100 ng DNA, 0,7 %, 0,5 x TBE-Puffer, 6 V cm⁻¹, 45 min).

5.7.2 In-Gel DNA-Modifikation mit M.BseCI

Lösungen (20 µL, M.BseCI-RP) mit Lambda-DNA (10 ng µL⁻¹) mit M.BseCI (0,94 pmol, 0,05 µM, 10 Äq. in Bezug auf 5'-ATCGAT-3'-Erkennungssequenzen) wurden bei 45 °C mit SeaPlaqueTM-Agaroselösung (2 %, M.BseCI-RP) gemischt (1:1, 40 µL, 5 ng µL⁻¹ DNA) und in Einwegformen (*disposable plug molds*, Biorad, Hercules, USA) überführt. Die SeaPlaqueTM-Agarose wurde dazu zuvor 20 min bei 75 °C gelöst. Nach Erstarren der Lösungen für 20 min bei 6 °C) wurden die Agarose-Plugs aus den Formen entfernt und in Modifikationslösungen (100 µL, M.BseCI-RP) mit AdoYnTAMRA, AdoYnATTO532, AdoYnCF640R oder AdoYnAF647 (**6a-d**, 20 µM) überführt und 2 h bei 50 °C inkubiert. Zusätzlich wurde ein Kontrollansatz ohne AdoMet-Analogon angesetzt und identisch behandelt. Anschließend wurden die Agarose-Plugs entnommen und gewaschen (CutSmart-Puffer, 10 mL, 3 x 20 min). Zwischen den einzelnen Waschschritten wurde der Puffer abdekantiert und ersetzt. Zum erneuten Lösen der SeaPlaqueTM-Agarose wurden die Agarose-Plugs zunächst 10 min bei 75 °C und dann 10 min bei 45 °C inkubiert, woraufhin β-Agarase I (3,5 µL, 3,5 U) zugegeben und 1 h bei 45 °C inkubiert wurde. Zu Teilen der Ansätze (20 µL) wurde Restriktionslösung (20 µL, CutSmart-Puffer) mit R.ClaI (0,1 U µL⁻¹, 2 U) zugegeben und 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde Proteinase K (2 µL, 0,6 mU) zugegeben und 1 h bei 55 °C inkubiert. Nach Zugabe von Ladepuffer (8 µL) wurden die Proben mittels Agarosegelelektrophorese analysiert (100 ng DNA, 0,7 %, 0,5 x TBE-Puffer, 6 V cm⁻¹, 45 min).

Literatur

- [1] D. C. Schwartz, X. Li, L. I. Hernandez, S. P. Ramnarain, E. J. Huff, Y.-K. Wang, *Science* **1993**, 262, 110–114.
- [2] M. Levy-Sakin, Y. Ebenstein, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2013**, 24, 690–698.
- [3] X. Michalet, R. Ekong, F. Fougereousse, S. Rousseaux, C. Schurra, N. Hornigold, M. v. Slegtenhorst, J. Wolfe, S. Povey, J. S. Beckmann *et al.*, *Science* **1997**, 277, 1518–1523.
- [4] L. A. Shearer, L. K. Anderson, H. de Jong, S. Smit, J. L. Goicoechea, B. A. Roe, A. Hua, J. J. Giovannoni, S. M. Stack, *G3* **2014**, 4, 1395–1405.
- [5] Z. A. Ratan, S. B. Zaman, V. Mehta, M. F. Haidere, N. J. Runa, N. Akter, *Cureus* **2017**, 9, e1325.
- [6] H. Zohar, S. J. Muller, *Nanoscale* **2011**, 3, 3027–3039.
- [7] A. Gottfried, E. Weinhold, *Biochem Soc Trans* **2011**, 39, 623–628.
- [8] R. K. Neely, J. Deen, J. Hofkens, *Biopolymers* **2011**, 95, 298–311.
- [9] J. Deen, C. Vranken, V. Leen, R. K. Neely, K. P. F. Janssen, J. Hofkens, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, 56, 5182–5200.
- [10] L. Feuk, A. R. Carson, S. W. Scherer, *Nat. Rev. Genet.* **2006**, 7, 85–97.
- [11] C. Alkan, B. P. Coe, E. E. Eichler, *Nat. Rev. Genet.* **2011**, 12, 363–376.
- [12] B. Teague, M. S. Waterman, S. Goldstein, K. Potamouisis, S. Zhou, S. Reslewic, D. Sarkar, A. Valouev, C. Churas, J. M. Kidd *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2010**, 107, 10848–10853.
- [13] M. Ray, S. Goldstein, S. Zhou, K. Potamouisis, D. Sarkar, M. A. Newton, E. Esterberg, C. Kendzioriski, O. Bogler, D. C. Schwartz, *BMC Genomics* **2013**, 14, 505–505.
- [14] K. Cheeseman, E. Rouleau, A. Vannier, A. Thomas, A. Briaux, C. Lefol, P. Walrafen, A. Bensimon, R. Lidereau, E. Conseiller *et al.*, *Hum. Mutat.* **2020**, 33, 998–1009.
- [15] Y. Dai, P. Li, Z. Wang, F. Liang, F. Yang, L. Fang, Y. Huang, S. Huang, J. Zhou, D. Wang *et al.*, *J. Med. Genet.* **2020**, 57, 109–120.
- [16] H. Sharim, A. Grunwald, T. Gabrieli, Y. Michaeli, S. Margalit, D. Torchinsky, R. Arielly, G. Nifker, M. Juhasz, F. Gularek *et al.*, *Genome Res.* **2019**, 29, 646–656.
- [17] M. L. Metzker, *Nat. Rev. Genet.* **2010**, 11, 31–46.
- [18] E. E. Schadt, S. Turner, A. Kasarskis, *Hum Mol Genet* **2010**, 19, R227–R240.
- [19] C. Alkan, S. Sajjadian, E. E. Eichler, *Nat. Methods* **2011**, 8, 61–65.
- [20] H. Barseghyan, W. Tang, R. T. Wang, M. Almalvez, E. Segura, M. S. Bramble, A. Lipson, E. D. Douine, H. Lee, E. C. Délot *et al.*, *Genome Med.* **2017**, 9, 90–94.
- [21] R. M. Durbin, D. Altshuler, R. M. Durbin, G. R. Abecasis, D. R. Bentley, A. Chakravarti, A. G. Clark, F. S. Collins, F. M. De La Vega, P. Donnelly *et al.*, *Nature* **2010**, 467, 1061–1073.
- [22] R. E. Mills, K. Walter, C. Stewart, R. E. Handsaker, K. Chen, C. Alkan, A. Abyzov, S. C. Yoon, K. Ye, R. K. Cheetham *et al.*, *Nature* **2011**, 470, 59–65.

- [23] M. J. Levene, J. Korlach, S. W. Turner, M. Foquet, H. G. Craighead, W. W. Webb, *Science* **2003**, 299, 682–686.
- [24] J. Eid, A. Fehr, J. Gray, K. Luong, J. Lyle, G. Otto, P. Peluso, D. Rank, P. Baybayan, B. Bettman *et al.*, *Science* **2009**, 323, 133–138.
- [25] G. X. Y. Zheng, B. T. Lau, M. Schnall-Levin, M. Jarosz, J. M. Bell, C. M. Hindson, S. Kyriazopoulou-Panagiotopoulou, D. A. Masquelier, L. Merrill, J. M. Terry *et al.*, *Nature Biotechnology* **2016**, 34, 303–311.
- [26] M. G. Ross, C. Russ, M. Costello, A. Hollinger, N. J. Lennon, R. Hegarty, C. Nusbaum, D. B. Jaffe, *Genome Biol.* **2013**, 14, R51.
- [27] M. Pendleton, R. Sebra, A. W. C. Pang, A. Ummat, O. Franzen, T. Rausch, A. M. Stütz, W. Stedman, T. Anantharaman, A. Hastie *et al.*, *Nat. Methods* **2015**, 12, 780–786.
- [28] E. T. Lam, A. Hastie, C. Lin, D. Ehrlich, S. K. Das, M. D. Austin, P. Deshpande, H. Cao, N. Nagarajan, M. Xiao *et al.*, *Nat. Biotechnol.* **2012**, 30, 771–776.
- [29] Y. Michaeli, Y. Ebenstein, *Nat. Biotechnol.* **2012**, 30, 762–763.
- [30] J. Jeffet, A. Kobo, T. Su, A. Grunwald, O. Green, A. N. Nilsson, E. Eisenberg, T. Ambjörnsson, F. Westerlund, E. Weinhold *et al.*, *ACS Nano* **2016**, 10, 9823–9830.
- [31] E. S. Lander, L. M. Linton, B. Birren, C. Nusbaum, M. C. Zody, J. Baldwin, K. Devon, K. Dewar, M. Doyle, W. FitzHugh *et al.*, *Nature* **2001**, 409, 860–921.
- [32] International Human Genome Sequencing Consortium, *Nature* **2004**, 431, 931–945.
- [33] A. W. C. Pang, J. R. MacDonald, R. K. Yuen, V. M. Hayes, S. W. Scherer, *G3* **2014**, 4, 63–65.
- [34] A. R. Hastie, L. Dong, A. Smith, J. Finklestein, E. T. Lam, N. Huo, H. Cao, P.-Y. Kwok, K. R. Deal, J. Dvorak *et al.*, *PloS One* **2013**, 8, e55864.
- [35] E. T. Lam, A. Hastie, C. Lin, D. Ehrlich, S. K. Das, M. D. Austin, P. Deshpande, H. Cao, N. Nagarajan, M. Xiao *et al.*, *Nat. Biotechnol.* **2012**, 30, 771–776.
- [36] M. Levy-Sakin, S. Pastor, Y. Mostovoy, L. Li, A. K. Y. Leung, J. McCaffrey, E. Young, E. T. Lam, A. R. Hastie, K. H. Y. Wong *et al.*, *Nat. Commun.* **2019**, 10, 1025.
- [37] R. K. Neely, J. Deen, J. Hofkens, *Biopolymers* **2011**, 95, 298–311.
- [38] A. Grunwald, M. Dahan, A. Giesbertz, A. Nilsson, L. K. Nyberg, E. Weinhold, T. Ambjörnsson, F. Westerlund, Y. Ebenstein, *Nucleic Acids Res.* **2015**, 43, e117.
- [39] N. O. Wand, D. A. Smith, A. A. Wilkinson, A. E. Rushton, S. J. W. Busby, I. B. Styles, R. K. Neely, *Nucleic Acids Res.* **2019**, 47, 68–68.
- [40] C. Heck, Y. Michaeli, I. Bald, Y. Ebenstein, *Curr Opin Biotechnol* **2019**, 55, 151–158.
- [41] M. Tahiliani, K. P. Koh, Y. Shen, W. A. Pastor, H. Bandukwala, Y. Brudno, S. Agarwal, L. M. Iyer, D. R. Liu, L. Aravind *et al.*, *Science* **2009**, 324, 930–935.
- [42] S. Ito, L. Shen, Q. Dai, S. C. Wu, L. B. Collins, J. A. Swenberg, C. He, Y. Zhang, *Science* **2011**, 333, 1300–1303.
- [43] R. L. Welch, R. Sladek, K. Dewar, W. W. Reisner, *Lab Chip* **2012**, 12, 3314–3321.

