

Entwicklung einer orthogonalen Markierungsmethode für die Fluoreszenzdetektion epigenetischer DNA-Modifikationen

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

vorgelegt von

Larissa Käver (M.Sc.)

aus Würselen

Berichter: Univ.-Prof. Dr. sc. nat. Elmar Weinhold
Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Markus Albrecht

Tag der mündlichen Prüfung: 04.03.2022

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Universitätsbibliothek verfügbar.

Eidesstattliche Erklärung

Ich, Larissa Käver,

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

1. Diese Arbeit wurde vollständig oder größtenteils in der Phase als Doktorand dieser Fakultät und Universität angefertigt;
2. 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;
3. Wenn immer andere eigene- oder Veröffentlichungen Dritter herangezogen wurden, wurden diese klar benannt;
4. Wenn aus anderen eigenen- oder Veröffentlichungen Dritter zitiert wurde, wurden stets die Quellen hierfür angegeben. Diese Dissertation ist vollständig meine eigene Arbeit, mit der Ausnahme solcher Zitate;
5. Alle wesentlichen Quellen von Unterstützungen wurden benannt;
6. 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;
7. Ein Teil oder Teile dieser Arbeit wurden zuvor veröffentlicht und zwar in:

Posterpräsentationen:

Larissa Käver, Alexandra Knops, Sarah Roeb und Elmar Weinhold “*Chemo-enzymatic labeling reactions for fluorescent detection of epigenetic DNA modifications*”, 11th New Year’s Symposium, Institut für Organische Chemie, RWTH Aachen University, 11. Jan. 2019, Aachen.

Larissa Käver, Leonie Schütz, Alexandra Knops, Sarah Roeb, André Krause, Barbara Zschoernig und Elmar Weinhold "*Chemo-enzymatic labeling reactions for fluorescent detection of epigenetic DNA modifications*", GDCh Wissenschaftsforum 2019, Eurgogress Aachen, 15.-18. Sept. **2019**, Aachen.

Larissa Käver, Leonie Schütz, Alexandra Knops, Sarah Roeb, André Krause, Barbara Zschoernig und Elmar Weinhold "*Chemo-enzymatic labeling reactions for fluorescent detection of epigenetic DNA modifications*", Nukleinsäurechemietagung, Universität des Saarlandes, 19. /20. Sept. **2019**, Saarbrücken.

Larissa Käver, Leonie Schütz, Alexandra Knops, Sarah Roeb, André Krause, Barbara Zschoernig und Elmar Weinhold "*Chemo-enzymatic labeling reactions for fluorescent detection of epigenetic DNA modifications*", 12th New Year's Symposium, Institut für Organische Chemie, RWTH Aachen University, 10. Jan. **2020**, Aachen.

Larissa Käver, Leonie Schütz, Barbara Zschoernig, André Krause und Elmar Weinhold "*Chemo-enzymatic labeling reactions for fluorescent detection of epigenetic DNA modifications*", Advances in Chemical Biology, Online-Tagung, 26.-28. Jan. **2021**.

Vorträge:

"*Chemo-enzymatic labeling reactions for fluorescent detection of epigenetic DNA modifications*", 1st International CancerEpiQuant Meeting, Tel Aviv University, 12. Sept. **2018**, Tel Aviv, Israel.

"*Development of a Highly Specific Labeling Method for DNA Methylation Detection by Fluorescence Microscopy*", 2nd National CancerEpiQuant Meeting, Institut für Organische Chemie, RWTH Aachen, 25. Feb. **2019**, Aachen.

"*Chemo-enzymatic labeling reactions for fluorescent detection of epigenetic DNA modifications*", German Half-Milestone Meeting for CancerEpiQuant Project, VDI, 28. Jun. **2019**, Berlin.

Ort, Datum:

Unterschrift:

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μmol	Mikromol
ε	Extinktionskoeffizient
λ	Wellenlänge
A	Adenin
Abb	Abbildung
AdoHcy	S-Adenosyl-L-homocystein
AdoMet	S-Adenosyl-L-methionin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Äq	Äquivalente
Bp	Basenpaare
BER	Basen-Exzisions-Reparatur
BIS	N’N-Methylenbisacrylamid
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
β-Me	β-Mercaptoethanol
C	Cytosin
ca.	circa
5caC	5-Carboxycytosin
CIAP	Calf Intestinal Alkaline Phosphatase
cm	Zentimeter
CpG	Cytosin-Phosphat-Guanin
CuAAC	Cu(I)-katalysierte Azid-Alkin-Cycloadditionen
d	Tag (<i>day</i>)
dA	2’-Desoxyadenosin
DA	Diels-Alder
Da (kDa)	Dalton (kilo Dalton, kg/mol)
dA ^{CF}	mit AdoYnCF640R modifiziertes 2’-Desoxyadenosin
dA ^{mod}	modifiziertes 2’-Desoxyadenosin
DBCO	Dibenzocyclooctin
dC	2’-Desoxycytidin
dC ^{azidoGlu}	modifiziertes 2’-Desoxy-5hydroxymethylcytidin mit UDP-6-Azidoglucose

dC ^{TAMRA}	modifiziertes 2'-Desoxy-5hydroxymethylcytidin geklickt mit DBCO-PEG ₄ -5/6-TAMRA
dG	2'-Desoxyguanosin
dhmC	2'-Desoxy-5hydroxymethylcytidin
dm	Doppelmutante
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-β-GT	DNA-β-Glucosyltransferase
Dnmt	Säugetier DNA-Methyltransferase
dT	2'-Desoxythymidin
DTT	Dithiothreitol
EcoDam	DNA-Methyltransferase aus <i>Escherichia coli</i>
EMCCD	Engl.: „Electron-Multiplying Charge-Coupled Device“
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI-MS	Elektrospray-Ionisations-Massenspektroskopie
F	Fläche des Peaks
5fC	5-Formylcytosin
G	Guanin
g	Gramm
5ghmC	Glucolysiertes 5-Hydroxymethylcytosin
h	Stunde (<i>hour</i>)
HDC	Huisgen 1,3-dipolare Cycloaddition
5hmC	5-Hydroxymethylcytosin
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IEDDA	Diels-Alder mit inversem Elektronenbedarf
L	Liter
M.BseCI	Methyltransferase aus <i>Bacillus stearothermophilus</i>
5mC	5-Methylcytosin
M.HhaI	Methyltransferase aus <i>Haemophilus haemolyticus</i>
min	Minuten (<i>minutes</i>)
mmol	Millimol
M.MpeI	Methyltransferase aus <i>Mycoplasma penetrans</i>
MR	<i>Middle-range Ladder</i>

M.SssI	Methyltransferase aus <i>Spiroplasma monobiae</i>
mTaG	<i>Methyltransferase-directed Transfer of Activated Groups</i>
MTase	Methyltransferase
M.TaqI	Methyltransferase aus <i>Thermus aquaticus</i>
MS	Massenspektrometrie
N	Anzahl
NEB	<i>New England Biolabs</i>
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie (nuclear magnetic resonance)
ODN	Oligodesoxynukleotid
PA	Polyacrylamid
p.a.	Zur Analyse (<i>pro analysi</i>)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEG	Polyethylenglykol
REase	Restriktionsendonuklease
R/M-System	Restriktions-Modifikations-System
rpm	Umdrehungen pro min (<i>rounds per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde (<i>seconds</i>)
S _N 2	Nukleophile Substitution 2. Ordnung
T	Thymin
TAMRA	Carboxytetramethylrhodamine
TCO	<i>trans</i> -Cyclooctine
TDG	Thymin-DNA-Glycosylase
TET	<i>Ten-Eleven</i> -Translokationsenzyme
TEAAc	Triethylammoniumacetat
TEMED	Tetramethylethylendiamin
THPTA	Tris(3-hydroxypropyltriazolmethyl)-amin
tm	Tripelmutante
TON	<i>Turnover Number</i>
t _R	Retentionszeit
UDP	Uridindiphosphat

ULR	<i>Ultra-low-range Ladder</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vis	Engl. „Visable“

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Desoxyribonukleinsäure (DNA).....	1
1.2 DNA-Methyltransferasen	3
1.3 Epigenetik.....	7
1.3.1 DNA-Methylierung.....	7
1.3.2 DNA-Hydroxymethylierung	10
1.3.3 Krebsdiagnostik	10
1.4 Synthetische Cofaktoranaloga für Methyltransferasen.....	11
1.5 Klick-Chemie.....	14
2. Zielsetzung	19
3. Ergebnisse und Diskussion.....	22
3.1 Synthesen doppeltaktivierter vinylicher AdoMet-Analoga	22
3.1.1 Synthese AdoVinylBenz (AdoVB) (6)	22
3.1.2 Synthese AdoYnVinylBenz (AdoYnVB) (kurz (16) /lang (17))	24
3.2 Aktivität doppeltaktivierter AdoMet-Analoga	28
3.2.1 Modifikations-/Restriktionstests mit den DNA-Adenin- <i>N</i> 6-MTasen M.TaqI und M.BseCI.....	29
3.2.2 Modifikations-/Restriktionstest mit den DNA-Cytosin- <i>C</i> 5-MTasen M.SssI (dm), M.MpeI (dm) und M.HhaI (tm)	36
3.3 Zweistufige DNA-Markierung zur DNA-Methylierungsdetektion.....	41
3.3.1 Untersuchung von AdoMet-Analoga mit endständiger aromatischer Doppelbindung und Tetrazin-Konjugaten	43
3.3.2 Untersuchungen eines AdoMet-Analogons mit gespannter Doppelbindung und Tetrazin-Konjugaten	52
3.4 Einstufige DNA-Modifikation.....	63
3.4.1 Untersuchung der einstufigen DNA-Markierung von λ -DNA und PCR-Produkt mit fluoreszierenden Reportergruppen.....	65

3.4.2 Untersuchung der einstufigen DNA Modifikation mit AdoYnTAMRA im humanen Genom.....	72
3.4.3 HPLC-Quantifizierung mit M.TaqI und EcoDam	77
3.5 Zweistufige DNA-Markierung zur DNA-Hydroxymethylierungs-detektion.....	87
3.5.1 Fluoreszenzmikroskopie von markiertem PCR-Produkt	89
3.5.2 HPLC-Quantifizierung.....	92
3.6 Orthogonale DNA-Markierung	97
3.6.1 Fluoreszenzmikroskopie von markiertem PCR-Produkt	99
3.6.2 HPLC-Quantifizierung.....	102
4. Zusammenfassung und Ausblick	109
5. Experimenteller Teil.....	119
5.1 Verwendete Materialien und Geräte.....	119
5.1.1 Chemikalien.....	119
5.1.2 Pufferlösungen.....	120
5.1.3 Marker, Plasmid- und Phagen-DNA	121
5.1.4 Oligodesoxynukleotide und Primer	122
5.1.5 Enzyme	123
5.1.6 Kits.....	124
5.1.7 Geräte.....	125
5.2 Instrumentelle Methoden.....	126
5.2.1 <i>rp</i> -HPLC	126
5.2.2 NMR-Spektroskopie	128
5.2.3 Massenspektrometrie	128
5.2.4 UV-/Vis-Spektroskopie	129
5.2.5 Agarosegel-Elektrophorese	129
5.2.6 Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE)	130
5.2.7 Plug-Aufreinigung	131
5.2.8 Polymerase-Kettenreaktion	131

5.2.9 Modifikations-/Restriktionstests doppeltaktivierter AdoMet-Analoga	132
5.2.9.1 Aktivitätstest mit M.TaqI	132
5.2.9.2 Aktivitätstest mit M.BseCI	133
5.2.9.3 Aktivitätstest mit EcoDam	134
5.2.9.4 Aktivitätstest mit M.SssI (Q142A/N370A, dm)	135
5.2.9.5 Aktivitätstest mit M.MpeI (Q136A/N374A, dm)	136
5.2.9.6 Aktivitätstest mit M.HhaI (Q82A/Y254S/N304A, tm).....	137
5.2.10 HPLC-Quantifizierungstest	138
5.2.10.1 Duplex-ODN -Hybridisierung und einstufige Modifikation mit M.TaqI	138
5.2.10.2 Duplex-ODN -Hybridisierung und einstufige Modifikation mit EcoDam	139
5.2.10.3 Duplex-ODN - Hybridisierung und einstufige Modifikation mit β -GT	139
5.2.10.4 Klick-Chemie (SPAAC) mit DBCO-PEG ₄ -5/6-TAMRA	140
5.2.10.5 Duplex-ODN -Hybridisierung und orthogonale Modifikationsreaktion	140
5.2.10.6 Enzymatische Fragmentierung und Analyse der Zusammensetzung	141
5.2.11 Fluoreszenzmikroskopie	142
5.2.11.1 Oberflächenmodifikation	142
5.2.11.2 Probenvorbereitung	142
5.2.11.3 Fluoreszenzmikroskopie	142
5.3 Synthesen doppeltaktivierter AdoMet-Analoga	144
5.3.1 AdoVB (6) ^[119]	144
5.3.2 1-(Azidomethyl)-4-vinylbenzol (18) ^[148]	145
5.3.3 AdoYnVB (kurz) (16)	146
5.3.4 AdoYnVB (lang) (17)	147
5.4 Zweistufige DNA-Markierung zur DNA-Methylierungsdetektion	148
5.4.1 DNA-Markierung mit M.BseCI	148
5.4.2 DNA-Markierung mit M.TaqI	149
5.4.3 DNA-Markierung mit M.HhaI	150
5.5 Einstufige DNA-Markierungen mit fluoreszierenden Reportergruppen	151

5.5.1 DNA-Markierung von λ -Phagen-DNA mit M.BseCI.....	151
5.5.2 DNA-Markierung von PCR- λ -DNA mit M.TaqI	152
5.5.3 DNA-Markierung von genomischer Human-DNA mit M.TaqI	153
5.5.4 DNA-Markierung von genomischer Human-DNA mit EcoDam	153
5.6 Zweistufige DNA-Markierung zur DNA-Hydroxymethylierungdetektion.....	154
5.7 Orthogonale DNA-Modifikation	154
6. Literaturverzeichnis.....	155
Anhang	163
A Zusätzliche Ergebnisse	163
B DNA-Sequenzen	173
B.1 PCR- λ -Sequenz (1052 Bp).....	173
Danksagung	174

1. Einleitung

1.1 Desoxyribonukleinsäure (DNA)

Bereits im Jahre 1944 postulierte Oswald Avery durch Transformationsexperimente, dass die genetische Information eines jeden lebenden Organismus in seiner DNA (*deoxyribonucleic acid*) und nicht in Proteinen codiert wird.^[1,2] Die DNA ist ein komplexes Makromolekül und besitzt eine antiparallele, doppelhelikale Struktur, die aus vier verschiedenen monomeren Untereinheiten, den Nukleotiden, aufgebaut ist. Jedes dieser Nukleotide besteht aus drei Bausteinen: Einem Pentosezucker, einer heterozyklischen, stickstoffhaltigen Base und einer Phosphatgruppe. Bei dem Zuckermolekül handelt es sich in der DNA um die 2'-Desoxyribose in seiner zyklischen Furanoseform, an die über eine β -glykosidische Bindung am ersten C-Atom eine der vier Nukleobasen gebunden ist. Die DNA weist vier verschiedene Nukleobasen auf: Adenin (A), Guanin (G), Cytosin (C) und Thymin (T). Adenin und Guanin haben bizyklische Strukturen und werden als Purinbasen bezeichnet, während Cytosin und Thymin dagegen monozyklisch sind und zu den Pyrimidinbasen zählen. Eine monomere Einheit, bestehend aus dem Zuckermolekül 2'-Desoxyribose und einer Nukleobase, wird als Nukleosid bezeichnet. Bei einem Nukleotid hingegen weist die Ribose am 5'-C-Atom noch eine Phosphatgruppe auf, die sich kovalent mit dem Zuckermolekül des nächsten Nukleotids über eine Phosphodiesterbindung kovalent verbindet (Abbildung 1.1, a). Dadurch entsteht ein alternierendes Zucker-Phosphat-Grundgerüst. Die Struktur dieser Kette erzeugt eine Richtungsabhängigkeit, wobei das 3'-Ende eine terminale Hydroxylgruppe und das 5'-Ende eine terminale Phosphatgruppe aufweist (Abbildung 1.1, a).^[2-6] Im Jahre 1953 postulierten Jim Watson und Francis Crick aufgrund von Röntgenstrukturanalysen, dass die DNA aus zwei zueinander antiparallelen Strängen besteht, die eine rechtsgängige Doppelhelix aufweist. Demnach bilden die Nukleobasen jeweils komplementäre Paare: Adenin paart nur mit Thymin und Guanin nur mit Cytosin, wobei A:T-Basenpaare zwei Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden, während G:C-Basenpaare über drei Wasserstoffbrückenbindungen miteinander verknüpft sind (Abbildung 1.1, b). Diese molekulare Erkennung wird gemäß den Entdeckern auch Watson-Crick-Basenpaarung genannt.^[6,7] Nach der Chargaffschen Regel ist die Menge an Adenin in der DNA gleich der von Thymin und die Menge an Guanin ist gleich der von Cytosin.^[8,9] Durch die ausgebildeten Wasserstoffbrücken zwischen den komplementären Nukleobasen, werden die beiden Polynukleotidstränge der DNA zusammengehalten, wobei

sich das hydrophile Zucker-Phosphat-Rückgrat auf der Außenseite der Doppelhelix befindet und die hydrophoben Nukleobasen nach innen zeigen (Abbildung 1.1, b).^[10]

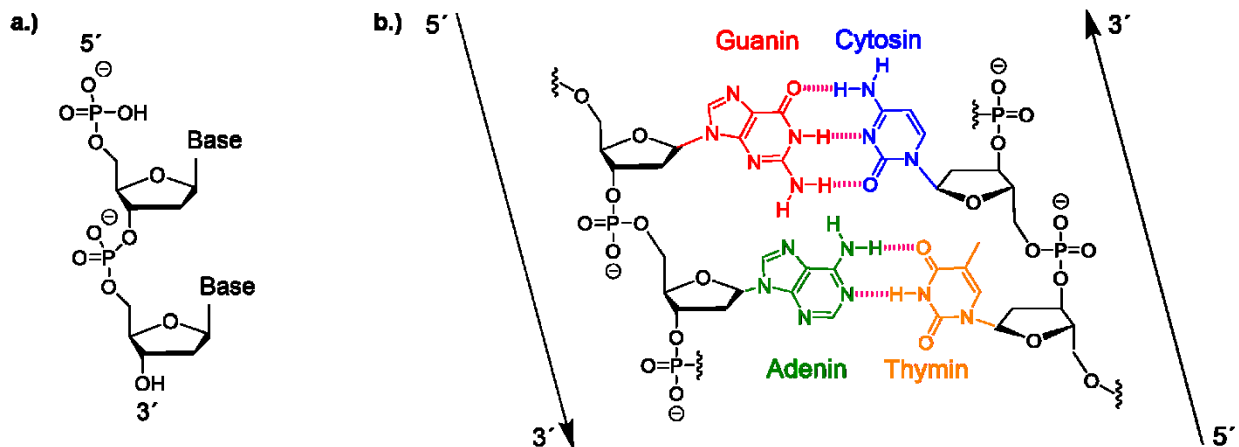


Abbildung 1.1: Struktur eines Dinukleotids bestehend aus zwei 2-Desoxyribosezuckereinheiten, zwei beliebigen Nukleobasen sowie zwei Phosphatgruppen (a) sowie die Watson-Crick Basenpaarung innerhalb der doppelsträngigen DNA mit Wasserstoffbrückenbindungen (pink) zwischen A und T (zwei) und G und C (drei) (b).

Durch Röntgenstrukturanalyse von kurzer DNA konnte weiterhin herausgefunden werden, dass die doppelhelikale Struktur der DNA in mehreren Konformationen existiert, die A- und B-Form, sowie die Z-Form.^[11–13] Die rechtsgängige B-Form kommt in der Natur am häufigsten vor und ist die für Zellprozesse relevanteste Konformation. Durch die Wechselwirkung von Wasserstoffbrückenbindungen und die antiparallele Anordnung der beiden Stränge entsteht bei dieser Form eine große Haupt- (*major groove*) und eine kleine Nebenfurche (*minor groove*), die für DNA-Protein-Wechselwirkungen entscheidend sind. Die B-Form ist schmaler und länger als die A-Form, die ebenfalls rechtsgängig vorliegt, jedoch eine gestauchtere und kompaktere Form aufweist. Die A-Konformation der DNA entsteht aus der B-Form unter dehydrierenden Bedingungen.^[14,15] Lediglich die längste und schmalste DNA-Form, die Z-Konformation, bildet eine linksgängige Helix und ist durch ein zick-zack geformtes Phosphat-Rückgrat charakterisiert. Diese Form der DNA ist bei hohen Salzkonzentrationen zu finden (Abbildung 1.2)^[14–17] Anfang der sechziger Jahre konnte weiterhin herausgefunden werden, dass die Aminosäuresequenzen eines Proteins von der Basensequenz innerhalb der DNA abhängen und dass eine einzelne Aminosäure immer durch die Abfolge von drei Nukleobasen codiert wird.^[18]

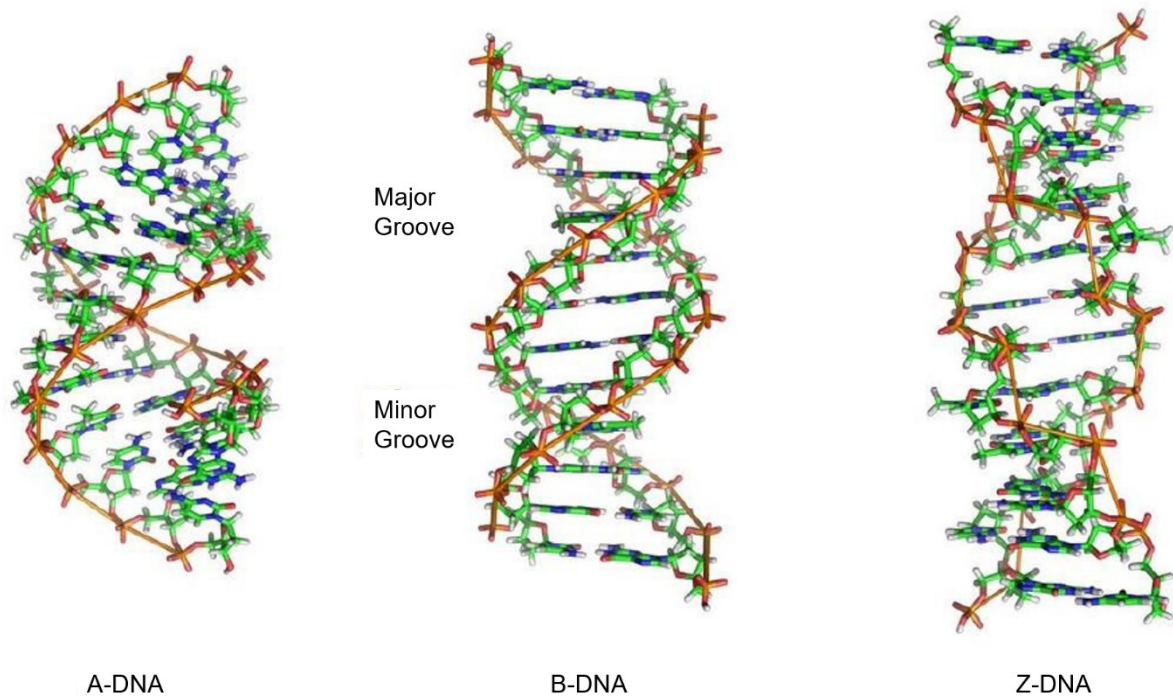


Abbildung 1.2: Darstellung der drei verschiedenen DNA-Konformationen, A-Form, B-Form und Z-Form.^[16]

1.2 DNA-Methyltransferasen

DNA-Methyltransferasen (MTasen) sind Enzyme, die die Methylierung der DNA durch den natürlichen Cofaktor *S*-Adenosyl-L-methionin (**1**) (AdoMet oder SAM) katalysieren.^[19,20] Die DNA-MTasen übertragen dabei die Methylgruppe des Methyl donors AdoMet (**1**) sequenzspezifisch auf die Zielbase einer meist palindromischen Erkennungssequenz innerhalb der DNA. DNA-MTasen sind somit sequenz- und basenspezifisch und die Erkennungssequenzen reichen von zwei bis acht Basenpaaren (Bp).^[21,22] Da die Methylierung positionsabhängig ist, können DNA-MTasen aus chemischer Sicht in zwei Klassen unterteilt werden. Die *N*-DNA-MTasen methylieren dabei exozyklische Stickstoffatome, während *C*-DNA-MTasen die Methylierung des endozyklischen C5-Atoms des Pyrimidinrings von Cytosin (5mC) katalysieren (DNA-Cytosin-C5-MTasen). Zu den *N*-DNA-MTasen zählen einerseits DNA-Adenin-*N*6-MTasen, die die Methylierung von Adenin zu *N*6-Methyladenin (6mA) ermöglichen und andererseits DNA-Cytosin-C4-MTasen, die eine Methylierung der *N*4-Position des Cytosins zu *N*4-Methylcytosin (4mC) katalysieren (Abbildung 1.3).^[19–21,23–25]

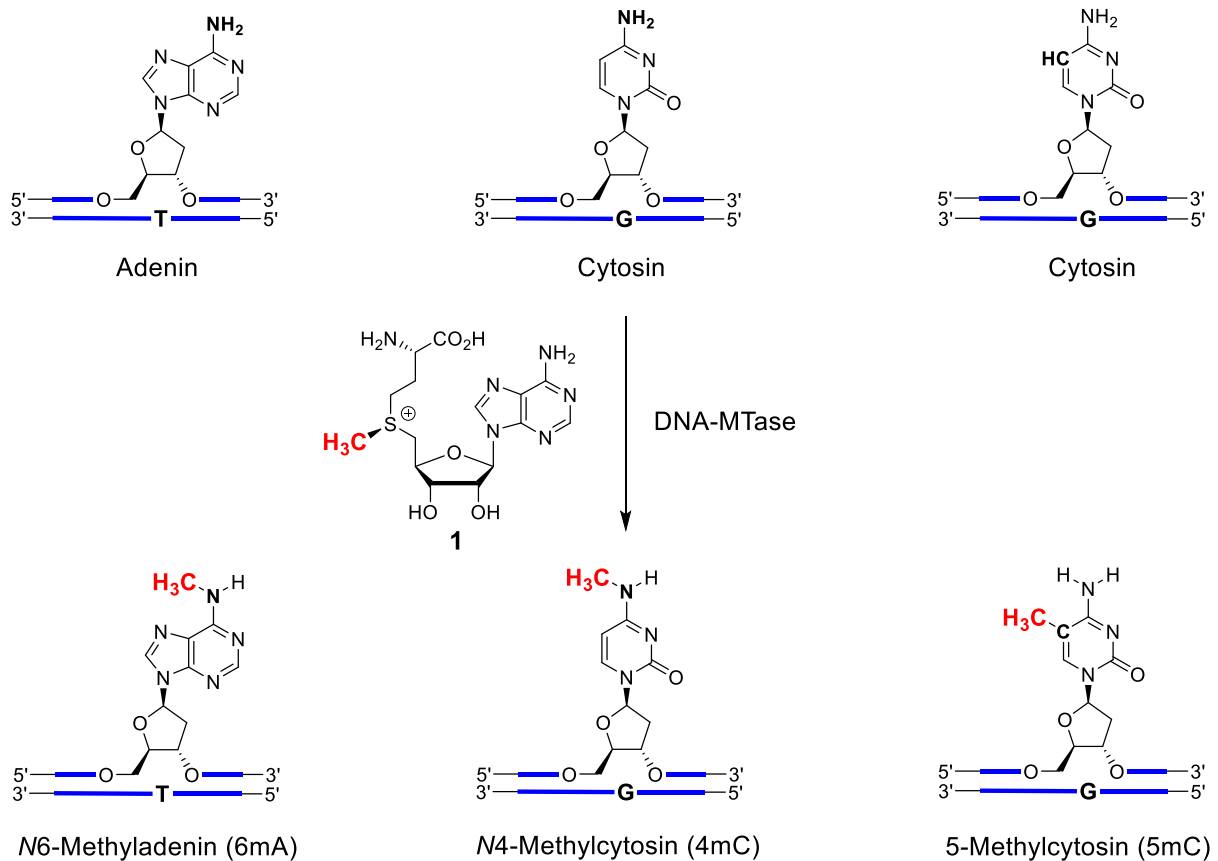


Abbildung 1.3: Katalyse der spezifischen Methylierung von DNA durch DNA-MTasen an der N6-Position von Adenin oder der N4- bzw. C5-Position von Cytosin. Gebildet werden dabei die methylierten Nukleobasen N6-Methyladenin (6mA), N4-Methylcytosin (4mC) oder 5-Methylcytosin (5mC).

6mA wurde vor allem im Genom von Pilzen, Bakterien, Protisten sowie Archaeen entdeckt, wohingegen 4mC nur in Bakterien vorkommt.^[23,26,27] In Prokaryoten dient die DNA-Methylierung zur Unterscheidung zwischen der eigenen und viraler Fremd-DNA und fungiert im Zusammenspiel mit Restriktionsendonukleasen (REasen) als eine Art bakterielles Immunsystem. Weiterhin dient sie zur Fehlerkorrektur nach der DNA-Replikation (*Mismatch-Reparatur*).^[23,25,26,28,29] Wird zellfremde, unmethylierte DNA innerhalb des Bakteriums oder zellfremde DNA mit unbekanntem Methylierungsmuster identifiziert, werden REasen genutzt, um die fremde, doppelsträngige DNA zu fragmentieren. Die eigene DNA wird durch die spezifische DNA-Methylierung vor der Spaltung und Zerstörung geschützt, da die eingesetzte REase dieselbe Erkennungssequenz aufweist, wie die zur DNA-Methylierung genutzte DNA-MTase, und die methylierte Erkennungssequenz nicht mehr schneiden kann. Die REasen fragmentieren die zellfremde DNA durch Hydrolyse der Phosphodiesterbindung zwischen dem Phosphatrückgrat des Doppelstrangs und der 2'-Desoxyribose. Die Kombination aus DNA-MTase und REase in einem Organismus nennt man Restriktions-Modifikations-System (R/M-

System).^[20,30–33] In Eukaryoten hat die spezifische DNA-Methylierung vor allem an der C5-Position von Cytosin eine bedeutende Rolle für die Epigenetik, da sie an der Kontrolle verschiedener zellulärer Prozesse, wie der Regulation der Genexpression, der Embryonalentwicklung und Karzinogenese beteiligt ist.^[20,24,34] Für die spezifische Methylierung nutzen DNA-MTasen einen sogenannten *base-flipping*-Mechanismus, der erstmals durch Röntgenkristallstrukturanalyse der C5-DNA-MTase M.HhaI in Komplex mit dem DNA-Substrat von Klimasauskas *et al.* beobachtet werden konnte.^[19,35–37] Dabei muss die zu methylierende Base aus der Doppelhelix unter Verlust der Stapelwechselwirkung zu den Nachbarbasen herausrotiert und in die katalytische Bindungstasche der DNA-MTase hineingedreht werden (Abbildung 1.4). Der Transfer der Methylgruppe von AdoMet (**1**) auf die Nukleobase erfolgt nach einem S_N2-Mechanismus. Bei der Rotation des *base-flipping*-Mechanismus erfahren die betroffenen Nukleobasen eine Konformationsverschiebung.^[38,39]

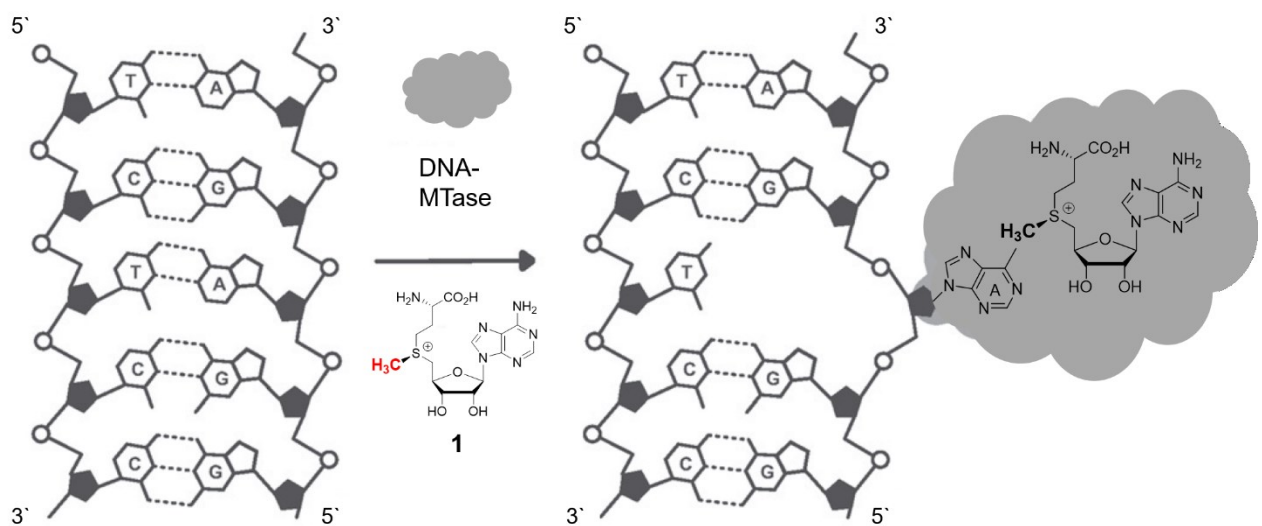


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung des Basenausklappmechanismus (*base flipping*) bei der Methylierung durch eine DNA-MTase und dem natürlichen Cofaktor AdoMet (**1**).^[40]

Die am häufigsten vorkommenden DNA-MTasen in Prokaryoten sind die Typ II DNA-MTasen, die aus monomeren Proteinen bestehen und nur eine relativ geringe Größe von durchschnittlich 30-50 kDa aufweisen.^[29] Zu den Typ II DNA-MTasen zählen einerseits die DNA-Adenin-N6-MTasen M.TaqI (5'-TCGA-3') und M.BseCI (5'-ATCGAT-3'). M.TaqI stammt aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* und bildet zusammen mit der zugehörigen kognaten REase R.TaqI, die die selbe Erkennungssequenz besitzt, ein Typ II R/M-System. M.TaqI überträgt die Methylgruppe des natürlichen Cofaktors AdoMet (**1**) auf N6-

Position von Adenin innerhalb der palindromischen Erkennungssequenz 5'-TCGAA-3'. Sie besitzt dabei insgesamt 421 Aminosäuren mit einem Gesamtmolekulargewicht von 47,9 kDa.^[41–43] Die Adenin-spezifische DNA-MTase M.BseCI stammt aus dem Bakterium *Bacillus stearothermophilus* und katalysiert die Methylierung der N6-Position des 3'-Adenins in der palindromischen Erkennungssequenz 5'-ATCGAT-3'. Die Sequenz umfasst 579 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 66,7 kDa. Zusammen mit der korrespondierenden kognaten REase R.ClaI, die ebenfalls 5'-ATCGAT-3' als spezifische Erkennungssequenz besitzt, bildet M.BseCI ein Typ II R/M-System, um bakterielle DNA vor der Einwirkung von zellfremder, viraler DNA zu schützen.^[44,45]

Neben den DNA-Adenin-N6-MTasen M.TaqI und M.BseCI zählt andererseits auch die Cytosin-C5-DNA-MTase M.HhaI zu den Typ II DNA-MTasen in Prokaryoten. M.HhaI stammt aus dem Bakterium *Haemophilus haemolyticus* und methyliert das interne Cytosin innerhalb der palindromischen Erkennungssequenz 5'-GCGC-3' an der C5-Position. Zusammen mit der zugehörigen kognaten REase R.HhaI bildet sie ein Typ II R/M-System. Sie besteht aus einem einzigen Polypeptid mit einer Sequenzlänge von 327 Aminosäuren (37 kDa) und zählt damit zu einer der kleinsten Vertreter der C5-DNA-MTasen.^[46–48]

Weitere Cytosin-C5-DNA-MTasen sind die M.MpeI und die M.SssI. M.MpeI wird aus dem Bakterienstamm *Mycoplasma penetrans* exprimiert und katalysiert genau wie M.SssI, aus *Spiroplasma monobiae*, die Methylierung der C5-Position von Cytosin innerhalb der Dinukleotidsequenz 5'-CG-3'. Somit teilen sie die Spezifität der eukaryotischen C5-DNA-MTasen und können zur Forschung von eukaryotischer DNA-Methylierung sowie epigenetischer Regulationsprozesse dienen. Beide Enzyme weisen sehr ähnliche Aminosäuresequenzen auf. M.MpeI besteht aus insgesamt 395 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 46,1 kDa und M.SssI aus 386 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 44,3 kDa.^[49–51]

In Eukaryoten gibt es drei funktionelle DNA-MTasen (Dnmt), die für die CpG-Methylierung an der C5-Position von Cytosin verantwortlich sind. Dazu zählt vor allem die Dnmt1. Diese DNA-MTase bewahrt das *in vivo* bereits existierende Methylierungsmuster im Genom während der Replikation und methyliert bevorzugt hemimethylierte DNA. Dnmt3a und Dnmt3b zählen hingegen zu den *de novo*-DNA-MTasen und spielen eine wichtige Rolle in der embryonalen Entwicklung, indem sie die DNA-Methylierung sowohl von unmethylierter als auch hemimethylierter DNA mit gleicher Effizienz katalysieren. Anders als Dnmt1 sind diese beiden DNA-MTasen dafür verantwortlich, neue Methylierungsmuster in embryonalen Stammzellen zu erschaffen.^[52–54]

1.3 Epigenetik

Ein wichtiger Aspekt bei der Expression des humanen Genoms ist die Epigenetik. Conrad Weddington prägte 1942 den Begriff Epigenetik als den Zweig der Biologie, der die kausalen Interaktionen zwischen Genen und ihren Produkten untersucht, die den Phänotyp hervorbringen. Sie ist demnach eine Art Brücke zwischen dem Genotyp und Phänotyp und kann laut Weddington definiert werden, als die Untersuchung jeder potenziell stabilen und im Idealfall vererbaren Variation der Genexpression oder des zellulären Phänotyps, die ohne Veränderungen in der Watson-Crick-Basenpaarung innerhalb der DNA-Sequenz auftritt.^[55] Aufgrund der Veränderungen des Phänotyps weisen verschiedene Zelltypen in einem Organismus, die dieselbe genetische Information zeigen, einzigartige Funktionen und Eigenschaften auf. Epigenetische Informationen sind beispielsweise Histonmodifikationen oder nicht-kodierende RNA. Die wichtigste Rolle in der Epigenetik spielt jedoch die DNA-Methylierung, die Hinweise auf Krankheiten wie beispielsweise Krebs liefern kann. Durch die DNA-Methylierung werden bestimmte Genareale aufgrund direkter chemischer Veränderungen an- oder abgeschaltet und beeinflussen somit die Regulation der Genexpression.^[56]

1.3.1 DNA-Methylierung

Die DNA-Methylierung bei Säugetieren wurde historisch gesehen bereits 1944 durch Avery *et. al* beschrieben, als er DNA als Träger der genetischen Information identifizierte.^[1,57] Der Methylierungsprozess innerhalb der Zelle wird durch Enzyme, den DNA-MTasen, katalysiert, indem eine Methylgruppe sequenz- und positionsspezifisch auf die Zielbase innerhalb der Erkennungssequenz übertragen wird. Dazu wird der natürliche Cofaktor AdoMet (**1**) genutzt, der als Methyl donor fungiert. Durch das benachbarte Sulfoniumzentrum innerhalb der Struktur von AdoMet (**1**) wird die Methylgruppe für einen nukleophilen Angriff aktiviert. Bei der Übertragung der Methylgruppe auf die Nukleobase innerhalb der DNA wird S-Adenosyl-L-homocystein (AdoHcy) (**2**) als Nebenprodukt freigesetzt (Abbildung 1.5).^[35] Das in der Zelle biologisch aktive AdoMet (**1**) wird aus Adenosintriphosphat (ATP) und der Aminosäure L-Methionin enzymatisch durch die Methionin-Adenosyl-Transferase (MAT) hergestellt.^[58–61]

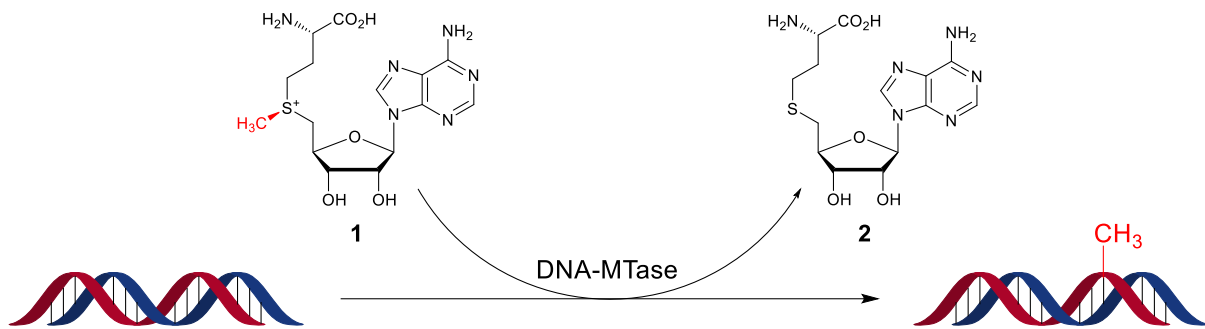


Abbildung 1.5: Enzymatische Übertragung der Methylgruppe des natürlichen Cofaktors AdoMet (1) sequenzspezifisch auf die DNA durch DNA-MTase unter Abspaltung von AdoHcy (2).

Abhängig davon, an welcher Position die DNA-Methylierung durch DNA-MTasen innerhalb der DNA stattfindet, entsteht 6mA, 4mC oder 5mC (Abbildung 1.3). Bei Säugetieren tritt die DNA-Methylierung hauptsächlich an der 5-Position von Cytosin innerhalb von CG-Sequenzmotiven auf, die allgemein als Cytosin-Phosphat-Guanin (CpG) bezeichnet werden^[55,62] und dessen relativer Anteil im Genom unterrepräsentiert ist.^[63] Durch Methylierung des 5-Kohlenstoffs von Cytosin entsteht die auch als fünfte Base der DNA bezeichnete epigenetische Modifikation 5mC.^[64] Rollin Hotchkiss postulierte 1948 erstmals die Entdeckung des modifizierten Cytosins in einem Präparat aus Kälberthymus mittels Papierchromatographie. Er stellte die Hypothese auf, dass es sich aufgrund des Trennverhaltens verglichen mit dem unmodifizierten Cytosin um 5mC handelte und dass diese Modifikation natürlicherweise im Genom vorkommt.^[57,65] In eukaryotischen Zellen spielt 5mC eine essentielle Rolle in verschiedenen zellulären Prozessen, wie der Regulierung der Genexpression, der X-Chromosom Inaktivierung und der genomischen Prägung.^[20,34,66] Ein Zusammenhang zwischen der DNA-Methylierung und der Entstehung von Krebs wurde erstmals 1983 nachgewiesen^[67], weshalb die Untersuchung von Bereichen der DNA mit hoher CpG-Dichte (*CpG-islands*) für die epigenetische Krebsforschung besonders interessant ist. Sehr häufig treten diese *CpG-islands* in Promotorregionen auf. Durch eine Hypermethylierung dieser CpG-Sequenzen werden Bereiche des Gens stumm geschaltet und die Genexpression kann nicht mehr im gewünschten Maße stattfinden oder wird gänzlich inaktiviert. Durch die Inaktivierung in Promotorregionen von Tumor-Suppressor-Genen wird die Entstehung von Krebs begünstigt, da sie die Bildung von Krebszellen durch die Abschaltung der Gene nicht mehr unterdrücken können.^[68,69]

Der Prozess der DNA-Methylierung ist eine stabile und vererbare DNA-Modifikation, die jedoch durch einen aktiven Demethylierungsprozess reversibel ist. 5mC wird durch *Ten-*

Eleven-Translokationsenzyme (TET) und der Nutzung von 2-Ketoglutarat zunächst zu 5-Hydroxymethylcytosin (5hmC) oxidiert.^[70–72] Diese Enzyme können jedoch noch weitere Oxidationsprozesse bewirken, sodass 5hmC zu 5-Formylcytosin (5fC) und im Anschluss zu 5-Carboxycytosin (5caC) umgesetzt wird.^[73–75] Die Umwandlung von 5fC und 5caC zurück zu unmodifiziertem Cytosin erfolgt durch einen aktiven Demethylierungsprozess, um biologische Effekte, die durch die CpG-Methylierung verursacht werden, umzukehren. Dabei kommen spezielle DNA-Glykosylasen, wie die Thymin-DNA-Glycosylase (TDG), zum Einsatz, die die glykosidische Bindungen von 5fC und 5caC, sowie von 5-Hydroxymethyluridin (5hmU) spalten.^[76–79] Letzteres entsteht nach der Desaminierung von 5hmC.^[78] Nach Basensabspaltung wird die abasische Stelle im weiteren Verlauf der Basen-Exzisions-Reparatur (BER) durch Einfügung von nativem Cytosin repariert.^[74,80] Abbildung 1.6 zeigt den beschriebenen epigenetischen Methylierungs- und Demethylierungszyklus innerhalb der eukaryotischen DNA ausgehend vom Cytosin.^[81]

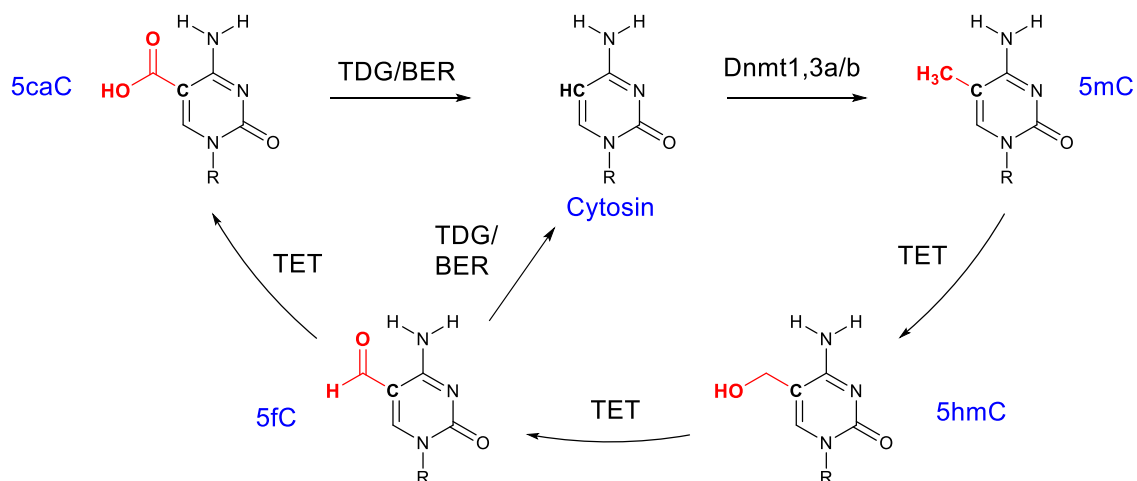


Abbildung 1.6: Epigenetischer DNA-Zyklus der Methylierung von Cytosin zu 5mC mittels Dnmt und anschließende Oxidation zu 5hmC, 5fC und 5caC durch TET-Enzyme sowie der Austausch von 5fC und 5caC durch Cytosin.

1.3.2 DNA-Hydroxymethylierung

Im Jahr 2009 wurde entdeckt, dass das genetische Material von Säugetieren neben den bekannten fünf Nukleobasen A, C, G, T und 5mC eine zusätzliche sechste Base 5hmC enthält. Diese epigenetische Modifikation, die erstmals 1972 von R. Yura in Säugetier-DNA nachgewiesen wurde, entsteht bei Oxidation des 5mC durch das TET1-Enzym.^[71,72,82–84] Die epigenetische Base 5hmC ist der Mittelpunkt vieler Studien, die sich damit beschäftigen, die spezifische Rolle und Funktion dieser Base im menschlichen Genom aufzudecken. Einerseits konnte festgestellt werden, dass 5hmC sowie TET-Enzyme in der Forschung der Stammzellenbiologie eine bedeutende Rolle spielen sowie an verschiedenen Krebsvorgängen beteiligt sind.^[85–88] Andererseits ist 5hmC als potentiell stabile Base an Genregulationsprozessen beteiligt und kann weiterhin die Chromatinstruktur und die lokale Transkriptionsaktivität kontrollieren, indem es 5mC-bindende Proteine abstößt oder 5hmC-spezifische Proteine bindet.^[89–91] Weiterhin wird angenommen, dass 5hmC einen Biomarker für die Genaktivierung darstellt, da es in aktiven Genen verschiedener Gewebetypen, embryonalen Stammzellen sowie den Neuronen des Gehirns angereichert vorkommt^[92–94] und weil 5hmC außerdem als wichtiges Intermediat im aktiven DNA-Demethylierungsprozess bei Säugetieren auftritt (Abbildung 1.6).^[95]

Im menschlichen Genom kommt die epigenetische Modifikation 5hmC in relativ geringer Konzentration vor, da lediglich 0,3-0,7 % aller Cytosine hydroxymethyliert vorliegen.^[82,84] Außerdem stellt die sechste Base eine stabile aber sehr gewebespezifische Modifikation dar^[84,96], wobei die höchsten Konzentrationen in Neuronen des Gehirns^[96–98] und die niedrigsten Konzentrationen im menschlichen Blutkreislauf identifiziert wurden.^[97,99] Für die epigenetische Forschung entwickelt sich 5hmC zu einem sehr wichtigen Biomarker, denn diverse Studien zeigen, dass Veränderungen des 5hmC-Gehalts mit mehreren menschlichen Krankheiten, wie beispielsweise Krebs oder mit neurodegenerative Erkrankungen wie beispielsweise Chorea Huntington und Alzheimer, in Verbindung gebracht werden können.^[100–102] Weiterhin treten Veränderungen des 5hmC-Gehaltes innerhalb der DNA bei psychiatrischen Störungen sowie psychischem Stress auf.^[100,103]

1.3.3 Krebsdiagnostik

Die Entwicklung einer Krebserkrankung korreliert nach neusten Studien mit dem Auftreten genetischer sowie epigenetischer Veränderungen innerhalb des menschlichen Genoms. Während genetische Veränderungen bereits als prädiktive Biomarker verwendet werden, ist das Gebiet der epigenetischen Variationen zur Diagnostik und Prognostik nicht ausreichend

charakterisiert.^[104,105] Globale Variationen der epigenetischen Modifikationen 5mC und 5hmC werden bei verschiedenen Krebsarten beobachtet. Heutige Untersuchungen weisen für verschiedene Tumorerkrankungen (beispielsweise Lungenkrebs, Brustkrebs, Leberkrebs oder Darmkrebs) auf eine dramatische Abnahme des 5hmC-Gehalts innerhalb der Tumorzellen, im Vergleich zu normalen Zellen des gleichen Gewebetyps hin (~50-90 %).^[87,97–99,106,107] Für 5mC wurde sowohl über eine Erhöhung als auch über eine Abnahme des globalen Spiegels berichtet. Einerseits werden CpG-Islands bestimmter Promotoren hypermethyliert, was zu einem unkontrollierten Abschalten bestimmter Genareale (beispielsweise von Tumor-Suppressor-Genen) und somit zur Entstehung von Krebserkrankungen führt. Andererseits tritt in Krebszellen ein Verlust der globalen DNA-Methylierung für repetitive DNA-Sequenzen auf, die normalerweise hoch methyliert vorliegen. Dieser Prozess wird Hypomethylierung genannt und aktiviert sogenannte Onkogene, die ebenfalls die Entstehung von bestimmten Krebserkrankungen begünstigen. Es kommt zu einer Überexpression von Onkogenen und damit verbunden zu einer erhöhten Zellproliferation.^[108,109]

1.4 Synthetische Cofektoranaloga für Methyltransferasen

Da die spezifische DNA-Methylierung durch den natürlichen Cofaktor AdoMet (**1**) in eukaryotischen Zellen vor allem an der 5-Position des Cytosins eine bedeutende epigenetische Rolle hat (1.2), soll im Folgenden der Übertragungsmechanismus der Methylgruppe auf das Cytosin durch die DNA-Cytosin-C5-MTase M.HhaI erläutert werden. Für die enzymatische Übertragungsreaktion befindet sich sowohl der Cofaktor als auch die extrahelikale Zielbase innerhalb der Bindungstasche der DNA-MTase. Cytosin wird durch die Thiofunktion eines Cysteinrestes zunächst nukleophil an der 6-Position angegriffen und im weiteren Verlauf wird die Methylgruppe von AdoMet (**1**) durch einen zweiten nukleophilen Angriff auf die 5-Position übertragen. Dabei entsteht AdoHcy (**2**) als Koppelprodukt und durch Deprotonierung des kovalenten Protein-DNA-Intermediats und Abspaltung der DNA-MTase findet anschließend eine Rearomatisierung statt. Dieser Übertragungsmechanismus führt zu der wichtigen fünften epigenetischen Base 5mC, die als mesomeriestabilisiertes Produkt vorliegt (Abbildung 1.7).^[110–112]

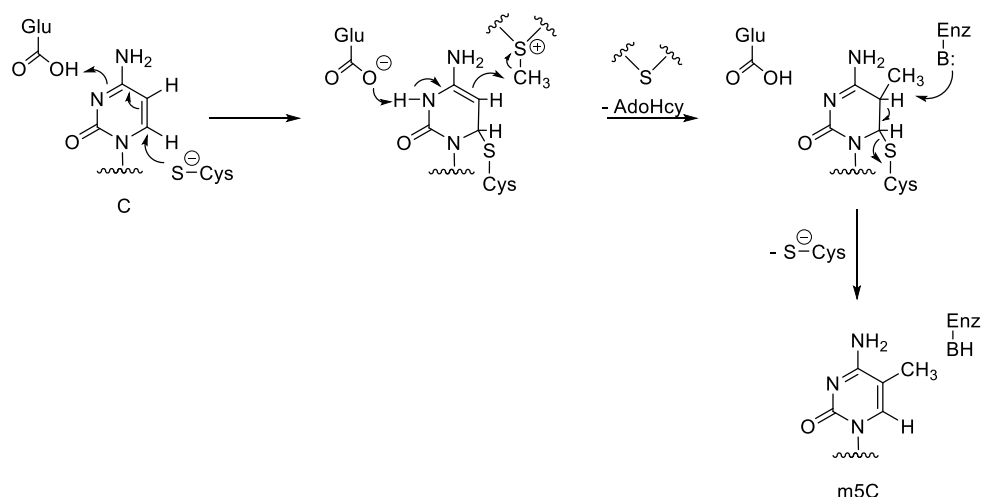


Abbildung 1.7: Katalytischer Mechanismus der Methylierung von Cytosin an der C5-Position durch die DNA-Cytosin-C5-MTase M.HhaI und AdoMet (**1**). Als Koppelprodukt entsteht AdoHcy (**2**). Der Cysteinrest (Cys) und Glutaminsäurerest (Glu) stammen aus der DNA-MTase.

Neben dem natürlichen Prozess der Methylierung zur Regulation verschiedener epigenetischer Prozesse, sind DNA-MTasen in der Lage, auch komplexere Reportergruppen von synthetischen Cofektoranaloga sequenzspezifisch auf die DNA zu übertragen. Hierzu werden Cofektoranaloga synthetisiert, die eine Doppel- oder Dreifachbindung oder ein aromatisches Ringsystem direkt in β -Position zum Sulfoniumzentrum aufweisen. Da sowohl durch das Sulfoniumzentrum als auch durch die ungesättigte Seitenkette des synthetischen Cofektoranalogons die enzymatische Übertragungsreaktion durch DNA-MTasen aktiviert wird, werden diese AdoMet-Analoga als „doppelt-aktivierte“-Cofaktoren bezeichnet.^[113] Die Methode zur sequenzspezifischen Übertragung von längeren Seitenketten auf doppelsträngige DNA wird als *methyltransferase-directed-Transfer of Activated Groups* (mTAG) bezeichnet.^[40,114–116] Dabei wird wie bei AdoMet (**1**) nur die Seitenkette unter Abspaltung von AdoHcy (**2**) auf die DNA übertragen und diese kann somit durch längere Kohlenstoffketten alkyliert werden. Ersetzt man die Methylgruppe jedoch durch gesättigte Seitenketten, wird eine starke Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit beobachtet, die auf ungünstige sterische Effekte im Übergangszustand zurückzuführen ist.^[113,117,118] Die enzymatische Transmethylierungsreaktion läuft über einen S_N2 -Mechanismus ab und es kommt zu einer Umhybridisierung von sp^3 zu sp^2 im Übergangszustand. Durch längere Alkylketten wird das fünffach koordinierte Kohlenstoffatom sterisch gehindert und es kommt zu einer Abnahme der Reaktivität (Abbildung 1.8). Diesem Effekt kann durch den Einbau von ungesättigten Bindungen in β -Position zum Sulfoniumzentrum entgegengewirkt werden. Dabei interagiert das π -Orbital des β -Kohlenstoffs mit dem durch Umhybridisierung entstandenen benachbarten

p-Orbital. Es kommt somit zu einer konjugativen Stabilisierung des Übergangszustands und eine damit verbundene Herabsetzung der Aktivierungsenergie für die nukleophile Substitution. Dies führt zu einem effizienten Transfer der verlängerten Seitenkette auf die DNA (Abbildung 1.8).^[113,115,117]

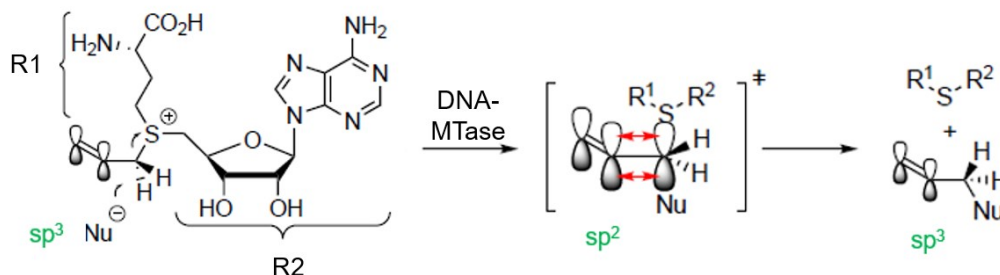
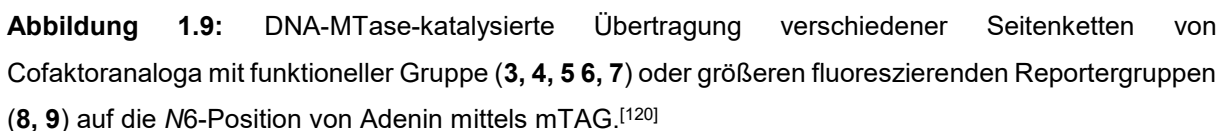


Abbildung 1.8: Konjugative Stabilisierung des Übergangszustandes bei der S_N2 -Reaktion der enzymatischen Transalkylierung durch DNA-MTase und einem doppeltaktivierten Cofaktoranalogen.^[113]

Der strukturelle Aufbau synthetischer Cofaktoraloga hängt von den gewünschten chemischen Eigenschaften ab. Einerseits können AdoMet-Analoga mit reaktiven Endgruppen synthetisiert werden^[114,115,119], die bei der bioorthogonalen Funktionalisierung von DNA in *two-step-labelling*-Reaktionen Anwendung finden.^[115] Hier kommen beispielsweise eine Dreifachbindung (**3**), eine Azid- oder Aminogruppe (**4**, **5**) zum Einsatz, die für nachfolgende Azid-Alkin-Cycloadditionen oder Amino-NHS-Ester-Reaktionen eingesetzt werden können.^[115,120,121] Weiterhin kann eine Doppelbindung (**6**) oder Norborneneinheit (**7**) als reaktive Endgruppe eingebaut werden, die in einer anschließenden Klick-Reaktion mit Tetrazinkonjugaten weiterreagieren kann.^[119,120,122] Andererseits werden Cofaktoraloga entwickelt, die lange Seitenketten mit Reportergruppen, wie beispielsweise Fluorophore (**8**, **9**), aufweisen und die in einstufigen Markierungsverfahren direkt durch DNA-MTasen sequenzspezifisch auf die DNA übertragen werden.^[116,120,123,124] Diese Fluoreszenzmarkierung ist für den Bereich des optischen DNA-Mappings besonders relevant und dient beispielsweise der Einzelmolekülanalyse genomischer DNA zur Ermittlung epigenetischer Modifikationen.^[123,125–127] Abbildung 1.9 zeigt die Übertragung der verschiedenen Seitenketten synthetischer Cofaktoraloga mittels der mTAG Methode für den Einsatz in ein- oder zweistufigen Modifikationsreaktionen.



Das Prinzip der Klick-Chemie wurde erstmals 2001 von K. B. Sharpless publiziert, um Reaktionen zu charakterisieren, die hohe Produktausbeuten erzeugen und nur unbedenkliche Nebenprodukte bilden, die ohne chromatographische Methoden einfach abgetrennt werden können. Zusätzlich muss die Reaktion stereospezifisch sein und unter milden Reaktionsbedingungen selektiv ablaufen. Weiterhin ist die Nutzung von leicht erhältlichen Startmaterialien und die Unempfindlichkeit gegenüber Sauerstoff und Wasser zu bevorzugen. Es sollten nur Lösungsmittel verwendet werden, die einen bequemen Einsatz erlauben (z.B. Wasser), leicht aus dem Reaktionsgemisch entfernbare sind sowie eine einfache Produktisolierung ermöglichen. Beispiele für solche Klick-Reaktionen sind Cycloadditionen ungesättigter Verbindungen, nukleophile Substitutionen und Additionen an Kohlenstoff-Mehrfachbindungen.^[128]

14

einer Azidgruppe und einem terminalen Alkin.^[129] Diese Art der Cycloaddition wies jedoch eine langsame Reaktionsgeschwindigkeit auf und lieferte darüberhinaus ein Produktgemisch, weshalb Cu(I)-katalysierte Azid-Alkin-Cycloadditionen (CuAAC) mit kupferhaltigen Katalysatoren entwickelt wurden.^[130] Aufgrund der Toxizität des kupferhaltigen Katalysators für Bakterien- und Säugetierzellen, ist die CuAAC Klick-Reaktion jedoch nicht für die Untersuchung lebender Systeme geeignet.^[131] Krebs und Wittig veröffentlichten 1961 eine Reaktion zwischen Cyclooctin und Phenylazid, die sehr schnell abläuft und zu einem einzigen Produkt, einem Triazol, führt.^[132] Auf Basis dieser Studien entwickelten Bertozzi *et al.* im Jahre 2004 die erste kupferfreie, ringspannungsinduzierte Azid-Alkin-Cycloaddition (*strain promoted azide-alkyne cycloaddition*, SPAAC). Die hohe Ringspannung des Cyclooctines (18 kcal/mol) ist hier die treibende Kraft der Klick-Reaktion, weshalb sehr hohe Reaktionsgeschwindigkeiten im Vergleich zu ungespannten Alkinen erreicht werden können. Außerdem läuft die Cycloaddition von Aziden und Cyclooctinderivaten leicht unter physiologischen Bedingungen ab und kann ohne Toxizität für die selektive chemische Modifikation in lebenden Organismen verwendet werden.^[131,133,134] Boons *et al.* konnten darüber hinaus die Reaktivität nochmals durch den Einsatz von Dibenzocyclooctinen (DBCO) steigern.^[135] Die SPAAC-Reaktion findet zunehmend Anwendung bei der Fluoreszenzmarkierung von Biomolekülen, indem die funktionalisierte DNA sequenzspezifisch mittels Fluorophoren als Reportergruppen durch Klick-Chemie markiert wird. Beispielsweise wird die SPAAC-Reaktion zur Bestimmung des Hydroxymethylierungsgrades eingesetzt, die für die gegenwärtige epigenetische Forschung sehr bedeutsam ist.^[81,136] Abbildung 1.10 zeigt beispielhaft die zweistufige Markierungsreaktion von 5hmC innerhalb der DNA mittels SPAAC-Klick-Reaktion.

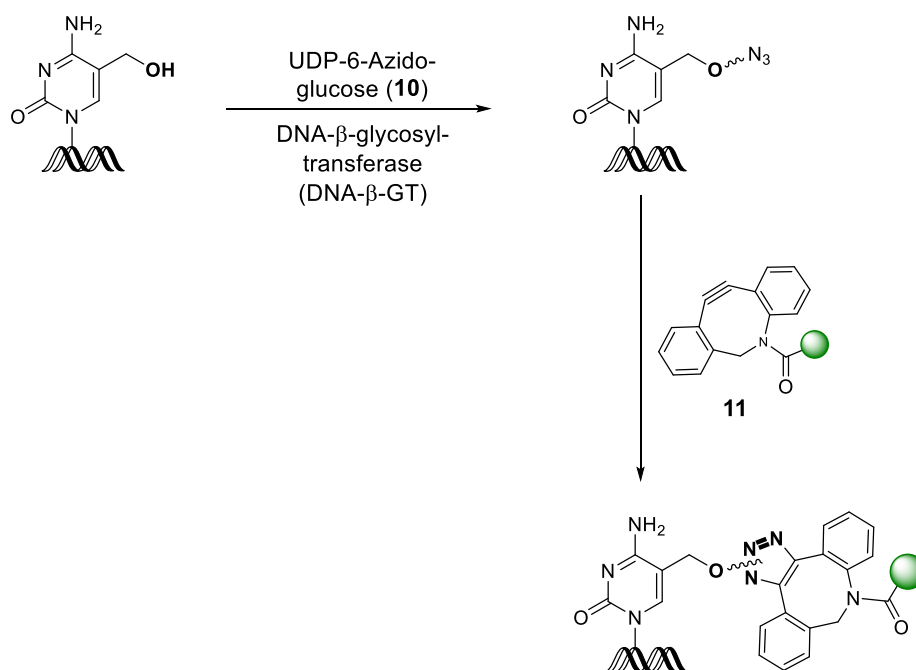


Abbildung 1.10: Darstellung der zweistufigen 5hmC-Markierungsreaktion durch DNA-β-GT und UDP-6-Azidoglucose (**10**) (1. Schritt) und anschließender Klick-Reaktion (SPAAC) mit einem DBCO-Reagenz (**11**) (2. Schritt) zur Fluoreszenzmarkierung von 5hmC in DNA. Der Fluorophor ist als grüne Kugel dargestellt.

Eine weitere Cycloaddition auf Basis gespannter Ringe mit Doppelbindungen und Tetrazinverbindungen stellt die Diels-Alder (DA) Reaktion mit inversem Elektronenbedarf (*inverse electron demand Diels-Alder*, IEDDA) dar, die für bioorthogonale Anwendungen im Jahr 2008 eingeführt wurde.^[137–139] Dabei handelt es sich um eine [4+2]-Cycloaddition zwischen einem elektronenarmen Dien, beispielweise einem Tetrazin, und einem elektronenreichen Dienophil.^[139–142] Abbildung 1.11 zeigt den zugehörigen Reaktionsmechanismus.

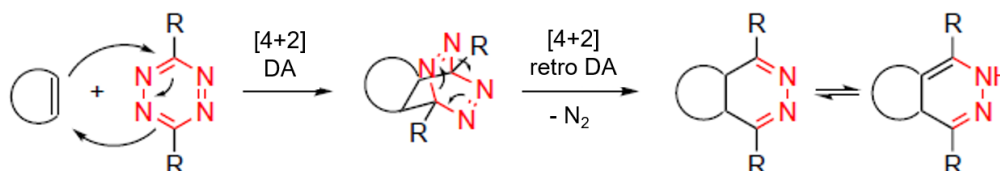


Abbildung 1.11: Mechanismus der Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf (IEDDA) bestehend aus einer [4+2]-DA-Cycloaddition und einer [4+2]-retro-DA-Reaktion unter Freisetzung von Stickstoff.^[140,142]

Diese zur SPAAC orthogonale Klick-Reaktion^[137] ist extrem selektiv, erzielt hohe Reaktionsausbeuten und verläuft im wässrigen Milieu mit hoher Reaktionsgeschwindigkeit, weshalb sie sich ebenfalls optimal zur Fluoreszenzmarkierung von DNA eignet.^[139] Die Markierung durch fluoreszierende Reportergruppen erfolgt dabei analog zur SPAAC-Reaktion in zwei Schritten durch den Einsatz der bereits vorgestellten doppeltaktivierten Cofaktoranaloge mit aromatischer (6) oder gespannter Doppelbindung (7) (1.4). Im ersten Schritt der *two-step labelling* Reaktion wird die Seitenkette des doppeltaktivierten Cofaktoranalogons (Dienophil) durch eine DNA-MTase sequenzspezifisch auf die DNA übertragen. Im zweiten Schritt reagiert die aktivierte Doppelbindung der Cofaktorseitenkette mit einem fluoreszierenden Tetrazinkonjugat (Dien).^[119,122,143,144] Die Reaktionsgeschwindigkeit und Ausbeute hängt dabei vom eingesetzten Dien sowie Dienophil ab. Abbildung 1.12 zeigt die IEDDA-Reaktion mit einer gespannten Noborneneinheit, die eine Geschwindigkeitskonstante von $0,5 - 5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ aufweist und damit 500fach schneller abläuft, als die Reaktion mit einer aromatischen Doppelbindung. Die höchste Reaktionsgeschwindigkeitskonstante ($10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) wird für *trans*-Cyclooctene (TCO) erreicht, wobei diese Verbindungen mit hoher Instabilität verbunden sind. Die Geschwindigkeitskonstanten für die möglichen Tetrazinverbindungen bewegen sich zwischen $0,1 - 1 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und $> 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.^[142]

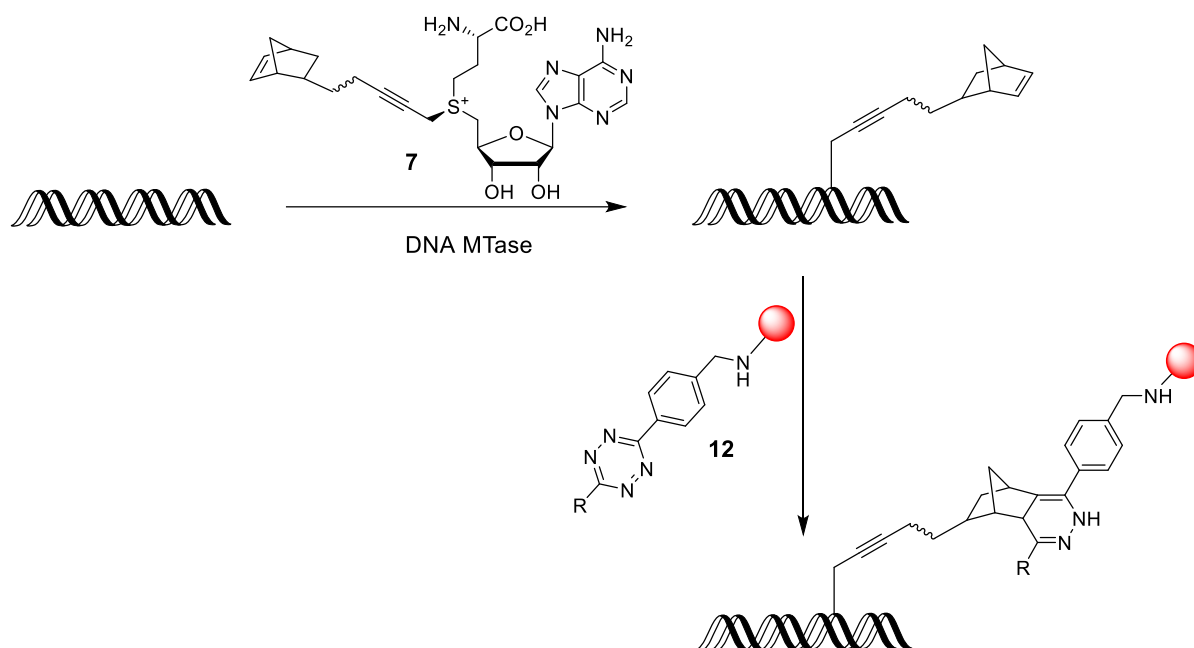


Abbildung 1.12: DNA-Markierung durch IEDDA in zwei Schritten. Die Seitenkette eines Cofaktoranalogs mit gespannter Doppelbindung wird sequenzspezifisch durch DNA-MTasen auf die DNA übertragen (Schritt 1) und anschließend mit fluoreszierenden Tetrazinen (**12**) umgesetzt (2. Schritt). Der Fluorophor ist als rote Kugel dargestellt.

Durch die IEDDA-Klick Reaktion, die eine bioorthogonale Reaktion zur SPAAC-Reaktion darstellt, kann parallel zur Ermittlung des Hydroxymethylierungsgrades der Methylierungsgrad der DNA indirekt über die Markierung der CpG-Sequenzen bestimmt werden. Dazu müssen zwei verschiedene Fluorophore als Reportergruppen zum Einsatz kommen, damit eine gleichzeitige Detektion der beiden epigenetischen Modifikationen 5hmC und 5mC durch Fluoreszenzmikroskopie sowie deren Unterscheidung gewährleistet ist.

2. Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die orthogonale Fluoreszenzmarkierung der beiden epigenetischen Nukleobasen 5mC und 5hmC in einem DNA-Substrat mit zwei unterschiedlichen Fluorophoren verschiedener Absorptions-/Emissionswellenlängen durch *two-step labelling*-Reaktionen (Abbildung 2.1).

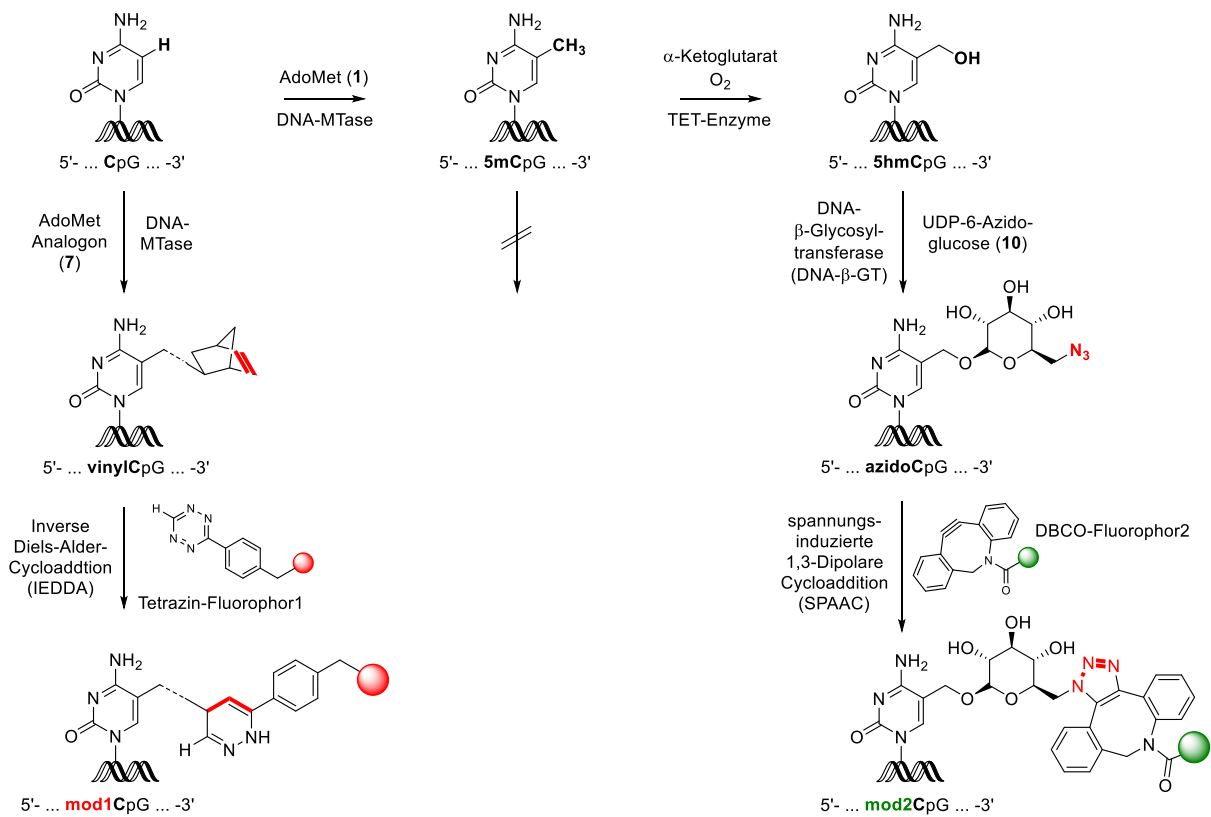


Abbildung 2.1: Bioorthogonale Markierungsreaktion zur parallelen Fluoreszenzanalyse der epigenetischen Modifikationen 5mC und 5hmC auf einem DNA-Substrat in zwei Schritten. CpG-Methylierungsdetektion (indirekt): Die Seitenkette eines vinylischen, doppeltaktivierten AdoMet-Analogons wird sequenzspezifisch mittels CpG-methylierungsabhängiger DNA-MTase auf die DNA übertragen (Schritt 1) und anschließend mit einem fluoreszierenden Tetrazinkonjugat (**13**) umgesetzt (IEDDA) (Schritt 2) (links). Eine Modifikation von methylierten CpG-Sequenzen findet nicht statt (Mitte). Hydroxymethylierungsdetektion (direkt am 5hmC): Markierung der DNA durch DNA- β -GT und UDP-6-Azidoglucose (**10**) (1. Schritt) und anschließender Klick-Reaktion (SPAAC) mit DBCO-PEG_{4-5/6}-TAMRA (**14**) (2. Schritt) (rechts). Die Fluorophore wurden als farbige Kugeln dargestellt.

5mC und 5hmC sind epigenetische Modifikationen im menschlichen Genom, die an der Genregulation beteiligt sind und deren globale Veränderungen bei verschiedenen Tumorarten festgestellt wurden.^[68,86,87,145] Eine parallele Analyse des Gehaltes von 5mC und 5hmC in

verschiedenen Gewebetypen potentieller Krebszellen kann somit als Biomarker für die Früherkennung, die Überwachung des Krankheitsverlaufs und das Ansprechen auf eine Behandlung dienen. Heutige Techniken zur globalen, orthogonalen Quantifizierung von 5mC und 5hmC eignen sich noch nicht für klinische Anwendungen. Aus diesem Grund liegt ein Fokus dieser Arbeit zunächst auf der Synthese neuer Analoga des natürlichen Cofaktors AdoMet (**1**) mit einer endständigen Doppelbindung zur sequenzspezifischen Übertragung durch DNA-MTasen und anschließender Markierungsreaktion durch Fluorophore. Weiterhin soll die enzymatische Aktivität der synthetisierten Cofaktoraloga mit Vinylfunktionalität in Modifikations-/Restriktionstests mit verschiedenen Adenin- und Cytosin-spezifischen DNA-MTasen untersucht werden.

Darauf aufbauend soll die DNA-Methylierung über eine zweistufige Fluoreszenzmarkierung analysiert werden. Diese soll indirekt über die Markierung der unmodifizierten Cytosine erfolgen. Dazu soll im ersten Schritt eine enzymatische Übertragung der vinylischen Cofaktorseitenkette (aromatische oder gespannte Doppelbindung) durch DNA-MTasen mittels der mTAG-Methode (Kapitel 1.4) stattfinden und im zweiten Schritt wird die modifizierte DNA mit verschiedenen fluoreszierenden Tetrazinkonjugaten umgesetzt (**12**) (IEDDA-Klick-Reaktion, Kapitel 1.5) (Abbildung 2.1, links). Durch Differenzbildung der Gesamtmenge an CpG-Sequenzen im untersuchten Genom und der fluoreszenzmarkierten CpG-Sequenzen, soll der Methylierungsgrad bestimmt werden. Die Analyse der fluoreszenzmarkierten DNA soll dabei an immobilisierten und gestreckten DNA-Einzelmolekülen (DNA-*Combing*)^[146] sowohl am institutseigenen Fluoreszenzmikroskop als auch durch einen Kooperationspartner an der Tel Aviv University in Israel stattfinden.

Neben der Quantifizierung von 5mC, soll weiterhin der Gehalt an 5hmC in einer zweistufigen Markierungsreaktion ermittelt werden. Dazu soll eine direkte Fluoreszenzmarkierung am 5hmC erfolgen, indem im ersten Schritt eine enzymatische Modifikation mittels DNA- β -Glycosyltransferase (DNA- β -GT) und dem Cofaktor UDP-6-Azidoglucose (**10**) stattfindet. Die dabei übertragene Azidgruppe soll im zweiten Schritt mit einer gespannten Dreifachbindung eines fluoreszierenden DBCO-Reagenz (**11**) in der zur IEDDA orthogonalen SPAAC-Klick-Reaktion (Kapitel 1.5) reagieren (Abbildung 2.1, rechts).

Zunächst sollen die Reaktionsausbeuten der beiden Einzelmodifikationsreaktionen zur Methylierungs- und Hydroxymethylierungsdetektion bestimmt werden. Dazu soll die Quantifizierung einerseits über eine HPLC-Analyse an einem kurzen Duplex-ODN und andererseits mittels *single-spot*-Analyse am Fluoreszenzmikroskop erfolgen.

Abschließend soll die orthogonale Quantifizierung der beiden epigenetischen Modifikationen 5mC und 5hmC auf einem DNA-Substrat mit zwei unterschiedlichen Fluorophoren zur Ermittlung der epigenetischen Information analysiert werden (Abbildung 2.1), indem die Reaktionsausbeuten ebenfalls mit Hilfe von HPLC an kurzen Duplex-ODN und durch Fluoreszenzmikroskopie bestimmt werden.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Synthesen doppeltaktivierter vinylicher AdoMet-Analoga

Der nachfolgende Abschnitt befasst sich mit der Synthese doppeltaktivierter AdoMet-Analoga, die eine aromatische Vinylmodifikation tragen. Diese werden im weiteren Verlauf für die sequenzspezifische Modifikation von DNA mittels DNA-Methyltransferasen (DNA-MTasen) eingesetzt.^[40,114] Da es sich bei diesen AdoMet-Analoga um Cofaktoren mit endständiger reaktiver Gruppe handelt, werden sie nach der enzymatischen Übertragung zur Funktionalisierung modifizierter DNA für einen zweiten Reaktionsschritt verwendet. Dazu werden fluoreszierende Tetrazinkonjugate mit der sequenzspezifisch übertragenen Vinylmodifikation in einer Diels-Alder Klick-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf (*inverse electron-demand Diels-Alder*, IEDDA) umgesetzt.^[139,140,147]

3.1.1 Synthese AdoVinylBenz (AdoVB) (6)

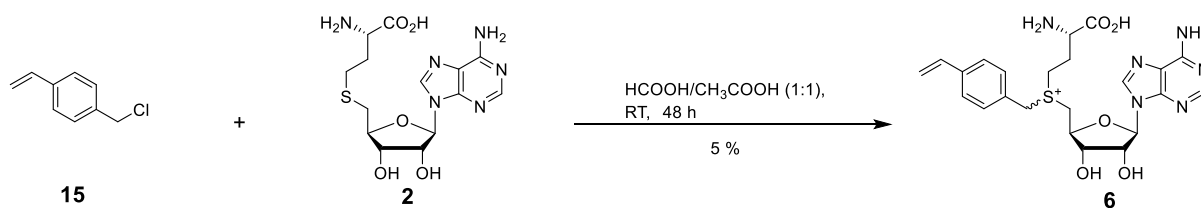


Abbildung 3.1: Synthese des Cofaktoranalogs AdoVB (6) ausgehend von 1-(Chlormethyl)-4-vinylbenzol (15) und AdoHcy (2). Die Gesamtausbeute der Reaktion beträgt 5 %.

Für die Synthese von AdoVB (6) wurde eine Reaktionsvorschrift nach Rentmeister *et al.*^[119] verwendet. Als Ausgangsstoff für die Synthese diente *S*-Adenosyl-L-homocystein (AdoHcy) (2), das mit 1-(Chlormethyl)-4-vinylbenzol (15) umgesetzt wurde. Die Reaktion wurde im sauren Milieu (Ameisensäure/Essigsäure, 1:1) durchgeführt, um die nukleophilen Zentren mit Ausnahme des Schwefels von AdoHcy (2) durch transiente Protonierung zu schützen. Dadurch wird eine regioselektive Alkylierung des Schwefelzentrums gewährleistet. Die Reaktion verlief zwei Tage bei RT und der Reaktionsverlauf wurde durch *rp*-HPLC zum Start und nach 48 h verfolgt (Abbildung 3.2), bevor ein Reaktionsabbruch durch Zugabe von Reinstwasser und eine anschließende Extraktion der wässrigen Phase mit Diethylether (3x, 5 mL) erfolgte. Die entsprechenden HPLC-Analysen der Umsatzverfolgung zur Identifikation des entstandenen

Produktes wurden bei einer Wellenlänge von 260/272 nm aufgezeichnet und sind in Abbildung 3.2 gezeigt.

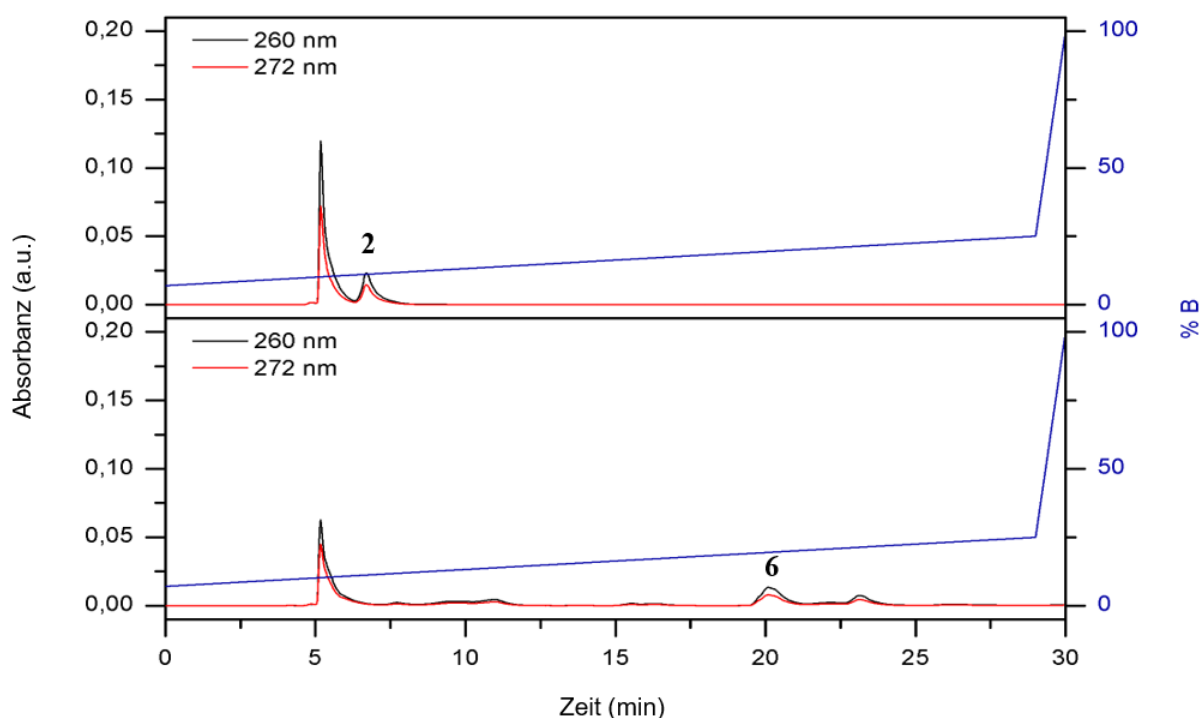


Abbildung 3.2: HPLC-Analyse der Synthese von AdoVB (**6**) nach Reaktionsstart (0 h, oben) und Reaktionsende (48 h, unten).

Zu Reaktionsbeginn wurde nur das Signal des Eduktes AdoHcy (**2**) bei einer Retentionszeit von ca. 7 min detektiert. Nach Ablauf der Reaktion (48 h) war ein Signal für das neu entstandene Produkt AdoVB (**6**) bei einer Retentionszeit von ca. 20 min sichtbar, während das Signal des Eduktes deutlich kleiner wurde. Die Zielverbindung **6** konnte anschließend mittels präparativer *rp*-HPLC isoliert und aufgereinigt werden. Die ermittelte Gesamtausbeute der Reaktion betrug 5 %. Nach der Aufreinigung wurde das neue AdoMet-Analogon an der Gefriertrocknungsanlage eingengt und in wässriger Lösung (0,01 % TFA) bei -20 °C gelagert. Die Reinheit des synthetisierten Produktes wurde im Anschluss zusätzlich durch eine Einzelinjektion mittels *rp*-HPLC verifiziert und das Chromatogramm ist dem Anhang zu entnehmen (Abbildung A2). Die eindeutige Charakterisierung des gewünschten Produktes erfolgte auf Basis eines ESI-MS Spektrums, welches ebenfalls im Anhang (Abbildung A1) aufgeführt ist. Weiterhin wurde die Aktivität des AdoMet-Analogons mit aromatischer Vinylmodifikation mit verschiedenen DNA-MTase in Modifikations-Restriktionstests (3.2)

untersucht. Dabei wurden sowohl die DNA-Adenin-*N*6-MTasen M.TaqI und M.BseCI als auch die DNA Cytosin-*C*5 MTasen M.SssI (dm), M.MpeI (dm) und M.HhaI (tm) überprüft.

3.1.2 Synthese AdoYnVinylBenz (AdoYnVB) (kurz (16) /lang (17))

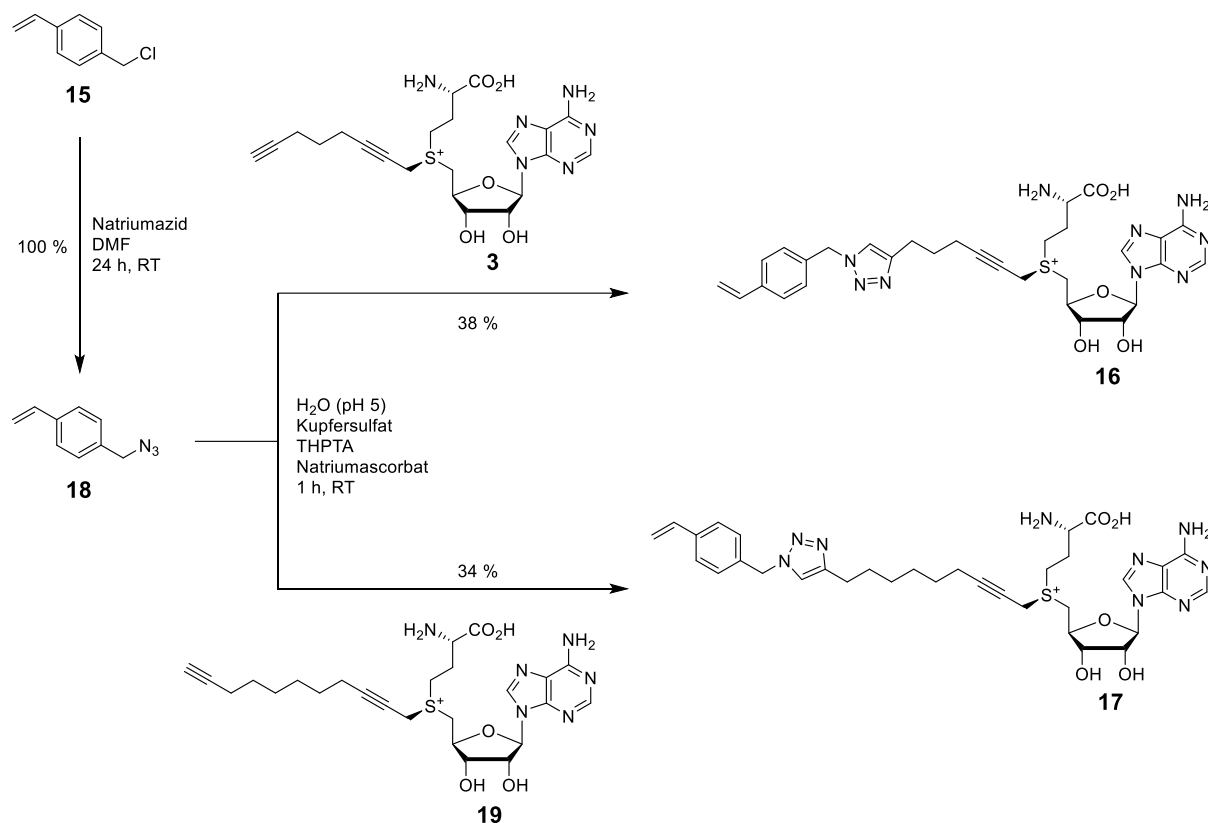


Abbildung 3.3: Synthese der Cofaktoranaloga AdoYnVB (kurz) (16) oder (lang) (17) ausgehend von 1-(Chlormethyl)-4-vinylbenzol (15) und AdoYnYn (kurz) (3) oder (lang) (19). Die Gesamtausbeute der Reaktionen beträgt 38 % für AdoYnVB (kurz) (16) und 34 % für AdoYnVB (lang) (17).

Angelehnt an die Reaktionsvorschrift nach Stansbury *et al.*^[148] wurde 1-(Chlormethyl)-4-vinylbenzol (15) mit Natriumazid zu 1-(Azidomethyl)-4-vinylbenzol (18) substituiert. Die Reaktion wurde 24 h bei RT gerührt, bevor ein Reaktionsabbruch durch Zugabe von Reinstwasser und eine Extraktion der organischen Phase mit Diethylether (3x, 50 mL) erfolgte. Die vereinigten organischen Phasen wurden weiterhin dreimal mit Reinstwasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach der Entfernung des vorhandenen Lösungsmittels unter Vakuum wurde eine leicht gelbliche, ölige Flüssigkeit als Produkt erhalten. Die Vollständigkeit der Substitution wurde durch ¹H-NMR-Spektroskopie (300 MHz) eindeutig bestätigt und die Ausbeute betrug 96 %. Die entsprechenden ¹H-NMR-Spektren von Produkt und Edukt sind dem Anhang (Abbildung A3 und A4) zu entnehmen. Das Produkt (18) wurde zur weiteren

Synthese in einer kupferkatalysierten Azid-Alkin-[3+2]-Cycloaddition (CuAAC)^[128,130,149,150] mit den AdoMet-Cofaktoranaloga AdoYnYn (kurz) (**3**) und AdoYnYn (lang) (**19**) umgesetzt. Diese Cofaktoranaloga wurden arbeitskreisintern von Dr. Felix Schilcher synthetisiert und weisen in ihrer chemischen Struktur eine terminale Alkinfunktion auf. AdoYnYn (kurz) (**3**) ist eine literaturbekannte Verbindung^[115], wohingegen AdoYnYn (lang) (**19**) eine neue Variante darstellt, bei der die Kohlenstoffkette um drei Kohlenstoffatome verlängert und somit die Entfernung zwischen terminaler Alkingruppe und Sulfoniumzentrum erhöht wurde. Da bei der CuAAC ein sterisch anspruchsvoller Triazolring entsteht, diente die Verlängerung der Kohlenstoffkette ebenfalls zur Erhöhung des Abstandes zum reaktiven Zentrum im DNA-MTase gebundenen Übergangszustand. Die entstandenen Produkte AdoYnVB (kurz) (**16**) und AdoYnVB (lang) (**17**) zählen durch die Dreifachbindung in β -Position zum Sulfoniumzentrum zu den doppeltaktivierten Cofaktoren, für die die Reaktivität mit DNA-MTasen durch einen sp^2 -hybridisierten Übergangszustand der S_N2 -Reaktion erhöht wird. Dies hat auch zur Folge, dass der Zerfall durch intramolekulare Substitution durch die Carboxylatfunktion am γ -C-Atom und Bildung des Thioethers gegenüber AdoMet begünstigt ist. Daher wurde zur Minimierung des Zerfalls zum Thioether die kupferkatalysierte Klick-Reaktion im leicht sauren Milieu durchgeführt. Die Reaktion verlief eine Stunde bei RT und wurde durch *rp*-HPLC verfolgt (Abbildung 3.4 und 3.5). Die entsprechenden HPLC-Analysen der Umsatzverfolgung zur Identifikation der entstandenen Produkte wurden bei einer Wellenlänge von 260/272 nm aufgezeichnet und sind in Abbildung 3.4 und 3.5 gezeigt.

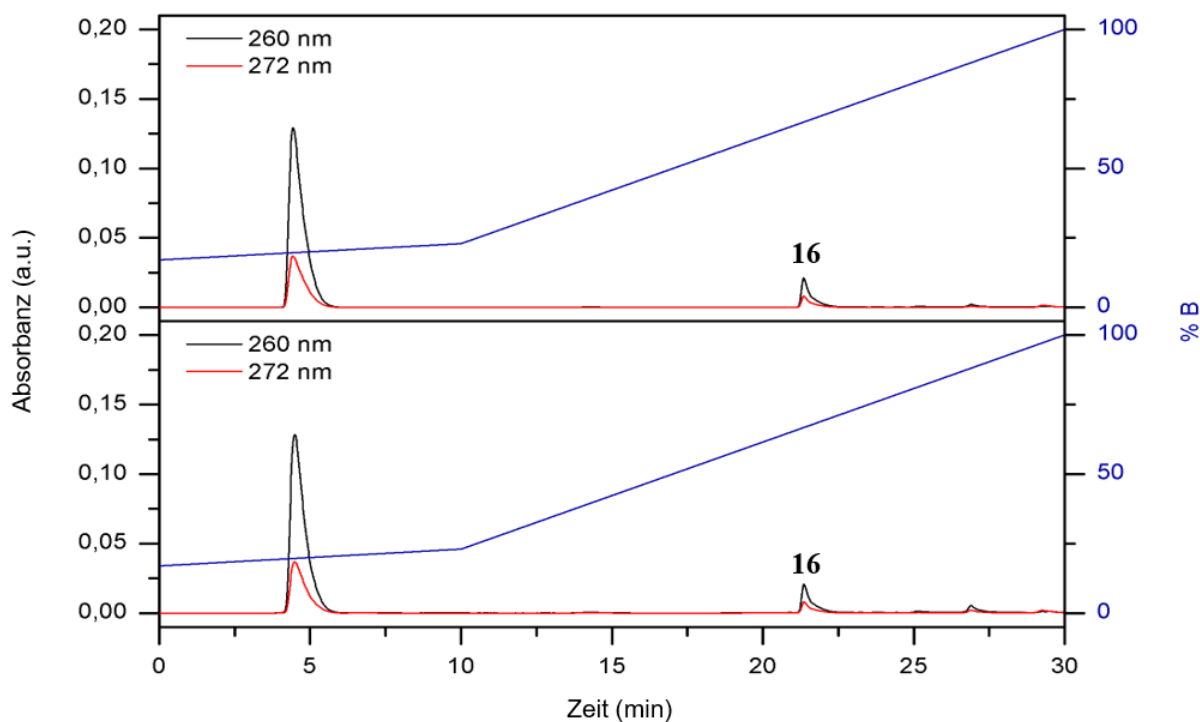


Abbildung 3.4: HPLC-Analyse der Synthese von AdoYnVB (kurz) (**16**) nach Reaktionsstart (0 h, oben) und nach 1 h Reaktionszeit (unten).