-
- [44] W. Reisner, N. B. Larsen, A. Silahtaroglu, A. Kristensen, N. Tommerup, J. O. Tegenfeldt, H. Flyvbjerg, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2010**, *107*, 13294–13299.
- [45] K. Jo, D. M. Dhingra, T. Odijk, J. J. de Pablo, M. D. Graham, R. Runnheim, D. Forrest, D. C. Schwartz, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, *104*, 2673–2678.
- [46] H. Kuhn, M. D. Frank-Kamenetskii, *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, e40.
- [47] Y. Masamune, C. C. Richardson, *J. Biol. Chem.* **1971**, *246*, 2692–2701.
- [48] S. K. Das, M. D. Austin, M. C. Akana, P. Deshpande, H. Cao, M. Xiao, *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, e177.
- [49] G. Lukinavičius, V. Lapienė, Z. Staševskij, C. Dalhoff, E. Weinhold, S. Klimašauskas, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 2758–2759.
- [50] G. Lukinavičius, M. Tomkuvienė, V. Masevičius, S. Klimašauskas, *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 1134–1139.
- [51] M. H. Lauer, C. Vranken, J. Deen, W. Frederickx, W. Vanderlinden, N. Wand, V. Leen, M. H. Gehlen, J. Hofkens, R. K. Neely, *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 3804–3811.
- [52] G. M. Hanz, B. Jung, A. Giesbertz, M. Juhasz, E. Weinhold, *J. Vis. Exp.* **2014**, *93*, e52014.
- [53] O. N. Assad, T. Gilboa, J. Spitzberg, M. Juhasz, E. Weinhold, A. Meller, *Adv. Mater.* **2017**, *29*, 1605442.
- [54] F. Gularek, Masterarbeit, RWTH Aachen University, **2016**.
- [55] K. Chen, M. Juhasz, F. Gularek, E. Weinhold, Y. Tian, U. F. Keyser, N. A. W. Bell, *Nano Lett.* **2017**, *17*, 5199–5205.
- [56] T. Gilboa, C. Torfstein, M. Juhasz, A. Grunwald, Y. Ebenstein, E. Weinhold, A. Meller, *ACS Nano* **2016**, *10*, 8861–8870.
- [57] S. Margalit, S. Avraham, T. Shahal, Y. Michaeli, N. Gilat, P. Magod, M. Caspi, S. Loewenstein, G. Lahat, D. Friedmann-Morvinski *et al.*, *Int. J. Cancer* **2020**, *146*, 115–122.
- [58] C.-X. Song, K. E. Szulwach, Y. Fu, Q. Dai, C. Yi, X. Li, Y. Li, C.-H. Chen, W. Zhang, X. Jian *et al.*, *Nat. Biotechnol.* **2011**, *29*, 68–72.
- [59] X. Meng, K. Benson, K. Chada, E. J. Huff, D. C. Schwartz, *Nature Genetics* **1995**, *9*, 432–438.
- [60] W. Cai, H. Aburatani, V. P. Stanton, D. E. Housman, Y. K. Wang, D. C. Schwartz, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1995**, *92*, 5164–5168.
- [61] A. Bensimon, A. Simon, A. Chiffaudel, V. Croquette, F. Heslot, D. Bensimon, *Science* **1994**, *265*, 2096–2098.
- [62] J. Jing, J. Reed, J. Huang, X. Hu, V. Clarke, J. Edington, D. Housman, T. S. Anantharaman, E. J. Huff, B. Mishra *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1998**, *95*, 8046–8051.
- [63] J. Deen, W. Sempels, R. De Dier, J. Vermant, P. Dedecker, J. Hofkens, R. K. Neely, *ACS Nano* **2015**, *9*, 809–816.
- [64] J. M. Sidorova, N. Li, D. C. Schwartz, A. Folch, R. J. Monnat Jr., *Nat. Protoc.* **2009**, *4*, 849–861.

- [65] H. Yokota, F. Johnson, H. Lu, R. M. Robinson, A. M. Belu, M. D. Garrison, B. D. Ratner, B. J. Trask, D. L. Miller, *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 1064–1070.
- [66] C. A. P. Petit, J. D. Carbeck, *Nano Lett.* **2003**, *3*, 1141–1146.
- [67] D. Varapula, E. LaBouff, K. Raseley, L. Uppuluri, G. D. Ehrlich, M. Noh, M. Xiao, *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 15059.
- [68] K. D. Dorfman, S. B. King, D. W. Olson, J. D. P. Thomas, D. R. Tree, *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 2584–2667.
- [69] J. O. Tegenfeldt, C. Prinz, H. Cao, S. Chou, W. W. Reisner, R. Riehn, Y. M. Wang, E. C. Cox, J. C. Sturm, P. Silberzan *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, *101*, 10979–10983.
- [70] J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature* **1953**, *171*, 737–738.
- [71] Y. Kim, K. S. Kim, K. L. Kounovsky, R. Chang, G. Y. Jung, J. J. dePablo, K. Jo, D. C. Schwartz, *Lab Chip* **2011**, *11*, 1721–1729.
- [72] W. Reisner, K. J. Morton, R. Riehn, Y. M. Wang, Z. Yu, M. Rosen, J. C. Sturm, S. Y. Chou, E. Frey, R. H. Austin, *Phys. Rev. Lett.* **2005**, *94*, 196101.
- [73] D. J. Bonthuis, C. Meyer, D. Stein, C. Dekker, *Phys. Rev. Lett.* **2008**, *101*, 108303.
- [74] W. Reisner, J. P. Beech, N. B. Larsen, H. Flyvbjerg, A. Kristensen, J. O. Tegenfeldt, *Phys. Rev. Lett.* **2007**, *99*, 058302.
- [75] C. Zhang, F. Zhang, J. A. van Kan, J. R. C. van der Maarel, *J. Chem. Phys.* **2008**, *128*, 225109.
- [76] P. G. de Gennes, *Scaling concepts in polymer physics*, Cornell University Press Ithaca, N.Y., **1979**, S. 324–328.
- [77] T. Odijk, *Macromolecules* **1983**, *16*, 1340–1344.
- [78] L. Dai, C. B. Renner, P. S. Doyle, *Adv. Colloid Interface Sci.* **2016**, *232*, 80–100.
- [79] Z. Ma, K. D. Dorfman, *Macromolecules* **2020**, *53*, 6461–6468.
- [80] V. Müller, F. Westerlund, *Lab Chip* **2017**, *17*, 579–590.
- [81] H. Cao, Z. Yu, J. Wang, J. O. Tegenfeldt, R. H. Austin, E. Chen, W. Wu, S. Y. Chou, *Appl. Phys. Lett.* **2002**, *81*, 174–176.
- [82] H. Cao, J. O. Tegenfeldt, R. H. Austin, S. Y. Chou, *Appl. Phys. Lett.* **2002**, *81*, 3058–3060.
- [83] L. Guo, X. Cheng, C.-F. Chou, *Nano Lett.* **2003**, *4*, 69–73.
- [84] L. C. Campbell, M. J. Wilkinson, A. Manz, P. Camilleri, C. J. Humphreys, *Lab Chip* **2004**, *4*, 225–229.
- [85] F. Persson, P. Utko, W. Reisner, N. B. Larsen, A. Kristensen, *Nano Lett.* **2009**, *9*, 1382–1385.
- [86] C. Freitag, C. Noble, J. Fritzsche, F. Persson, M. Reiter-Schad, A. N. Nilsson, A. Granéli, T. Ambjörnsson, K. U. Mir, J. O. Tegenfeldt, *Biomechanics* **2015**, *9*, 044114.
- [87] A. Zrehen, D. Huttner, A. Meller, *ACS Nano* **2019**, *13*, 14388–14398.
- [88] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004–2021.
- [89] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057–3064.

-
- [90] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *41*, 2596–2599.
- [91] S. W. Hell, J. Wichmann, *Opt. Lett.* **1994**, *19*, 780–782.
- [92] T. Klein, A. Löschberger, S. Proppert, S. Wolter, S. van de Linde, M. Sauer, *Nat. Methods* **2011**, *8*, 7–9.
- [93] M. Gilar, E. S. P. Bouvier, *J. Chromatogr. A* **2000**, *890*, 167–177.
- [94] N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046–15047.
- [95] K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, T. Yoshida, T. Matsuo, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1988**, *2*, 151–153.
- [96] R. J. Roberts, D. Macelis, *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 248–262.
- [97] M. McClelland, *Nucleic Acids Res.* **1981**, *9*, 6795–6804.
- [98] S. Sato, C. A. Hutchinson, J. I. Harris, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1977**, *74*, 542–546.
- [99] K. Goedecke, M. Pignot, R. S. Goody, A. J. Scheidig, E. Weinhold, *Nat. Struct. Biol.* **2001**, *8*, 121–125.
- [100] I. R. Lehman, A. L. Nussbaum, *J. Biol. Chem.* **1964**, *239*, 2628–2636.
- [101] T. R. Gingeras, L. Greenough, I. Schildkraut, R. J. Roberts, *Nucleic Acids Res.* **1981**, *9*, 4525–4536.
- [102] Q. Xu, R. D. Morgan, R. J. Roberts, M. J. Blaser, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**, *97*, 9671–9676.
- [103] M. Rina, V. Bouriotis, *Gene* **1993**, *133*, 91–94.
- [104] I. Heller, G. Sitters, O. D. Broekmans, G. Farge, C. Menges, W. Wende, S. W. Hell, E. J. G. Peterman, G. J. L. Wuite, *Nat. Methods* **2013**, *10*, 910–916.
- [105] H. Mayer, R. Grosschedl, H. Schütte, G. Hobom, *Nucleic Acids Res.* **1981**, *9*, 4833–4845.
- [106] H. S. Rye, S. Yue, D. E. Wemmer, M. A. Quesada, R. P. Haugland, R. A. Mathies, A. N. Glazer, *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20*, 2803–2812.
- [107] B. Kundukad, J. Yan, P. S. Doyle, *Soft Matter* **2014**, *10*, 9721–9728.
- [108] C. Danilowicz, C. Limouse, K. Hatch, A. Conover, V. W. Coljee, N. Kleckner, M. Prentiss, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2009**, *106*, 13196–13201.
- [109] R. S. Tuma, M. P. Beaudet, X. Jin, L. J. Jones, C.-Y. Cheung, S. Yue, V. L. Singer, *Anal. Biochem.* **1999**, *268*, 278–288.
- [110] A. Ashkin, *Phys. Rev. Lett.* **1970**, *24*, 156–159.
- [111] N. A. W. Bell, U. F. Keyser, *Nat. Nanotechnol.* **2016**, *11*, 645–651.
- [112] A. Pingoud, G. G. Wilson, W. Wende, *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, 7489–7527.
- [113] G. Gasiunas, G. Sasnauskas, G. Tamulaitis, C. Urbanke, D. Razaniene, V. Siksnys, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *36*, 938–949.
- [114] S. Advani, P. Mishra, S. Dubey, S. Thakur, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2010**, *402*, 177–179.

- [115] K. E. Narva, D. L. Wendell, M. P. Skrdla, J. L. Van Etten, *Nucleic Acids Res.* **1987**, *15*, 9807–9823.
- [116] S. Kang, O. Yoo, *Korean J. Microbiol.* **1985**, *23*, 13–19.
- [117] H. Ito, A. Sadaoka, H. Kotani, N. Hiraoka, T. Nakamura, *Nucleic Acids Res.* **1990**, *18*, 3903–3911.
- [118] M. O. Pollard, D. Gurdasani, A. J. Mentzer, T. Porter, M. S. Sandhu, *Hum. Mol. Genet.* **2013**, *27*, 234–241.
- [119] T. Klingström, E. Bongcam-Rudloff, O. V. Pettersson, *bioRxiv* **2018**, 254276.
- [120] M. R. Liles, L. L. Williamson, J. Rodbumrer, V. Torsvik, R. M. Goodman, J. Handelsman, *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, *74*, 3302–3305.
- [121] H. Malke, *J. Basic Microbiol.* **1984**, *25*, 350–350.
- [122] J. A. Zeugin, J. L. Hartley, *Focus* **1985**, *7*, 1–2.
- [123] C. A. Schneider, W. S. Rasband, K. W. Eliceiri, *Nature Methods* **2012**, *9*, 671–675.
- [124] J. Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid *et al.*, *Nat. Methods* **2012**, *9*, 676–682.
- [125] C. Steger, *IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.* **1998**, *20*, 113–125.
- [126] M. Ovesný, P. Křížek, J. Borkovec, Z. Svindrych, G. M. Hagen, *Bioinformatics* **2014**, *30*, 2389–2390.
- [127] F. P. Miller, A. F. Vandome, J. McBrewster, *Lua (Programming Language)*, Alpha Press, **2009**.
- [128] S. B. Needleman, C. D. Wunsch, *J Mol Biol* **1970**, *48*, 443–453.

A Anhang

A.1 Agarosegelelektrophorese

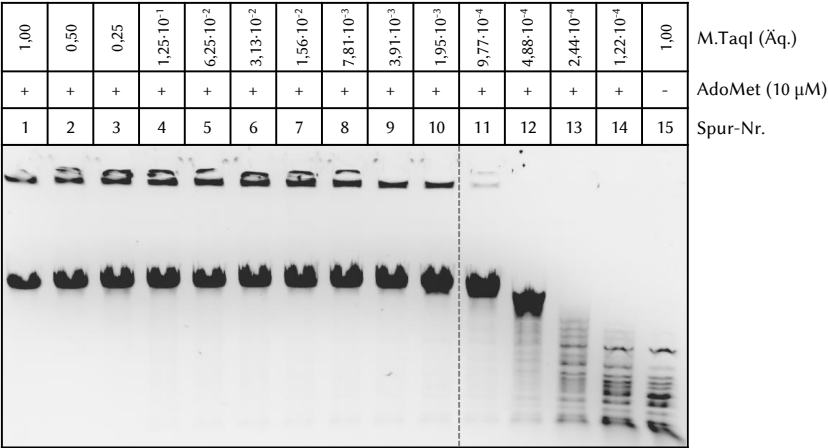


Abbildung A.1: Gelelektrophoretische Analyse eines Aktivitätstest mit AdoMet (1) und M.TaqI (DNA-MTase-Verdünnung).