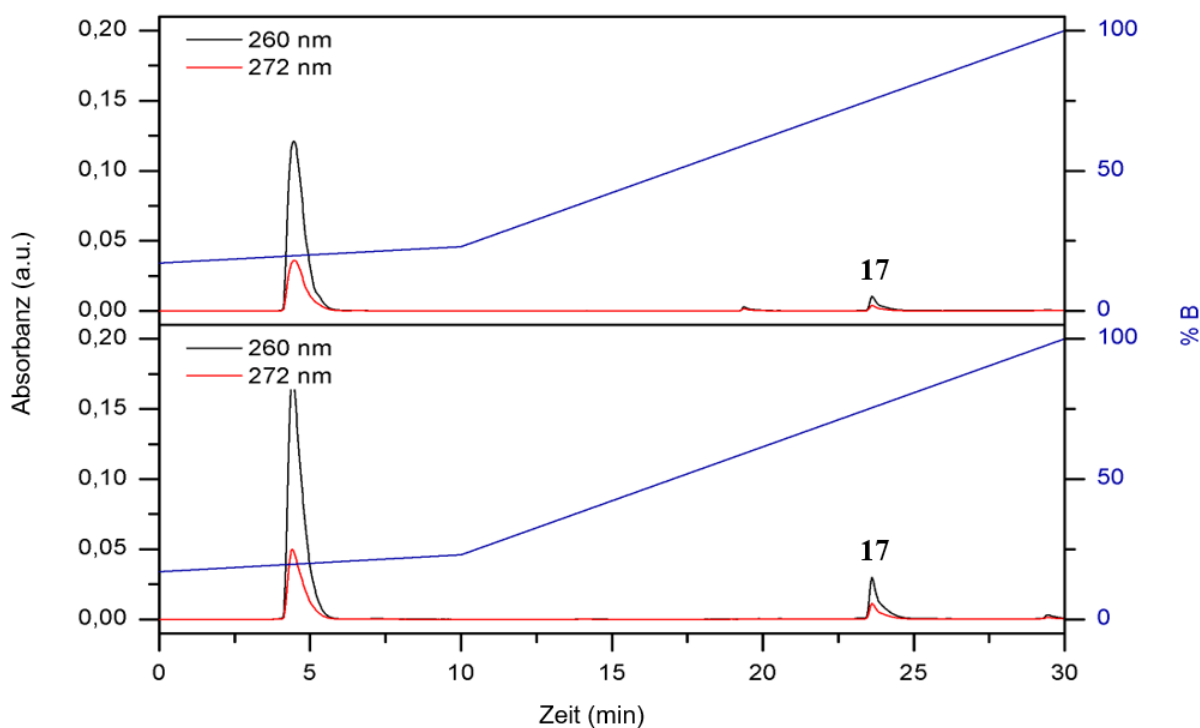


Abbildung 3.5: HPLC-Analyse der Synthese von AdoYnVB (lang) (**17**) nach Reaktionsstart (0 h, oben) und nach 1 h Reaktionszeit (unten).

In allen Chromatogrammen wurde ein eindeutiges Signal bei einer Retentionszeit von 4 min detektiert, welches dem gebildeten THPTA-Kupferkomplex durch vorangegangene Vergleichschromatogramme zugeordnet werden kann. Außerdem konnten bei Reaktionsstart (0 h) keine Signale für die eingesetzten Edukte AdoYnYn (kurz) (**3**) und AdoYnYn (lang) (**19**) beobachtet werden, was mit der Komplexierung durch das katalytische Kupfer(II) erklärt werden kann. Da weiterhin bereits zu Beginn der Reaktion die Signale für die gewünschten Produkte bei $t_R = 21,5$ min und $t_R = 23,5$ min zu erkennen waren und sich dies für AdoYnVB (kurz) (**16**) über den gesamten Reaktionszeitraum auch nicht mehr maßgeblich veränderte, konnte gezeigt werden, dass die Reaktionen sehr schnell und innerhalb einer Stunde ablaufen. Die Zielverbindungen **16**, **17** konnten anschließend mittels präparativer *rp*-HPLC isoliert und aufgereinigt werden. Die ermittelten Gesamtausbeuten der Reaktionen betrugen 38 % für AdoYnVB (kurz) (**16**) und 34 % für AdoYnVB (lang) (**17**). Nach der Aufreinigung wurden die neuen AdoMet-Analoga durch Gefriertrocknung eingeengt und in wässriger Lösung (0,01 % TFA) bei -20 °C gelagert. Die Reinheit der synthetisierten Produkte wurde im Anschluss durch eine Coinjektion mit dem kürzeren vinylischen AdoMet-Analogen AdoVB (**6**) mittels *rp*-HPLC verifiziert. Das Chromatogramm ist im Anhang gezeigt (Abbildung A7). Die eindeutige Charakterisierung der gewünschten Produkte erfolgte auf Basis von ESI-MS-Spektren, welche ebenfalls im Anhang aufgeführt sind (Abbildung A5 und A6). Weiterhin erfolgte eine Untersuchung der reaktiven AdoMet-Analoga mit aromatischer Vinylmodifikation hinsichtlich ihrer Aktivität in DNA-MTase katalysierten enzymatischen Modifikationsreaktionen durch Modifikations-Restriktionstests (3.2). Dabei wurden sowohl die DNA-Adenin-*N*6-MTasen M.TaqI und M.BseCI als auch die DNA Cytosin-*C*5-MTasen M.SssI (dm), M.MpeI (dm) und M.HhaI (tm) überprüft.

Neben den drei reaktiven AdoMet-Cofaktoranaloga mit aromatischer Vinylfunktionalität wurde der Cofaktor AdoYnNorbornen (AdoYnNorb) (**7**) von Leonie Schütz im Arbeitskreis synthetisiert^[151] und für verschiedene Experimente dieser Arbeit zur Verfügung gestellt. AdoYnNorb (**7**) weist in der chemischen Struktur eine gespannte Doppelbindung auf (Abbildung 3.6), wodurch eine Reaktivitätssteigerung in der anschließenden IEDDA-Klick-Reaktion, verglichen mit den drei aromatischen vinylischen Cofaktoranaloga, erreicht werden soll.^[142] AdoYnNorb (**7**) wurde somit in den nachfolgenden Experimenten ebenfalls berücksichtigt.

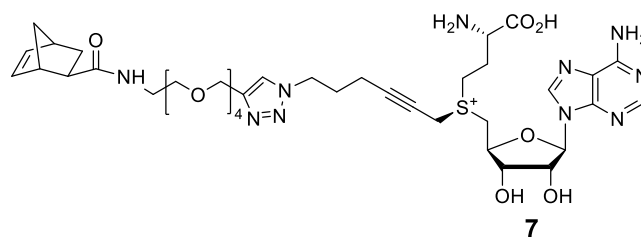


Abbildung 3.6: Chemische Struktur des Cofaktoranalogs AdoYnNorb (**7**) zur Übertragung einer gespannten Doppelbindung.

3.2 Aktivität doppeltaktivierter AdoMet-Analoga

Nach erfolgreicher Synthese der AdoMet-Cofaktoranaloga (**6**, **16**, **17**), wurde zunächst ihre Aktivität mit spezifischen DNA-MTasen in DNA-Modifikationsreaktionen überprüft. Dazu wurden sogenannte Modifikations-Restriktions-Tests, im Folgenden auch als Aktivitätstests bezeichnet, durchgeführt. Diese bestehen aus zwei enzymatischen Reaktionen, einer Modifikation und einer Restriktion. Im ersten Schritt wird ein DNA-Substrat unter Verwendung einer spezifischen DNA-MTase und eines reaktiven Cofaktor-Analogons sequenz- und regiospezifisch modifiziert. Im zweiten Schritt wird eine Restriktionsendonuklease (REase), hauptsächlich kognate REasen des Typs II, hinzugefügt, die im Bezug zur eingesetzten DNA-MTase eine identische Erkennungssequenz aufweist. Bei diesen Aktivitätstests wird die Methylierungssensitivität der REasen genutzt. Befindet sich eine Methylierung oder andere DNA-Modifikation an der Zielposition innerhalb der spezifischen Erkennungssequenz der eingesetzten REase, so ist diese nicht mehr in der Lage, das DNA-Substrat an den entsprechenden Stellen zu fragmentieren und die DNA wird vollständig geschützt.^[30,152] Die nachfolgende Abbildung 3.7 zeigt schematisch den Ablauf eines solchen Modifikations-Restriktions-Tests.

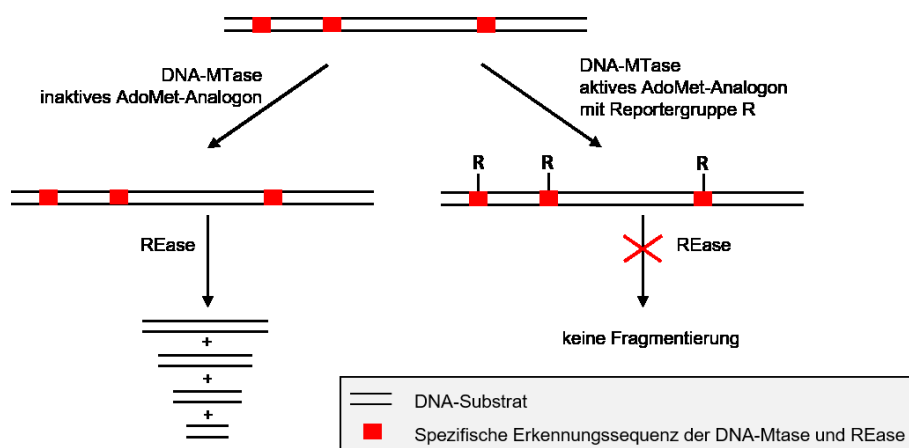


Abbildung 3.7: Schematische Darstellung eines Modifikations-Restriktions-Tests.

Wie Abbildung 3.7 zeigt, findet bei Verwendung eines inaktiven AdoMet-Analogons mit der DNA-MTase keine Modifikationsreaktion statt, während die Erkennungssequenzen der DNA-MTase innerhalb des DNA-Substrates bei Einsatz eines aktiven AdoMet-Analogons modifiziert werden. Bei Zugabe der entsprechenden REase erfolgt beim inaktiven Analogon eine Hydrolyse innerhalb der Erkennungssequenzen. Bei einer erfolgreichen Modifikation mit Reportergruppen des aktiven Analogons kann jedoch keine Fragmentierung durch die REase an den Erkennungssequenzen stattfinden. Die Vollständigkeit dieses Effektes lässt sich durch eine Agarosegel-Elektrophorese überprüfen. Wird nur eine Bande im Agarosegel beobachtet, kann diese dem ursprünglich eingesetzten DNA-Substrat zugeordnet werden. Die Modifikation war erfolgreich und die DNA ist vollständig geschützt. Für diesen Fall kann im Anschluss die *Turnover Number* (TON) der eingesetzten DNA-MTase abgeschätzt werden. Die TON beschreibt die Anzahl an reaktiven Cofaktoren, die pro Stunde und pro aktivem Zentrum der DNA-MTase umgesetzt werden können.^[153] Ein Fragmentierungsmuster des Substrats innerhalb des Gels deutet hingegen auf eine unvollständige Modifikation hin. Entsprechen die beobachteten Banden sogar dem Fragmentierungsmuster, das bei vollständiger Hydrolyse durch die eingesetzte REase erwartet wird, hat überhaupt keine Modifikation stattgefunden.

3.2.1 Modifikations-/Restriktionstests mit den DNA-Adenin-N6-MTasen M.TaqI und M.BseCI

M.TaqI (5'-TCGA-3')

Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität der DNA-Adenin-N6-MTase M.TaqI (5'-TCGA-3')^[154] erfolgte mit den vinylischen Cofaktor-Analoga AdoVB (6), AdoYnVB

(kurz) (**16**), AdoYnVB (lang) (**17**) und AdoYnNorb (**7**). Da diese Cofaktoren später für eine *two-step labelling*-Reaktion eingesetzt werden, muss der erste Modifikationsschritt vollständig ablaufen, damit auch die Gesamtreaktion vollständig verlaufen kann. Aus diesem Grund wurden die Aktivitäten von MTaqI mit diesen Cofaktoren und T7-Phagen-DNA (39936 Bp) hinsichtlich der Vollständigkeit der Modifikation untersucht und die erhaltenen TON untereinander verglichen, wobei T7-Phagen-DNA 111 TCGA-Erkennungssequenzen besitzt. Die DNA-MTase M.TaqI ist eine CpG-methylierungsabhängige DNA-MTase, da sie das Zieladenin nicht modifizieren kann, wenn Cytosin innerhalb der TCGA-Erkennungssequenz als 5-Methylcytosin vorliegt. Somit kann diese Adenin-spezifische DNA-MTase auch zur Ermittlung der CpG-Methylierung genutzt werden, die in der epigenetischen Forschung sehr bedeutsam ist.^[108]

In der anschließenden Restriktionsreaktion wurde die zugehörige kognate REase TypII R.TaqI (5'-T⁺CGA-3')^[152,155] eingesetzt. Sie besitzt dieselben 111 TCGA-Erkennungssequenzen auf T7-Phagen-DNA. Die Reaktionszeit für Modifikation sowie Restriktion betrug jeweils 1 h und wurde aufgrund des thermophilen Charakters von M.TaqI und R.TaqI bei 65 °C durchgeführt. Die Konzentrationen der eingesetzten AdoMet-Cofaktoranaloga betrug 80 µM, die höchste eingesetzte M.TaqI-Konzentration 0,21 µM, welche bezogen auf die TCGA-Erkennungssequenzen 1 Äq. entspricht. Die nachfolgenden Abbildungen 3.8 und 3.9 zeigen die gelelektrophoretischen Analysen der Cofaktoranaloga AdoVB (**6**), AdoYnVB (kurz) (**16**), AdoYnVB (lang) (**17**) und AdoYnNorb (**7**) für die enzymatische Übertragungsreaktion mit M.TaqI.

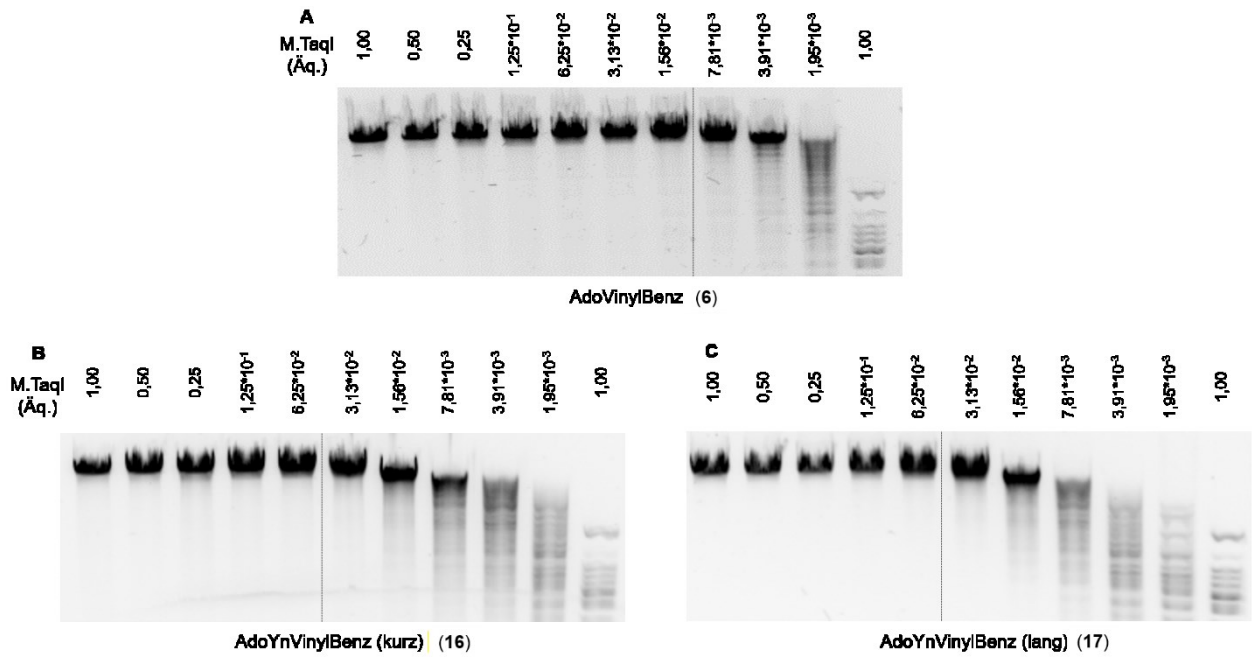


Abbildung 3.8: Gelelektrophoretische Analyse der Aktivität von M.TaqI mit AdoVB (6) (A), AdoYnVB (kurz) (16) (B), AdoYnVB (lang) (17) (C). Die Konzentrationen von T7-DNA und des Cofaktoranalogs (80 μ M) sind in jeder Spur konstant, wohingegen sich die Konzentration von M.TaqI ausgehend von 0,21 μ M (1 Äq.) von Spur zu Spur halbiert. Fragmentiert wurde mit R.TaqI (10 U/ μ g DNA). Letzte Spur: Kontrolle mit 1 Äq. M.TaqI, ohne Cofaktoranalogon. Die gestrichelte Linie zeigt die Grenzkonzentration von M.TaqI bei der die T7-DNA noch vollständig geschützt wird. Die Aktivität von M.TaqI mit AdoVB (6) (kürzeste Seitenkette, TON = 64 h⁻¹) ist höher als die Aktivitäten mit den Cofaktoren AdoYnVB (kurz/lang (16, 17), TON = 16 h⁻¹).

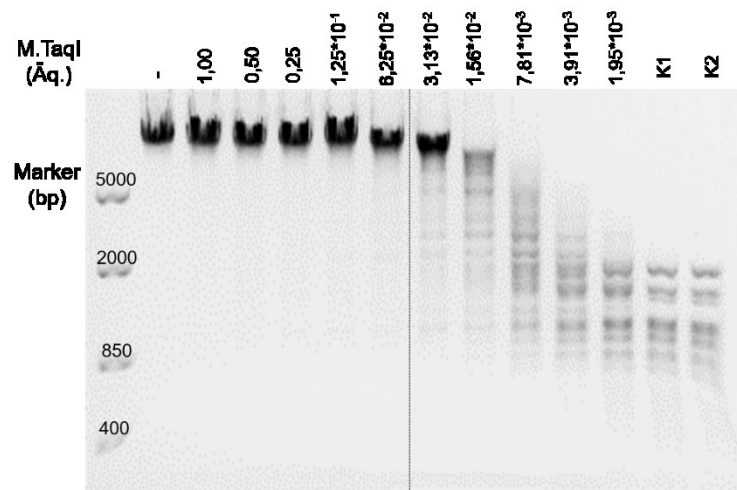


Abbildung 3.9: Gelelektrophoretische Analyse der Aktivität von M.TaqI mit AdoYnNorb (**7**). Die Konzentrationen von T7-DNA und des Cofaktoranalogs (80 μM) sind in jeder Spur konstant, wohingegen sich die Konzentration von M.TaqI ausgehend von 0,21 μM (1 Äq.) von Spur zu Spur halbiert. Fragmentiert wurde mit R.TaqI (10 U/ μg DNA). Erste Spur: DNA-Marker (MR); zweite Spur: T7-DNA-Referenz (100 ng) unverdaut ohne Cofaktor und DNA-MTase; K1: Kontrolle mit 1 Äq. M.TaqI, ohne Cofaktoranalogen; K1: Kontrolle ohne DNA-MTase mit Cofaktoranalogen. Die gestrichelte Linie zeigt die Grenzkonzentration von M.TaqI bei der die T7-DNA noch vollständig geschützt wird. Die Aktivität für AdoYnNorb (**7**) (gespannte Doppelbindung, $\text{TON} = 16 \text{ h}^{-1}$) liegt im Bereich der oben gezeigten beiden Cofaktoranaloga AdoYnVB (kurz/lang, **16**, **17**) mit aromatischer Vinylmodifikation.

Vergleicht man die enzymatische Aktivität von M.TaqI mit den Cofaktoranaloga mit aromatischer Vinylmodifikation (Abbildung 3.8), zeigt sich, dass AdoVB (**6**) die höchste Aktivität mit einer $\text{TON} = 64 \text{ h}^{-1}$ aufweist. AdoYnVB (kurz) (**16**) und AdoYnVB (lang) (**17**) unterscheiden sich in ihrer chemischen Struktur nur in der Linkerlänge. Der dadurch erhöhte Abstand der Modifikation zum reaktiven Zentrum scheint keinen signifikanten Einfluss auf die Übertragungsreaktion mit M.TaqI zu haben, da für beide Cofaktoren eine identische Aktivität mit einer $\text{TON} = 16 \text{ h}^{-1}$ erreicht werden konnte. Die drei Cofaktoranaloga unterscheiden sich in der funktionellen Gruppe für die Doppelaktivierung. AdoVB (**6**) besitzt ein aromatisches Ringsystem in β -Position zum Sulfoniumzentrum, welches den Übergangszustand der S_N^2 -Übertragungsreaktion für M.TaqI scheinbar besser stabilisiert als die Dreifachbindungen von AdoYnVB (kurz/lang, **16**, **17**) und somit zu einer vierfach höheren Aktivität führt. AdoYnNorb (**7**) weist strukturell eine gespannte Doppelbindung auf und besitzt ebenfalls eine Dreifachbindung in β -Position zum Sulfoniumzentrum. Auch hier wird eine enzymatische Aktivität (Abbildung 3.9) mit einer TON von 16 h^{-1} , beobachtet, wie zuvor für AdoYnVB (kurz/lang) (**16**, **17**). Generell zeigt M.TaqI gute Aktivitäten sowohl für kürzere

Cofektoranaloga, als auch für solche, die größere und sterisch anspruchsvollere Seitenketten tragen. Allerdings ist M.TaqI mit dem natürlichen Cofaktor AdoMet (**1**) deutlich aktiver und zeigt eine TON von 1024 h^{-1} .^[156] Betrachtet man die Kristallstruktur des Komplexes von M.TaqI mit DNA und Cofektoranalogon, lässt sich dies damit erklären, dass die jeweilige Seitenkette aus dem aktiven Zentrum des Enzyms herausragt.^[157] Alle untersuchten Cofektoranaloga mit Vinylfunktionalität eignen sich sehr gut zur Anwendung in Modifikationsreaktionen mit der DNA-MTase M.TaqI und damit für die späteren *two-step labelling*-Reaktionen. Da die Modifikation für 1 Äq. M.TaqI mit allen Cofaktoren vollständig abläuft, können sie für eine anschließende Klick-Reaktion zur Fluoreszenzmarkierung eingesetzt werden.

Neben den *two-step labelling*-Reaktionen wurden im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls DNA-MTasen katalysierte einstufige DNA-Modifikationsreaktionen zur Fluoreszenzmarkierung durchgeführt. Dazu wird ein fluoreszierendes Reportermolekül innerhalb der Seitenkette des AdoMet-Analogons sequenzspezifisch direkt auf das DNA-Substrat übertragen. Aus diesem Grund wurden ebenfalls die Aktivitäten für die DNA-MTase M.TaqI mit den fluoreszierenden Cofektoranaloga AdoYnTAMRA (**8**) und AdoYnCF640R (**20**) bestimmt, die alle arbeitskreisintern von Polina Aseeva und Sascha Peters synthetisiert wurden. Die zugehörigen gelelektrophoretischen Analysen sowie die TON sind dem Anhang zu entnehmen (Abbildungen A8 – A9).

M.BseCI (5'-ATCGAT-3')

Zur Ermittlung der enzymatischen Aktivität der DNA-Adenin-N6-MTase M.BseCI (5'-ATCGAT-3')^[45] mit den vinylischen Cofaktor-Analoga AdoVB (**6**), AdoYnVB (kurz) (**16**), AdoYnVB (lang) (**17**) und AdoYnNorb (**7**) wurde ein Modifikations-/Restriktionstest durchgeführt. Da diese Cofaktoren später für eine *two-step labelling*-Reaktion eingesetzt werden, muss der erste Modifikationsschritt vollständig ablaufen, damit auch die Gesamtreaktion vollständig verlaufen kann. Aus diesem Grund wurden die Aktivitäten der DNA-MTase mit diesen Cofaktoren und T7-Phagen-DNA (39936 Bp) hinsichtlich der Vollständigkeit der Modifikation untersucht und die erhaltenen TON untereinander verglichen. Die T7-Phagen-DNA besitzt dabei lediglich drei spezifische ATCGAT-Erkennungssequenzen und kann deshalb aufgrund der geringen Markierungsdichte zur Ermittlung der Reaktionsausbeute für *two-step labelling*-Reaktionen durch Fluoreszenzmikroskopie verwendet werden. Die DNA-MTase M.BseCI ist im Gegensatz zu M.TaqI nicht CpG-

methylierungssensitiv, da sie das Zieladenin auch dann modifizieren kann, wenn das Cytosin innerhalb der ATCGAT-Erkennungssequenz als 5-Methylcytosin vorliegt. In der anschließenden Restriktionsreaktion wurde die zugehörige kognate REase TypII R.ClaI (5'-AT⁺CGAT-3')^[154,158] eingesetzt, die Adenin-modifizierte ATCGAT-Erkennungssequenzen nicht fragmentieren kann. Die Reaktionszeit für Modifikation sowie Restriktion betrug jeweils 1 h und wurde bei 55 °C bzw. 37 °C durchgeführt. Die Konzentrationen der eingesetzten reaktiven AdoMet-Cofaktoranaloga betrug 80 µM. Die höchste eingesetzte M.BseCI-Konzentration 58 nM, welche bezogen auf die ATCGAT-Erkennungssequenzen 10 Äq. entspricht. Die nachfolgenden Abbildungen 3.10 und 3.11 zeigen die gelelektrophoretischen Analysen der enzymatischen Übertragungsreaktionen mit den Cofaktoranaloga AdoVB (6), AdoYnVB (kurz) (16), AdoYnVB (lang) (17) und AdoYnNorb (7) und M.BseCI.

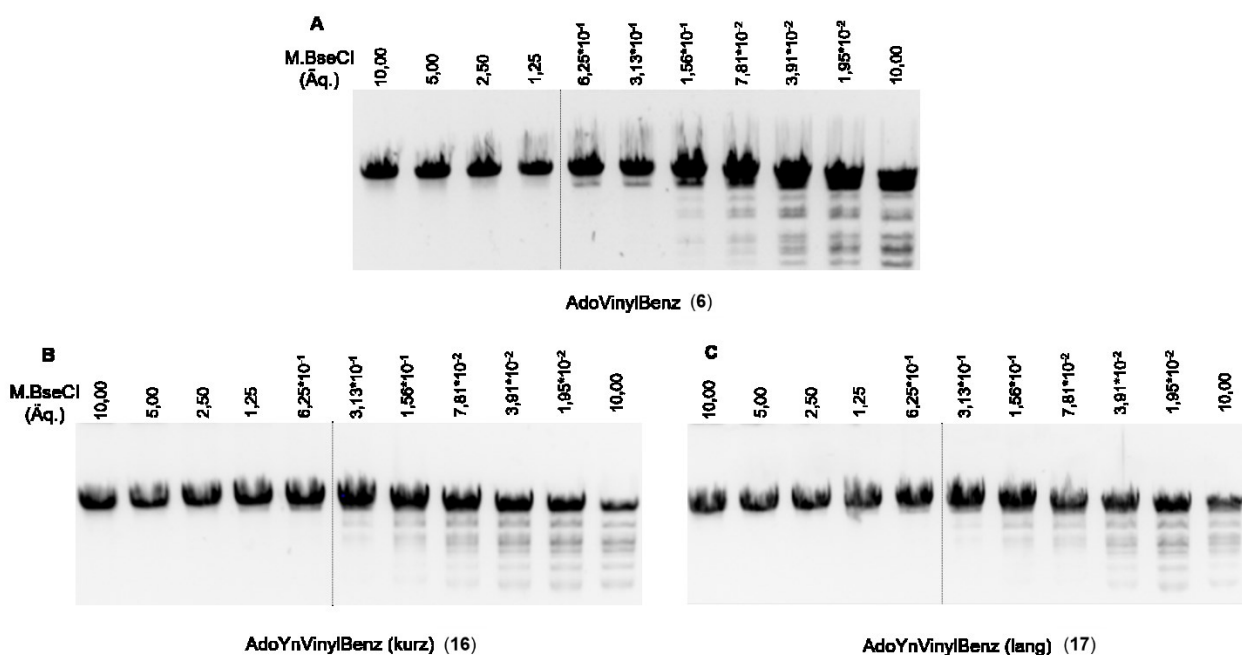


Abbildung 3.10: Gelelektrophoretische Analyse der Aktivität von M.BseCI mit AdoVB (6) (A), AdoYnVB (kurz) (16) (B), AdoYnVB (17) (C). Die Konzentrationen von T7-DNA und des Cofaktoranalogs (80 µM) sind in jeder Spur gleich, wohingegen sich die Konzentration von M.BseCI ausgehend von 58 nM (10 Äq.) von Spur zu Spur halbiert. Fragmentiert wurde mit R.ClaI (10 U/µg DNA). Letzte Spur: Kontrolle mit 10 Äq. M.BseCI, ohne Cofaktoranalogen. Die gestrichelte Linie zeigt die Grenzkonzentration von M.BseCI, bei der die T7-DNA noch vollständig geschützt vorliegt. Die Aktivität von M.BseCI mit AdoVB (6) (TON = 0,8 h⁻¹) ist niedriger als die Aktivitäten mit den Cofaktoren AdoYnVB (kurz/lang (16, 17), TON = 1,6 h⁻¹).

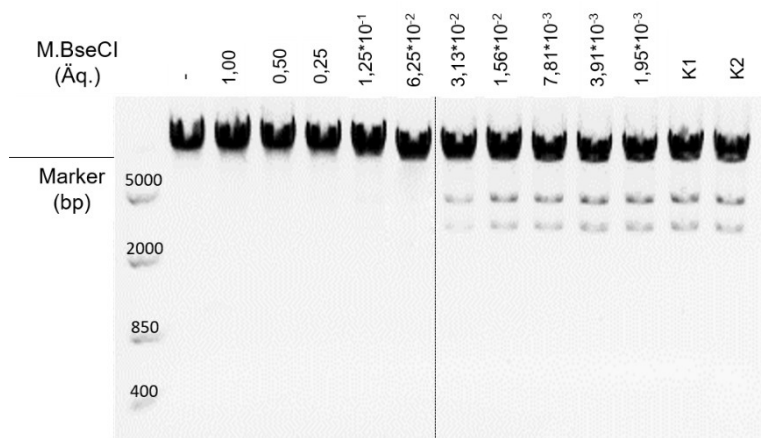


Abbildung 3.11: Gelelektrophoretische Analyse der Aktivität von M.BseCI mit AdoYnNorb (**7**). Die Konzentrationen von T7-DNA und des Cofaktoranalogs (80 μ M) sind in jeder Spur gleich, wohingegen die Konzentration von M.BseCI von Spur zu Spur ausgehend von 58 nM (10 Äq.) halbiert wird. Fragmentiert wurde mit R.ClaI (10 U/ μ g DNA). Erste Spur: DNA-Marker (MR); zweite Spur: T7-DNA-Referenz (100 ng) unverdaut ohne Cofaktor und MTase; K1: Kontrolle mit 10 Äq. M.BseCI, ohne Cofaktoranalogen; K2: Kontrolle ohne DNA-MTase mit Cofaktoranalogen. Die gestrichelte Linie zeigt die Grenzkonzentration von M.BseCI, bei der die T7-DNA noch vollständig gegen Fragmentierung geschützt wird. Die Aktivität von M.BseCI mit AdoYnNorb (**7**) (gespannte Doppelbindung, TON = 1,6 h⁻¹) entspricht der Aktivität der DNA-MTase mit den oben gezeigten Cofaktoranaloga AdoYnVB (kurz/lang, **16**, **17**) mit aromatischer Vinylmodifikation.

Vergleicht man die enzymatische Aktivität von M.BseCI mit den Cofaktoranaloga mit aromatischer Vinylmodifikation (Abbildung 3.10), zeigt sich, dass für AdoVB (**6**) vier Spuren vollständig geschützt sind, woraus eine TON = 0,8 h⁻¹ resultiert. Für AdoYnVB (kurz) (**16**) und AdoYnVB (lang) (**17**), die sich untereinander in ihrer chemischen Struktur nur in der Linkerlänge unterscheiden, werden fünf Spuren vollständig geschützt. Der dadurch gewonnene erhöhte Abstand der Modifikation zum reaktiven Zentrum scheint keinen signifikanten Einfluss auf die Übertragungsreaktion mit M.BseCI zu haben, da für beide Cofaktoren eine identische Aktivität erreicht werden konnte (TON = 1,6 h⁻¹). AdoVB (**6**) besitzt ein aromatisches Ringsystem in β -Position zum Sulfoniumzentrum, während AdoYnVB (kurz/lang, **16**, **17**) eine Dreifachbindung an dieser Position aufweisen. Im Gegensatz zur DNA-MTase M.TaqI ist die DNA-MTase M.BseCI mit den beiden Cofaktoranaloga mit Dreifachbing in β -Position zum Sulfoniumzentrum doppelt so aktiv wie der AdoVB-Cofaktor (**6**) mit einem Aromaten zur Doppelaktivierung. Dies zeigt sich ebenfalls bei Betrachtung der ermittelten Aktivität von M.BseCI mit dem Cofaktor AdoYnNorb (**7**), der eine gespannte Doppelbindung trägt aber ansonsten strukturell den beiden Cofaktoranaloga AdoYnVB (kurz/lang, **16**, **17**) sehr ähnelt.

AdoYnNorb (7) besitzt aufgrund einer kupferkatalysierten Azid-Alkin-[3+2]-Cycloaddition (CuAAC) ebenfalls einen Triazolring sowie eine Dreifachbindung zur Doppelaktivierung in β -Position zum Sulfoniumzentrum. Aufgrund dieser strukturellen Ähnlichkeit, ergab sich für AdoYnNorb (7) ebenfalls eine vollständige Modifikation für die ersten fünf Banden (Abbildung 3.11) und damit eine $\text{TON} = 1,6 \text{ h}^{-1}$. Generell zeigt M.BseCI gute Aktivitäten sowohl für kürzere Cofaktoranaloga, als auch für solche, die größere und sterisch anspruchsvollere Seitenketten tragen und eignet sich für die nachfolgenden *two-step labelling*-Reaktionen zur Ermittlung der Reaktionsausbeute für die Fluoreszenzmarkierung von DNA. Allerdings ist für diese DNA-MTase anders als für M.TaqI, mindestens ein stöchiometrischer Einsatz nötig, um alle ATCGAT-Erkennungssequenzen innerhalb einer Stunde modifizieren zu können. Auch hier ist die Aktivität mit dem natürlichen Cofaktor AdoMet (1) höher und besitzt eine TON von $5,82 \text{ h}^{-1}$.^[156] Weiterhin konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche DNA-Adenin-*N*6-MTasen unterschiedliche Präferenzen für verschiedene Cofaktoranaloga aufgrund sterischer oder elektronischer Effekte sowie struktureller Variationen aufweisen.

3.2.2 Modifikations-/Restriktionstest mit den DNA-Cytosin-C5-MTasen M.SssI (dm), M.MpeI (dm) und M.HhaI (tm)

Zur ersten Beurteilung der enzymatischen Aktivität der vinyllischen Cofaktoraloga AdoVB (6), AdoYnVB (kurz) (16), AdoYnVB (lang) (17) und AdoYnNorb (7) wurden die verschiedenen DNA-Cytosin-C5-MTasen M.SssI (dm) (Q142A/N370A), M.MpeI (dm) (Q136A/N374A)^[49,159] und M.HhaI (tm) (Q82A/Y254S/N304A) untersucht. Dabei handelt es sich bei allen drei DNA-MTasen um Varianten der Wildtyp-Enzyme, für die verschiedene Aminosäuren an bestimmten Positionen ausgetauscht wurden, um die Cofaktor-Bindungstasche zu vergrößern und damit die Spezifität zu erweitern. Damit sollte ermöglicht werden, dass auch sterisch anspruchsvollere Seitenketten der doppeltaktivierten Cofaktoraloga sequenzspezifisch vollständig auf die DNA übertragen werden können. Somit könnten die *two-step labelling*-Reaktionen für die Fluoreszenzmarkierung der DNA direkt mit CpG-spezifischen DNA-MTasen zur Ermittlung der epigenetischen Information durchgeführt werden. Für ein erstes *Screening* der Aktivität vinyllischer Cofaktoraloga mit den DNA-Cytosin-C5-MTasen, wurde nur eine Modifikationsprobe mit Cofaktor und DNA-MTase sowie zwei Kontrollen, einmal ohne Cofaktor und einmal ohne DNA-MTase, untereinander verglichen (Abbildung 3.12 und 3.13). Als DNA-Substrate wurden λ -DNA für M.SssI (dm) und M.HhaI (tm), pUC19-Plasmid-DNA für M.MpeI (dm) eingesetzt. Die pUC19-Plasmid-

DNA wurde dafür vor Verwendung zunächst mit der REase R.EcoRI linearisiert. Die eingesetzte Cofaktorkonzentration betrug für alle drei untersuchten DNA-MTasen 80 μ M und die eingesetzte Enzymkonzentration 1 Äq. für M.SssI (dm), 2 Äq. für M.MpeI (dm) und 1 bzw. 10 Äq. für M.HhaI (tm) bezogen auf die jeweiligen Erkennungssequenzen der DNA-MTasen. Zur Restriktionsreaktion wurden unterschiedliche kognate REasen des TypsII je nach spezifischer Erkennungssequenz der DNA-MTase eingesetzt. Für M.SssI (dm) und M.MpeI (dm), die eine CpG-Erkennungssequenz aufweisen, wurde die REase R.BstUI (5'-CG⁺CG-3') (10 U, 1 h bei 60 °C) verwendet, da es keine REase mit direkter CpG-Erkennungssequenz gibt. M.HhaI (tm) weist die spezifische Erkennungssequenz 5'-GCGC-3' auf, weshalb zur Überprüfung der enzymatischen Übertragungsreaktion die REase R.HhaI (10 U, 1 h bei 37 °C) mit identischer Erkennungssequenz (5'-GCG⁺C-3') eingesetzt wurde.

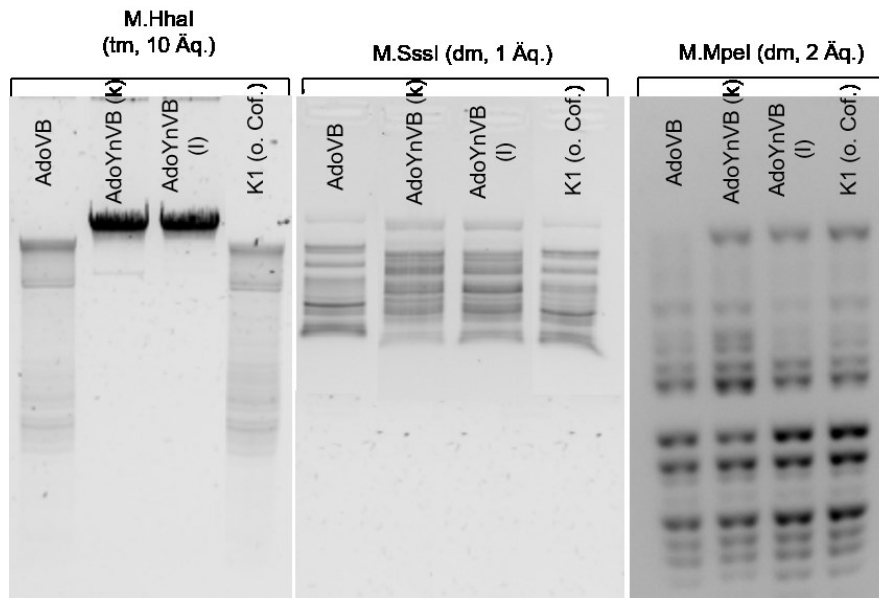


Abbildung 3.12: Gelelektrophoretische Analyse zur Ermittlung der Aktivität verschiedener DNA-Cytosin-C5-MTasen mit AdoVB (6), AdoYnVB (kurz) (16) und AdoYnVB (lang) (17) mit λ -DNA bzw. R.EcoRI-linearisierte pUC19-Plasmid-DNA. Überprüft wurden von links nach rechts: M.HhaI (Q82A/Y254S/N304A) (5'-GCGC-3', 10 Äq), M.SssI (Q142A/N370A) (5'-CG-3', 1 Äq.) und M.MpeI (Q136A/N374A) (5'-CG-3', 2 Äq.). Die Äquivalente beziehen sich auf die Erkennungssequenzen der jeweiligen DNA-MTase. Durch die Kontrolle K1 (ohne Cofaktor) können falsch-positive Ergebnisse ausgeschlossen werden. Aktivität zeigt sich nur für die Cofaktoren AdoYnVB (kurz/lang, 16, 17) mit M.HhaI (tm, 10 Äq.).

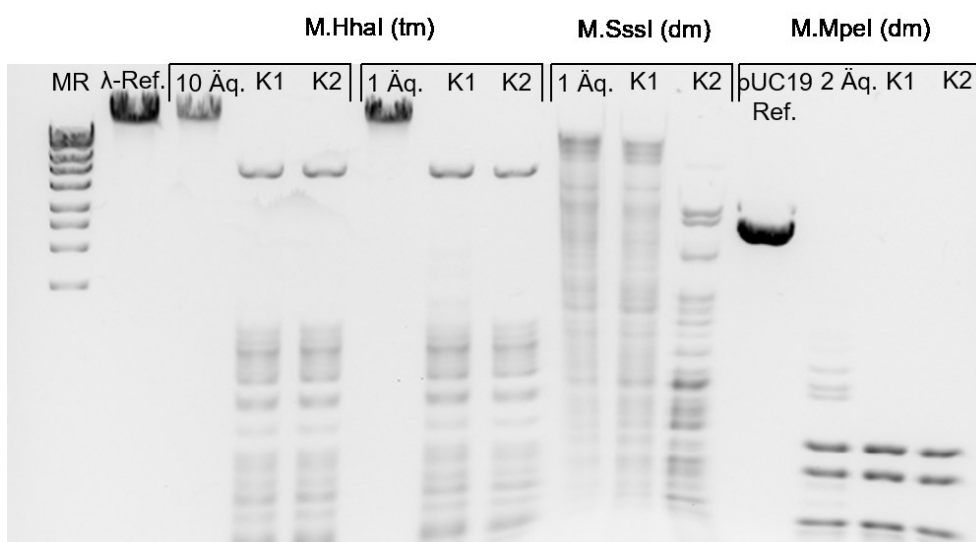


Abbildung 3.13: Gelelektrophoretische Analyse zur Ermittlung der Aktivität verschiedener DNA-Cytosin-C5-MTasen mit AdoYnNorb (**7**). Überprüft wurden von links nach rechts: M.HhaI (Q82A/Y254S/N304A) (5'-GCGC-3', 10 Äq.), M.HhaI (Q82A/Y254S/N304A) (5'-GCGC-3', 1 Äq.), M.SssI (Q142A/N370A) (5'-CG-3', 1 Äq.) und M.MpeI (Q136A/N374A) (5'-CG-3', 2 Äq.). Die Äquivalente beziehen sich auf die Erkennungssequenzen der jeweiligen DNA-MTase. Als Referenz wurde das untersuchte DNA-Substrat, hier λ -DNA (100 ng) oder R.EcoRI-linearisierte pUC19-Plasmid-DNA (100 ng), aufgetragen. Durch die Kontrollen K1 (ohne Cofaktor) und K2 (ohne DNA-MTase) können falsch-positive Ergebnisse ausgeschlossen werden. Aktivität zeigt sich mit AdoYnNorb (**7**) nur für M.HhaI (tm).

Die DNA-MTase M.HhaI (tm) war die einzige der getesteten DNA-Cytosin-C5-MTasen, die Aktivität mit den vinylischen Cofaktoren AdoYnVB (kurz) (**16**), AdoYnVB (lang) (**17**) und AdoYnNorb (**7**) zeigte. Lediglich der Cofaktor AdoVB (**6**), der zur Stabilisierung des Übergangszustandes statt der Dreifachbindung ein aromatisches Ringsystem in β -Position zum Sulfoniumzentrum aufweist, zeigt mit dieser DNA-MTase keine Aktivität. Die Ergebnisse der enzymatischen Aktivitäten der Cytosin-spezifischen DNA-MTasen mit den vinylischen Cofaktoren sind nochmals in Tabelle 3.1 zusammengefasst. Zum Vergleich wurden die Aktivitäten für den natürlichen Cofaktor AdoMet (**1**) hinzugefügt, die in früheren Experimenten ermittelt werden konnten.

Tabelle 3.1: Aktivitäten des natürlichen Cofaktors AdoMet (1) und der vinylischen Cofaktoranaloga mit DNA-Cytosin-C5-MTasen; +/-: Aktivität der DNA-MTase mit dem jeweiligen Cofaktor/ fehlende Aktivität der DNA-MTase mit dem jeweiligen Cofaktor.

	AdoMet (1)	AdoVB (6)	AdoYnVB (kurz) (16)	AdoYnVB (lang) (17)	AdoYnNorb. (7)
M.SssI (dm, <u>CG</u>)	+	-	-	-	-
M.MpeI (dm, <u>CG</u>)	+	-	-	-	-
M.HhaI (tm) (G <u>C</u> GC) (1 Äq.)	+	-	-	-	+
M.HhaI (tm) (G <u>C</u> GC) (10 Äq.)	+	-	+	+	+

Neben den DNA-Adenin-N6-MTasen M.TaqI und M.BseCI, existiert mit der DNA-Cytosin-C5-MTase M.HhaI (tm) eine direkt CpG-spezifische DNA-MTase, die Aktivität mit den vinylischen Cofaktoren AdoYnVB (kurz/lang, 16, 17) und AdoYnNorb (7) zeigt. Somit können spätere *two-step labelling*-Reaktionen für die Fluoreszenzmarkierung der DNA zur Ermittlung der epigenetischen Information auch direkt am Cytosin durchgeführt werden.

Der Erfolg der Modifikation von M.TaqI mit AdoYnNorb (7) wurde zusätzlich auf einem kurzen Duplex-ODN (14+/TCGA, 14-/TCGA, 5.1.4) mittels eines HPLC-Tests untersucht. Dazu wurde der Duplex-ODN gemäß Abschnitt 5.2.10 modifiziert und anschließend fragmentiert. Im zugehörigen Chromatogramm (Anhang, A10) ist eine deutliche Abnahme des Adeninsignals (dA) zu beobachten, während ein neues Signal bei einer Retentionszeit von ca. 48 min auftaucht. Um beurteilen zu können, ob dieses Signal von dem mit Norbornen modifizierten Adenin (dA^{Norb}) stammt, wurde dieser Peak aufgefangen und am institutseigenen Massenspektrometer analysiert. Das zugehörige ESI-Massenspektrum des modifizierten Nukleosides (dA^{Norb}) ist im Anhang, Abbildung A11 gezeigt und weist die Norbornenmodifikation eindeutig an erwarteter Position nach. Quantifiziert man die Reaktion hinsichtlich der Anzahl der maximal zwei zu modifizierenden Adenine in der palindromischen Erkennungssequenzsequenz von M.TaqI wie in Abschnitt 3.4.3 beschrieben, ergibt sich eine beidseitige und damit vollständige Modifikation der beiden Zieladenine (Anhang Tabelle A1). Die Aktivität von M.TaqI (1 Äq. bezogen auf die TCGA-Erkennungssequenz) mit dem Cofaktoranalogon AdoYnNorb (7) (40 µM) konnte somit zusätzlich eindeutig bestätigt werden

und zeigte, dass der erste Modifikationsschritt der enzymatischen Übertragung mit dieser DNA-MTase vollständig abläuft. AdoYnNorb (7) kann mit M.TaqI nachfolgend sehr gut zur Methylierungsdetektion in *two-step labelling*-Reaktionen eingesetzt werden, da die Reaktionsausbeute somit nur vom zweiten Schritt der Klick-Reaktion abhängt und M.TaqI darüberhinaus zwar eine Adenin-spezifische, jedoch CpG-methylierungssabhängige DNA-MTase darstellt.

3.3 Zweistufige DNA-Markierung zur DNA-Methylierungsdetektion

Der nachfolgende Abschnitt behandelt eine zweistufige DNA-Markierungsreaktion (*two-step labelling*-Reaktion) zur Fluoreszenzmarkierung epigenetischer Marker in der DNA. Zunächst erfolgt eine Enzym-katalysierte Modifikation mit einer DNA-MTase und einem doppeltaktivierten Cofaktoranalogen, zur sequenzspezifischen Übertragung eines chemischen Reporters. Die Vollständigkeit dieses ersten Schritts ist besonders wichtig, damit die folgende chemische Markierungsreaktion ebenfalls vollständig ablaufen kann. Zur Überprüfung der Modifikation wird die Methylierungssensitivität von kognaten REasen genutzt (Abschnitt 3.2) und die Fragmentierung mittels Agarosegel-Elektrophorese verifiziert. Anschließend erfolgt eine Diels-Alder Klick-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf (IEDDA). Dabei werden verschiedene fluoreszierende Tetrazinkonjugate an die zuvor übertragene Seitenkette des Cofaktoranalogs geklickt. Die fluoreszenzmarkierte DNA kann abschließend mittels Fluoreszenzmikroskopie zur Ermittlung der epigenetischen DNA-Methylierung genutzt werden. Die nachfolgende Abbildung 3.14 zeigt den schematischen Ablauf einer solchen zweistufigen Markierungsreaktion, sowie die entsprechenden Strukturen der genutzten Tetrazinkonjugate.

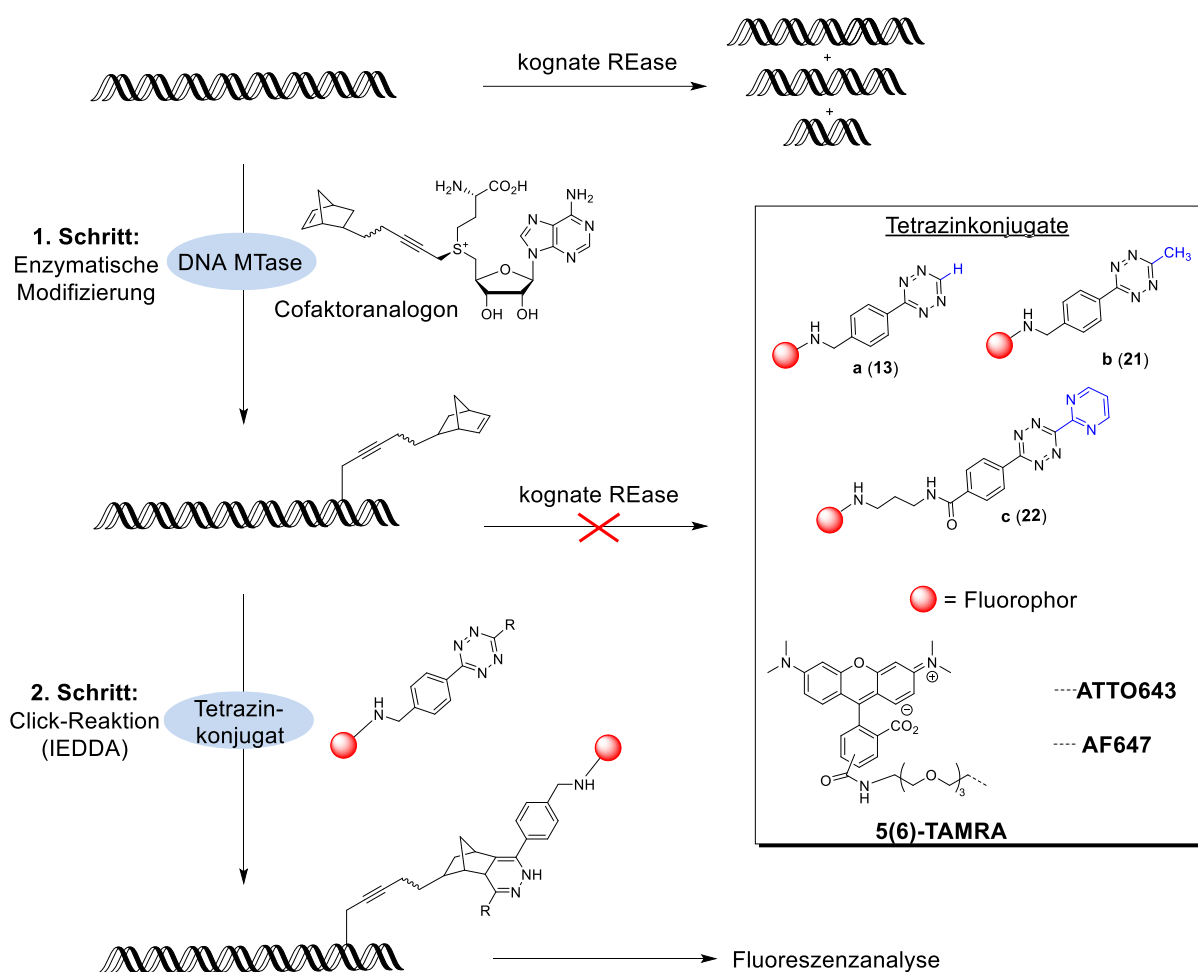


Abbildung 3.14: Schematische Darstellung der DNA-Markierung über zwei Schritte. Im ersten Schritt wird die Seitenkette eines Cofaktoranalogs sequenzspezifisch durch DNA-MTasen auf die DNA übertragen. Die Verifizierung der Vollständigkeit der Alkylierungsreaktion erfolgt mittels kognater REasen und eine agarosegelelektrophoretische Analyse. Im zweiten Schritt erfolgt eine Klick-Reaktion mit verschiedenen fluoreszierenden Tetrazinkonjugaten (a-c, **13**, **21**, **22**) (IEDDA) an der zuvor übertragenen Seitenkette zur Fluoreszenzmarkierung der DNA. Der jeweilige Fluorophor des Tetrazinkonjugates ist als rote Kugel dargestellt. Bei den Fluorophoren ATTO643 und AF647 handelt es sich um geschützte Verbindungen, deren Strukturen nicht eindeutig bekannt sind.

Bei der *two-step labelling*-Reaktion gibt es verschiedene Faktoren, die Einfluss auf die einzelnen Reaktionsschritte haben und eine Variation der Parameter kann das Ergebnis maßgeblich beeinflussen. Zunächst war die Wahl des Cofaktoranalogs mit Vinylmodifikation besonders wichtig, da die Reaktionsgeschwindigkeit für den zweiten Schritt der Klick-Reaktion durch unterschiedliche Dienophile verbessert werden kann.^[142] Hierzu wurden sowohl Cofaktoranaloga mit aromatischer Vinylmodifikation, als auch mit gespannter Doppelbindung untersucht, da letztere eine erhöhte Reaktivität in der IEDDA-Klick-Reaktion

zeigen sollte. Die Wahl der eingesetzten DNA-MTase zur katalysierten Übertragung von Reportermolekülen ist ebenfalls ein wichtiger Faktor für die Modifikationsreaktion der zweistufigen Markierung. Untersucht wurden in dieser Arbeit einerseits die DNA-Adenin-N6-MTasen M.TaqI (5'-TCGAA-3')^[154] und M.BseCI (5'-ATCGAT-3')^[45] und andererseits die DNA-Cytosin-C5-MTase M.HhaI (tm) (5'-GCGC-3')^[112]. Je nach Länge der spezifischen Erkennungssequenz der verwendeten DNA-MTase ergibt sich eine unterschiedliche statistische Verteilung und die Alkylierung kann mit hoher oder niedriger Modifikationsdichte im ersten Schritt eingebracht werden. Der theoretische statistische Abstand von Basenpaarmotiven innerhalb von DNA-Substraten errechnet sich aus $m = 4^n$ (mit m = durchschnittlicher Abstand in Basenpaaren = Bp und n = Länge der Erkennungssequenz in Bp). Statistisch gesehen kommen die Erkennungssequenzen von M.TaqI und M.HhaI alle 256 Bp vor, während die Erkennungssequenz von M.BseCI nur alle 4096 Bp auftritt. Aus diesem Grund werden M.TaqI und M.HhaI im Folgenden dem *high-density DNA-labelling* zugeordnet. M.BseCI führt zu *low-density DNA-labelling* und kann zur Ermittlung der Reaktionsausbeute durch Fluoreszenzmikroskopie von Einzelmolekülen verwendet werden.

Die Wahl der Tetrazinkonjugate (Diene) nimmt durch ladungsverändernde Effekte in den Strukturen ebenso Einfluss auf den Erfolg und die Geschwindigkeit der Markierungsreaktion, weshalb nachfolgend verschiedene fluoreszierende Tetrazine mit strukturellen Variationen verglichen werden (Abbildung 3.14).^[142] Ziel dieser Arbeit war die orthogonale Markierung zweier epigenetischer-DNA-Modifikationen auf einem DNA-Substrat. Deshalb wurden verschiedene Fluorophore benötigt, deren Absorptions- und Emissionsbereiche sich nicht überschneiden und die somit Photonen unterschiedlicher Wellenlängen absorbieren und emittieren. Daher wurde das Pyrimidyl-Tetrazin (Abbildung 3.14 c, **22**) mit verschiedenen gebundenen Fluorophoren (TAMRA, AF647, ATTO643) untersucht. Die Tetrazine unterschieden sich somit nur durch den Fluorophor und damit in den Fluoreszenzwellenlängen (Abbildung 3.14).

3.3.1 Untersuchung von AdoMet-Analoga mit endständiger aromatischer Doppelbindung und Tetrazin-Konjugaten

Für die Untersuchung der Markierungsreaktion in zwei Schritten wurden zunächst die neu synthetisierten Cofaktoranaloga mit aromatischer Vinylmodifikation (Abschnitt 3.1) untersucht. Im ersten Schritt wurde die terminale Doppelbindung innerhalb der Seitenkette der Cofaktoranaloga durch DNA-MTasen sequenzspezifisch auf DNA übertragen. Im zweiten Schritt erfolgte eine Fluoreszenzmarkierung dieser Positionen durch eine IEDDA-Klick-

Reaktion mit fluoreszierenden Tetrazinkonjugaten, die kommerziell von Jena Bioscience GmbH bezogen wurden (Abbildung 3.14 a-c). Als DNA Substrat diente hier T7-Phagen-DNA (39937 Bp), bei der aufgrund ihrer Länge (12-15 μm)^[160] die DNA-Markierung mit Fluorophoren mittels Fluoreszenzmikroskopie detektiert und analysiert werden kann. Die erhaltenen Analyseproben wurden in Kooperation mit dem AK Wöll (IPC, RWTH Aachen University) am institutseigenen Fluoreszenzmikroskop untersucht.

Zur fluoreszenzmikroskopischen Analyse wurde die DNA durch die Zugabe des Interkalators YOYO-1 angefärbt und das Reduktionsmittel DTT zugegeben. DTT soll dabei die Oxidation der Fluorophore durch Luftsauerstoff unterdrücken und somit die Lebensdauer für die Analyse verlängern. YOYO-1 wird dem Cyaninfarbstoff Oxazolgelb zugeordnet^[161] und ist über einen biskationischen Linker verbrückt (Abbildung 3.15 C). YOYO-1 bindet DNA unspezifisch über π - π -Wechselwirkungen (*base stacking*). Durch die Einlagerung des Interkalators wird das gebundene DNA-Substrat überstreckt und die maximale Sättigung wird für ein Verhältnis von 1:4 Interkalator zu Bp erreicht.^[162]

Für die optische Einzelmolekülanalyse der Proben wurde die fluoreszenzmarkierte T7-Phagen-DNA vor der Messung mittels einer abgewandelten Methode des DNA-*Combings* auf einer Glasoberfläche gestreckt und immobilisiert.^[146] Die Streckung der DNA-Einzelmoleküle erfolgt dabei durch Kapillarfluss zwischen einer vinylisch- und einer trimethylammonium-funktionalisierten Glasoberfläche. Das Protokoll nach Sidorova *et al.*^[146] wurde für die Analysen der *two-step labelling*-Reaktionen dahingehend abgeändert, dass sowohl der Probenträger als auch das Deckglas mit Silanen modifiziert wurden. Die positiv geladenen Ammoniumgruppen am Deckglas können bei Applikation der Probe an die Grenzfläche beider Glasplatten mit dem negativ geladenen Phosphatrückgrat der DNA wechselwirken. Dadurch entsteht eine elektrostatische Bindung und die DNA wird gestreckt und immobilisiert. Die untere Glasoberfläche wurde für die Experimente dieser Arbeit mit hydrophoben Vinylgruppen modifiziert, da noch freie fluoreszierende Tetrazine mit diesen Vinylgruppen reagieren können und kovalent an die untere Glasoberfläche gebunden werden. Somit befinden sich die gebundenen Fluorophore in einer anderen Ebene und beeinflussen die Aufnahmen im Laserkanal, die an der oberen Glasplatte stattfinden, nicht durch ein erhöhtes Hintergrundsignal (Abbildung 3.15 A und B).

Die Analyse der über die *two-step labelling*-Reaktion eingebrachten Fluorophore erfolgte über eine Überlagerung der Aufnahmen sequenzspezifischer Signale (Label-Kanal) und des YOYO-1-Signals (DNA-Kanal) (Abbildung 3.15 D) mittels des Programms Image J (v1.51k

Fiji)^[163,164]. Dabei wird zur Auswertung und besseren Visualisierung der DNA-Kanal in nachfolgenden Bildern immer grün, der Label-Kanal immer rot dargestellt.

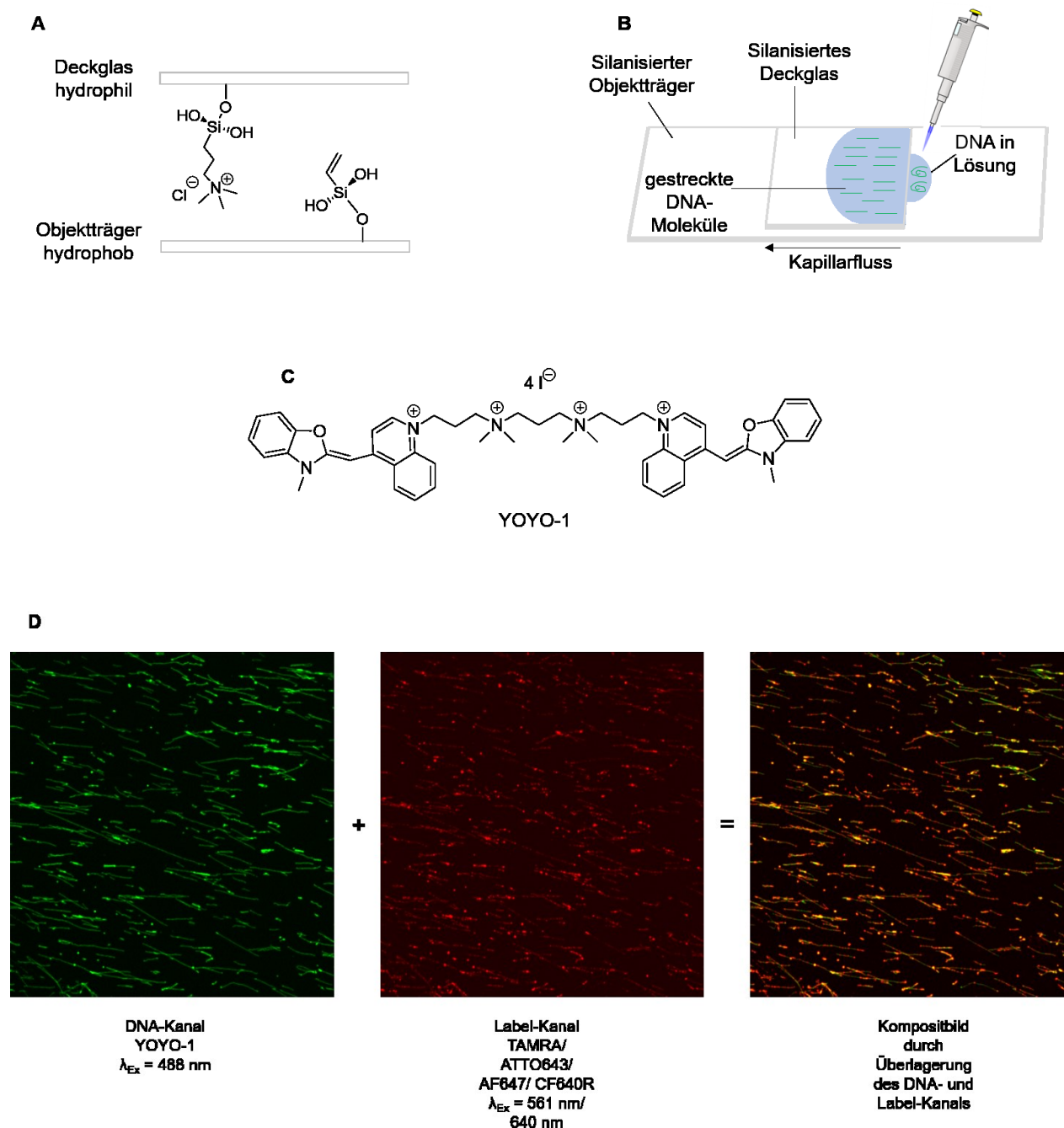


Abbildung 3.15: Darstellung der Methode zur fluoreszenzmikroskopischen Analyse von DNA-Substraten mittels des DNA-Combing (optisches DNA-Mapping). Molekulare Strukturen der zur Oberflächenmodifizierung von Objektträger und Deckglas verwendeten Silane (**A**) sowie der Aufbau und die experimentelle Ausführung des DNA-Combing zur Streckung und Immobilisierung modifizierter DNA-Moleküle (**B**). Strukturformel des DNA-Interkalators YOYO-1 (**C**) und das Prinzip zur

Visualisierung fluoreszenzmarkierter DNA-Einzelmoleküle durch Überlagerung der Aufnahmen mit unterschiedlichen Laserkanälen (**D**).

Nachfolgend wurden die DNA-MTasen M.TaqI (*high density DNA-labelling*, 111 TCGA-Erkennungssequenzen auf T7-Phagen DNA) und M.BseCI (*low density DNA-labelling*, drei ATCGAT-Erkennungssequenzen auf T7-Phagen-DNA) untersucht. Das Vorgehen für optische Analysen mittels Fluoreszenzmikroskopie unterscheidet sich für die Markierung mit hoher (*high density*) oder niedriger Dichte (*low density*). Für letztere ist es möglich, Reaktionsausbeuten zu bestimmen, während es für Modifikationen mit hoher Dichte nur möglich ist, Intensitätsprofile entlang eines DNA-Einzelmoleküls zu untersuchen^[123,125]. Die Auflösung des Mikroskops reicht bei hoher Markierungsdichte nicht aus, um einzelne Markierungen unterscheiden zu können.

High density DNA-Labelling (M.TaqI)

Zur ersten Einschätzung des Erfolgs der *two-step DNA-labelling* Reaktion wurde im ersten Schritt die Seitenkette des vinylischen Cofaktoranalogs AdoVB (**6**) mit M.TaqI (*high density*) auf T7-DNA sequenzspezifisch übertragen. In den Ansätzen wurde dieselbe Konzentration an DNA-MTase (1 Äq. bezogen auf 5'-TCGA-3'-Erkennungssequenzen) und AdoVB (**6**) (80 µM) eingesetzt, die zuvor in Aktivitätstests quantitativen Umsatz lieferte (3.2.1). Die Überprüfung der Vollständigkeit des ersten Reaktionsschrittes erfolgte nach Zugabe der kognaten REase R.TaqI (5'-T⁺CGA-3')^[152,155] durch Agarosegel-Elektrophorese. Im zweiten Schritt wurde dann H-Tetrazin-TAMRA (**13**) (Abbildung 3.14 a) oder 6-Methyl-Tetrazin-TAMRA (**21**) (Abbildung 3.14 b) zugegeben. Zur Entfernung noch freier Fluorophore und um ein möglichst gutes Signal-Rausch-Verhältnis zu gewährleisten, wurden die Proben anschließend mittels Agarose-Plugs aufgereinigt. Diese Aufreinigungsmethode wurde der *DropDialyse*-Methode, die in früheren Arbeiten Anwendung fand, vorgezogen, weil die Proben so einem geringeren mechanischen Stress ausgesetzt sind und höhere Ausbeuten erzielt werden können. Da M.TaqI auf T7-DNA 111 spezifische TCGA-Erkennungssequenzen besitzt, wurde mit hoher Dichte modifiziert und anschließend die Reaktion am Fluoreszenzmikroskop analysiert (Abbildung 3.16).

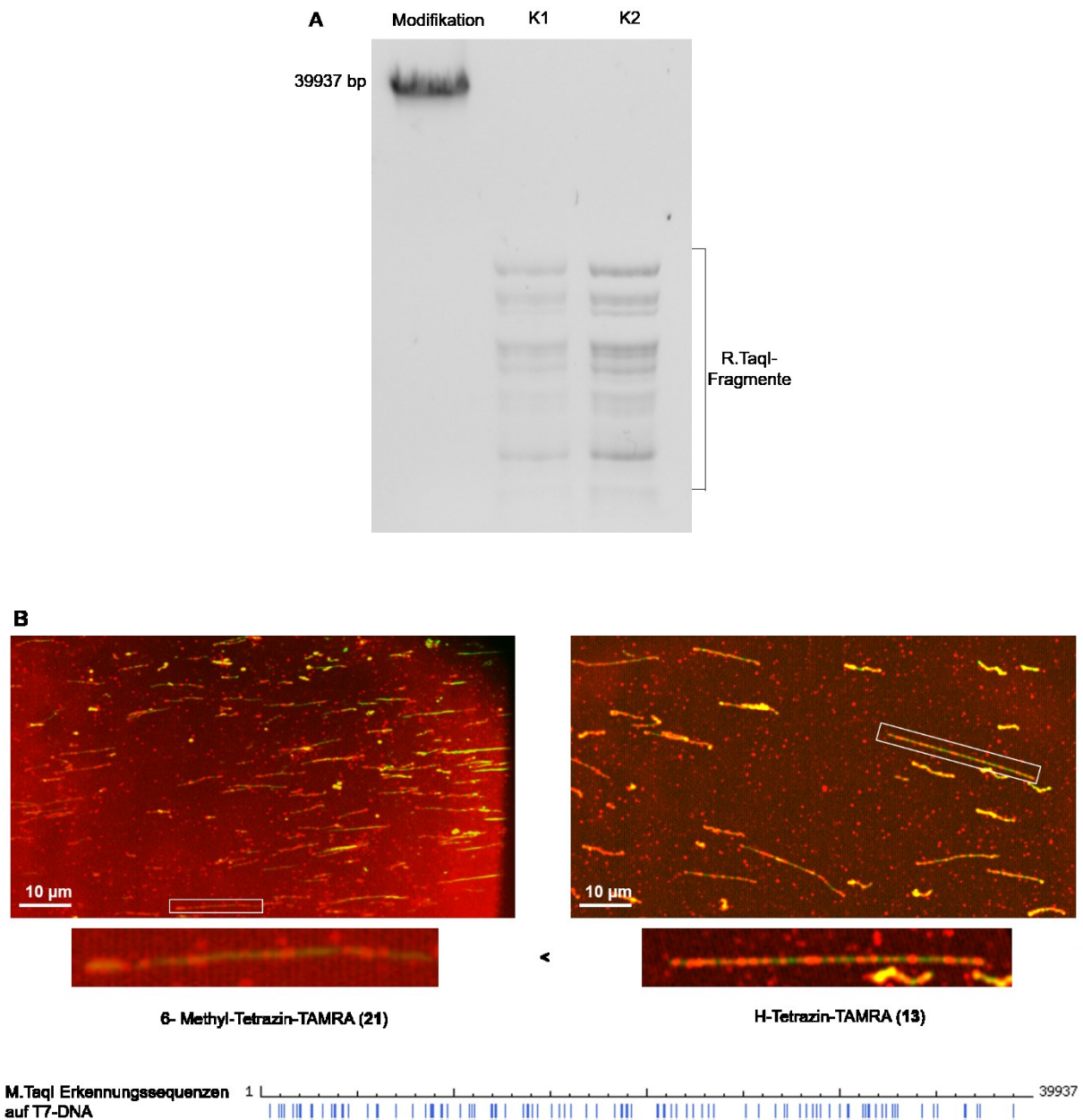


Abbildung 3.16: Gelelektrophoretische Analyse der Modifikationsreaktion von T7-DNA mit AdoVB (**6**) und M.TaqI (5'-TCGA-3', *high density*), sowie zwei Kontrollen (K1: ohne Cofaktor und K2: ohne DNA-MTase) nach Zusatz von R.TaqI zur Verifizierung der Vollständigkeit des ersten Modifikationsschrittes (**A**). Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach der Klick-Reaktion mit 6-Methyl-Tetrazin-TAMRA (**21**) und H-Tetrazin-TAMRA (**13**). Vollständige Kompositbilder (DNA-Kanal: grün, Aufnahmen bei 488 nm, Label-Kanal: rot, Aufnahmen bei 561 nm) der markierten und mittels DNA-*Combing* gestreckten DNA sowie Ausschnitte gestreckter Einzelmoleküle (**B**). Außerdem ist eine Übersicht der Erkennungssequenzen der DNA-MTase M.TaqI auf T7-DNA zur Darstellung des erwarteten Markierungsmusters gezeigt (**B**, unten).

In Abbildung 3.16 A ist deutlich erkennbar, dass für die Modifikationsreaktion von T7-Phagen-DNA mit AdoVB und M.TaqI nur eine Bande im Gel erhalten wird (Abbildung 3.16 A, Spur 1). Diese kann dem vollständig geschützten DNA-Substrat zugeordnet werden. In den beiden Kontrollen, die zum einen ohne Cofaktor (3.16 A, K1) und zum anderen ohne DNA-MTase (3.16 A, K2) angesetzt wurden, ist hingegen das vollständige R.TaqI-Fragmentierungsmuster der T7-DNA zu beobachten. Auffällig ist dabei, dass die Kontrolle K1 ohne Cofaktoranalogen aber mit DNA-MTase nach der Restriktion trotz Proteinase K Behandlung viel schwächere und deutlich weniger definierte Banden aufweist. Dieses Phänomen wurde bereits häufiger in früheren Modifikationsansätzen mit DNA-MTase und REase beobachtet und kann auf sehr geringe Mengen des natürlichen Cofaktors AdoMet in der Enzym-Präparation zurückgeführt werden. Da durch die gelelektrophoretische Analyse die enzymatische Übertragungsreaktion des ersten Schrittes erfolgreich verifiziert werden konnte, kann davon ausgegangen werden, dass die Ausbeute der Markierungsreaktion allein von dem sich anschließenden zweiten Schritt der Klick-Reaktion abhängt. Dazu wurde die modifizierte DNA zunächst mittels Agarose-*Plugs* aufgereinigt, um die Probe vom Überschuss an noch ungebundenem Cofaktoranalogen zu befreien (5.2.7). Anschließend erfolgte die Klick-Reaktion mit den fluoreszierenden Tetrazinkonjugaten H-Tetrazin-TAMRA (**13**) und 6-Methyl-Tetrazin-TAMRA (**21**) bei 37 °C über Nacht. Es erfolgte erneut eine Aufreinigung mit Agarose-*Plugs* (5.2.7) zur Beseitigung freier Fluorophore und zur Erreichung eines möglichst hohen Signal-Rausch-Verhältnisses. Abbildung 3.16 B zeigt die fluoreszenzmikroskopische Analyse der markierten DNA sowie die erwarteten theoretischen Positionen (spezifischer Barcode) der Fluorophore auf T7-DNA für die Markierung mit M.TaqI. Für beide Tetrazinkonjugate wurde eine hohe Markierungsdichte erreicht und die Fluoreszenz war über den gesamten, getreckten DNA-Strang detektierbar. Deshalb kann von einer erfolgreichen Fluoreszenzmarkierung gesprochen werden kann. Eine quantitative Auswertung zur genaueren Beurteilung der Reaktionsausbeute ist hier jedoch nicht möglich, da die Auflösung des Mikroskops nicht ausreicht, um einzelne Label detektieren zu können. Weiterhin kann die Fluoreszenz einiger gebundener TAMRA-Fluorophore durch zu lange oder intensive Laserbestrahlung bereits ausgelöscht worden sein, obwohl zuvor eine Bindung stattgefunden hat. Für die Reaktion mit hoher Markierungsdichte wäre es daher erforderlich, Intensitätsprofile für das optische Mapping entlang eines DNA-Einzelmoleküls aufzunehmen.^[123,125] Ebenfalls erkennbar ist, dass die Ausbeute der *two-step labelling*-Reaktion mit dem H-Tetrazin-TAMRA (**13**) größer ist als mit dem 6-Methyl-Tetrazin-TAMRA (**21**). Diese Ergebnisse decken sich auch mit den Angaben in der Literatur, in der Geschwindigkeitskonstanten angegeben werden, die die Reaktivität und damit auch die

Ausbeute der Gesamtreaktion beeinflussen. Dabei werden für 6-Methyl-Tetrazin-TAMRA (**21**) Werte von $10 - 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ angegeben, für H-Tetrazin-TAMRA (**13**) hingegen höhere Werte von $10^2 - 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.^[142] Außerdem zeigen beide Proben noch ein sehr hohes Hintergrundsignal aufgrund freier Fluorophore in der Probe, die das Ergebnis und die Auswertung negativ beeinflussen können. Für die nachfolgenden Experimente wurden daher bei der *Plug*-Aufreinigungsmethode längere Waschschrte durchgeführt. Statt siebenmal 10 min wurde dreimal über Nacht auf einem Schüttelinkubator mit jeweils frischem TE-Puffer (50 mL, 1x) gewaschen. Die Aufnahmen für die Klick-Reaktion mit dem 6-Methyl-Tetrazin-TAMRA (**21**) waren außerdem etwas unschärfer und weniger kontrastreich. Dies könnte daran liegen, dass die für diese Messung genutzte Silan-modifizierte Glasplatte nicht ausreichend gewaschen oder mit Argon getrocknet wurde.

Die anschließende Überprüfung der zweistufigen Markierungsreaktion für AdoVB mit M.BseCI (*low density*), um die Ausbeute der Klick-Reaktion zu bestimmen, ergab keine Ergebnisse. Es war nicht möglich, die TAMRA-Fluorophore im Label-Kanal bei 561 nm zu detektieren. Aus diesem Grund wurde nachfolgend der längere Cofaktor AdoYnVB (lang) (**17**) mit M.BseCI untersucht, der durch den größeren Abstand der Reportergruppe zum reaktiven Zentrum die Reaktion zur Bestimmung der Ausbeute verbessern sollte. Außerdem konnte durch Aktivitätstests mit der *low density* DNA-MTase M.BseCI (3.2.1) gezeigt werden, dass diese mit den Cofaktoranaloga AdoYnVB (kurz/lang, **16**, **17**) die eine Dreifachbindung in β -Position zum Sulfoniumzentrum aufweisen, höhere Aktivität zeigt, als mit dem Cofaktor AdoVB (**6**), der an dieser Position ein aromatisches Ringsystem besitzt. Weiterhin wurde zusätzlich ein reaktiveres Tetrazinkonjugat, das Pyrimidyl-Tetrazin-TAMRA (**22**) (Abbildung 3.14 c), untersucht, um die Reaktionsausbeute zu maximieren.

Low density DNA-Labeling (M.BseCI)

Zur Bestimmung der Reaktionsausbeute der *two-step DNA-labelling* Reaktion wurde im ersten Schritt die Seitenkette des vinylischen Cofaktoranalogons AdoYnVB (lang) (**17**) mit M.BseCI^[45] (*low density*) auf T7-DNA sequenzspezifisch übertragen. In allen Ansätzen wurde dieselbe Konzentration an DNA-MTase (10 Äq. bezogen auf 5'-ATCGAT-3'-Erkennungssequenzen) und AdoYnVB (lang) (**17**) (80 μM) eingesetzt, die zuvor durch Aktivitätstests abgeleitet wurden (3.2.1). Die Überprüfung der Vollständigkeit des ersten Reaktionsschrittes erfolgte durch Agarosegel-Elektrophorese nach Zugabe der kognaten REase R.ClaI (5'-AT⁺CGAT-3')^[154,158]. Im zweiten Schritt wurde mit 6-Methyl-Tetrazin-TAMRA

(**21**) (Abbildung 3.14 b), H-Tetrazin-TAMRA (**13**) (Abbildung 3.14 a) und Pyrimidyl-Tetrazin-TAMRA (**22**) (Abbildung 3.14 c) geklickt. Da M.BseCI auf T7-DNA drei spezifische ATCGAT-Erkennungssequenzen besitzt, wurde die DNA mit niedriger Dichte zur Quantifizierung der Reaktionsausbeute am Fluoreszenzmikroskop analysiert (Abbildung 3.17).

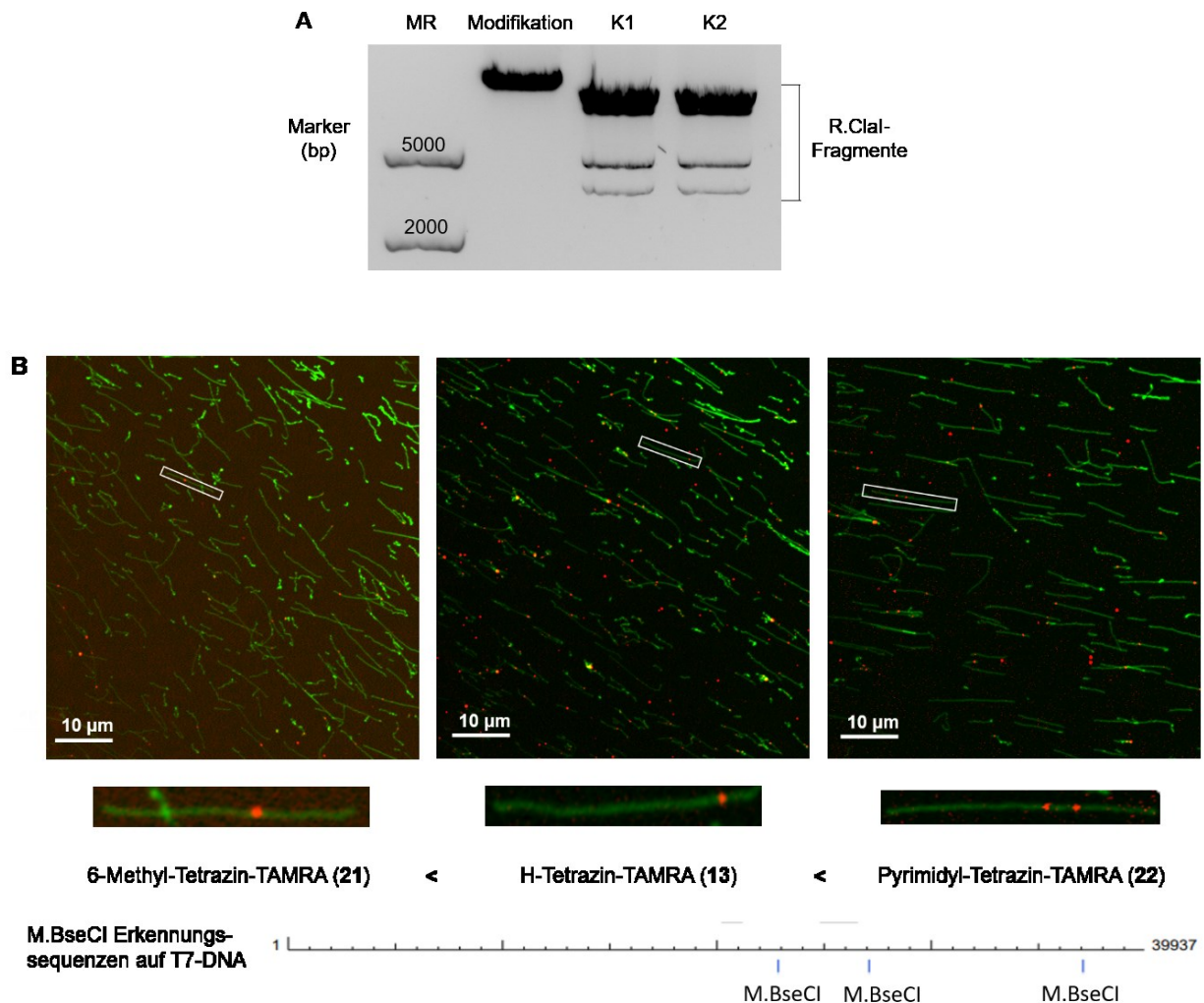


Abbildung 3.17: Gelelektrophoretische Analyse der Modifikationsreaktion von T7-DNA mit AdoYnVB (lang) (**17**) und M.BseCI (5'-ATCGAT-3', *low density*), sowie ein DNA-Standard (MR, Spur 1) und zwei Kontrollen (K1: ohne Cofaktor und K2: ohne DNA-MTase) nach Zugabe von R.ClaI zur Verifizierung der Vollständigkeit des ersten Modifikationsschrittes (**A**). Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach der Klick-Reaktion mit 6-Methyl-Tetrazin-TAMRA (**21**), H-Tetrazin-TAMRA (**13**) und Pyrimidyl-Tetrazin-TAMRA (**22**). Vollständige Kompositbilder (DNA-Kanal: grün, Aufnahmen bei 488 nm, Label-Kanal: rot, Aufnahmen bei 561 nm) der markierten und mittels DNA-*Combing* gestreckten DNA sowie Ausschnitte gestreckter Einzelmoleküle (**B**). Außerdem ist eine Übersicht der Erkennungssequenzen der DNA-MTase M.BseCI auf T7-DNA mit erwartetem Markierungsmuster gezeigt (**B**, unten).

Abbildung 3.17 A zeigt, dass für den ersten Schritt der enzymatischen Modifikation von T7-DNA mit M.BseCI und AdoYnVB (lang) (**17**) nur eine Bande im Gel erkennbar ist (Abbildung 3.17 A, Spur 2). Diese kann dem vollständig geschützten DNA-Substrat zugeordnet werden, da in beiden Kontrollen, die sowohl ohne Cofaktor (3.17 A, K1) als auch ohne DNA-MTase (3.17 A, K2) angesetzt wurden, das vollständige R.ClaI-Fragmentierungsmuster erkennbar ist. Durch die gelelektrophoretische Analyse konnte somit verifiziert werden, dass die enzymatische Modifikationsreaktion des ersten Schrittes vollständig verläuft und davon ausgegangen werden kann, dass die Reaktionsausbeute der Markierungsreaktion allein vom zweiten Schritt der Klick-Reaktion abhängt. Zur Quantifizierung der Ausbeute wurde die modifizierte DNA zunächst mittels *Agarose-Plugs* aufgereinigt, um sie vom Überschuss an noch ungebundenem Cofaktoranalogen zu befreien (5.2.7). Anschließend erfolgte die Klick-Reaktion mit den fluoreszierenden Tetrazinkonjugaten 6-Methyl-Tetrazin-TAMRA (**21**), H-Tetrazin-TAMRA (**13**) und Pyrimidyl-Tetrazin-TAMRA (**22**). Um ein möglichst gutes Signal-Rausch-Verhältnis zu erhalten, erfolgte erneut eine *Plug*-Aufreinigung mit längeren Waschschritten auf dem Schüttelinkubator (3x über Nacht). Abbildung 3.17 B zeigt die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der markierten DNA sowie die erwarteten Positionen (spezifischer Barcode) der Fluorophore auf T7-DNA für die *low-density* DNA-MTase M.BseCI. Die DNA-Stränge, die durch den Interkalator YOYO-1 sichtbar gemacht wurden, sind in grün, die einzelnen TAMRA-Fluorophore in rot dargestellt. Erkennbar sind einzelne mittels DNA-*Combing* gestreckte DNA-Moleküle, die sich aufgrund der hohen DNA-Menge jedoch teilweise überlagern und einen jeweils unterschiedlichen Streckungsfaktor aufweisen. Betrachtet man jedoch die vergrößerten T7-DNA-Einzelstränge (3.17 B), lassen sich einzelne TAMRA-Fluorophore auf der DNA erkennen. M.BseCI besitzt drei spezifische Erkennungssequenzen auf T7-DNA, sodass bei vollständigem Umsatz drei TAMRA-Fluorophore pro Strang erwartet werden. Vergleicht man die dargestellten Einzelmoleküle mit dem theoretischen Markierungsmuster für M.BseCI (3.17 B, unten), wird deutlich, dass für das 6-Methyl-Tetrazin-TAMRA (**21**) als auch für H-Tetrazin-TAMRA (**13**) lediglich meist nur eine Position markiert wurde, während für Pyrimidyl-Tetrazin-TAMRA (**22**) öfter zwei spezifische Positionen markiert werden konnten. Die Reaktionsausbeute ist für alle drei fluoreszierende Tetrazinkonjugate somit nicht vollständig. Es kann aber eine Reaktionssteigerung von 6-Methyl-Tetrazin-TAMRA (**21**) (Abbildung 3.14 b) über H-Tetrazin-TAMRA (**13**) (Abbildung 3.14 a) zum Pyrimidyl-Tetrazin-TAMRA (**22**) (Abbildung 3.14 c) aufgrund der strukturellen Veränderungen (Abbildung 3.14 a-c, blau dargestellt) augenscheinlich erreicht werden. Diese Ergebnisse decken sich auch mit den Angaben in der Literatur, in denen Geschwindigkeitskonstanten angegeben werden, die die

Reaktivität und damit auch die Ausbeute der Gesamtreaktion beeinflussen (3.3.1, *high density*). Dabei werden für das Pyrimidyl-Tetrazin-TAMRA (22) die höchsten Werte von $10^4 - 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ angegeben.^[142] Außerdem zeigen alle Proben verglichen mit dem *high-density labelling* von M.TaqI mit AdoVB (6) (Abbildung 3.16 B) ein deutlich geringeres Hintergrundsignal. Die zeitliche Verlängerung der einzelnen Waschschrte bei der *Plug-*Aufreinigung war somit erfolgreich, da nahezu alle freien Fluorophore entfernt werden konnten. Allerdings erfolgte die Reaktionssteigerung der Klick-Reaktion durch die Wahl eines reaktiveren Dienes für den Einsatz des Cofaktors AdoYnVB (lang) (17) nicht im gewünschten Maße, sodass nachfolgend ein reaktiveres Dienophil untersucht wird. Dafür kommt das Cofaktoranalogen AdoYnNorb (7) zum Einsatz, das strukturell eine gespannte statt aromatischer Vinylgruppe überträgt und damit eine Steigerung der Reaktionsausbeute erfolgen sollte. Der Cofaktor mit Norbornenfunktion könnte dabei 100-fach schneller reagieren als die Cofaktoren mit vinylischer Modifikation.^[142]

3.3.2 Untersuchungen eines AdoMet-Analogons mit gespannter Doppelbindung und Tetrazin-Konjugaten

Die zweistufige Markierungsreaktion zur DNA-Methylierungsdetektion wurde außerdem für den Cofaktor AdoYnNorb (7) untersucht, der von Leonie Schütz arbeitskreisintern synthetisiert und dieser Arbeit für Experimente zur Verfügung gestellt wurde.^[151] AdoYnNorb (7) weist in seiner chemischen Struktur einen Norbornenrest mit gespannter Doppelbindung auf, wodurch in der Klick-Reaktion des zweiten Schrittes eine Reaktivitätssteigerung, verglichen mit den vinylischen Cofaktoranaloga (Abschnitt 3.3.1), erreicht werden soll. Die dafür eingesetzten Tetrazinkonjugate wurden kommerziell von Jena Bioscience GmbH erworben (Abbildung 3.14 a-c). Als DNA Substrat diente hier T7-Phagen-DNA (39937 Bp), bei der aufgrund ihrer Länge (12-15 μm)^[160] die DNA-Markierung durch Fluorophore mittels Fluoreszenzmikroskopie detektiert und analysiert werden kann. Die erhaltenen Analyseproben wurden in Kooperation mit dem AK Wöll (IPC, RWTH Aachen University) am institutseigenen Fluoreszenzmikroskop untersucht. Für die optische Einzelmolekülanalyse der Proben wurde die fluoreszenzmarkierte T7-Phagen-DNA vor der Messung mittels der Methode des DNA-*Combings* (3.3.1) auf einer Glasoberfläche gestreckt und immobilisiert.^[146]

Low density DNA-Labelling (M.BseCI)

Zur Verbesserung der Reaktionsausbeute der *two-step DNA-labelling* Reaktion wurde im ersten Schritt die gespannte Doppelbindung des Cofaktoranalogs AdoYnNorb (**7**) mit M.BseCI^[45] (*low density*) auf T7-DNA sequenzspezifisch übertragen. In allen Ansätzen wurde dieselbe Konzentration an DNA-MTase (10 Äq. bezogen auf 5'-ATCGAT-3'-Erkennungssequenzen) und AdoYnNorb (**7**) (80 µM) eingesetzt, die zuvor durch Aktivitätstests quantitativen Umsatz zeigten (3.2.1). Die Überprüfung der Vollständigkeit des ersten Reaktionsschrittes erfolgte nach Zugabe der REase R.ClaI (5'-AT[▼]CGAT-3')^[154,158] und Analyse der Fragmentierung mittels Agarosegel-Elektrophorese. Im zweiten Schritt wurde dann die modifizierte T7-DNA mit H-Tetrazin-TAMRA (**13**) (Abbildung 3.14 a), 6-Methyl-Tetrazin-TAMRA (**21**) (Abbildung 3.14 b) und Pyrimidyl-Tetrazin-TAMRA (**22**) (Abbildung 3.14 c) umgesetzt. Da M.BseCI auf T7-DNA drei spezifische ATCGAT-Erkennungssequenzen besitzt, erfolgte die DNA-Markierung mit niedriger Dichte und konnte anschließend durch Fluoreszenzmikroskopie hinsichtlich der Reaktionsausbeute quantifiziert werden (Abbildung 3.18).

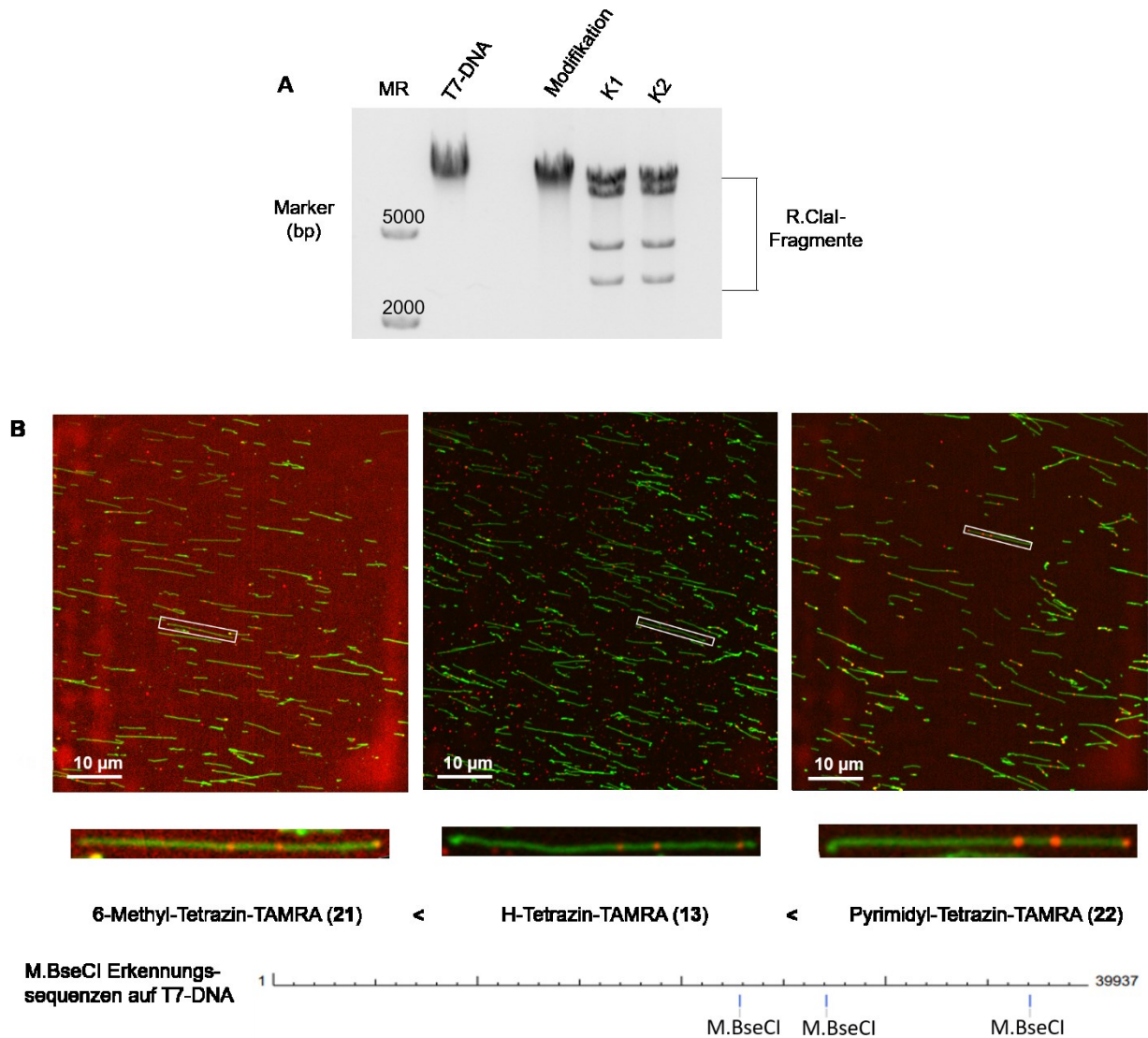


Abbildung 3.18: Gelelektrophoretische Analyse der Modifikationsreaktion von T7-DNA mit AdoYnNorb (7) und M.BseCI (5'-ATCGAT-3', *low density*), sowie ein DNA-Standard (MR, Spur 1), T7-DNA-Referenz (Spur 2) und zwei Kontrollen (K1: ohne Cofaktor und K2: ohne DNA-MTase) zur Verifizierung der Vollständigkeit des ersten Modifikationsschrittes (A). Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach der Klick-Reaktion mit H-Tetrazin-TAMRA (13), 6-Methyl-Tetrazin-TAMRA (21) und Pyrimidyl-Tetrazin-TAMRA (22). Vollständige Kompositbilder (DNA-Kanal: grün, Aufnahmen bei 488 nm, Label-Kanal: rot, Aufnahmen bei 561 nm) der markierten und mittels DNA-Combing gestreckten DNA sowie Ausschnitte gestreckter Einzelmoleküle (B). Außerdem ist eine Übersicht der Erkennungssequenzen der DNA-MTase M.BseCI auf T7-DNA mit erwartetem Markierungsmuster gezeigt (B, unten).