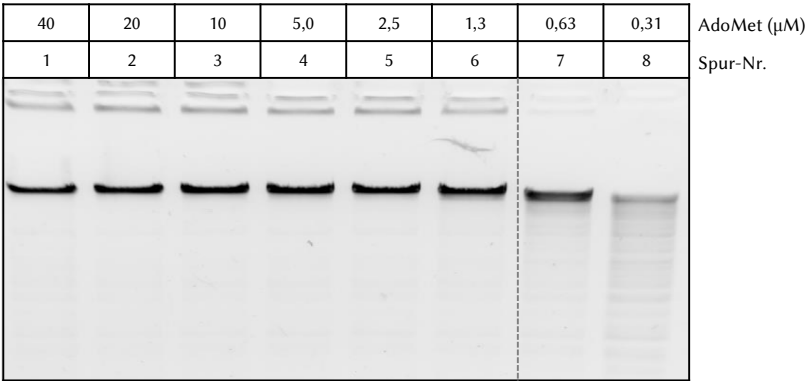


Abbildung A.2: Gelelektrophoretische Analyse eines Aktivitätstest mit AdoMet (1) und M.TaqI (1 Äq., Cofaktorverdünnung).

A.2 *rp*-HPLC Chromatogramme

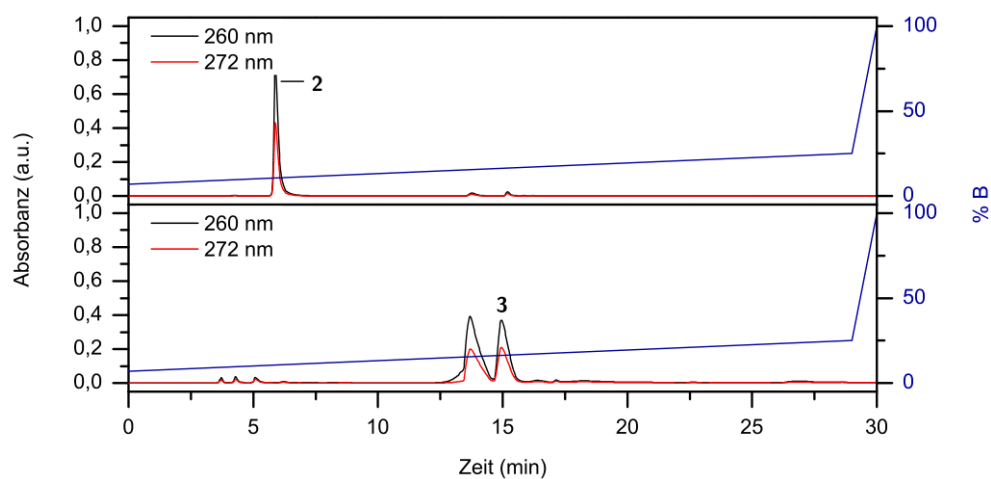


Abbildung A.3: Reaktionsverfolgung der Synthese von AdoYnAzid (3). Das obere Chromatogramm entspricht dem Reaktionsstart ($t = 0$ h), das untere dem Reaktionsende ($t = 16$ h).

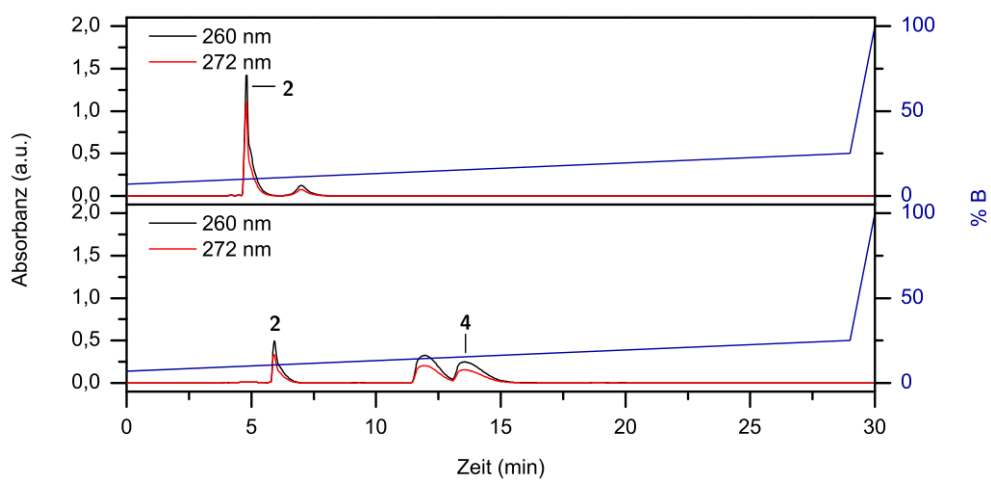


Abbildung A.4: Reaktionsverfolgung der Synthese von AdoYnYn (kurz) (4). Das obere Chromatogramm entspricht dem Reaktionsstart ($t = 0$ h), das untere dem Reaktionsende ($t = 16$ h).

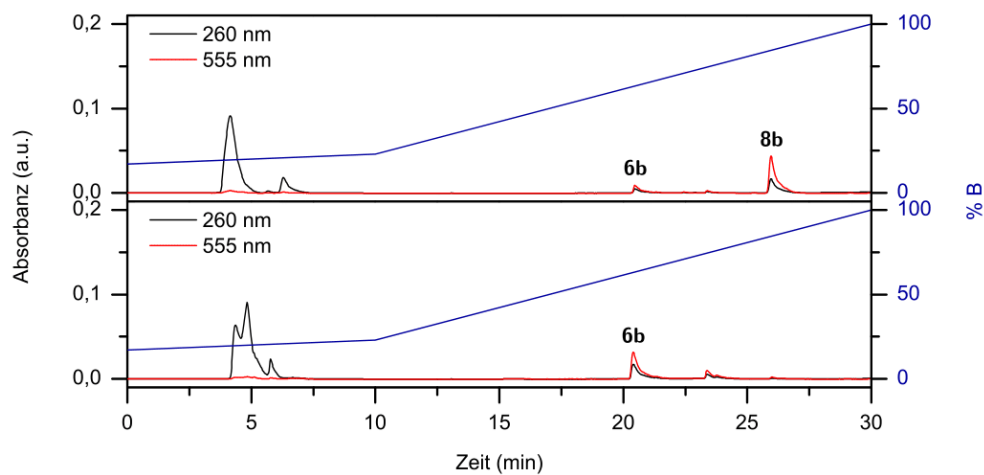


Abbildung A.5: Reaktionsverfolgung der Synthese von AdoYnTAMRA (kurz) (**6b**). Das obere Chromatogramm entspricht dem Reaktionsstart ($t = 0$ h), das untere dem Reaktionsende ($t = 3$ h).

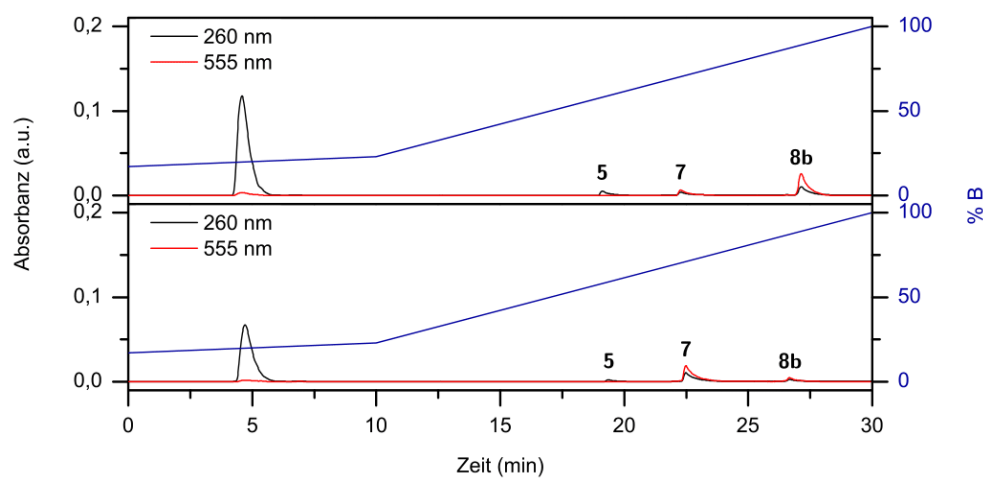


Abbildung A.6: Reaktionsverfolgung der Synthese von AdoYnTAMRA (lang) (**7**). Das obere Chromatogramm entspricht dem Reaktionsstart ($t = 0$ h), das untere dem Ende ($t = 2$ h).

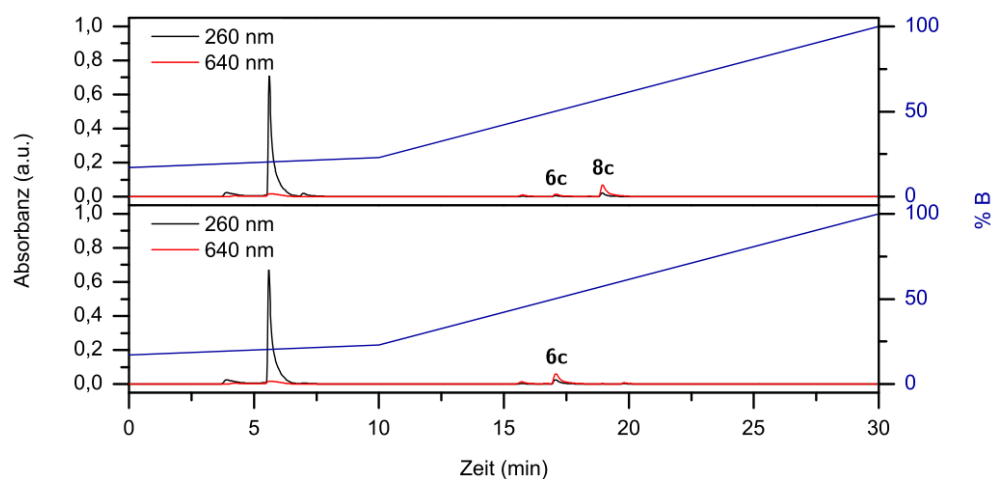


Abbildung A.7: Reaktionsverfolgung der Synthese von AdoYnCF640R (**6c**). Das obere Chromatogramm entspricht dem Reaktionsstart ($t = 0$ h), das untere dem Reaktionsende ($t = 3$ h).

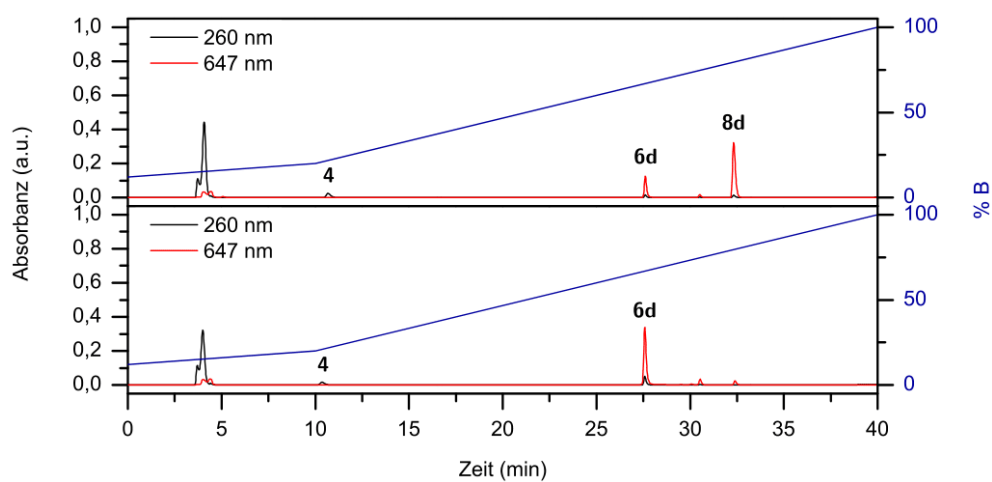


Abbildung A.8: Reaktionsverfolgung der Synthese von AdoYnAF647 (**6d**). Das obere Chromatogramm entspricht dem Reaktionsstart ($t = 0$ h), das untere dem Reaktionsende ($t = 3$ h).