In Abbildung 3.18 A (Spur 3) lässt sich im Agarosegel für die Modifikation von AdoYnNorb (7) mit M.BseCI nach der Restriktionsreaktion nur eine Bande erkennen. Diese kann dem vollständig geschützten DNA-Substrat zugeordnet werden, da in beiden Kontrollspuren, die

sowohl ohne Cofaktor (3.18 A K1) als auch ohne DNA-MTase (3.18 A K2) angesetzt wurden, das vollständige R.ClaI-Fragmentierungsmuster vorhanden ist. Durch die gelelektrophoretische Analyse konnte somit die Vollständigkeit der enzymatischen Modifikationsreaktion des ersten Schrittes verifiziert werden, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die Reaktionsausbeute der Markierungsreaktion allein vom zweiten Schritt der Klick-Reaktion abhängt. Um die Ausbeute zu quantifizieren wurden die Proben analog zum beschriebenen Vorgehen in Abschnitt 3.3.1 (*low density DNA-labelling* mit M.BseCI) aufgereinigt. Abbildung 3.18 B zeigt die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der markierten DNA sowie die erwarteten theoretischen Positionen (spezifischer Barcode) der Fluorophore auf T7-DNA für die *low-density* DNA-MTase M.BseCI. Die DNA-Stränge, die durch den Interkalator YOYO-1 sichtbar gemacht wurden, sind in grün, die einzelnen TAMRA-Fluorophore in rot dargestellt. Die angewandte Methode des DNA-Combing war erfolgreich, da gestreckte DNA-Einzelmoleküle für alle drei Proben in ähnlicher Qualität erkennbar sind. Verglichen mit dem theoretischen Barcode für M.BseCI (3.18 B unten) sollten bei vollständigem Umsatz drei TAMRA-Fluorophore pro Strang detektiert werden. Bei Betrachtung der vergrößerten Einzelstränge in Abbildung 3.18 B, ist dieser Barcode für die Markierung mit allen drei Tetrazinkonjugaten (**21**, **13**, **22**) in den Mikroskopieaufnahmen zu finden. Eine Reaktivitätssteigerung konnte somit augenscheinlich für das Cofaktoranalogen AdoYnNorb (**7**) im Vergleich zur Markierung mit AdoYnVB (lang) (**17**) und den verschiedenen Tetrazinkonjugaten (3.3.1) erreicht werden. Im Gegensatz zur Markierung mit M.TaqI (*high density*) war für das *low-density labelling* hier eine computergestützte quantitative Auswertung der Reaktionsausbeute möglich. Die Auswertung erfolgte dabei mit einem Computerprogramm, das von Dr. Felix Schilcher arbeitskreisintern geschrieben und dieser Doktorarbeit zur Verfügung gestellt wurde. Für dieses Programm wurden nur einzelne DNA-Stränge analysiert und in die Auswertung mit einbezogen, die eine passende gestreckte Länge der T7-DNA^[160] mit einer Toleranz von $\pm 10 \%$ aufwiesen. Diese Toleranzgrenze wurde im *Source Code* des Programms zur besseren Vergleichbarkeit festgelegt. Durch einen Algorithmus wurden die gestreckten DNA-Einzelmoleküle erfasst und die zugehörigen Signale im Label-Kanal mit den Signalen der Stränge des DNA-Kanals verglichen. Im Falle einer Übereinstimmung wurde angenommen, dass die detektierten Fluorophore kovalent an die Stränge gebunden waren und sich die Signale eindeutig auf der DNA befanden. Im Anschluss wurden auf Basis der theoretisch erwarteten Markierung von M.BseCI auf T7-DNA (spezifischer Barcode, Abbildung 3.18 B, unten) die Positionen der Label auf dem DNA-Strang bestimmt und mit der richtigen Position verglichen. Die Auswertung lieferte dabei zwei spezifische Werte: Zum

einen die gefundenen *Hits*, also alle Label, die sich an der korrekten Position auf dem DNA-Strang, verglichen mit dem erwarteten Markierungsmuster, befanden und zum anderen die Label, die zwar auf dem jeweiligen DNA-Strang, jedoch an falscher Position des erwarteten Barcodes gefunden wurden (*false positives*, FP). Aus diesen beiden spezifischen Werten, konnte der Algorithmus den sogenannten *Score* der entsprechenden Markierungsreaktion ermitteln, indem die Differenz aus *Hits* und *false-positives* gebildet und durch die möglichen theoretischen *Map entries* (hier 3 Label) dividiert wurde. Über diesen Wert kann die Reaktivität der verschiedenen fluoreszierenden Tetrazine bestimmt und untereinander verglichen werden (Tabelle 3.2).

Tabelle 3.2: Quantitative Auswertung mit computergestütztem Algorithmus für die Markierung von T7-DNA mit M.BseCI, AdoYnNorb (**7**) und verschiedenen Tetrazinkonjugaten (**21**, **13**, **22**).

	6-Methyl-Tetrazin- TAMRA (21)	H-Tetrazin- TAMRA (13)	Pyrimidyl-Tetrazin- TAMRA (22)
Hits	0,30	1,42	1,45
Score	0,26	0,42	0,83

Die in Tabelle 3.2 ermittelten Scores stimmen mit der erwarteten Reaktivitätstendenz aus der Literatur für die eingesetzten Tetrazinkonjugate 6-Methyl-Tetrazin-TAMRA (**21**), H-Tetrazin-TAMRA (**13**) und Pyrimidyl-Tetrazin-TAMRA (**22**) überein.^[142] Für das reaktivste Dien Pyrimidyl-Tetrazin-TAMRA (**22**) ergaben sich die besten Reaktionsausbeuten mit durchschnittlich ca. 1,5 detektierten Labeln auf der DNA und einem erzielten *Score* von 0,8. Wie erwartet waren die erhaltenen Berechnungsergebnisse für das 6-Methyl-Tetrazin-TAMRA (**21**) mit einem *Score* von nur 0,26 am schlechtesten. Bei der Markierung mit dem H-Tetrazin-TAMRA (**13**) lässt sich noch ein starkes Hintergrundsignal durch Fluorophore erkennen, die nicht reagiert haben und durch Aufreinigung nicht entfernt wurden. Trotzdem konnte für die Markierung mit diesem Tetrazin ein besserer *Score* erreicht werden, als mit dem 6-Methyl-Tetrazin-TAMRA (**21**). Mit einem Wert von 0,42 war die Markierung jedoch nur halb so erfolgreich wie mit Pyrimidyl-Tetrazin-TAMRA (**22**). Werden die erhaltenen Ergebnisse für die *low-density labelling*-Reaktion mit AdoYnNorb (**7**) gegenüber der mit AdoYnVB (lang) (**17**) (3.3.1) verglichen, konnte eine gewünschte Reaktivitätssteigerung erreicht werden. Die beste Kombination für die *two-step* Markierungsreaktion besteht somit für den Einsatz des Cofektoranalogons AdoYnNorb (**7**) mit Pyrimidyl-Tetrazin-TAMRA (**22**), da so die höchste Reaktionsausbeute über zwei Schritte erhalten werden konnte. Mit durchschnittlich 1,5

gefundenen Fluorophoren auf den DNA-Strängen statt der erwarteten 3, ist die Ausbeute dabei jedoch nach wie vor nicht quantitativ.

Das Ziel dieser Arbeit besteht in der orthogonalen Detektion der epigenetischen DNA-Modifikationen 5-Methyl-Cytosin (5mC) und 5-Hydroxymethylcytosin (5hmC), sodass die Methylierungsdetektion möglichst vollständig ablaufen sollte. Aus diesem Grund wird für die orthogonale Reaktion nachfolgend statt der *two-step labelling*-Reaktion eine einstufige DNA-Markierung mit fluoreszierenden Cofaktoranaloga durchgeführt. Aus einer vorangegangenen Dissertation von Dr. Felix Schilcher^[165] ist bekannt, dass die einstufige Markierung mit bestimmten DNA-MTasen nahezu vollständig abläuft (Dissertation Schilcher, Abschnitt 3.6).

High density DNA-Labelling (M.TaqI/M.HhaI)

Zum Vergleich zwischen Adenin- und Cytosin-spezifischen DNA-MTasen wurde AdoYnNorB (**7**) mit M.TaqI^[154] (5'-TCGAA-3') und M.HhaI (tm) (5'-GCGC-3') auf T7-Phagen-DNA in einer zweistufigen Reaktion untersucht. Die Konzentration an M.TaqI betrug dabei 1 Äq. bezogen auf die 111 spezifischen TCGA-Erkennungssequenzen und die Konzentration an M.HhaI (tm) 10 Äq. bezogen auf die 103 spezifischen GCGC-Erkennungssequenzen. Die Konzentration des eingesetzten Cofaktors (**7**) betrug in allen Ansätzen, wie zuvor in Aktivitätstests (3.2.1) 80 µM. Zur Überprüfung des ersten Reaktionsschrittes erfolgte nach der Modifikation eine Restriktion mit R.TaqI bzw. R.HhaI und eine Analyse mittels Agarosegel-Elektrophorese (Abbildung 3.19, A). Dabei konnte die Vollständigkeit der enzymatischen Modifikation verifiziert werden, da im Agarosegel lediglich eine Bande für die Modifikation mit M.TaqI bzw. M.HhaI (tm) erhalten wurde. Diese können dem vollständig geschützten DNA-Substrat zugeordnet werden, da jeweils in den beiden Kontrollansätzen ohne Cofaktor (Abbildung 3.19 A, K1) und ohne DNA-MTase (Abbildung 3.19 A, K2) nach Zugabe der REasen R.TaqI bzw. R.HhaI die vollständigen Fragmentierungsmuster zu sehen waren. Anschließend wurden die Modifikationen für den zweiten Markierungsschritt mit dem Pyrimidyl-Tetrazin-TAMRA (**22**) (Abbildung 3.14 c) bei 37 °C über Nacht inkubiert. Die mit hoher Dichte fluoreszenzmarkierten DNA-Proben wurden anschließend nach der *Plug*-Aufreinigung am Fluoreszenzmikroskop analysiert (Abbildung 3.19).

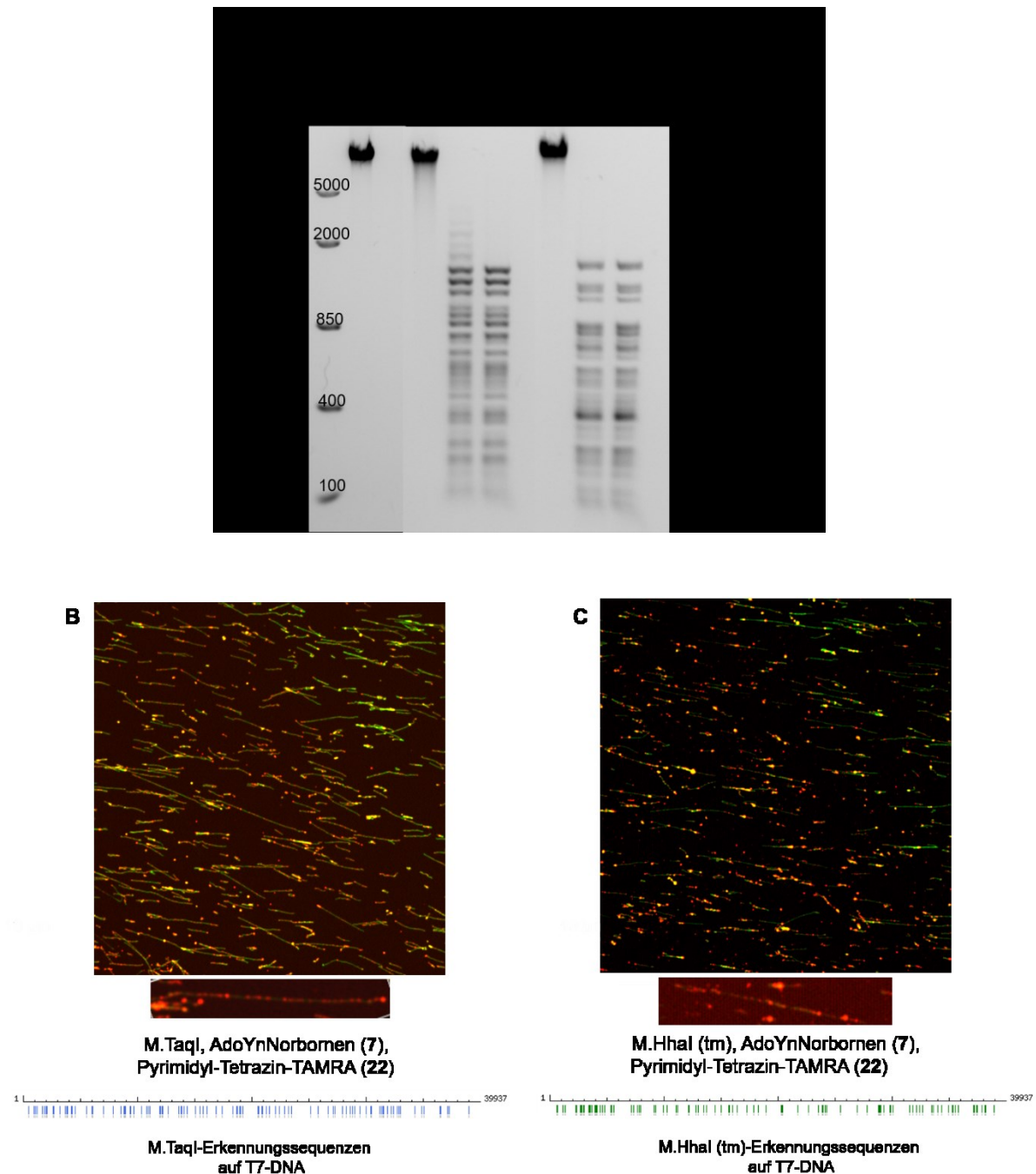


Abbildung 3.19: Gelelektrophoretische Analyse der Modifikationsreaktion von T7-DNA mit AdoYnNorbornen (7) und M.HhaI (tm) (5'-GCGC-3', *high density*) bzw. M.TaqI (5'-TCGA-3', *high density*), sowie ein DNA-Standard (MR, Spur 1), T7-DNA-Referenz (Spur 2) und jeweils zwei Kontrollen (K1: ohne Cofaktor und K2: ohne DNA-MTase) zur Verifizierung der Vollständigkeit des ersten Modifikationsschrittes (A). Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach der Klick-Reaktion mit Pyrimidyl-Tetrazin-TAMRA (22) für M.TaqI (B) und M.HhaI (tm) (C). Vollständige Kompositbilder (DNA-Kanal: grün, Aufnahmen bei 488 nm, Label-Kanal: rot, Aufnahmen bei 561 nm) der markierten und mittels DNA-Combing gestreckten DNA sowie ein dargestellter Ausschnitt des Label-Kanals zweier DNA-Einzelmoleküle. Außerdem ist eine Übersicht der Erkennungssequenzen der DNA-MTasen M.TaqI und M.HhaI (tm) auf T7-DNA mit erwartetem Markierungsmuster gezeigt (B, C, unten).

Sowohl für die CpG-methylierungsabhängige Adenin-spezifische DNA-MTase M.TaqI als auch für die Cytosin-spezifische DNA-MTase M.HhaI (tm) war die *two-step labelling*-Reaktion erfolgreich, da eine hohe Markierungsdichte erreicht und die Fluoreszenz über den gesamten Bereich der gestreckten DNA-Stränge detektiert werden konnte. Somit kann allgemein von einer erfolgreichen Fluoreszenzmarkierung gesprochen werden. Die exakte Quantifizierung der Reaktionsausbeuten der Markierungsreaktionen bezogen auf die theoretisch erwarteten Barcodes der DNA-MTasen ist jedoch aufgrund der Limitierung der Auflösung des Fluoreszenzmikroskops nicht möglich. Für die Methylierungsdetektion wird es zukünftig immer wichtiger, verlässliche Aussagen auf Basis der Analyse mit CpG-spezifischen DNA-MTasen treffen zu können. Mit der DNA-Cytosin-C5-MTase M.HhaI (tm) konnte eine direkt CpG-spezifische MTase verifiziert werden, mit der *two-step labelling*-Reaktionen für die Fluoreszenzmarkierung der DNA zur Ermittlung der epigenetischen Information direkt am Cytosin durchgeführt werden können.

Um die beiden epigenetischen Modifikationen 5mC und 5hmC orthogonal auf einem DNA-Strang über eine *two-step labelling*-Reaktion untersuchen zu können, müssen verschiedene Fluorophore eingesetzt werden. Diese dürfen sich in den Absorptions- und Emissionsbereichen nicht überschneiden. Neben dem Pyrimidyl-Tetrazin-TAMRA (**22**) wurde weiterhin das Pyrimidyl-Tetrazin-ATTO643 (**23**) und Pyrimidyl-Tetrazin-AF647 (**24**) mit AdoYnNorb (**7**) und M.TaqI auf T7-DNA untersucht. Die eingesetzten Tetrazine unterschieden sich in der chemischen Struktur nur durch die Wahl des gebundenen Fluorophors. Die Absorption des TAMRA-Fluorophors liegt dabei im grünen Bereich des sichtbaren Spektrums ($\lambda^{\text{Ex}} = 556 \text{ nm}$, $\lambda^{\text{Em}} = 563 \text{ nm}$; Jena Bioscience GmbH), während die Fluorophore ATTO643 ($\lambda^{\text{Ex}} = 643 \text{ nm}$, $\lambda^{\text{Em}} = 665 \text{ nm}$; Jena Bioscience GmbH), und AF647 ($\lambda^{\text{Ex}} = 648 \text{ nm}$, $\lambda^{\text{Em}} = 671 \text{ nm}$; Jena Bioscience GmbH), im roten sichtbaren Wellenlängenbereich absorbieren. Abbildung 3.20 zeigt die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen nach der Klick-Reaktion für die *high-density* Markierung mit den verschiedenen Fluorophoren.

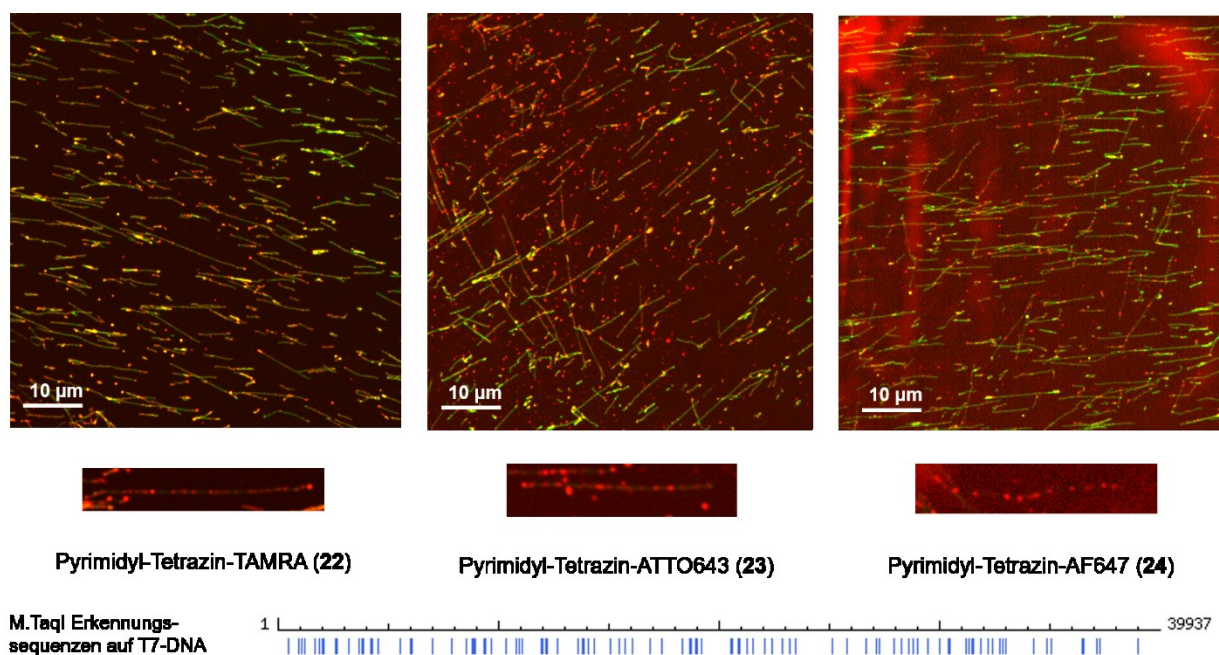


Abbildung 3.20: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach der Klick-Reaktion mit Pyrimidyl-Tetrazin-TAMRA (**22**), Pyrimidyl-Tetrazin-ATTO643 (**23**) und Pyrimidyl-Tetrazin-AF647 (**24**) mit M.TaqI und AdoYnNorb (**7**) modifizierter T7-DNA. Vollständige Kompositbilder (DNA-Kanal: grün, Aufnahmen bei 488 nm, Label-Kanal: rot, links Aufnahmen bei 561 nm und mitte rechts bei 640 nm) der markierten und mittels DNA-Combing gestreckten DNA sowie dargestellte Ausschnitte des Label-Kanals von DNA-Einzelmolekülen. Außerdem ist eine Übersicht der Erkennungssequenzen der DNA-MTase M.TaqI auf T7-DNA mit erwartetem Markierungsmuster gezeigt (unten).

Die DNA-Stränge, die durch den Interkalator YOYO-1 sichtbar gemacht wurden, sind in grün und die einzelnen Fluorophore in rot dargestellt. Das Strecken der DNA durch die Methode des DNA-Combing konnte für alle Proben mit verschiedenen Fluorophoren in ähnlich guter Qualität erreicht werden. Die Analyse der Markierungsreaktion für die verschiedenen Pyrimidyl-Tetrazinkonjugate wurde durch teilweise Überlagerungen von DNA-Strängen nicht wesentlich beeinflusst, da trotzdem sehr viele freiliegende DNA-Einzelstrangmoleküle gefunden werden konnten. Bei Betrachtung der in Abbildung 3.20 dargestellten DNA-Einzelmoleküle wird deutlich, dass die Markierung mit dem gebundenen TAMRA-Fluorophor augenscheinlich am besten funktioniert. Die Markierung mit Pyrimidyl-ATTO643 (**23**) verläuft in ähnlich guter Qualität, während vergleichbar wenige AF647 Fluorophore detektiert werden konnten. Für die Anregung der unterschiedlichen Fluorophore mussten jedoch verschiedene Laser verwendet werden (TAMRA: 561 nm, ATTO643 und AF647: 640 nm), welche sich in ihrer Stärke und Qualität unterscheiden. Daher können sich Unterschiede hinsichtlich der direkten Vergleichbarkeit der Fluorophore untereinander ergeben. Eine mögliche Ursache für

die geringere Detektion der mit Pyrimidyl-Tetrazin-AF647 (**24**) markierten Proben könnte die Lichtempfindlichkeit der AF647-Fluorophore sein. Der spezifische Aufbau des verwendeten Fluoreszenzmikroskops sorgte für eine andauernde Bestrahlung des roten Lasers (640 nm), wodurch eventuell markierte Positionen ausgebleichen und somit nicht mehr zu detektieren waren. Eine exakte Quantifizierung der Ergebnisse mit einem computergestützten Programm war hier jedoch ebenfalls aufgrund der hohen Markierungsdichte durch die DNA-MTase M.TaqI nicht möglich, weshalb nur von einem generellen Erfolg der *two-step labelling* Reaktion mit den verschiedenen Pyrimidyl-Tetrazinkonjugaten (**22**, **23**, **24**) gesprochen werden kann. Mit Hinblick auf das übergeordnete Ziel dieser Arbeit konnten zwei verschiedene Fluorophore gefunden werden, die zur orthogonalen Detektion der epigenetischen Modifikationen 5mC und 5hmC eingesetzt werden können. TAMRA und ATTO643 lieferten ähnliche Ergebnisse für die Markierung mit M.TaqI und AdoYnNorb (**7**) auf T7-DNA und emittieren darüber hinaus Photonen unterschiedlicher Wellenlängen ohne Überlagerung der Absorptions- und Emissionsspektren.

Eine MTase katalysierte Übertragung einer aromatischen Vinylmodifikation oder einer Norborneneinheit für eine anschließende IEDDA-Klick-Reaktion mit Tetrazinkonjugaten wurde bereits in der Literatur beschrieben.^[119,122] Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden die Untersuchungen jedoch ausgeweitet und die zweistufige Markierung mit den Cofaktoranaloga AdoVB (**6**) und AdoYnNorb (**7**) und DNA-MTasen sowie anschließend mit fluoreszierenden Tetrazinkonjugaten genauer quantifiziert. Zum einen wurde für die Bestimmung der Aktivitäten der Cofaktoranaloga mit DNA-MTasen lange DNA (T7-Phagen-DNA) eingesetzt, während bisherige Analysen nur mit RNA oder kurzer pBR322-Plasmid-DNA durchgeführt wurden.^[122] Für die vorliegende Arbeit wurden verschiedene Adenin- und Cytosin-spezifische DNA-MTasen hinsichtlich der Enzym-katalysierten Übertragungsreaktion mit vinylischen Cofaktoranaloga untersucht, während in der Literatur lediglich die RNA-MTase Ecm1 oder die DNA-MTase M.TaqI zum Einsatz kamen. Die Überprüfung einer erfolgreichen Modifikation konnte für die RNA-Modifikation nur durch HPLC-Analysen an kurzen Dinukleotiden erfolgen. In dieser Arbeit konnten die DNA-Modifikationen hingegen auszuführlich durch Agarosegel-Elektrophorese nach Zugabe einer kognaten REase überprüft werden.^[119,122] Außerdem wurde die zweistufige Markierungsreaktion zur Methylierungsdetektion ausgiebig mittels Fluoreszenzmikroskopie von DNA-Einzelmolekülen charakterisiert. Dazu wurde die IEDDA-Klick-Reaktion zusätzlich hinsichtlich der Reaktionsausbeute durch den Einsatz der *low-density* DNA-MTase M.BseCI an Einzelmolekülen durch optisches DNA-Mapping

untersucht. Weiterhin wurde in der vorliegenden Arbeit zusätzlich das Cofaktoranalogen AdoYnVB (lang) (**17**) fluoreszenzmikroskopisch hinsichtlich der Ausbeute der zweistufigen Reaktion analysiert, das durch einen Linker den Abstand der Reportergruppe zum reaktiven Zentrum im Gegensatz zum kurzen AdoVB (**6**) erhöhen sollte. Außerdem wurden AdoMet-Analoga mit einer Dreifachbindung im Gegensatz zu Analoga mit einem Phenylring zur Doppelaktivierung von wesentlich mehr DNA-MTasen akzeptiert. Dies sollte für eine generelle Anwendung der Cofaktoren zur Übertragung einer aktivierten Vinylgruppe von entscheidendem Vorteil sein.

3.4 Einstufige DNA-Modifikation

Der nachfolgende Abschnitt beschreibt eine einstufige DNA-Markierungsreaktion (*one-step labelling*-Reaktion) für die epigenetische Methylierungsdetektion durch fluoreszierende Reportermoleküle und findet Anwendung im Bereich des optischen DNA-Mappings von genomischer DNA.^[126,127] Dabei erfolgt eine Enzym-katalysierte Modifikation mit einer DNA-MTase und einem Cofaktoranalogon, wobei das fluoreszierende Reportermolekül innerhalb der Seitenkette des Cofaktors unter Abspaltung von AdoHcy (**2**) sequenzspezifisch direkt auf die DNA übertragen wird. Die einstufige DNA-Markierungsreaktion kann allgemein der Methode des *methyltransferase-directed-Transfer of Activated Groups* (mTAG) zugeordnet werden.^[40,114–116] Genau wie für das *two-step DNA-labelling* (3.3) wird auch für die Analyse der einstufigen DNA-Modifikation die Methylierungssensitivität der kognaten REasen genutzt (3.2), um die quantitative Alkylierung der Erkennungssequenzen durch die DNA-MTase mittels Agarosegel-Elektrophorese zu verifizieren. Die fluoreszenzmarkierte DNA kann abschließend mittels Fluoreszenzmikroskopie zur Ermittlung der epigenetischen Information analysiert werden. Die nachfolgende Abbildung 3.21 zeigt schematisch das Prinzip der einstufigen DNA-Markierungsreaktionen.

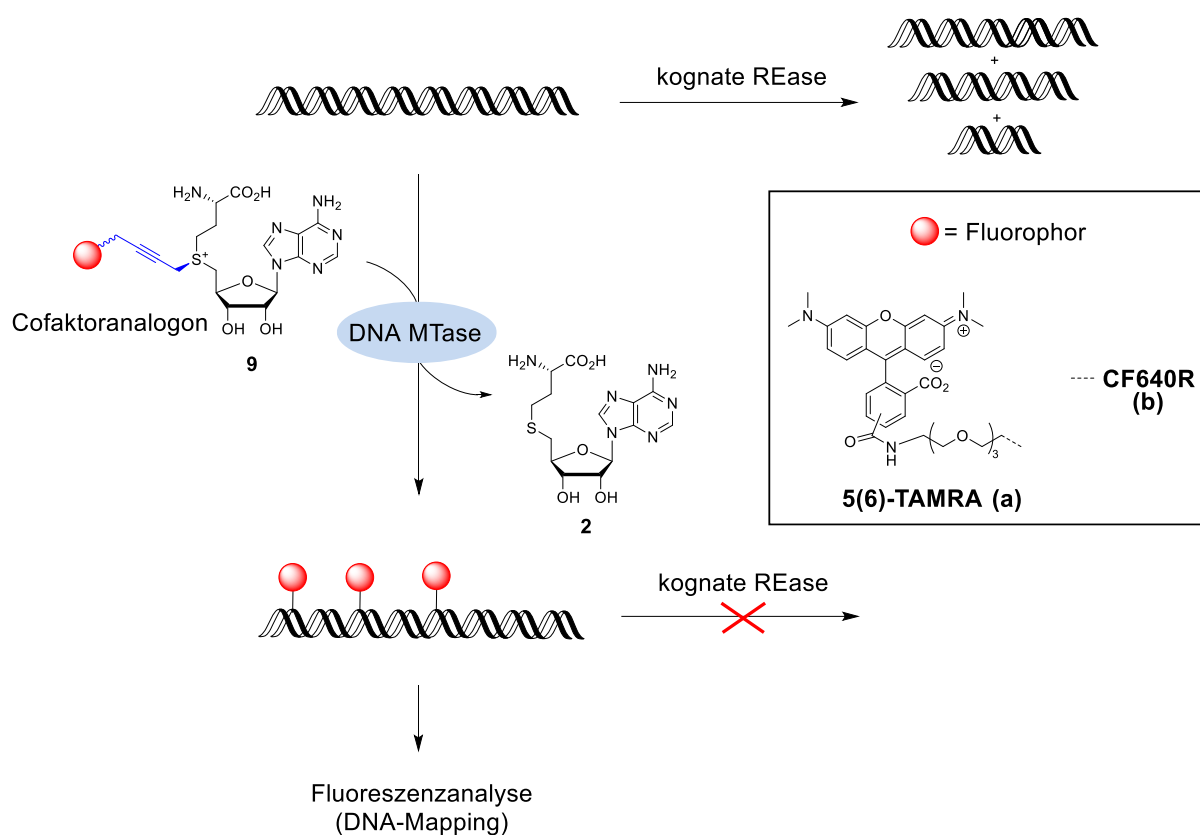


Abbildung 3.21: Schematische Darstellung der einstufigen DNA-Modifikation zur Fluoreszenzmarkierung von DNA. Die Seitenkette eines fluoreszierenden doppeltaktivierten AdoMet-Analogons wird sequenzspezifisch auf die DNA übertragen. Die Verifizierung der Alkylierungsreaktion hinsichtlich der Vollständigkeit der Reaktion erfolgt mittels kognater und agarosegelelektrophoretischer Analyse. Die Fluorophore wurden als rote Kugel dargestellt. Bei dem Fluorophor CF640R handelt es sich um eine geschützte Verbindung, dessen Struktur nicht eindeutig bekannt ist.

Für die einstufigen DNA-Modifikationen wurde λ -Phagen-DNA, PCR- λ -DNA und genomische Human-DNA (Brustkrebszelllinie, UK Aachen) mit den DNA-MTasen M.BseCI (5'-ATCGAT-3'), M.TaqI (5'-TCGA-3') und EcoDam (5'-GATC-3') markiert. Als fluoreszierende Cofaktoranaloga wurden entweder AdoYnTAMRA (8) (arbeitskreisintern synthetisiert von Sascha Peters) oder AdoYnCF640R (20) (arbeitskreisintern synthetisiert von Polina Aseeva) verwendet.

Die erhaltenen Analyseproben wurden einerseits in Kooperation mit dem AK Wöll (IPC, RWTH Aachen University) am institutseigenen Fluoreszenzmikroskop analysiert, wobei genomische λ -Phagen-DNA oder PCR- λ -DNA mittels der Methode des DNA-Combing und einer literaturbekannten Oberflächensilanisierung des Deckgläschens gestreckt und immobilisiert wurden.^[146] Die Interkalation mit dem YOYO-1 Cyaninfarbstoff sowie die

Analyse der eingebrachten Fluorophore erfolgten analog zu Abschnitt 3.3.1. Die Kompositbilder wurden ebenfalls durch Überlagerung der Aufnahmen des Label-Kanals mit Aufnahmen des DNA-Kanals mittels des Programms Image J (v1.51k Fiji) erhalten (Abbildung 3.15).^[163,164]

Weiterhin wurde fluoreszenzmarkierte genomische Human-DNA in Kooperation mit Prof. Yuval Ebenstein von der Tel Aviv University in Israel zur Quantifizierung des Methylierungsgrades auf einem *multi-sample array* Chip fluoreszenzmikroskopisch analysiert.^[166] Nachfolgend wird zur Auswertung und besseren Visualisierung der markierten genomischen DNA, der DNA-Kanal immer in grün und der Label-Kanal in rot dargestellt. Für die kürzere markierte PCR- λ -DNA werden keine Farben verwendet, um die Kontraste der Bilder möglichst hoch und das Signal-Rausch-Verhältnis möglichst gering zu halten.

3.4.1 Untersuchung der einstufigen DNA-Markierung von λ -DNA und PCR-Produkt mit fluoreszierenden Reportergruppen

Zur Bestimmung der Reaktionsausbeute und zur optischen Analyse der einstufigen Markierung am Fluoreszenzmikroskop wurde genomische λ -Phagen-DNA mit M.BseCI^[45] (5'-ATCGAT-3', 10 Äq. bezogen auf 15 spezifische Erkennungssequenzen) und AdoYnTAMRA (**8**) (80 μ M) modifiziert und mittels DNA-*Combing* an einer Glasoberfläche gestreckt und immobilisiert. Die eingesetzten Konzentrationen für die DNA-MTase sowie das fluoreszierende Cofaktor-Analogon wurden aufgrund von Aktivitätstests aus früheren Arbeiten von Matyas Juhasz (AK Weinhold, RWTH Aachen University) und Dr. Felix Schilcher^[165] gewählt. Die Verifikation der Alkylierung der N6-Position des zweiten Adenins in der palindromischen Erkennungssequenz erfolgte durch Agarosegel-Elektrophorese nach Zugabe der kognaten REase R.ClaI^[154,158]. Da M.BseCI auf λ -DNA 15 spezifische ATCGAT-Erkennungssequenzen besitzt, konnte die Reaktionsausbeute aufgrund der niedrigen Markierungsdichte am Fluoreszenzmikroskop quantifiziert werden (Abbildung 3.22).

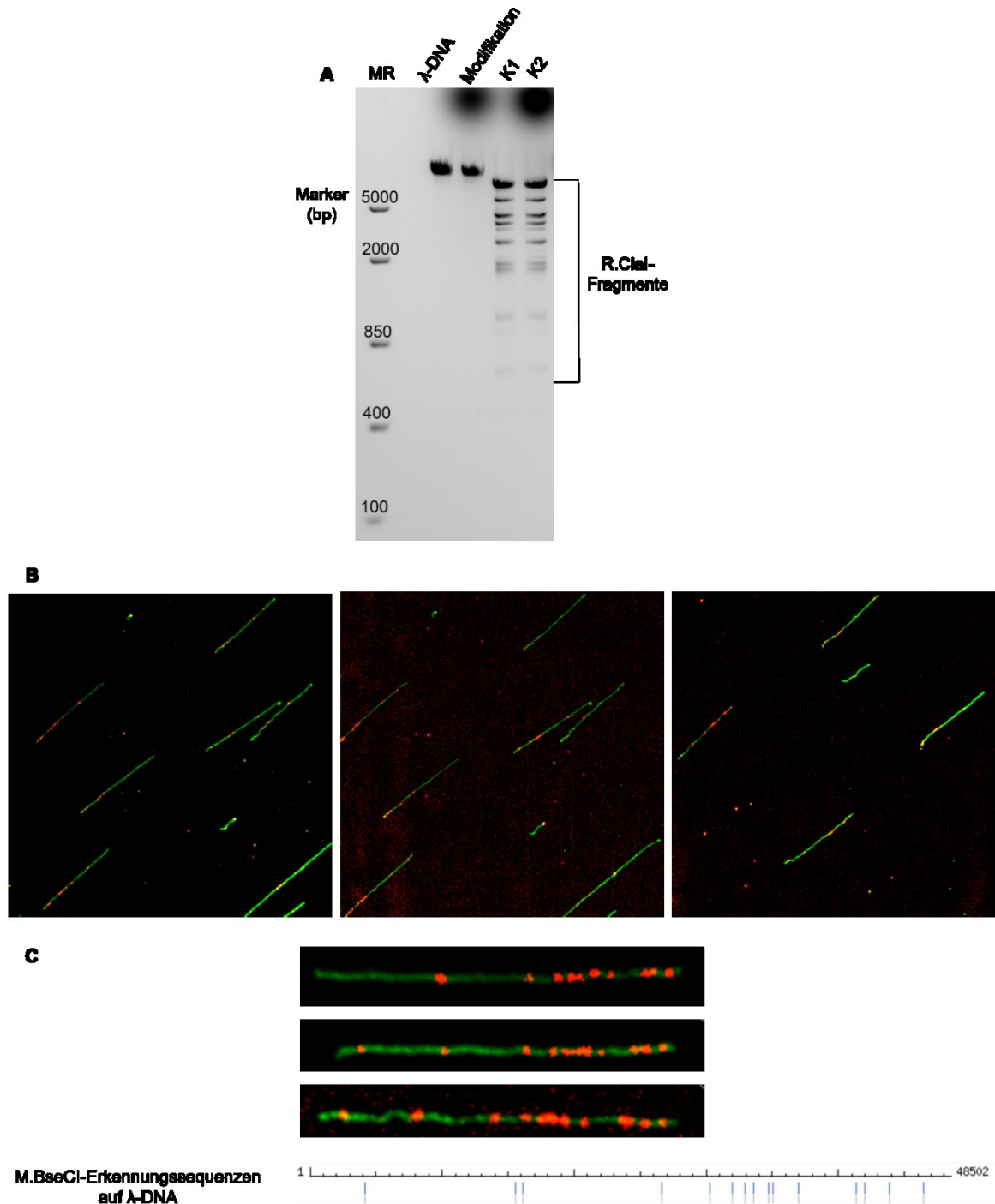


Abbildung 3.22: Gelelektrophoretische Analyse der einstufigen Modifikationsreaktion von λ -DNA mit AdoYnTAMRA (8) und M.BseCI (5'-ATCGAT-3', *low density*), sowie ein DNA-Standard (MR, Spur 1), λ -DNA-Referenz (Spur 2) und zwei Kontrollen (K1: ohne Cofaktor und K2: ohne DNA-MTase) zur Verifizierung der Vollständigkeit der Alkylierung (**A**). Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (Kompositbilder, DNA-Kanal: grün, Aufnahmen bei 488 nm, Label-Kanal: rot, Aufnahmen bei 561 nm) der mittels DNA-Combing gestreckten TAMRA-modifizierten λ -DNA (**B**). Die meisten DNA-Einzelmoleküle liegen gestreckt und einheitlich gerichtet vor. Ausschnitte von TAMRA-modifizierten λ -

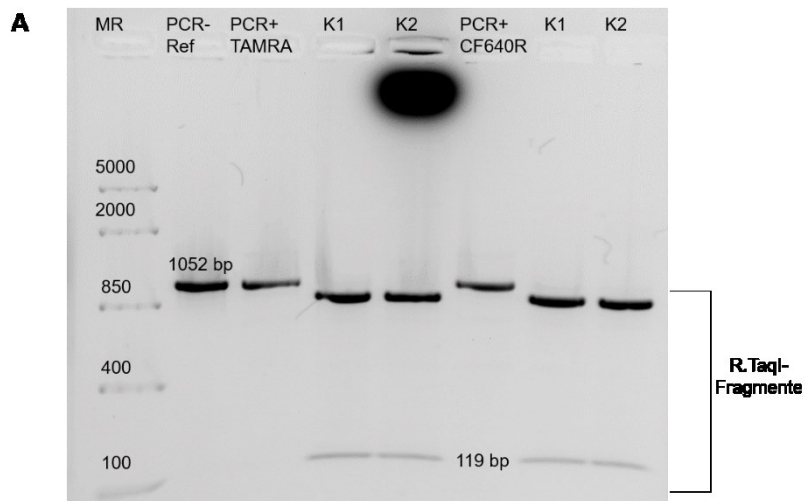
DNA-Einzelmolekülen und eine Übersicht der Erkennungssequenzen der DNA-MTase M.BseCI auf λ -DNA mit theoretischem Markierungsmuster (C).

Wie das Agarosegel in Abbildung 3.22 zeigt, war die enzymatische Markierung von λ -DNA mit M.BseCI und AdoYnTAMRA (8) erfolgreich, da lediglich eine Bande im Gel erkennbar ist (Abbildung 3.22 A, Spur 3). Verglichen mit der λ -DNA-Referenz (Abbildung 3.22 A, Spur 2, ohne REase) und den beiden Kontrollspuren (3.22 A, K1: ohne Cofaktor und K2: ohne DNA-MTase) kann diese Bande dem vollständig geschützten DNA-Substrat zugeordnet werden, da nach der Restriktion mit R.ClaI keine Fragmentierung und demnach eine vollständige DNA-Markierung aller M.BseCI-Erkennungssequenzen erhalten wurde. Für die Probe ist im Gel ein weiteres Fluoreszenzsignal oberhalb der Geltaschen zu erkennen, das auf freien AdoYnTAMRA-Cofaktor (8) bzw. dessen etwaige Zerfallsprodukte (Thioether) zurückgeführt werden kann.

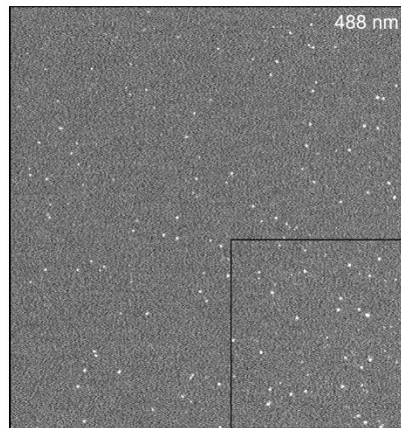
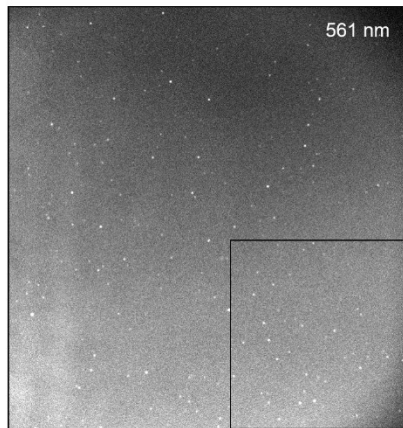
Um die Ausbeute der Reaktion möglichst gut quantifizieren zu können, wurde die modifizierte DNA mittels Agarose-Plugs aufgereinigt, um den Überschuss an noch freiem fluoreszierenden Cofaktoranalogen zu entfernen (5.2.7) und um ein möglichst gutes Signal-Rausch-Verhältnis zu gewährleisten. Abbildung 3.22 B zeigt weiterhin die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der TAMRA-markierten DNA sowie die erwarteten theoretischen 15 Positionen (spezifischer Barcode) der Fluorophore auf λ -DNA für die *low-density* DNA-MTase M.BseCI. Die DNA-Stränge, die durch den Interkalator YOYO-1 sichtbar gemacht wurden, sind in grün, die einzelnen TAMRA-Fluorophore in rot dargestellt. Erkennbar sind mehrere DNA-Einzelmoleküle, die alle mittels DNA-Combing sehr gut gestreckt werden konnten. Außerdem ist die DNA-Menge auf dem Probenträger optimal, da keinerlei Überlagerung von DNA-Einzelmolekülen stattgefunden hat und die Analyse der Reaktionsausbeute somit nicht beeinträchtigt wurde. Weiterhin war die Aufreinigung sehr erfolgreich, da kaum Hintergrundsignale, die auf noch freie Moleküle mit gebundenem TAMRA-Fluorophor zurückzuführen sind, detektiert wurden. Vergleicht man die dargestellten und vergrößerten λ -DNA Einzelmoleküle in Abbildung 3.22 B mit dem theoretisch erwarteten Barcode, stimmen die erhaltenen Fluoreszenzmuster augenscheinlich alle sehr gut mit dem erwarteten Markierungsmuster überein, weshalb generell von einer sehr erfolgreichen Markierung gesprochen werden kann. Teilweise liegen jedoch mehrere M.BseCI-Erkennungssequenzen auf λ -DNA nah aneinander, weshalb mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops, aufgrund der Limitierung der Auflösung, nicht jede Fluoreszenzmarkierung erfasst werden kann. In einer früheren Dissertation von Dr. Felix Schilcher^[165] wurde die einstufige Markierung (*low density*) der λ -DNA durch AdoYnTAMRA (8) ausführlich durch einen eigens geschriebenen,

computergestützten Algorithmus zur Quantifizierung der Reaktionsausbeute untersucht. Aufgrund der limitierten Auflösung des institutseigenen Fluoreszenzmikroskops (AK Wöll), konnte das Programm lediglich 11 der ursprünglichen 15 Erkennungssequenzen erfassen. Bezogen auf diese 11 *Map entries* wurden in 100 Bildern 405 Einzelmoleküle repräsentativ analysiert und durchschnittlich 10,4 Label detektiert. Verglichen mit dem *two-step DNA-labelling* (3.3) konnte mit dem *one-step DNA-labelling* eine wesentlich höhere Reaktionsausbeute (nahezu 100 %) erzielt werden, weshalb nachfolgend für die orthogonale Markierung epigenetischer Marker diese Methode zur Methylierungsdetektion bevorzugt verwendet wird.

Um die orthogonale Markierung mit Hinblick auf das Ziel dieser Arbeit beurteilen und quantifizieren zu können, wurde ein definiertes PCR-Produkt (1052 Bp) aus λ -DNA-Templat hergestellt (5.2.8), das in seiner Sequenz genau eine spezifische Position für die DNA-MTase M.TaqI (5'-TCGA-3') und eine 5hmC-Modifikation aufweist (Anhang, B.1). Somit können auf diesem Substrat beide Einzelmodifikationen sowie die gewünschte orthogonale Reaktion hinsichtlich der Ausbeute der Reaktion analysiert werden. Für die CpG-Methylierungsdetektion wurde die PCR- λ -DNA mit M.TaqI (5'-TCGA-3', 1 Äq. bezogen auf die spezifische Erkennungssequenz) und den fluoreszierenden Cofaktoranaloge AdoYnTAMRA (**8**) oder AdoYnCF640R (**20**) (80 μ M) modifiziert und bei 37 °C über Nacht inkubiert. M.TaqI überträgt dabei die fluoreszierende Reportergruppe der Seitenkette des Cofaktoranalogons zwar auf die N6-Position des Adenins und nicht auf die gewünschte C5-Position des Cytosins, ist aber indirekt CpG-methylierungsabhängig. Wenn das Cytosin innerhalb der TCGA-Erkennungssequenz methyliert vorliegt, kann M.TaqI Adenin nicht mehr modifizieren und durch eine anschließende Restriktionsreaktion mit der zugehörigen REase kann die fehlende Modifikation an dieser Position nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wird die DNA-MTase M.TaqI im Folgenden zur Methylierungsdetektion in einer einstufigen Markierungsreaktion eingesetzt. Die Verifikation der Alkylierung des Adenins in der palindromischen TCGA-Erkennungssequenz erfolgte nach Einsatz der zugehörigen REase R.TaqI durch Agarosegel-Elektrophorese (Abbildung 3.23 A). Bei einer fehlenden Modifikation erhält man Fragmente mit einer Länge von 119 Bp und 933 Bp, während bei erfolgreicher Modifikation hingegen nur eine Bande im Gel erkennbar ist. Nach der DNA-Aufreinigung mit Hilfe des *QIAquick® PCR-Purification Kit* zur Entfernung freier Fluorophore wurden die Proben an einer oberflächenmodifizierten Glasplatte immobilisiert^[146] und zur Quantifizierung der Reaktion am Fluoreszenzmikroskop analysiert (Abbildung 3.23 B, C).