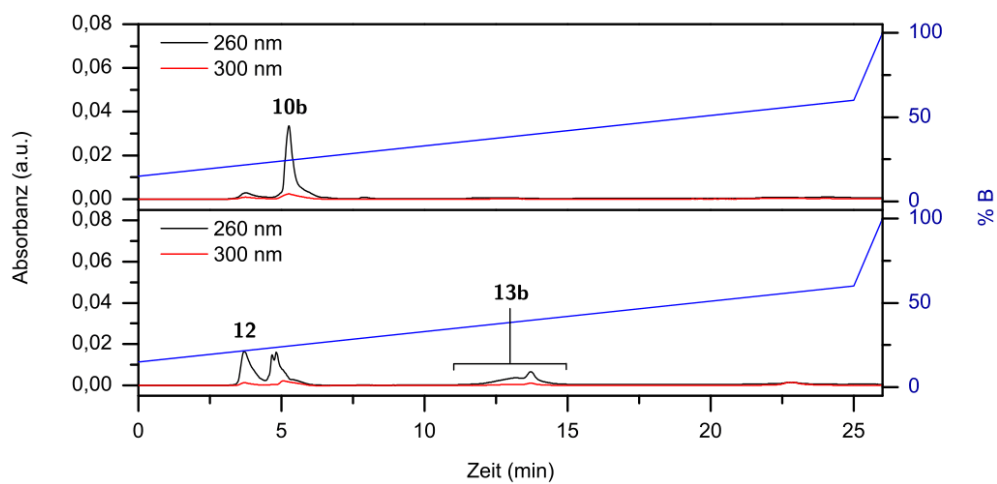


Abbildung A.9: Reaktionsverfolgung der Synthese von ODN8-DBCO (**13b**). Das obere Chromatogramm entspricht dem Reaktionsstart ($t = 0$ h), das untere dem Reaktionsende ($t = 3$ h).

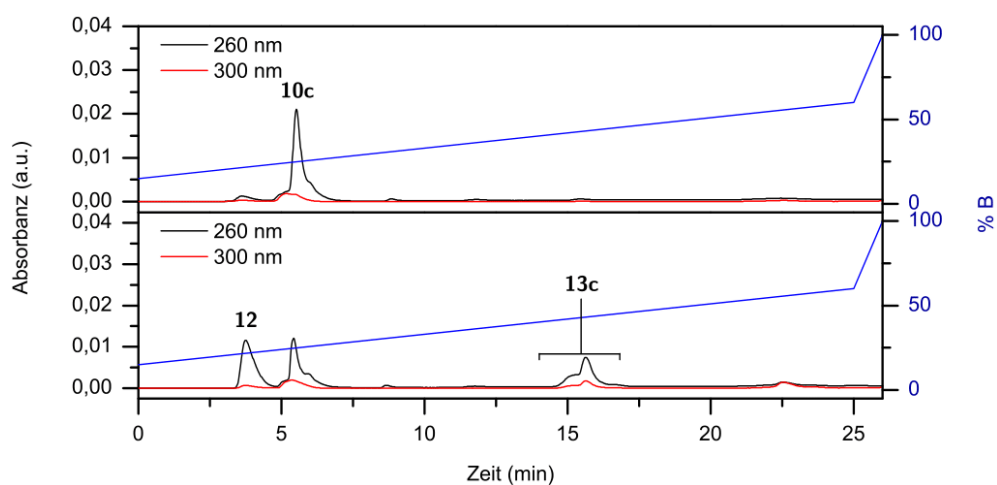


Abbildung A.10: Reaktionsverfolgung der Synthese von ODN5-DBCO (**13c**). Das obere Chromatogramm entspricht dem Reaktionsstart ($t = 0$ h), das untere dem Reaktionsende ($t = 3$ h).

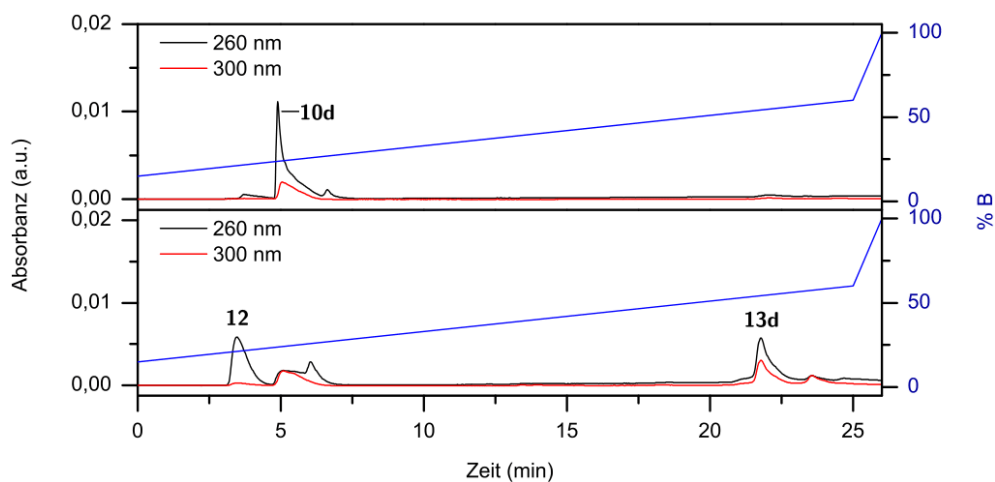


Abbildung A.11: Reaktionsverfolgung der Synthese von ODN2-DBCO (**13d**). Das obere Chromatogramm entspricht dem Reaktionsstart ($t = 0$ h), das untere dem Reaktionsende ($t = 3$ h).

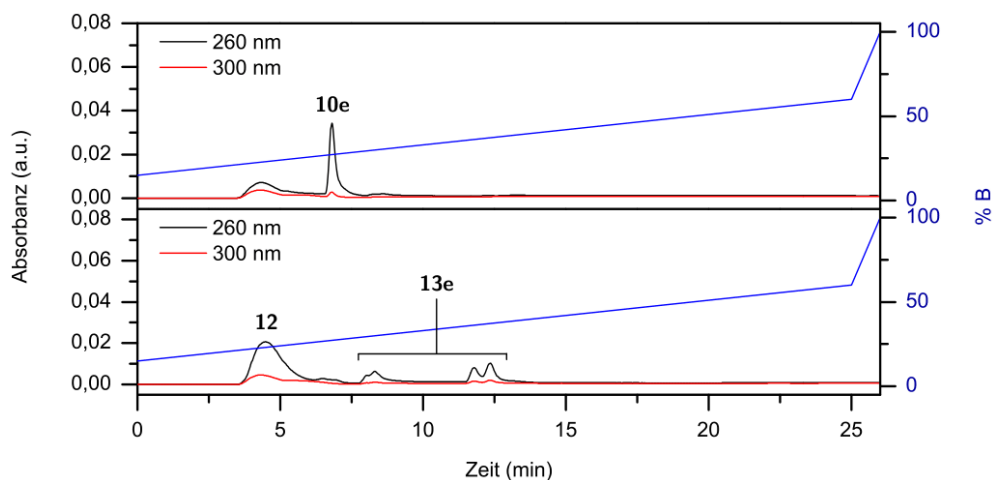


Abbildung A.12: Reaktionsverfolgung der Synthese von ODN14-C₆-DBCO (**13e**). Das obere Chromatogramm entspricht dem Reaktionsstart ($t = 0$ h), das untere dem Reaktionsende ($t = 2$ h).

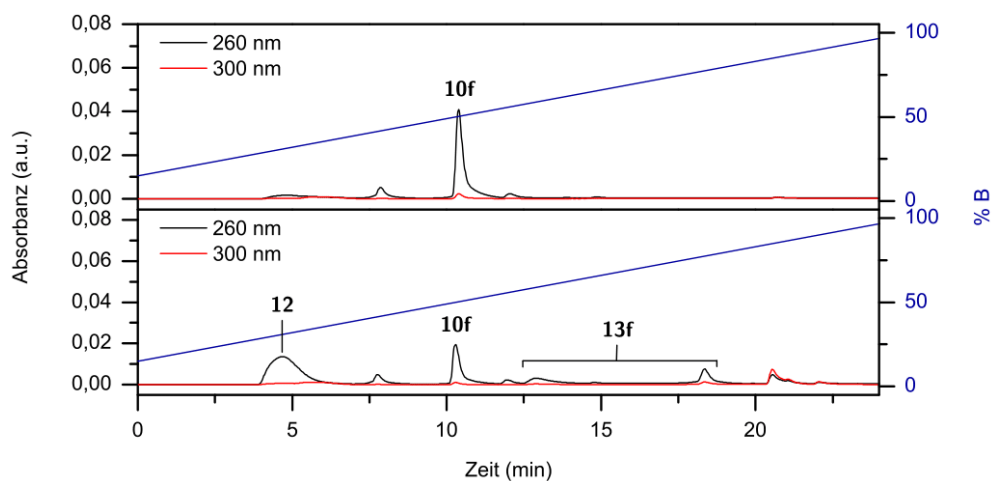


Abbildung A.13: Reaktionsverfolgung der Synthese von ODN14-C₁₂-DBCO (**13f**). Das obere Chromatogramm entspricht dem Reaktionsstart (t = 0 h), das untere dem Reaktionsende (t = 2 h).

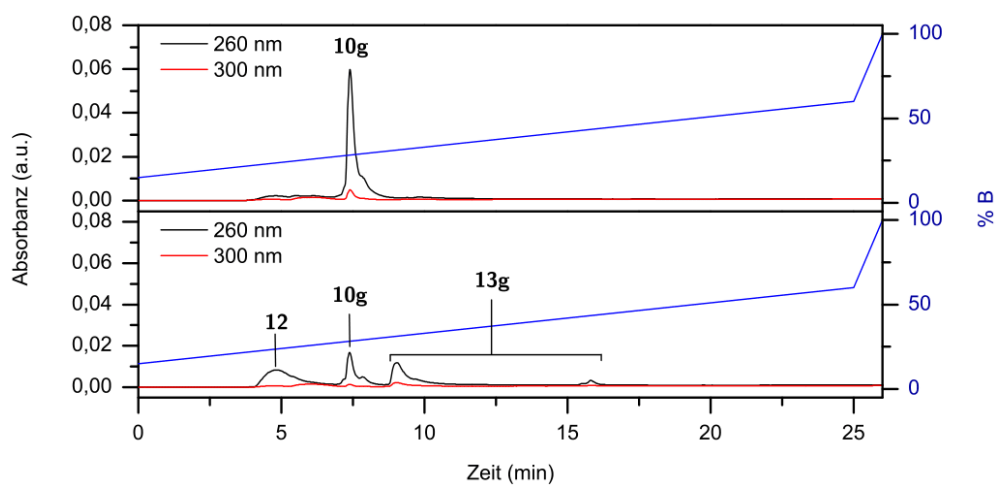


Abbildung A.14: Reaktionsverfolgung der Synthese von ODN14-PEG₆C₆-DBCO (**13g**). Die Chromatogramme entsprechen Reaktionsstart (t = 0 h) und Reaktionsende (t = 2 h).

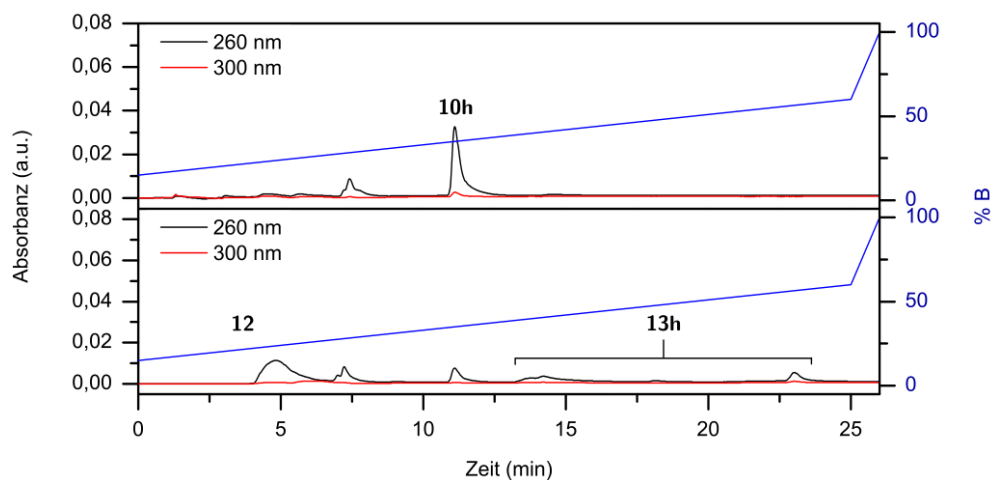


Abbildung A.15: Reaktionsverfolgung der Synthese von ODN14-PEG₆C₁₂-DBCO (**13h**). Die Chromatogramme entsprechen Reaktionsstart (t = 0 h) und Reaktionsende (t = 2 h).