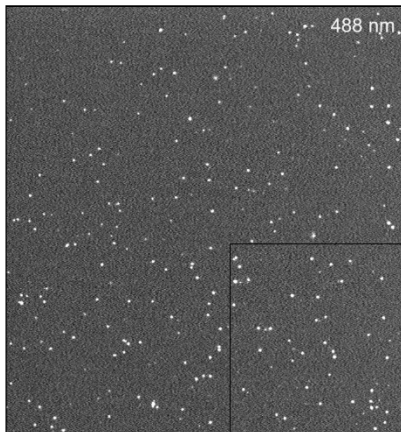
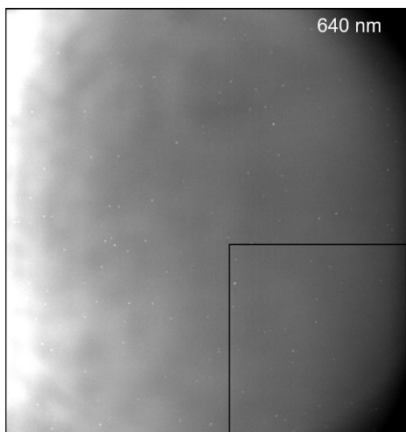
B – AdoYnTAMRA (8)



488 nm: 10 frames, 50 ms, 250 EMCCD
561 nm: 10 frames, 100 ms, 250 EMCCD

DNA: 45;
Label: 39;
davon auf DNA: 33;
Freie Label: 6
→ 15 % Hintergrundsignal
→ 73 % Markierungsausbeute

C – AdoYnCF640R (20)



488 nm: 10 frames, 50 ms, 250 EMCCD
640 nm: 10 frames, 100 ms, 250 EMCCD

DNA: 57;
Label: 36;
davon auf DNA: 36;
Freie Label: 0
→ 0 % Hintergrundsignal
→ 63 % Markierungsausbeute

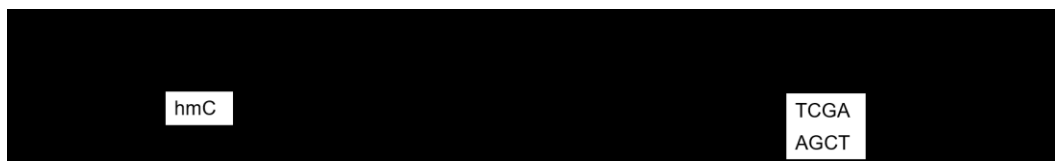


Abbildung 3.23: Gelelektrophoretische Analyse der einstufigen Modifikationsreaktion von PCR- λ -DNA (1052 Bp) mit AdoYnTAMRA (**8**) oder AdoYnCF640R (**20**) und M.TaqI (5'-TCGA-3'), sowie ein DNA-Standard (MR, Spur 1), PCR- λ -Referenz (Spur 2) und zwei Kontrollen (K1: ohne Cofaktor und K2: ohne DNA-MTase) zur Verifizierung der Vollständigkeit der enzymatischen Übertragung (**A**). Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (DNA-Kanal: Aufnahmen bei 488 nm, Label-Kanal: Aufnahmen bei 561 bzw. 640 nm) der mittels Oberflächensilanisierung immobilisierten TAMRA- oder CF640R-modifizierten PCR- λ -DNA (**B, C**). Es wurden 10 Bilder mit einer Belichtungszeit von 50 ms für den DNA-Kanal aufgenommen und je 10 Bilder mit einer Belichtungszeit von 100 ms für die Label-Kanäle. Für alle Aufnahmen in allen Kanälen wurde eine EMCCD-Verstärkung von 250 gewählt. Außerdem ist die Struktur des verwendeten PCR- λ -Substrats gezeigt (**D**).

Abbildung 3.23 A zeigt deutlich, dass für beide fluoreszierende Cofaktoranaloga eine vollständige Modifikation der TCGA-Sequenz innerhalb der PCR- λ -DNA erreicht werden konnte, da die Banden der modifizierten DNA-Proben auf selber Höhe laufen, wie die Referenzprobe (3.23 A, Spur 2). Die beiden Kontrollspuren, die jeweils ohne Cofaktor (3.23 A, K1) oder ohne DNA-MTase (3.23 A, K2) aber mit der REase R.TaqI angesetzt wurden, zeigen hingegen eine Fragmentierung der DNA. Man erkennt deutlich das durch R.TaqI abgeschnittene Fragment der Länge 119 Bp, sowie das größere Fragment mit einer Länge von 933 Bp, das etwas unterhalb der vollständig geschützten DNA-Bande (1052 Bp) läuft. Die Größen der erhaltenen Fragmente stimmen außerdem sehr gut mit den erwarteten DNA-Banden eines aufgetragenen DNA-Standards (3.23 A, Spur 1) überein.

Abbildungen 3.23 B und C zeigen die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Markierung von PCR- λ -DNA mit M.TaqI und AdoYnTAMRA (**8**) bzw. AdoYnCF640R (**20**). Die DNA, die durch den Interkalator YOYO-1 sichtbar gemacht wurde, ist ähnlich wie die Fluorophore im Label-Kanal aufgrund ihrer geringen Länge nur als einzelner Punkt (*single-spot*) und nicht als gestrecktes Einzelmolekül zu erkennen. Da das verwendete DNA-Substrat nur genau eine spezifische Position für die DNA-MTase M.TaqI enthält (Abbildung 3.23, D), sollte die Markierung auch nur an dieser Stelle auf der DNA erfolgen. Die Aufnahmen des DNA-Kanals (488 nm) wurden den Aufnahmen des Label-Kanals (561 nm für TAMRA, 640 nm für CF640R) gegenübergestellt. Um einen möglichst hohen Kontrast der einzelnen Fluorophore zu erreichen, wurden die Bilder in schwarz-weiß und nicht farbig dargestellt. Für die Darstellung der DNA wurden am Fluoreszenzmikroskop 10 Bilder mit einer Belichtungszeit von 50 ms aufgenommen. Für den Label-Kanal wurden ebenfalls 10 Bilder mit einer höheren Belichtungszeit von 100 ms aufgenommen, um möglichst viele Fluorophore detektieren zu können, ohne diese jedoch bereits vor Detektion durch eine zu lange Bestrahlung

auszubleichen. Die Auswertung erfolgte durch Auszählung bestimmter definierter Bereiche der Bilder für den DNA-Kanal und den zugehörigen Label-Kanal (Abbildung 3.23, schwarzer Kasten) sowie des Kompositbildes der beiden übereinandergelegten Kanäle. Dabei wurde bestimmt, wie viele DNA-Punkte, wie viele Fluorophore und wie viele Fluorophore frei bzw. auf der DNA detektiert werden konnten. Somit konnte sowohl das erhaltene Hintergrundsignal als auch die Markierungsausbeute der einstufigen Reaktion zur Methylierungsdetektion beurteilt werden. Für die Modifikation mit dem TAMRA-Fluorophor ergaben sich die besten Ergebnisse mit einer Reaktionsausbeute von 73 %. Die Markierung mit AdoYnCF640R (**20**) ergab eine etwas niedrigere Ausbeute von 63 %, jedoch auch keine freien Fluorophore mehr, während für AdoYnTAMRA (**8**) noch ca. 15 % Hintergrundsignal detektiert wurde. Die etwas niedrigeren Werte für den CF640R-Fluorophor könnten mit dem spezifischen Aufbau des institutseigenen Fluoreszenzmikroskops zusammenhängen, da für den roten Laser (640 nm) eine andauernde Bestrahlung besteht und somit vorhandene Label vor der Detektion ausgebleichen werden könnten. Außerdem sind die Mikroskopieaufnahmen für den roten Laser immer mit einem Gradientenverlauf des Kontrasts im Bild verbunden, was die Auswertung einzelner Fluorophore beeinträchtigt, da diese schwer erkennbar werden können. Um die Reaktionsausbeute genauer beurteilen zu können, wurde ein weiteres PCR- λ -Substrat hergestellt, das einen gebundenen internen TAMRA-Standard bereits in der Sequenz beinhaltet, ohne, dass eine Modifikation stattfinden muss. Es konnte somit beurteilt werden, wie gut der TAMRA-Fluorophore aufgrund des individuellen Aufbaus des Mikroskops tatsächlich detektiert werden kann. Die erhaltene relative Ausbeute konnte anschließend auf die erhaltene Markierungsausbeute zur Quantifizierung der Modifikation mit AdoYnTAMRA (**8**) umgerechnet werden. Die fluoreszenzmikroskopische Messung des PCR- λ -Substrats mit interner TAMRA-Modifikation lieferte 84,7 % detektierbare Fluorophore und bestätigte somit die Annahme, dass nicht 100 % der vorhandenen Label am Mikroskop detektiert werden konnten (Anhang Abbildung A12). Bezieht man diesen Wert auf die Modifikation der PCR- λ -DNA mit M.TaqI und AdoYnTAMRA (**8**), verbessert sich die Markierungsausbeute von 73 % auf 86 %. Dies entspricht der sehr guten Markierungsausbeute mit AdoYnTAMRA (**8**) und M.BseCI (Abbildung 3.22).

Um feststellen zu können, wie hoch die tatsächliche Reaktionsausbeute für die Markierung mit dem CF640R-Fluorophor mit Hinblick auf die Limitierung des Mikroskops ist, müsste weiterhin ein PCR-Substrat mit interner CF640R-Modifikation hergestellt werden. Dies wurde im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht realisiert. Weiterhin müsste zur genauen Quantifizierung der Reaktionsausbeuten ein computergestützter Algorithmus entwickelt werden, der alle

aufgenommenen Bilddateien in allen Bereichen automatisiert ausgewertet. Generell konnte jedoch für das *one-step DNA-labelling* mit zwei verschiedenen fluoreszierenden Cofaktoranaloga und der CpG-abhängigen DNA-MTase M.TaqI gute bis sehr gute Reaktionsausbeuten erreicht werden. Mit Hinblick auf das endgültige Ziel der orthogonalen Markierung der epigenetischen Marker 5mC und 5hmC ist dies besonders wichtig, da es Flexibilität hinsichtlich der Fluorophore für die Methylierungsdetektion bietet.

3.4.2 Untersuchung der einstufigen DNA Modifikation mit AdoYnTAMRA im humanen Genom

Für die nachfolgende einstufige Markierungsreaktion wurde genomische Human-DNA (Brustkrebszelllinie, UK Aachen) mit M.TaqI oder EcoDam und AdoYnTAMRA (8) (arbeitskreisintern synthetisiert von Sascha Peters) zur Quantifizierung des Methylierungsgrades mittels Fluoreszenzmikroskopie umgesetzt. Die Proben wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Yuval Ebenstein der Tel Aviv University in Israel untersucht. Dazu wurde die fluoreszenzmarkierte DNA auf einem *multi-sample array* Chip appliziert (Abbildung 3.24, B), bei dem das Fluoreszenzsignal der markierten epigenetischen Information und das Absorptionssignal der angefärbten DNA mit einem kommerziellen Lesegerät für eine große Anzahl an Proben bestimmt werden kann (Abbildung 3.24, C). Die Chips wurden mit Epoxid beschichtet. Außerdem wurde der Probenträger mit einer hydrophoben Teflonmaske (90 Vertiefungen für Probenapplikation) beschichtet, die dabei so konzipiert wurde, dass das Probenvolumen (μL) durch Oberflächenspannung in einem definierten Bereich gehalten wird.^[167] Weiterhin ist der Detektionsbereich mit dem positiv geladenen Polymer Poly-l-Lysin beschichtet, das mit der negativ geladenen DNA eine elektrostatische Bindung eingeht. Poly-l-Lysin ist ein Homopolymer, das eine aliphatische Seitenkette mit einem primären Amin enthält. Diese Aminogruppe liegt im sauren sowie neutralen pH-Bereich (unter pH 9) vollständig protoniert vor und ermöglicht damit die elektrostatische Bindung der DNA in den Proben.^[167,168] Die Analyse und Auswertung wurde von Sigal Avraham der Arbeitsgruppe von Prof. Yuval Ebenstein durchgeführt. Die Aufnahme der TAMRA-Fluoreszenz erfolgte dabei mit einem Laser der Wellenlänge $\lambda = 532 \text{ nm}$, die Quantifizierung der DNA-Fluoreszenz (EvaGreen) mit einem Laser der Wellenlänge $\lambda = 488 \text{ nm}$. Um eine mögliche frühzeitige Auslöschung der TAMRA-Fluorophore zu vermeiden, wurde die TAMRA-Fluoreszenz stets vor der EvaGreen-Färbung detektiert. Die erhaltenen Bilddateien wurden mit dem Bildanalyseprogramm ImageJ 30 ausgewertet, wobei die mittlere Fluoreszenzintensität in jeder Probenvertiefung für beide Laserkanäle bestimmt wurde.

Außerdem wurde stets eine Kontrollprobe zur Ermittlung des TAMRA-Hintergrundsignals analysiert und von der modifizierten Probe subtrahiert.^[167] Zur Darstellung der erhaltenen Ergebnisse der Modifikation von genomischer Human-DNA mit M.TaqI bzw. EcoDam und AdoYnTAMRA (8) zur Bestimmung der epigenetischen Information, wurden das erhaltene Fluoreszenzsignal auf die tatsächliche DNA-Menge normalisiert und Mittelwerte sowie die Standardabweichung angegeben (Abbildung 3.24, D).

3.4.2.1 Untersuchung der DNA-Modifikation mit M.TaqI und EcoDam

Zur optischen Analyse von genomischer Human-DNA (Brustkrebszelllinie, UK Aachen) hinsichtlich der Methylierung, wurde das Substrat mit M.TaqI (0,5 Äq. bezogen auf $1,6 \times 10^6$ 5'-TCGA-3'-Erkennungssequenzen in humaner DNA) und AdoYnTAMRA (8) (10 μ M) modifiziert und mit dem *Oligo Clean & Concentrator*TM Kit von Zymo Research aufgereinigt. Die Adenin-spezifische DNA-MTase M.TaqI kann zur Ermittlung der CpG-Methylierung des betrachteten Genoms genutzt werden, da sie CpG-methylierungsabhängig ist. M.TaqI kann das Zieladenin der palindromischen Erkennungssequenz nicht modifizieren, sobald das Cytosin innerhalb der TCGA-Erkennungssequenz als 5-Methylcytosin vorliegt. Für die epigenetische Forschung ist die Methylierungsdetektion in Tumorgewebe sehr bedeutsam, da die Genregulierung über die Einbringung von Methylgruppen auf die C5-Position des Cytosins für bestimmte Krebsarten in Promotorregionen gestört ist. Somit kommt es zu einer Veränderung des Methylierungsmusters.^[67,108] Im Vergleich zu den bisher diskutierten Markierungsreaktionen, wurde hier eine geringere Konzentration des fluoreszierenden Cofaktoranalogs AdoYnTAMRA (8) eingesetzt, damit möglichst viel überschüssiger Cofaktor entfernt und ein möglichst geringes Hintergrundsignal gewährleistet werden konnte. Der Nachweis einer vollständigen Modifikation für diese Cofaktorkonzentration auf genomischer λ -DNA wurde bereits in einer früheren Dissertation ausführlich untersucht.^[165] Die Markierung der 5'-TCGA-3'-Sequenzen im Humangenom mit M.TaqI und AdoYnTAMRA (8) wurde durch die kognate REase R.TaqI überprüft. Die agarosegelelektrophoretische Analyse ist in Abbildung 3.24 A gezeigt. Die dritte Spur zeigt die Markierungsreaktion ohne Fragmentierung durch die REase R.TaqI (Vollschutzbande), wohingegen die vierte Spur mit R.TaqI fragmentiert wurde. Im Gegensatz zu M.TaqI vermag R.TaqI CpG-methylierte 5'-TCGA-3'-Sequenzen als Substrat zu akzeptieren und zu schneiden. Die fünfte Spur ist eine Kontrollprobe, die ohne Cofaktoranalogen aber mit REase angesetzt wurde, um das vollständige Fragmentierungsmuster zu erhalten. Die Markierung lieferte die erwarteten Ergebnisse, da man eine teilweise fragmentierte und teilweise geschützte DNA

erhält (3.24, Spur 4). Da M.TaqI CpG-methylierungsabhängig ist, wird die genomische Human-DNA an den methylierten 5'-TmCGA-3'-Positionen durch die REase R.TaqI fragmentiert. Das Zieladenin konnte durch die Methylierung von Cytosin nicht mehr modifiziert werden, wodurch die Restriktion mit R.TaqI erfolgen konnte. Für die nicht-methylierten TCGA-Positionen im menschlichen Human-Genom, konnte eine Fluoreszenzmarkierung durch AdoYnTAMRA (8) mit M.TaqI stattfinden und eine Fragmentierung an diesen Stellen wurde verhindert.

Weiterhin wurden zwei Kontrollproben angesetzt. Kontrolle 1 beinhaltete eine Modifikation von genomischer Human-DNA (Brustkrebszelllinie, UK Aachen) mit EcoDam (10 Äq. bezogen auf $7,2 \times 10^6$ 5'-GATC-3'-Erkennungssequenzen in humaner DNA) und AdoYnTAMRA (8) (10 µM). Die Vollständigkeit der Modifikation wurde für die eingesetzten Konzentrationen an DNA-MTase und Cofaktoranalogen zuvor ebenfalls durch einen Aktivitätstest mit λ-DNA bestätigt (Anhang A13). Diese Kontrollprobe diente zur Kalibrierung des TAMRA-Fluoreszenzsignals in Bezug zum DNA-Kanal (EvaGreen-Färbung), da die Anzahl der EcoDam-Erkennungssequenzen relativ zur Länge des untersuchten humanen DNA-Substrats (Markierungsdichte) bekannt ist. EcoDam ist wie M.TaqI eine Adenin-spezifische DNA-MTase, die jedoch im Gegensatz zu M.TaqI nicht abhängig von der CpG-Methylierung ist. Somit werden alle GATC-Erkennungssequenzen durch EcoDam mit TAMRA modifiziert, unabhängig davon, ob das Cytosin innerhalb der Erkennungssequenz als 5-Methylcytosin vorkommt.^[169] Demnach kann mit EcoDam die TAMRA-Fluoreszenz der genomischen Human-DNA-Probe bei bekannter DNA-Menge quantifiziert werden. Die Kontrollprobe wurde ebenfalls mittels Agarosegel-Elektrophorese untersucht und lieferte die erwarteten Ergebnisse. Für die Modifikation von EcoDam mit AdoYnTAMRA (8) war nach Zugabe der REase R.MboI nur eine Bande im Gel erkennbar (3.24, Spur 7), da alle Zieladenine der palindromischen 5'-GATC-3'-Erkennungssequenz modifiziert wurden. Diese Bande läuft auf selber Höhe wie die Vergleichsprobe, die ohne Zugabe an REase analysiert wurde (3.24 A, Spur 6). Die Kontrolle (Spur 8), die ohne Cofaktor aber mit R.MboI angesetzt wurde, zeigt hingegen das vollständige Fragmentierungsmuster bei nicht stattgefundenen Modifikation.

Die zweite Kontrollprobe enthielt genomische Human-DNA und den fluoreszierenden Cofaktor AdoYnTAMRA (8) (10 µM), für die aufgrund des fehlenden Enzyms keine Markierung der DNA stattfinden sollte. Diese Probe wurde wie die anderen beiden markierten Proben aufgereinigt, um verifizieren zu können, wie erfolgreich das überschüssige Cofaktoranalogen entfernt werden konnte und wie hoch das TAMRA-Hintergrundsignal nach der Aufreinigung weiterhin ist. Die fehlende Modifikation ist ebenfalls im Agarosegel (3.24 A, Spur 9) erkennbar,

da nach Zugabe des Restriktionsenzym R.TaqI eine vollständige Fragmentierung der DNA erhalten wird.

Die fluoreszenzmarkierten Proben wurden zur Analyse und Auswertung der epigenetischen Modifikation 5mC an die Arbeitsgruppe von Prof. Yuval Ebenstein der Tel Aviv University nach Israel geschickt. Die dortige Fluoreszenzmessung erfolgte auf einem *multi-sample array* Chip und die erhaltenen Ergebnisse sowie der allgemeine Aufbau eines solchen Chips sind in Abbildung 3.24 B, C und D dargestellt.

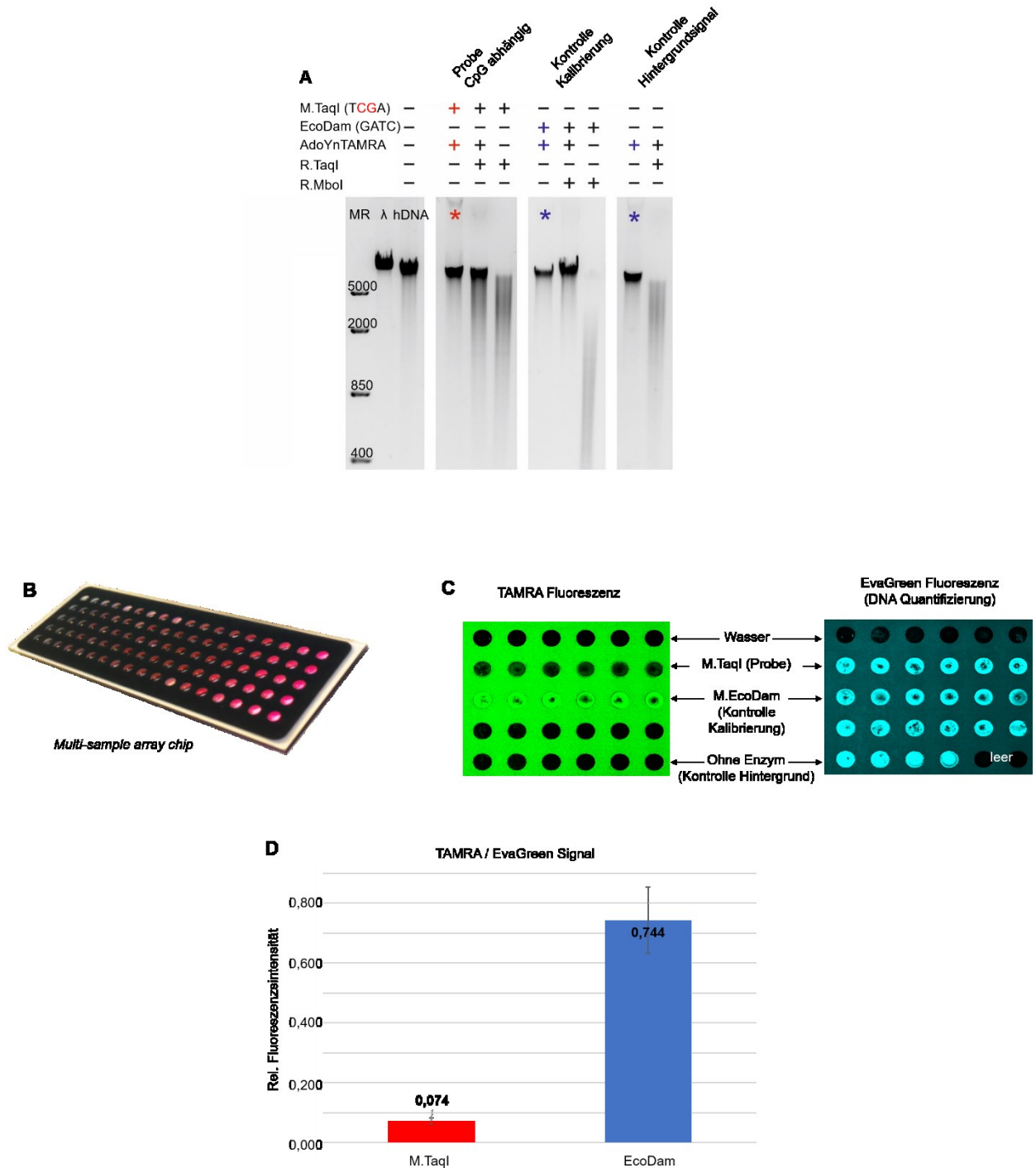


Abbildung 3.24: Gelelektrophoretische Analyse der einstufigen Markierungsreaktion von hDNA (Bustkrebzelllinie, UK Aachen) mit AdoYnTAMRA (**8**) (10 μ M) und M.TaqI (5'-TCGA-3', 0,5 Äq.) bzw. EcoDam (5'-GATC-3', 10 Äq.), DNA-Standard (MR, Spur 1), λ -DNA-Referenz (Spur 2), hDNA-Referenz (Spur 3) und die fragmentierten Kontrollen ohne Cofaktor und DNA-MTase (Spur 5, 8, 10). Die Markierung wurde mit R.TaqI bzw. R.MboI (10 U/ μ g DNA) überprüft (**A**). Weiterhin dargestellt sind der Aufbau eines *Multi-sample array chips* (**B**), die Quantifizierung der TAMRA-Fluoreszenz (grün) und EvaGreen-Fluoreszenz (cyan) nach der Messung auf dem Chip (je 10 ng DNA) (**C**) und die Auswertung der normalisierten relativen Fluoreszenzintensitäten der Markierung von M.TaqI (rot) bzw. EcoDam (blau) mit AdoYnTAMRA (**8**) bezogen auf die gesamte DNA-Menge der Probe (**D**).

Abbildung 3.24 C zeigt die erhaltenen Fluoreszenzsignale nach der Messung der markierten Proben auf einem *multi-sample array* Chip (3.24, B). Für die TAMRA-Fluoreszenz wurde ein Laser der Wellenlänge $\lambda = 532$ nm verwendet und für die Quantifizierung des Fluoreszenzsignals der mit EvaGreen interkalierten DNA ein Laser der Wellenlänge $\lambda = 488$ nm. Für beide Laserkanäle wurde, anders als bei den eigens durchgeführten Messungen mittels *DNA-Combing* (3.3, 3.4.1), die Gesamtfluoreszenz innerhalb der markierten Probe bestimmt und keine Einzelstrangmessung durchgeführt. Zur Darstellung der erhaltenen Ergebnisse der Markierung von genomischer Human-DNA mit M.TaqI bzw. EcoDam und AdoYnTAMRA (**8**), wurde das erhaltene Fluoreszenzsignal von Sigal Avraham (Arbeitsgruppe Prof. Yuval Ebenstein, Tel Aviv University) auf die DNA-Menge normiert und Mittelwerte sowie die Standardabweichung angegeben (Abbildung 3.24 D). Erkennbar ist, dass die mit M.TaqI markierten Proben eine zehnfach geringere relative Fluoreszenzintensität aufwiesen, als die Proben, die mit EcoDam und AdoYnTAMRA (**8**) markiert wurden. Aufgrund der CpG-Sensitivität von M.TaqI entspricht das Ergebnis zunächst den Erwartungen, da für diese DNA-MTase weniger Markierungen wegen der CpG-Methylierung innerhalb des Genoms erreicht werden sollte. Die gemessene TAMRA-Fluoreszenz für die Markierung mit EcoDam (CpG-unabhängig) lieferte das Referenzsignal für die Messung der Markierung mit M.TaqI. Über das Intensitätsverhältnis der Fluoreszenz von M.TaqI/EcoDam ($0,074/0,744 = 0,099$) und die Anzahl der jeweiligen Erkennungssequenzen im menschlichen Genom, können die mit TAMRA markierten Positionen (nicht CpG-methyliert) durch die DNA-MTase M.TaqI ermittelt werden. Die für die Berechnung genutzte Anzahl der Erkennungssequenzen im menschlichen Genom wurde von Prof. Ivan Gesteira Costa Filho an der RWTH Aachen University bioinformatisch bestimmt (M.TaqI: 1.603.346, EcoDam: 7.199.434 Erkennungssequenzen). Demnach waren 45 % der CpG-Sequenzen in der untersuchten genomischen Human-DNA nicht methyliert ($0,1 \times 7,2/1,6$) und 55 % methyliert. Dieses Ergebnis erscheint etwas hoch, da in der Literatur lediglich 20-30 % der CpG's unmodifiziert

(nicht methyliert) auftreten.^[170] Aufgrund dieser Abweichung zu den Literaturangaben, sollte eine weitere Untersuchung an einem kurzen Duplex-ODN mittels *rp*-HPLC-Analyse stattfinden. Dabei sollte überprüft werden, ob für die palindromischen Erkennungssequenzen der DNA-MTasen M.TaqI und EcoDam jeweils nur eines der beiden Zieladenine, wie bisher angenommen, fluoreszenzmarkiert wird, oder das gemessene Fluoreszenzsignal von einer beidseitigen Modifizierung stammt. Die Interpretation des Intensitätsverhältnisses für die gemessene Fluoreszenz mit beiden DNA-MTasen würde sich so gegebenenfalls verändern und das Ergebnis hinsichtlich der CpG-Methylierung im untersuchten Substrat beeinflussen.

3.4.3 HPLC-Quantifizierung mit M.TaqI und EcoDam

Im nachfolgenden Abschnitt wird die einstufige Markierungsreaktion mit den Adenin-spezifischen DNA-MTasen M.TaqI und EcoDam und fluoreszierenden Cofaktoranaloga an einem kurzen Duplex-ODN mittels *rp*-HPLC analysiert. Das Duplex-ODN wurde dabei so gewählt, dass das Substrat nur eine zentrale palindromische Erkennungssequenz für die untersuchte DNA-MTase aufwies. Somit sollte überprüft werden, ob die Fluoreszenzmarkierung des Duplex-ODN nur an einer der beiden Zieladenine in der palindromischen Sequenz stattfindet oder eine beidseitige und damit vollständige Markierung erfolgt. Für bisherige Messungen wurde von einer einseitigen Markierung für Cofaktoranaloga mit größeren Reportergruppen ausgegangen, da aufgrund der Sterik der zusätzlichen Seitenkette auf dem einfach markierten Duplex-ODN die zweite Markierung viel langsamer ablaufen sollte. Diese Quantifizierung ist jedoch essenziell, um die Daten der Fluoreszenzmikroskopie analysieren zu können, da das gemessene Signal (Abbildung 3.24) aus einer einfachen oder zweifachen Fluoreszenzmarkierung resultieren könnte. Aus diesem Grund wurden die DNA-Proben nach der einstufigen Markierung mit M.TaqI bzw. EcoDam über eine NAP-5 Säule aufgereinigt, zu Desoxynukleosiden fragmentiert und anschließend die Anzahl und Ausbeute an modifizierten Desoxynukleosiden mittels *rp*-HPLC bestimmt (5.2.10.6).

M.TaqI

Der Duplex bestehend aus den Einzelsträngen 14+TCGA und 14-TCGA (5.1.4) wurde zunächst mit der CpG-methylierungsabhängigen DNA-Adenin-*N*6-MTase M.TaqI und den fluoreszierenden Cofaktoranaloga AdoYnTAMRA (**8**), sowie AdoYnCF640R (**20**), AdoYnATTO643 (**25**) und AdoYnAF647 (**26**) markiert (5.2.10.1). Dabei sollte die fluoreszierende Seitenkette der Cofaktoranaloga auf das Adenin in der zentralen

palindromischen TCGA-Sequenz übertragen werden. Die anschließende Fragmentierung des modifizierten Duplex-ODN in die einzelnen Nukleoside und quantitative *rp*-HPLC-Analyse durch Messung der UV-Absorption diene der Quantifizierung. Überprüft wurde dabei, ob eine einfache oder zweifache Fluoreszenzmarkierung der Zieladenine durch M.TaqI stattfindet. Neben dem TAMRA-Fluorophor wurden auch die roten Fluorophore CF640R, ATTO643 und AF647 durch Cofaktoranaloga sequenzspezifisch übertragen, da für die spätere orthogonale Reaktion zur Quantifizierung von 5mC und 5hmC zwei verschiedene Fluorophore auf einem Substrat eingesetzt werden müssen. Diese müssen unterschiedliche Wellenlängen emittieren und deren Absorptions- und Emissionsspektren dürfen sich dabei nicht überlagern.

Abbildung 3.25 zeigt die *rp*-HPLC-Analysen des unmodifizierten Duplex-ODN sowie der Modifikationen mit M.TaqI und verschiedenen fluoreszierenden Cofaktoranaloga nach der Fragmentierung in die Nukleoside. Aufgenommen wurden die Chromatogramme bei den Wellenlängen $\lambda = 260/600$ nm bzw. $\lambda = 260/555$ nm.

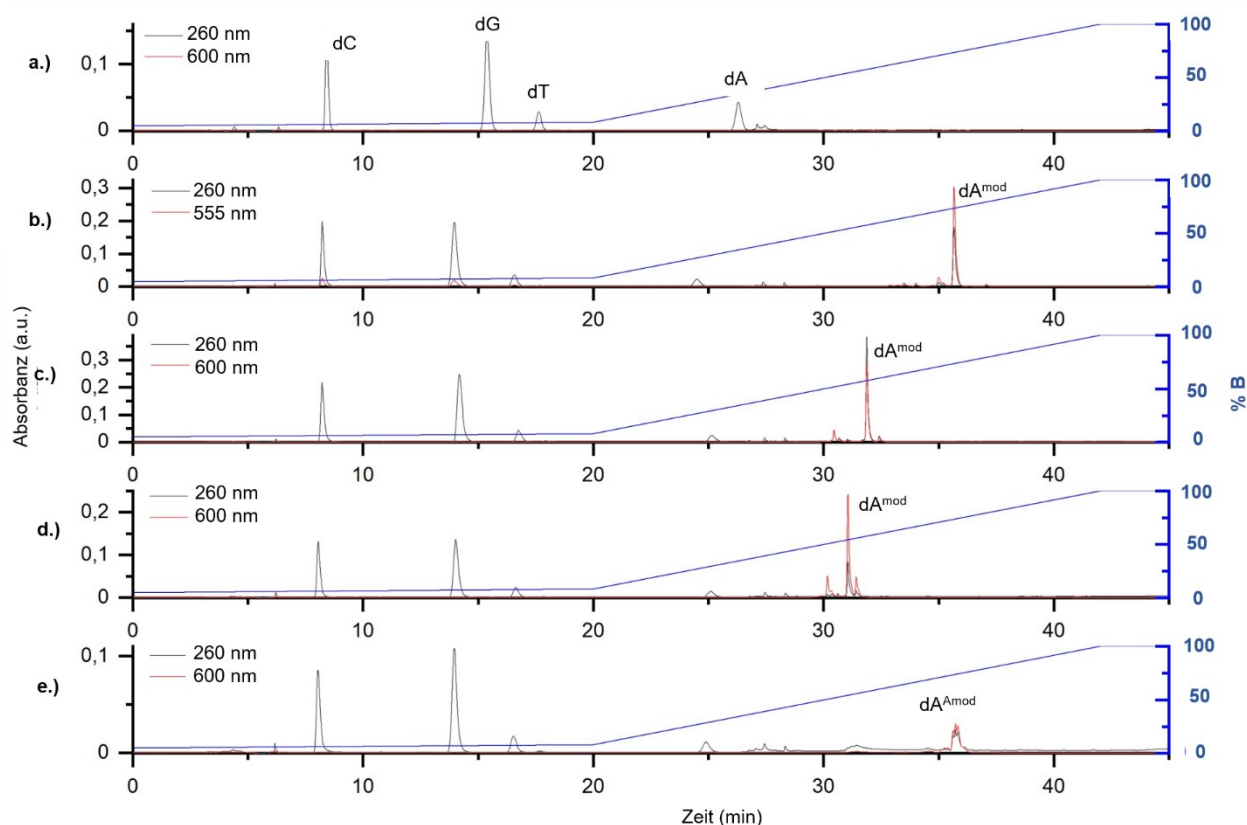


Abbildung 3.25: HPLC-Analyse der Fragmentierung des unmodifizierten Duplex-ODN (a) und der Fragmentierungen der Modifikationen von M.TaqI mit AdoYnTAMRA (8) (b), AdoYnCF640R (20) (c), AdoYnAF647 (26) (d) und AdoYnATTO643 (25) (e) aufgenommen bei den Wellenlängen $\lambda = 260/555$ nm und $\lambda = 260/600$ nm. Die Konzentration von M.TaqI betrug 1 Äq. bezogen auf eine TCGA-Erkennungssequenz und die Konzentration der Cofaktoranaloge 40 μ M. dC: 2'-Desoxycytosin, dG: 2'-Desoxyguanosin, dT: 2'-Desoxythymidin, dA: 2'-Desoxyadenosin, dA^{mod}: modifiziertes 2'-Desoxyadenosin. Analyse mit Methode N2 und neutralen HPLC-Puffern A und B (5.2.1).

Das Chromatogramm in Abbildung 3.25 a entspricht einem Kontrolllauf, der mit dem unmodifizierten und fragmentierten Duplex-ODN durchgeführt wurde. Erkennbar sind hier vier scharfe Signale, die den einzelnen Nukleosiden dC ($t_R = 8,5$ min), dG ($t_R = 15,2$ min), dT ($t_R = 17$ min) und dA ($t_R = 26,5$ min) aufgrund zuvor gemessener Nukleosid-Standards eindeutig zugeordnet werden konnten. Die weiteren Chromatogramme in Abbildung 3.25 zeigen die HPLC-Analysen für die Modifikation mit M.TaqI und AdoYnTAMRA (8) (b), AdoYnCF640R (20) (c), AdoYnAF647 (26) (d) und AdoYnATTO643 (25) (e). Im Vergleich zum Chromatogramm resultierend aus dem unmodifizierten Duplex-ODN (a) fällt auf, dass das Signal für dA deutlich abnimmt, während neue Signale für die modifizierten Nukleoside (dA^{Mod}) auftauchen. Die Quantifizierung der Reaktionen und Anzahl der modifizierten

Nukleoside erfolgte über die Integration der UV-Absorptions-Flächen und den zugehörigen spezifischen Extinktionskoeffizienten der entsprechenden Nukleoside. Dazu wurde zunächst die Anzahl N_i der verschiedenen Nukleoside über die nachfolgende Gleichung **(1)** bestimmt. Die Flächen wurden für den Kontrolllauf auf die Gesamtfläche der Nukleoside normiert, für alle weiteren Läufe auf die Fläche von dG.

$$N_i = \frac{\frac{A_i}{\varepsilon_i}}{\sum_i \frac{A_i}{\varepsilon_i}} \times N_{ges} \quad (1)$$

$$N_i = \frac{\frac{A_i}{\varepsilon_i}}{\frac{A_{dG/dC}}{\varepsilon_{dG/dC}}} \times N_{dG/dC}$$

N_i = Anzahl Nukleosid

A_i = UV-Fläche Nukleosid

ε_i = spezifischer Extinktionskoeffizient Nukleosid

N_{ges} = Anzahl der gesamten Nukleoside innerhalb der Sequenz

$N_{dG/dC}$ = Anzahl von dG/dC in der Sequenz

Die verwendeten spezifischen Extinktionskoeffizienten zur Quantifizierung sind in Tabelle 3.3 dargestellt.

Tabelle 3.3: Verwendete Extinktionskoeffizienten für die einzelnen Nukleoside und Quellenangabe.

	Extinktionskoeffizient	Literatur
dC (260 nm)	7.009,0 L mol ⁻¹ cm ⁻¹	Christine Beuck, RWTH Aachen University ^[171]
dG (260 nm)	11.715 L mol ⁻¹ cm ⁻¹	Christine Beuck, RWTH Aachen University ^[171]
dT (260 nm)	8.902,0 L mol ⁻¹ cm ⁻¹	Christine Beuck, RWTH Aachen University ^[171]
dA (260 nm)	15.663 L mol ⁻¹ cm ⁻¹	Christine Beuck, RWTH Aachen University ^[171]
dmC (260 nm)	5.435,0 L mol ⁻¹ cm ⁻¹	Christine Beuck, RWTH Aachen University ^[171]
CF640R (600 nm)	33.474 L mol ⁻¹ cm ⁻¹	Umrechnung von $\epsilon_{644 \text{ nm}}$ (105.000 L mol ⁻¹ cm ⁻¹ , VWR Biotium) auf $\epsilon_{600 \text{ nm}}$ durch UV-Spektrum
TAMRA (555 nm)	84.000 L mol ⁻¹ cm ⁻¹	Jena Bioscience GmbH
TAMRA (260 nm)	29.469 L mol ⁻¹ cm ⁻¹	UV-Spektrum
TAMRA (260 nm) + dmC	34.904 L mol ⁻¹ cm ⁻¹	Summe aus $\epsilon_{\text{TAMRA}_{260}}$ (durch UV-Spektrum) und ϵ_{dmC}
AF647 (600 nm)	78.657 L mol ⁻¹ cm ⁻¹	Umrechnung von $\epsilon_{652 \text{ nm}}$ (270.000 L mol ⁻¹ cm ⁻¹ , Jena Bioscience GmbH) auf $\epsilon_{600 \text{ nm}}$ durch UV-Spektrum
ATTO643 (600 nm)	36.942 L mol ⁻¹ cm ⁻¹	Umrechnung von $\epsilon_{644 \text{ nm}}$ (150.000 L mol ⁻¹ cm ⁻¹ , ATTO-TEC GmbH) auf $\epsilon_{600 \text{ nm}}$ durch UV-Spektrum

Weiterhin wurden die relativen Ausbeuten der einstufigen Markierungsreaktionen bestimmt. Dazu wurde die erhaltene Anzahl des jeweiligen fluoreszenzmodifizierten Nukleosids durch die maximal mögliche Anzahl geteilt. Da hier nur zwei der drei im Duplex-ODN vorhandenen Adenine innerhalb der palindromischen Erkennungssequenz von M.TaqI liegen, beträgt die maximale Anzahl für dA^{mod} zur Ausbeuteberechnung zwei. Außerdem wurde die Anzahl der modifizierten Nukleoside ebenfalls über die Abnahme der Anzahl an dA von Kontrolllauf zu Modifikationslauf bestimmt, um quantifizieren zu können, wie viele Adenine tatsächlich reagiert haben. Für die Markierung mit fluoreszierenden Cofaktoranaloga ist die Berechnung über die Abnahme des dA-Signals besonders bedeutsam, da zum einen teilweise mehrere

Signale für das modifizierte Nukleosid im Chromatogramm auftauchen. Durch die Normierung auf die Fläche von dG anstatt auf die Gesamtfläche aller Signale, erfolgte die Berechnung von dA^{mod} unabhängig von den Flächen der modifizierten Nukleoside. Zum anderen liegen die Absorptionsmaxima der Fluorophore alle über einer Wellenlänge von $\lambda = 555$ nm und damit im sichtbaren Wellenlängenbereich. Der verwendete HPLC-Detektor ist für diesen Bereich jedoch limitiert, da lediglich eine UV-Lampe und keine zusätzliche Vis-Lampe eingebaut ist. Dies führt zu einer geringeren Sensitivität im Vis-Bereich. Die Aufnahme bei diesen Wellenlängen wurde jedoch als qualitatives Indiz zur Identifikation der Modifikation betrachtet. Da diese Wellenlängen den Absorptionsmaxima der Fluorophore entsprechen, kann so überprüft werden, ob der jeweilige Fluorophor eingebaut wurde. Sowohl der qualitative Wert (über 555/600 nm) als auch quantitative Wert (über die Abnahme des dA) wird in dieser Arbeit angegeben. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde jedoch nur der Wert, der über die Abnahme des dA-Signals bestimmt wurde, betrachtet. Tabelle 3.4 zeigt die Quantifizierung der einstufigen Markierungsreaktionen von M.TaqI mit AdoYnTAMRA (**8**), AdoYnCF640R (**20**), AdoYnAF647 (**26**) und AdoYnATTO643 (**25**) und die zugehörigen Ausbeuten. Für die Modifikation mit dem TAMRA-Fluorophor wurde die Anzahl und Ausbeute aufgrund der Detektorlimitierung im sichtbaren Bereich sowohl bei der Wellenlänge $\lambda = 555$ nm als auch $\lambda = 260$ nm bestimmt.

Tabelle 3.4: Quantifizierung der Anzahl der Nukleoside und entsprechende Ausbeuten für die Modifikation mit M.TaqI und AdoYnTAMRA (**8**), AdoYnCF640R (**20**), AdoYnAF647 (**26**) und AdoYnATTO643 (**25**). Die Anzahl sowie Ausbeute für die Markierung mit dem TAMRA-Fluorophor wurde für die Wellenlängen $\lambda = 555$ nm und $\lambda = 260$ nm quantifiziert.

	dC	dG	dT	dA	dA ^{mod}	Ausbeute	dA ^{mod*}	Ausbeute*
Kontrolle (260 nm)	11,1	10,9	3,0	2,9	-	-	-	-
TAMRA: 260 nm (555 nm)	11,4	11,0	2,8	1,2	1,7 (1,3**)	87 % (66 %**)	1,7*	87 %*
CF640R (600 nm)	11,2	11,0	2,9	1,1	1,9	93 %**	1,8	90 %
AF647 (600 nm)	11,4	11,0	2,9	1,2	1,5	74 %**	1,7	86 %
ATTO643 (600 nm)	11,2	11,0	2,9	1,2	1,2	61 %**	1,7	87 %

* Anzahl und Ausbeute quantifiziert über die Abnahme des Signals für dA nach der Modifikation

** wird durch geringe Sensitivität des Detektors unterschätzt.

Betrachtet man die Sequenz des verwendeten doppelsträngigen ODN (5.4.1) werden elf dC, elf dG, drei dT und drei dA erwartet. Der Kontrolllauf zeigte genau diese Verteilung innerhalb der Fehlergrenzen. Die Abnahme für die Anzahl an dA zeigt sich für alle Modifikationsläufe und es blieb verglichen mit dem Kontrolllauf nur noch etwas mehr als ein (1,2) unmodifiziertes dA übrig, sodass nahezu zwei Modifikationen für alle fluoreszierenden Cofaktoranaloga mit M.TaqI erreicht werden konnten. Für die Markierung mit AdoYnTAMRA (**8**) zeigte sich das Detektorlimit bei der Aufnahme von $\lambda = 555$ nm deutlich, da so nur 1,3 dA^{mod} (66 %) detektiert werden konnten, während bei der Quantifizierung über 260 nm 1,7 dA^{mod} (87 %) erhalten wurden, was genau der berechneten Anzahl für die Bestimmung über die Abnahme des dA Signals entspricht. Für die roten Fluorophore CF640R, AF647 und ATTO643 konnte ebenfalls eine doppelseitige Markierung beider Zieladenine innerhalb der palindromischen TCGA-Sequenz über die Berechnung der dA-Abnahme erreicht werden. Als bester roter Cofaktor wurde AdoYnCF640R (**20**) mit einer Ausbeute von 93 % bzw. 90 % für die einstufige Markierung identifiziert. Dieser Fluorophor kann somit neben TAMRA für die orthogonale Markierung der epigenetischen Modifikationen 5mC und 5hmC zur Fluoreszenzanalyse eingesetzt werden. Das gemessene Signal kommt dabei für beide Fluorophore jedoch von einer zweifachen Markierung der palindromischen Sequenz, was bei den Berechnungen der Fluoreszenzintensitäten mit einbezogen werden muss.

EcoDam

Neben der CpG-abhängigen DNA-Adenin-*N*6-MTase M.TaqI wurde zusätzlich die Fluoreszenzmarkierung durch die Adenin-spezifische DNA-MTase EcoDam quantifiziert. EcoDam diente als Referenz, da diese DNA-MTase im Vergleich zu M.TaqI unabhängig von einer Cytosinmethylierung innerhalb der Erkennungssequenz ist. Dazu wurde zunächst Duplex-ODN aus den Einzelsträngen 14+GATC und 14-GATC mit EcoDam und dem fluoreszierenden Cofaktoranalogen AdoYnTAMRA (**8**) markiert (5.2.10.2). Die anschließende Fragmentierung des modifizierten Duplex-ODN in die einzelnen Nukleoside und Analyse mittels *rp*-HPLC diente der Quantifizierung der einstufigen Markierung. Überprüft wurde dabei, ob eine einfache oder zweifache Fluoreszenzmarkierung der Zieladenine in der palindromischen Erkennungssequenz durch EcoDam stattfindet. Für die Bestimmung des Methylierungsgrades innerhalb der genomischen Human-DNA-Probe und zur Ermittlung der Fluoreszenzintensität (3.4.2) ist dies von besonderer Bedeutung. Abbildung 3.26 zeigt die *rp*-HPLC-Analyse des unmodifizierten Duplex-ODN sowie der Modifikation mit EcoDam und AdoYnTAMRA (**8**) nach der Fragmentierung in die einzelnen Nukleoside. Aufgenommen wurden die Chromatogramme bei den Wellenlängen $\lambda = 260/272$ nm bzw. $\lambda = 260/555$ nm.

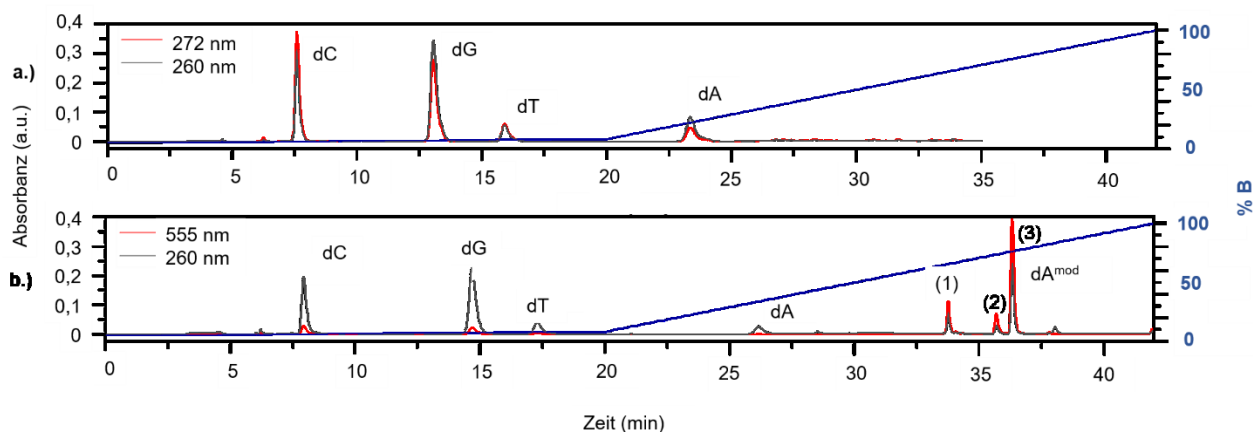


Abbildung 3.26: HPLC-Analyse der Fragmentierung des unmodifizierten Duplex-ODN (a) und der Fragmentierungen der Markierungen von EcoDam mit AdoYnTAMRA (**8**) (b) aufgenommen bei den Wellenlängen $\lambda = 260/272$ nm und $\lambda = 260/555$ nm. Die Konzentration von EcoDam betrug 1 Äq. bezogen auf eine GATC-Erkennungssequenz und die Konzentration des Cofaktoranalogs 40 μ M. dC: 2'-Desoxycytosin, dG: 2'-Desoxyguanosin, dT: 2'-Desoxythymidin, dA: 2'-Desoxyadenosin, dA^{mod}: modifiziertes 2'-Desoxyadenosin. Analyse mit HPLC-Methode N2 und neutralen HPLC-Puffern A und B (5.2.1).

Das Chromatogramm in Abbildung 3.26 a entspricht einem Kontrolllauf, der nur mit dem unmodifizierten und fragmentierten Duplex-ODN durchgeführt wurde. Erkennbar sind hier vier

scharfe Signale, die den einzelnen Nukleosiden dC ($t_R = 7,5$ min), dG ($t_R = 13$ min), dT ($t_R = 17$ min) und dA ($t_R = 23,5$ min) aufgrund zuvor gemessener Nukleosid-Standards eindeutig zugeordnet werden konnten. Das Chromatogramm in Abbildung 3.26 b zeigt die HPLC-Analyse für die Markierung mit EcoDam und AdoYnTAMRA (8). Im Vergleich zum Chromatogramm des unmodifizierten Duplex-ODN (Abbildung 3.26 a) fällt auf, dass das Signal von dA deutlich abnimmt, während drei neue Signale mit Retentionszeiten von $t_R = 34 - 36,5$ min für das modifizierte Nukleosid (dA^{Mod}) auftauchen. Da alle neuen Signale bei $\lambda = 555$ nm eine deutlich höhere Absorbanz zeigen als bei $\lambda = 260$ nm und dies dem Absorptionsmaximum des TAMRA-Fluorophors entspricht, werden diese Signale der Modifikationsreaktion zugeordnet. Um verifizieren zu können, welches Signal tatsächlich TAMRA-modifiziertem dA und nicht etwaigen Zerfallsprodukten entspricht, wurden die Peaks aufgefangen und mittels ESI-Massenspektrometrie analysiert. Dabei wurde lediglich der dritte Peak eindeutig als dA^{mod} identifiziert (Anhang A14), dessen Fläche nachfolgend zur Quantifizierung verwendet wurde. Peak 1 und 2 wurden in die Berechnung nicht mit einbezogen, da im ESI-Massenspektrum die exakte Masse des TAMRA-modifizierten dA nicht identifiziert werden konnte. Die Quantifizierung der Reaktionen erfolgte analog zu der in diesem Abschnitt beschriebenen Vorgehensweise mit Gleichung (1) und den zugehörigen spezifischen Extinktionskoeffizienten in Tabelle 3.3, jedoch mit Normierung auf die Gesamtfläche für den Kontrolllauf und Normierung auf die Fläche von dC für die Markierung mit AdoYnTAMRA (8). Genau wie für M.TaqI wurde auch für EcoDam die Anzahl der Nukleoside zusätzlich über die Abnahme des dA von Kontrolllauf zu Markierungslauf bestimmt. Durch die weiter oben beschriebene Limitierung des verwendeten HPLC-Detektors konnte so die Reaktionsausbeute verlässlich quantifiziert werden. Die qualitative Aufnahme bei einer Wellenlänge von $\lambda = 555$ nm wurde hier ebenfalls zur Identifikation der Markierung angegeben. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde jedoch nur der Wert, der durch die Abnahme des dA-Signals bestimmt wurde, betrachtet.

Tabelle 3.5 zeigt die Quantifizierung der einstufigen Modifikationsreaktionen von EcoDam mit AdoYnTAMRA (8) und die zugehörigen Ausbeuten. Für die Modifikation mit dem TAMRA-Fluorophor wurde die Anzahl und Ausbeute aufgrund der Detektorlimitierung im sichtbaren Bereich sowohl bei der Wellenlänge $\lambda = 555$ nm als auch $\lambda = 260$ nm bestimmt.

Tabelle 3.5: Quantifizierung der Anzahl der Nukleoside und entsprechende Ausbeuten für die Modifikation von EcoDam mit AdoYnTAMRA (8). Die Anzahl sowie Ausbeute für die Modifikation mit dem TAMRA-Fluorophor wurde für die Wellenlängen $\lambda = 555$ nm und $\lambda = 260$ nm quantifiziert.

	dC	dG	dT	dA	dA ^{mod}	Ausbeute	dA ^{mod*}	Ausbeute*
Kontrolle (260 nm)	10,7	10,6	2,9	3,0	-	-	-	-
TAMRA (555 nm)	11,0	10,7	3,1	1,2	1,2**	60 %**	1,8	90 %
TAMRA (260 nm)	11,0	10,6	3,0	1,2	1,8	90 %	1,8	90 %

* Anzahl und Ausbeute quantifiziert über die Abnahme des Signals für dA nach der Modifikation

** wird durch geringe Sensitivität des Detektors unterschätzt.

Betrachtet man die Sequenz des verwendeten doppelsträngigen ODN (5.4.1) werden elf dC, elf dG, drei dT und drei dA erwartet. Der Kontrolllauf zeigte genau diese Verteilung innerhalb der Fehlergrenzen. Für die Markierung mit AdoYnTAMRA (8) zeigte sich eine deutliche Abnahme der Anzahl an dA und es blieb verglichen mit dem Kontrolllauf nur noch etwas mehr als ein (1,2) unmodifiziertes dA übrig, sodass auch hier eine zweifache Markierung mit EcoDam und AdoYnTAMRA (8) erreicht werden konnte. Für die TAMRA-Fluoreszenz wurde die Detektorlimitierung bei der Aufnahme von $\lambda = 555$ nm deutlich, da so nur 1,2 dA^{mod} (60 %) detektiert werden konnten, während bei der Quantifizierung über 260 nm 1,8 dA^{mod} (90 %) erhalten wurden, was genau der berechneten Anzahl für die Bestimmung über die Abnahme des dA Signals entspricht (90 %).

Für die in Abschnitt 3.4.2 beschriebene Diskrepanz der Methylierungsdetektion im menschlichen Genom gegenüber den Angaben in der Literatur, wurde die einstufige Markierungsreaktion mittels *rp*-HPLC analysiert. Dabei sollte überprüft werden, ob die DNA-MTasen M.TaqI und EcoDam mit AdoYnTAMRA (8) jeweils nur eines der beiden Zieladenine innerhalb der palindromischen Erkennungssequenz markieren, oder ob das gemessene Fluoreszenzsignal von einer zweifachen Modifikation stammt. Die Bestimmung des Intensitätsverhältnisses für die gemessene Fluoreszenz hängt maßgeblich von dieser Erkenntnis ab. Da für die Markierungsreaktionen mit M.TaqI bzw. EcoDam und dem fluoreszierenden Cofaktoranalogen AdoYnTAMRA (8) 1,7 bzw. 1,8 Zieladenine innerhalb der palindromischen Erkennungssequenz modifiziert wurden, kann für beide Enzyme von einer zweifachen Markierung ausgegangen werden. Das Intensitätsverhältnis der gemessenen Fluoreszenz für beide DNA-MTasen verändert sich somit nicht und die statistische Verteilung der ermittelten CpG-Methylierung im untersuchten Substrat bleibt erhalten.

3.5 Zweistufige DNA-Markierung zur DNA-Hydroxymethylierungs-detektion

Der nachfolgende Abschnitt behandelt eine zweistufige DNA-Markierungsreaktion (*two-step labelling*-Reaktion) zur Fluoreszenzmarkierung der epigenetischen DNA-Modifikation 5hmC, die durch Oxidation von 5mC durch TET-Enzyme innerhalb des Genoms auftritt.^[82] 5hmC stellt dabei einen wichtigen Biomarker für verschiedene Erkrankungen dar, denn diverse Studien zeigen, dass Veränderungen des 5hmC-Gehalts mit mehreren menschlichen Krankheiten, wie beispielsweise Krebs oder mit neurodegenerative Erkrankungen, wie beispielsweise Chorea Huntington und Alzheimer, in Verbindung gebracht werden.^[101,102,172] Im Falle einer Tumorerkrankung wird eine dramatische Abnahme des 5hmC-Spiegels innerhalb der Tumorzellen, im Vergleich zu normalen Zellen des gleichen Gewebetyps, gefunden^[87,97–99,106], weshalb eine fluoreszenzmikroskopische Quantifizierung dieser epigenetischen Modifikation für die medizinische Forschung sehr bedeutsam ist. Für die zweistufige Reaktion zur Markierung der epigenetischen Base 5hmC findet, anders als bei der Methylierungsdetektion (3.3), eine direkte Modifikation am 5hmC statt. Dazu erfolgt im ersten Schritt zunächst eine enzymatische Modifikation mittels DNA- β -Glucosyltransferase (DNA- β -GT) und dem Cofaktor UDP-6-Azidoglucose (**10**), mit dem das Zuckermolekül mit gebundener Azidgruppe direkt auf das DNA-Substrat übertragen wird. Im anschließenden zweiten Schritt der *two-step labelling*-Reaktion reagiert diese Azidgruppe mit der gespannten Dreifachbindung von DBCO-PEG₄-5/6-TAMRA (**14**) in einer 1,3-dipolaren kupferfreien Cycloaddition (*strain-promoted azide-alkyne cycloaddition*, SPAAC).^[131] Die fluoreszenzmarkierte DNA kann abschließend mittels Fluoreszenzmikroskopie zur Ermittlung des 5hmC-Gehalts analysiert werden. Abbildung 3.27 zeigt den allgemeinen Ablauf dieser zweistufigen Markierungsreaktion zur Fluoreszenzdetektion von 5hmC.

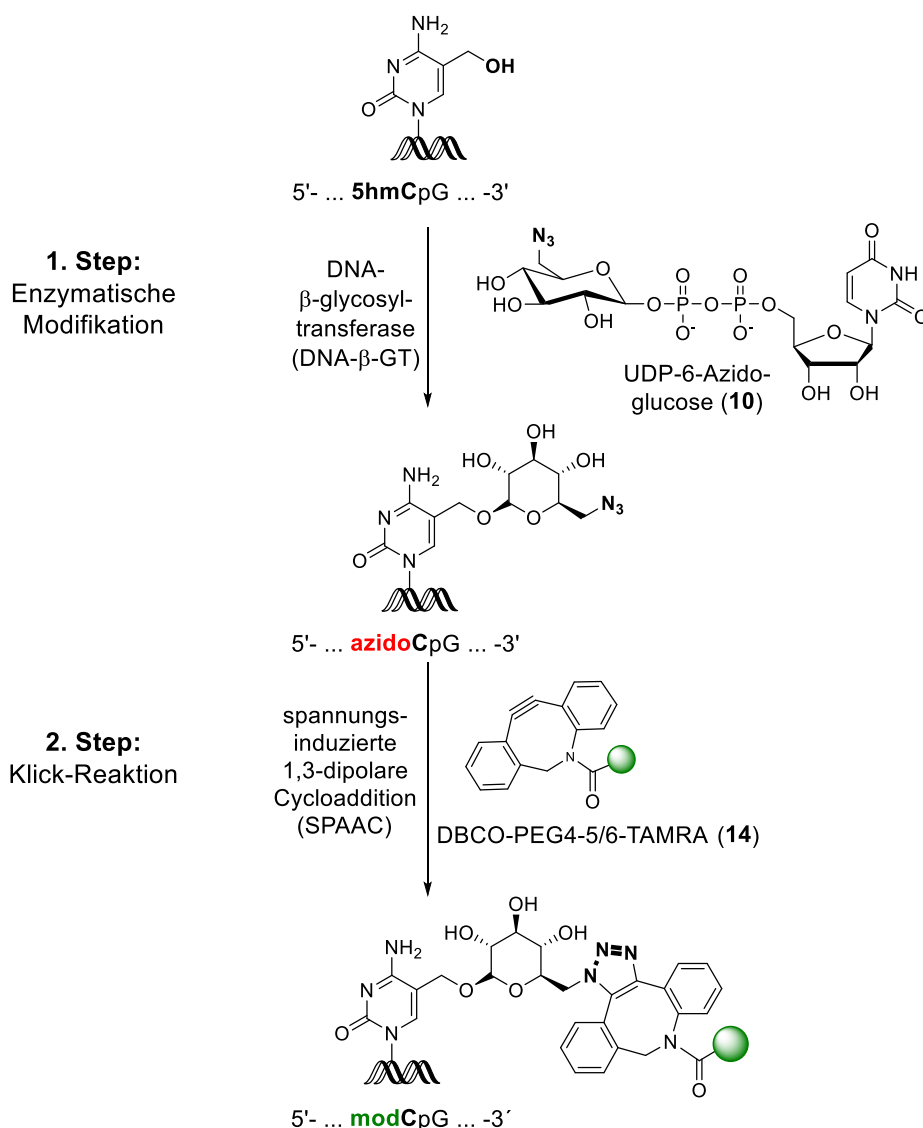


Abbildung 3.27: Zweistufige Markierungsreaktion von 5hmC durch DNA- β-GT und UDP-6-Azidoglucose (**10**) (1. Schritt) und anschließender Klick-Reaktion (SPAAC) mit DBCO-PEG_{4-5/6}-TAMRA (**14**) (2. Schritt) zur Fluoreszenzmarkierung der DNA. Der Fluorophor (hier TAMRA) wurde mit einer grünen Kugel dargestellt.

Zur Untersuchung der Markierungsreaktion von 5hmC wurde PCR-λ-DNA fluoreszenzmarkiert und in Kooperation mit dem AK Wöll (IPC, RWTH Aachen University) am institutseigenen Fluoreszenzmikroskop analysiert. Die Analyseproben wurden mittels der Methode des DNA-Combing und einer literaturbekannten Oberflächensilanisierung des Deckgläschens immobilisiert^[146] und die Interkalation der DNA mit dem YOYO-1 Cyaninfarbstoff erfolgte analog zu Abschnitt 3.3.1. Für die Visualisierung der Mikroskopiebilder mit der kurzen PCR-λ-DNA wurde sowohl der DNA-Kanal als auch der Label-Kanal, in denen jeweils *single-spots* analysiert wurden, in schwarz-weiß dargestellt.

Somit sollte ein möglichst hoher Kontrast für die Darstellung der Einzelpunkte und ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis erreicht werden.

3.5.1 Fluoreszenzmikroskopie von markiertem PCR-Produkt

Zur Analyse der epigenetischen Modifikation 5hmC wurde ein definiertes PCR-Produkt (1052 Bp) von λ -Templat-DNA verwendet (5.2.8), das in der Sequenz neben einer spezifischen Position für die DNA-MTase M.TaqI (5'-TCGA-3') auch genau eine 5hmC-Modifikation in einem der beiden PCR-Primer aufwies (Anhang, B.1). Mit Hinblick auf das finale Ziel dieser Arbeit, kann somit sowohl die orthogonale Markierung der beiden epigenetischen Biomarker 5mC und 5hmC zeitgleich auf diesem Substrat quantifiziert werden, als auch die beiden Einzelmodifikationen. Für die Hydroxymethylierungsdetektion wurde PCR- λ -DNA zunächst mittels DNA- β -GT und dem Cofaktor UDP-6-Azidoglucose (**10**) im ersten Schritt glucosyliert, sodass eine Zuckereinheit mit gebundener Azidgruppe direkt auf die 5hmC-Modifikation des DNA-Substrates übertragen wurde (5-Azidoghmc). Anschließend erfolgte eine Klick-Reaktion an dieser Azidgruppe mit einem Überschuss an DBCO-PEG₄-5/6-TAMRA-Reagenz (**14**) in einer SPAAC-Cycloaddition zur Fluoreszenzmarkierung der epigenetischen Information. Anders als bei der Methylierungsdetektion (3.3) konnte hier keine Überprüfung des ersten Schrittes hinsichtlich der Vollständigkeit der Übertragung der Azidgruppe auf 5hmC durch eine Agarosegel-Elektrophorese durchgeführt werden. Die 5hmC-Modifikation innerhalb des hergestellten PCR- λ -DNA-Substrates befand sich dabei am äußeren Ende des Doppelstrangs (Anhang, B.1) und das erhaltene Fragment bei fehlender Modifikation wäre mit 9 Bp viel zu klein, um mittels Agarosegel-Elektrophorese detektiert werden zu können. Außerdem existiert keine bekannte REase, die als spezifische Erkennungssequenz 5'-CpG-3' aufweist und eine Sensitivität hinsichtlich der Glucosylierung des 5hmC des ersten Schrittes zeigt. Das Enzym R.MspI, das ein Isochizomer der Restriktionsendonuklease R.HpaII darstellt, erkennt die Sequenz CCGG. Beide Restriktionsenzyme sind jedoch empfindlich für unterschiedliche Methylierungszustände. R.HpaII spaltet die DNA nur, wenn die Cytosine innerhalb der CCGG-Erkennungssequenz vollkommen unmodifiziert vorliegen. Jede Modifikation an einem der beiden Cytosine (5mC, 5hmC oder 5ghmC) blockiert die Fragmentierung, während R.MspI 5mC und 5hmC erkennt und fragmentiert, die DNA jedoch nicht mehr schneiden kann, sobald das 5hmC glucosyliert wurde.^[173] Somit wäre R.MspI in der Lage, die Modifikation des ersten Schrittes (5-Azidoghmc) zur Hydroxymethylierungsdetektion grundsätzlich nachzuweisen. Da hier die 5hmC-Modifikation jedoch nicht innerhalb einer CCGG-Sequenz liegt, konnte die

Glycosylierung des ersten Schrittes nicht mittels Agarosegel-Elektrophorese verifiziert werden, bevor der zweite Schritt der Klick-Reaktion stattfand.

Nach der DNA-Aufreinigung durch das *QIAquick® PCR-Purification Kit* zur Entfernung freier Fluorophore und Immobilisierung der fluoreszenzmarkierten DNA an einer oberflächenmodifizierten Glasplatte^[146] wurden die Proben zur Quantifizierung der Reaktion am Fluoreszenzmikroskop analysiert (Abbildung 3.28).

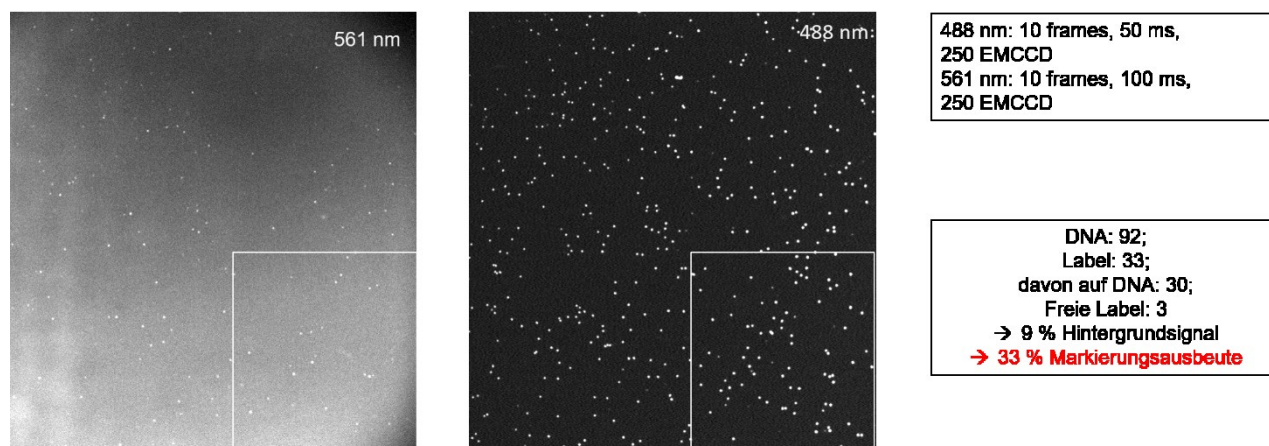


Abbildung 3.28: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (DNA-Kanal: Aufnahmen bei 488 nm, Label-Kanal: Aufnahmen bei 561 nm) der mittels Oberflächensilanisierung immobilisierten TAMRA-modifizierten PCR- λ -DNA. Es wurden 10 Bilder mit einer Belichtungszeit von 50 ms für den DNA-Kanal aufgenommen und je 10 Bilder mit einer Belichtungszeit von 100 ms für den Label-Kanal. Für alle Aufnahmen in allen Kanälen wurde eine EMCCD-Verstärkung von 250 gewählt.

Abbildung 3.28 zeigt die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der TAMRA-markierten 5hmC-Modifikation. Die DNA, die durch den Interkalator YOYO-1 sichtbar gemacht wurde, ist, ähnlich wie die Fluorophore im Label-Kanal, aufgrund ihrer geringen Länge nur als einzelner Punkt (*single-spot*) und nicht als gestreckter Einzelstrang zu erkennen. Da das verwendete DNA-Substrat nur genau eine 5hmC-Modifikation enthält, muss bei erfolgreicher Markierung auch genau ein TAMRA-Fluorophor an entsprechender Stelle auf der DNA erscheinen. Die Aufnahmen des DNA-Kanals (488 nm) wurden den Aufnahmen des Label-Kanals (561 nm) gegenübergestellt. Um einen möglichst hohen Kontrast der einzelnen Fluorophore zu erreichen, sind die Bilder in schwarz-weiß und nicht farbig dargestellt. Für die Visualisierung der DNA wurden am Fluoreszenzmikroskop 10 Bilder mit einer Belichtungszeit von 50 ms aufgenommen. Für den Label-Kanal wurden ebenfalls 10 Bilder mit einer höheren Belichtungszeit von 100 ms aufgenommen, um möglichst viele Fluorophore detektieren zu können, ohne diese jedoch bereits vor Detektion durch eine zu lange Bestrahlung

auszubleichen. Die Auswertung erfolgte über eine Auszählung bestimmter, definierter Bereiche der Bilder für den DNA-Kanal und den zugehörigen Label-Kanal (Abbildung 3.28, weißer Kasten) sowie des Kompositbildes der beiden übereinandergelegten Kanäle. Dabei wurde bestimmt, wie viele DNA-Punkte, wie viele Fluorophore und wie viele Fluorophore frei bzw. auf der DNA detektiert werden konnten. Somit konnte sowohl das erhaltene Hintergrundsignal als auch die Markierungsausbeute der zweistufigen Reaktion zur Hydroxymethylierungsdetektion beurteilt werden. Die Ausbeute für die Markierung des 5hmC über zwei Schritte lag nur bei knapp einem Drittel (33 %). Das Hintergrundsignal durch freie TAMRA-Fluorophore, die bei der Aufreinigung nicht entfernt werden konnten, war mit 9 % eher gering. Da jedoch der erste Schritt der zweistufigen Reaktion vor der Klick-Reaktion hinsichtlich der Vollständigkeit nicht überprüft werden konnte, ist es an dieser Stelle schwierig zu beurteilen, wodurch die niedrige Ausbeute der Gesamtreaktion entsteht und welcher der beiden Schritte dabei der entscheidende ist. Weiterhin wurde die Reaktion über die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen nur durch augenscheinliche Auszählung definierter Bereiche ausgewertet, was zu fehlerhaften Ergebnissen aufgrund nicht erkennbarer aber eventuell vorhandener *spots* führen kann. Deshalb müsste zur genauen Quantifizierung der Reaktionsausbeute zukünftig ein computergestützter Algorithmus entwickelt werden, der alle aufgenommenen Bilddateien in allen Bildbereichen automatisiert auswertet.

Um die Reaktionsausbeute zusätzlich genauer quantifizieren zu können, wurde ein weiteres PCR- λ -Substrat hergestellt, das einen gebundenen internen TAMRA-Fluorophor bereits in der Sequenz beinhaltet, ohne dass eine Modifikation stattfinden muss. Es konnte somit beurteilt werden, wie viel der TAMRA-Fluorophore aufgrund des individuellen Aufbaus des Mikroskops tatsächlich detektierbar waren. Die erhaltene relative Ausbeute könnte anschließend als Normierung auf die erhaltene Markierungsausbeute zur Quantifizierung der Hydroxymethylierung angewendet werden. Die fluoreszenzmikroskopische Messung des PCR- λ -Standards mit interner TAMRA-Modifikation lieferte 85 % detektierbare Fluorophore und bestätigte somit die Annahme, dass nicht 100 % der vorhandenen Label am Mikroskop detektiert werden konnten. Bezieht man diesen Wert auf die zweistufige Markierung zur 5hmC-Detektion, verbesserte sich die Markierungsausbeute von 33 % auf 39 %. Da die zweistufige Markierung von 5hmC jedoch nur zu knapp 40 % und nicht vollständig ablief, sollten im Folgenden die Reaktionsausbeuten für den ersten und zweiten Schritt genauer quantifiziert werden, um zu beurteilen, welcher Schritt der *two-step labelling*-Reaktion für die geringe Ausbeute verantwortlich ist. Dazu wurde wie für die einstufige Reaktion zur

Methylierungsdetektion mit fluoreszierenden Cofaktoranaloga eine Analyse mittels *rp*-HPLC durchgeführt (3.4.3).

3.5.2 HPLC-Quantifizierung

Für die nachfolgende Quantifizierung der *two-step labelling*-Reaktion zur Bestimmung der Ausbeuten der beiden Reaktionsschritte zur Hydroxymethylierungsdetektion, wurde ein kurzes Duplex-ODN mittels *rp*-HPLC analysiert. Das Duplex-ODN wurde dabei so gewählt, dass das Substrat genau eine zentrale 5hmC-Modifikation aufwies. Somit sollte zunächst überprüft werden, ob der erste Schritt der Glycosylierung vollständig abläuft, bevor der zweite Schritt der Klick-Reaktion quantifiziert wird.

Der Duplex aus 13mer hmC⁺ und 13mer hmC⁻ (5.1.4) wurde im ersten Schritt mit UDP-6-Azidoglucose (**10**) (40 μ M) und dem Enzym β -GT über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Probe aufgeteilt (je 1 nmol), sodass die Hälfte der Probe aus dem ersten Modifikationsschritt für den zweiten Schritt der Klick-Reaktion genutzt werden konnte. Die andere Hälfte wurde zunächst zur Beseitigung von überschüssigem Cofaktor sowie anderen Verunreinigungen durch Gelfiltration mit einer NAP-5-Säule (5.1.6) aufgereinigt und anschließend zur HPLC-Analyse des ersten Reaktionsschrittes in die einzelnen Nukleoside enzymatisch fragmentiert (5.2.10.6). Zur Überprüfung des zweiten Schrittes der zweistufigen Markierung wurde die verbliebene Probenlösung mit einem Überschuss an DBCO-PEG₄-5/6-TAMRA (**14**) (160 μ M) versetzt und erneut über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach der Aufreinigung mit einer NAP-5-Säule (5.1.6) zur Beseitigung überschüssiger Fluorophore, wurde die Probe fragmentiert (5.2.10.6) und mittels *rp*-HPLC hinsichtlich der Reaktionsausbeute quantifiziert. Abbildung 3.29 zeigt die *rp*-HPLC-Analysen des unmodifizierten Duplex-ODN, der Glycosylierung des ersten Reaktionsschrittes sowie die zweite Stufe der Klick-Reaktion nach der Fragmentierung in die einzelnen Nukleoside. Aufgenommen wurden die Chromatogramme bei den Wellenlängen $\lambda = 260/272$ nm (Kontrolle und erster Schritt) bzw. $\lambda = 260/555$ nm (zweiter Schritt mit TAMRA-Fluorophor).

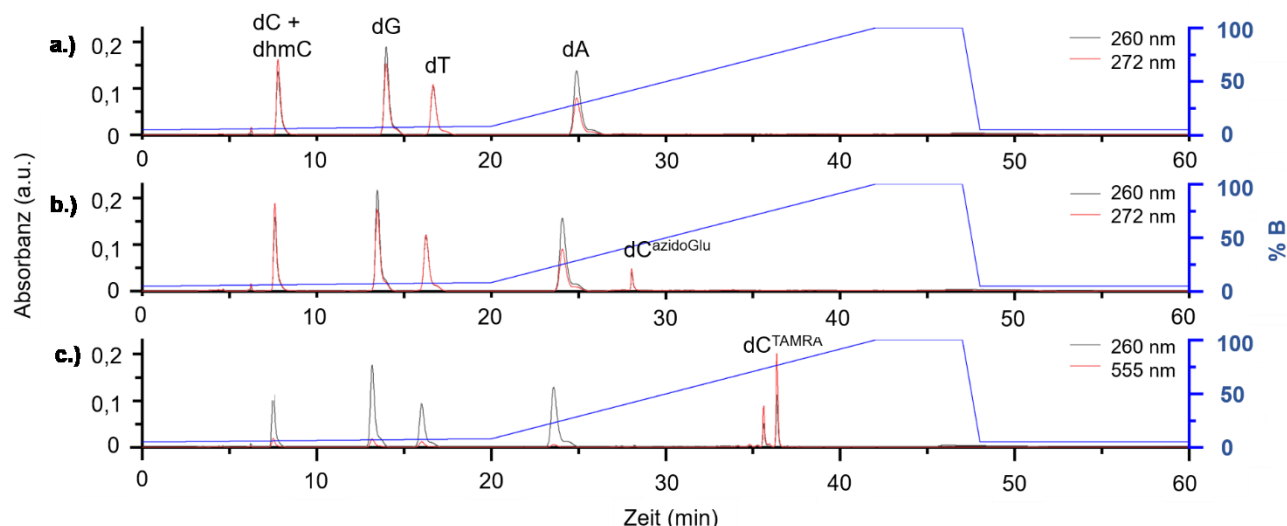


Abbildung 3.29: HPLC-Analyse der Fragmentierung des unmodifizierten Duplex-ODN (13mer hmC+/13mer hmC-) (a), der Fragmentierung des ersten Schrittes der Modifikation mit DNA- β -GT und UDP-6-Azidoglucose (10) (b) und der Fragmentierung des zweiten Schrittes der Klick-Reaktion mit DBCO-PEG_{4-5/6}-TAMRA (14) (160 μ M) (c) aufgenommen bei den Wellenlängen λ = 260/272 nm und λ = 260/555 nm (jeweils 1 nmol). Die Konzentration von DNA- β -GT betrug 1,72 U/ μ L, die Konzentration des Duplex 20 μ M und die Konzentration des Cofaktors 40 μ M. dC: 2'-Desoxycytidin, dhmcC: 2'-Desoxy-5hydroxymethylcytidin, dG: 2'-Desoxyguanosin, dT: 2'-Desoxythymidin, dA: 2'-Desoxyadenosin, dC^{azidoGlu}: modifiziertes 2'-Desoxy-5hydroxymethylcytidin mit UDP-6-Azidoglucose (10), dC^{TAMRA}: modifiziertes 2'-Desoxy-5hydroxymethylcytidin geklickt mit DBCO-PEG_{4-5/6}-TAMRA (14). Analyse mit Methode N2 und neutralen HPLC-Puffern A und B (5.2.1).

Das Chromatogramm in Abbildung 3.29 a.) entspricht einem Kontrolllauf, der nur mit dem unmodifizierten und fragmentieren Duplex-ODN durchgeführt wurde. Erkennbar sind hier vier Signale, die nach Messung von Nukleosid-Standards den einzelnen Nukleosiden dC und dhmcC (t_R = 8,5 min), dG (t_R = 14,5 min), dT (t_R = 17 min) und dA (t_R = 25 min) zugeordnet werden konnten. Auffällig war dabei, dass die Nukleoside dC und dhmcC sehr ähnliche Retentionszeiten aufwiesen und deshalb im Chromatogramm als ein Signal detektiert wurden. Es war durch keine Variation der HPLC-Bedingungen im Rahmen der für diese Arbeit durchgeführten Experimente möglich, diese beiden Nukleoside vollständig zu trennen. Das Chromatogramm in Abbildung 3.29 b.) zeigt die HPLC-Analyse der Glucosylierung des ersten Reaktionsschrittes mit DNA- β -GT und UDP-6-Azidoglucose (10). Im Vergleich zum Chromatogramm des unmodifizierten Duplex-ODN tauchte ein neues Signal bei einer Retentionszeit t_R = 27 min auf, welches dem modifiziertes 2'-Desoxycytosin mit UDP-6-Azidoglucose (10) (dC^{azidoGlu}) zugeordnet werden konnte. Nach der Klick-Reaktion zur Fluoreszenzmarkierung mit DBCO-PEG_{4-5/6}-TAMRA (14) im zweiten Reaktionsschritt (Abbildung 3.29 c.) entstanden weiterhin

zwei neue Signale bei Retentionszeiten von ca. $t_R = 35,5$ min und $t_R = 36,5$ min, die aufgrund der hohen Absorbanz bei einer Wellenlänge von 555 nm dem fluoreszenzmarkierten 2'-Desoxycytosin geklickt mit DBCO-PEG_{4-5/6}-TAMRA (**14**) (dC^{TAMRA}) zugeordnet werden konnten, da das Absorptionsmaximum des TAMRA-Fluorophors für $\lambda = 555$ nm erreicht wird. Außerdem verschwindet das Signal für $dC^{azidoGlu}$ des ersten Schrittes nahezu vollständig, was für einen erfolgreichen Reaktionsumsatz der Azidgruppe mit der Dreifachbindung des TAMRA-modifizierten DBCO-Reagenz (**14**) spricht. Im Chromatogramm Abbildung 3.29 c.) sind zwei neue Signale nach der Klick-Reaktion entstanden, da es sich bei dem eingesetzten DBCO-5/6-TAMRA (**14**) um ein Isomerengemisch handelte und sich somit zwei verschiedene Produkte nach der Klick-Reaktion ergaben, die zu unterschiedlichen Zeiten eluieren.

Die Quantifizierung der Reaktionen und die Bestimmung der Anzahl der einzelnen Nukleoside erfolgte analog zu der in Abschnitt 3.4.3 beschriebenen Vorgehensweise mit Gleichung (1) und den zugehörigen Extinktionskoeffizienten in Tabelle 3.3. Für den Kontrolllauf (a.) wurde auf die Gesamtfläche aller Nukleoside normiert, für den ersten und zweiten Reaktionsschritt (b., c.) sowohl einmal auf die Gesamtfläche als auch nur auf die Fläche von dG. Durch die Normierung auf die Fläche von dG anstatt auf die Gesamtfläche aller Signale, erfolgte die Berechnung des $dC^{azidoGlu}$ unabhängig von den Flächen der modifizierten Nukleoside. Die Bestimmung des dC^{TAMRA} konnte somit ebenfalls über die Abnahme des Signals für $dC^{azidoGlu}$ von Schritt 1 zu Schritt 2 bestimmt werden. Aufgrund der in Abschnitt 3.4.3 beschriebenen Problematik der HPLC-Detektorlimitierung konnte so die Reaktionsausbeute verlässlich quantifiziert werden. Die qualitative Aufnahme bei einer Wellenlänge von $\lambda = 555$ nm ist hier zur Identifikation der Modifikation aufgeführt. Zur besseren Vergleichbarkeit aller TAMRA-modifizierten Nukleoside zur Methylierungs- und Hydroxymethylierungsdetektion wurde hier jedoch nur der Wert, der über die Abnahme des $dC^{azidoGlu}$ -Signals bestimmt wurde, betrachtet. Tabelle 3.6 zeigt die Quantifizierung der zweistufigen Markierungsreaktion von 5hmC durch DNA- β -GT und UDP-6-Azidoglucose (**10**) und die zugehörigen Ausbeuten. Für die Markierung mit dem TAMRA-Fluorophor wurde die Anzahl und Ausbeute aufgrund der Detektorlimitierung im sichtbaren Bereich sowohl bei einer Wellenlänge $\lambda = 555$ nm als auch $\lambda = 260$ nm bestimmt.

Tabelle 3.6: Quantifizierung der Anzahl der Nukleoside und entsprechende Ausbeuten für die *two-step labelling*-Reaktion zur Hydroxymethylierungsdetektion. 1. Schritt: Modifikation von 5hmC durch DNA- β -GT und UDP-6-Azidoglucose (**10**), 2. Schritt: Klick-Reaktion mit DBCO-PEG₄-5/6-TAMRA (**14**). Die Anzahl sowie Ausbeute für die Markierung mit dem TAMRA-Fluorophor (2. Schritt) wurde für die Wellenlängen $\lambda = 555$ nm und $\lambda = 260$ nm quantifiziert. Außerdem wurde eine alternative Berechnung über die Abnahme des dC^{azidoGlu}-Signals vom ersten zum zweiten Schritt angewendet.

	dC +dhmC	dG	dT	dA	dC ^{azidoGlu}	dC ^{TAMRA}	Ausbeute
Kontrolle	7,0	7,0	6,0	6,0	-	-	-
1. Schritt	6,1	7,0	6,2	5,7	1,1	-	100 %
2. Schritt: TAMRA: 260 nm (555 nm)	6,1	7,0	6,4	5,9	0,1	0,8 (0,6**)	80 % (60 %**)
1. Schritt (Normierung auf dG)	6,0	7,0	6,3	5,8	1,1	-	100 %
2. Schritt (Normierung auf dG)	6,1	7,0	6,4	6,0	0,1	1*	91 %*

* Anzahl und Ausbeute quantifiziert über die Abnahme des Signals für dC^{azidoGlu} vor und nach der Klick-Reaktion

** wird im HPLC-Detektor unterschätzt.

Betrachtet man die Sequenz des verwendeten doppelsträngigen ODN (5.4.1) werden 7 dC+dhmC, 7 dG, 6 dT und 6 dA erwartet. Der Kontrolllauf der Fragmentierung des unmodifizierten Duplex-ODN (**a**) zeigte exakt diese Verteilung. Für den ersten Reaktionsschritt der Glucosylierung von 5hmC konnten 1,1 dC^{azidoGlu} detektiert werden, während genau ein dC+dhmC verschwindet. Da die Sequenz nur genau eine 5hmC-Modifikation aufwies, konnte somit ein vollständiger Umsatz und damit eine Reaktionsausbeute von 100 % für den ersten Schritt der zweistufigen Markierung erreicht werden. Für den zweiten Schritt der Klick-Reaktion zeigte sich die Limitierung des verwendeten HPLC-Detektors für die Aufnahmen im sichtbaren Bereich ($\lambda = 555$ nm) deutlich, da so nur knapp 60 % der TAMRA-Markierung detektiert werden konnten, während für die Quantifizierung bei $\lambda = 260$ nm eine höhere Reaktionsausbeute von 80 % erreicht wurde. Da jedoch nur noch knapp 0,1 dC^{azidoGlu} nach der Klick-Reaktion verblieben, schien die Bestimmung über die Wellenlänge $\lambda = 260$ nm ebenfalls noch nicht die vollständige und korrekte Reaktionsausbeute zu liefern. Daher wurde die Quantifizierung der beiden Schritte zusätzlich mit einer Normierung auf die Fläche von dG durchgeführt, um die Abnahme des dC^{azidoGlu}-Signals von Schritt 1 zu Schritt 2 unabhängig von

den Flächen der modifizierten Nukleoside zu betrachten. Hierbei konnte eine Ausbeute von 91 % für den zweiten Schritt und damit für die Gesamtreaktion über zwei Schritte bestimmt werden. Mit Hinblick auf das Ziel der vorliegenden Arbeit und der nachfolgenden orthogonalen Markierung der beiden epigenetischen Modifikationen 5mC und 5hmC ist dies besonders wichtig, da eine Vollständigkeit der Methylierungs- und Hydroxymethylierungsdetektion für die Bestimmung der epigenetischen Information im untersuchten Gewebe gewährleistet werden muss. Beide Einzelmodifikationen zur Markierung des 5mC (3.4.3) und des 5hmC lieferten mit der HPLC-Quantifizierung sehr gute Reaktionsausbeuten von über 90 %. Für die Quantifizierung der Reaktionsausbeute der *two-step labelling* Reaktion ist der HPLC-Assay gegenüber der *Single-spot*-Analyse zu bevorzugen, da diese *Quenching*-Probleme zeigt und damit nicht quantitativ ist. Für die Markierung des 5hmC mittels *Single-spot*-Fluoreszenzanalyse konnten gegenüber der einstufigen DNA-Markierung mit M.TaqI und einem fluoreszierenden Cofaktoranalogen nur knapp die Hälfte an Fluorophoren detektiert werden. M.TaqI überträgt zwei Fluorophore auf die im Substrat untersuchte palindromische Erkennungssequenz, während für 5hmC aufgrund nur einer 5hmC Modifikation im Substrat nur ein Fluorophor übertragen werden kann. Einen *spot*, der von zwei übertragenen Fluorophoren herrührt, sieht man unter dem Fluoreszenzmikroskop demnach deutlicher als nur eine einzelne Markierung, weshalb für die einstufige Modifikation mit M.TaqI und fluoreszierenden Cofaktoranaloga höhere Reaktionsausbeuten erzielt werden konnten.

3.6 Orthogonale DNA-Markierung

Das Ziel der vorliegenden Dissertation war die gleichzeitige (orthogonale) Fluoreszenzmarkierung der epigenetischen Modifikationen 5mC und 5hmC auf einem DNA-Substrat zur späteren Bestimmung der epigenetischen Information mittels Fluoreszenzmikroskopie. 5mC und das Oxidationsprodukt 5hmC stellen dabei wichtige Biomarker zur Krebsdiagnostik dar, denn Veränderungen im Methylierungsgrad^[68,145] und eine dramatische Abnahme der Hydroxymethylierung^[86,87] innerhalb des Genoms wurden bei verschiedenen Tumorarten beobachtet. Aus diesem Grund sollte eine bioorthogonale Markierung der beiden epigenetischen Modifikationen durch verschiedene Fluorophore und spezifischen Klick-Reaktionen mittels *two-step labelling*-Reaktionen erfolgen (Abschnitt 2). Für die nachfolgende orthogonale DNA-Markierung wurde zur Methylierungsdetektion jedoch statt der *two-step labelling*-Reaktion eine einstufige Markierungsreaktion genutzt (Abbildung 3.30, links), da diese für die vorliegenden Untersuchungen die besten Ausbeuten lieferte (Abschnitt 3.3 und 3.4). Dazu erfolgte eine indirekte Bestimmung durch Fluoreszenzmarkierung der nicht methylierten CpG's durch sequenzspezifische Übertragung der Seitenkette eines fluoreszierenden doppeltaktivierten Cofaktoranalogs mittels einer CpG-abhängigen DNA-MTase auf die DNA. Durch Differenzbildung der Gesamtmenge an CpG-Sequenzen im untersuchten Genom und der fluoreszenzmarkierten CpG-Sequenzen, kann der Methylierungsgrad bestimmt werden. Für die Hydroxymethylierungsdetektion wurde weiterhin eine zweistufige Markierungsreaktion eingesetzt, wobei anders als für die Methylierungsdetektion eine direkte Fluoreszenzmarkierung am 5hmC stattfand. Dazu erfolgte im ersten Schritt zunächst eine enzymatische Modifikation mittels DNA- β -GT und dem Cofaktor UDP-6-Azidoglucose (**10**), bei dem das Zuckermolekül mit gebundener Azidgruppe direkt auf das DNA-Substrat übertragen wurde. Im anschließenden zweiten Schritt der *two-step labelling*-Reaktion reagiert diese Azidgruppe spezifisch mit der gespannten Dreifachbindung von DBCO-PEG₄-5/6-TAMRA (**14**) in einer spannungsinduzierten 1,3 dipolaren Cycloaddition (SPAAC) (Abbildung 3.30, rechts). Die fluoreszenzmarkierte DNA kann abschließend mittels Fluoreszenzmikroskopie zur Ermittlung der epigenetischen Informationen des 5mC- und 5hmC-Gehalts analysiert werden. Abbildung 3.30 zeigt den allgemeinen Ablauf dieser bioorthogonalen Markierungsreaktion zur Fluoreszenzdetektion von 5mC und 5hmC zeitgleich auf einem DNA-Substrat mit zwei unterschiedlichen Fluorophoren.

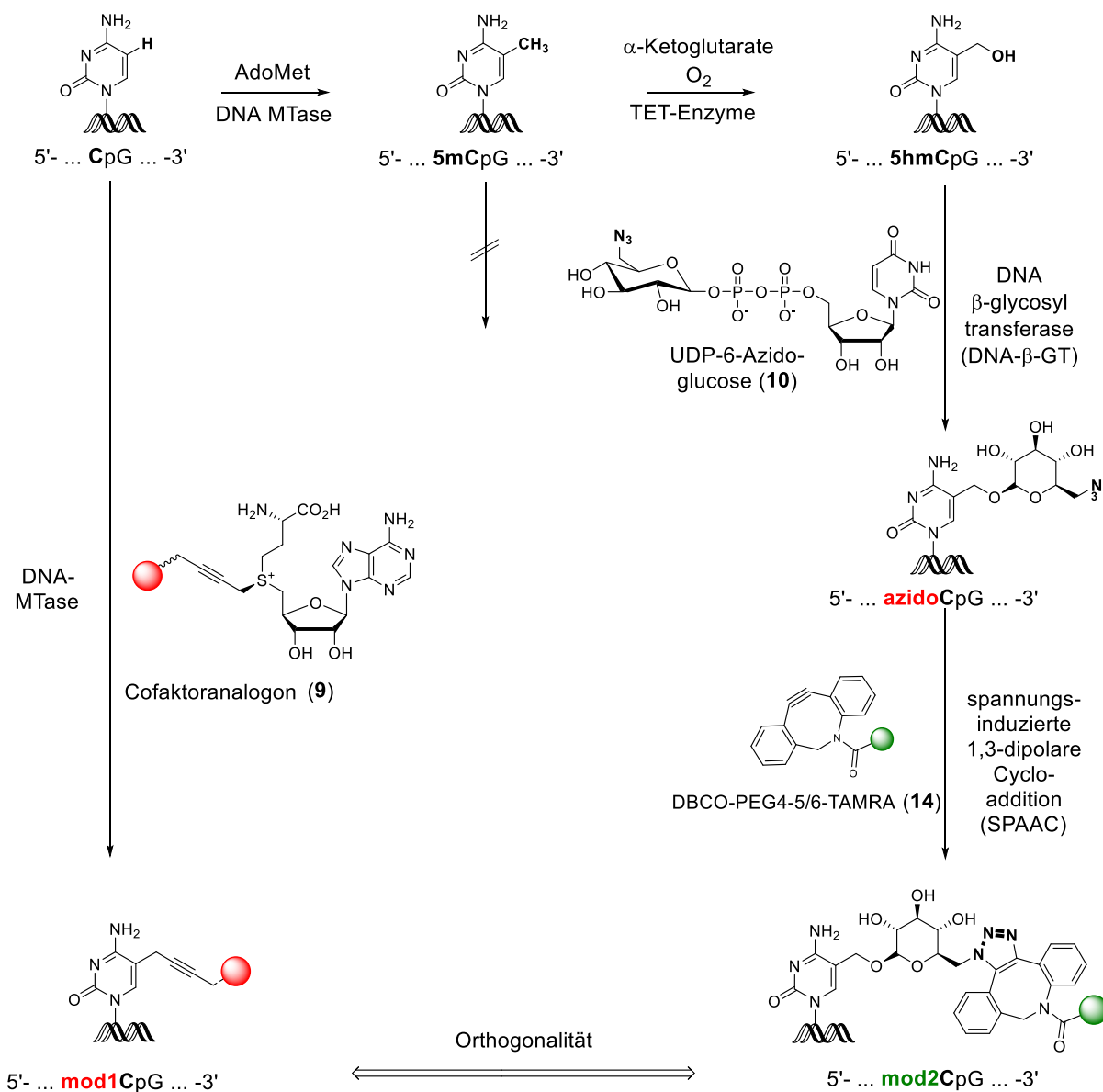


Abbildung 3.30: Bioorthogonale Markierungsreaktion zur Fluoreszenzanalyse der epigenetischen Modifikationen 5mC und 5hmC auf einem DNA-Substrat. Methylierungsdetektion (indirekt über CpG): Die Seitenkette eines fluoreszierenden doppeltaktivierten AdoMet-Analogons (blau) wird sequenzspezifisch mittels einer methylierungssensitiven DNA-MTase auf die DNA übertragen (links). Hydroxymethylierungsdetektion (direkt am 5hmC): Zweistufige Markierung der DNA durch DNA- β -GT und UDP-6-Azidoglucose (**10**) (1. Schritt) und anschließender Klick-Reaktion (SPAAC) mit DBCO-PEG_{4-5/6}-TAMRA (**14**) (2. Schritt) (rechts). Die Fluorophore (hier CF640R und TAMRA) sind als rote (CF640R) und grüne Kugeln (TAMRA) dargestellt.