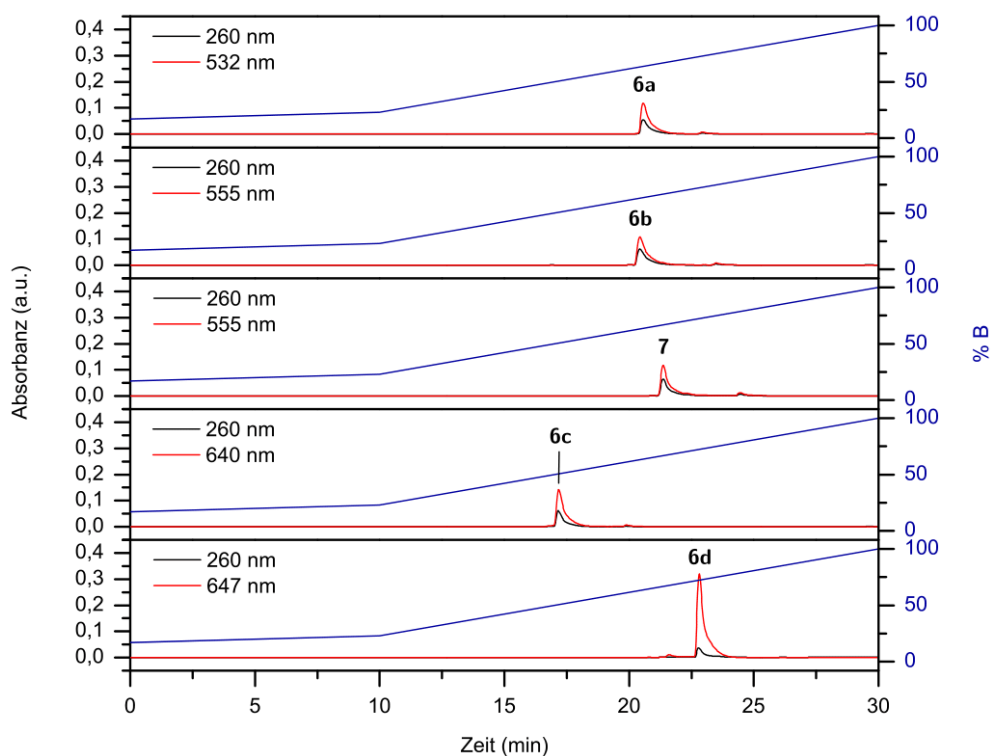


Abbildung A.16: Einzelinjektionen (*rp*-HPLC) der fluoreszierenden AdoMet-Analoga **6a-d** und **7**. Alle Verbindungen weisen nach Aufreinigung mittels *rp*-HPLC eine Reinheit von > 98 % auf.

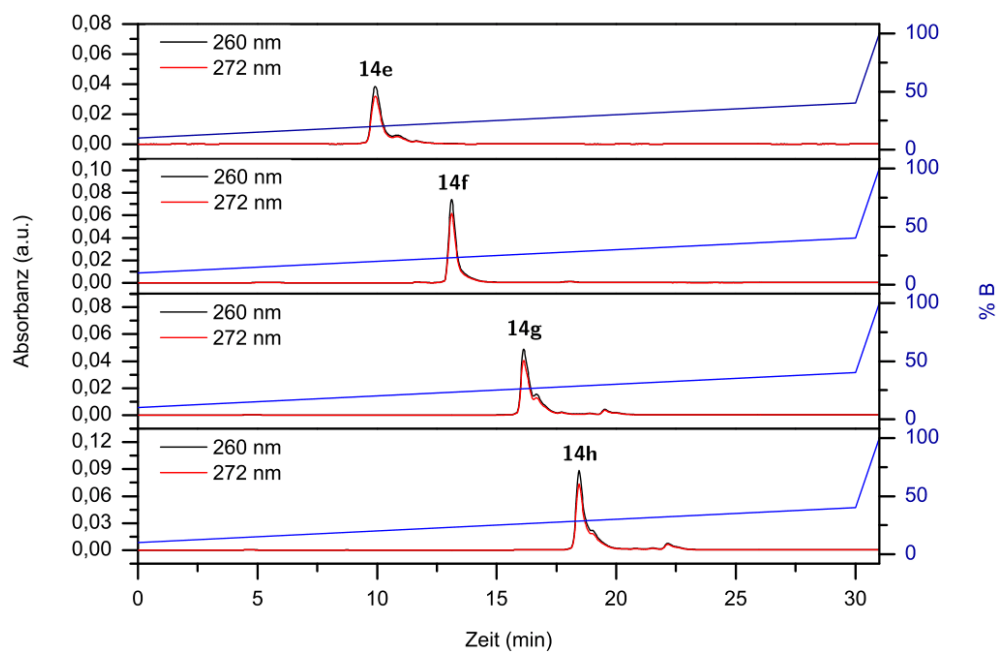


Abbildung A.17: Einzelinjektionen (*rp*-HPLC) der ODN-modifizierten AdoMet-Analoga **14e-h**.

A.3 ^1H -NMR-Spektren

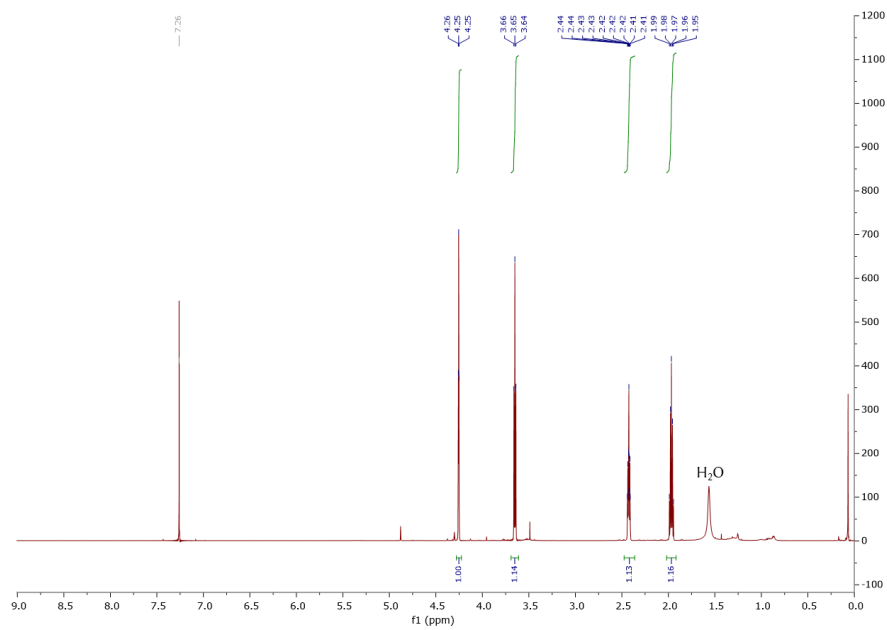


Abbildung A.18: ^1H -NMR-Spektrum von 6-Chlorohex-2-en-1-ol in CDCl_3 .

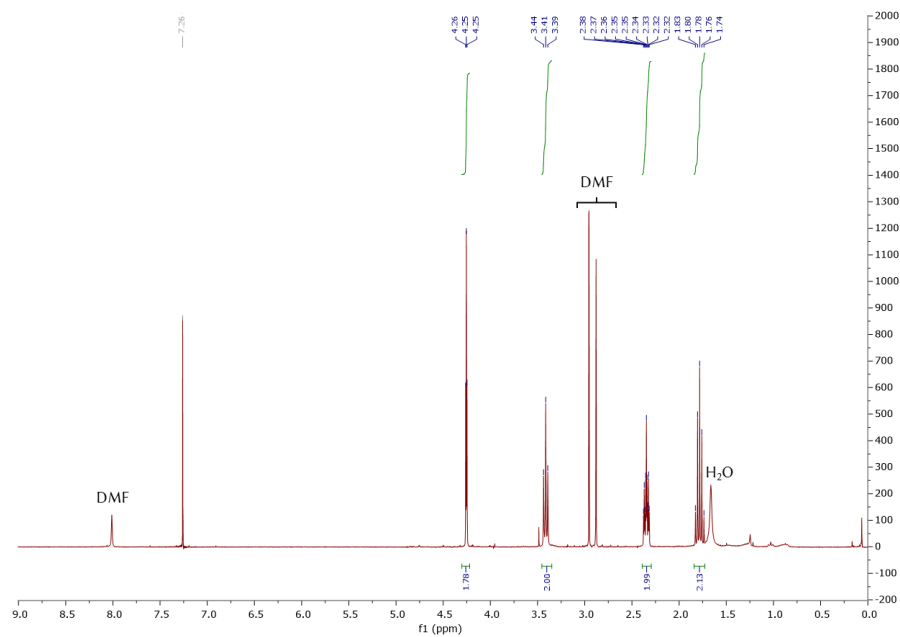


Abbildung A.19: ¹H-NMR-Spektrum von 6-Azidohex-2-in-1-ol in CDCl₃.

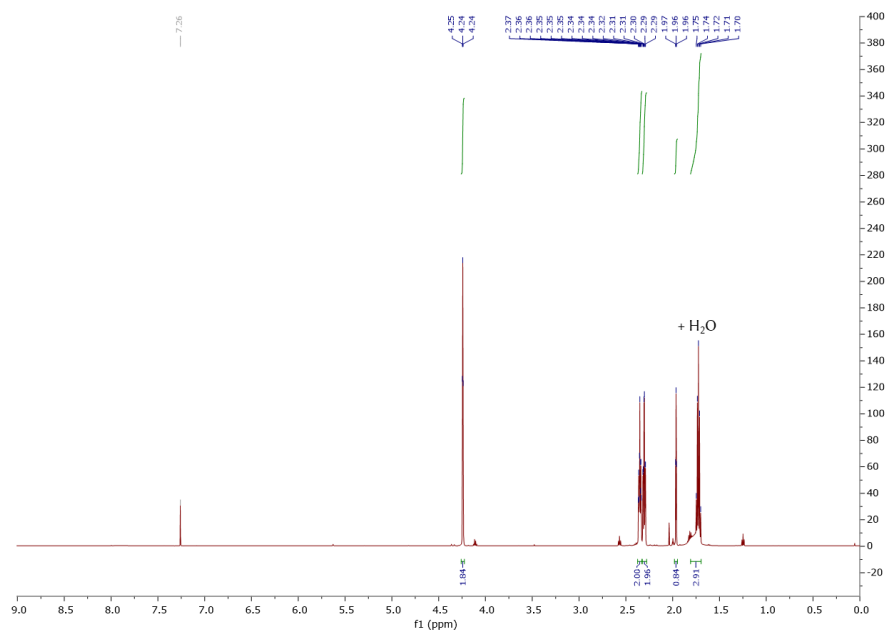
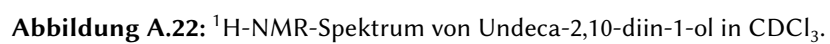


Abbildung A.20: ¹H-NMR-Spektrum von Octa-2,7-diin-1-ol in CDCl₃.



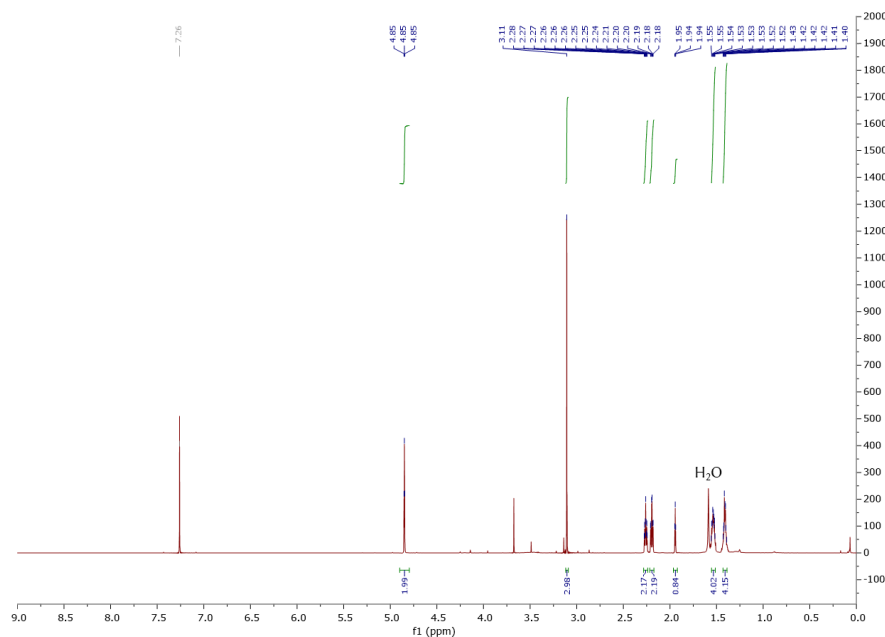


Abbildung A.23: ^1H -NMR-Spektrum von Undeca-2,10-dien-1-ylmethansulfonat in CDCl_3 .

A.4 ESI-MS-Spektren

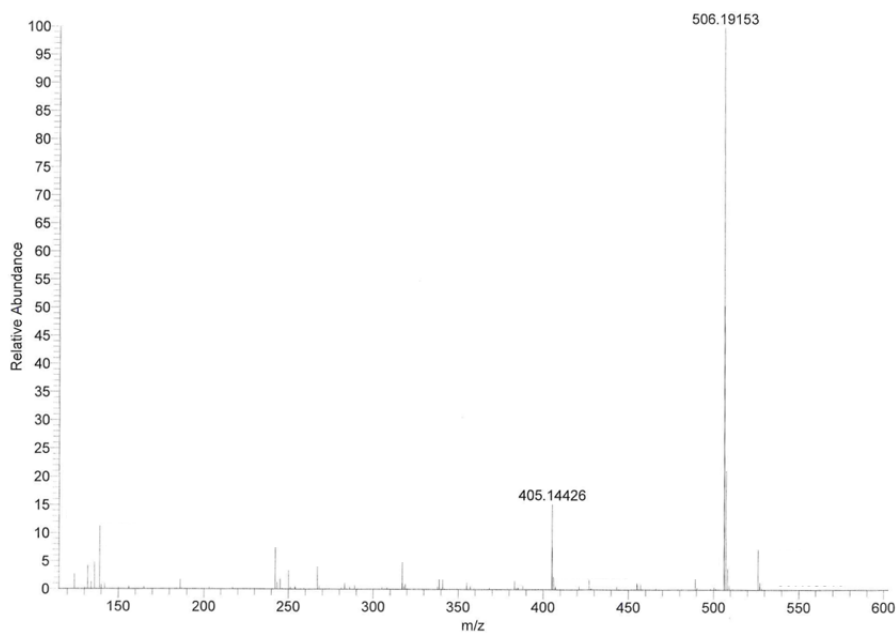


Abbildung A.24: ESI-MS-Spektrum von AdoYnAzid (3).

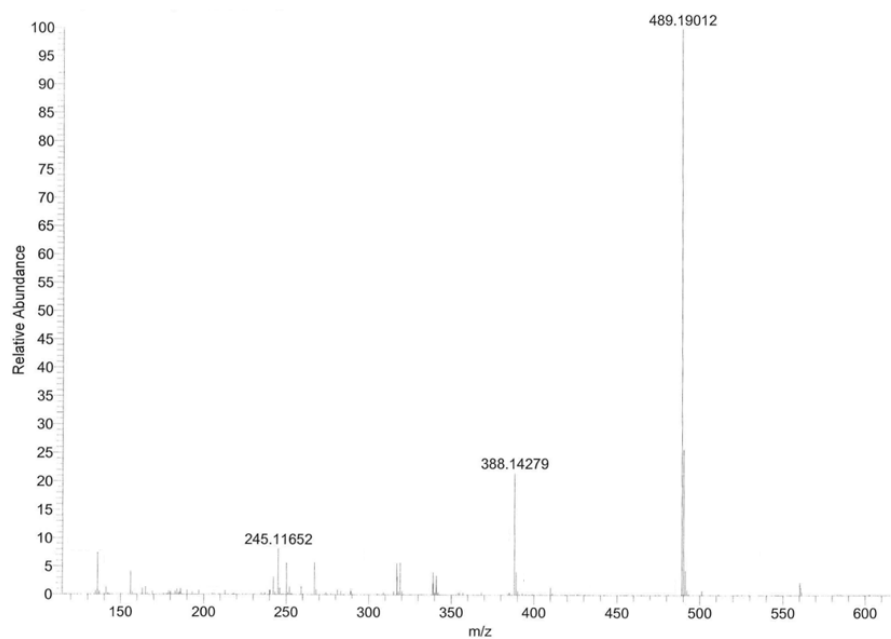


Abbildung A.25: ESI-MS-Spektrum von AdoYnYn (kurz) (4).

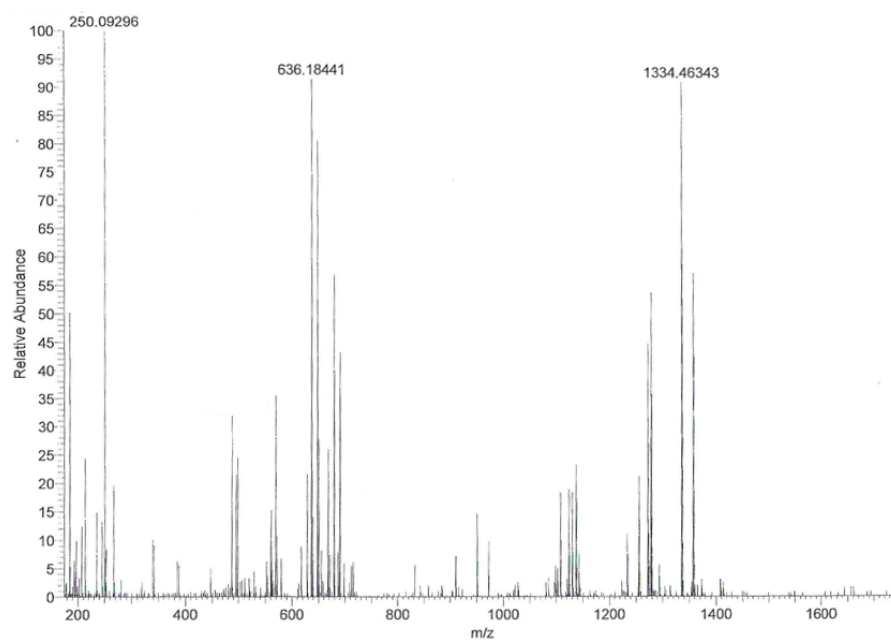


Abbildung A.26: ESI-MS-Spektrum von AdoYnATTO532 (6a).

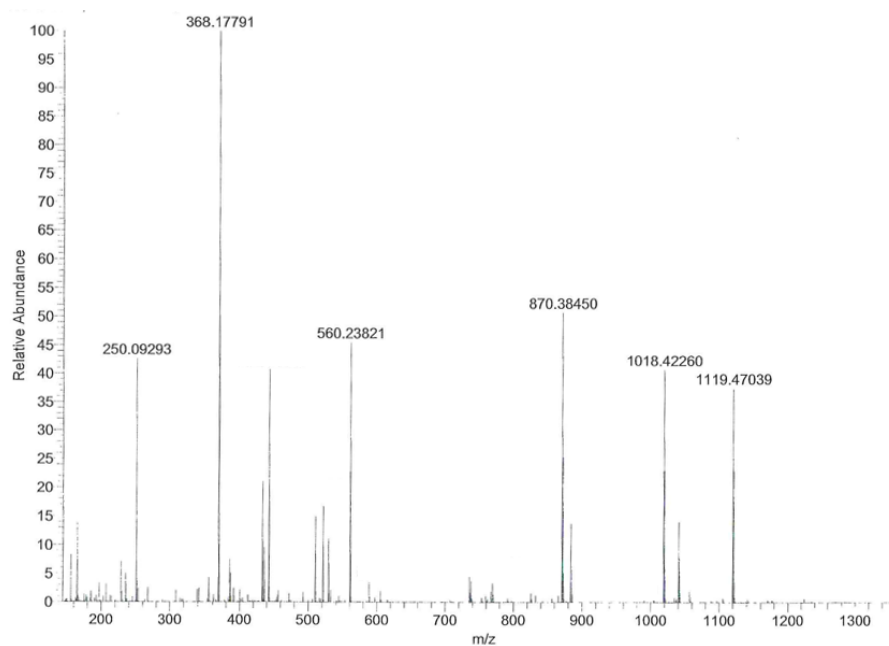


Abbildung A.27: ESI-MS-Spektrum von AdoYnTAMRA (kurz) (6b).

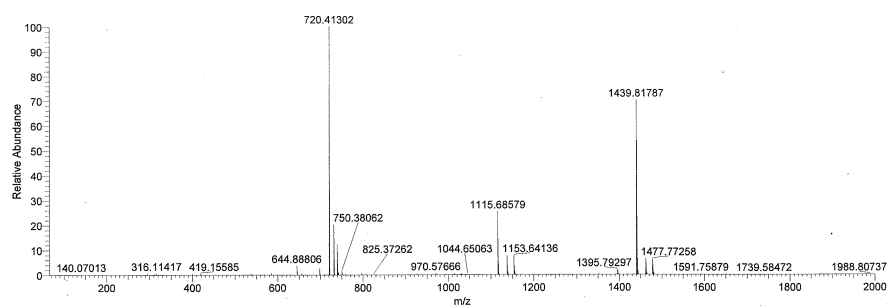


Abbildung A.28: ESI-MS-Spektrum von AdoYnCF640R (6c).

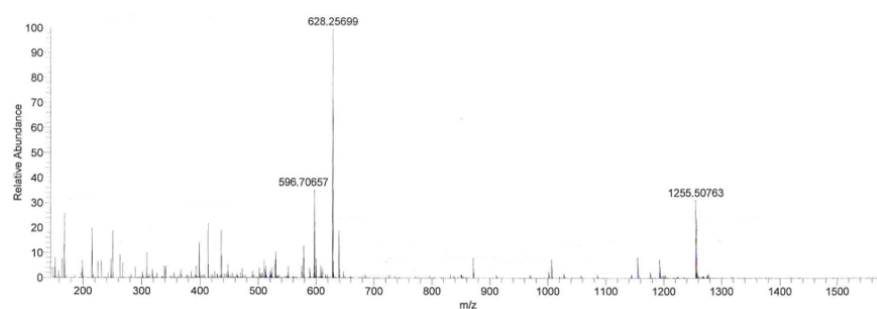


Abbildung A.29: ESI-MS-Spektrum von AdoYnAF647 (6d).

A.5 MALDI-TOF-Spektren

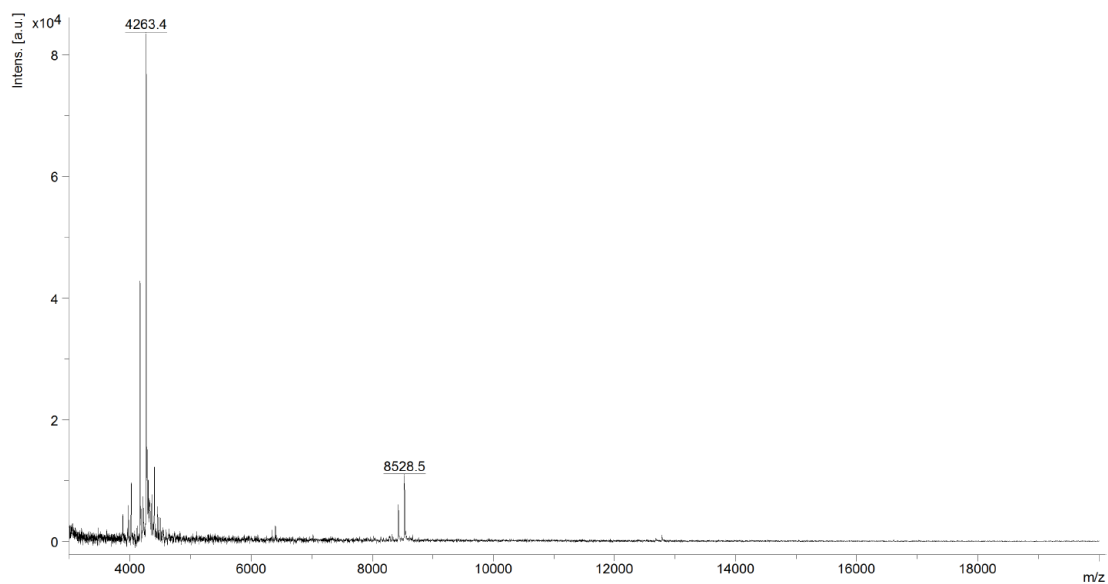


Abbildung A.30: MALDI-TOF-Spektrum von AdoYnODN11 (**14a**).

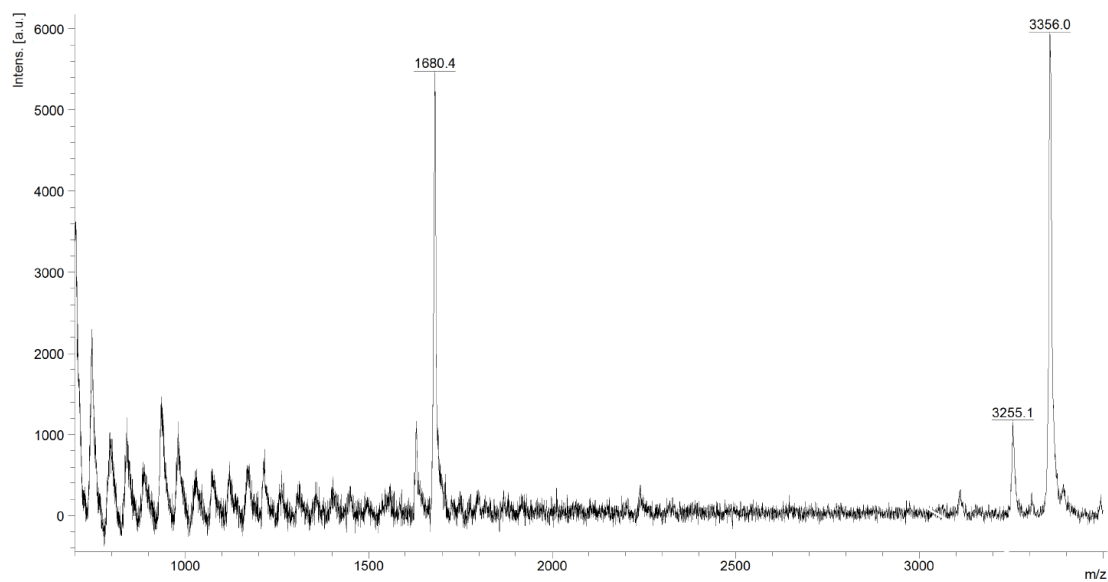


Abbildung A.31: MALDI-TOF-Spektrum von AdoYnODN8 (**14b**).

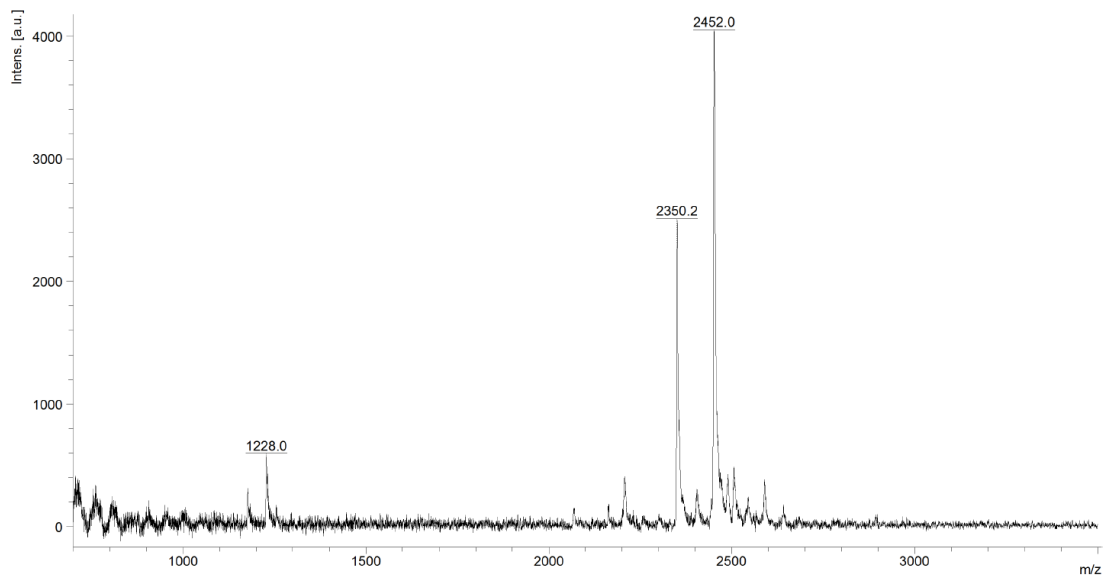


Abbildung A.32: MALDI-TOF-Spektrum von AdoYnODN5 (14c).

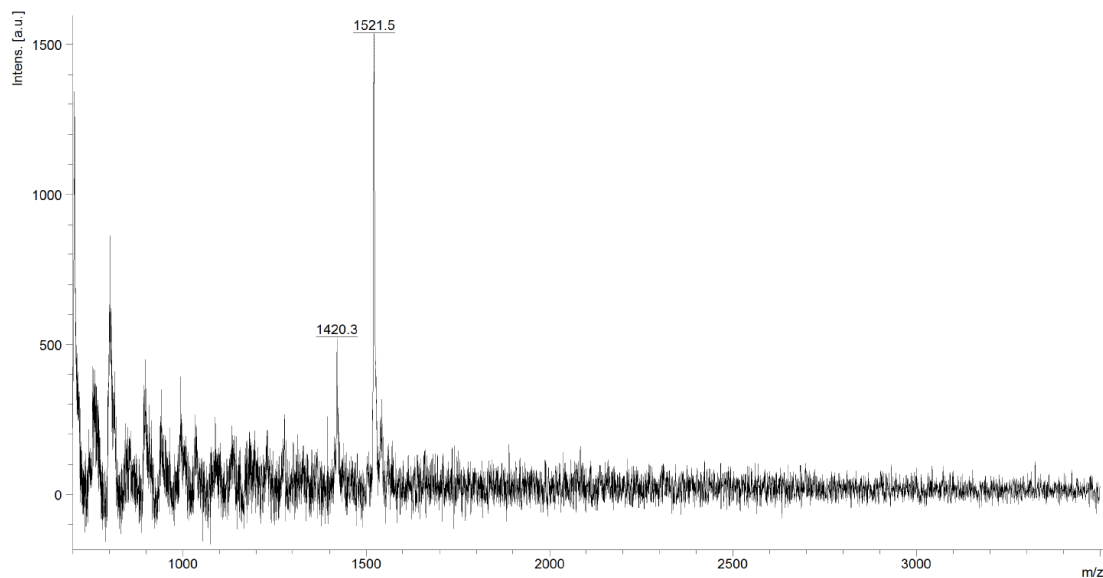


Abbildung A.33: MALDI-TOF-Spektrum von AdoYnODN2 (14d).

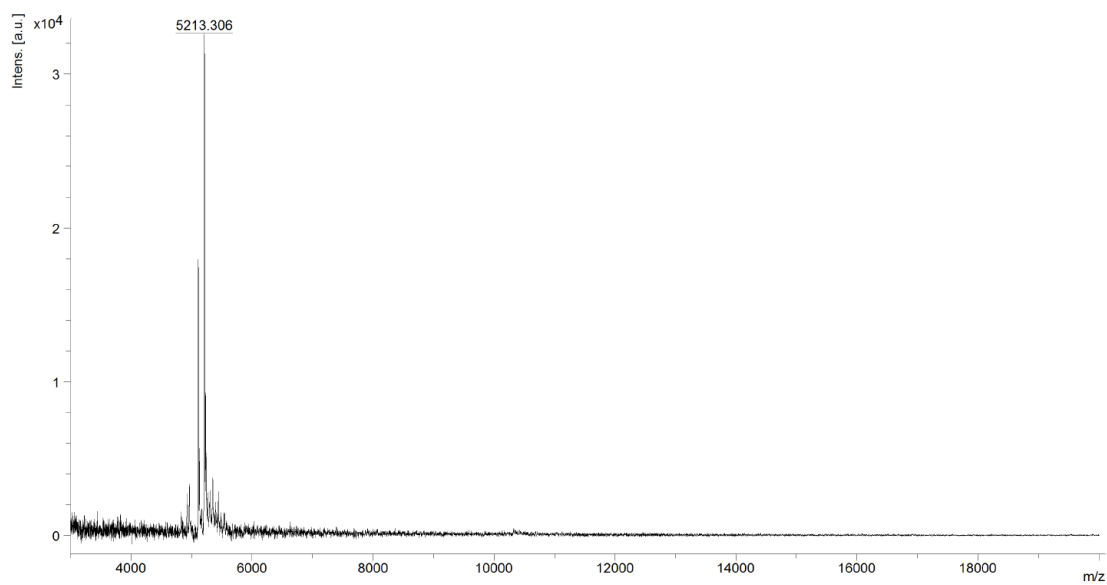


Abbildung A.34: MALDI-TOF-Spektrum von AdoYnC₆ODN14 (**14e**).

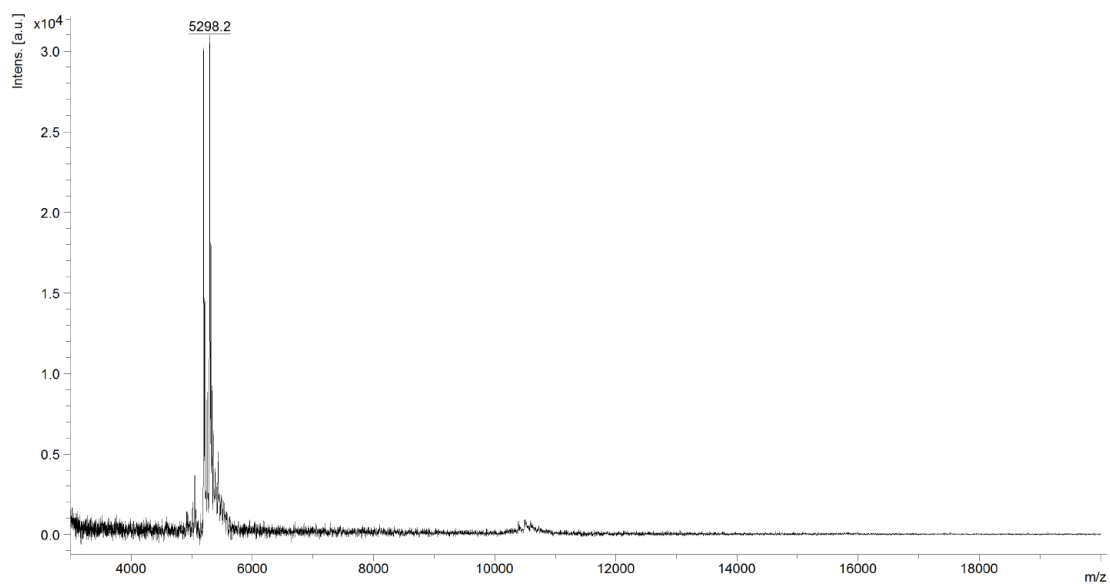


Abbildung A.35: MALDI-TOF-Spektrum von AdoYnC₁₂ODN14 (**14f**).

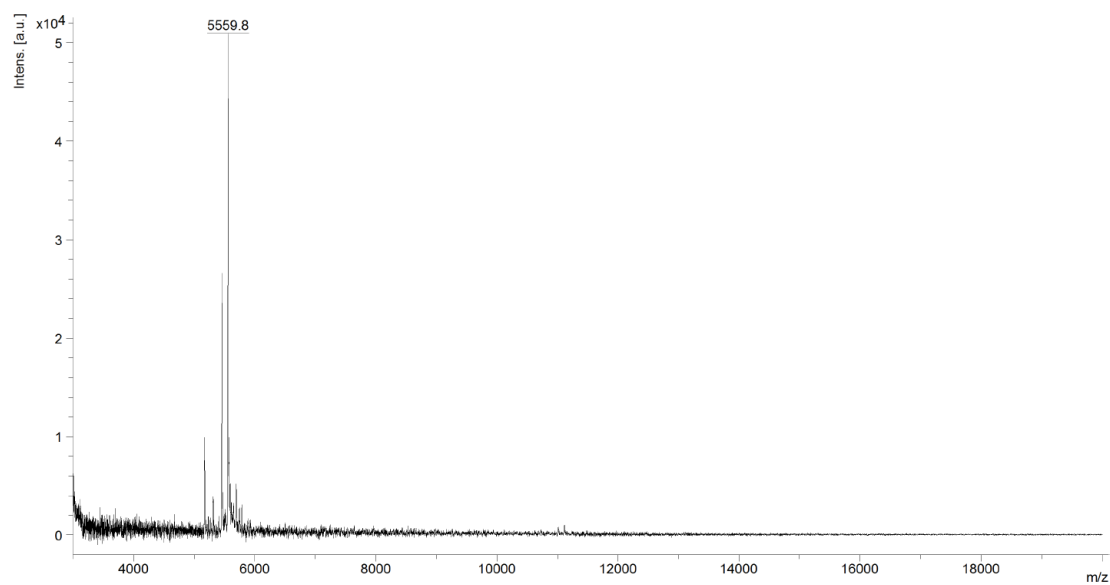


Abbildung A.36: MALDI-TOF-Spektrum von AdoYnPEG₆C₆ODN14 (**14g**).

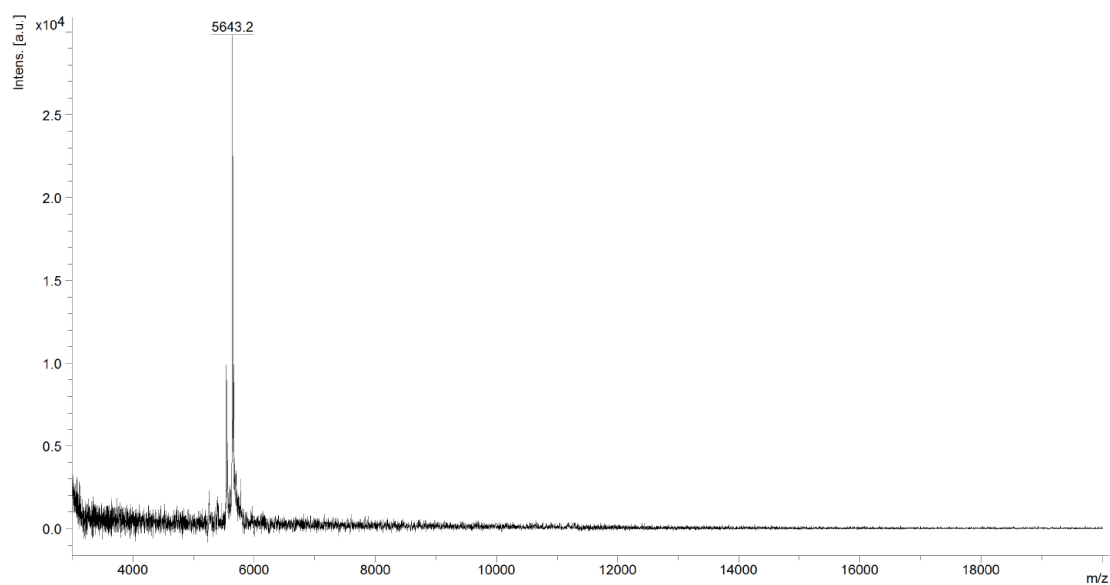


Abbildung A.37: MALDI-TOF-Spektrum von AdoYnPEG₆C₁₂ODN14 (**14h**).

Abbildungsverzeichnis

2.1	Schematische Übersicht der interdisziplinären Aufgabenstellung	9
3.1	Übersicht von Synthesen der AdoMet-Analoga mit reaktiven Endgruppen	11
3.2	Reaktionsverfolgung der Synthese von AdoYnYn (lang)	12
3.3	Übersicht von Synthesen der fluoreszierenden AdoMet-Analoga	13
3.4	Reaktionsverfolgung der Synthese von AdoYnATTO532	14
3.5	Absorptions- und Fluoreszenzspektren der fluoreszierenden AdoMet-Analoga	16
3.6	Übersicht der Synthesen ODN-modifizierter AdoMet-Analoga	17
3.7	Reaktionsverfolgung der Synthese von ODN11-DBCO	18
3.8	Einzelinjektionen (<i>rp</i> -HPLC) der ODN-modifizierten AdoMet-Analoga	19
3.9	Schematische Darstellung eines Modifikations-Restriktions-Tests	20
3.10	Gelelektrophoretische Analyse der Aktivitätstests von M.TaqI mit AdoYnYn (kurz und lang) und AdoYnTAMRA (kurz und lang)	21
3.11	Gelelektrophoretische Analyse der Aktivitätstests von M.TaqI/M.BseCI mit AdoYnATTO532 und AdoYnCF640R	24
3.12	Gelelektrophoretische Analyse der Aktivitätstests von M.TaqI mit ODN-modifizierten AdoMet-Analoga	25
3.13	Schematische Darstellung und Plasmidkarten zu den EMSA-Experimenten	27
3.14	Gelelektrophoretische Analyse des EMSA-Experiments mit AdoYnODN11, M.TaqI und R.PvuII bzw. R.Hpy188III	28
3.15	Schematische Darstellung einstufiger DNA-Modifikationen	29
3.16	Gelelektrophoretische Analyse der TAMRA-, CF640R- und AF647-Modifikation mit M.BseCI zur fluoreszenzmikroskopischen Analyse mittels DNA-Combing	31
3.17	Übersichtsgrafik zum optischen DNA-Mapping mittels DNA-Combing	32
3.18	Übersicht der Fluoreszenzmikroskopie einstufig modifizierter DNA	34
3.19	Gelelektrophoretische Analyse der CF640R-Modifikation mit M.TaqI bzw. M.BseCI zur Analyse mittels optischer Pinzette (<i>C-Trap</i>) und Fluoreszenzmikroskopie	35
3.20	Übersichtsgrafik zum Funktionsprinzip und Ergebnissen des optischen Mappings mittels <i>C-Trap</i> und Fluoreszenzmikroskopie	36
3.21	Schematische Darstellung der Translokation eines mit sterischen Gruppen modifizierten DNA-Strangs durch eine Nanopore	37
3.22	Gelelektrophoretische Analyse der einstufigen DNA-Modifikation mit M.TaqI und AdoYnBiotinII zur Analyse mittels Festkörpernanoporen	39
3.23	Übersichtsgrafik zur Funktionsweise und Ergebnissen des elektrischen Mappings von Biotin-Streptavidin-Modifikationen mittels Festkörpernanoporen	40
3.24	Gelelektrophoretische Analyse der einstufigen DNA-Modifikation mit M.TaqI und AdoYnODN11 zur Analyse mittels Festkörpernanoporen	41
3.25	Übersichtsgrafik zur Funktionsweise und Ergebnissen des elektrischen Mappings von ODN11-Modifikationen mittels Festkörpernanoporen	42

3.26	Schematische Darstellung zu DNA-Blocking und Blocking-Sequenzen.....	44
3.27	Gelelektrophoretische Analyse der Voruntersuchungen hinsichtlich der Verwendung von Restriktionsendonukleasen in Blocking-Puffer	45
3.28	Gelelektrophoretische Analyse der Voruntersuchungen zur Verwendung von DNA-MTasen unter Blocking-Bedingungen	46
3.29	Plasmidkarten zu den Blocking-Experimenten mit pUC19- und PBR322-DNA	47
3.30	Gelelektrophoretische Analyse der Blocking-Experimente mit unterschiedlichen DNA-MTasen, Blocking-REasen und DNA-Plasmid-Substraten.....	48
3.31	Übersichtsgrafik zur Modifikation genomischer DNA mittels DNA-Blocking	50
3.32	Gelelektrophoretische Analyse der Blocking-Experimente mit genomischer DNA zur optischen Analyse mittels DNA-Combing.....	51
3.33	Vergleich zwischen Tropfendialyse und Plug-Aufreinigung	52
3.34	Agarosegelelektrophoretische Analyse der In-Gel-Modifikationsreaktionen	54
3.35	Übersicht der Auswertungsroutine fluoreszenzmikroskopischer Analysen mittels mTAG-Methode modifizierter DNA.	55
3.36	Matrix zur Ermittlung der Übereinstimmung zwischen <i>Map</i> und DNA-Barcode.....	56
3.37	Grafische Darstellung der Ergebnisse des automatisierten DNA-Mappings.....	59
4.1	Beispiele neuer AdoMet-Analoga unterschiedlicher Klassen	61
A.1	Gelelektrophorese Analyse eines Aktivitätstest mit AdoMet (M.TaqI-Verdünnung) .	I
A.2	Gelelektrophorese eines Aktivitätstest mit M.TaqI (AdoMet-Verdünnung).....	I
A.3	Reaktionsverfolgung der Synthese von AdoYnAzid	II
A.4	Reaktionsverfolgung der Synthese von AdoYnYn (kurz)	II
A.5	Reaktionsverfolgung der Synthese von AdoYnTAMRA (kurz).....	III
A.6	Reaktionsverfolgung der Synthese von AdoYnTAMRA (lang)	III
A.7	Reaktionsverfolgung der Synthese von AdoYnCF640R.....	IV
A.8	Reaktionsverfolgung der Synthese von AdoYnAF647	IV
A.9	Reaktionsverfolgung der Synthese von ODN8-DBCO	V
A.10	Reaktionsverfolgung der Synthese von ODN5-DBCO	V
A.11	Reaktionsverfolgung der Synthese von ODN2-DBCO	VI
A.12	Reaktionsverfolgung der Synthese von ODN14-C ₆ -DBCO.....	VI
A.13	Reaktionsverfolgung der Synthese von ODN14-C ₁₂ -DBCO.....	VII
A.14	Reaktionsverfolgung der Synthese von ODN14-PEG ₆ C ₆ -DBCO	VII
A.15	Reaktionsverfolgung der Synthese von ODN14-PEG ₆ C ₁₂ -DBCO	VIII
A.16	Einzelinjektionen (<i>rp</i> -HPLC) der fluoreszierenden AdoMet-Analoga	VIII
A.17	Einzelinjektionen (<i>rp</i> -HPLC) der ODN-modifizierten AdoMet-Analoga	IX
A.18	¹ H-NMR-Spektrum von 6-Chlorohex-2-in-1-ol in CDCl ₃	IX
A.19	¹ H-NMR-Spektrum von 6-Azidohex-2-in-1-ol in CDCl ₃	X
A.20	¹ H-NMR-Spektrum von Octa-2,7-diin-1-ol in CDCl ₃	X
A.21	¹ H-NMR-Spektrum von Octa-2,7-diin-1-ylmethansulfonat in CDCl ₃	XI
A.22	¹ H-NMR-Spektrum von Undeca-2,10-diin-1-ol in CDCl ₃	XI
A.23	¹ H-NMR-Spektrum von Undeca-2,10-diin-1-ylmethansulfonat in CDCl ₃	XII

A.24	ESI-MS-Spektrum von AdoYnAzid	XII
A.25	ESI-MS-Spektrum von AdoYnYn (kurz).....	XIII
A.26	ESI-MS-Spektrum von AdoYnATTO532	XIII
A.27	ESI-MS-Spektrum von AdoYnTAMRA (kurz).....	XIV
A.28	ESI-MS-Spektrum von AdoYnCF640R.....	XIV
A.29	ESI-MS-Spektrum von AdoYnAF647	XIV
A.30	MALDI-TOF-Spektrum von AdoYnODN11.....	XV
A.31	MALDI-TOF-Spektrum von AdoYnODN8	XV
A.32	MALDI-TOF-Spektrum von AdoYnODN5	XVI
A.33	MALDI-TOF-Spektrum von AdoYnODN2	XVI
A.34	MALDI-TOF-Spektrum von AdoYnC ₆ ODN14	XVII
A.35	MALDI-TOF-Spektrum von AdoYnC ₁₂ ODN14	XVII
A.36	MALDI-TOF-Spektrum von AdoYnPEG ₆ C ₆ ODN14.....	XVIII
A.37	MALDI-TOF-Spektrum von AdoYnPEG ₆ C ₁₂ ODN14.....	XVIII

Tabellenverzeichnis

3.1	Ergebnisse des DNA-Mappings unterschiedlicher DNA-Modifikationen	58
4.1	Übersicht der in Aktivitätstests ermittelten TONs.....	62
5.1	Verwendete Chemikalien und deren Bezugsquelle	64
5.2	Selbst hergestellte Pufferlösungen und Zusammensetzung.....	67
5.3	Kommerzielle Pufferlösungen, Bezugsquelle und Zusammensetzung	67
5.4	DNA-Substrate und -Marker sowie Bezugsquelle.....	68
5.5	Oligonukleotide und deren Sequenzen	69
5.6	Enzymklassen, -spezifität und deren Bezugsquelle	69
5.7	Geräte, Modellbezeichnung und Hersteller	70
5.8	Zusammensetzung der HPLC-Elutionspuffer.....	72
5.9	<i>rp</i> -HPLC Methode N1.....	72
5.10	<i>rp</i> -HPLC Methode N2.....	72
5.11	<i>rp</i> -HPLC Methode S1	72
5.12	<i>rp</i> -HPLC Methode S2	72

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Elmar. Zum einen für die Möglichkeit meine Dissertation auf diesem spannenden und interdisziplinären Forschungsgebiet anfertigen und noch dazu so frei gestalten zu können. Zum anderen für den steten Austausch, das große Verständnis für die kleinen Überraschungen und letztlich die großartige Unterstützung auf dem gesamten Weg hin zu dieser Arbeit. Ich freue mich jetzt schon auf die jährlichen Treffen!

Weiterhin möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe um Prof. Wöll bedanken. Bei Dominik selbst, für das Berichten dieser Arbeit und die große Unterstützung während der Promotion. Bei Oleksii für die riesige Hilfe im Rahmen der Fluoreszenzmikroskopie und Laura für die allgemein gute Kooperation und spannende Zeit. Bei allen Dreien für die offene und herzliche Art, die den Kern der Zusammenarbeit gebildet hat.

Auch möchte ich mich bei meinen ehemaligen Kollegen Matyas und Larissa für die tolle Zusammenarbeit und die konstruktiven Synergien bedanken, sowohl menschlich als auch fachlich! Es war mir eine große Freude diesen Weg gemeinsam mit Euch zu gehen. Auch Andreas, Anna, Leonie, Kerstin, Miriam, Sabrina, Sascha und Valerie gilt mein Dank. Neben der gegenseitigen Unterstützung im und um das Labor herum, auch dafür, dass die letzten Jahre so viel Spaß gemacht haben.

Weiterhin möchte ich mich bei den vielen Studenten bedanken, die im Rahmen von Studien- bzw. Abschlussarbeiten zum Erfolg dieser Promotion beigetragen haben. Darunter sind insbesondere Alexander Schacht, Lukas Reim, Clara Ingelrham, Mariella Bregu, Lars Pritzlaff, Luca Modolo und Noemi Tasca hervorzuheben.

Natürlich gilt mein Dank auch meiner Familie, die mich stets in allen Phasen vor und während dem Anfertigen dieser Dissertation unterstützt hat. Mein größter Dank gilt dabei der weltbesten Ehefrau. Larissa, du hast mir so oft den Rücken freigehalten, mir auch in schwierigen Phasen Kraft gegeben! Ohne dich wäre diese Arbeit so nicht möglich gewesen.