Für die orthogonale Markierung der epigenetischen Modifikationen 5mC und 5hmC wurde PCR- λ -DNA fluoreszenzmarkiert. Dieses PCR-Substrat wurde so hergestellt, dass es genau eine palindromische TCGA-Erkennungssequenz für die eingesetzte CpG-methylierungsabhängige DNA-MTase M.TaqI und genau eine 5hmC-Modifikation aufweist,

um die Ausbeuten bestimmen zu können. Die markierten Proben wurden in Kooperation mit dem AK Wöll (IPC, RWTH Aachen University) am institutseigenen Fluoreszenzmikroskop analysiert und zuvor mittels der Methode des DNA-*Combings* und einer literaturbekannten Oberflächensilanisierung des Deckgläschens immobilisiert^[146]. Die Interkalation der DNA mit dem YOYO-1 Cyaninfarbstoff erfolgte analog zu Abschnitt 3.3.1. Für die Visualisierung der Mikroskopiebilder der kurzen PCR- λ -DNA wurde sowohl der DNA-Kanal als auch die beiden Label-Kanäle, in denen jeweils *single-spots* analysiert wurden, in schwarz-weiß dargestellt. Somit sollte ein möglichst hoher Kontrast für die Darstellung der Einzelpunkte und ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis erreicht werden.

3.6.1 Fluoreszenzmikroskopie von markiertem PCR-Produkt

Zur orthogonalen Analyse der epigenetischen Modifikationen 5mC und 5hmC wurde ein definiertes PCR-Produkt (1052 Bp) von λ -Templat-DNA verwendet (5.2.8), das in der Sequenz neben einer spezifischen Position für die CpG-methylierungsabhängige DNA-MTase M.TaqI (5'-TCGA-3') auch eine 5hmC-Modifikation aufweist (Anhang, B.1). Somit kann der epigenetische Status der beiden Modifikationen zeitgleich auf einem DNA-Substrat durch Fluoreszenzmarkierung mit zwei unterschiedlichen Fluorophoren quantifiziert werden. Dazu wurde eine Modifikationslösung bestehend aus PCR- λ -DNA, AdoYnCF640R (**20**), UDP-6-Azidoglucose (**10**), M.TaqI (1 Äq. bezogen auf 5'-TCGA-3'-Erkennungssequenzen) und β -GT (0,66 U/ μ L) in einem Mikroreaktionsgefäß angesetzt, gut durchmischt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Für den zweiten Schritt der 5hmC-Markierung wurde der Ansatz anschließend mit einem Überschuss an DBCO-PEG_{4-5/6}-TAMRA (**14**) versetzt und erneut bei 37 °C über Nacht inkubiert (Abschnitt 5.7). Zur Entfernung noch freier Fluorophore sowie anderer Verunreinigungen wurde die Probe mit dem *QIAquick® PCR-Purification* Kit aufgereinigt, um ein möglichst hohes Signal-Rausch-Verhältnis für die Aufnahmen der Mikroskopiebilder zu gewährleisten. Nachdem die fluoreszenzmarkierte DNA an einer oberflächenmodifizierten Glasplatte^[146] immobilisiert wurde, wurde die Probe zur Quantifizierung der orthogonalen Reaktion am Fluoreszenzmikroskop analysiert (Abbildung 3.31).

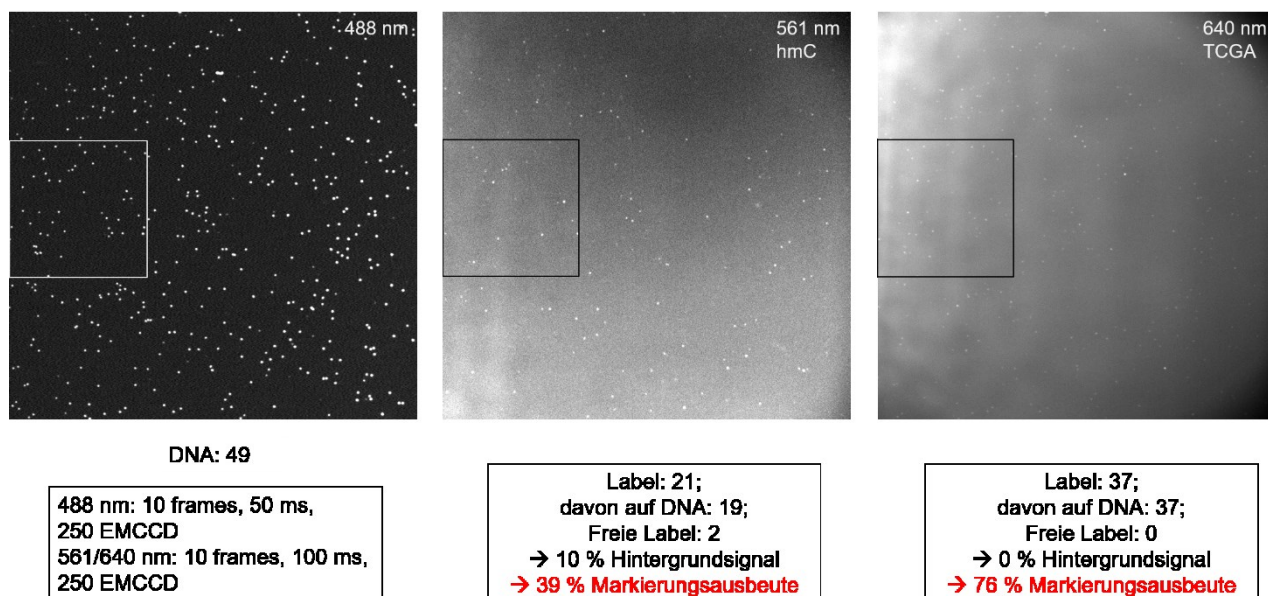


Abbildung 3.31: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (DNA-Kanal: Aufnahmen bei 488 nm, links; Label-Kanal: Aufnahmen bei 561/640 nm, Mitte, rechts) der orthogonal markierten PCR- λ -DNA (TAMRA und CF640R), die mittels DNA-*Combing* immobilisiert wurde. Für die Methylierungsdetektion wurde die DNA mittels der CpG-methylierungsabhängigen DNA-MTase M.TaqI (5' TCGA 3') und AdoYnCF640R (**20**) sequenzspezifisch markiert (rechts). Zweistufige Markierung der DNA durch DNA- β -GT und UDP-6-Azidoglucose (**10**) und anschließender Klick-Reaktion (SPAAC) mit DBCO-PEG₄-5/6-TAMRA (**14**) zur Hydroxymethylierungsdetektion (Mitte). Es wurden je 10 Bilder mit einer Belichtungszeit von 100 ms für die Label-Kanäle aufgenommen und 10 Bilder mit einer Belichtungszeit von 50 ms für den DNA-Kanal. Für alle Aufnahmen in allen Kanälen wurde eine EMCCD-Verstärkung von 250 gewählt.

Abbildung 3.31 zeigt die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der TAMRA-markierten 5hmC-Modifikation (Mitte) und der CF640R-markierten TCGA-Sequenzen (rechts). Die DNA (3.31, links), die durch den Interkalator YOYO-1 sichtbar gemacht wurde, ist, ähnlich wie die Fluorophore in den Label-Kanälen, aufgrund ihrer geringen Länge nur als einzelner Punkt (*single-spot*) und nicht als gestreckter Doppelstrang zu erkennen. Da das verwendete DNA-Substrat nur eine TCGA-Sequenz und eine 5hmC-Modifikation enthält, müssen bei erfolgreicher Markierung auch genau ein TAMRA- und ein bzw. zwei CF640R-Fluorophore (3.4.3) an entsprechender Stelle auf der DNA erscheinen. Die Aufnahmen des DNA-Kanals (488 nm) wurden den Aufnahmen der Label-Kanäle (561 nm und 640 nm) gegenübergestellt. Um einen möglichst hohen Kontrast der einzelnen Fluorophore zu erreichen, wurden die Bilder in schwarz-weiß und nicht farbig dargestellt. Für die Visualisierung der DNA wurden am Fluoreszenzmikroskop 10 Bilder mit einer Belichtungszeit von 50 ms aufgenommen und für die Label-Kanäle ebenfalls 10 Bilder jedoch mit einer höheren Belichtungszeit von 100 ms, um

möglichst viele Fluorophore detektieren zu können, ohne diese bereits vor Detektion durch eine zu lange Bestrahlung auszubleichen. Die Aufnahme der Mikroskopiebilder erfolgte dabei stets in einer bestimmten Reihenfolge aufgrund der Laserempfindlichkeit der eingebrachten Fluorophore. Um eine Mitanregung und damit frühzeitige Auslöschung der CF640R-Fluorophore zu vermeiden, wurde zunächst die langwellige CF640R-Fluoreszenz angeregt. Dadurch könnte ein schnelles Ausbleichen der roten Fluorophore und eine unzureichende Detektion verhindert werden. Anschließend erfolgte die Anregung der TAMRA-Fluorophore und abschließend die Visualisierung des DNA-Kanals, da der YOYO-1 Interkalator eine stabile und langanhaltende Fluoreszenzdetektion gewährleistet.

Die Auswertung erfolgte über eine Auszählung bestimmter, definierter Bereiche der Bilder für den DNA-Kanal und die zugehörigen Label-Kanäle sowie des Kompositbildes der drei übereinandergelegten Kanäle. Abbildung 3.31 zeigt die Auszählung der Aufnahmen in den drei Laserkanälen beispielhaft für einen definierten Bildbereich, der durch ein Quadrat dargestellt ist. Dabei wurde bestimmt, wie viele DNA-Punkte, wie viele Fluorophore und wie viele Fluorophore frei bzw. auf der DNA detektiert werden konnten. Somit konnten sowohl das erhaltene Hintergrundsignal als auch die Markierungsausbeute der orthogonalen Markierungsreaktion zur Methylierungs- und Hydroxymethylierungsdetektion beurteilt werden. Die bestimmten Ausbeuten der orthogonalen Reaktionen über mehrere Bereiche eines Bildes waren allesamt sehr ähnlich und lagen bei ca. 40 % für die Markierung von 5hmC und bei ca. 80 % für die Methylierungsdetektion. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden jedoch nur durch augenscheinliche Auszählung definierter Bildbereiche ausgewertet, was zu fehlerhaften Ergebnissen aufgrund nicht erkennbarer aber eventuell vorhandener *spots* führen kann und somit niedrigere Reaktionsausbeuten liefern würde. Deshalb müsste zur genauen Quantifizierung der Reaktionsausbeute zukünftig ein computergestützter Algorithmus entwickelt werden, der alle aufgenommenen Bilddateien in allen Bildbereichen automatisiert auswertet. Um die Reaktionsausbeute jedoch zusätzlich genauer beurteilen zu können, wurde ein weiteres PCR- λ -Substrat hergestellt, das einen gebundenen internen TAMRA-Standard bereits in der Sequenz beinhaltet, ohne dass eine Modifikation stattfinden muss. Es konnte somit beurteilt werden, wie viel der TAMRA-Fluorophore aufgrund des individuellen Aufbaus des Mikroskops tatsächlich detektierbar waren. Die erhaltene relative Ausbeute konnte anschließend auf die erhaltene Markierungsausbeute zur Hydroxymethylierungsdetektion mit DBCO-PEG₄-5/6-TAMRA (**14**) umgerechnet werden. Die fluoreszenzmikroskopische Messung des PCR- λ -Substrats mit interner TAMRA-Modifikation lieferte 85 % detektierbare Fluorophore und bestätigte somit die Annahme, dass nicht 100 % der vorhandenen Label am

Mikroskop detektiert werden konnten (vgl. 3.5.1). Bezieht man diesen Wert auf die 5hmC-Markierung der PCR- λ -DNA mit dem TAMRA-Fluorophor, verbessert sich die Markierungsausbeute von 39 % auf 46 %. Um feststellen zu können, wie hoch die tatsächliche Ausbeute der Methylierungsreaktion mit dem CF640R-Fluorophor in Bezug auf die Limitierung des Mikroskops ist, müsste weiterhin ein PCR-Substrat mit interner CF640R-Modifikation hergestellt und quantifiziert werden. Dies wurde im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht untersucht.

Generell fällt auf, dass für die orthogonale Markierungsreaktion in einem Ansatz mit beiden Enzymen und Cofaktoren (10, 20) sogar leicht höhere Ausbeuten für die Methylierungs- und Hydroxymethylierungsdetektion beobachtet werden konnten, als bei Betrachtung der Einzelreaktionen (3.4.1 und 3.5.1). Dies könnte mit der Auswertungsmethode der manuellen Bildauszählung erklärt werden, die nicht sehr repräsentativ und leicht fehlerbehaftet ist. Für die Markierungsdetektion von 5mC mit CF640R konnte für die Einzeluntersuchung der einstufigen Reaktion eine Ausbeute von 63 % erreicht werden, während für die orthogonale *one-pot*-Reaktion in einem Reaktionsgemisch mit einem weiteren Enzym und Cofaktor sowie einem DBCO-Reagenz eine höhere Ausbeute von 76 % bestimmt wurde. Für die Hydroxymethylierungsdetektion steigerte sich die Ausbeute ebenfalls von 39 % (Einzelreaktion) auf 46 % (orthogonale Reaktion). Sowohl für die Quantifizierung der Einzelreaktionen als auch für die orthogonale Untersuchung der fluoreszenzmarkierten DNA zeigte sich jedoch dieselbe Tendenz, dass die einstufige Markierung zur Methylierungsdetektion eine deutlich höhere Ausbeute lieferte als die Markierung von 5hmC über zwei Schritte.

Um die Reaktionsausbeute der orthogonalen Reaktion in einer *one-pot*-Reaktion unabhängig von der Limitierung der Bildaufnahmen und augenscheinlichen Auswertungsmethode genauer quantifizieren zu können, wurde nachfolgend, wie für die Untersuchung der Einzelreaktionen, eine Analyse mittels *rp*-HPLC durchgeführt (3.4.3). Dazu wurden zwei Substrate in einem Reaktionsgemisch genutzt, die jeweils nur eine spezifische Position für die eingesetzten Enzyme M.TaqI und DNA- β -GT aufwiesen.

3.6.2 HPLC-Quantifizierung

Für die nachfolgende Quantifizierung der orthogonalen Reaktion zur gleichzeitigen Methylierungs- und Hydroxymethylierungsdetektion wurde eine *one-pot*-Reaktion durchgeführt und mittels *rp*-HPLC analysiert. *One-pot* bedeutet, dass die beiden Markierungsreaktionen zur Detektion von 5mC und 5hmC in einem Mikroreaktionsgefäß mit

allen benötigten Reagenzien und zwei kurzen Duplex-ODN angesetzt wurden. Das eine Substrat enthielt dabei eine palindromische Erkennungssequenz für die eingesetzte DNA-MTase M.TaqI und das andere wies eine 5hmC-Modifikation für die DNA- β -GT auf, um die Reaktionsausbeute der orthogonalen Reaktion bestimmen zu können.

Die Reaktionsansätze zur orthogonalen Markierung erfolgten dabei sowohl durch die gleichzeitige Zugabe beider Enzyme und Cofaktoren (analog zu *single-spot*-Analyse, 3.6.1), als auch durch sukzessive Zugabe, um eine mögliche Inhibition zu minimieren. Für den gleichzeitigen Reaktionsansatz wurden doppelsträngige ODN aus 13mer hmC⁺ und 13mer hmC⁻ bzw. 14⁺/TCGA und 14⁻/TCGA (5.1.4) zunächst mit den beiden Cofaktoren AdoYnCF640R (**20**) und UDP-6-Azidoglucose (**10**) sowie den beiden Enzymen M.TaqI (1 Äq. pro Erkennungssequenz bezogen auf eine TCGA-Sequenz auf dem Duplex-ODN) und DNA- β -GT angesetzt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Für die Hydroxymethylierungsdetektion erfolgte dann zusätzlich die Klick-Reaktion mit einem Überschuss an DBCO-PEG₄-5/6-TAMRA (**14**) (5.2.10.4) und eine Inkubation über Nacht bei 37 °C. Für den sukzessiven Reaktionsansatz wurden doppelsträngige ODN aus 13mer hmC⁺ und 13mer hmC⁻ bzw. 14⁺/TCGA und 14⁻/TCGA (5.1.4) mit DNA- β -GT und UDP-6-Azidoglucose (**10**) angesetzt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden das Cofaktoranalogen AdoYnCF640R (**20**) und M.TaqI (1 Äq.) sowie ein Überschuss DBCO-PEG₄-5/6-TAMRA (**14**) zugegeben, gut durchmischt und erneut bei 37 °C über Nacht inkubiert. Die Markierungslösung beider Ansätze wurde anschließend zur Beseitigung von überschüssigen Fluorophoren sowie anderen Verunreinigungen durch Gelfiltration mit einer NAP-5-Säule (5.1.6) aufgereinigt und anschließend zur HPLC-Analyse der orthogonalen Gesamtreaktion hinsichtlich der Reaktionsausbeute in die einzelnen Nukleoside enzymatisch fragmentiert (5.2.10.6). Abbildung 3.32 zeigt die *rp*-HPLC-Analysen der unmodifizierten Duplex-ODN und die Fragmentierungen der orthogonalen Markierung mit M.TaqI und AdoYnCF640R (**20**) sowie DNA- β -GT und UDP-6-Azidoglucose (**10**) mit DBCO-PEG₄-5/6-TAMRA (**14**) des sukzessiven Reaktionsansatzes. Aufgenommen wurden die Chromatogramme bei den Wellenlängen λ = 260/272 nm zur Analyse der Kontrolle mit den unmodifizierten Duplex-ODN, bei λ = 260/600 nm für die Reaktion zur Methylierungsdetektion und bei λ = 260/555 nm zur Analyse der Hydroxymethylierungsdetektion.

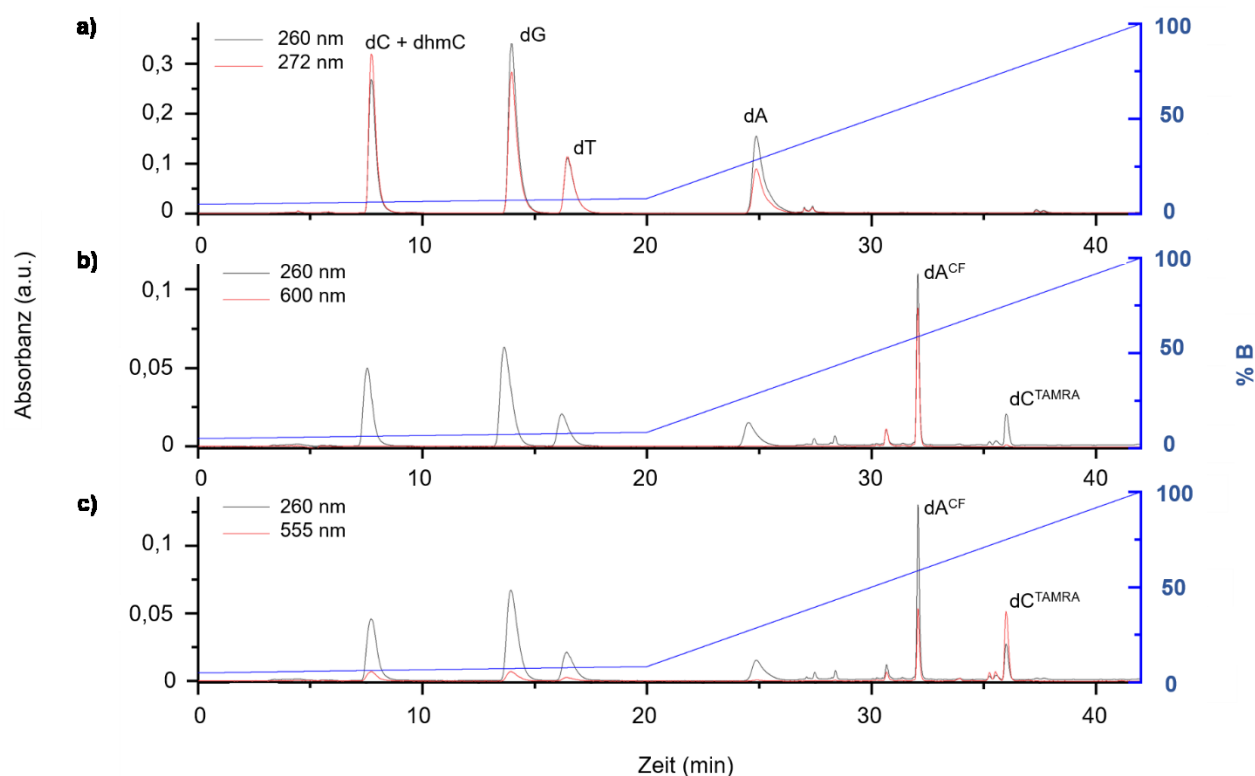


Abbildung 3.32: HPLC-Analyse (sukzessiver Ansatz) der Fragmentierung der unmodifizierten Duplex-ODN (a) und der Fragmentierungen der orthogonalen Markierung mit M.TaqI/AdoYnCF640R (20) und DNA- β -GT/UDP-6-Azidoglucose (10) mit DBCO-PEG₄-5/6-TAMRA (14) aufgenommen bei $\lambda = 260/600$ nm zur Analyse der Methylierungsdetektionsreaktion (b) und bei $\lambda = 260/555$ nm zur Analyse der Hydroxymethylierungsdetektion (c). Eingesetzte Konzentrationen: M.TaqI (1 Äq. bezogen auf eine TCGA-Erkennungssequenz), DNA- β -GT (1,77 U/ μ L), AdoYnCF640R (20) (40 μ M) und UDP-6-Azidoglucose (10) (40 μ M). dC: 2'-Desoxycytidin, dhmC: 2'-Desoxy-5-hydroxymethylcytidin, dG: 2'-Desoxyguanosin, dT: 2'-Desoxythymidin, dA: 2'-Desoxyadenosin, dA^{CF}: mit AdoYnCF640R (20) modifiziertes 2'-Desoxyadenosin, dC^{TAMRA}: modifiziertes 2'-Desoxy-5-hydroxymethylcytidin geklickt mit DBCO-PEG₄-5/6-TAMRA (14). Analyse mit Methode N2 und neutralen HPLC-Puffern A und B (5.2.1).

Das Chromatogramm in Abbildung 3.32 a) entspricht einem Kontrolllauf, der nur mit den unmodifizierten und fragmentieren Duplex-ODN durchgeführt wurde. Erkennbar sind hier vier Signale, die nach Messung von Nukleosid-Standards den einzelnen Nukleosiden dC+dhmC ($t_R = 8,5$ min), dG ($t_R = 14,5$ min), dT ($t_R = 17$ min) und dA ($t_R = 25$ min) zugeordnet werden konnten. Auffällig war dabei, dass die Nukleoside dC und dhmC sehr ähnliche Retentionszeiten aufwiesen und deshalb im Chromatogramm als ein Signal erschienen. Es war durch keine Variation der HPLC-Bedingungen im Rahmen der für diese Arbeit durchgeführten Experimente möglich, diese beiden Nukleoside als zwei einzelne, basisliniengetreunte Signale zu erhalten. Das Chromatogramm in Abbildung 3.32 b) zeigt die Fragmentierung der

orthogonalen Markierungsreaktionen aufgenommen bei den Wellenlängen $\lambda = 260/600$ nm zur besseren Analyse der Methylierungsdetektionsreaktion mit dem CF640R-Fluorophor, der bei $\lambda = 600$ nm eine hohe Absorbanz zeigt. Im Vergleich zum Kontrolllauf in Abbildung 3.32 a) ist erkennbar, dass mehrere neue Signale auftauchen. Verglichen mit dem Chromatogramm der Kontrolle konnte eine Abnahme des Signals für dC+dhmC beobachtet werden, was für eine Reaktion von 5hmC im Duplec-ODN spricht. Außerdem wurde ein deutliches Signal für das mit dem CF640R-Fluorophor modifizierte 2'-Desoxyadenosin (dA^{CF}) zur Methylierungsdetektion bei einer Retentionszeit von $t_R = 32$ min aufgezeichnet, während das Signal für 2'-Desoxyadenosin (dA) verglichen mit dem Kontrolllauf deutlich abnahm. Das modifizierte 2'-Desoxyadenosin konnte aufgrund des spezifischen UV-Verhältnisses verglichen mit früheren Messungen eindeutig zugeordnet werden. Welche der neuen Signale vom modifizierten 2'-Desoxy-5hydroxymethylcytosin geklickt mit DBCO-PEG₄-5/6-TAMRA (**14**) stammen, wurde durch das Chromatogramm in Abbildung 3.32 c) bestimmt, das bei den Wellenlängen $\lambda = 260/555$ nm aufgenommen wurde und das Absorptionsmaximum des TAMRA-Fluorophors beinhaltet. Aufgrund des spezifischen UV-Verhältnisses, konnte das Signal bei $t_R = 36$ min dem mit TAMRA modifizierten 2'-Desoxy-5-hydroxymethylcytosin (dC^{TAMRA}) nach der Klick-Reaktion, auch verglichen mit den Retentionszeiten aus vorherigen Messungen (Abb. 3.29 c), zugeordnet werden. Weiterhin ist in diesem Chromatogramm kein Restsignal von $\text{dC}^{\text{azidoGlu}}$ erkennbar, was für eine vollständige Umsetzung der Azidmodifikation des ersten Reaktionsschrittes mit der Dreifachbindung des TAMRA-modifizierten DBCO-Reagenz (**14**) spricht.

Die Quantifizierung der gleichzeitigen sowie sukzessiven Reaktionsansätze und die Bestimmung der Anzahl der einzelnen Nukleoside erfolgte analog zu der in Abschnitt 3.4.3 beschriebenen Vorgehensweise mit Gleichung (1) und den zugehörigen Extinktionskoeffizienten in Tabelle 3.3 mit Normierung auf die Fläche von dG. Durch die Normierung auf die Fläche von dG anstatt auf die Gesamtfläche aller Signale, erfolgte die Berechnung unabhängig von den Flächen der modifizierten Nukleoside und sollte somit ein genaueres Ergebnis liefern. Eine alternative Berechnung über die Abnahme des Signals für $\text{dC}^{\text{azidoGlu}}$ von Schritt 1 zu Schritt 2 der Hydroxymethylierungsdetektion (3.5.2) war an dieser Stelle nicht möglich, da die Reaktionsausbeuten nur für die Gesamtreaktion über zwei Schritte bestimmt wurden. Der erste Schritt der Glycosylierung von 5hmC wurde hier nicht explizit untersucht, da in Abschnitt 3.5 gezeigt werden konnte, dass dieser Schritt vollständig (100 %) abläuft. Tabelle 3.7 fasst die Quantifizierungen der orthogonalen Markierungsreaktionen zur parallelen Methylierungs- und Hydroxymethylierungsdetektion und die zugehörigen

Ausbeuten für den gleichzeitigen und sukzessiven Reaktionsansatz zusammen. Für die Markierung mit dem TAMRA-Fluorophor wurde die Anzahl und Ausbeute aufgrund der Detektorlimitierung im sichtbaren Bereich (Abschnitt 3.4.3) auch bei $\lambda = 260$ nm bestimmt.

Tabelle 3.7: Quantifizierung der Anzahl der Nukleoside und entsprechende Ausbeuten für die orthogonalen Markierungsreaktionen mit M.TaqI/AdoYnCF640R (**20**) und DNA- β -GT/UDP-6-Azidoglucose (**10**) mit DBCO-PEG₄-5/6-TAMRA (**14**) zur Methylierungs- und Hydroxymethylierungsdetektion (gleichzeitiger und sukzessiver Reaktionsansatz). Die Anzahl sowie Ausbeute für die Markierung mit dem TAMRA-Fluorophor wurde bei den Wellenlängen $\lambda = 555$ nm und $\lambda = 260$ nm und die Anzahl sowie Ausbeuten für die Markierung mit dem CF640R-Fluorophor bei der Wellenlänge $\lambda = 600$ nm bestimmt.

	dC+ dhmC	dG	dT	dA	dC ^{azidoGlu}	dC ^{TAMRA}	Ausbeute (dC ^{TAMRA})	dA ^{CF}	Ausbeute (dA ^{CF})
Theoretisch	18	18	9	9	-	-	-	-	-
Kontrolle	19,1	18,0	9,5	8,7	-	-	-	-	-
<u>Sukzessive:</u> TAMRA: 260 nm (555 nm) CF: 600 nm	19,0	18,0	8,4	3,7	0,0	0,8 (0,7)*	80 % (70 %)*	2,3	100 %
<u>gleichzeitig:</u> TAMRA: 260 nm (555 nm) CF: 600 nm	19,5	18,0	9,7	5,7	0,0	0,6 (0,5)*	60 % (50 %)*	1,9	98 %

* wird im HPLC-Detektor unterschätzt.

Betrachtet man die Sequenzen der verwendeten doppelsträngigen ODN aus 14+/TCGA und 14-/TCGA bzw. 13mer hmC+ und 13mer hmC- (5.4.1) werden insgesamt 18 dC+dhmC, 18 dG, neun dT und neun dA erwartet. Der Kontrolllauf der Fragmentierung der unmodifizierten Duplex-ODN (Abb. 3.32 a) zeigte annähernd diese Verteilung. Für die Methylierungsdetektionsreaktion (Chromatogramm 3.32 b) findet für die orthogonale Reaktion sowohl für den gleichzeitigen als auch sukzessiven Ansatz eine vollständige (beidseitige) Übertragung (98-100 %) des CF640R-Fluorophors durch M.TaqI auf die beiden Zieladenine der palindromischen Erkennungssequenz statt. Eine ähnliche Reaktionsausbeute (93 %) konnte auch für die HPLC-Untersuchung der Einzelreaktion bestimmt werden (3.4.3). Für die Hydroxymethylierungsdetektion über zwei Schritte konnten für den gleichzeitigen Reaktionsansatz mit beiden Enzymen und Cofaktoren in einer *one-pot*-Reaktion 0,6 dC^{TAMRA}

beobachtet werden, was aufgrund von nur einer 5hmC-Modifikation im Substrat zu einer Ausbeute von 60 % für die Bestimmung über $\lambda = 260$ nm führte. Betrachtet man jedoch die Ausbeute für den Reaktionsansatz, bei dem die Enzyme sukzessive zugegeben wurden, fällt auf, dass eine höhere Ausbeute von 80 % ($0,8 \text{ dC}^{\text{TAMRA}}$) für die Bestimmung über $\lambda = 260$ nm erreicht werden konnte. Auffällig ist bei beiden Ansätzen, dass kein Azid-modifiziertes Cytosin des ersten Schrittes ($\text{dC}^{\text{azidoGlu}}$) in der Reaktion verbleibt, was für vollständigen Umsatz im zweiten Schritt der spezifischen SPAAC-Klick-Reaktion spricht.

Generell konnte festgestellt werden, dass die orthogonale Reaktion in einem Modifikationsansatz sowohl für den gleichzeitigen Reaktionsansatz mit beiden Enzymen und beiden Cofaktoren zur Fluoreszenzmarkierung von 5mC und 5hmC als auch für die sukzessive Zugabe funktioniert. Während die Methylierungsreaktion vollständig stattfindet (98-100 % Umsatz), läuft die Fluoreszenzmarkierung von 5hmC über zwei Schritte zu 60-80 % ab. Die *single-spot*-Analyse der orthogonalen Markierungsreaktion (3.6.1) erfolgte nach gleichzeitiger Modifikation, indem alle Reagenzien gleichzeitig dem Reaktionsgemisch zugeführt wurden. Dabei konnte eine Reaktionsausbeute für die Markierung von 5hmC von ~50 % beobachtet werden, was verglichen mit den Ergebnissen der HPLC-Analyse für die orthogonale Reaktion eine ähnliche Ausbeute lieferte (60 %). Da die HPLC-Quantifizierung gegenüber der *single-spot*-Analyse jedoch die robustere und für diese Arbeit bedeutendere Analysemethode darstellt, wurde die *one-pot*-Reaktion zur orthogonalen Markierung zusätzlich sukzessive angesetzt, indem zunächst nur die DNA- β -GT und UDP-6-Azidoglucose (**10**) dem Reaktionsgemisch zugesetzt wurden. Dadurch sollte die Reaktionsausbeute nochmals verbessert werden, da bei gleichzeitiger Zugabe der beiden Enzyme DNA- β -GT und M.TaqI eine Inhibition stattfinden könnte. Tatsächlich konnte eine gesteigerte Reaktionsausbeute für die Hydroxymethylierungsdetektion über zwei Schritte von 60 % auf 80 % erhalten werden. Dieses Ergebnis deckt sich mit der HPLC-Untersuchung der Einzelreaktion (3.5.2), da hier ebenfalls 80 % für die Quantifizierung bei $\lambda = 260$ nm erreicht wurde.

Somit wäre es daher sinnvoll, die orthogonale Reaktion zur parallelen Markierung von 5mC und 5hmC als *one-pot*-Reaktion nicht gleichzeitig ablaufen zu lassen, sondern beide Enzymreaktionen sukzessive durchzuführen. Dabei sollte die Hydroxymethylierungsreaktion zuerst durchgeführt werden, da die eingesetzte DNA- β -GT bei gleichzeitigem Ansatz mit M.TaqI in einem Reaktionsgefäß für kurze Duplex-ODN scheinbar teilweise inhibiert wird.

Die orthogonale Fluoreszenzmarkierung zur parallelen Bestimmung von 5mC und 5hmC wurde im Rahmen dieser Arbeit eingehend untersucht. Es konnten wichtige erste Erkenntnisse gewonnen werden, die eine gute Grundlage für weitere zukünftige Untersuchungen liefern.

Eine Optimierung der Reaktion ist jedoch wichtig, um die parallele Markierung beider epigenetischer Modifikationen in einem Reaktionsgefäß vollständig durchführen zu können. Dies ist für die gegenwärtige und zukünftige Forschung von besonderer Bedeutung, da 5mC und 5hmC wichtige Biomarker in der Krebsdiagnostik darstellen.^[68,86,87,145]

4. Zusammenfassung und Ausblick

5-Methylcytosin (5mC) und das Oxidationsprodukt 5-Hydroxymethylcytosin (5hmC) sind epigenetische Modifikationen, die an der Genregulation beteiligt sind und deren globale Veränderungen bei verschiedenen Arten von Krebs festgestellt wurden.^[68,86,87,145] Die parallele Analyse des Gehaltes von 5mC und 5hmC kann potenziell als Biomarker für die Früherkennung, die Überwachung des Krankheitsverlaufs und das Ansprechen auf eine Behandlung dienen. Derzeitige Techniken zur globalen Quantifizierung von 5mC und 5hmC eignen sich noch nicht für klinische Anwendungen, da dafür beide Modifikationen sehr schnell im untersuchten Gewebe parallel mit unterschiedlichen Fluorophoren quantifiziert werden müssten.

Ziel dieser Arbeit war daher die Entwicklung einer orthogonalen Methode zur parallelen globalen Fluoreszenzmarkierung der epigenetischen Modifikationen 5mC und 5hmC (Abbildung 4.1). Dazu lag ein Fokus dieser Arbeit zunächst auf der Synthese von Analoga des natürlichen Cofaktors AdoMet (**1**), die verschiedene Vinylmodifikation aufwiesen und in *two-step labelling*-Reaktionen Anwendung finden sollten. Weiterhin wurde die enzymatische Aktivität der neuen Cofaktoranaloga in Aktivitätstests mit verschiedenen Adenin- und Cytosinspezifischen DNA-MTasen untersucht. Darauf aufbauend folgte zunächst die Untersuchung der zweistufigen DNA-Markierung zur Methylierungsdetektion mit den verschiedenen vinylischen Cofaktoranaloga und verschiedenen Tetrazinkonjugaten zur Fluoreszenzanalyse mit hoher und niedriger Markierungsdichte. Die Analyse der fluoreszenzmarkierten DNA erfolgte dabei an immobilisierten und gestreckten DNA-Einzelmolekülen (DNA-*Combing*) am institutseigenen Fluoreszenzmikroskop. Weiterhin wurde die Methylierungsdetektion zusätzlich durch eine einstufige Markierungsreaktion durch sequenzspezifische Modifikation von verschiedenen DNA-Substraten mit fluoreszierenden Cofaktoranaloga untersucht. Aufgrund der bedeutenden Rolle der epigenetischen Modifikationen 5mC und 5hmC in der Früherkennung von Krebs, wurde ebenfalls eine genomische Human-DNA-Probe (Brustkrebszelllinie, UK Aachen) markiert und von unseren Kooperationspartnern an der Tel Aviv University in Israel hinsichtlich der epigenetischen Information untersucht. Außerdem wurde neben der Methylierung auch die Hydroxymethylierung in einer zweistufigen Markierungsreaktion, sowie die orthogonale Bestimmung von 5mC und 5hmC fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Beide Einzeldetektionen sowie die orthogonale Bestimmung wurden zusätzlich hinsichtlich Reaktionsausbeuten auf kurzen Duplex-ODN mittels *rp*-HPLC quantifiziert.

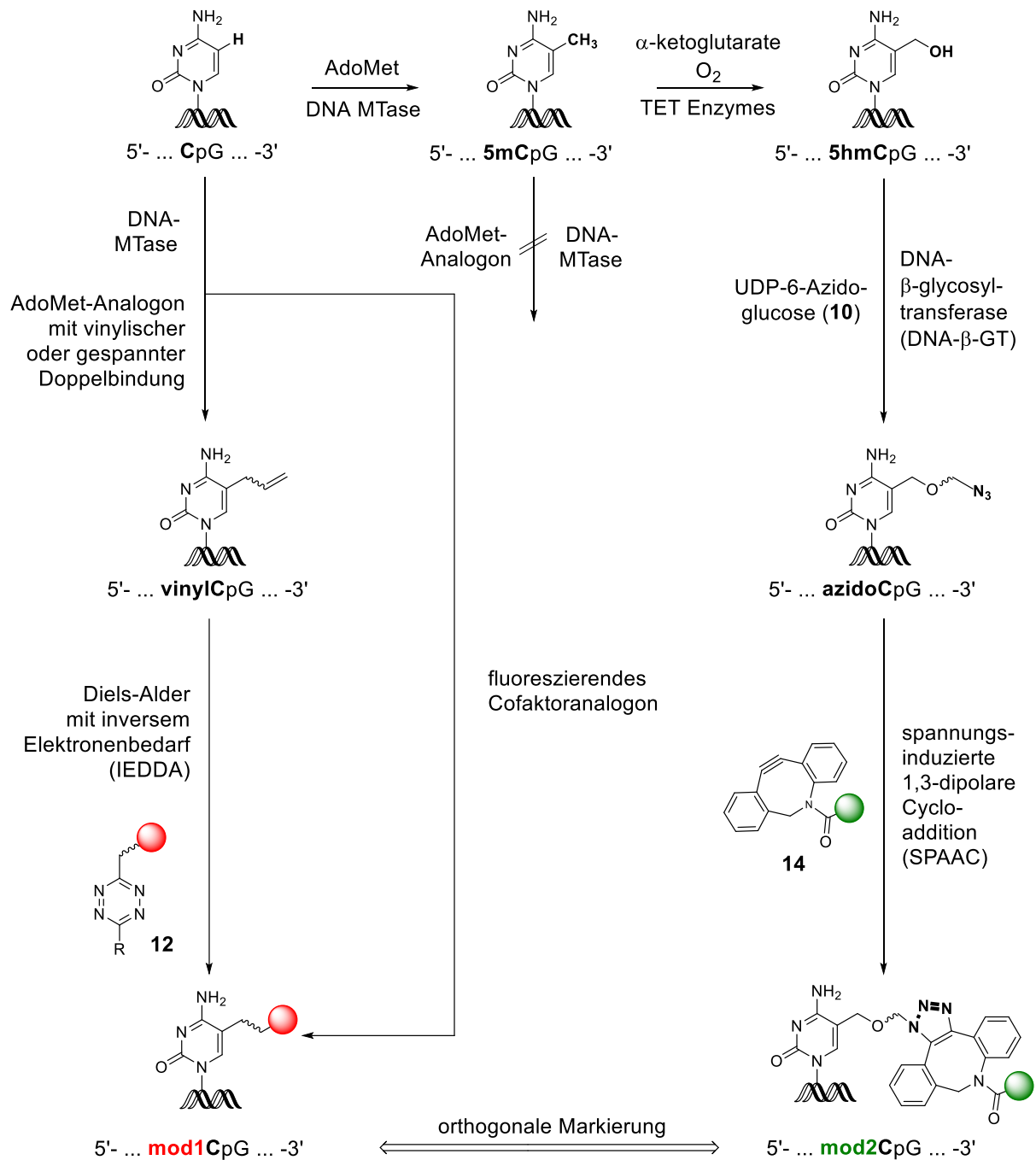


Abbildung 4.1: Bioorthogonale Markierungsreaktion zur parallelen Fluoreszenzanalyse der epigenetischen Modifikationen 5mC und 5hmC auf einem DNA-Substrat. Methylierungsdetektion (indirekt über CpG): Die Seitenkette eines fluoreszierenden doppeltaktivierten AdoMet-Analogons wird entweder direkt sequenzspezifisch mittels DNA-MTase oder zunächst eine vinylische oder gespannte Doppelbindung auf die DNA übertragen (Schritt 1) und anschließend mit einem fluoreszierenden Tetrazinkonjugat (**12**) umgesetzt (IEDDA) (Schritt 2) (links). Hydroxymethylierungsdetektion (direkt am 5hmC): Zweistufige Markierung der DNA durch DNA-β-GT und UDP-6-Azidoglucose (**10**) (1. Schritt) und anschließender Klick-Reaktion (SPAAC) mit DBCO-PEG₄-5/6-TAMRA (**14**) (2. Schritt) (rechts). Die Fluorophore (hier CF640R und TAMRA) wurden als rote (CF640R) und grüne Kugeln (TAMRA) dargestellt.

Synthesen: Es wurden neue doppeltaktivierte AdoMet-Analoga mit aromatischer Vinylmodifikation synthetisiert (Abbildung 4.2). Diese wurden zur sequenzspezifischen Modifikation von DNA mittels DNA-MTasen und anschließender Fluoreszenzmarkierung der modifizierten DNA mit Tetrazinkonjugaten (IEDDA) in einem zweiten Reaktionsschritt eingesetzt. Die Synthese von AdoVB (**6**) basierte auf einer Reaktionsvorschrift nach Holstein *et al.*^[119] und lieferte eine Ausbeute von 5 %. Die Synthesen der Cofaktoranaloga AdoYnVB (kurz) (**16**) und lang (**17**) erfolgten angelehnt an die Reaktionsvorschrift nach Liu *et al.*^[148] zunächst durch die Substitutionsreaktion von 1-(Chlormethyl)-4-vinylbenzol (**15**) mit Natriumazid zu 1-(Azidomethyl)-4-vinylbenzol (**18**). Die Ausbeute betrug dabei 96 %. Das Produkt **18** wurde anschließend zur weiteren Synthese der vinylischen Cofaktoranaloga in einer kupferkatalysierten Azid-Alkin-[3+2]-Cycloaddition (CuAAC) mit den AdoMet-Cofaktoranaloga AdoYnYn (kurz) (**3**) und AdoYnYn (lang) (**19**) umgesetzt. Die Gesamtausbeuten der Reaktionen betrugen 38 % für AdoYnVB (kurz) (**16**) und 34 % für AdoYnVB (lang) (**17**). Die Charakterisierung der Cofaktoranaloga erfolgte nach *rp*-HPLC-Aufreinigung mittels ESI-MS. Weiterhin wurde der Cofaktor AdoYnNorb (**7**) von Leonie Schütz^[151] im Arbeitskreis synthetisiert und dieser Arbeit für verschiedene Experimente zur Verfügung gestellt. AdoYnNorb (**7**) weist in der chemischen Struktur eine gespannte Doppelbindung auf (Abbildung 4.2), wodurch eine Reaktivitätssteigerung in der anschließenden IEDDA-Klick-Reaktion, verglichen mit den drei aromatischen vinylischen Cofaktoranaloga, erreicht werden sollte.^[142]

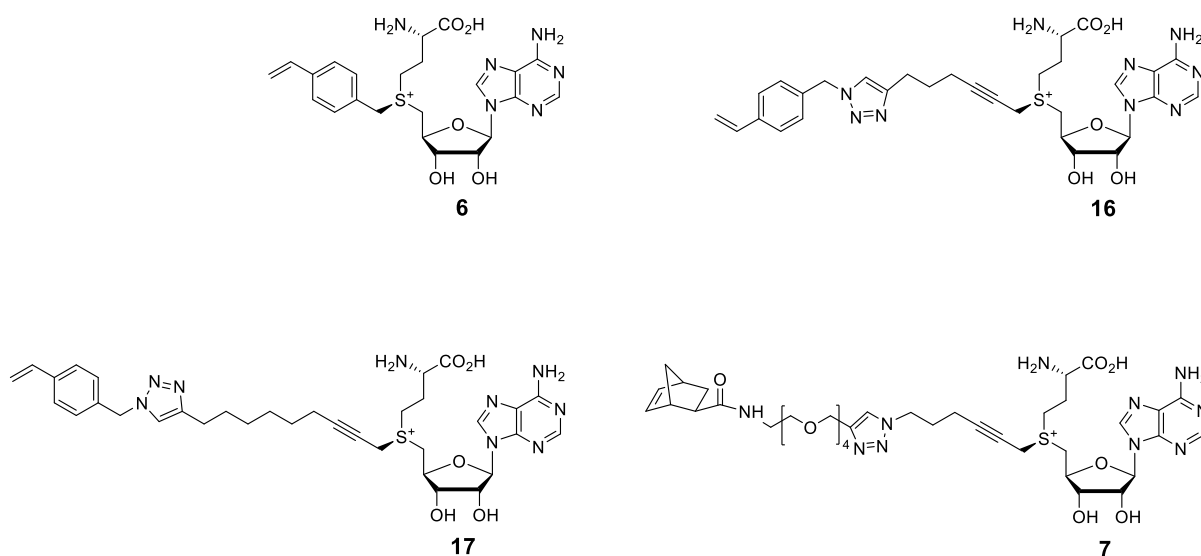


Abbildung 4.2: Strukturen der synthetisierten Cofaktoranaloga mit aromatischer und gespannter Vinylmodifikation AdoVB (**6**), AdoYnVB (kurz) (**16**) und (lang) (**17**) und AdoYnNorb (**7**).

Aktivitätstests: Im weiteren Verlauf wurden zunächst die enzymatischen Aktivitäten der DNA-Adenin-*N*6-MTasen M.TaqI und M.BseCI mit den doppeltaktivierten Cofaktoraloga (Abbildung 4.2) untersucht. Die Ergebnisse der durchgeführten Aktivitätstests sind im Folgenden tabellarisch zusammengefasst (Tabelle 4.1). Die indirekt CpG-methylierungsabhängige DNA-MTase M.TaqI zeigte mit dem Cofaktor AdoVB (**6**), der ein konjugiertes Ringsystem in β -Position zur Doppelaktivierung aufweist, vierfach höhere Aktivität ($\text{TON} = 64 \text{ h}^{-1}$) als mit den drei Cofaktoraloga (**16**, **17**, **7**), die eine Dreifachbindung zur Doppelaktivierung besitzen ($\text{TON} = 16 \text{ h}^{-1}$). Für die CpG-methylierungsunabhängige DNA-MTase M.BseCI hingegen, zeigte sich eine gegenteilige Tendenz, da M.BseCI mit den Cofaktoraloga (**16**, **17**, **7**) mit Dreifachbindung in β -Position zum Sulfoniumzentrum zweifach aktiver ist ($\text{TON} = 1,6 \text{ h}^{-1}$), als mit dem kürzeren AdoVB-Cofaktor (**6**) ($\text{TON} = 0,8 \text{ h}^{-1}$). Außerdem hat der gewonnene erhöhte Abstand zwischen reaktivem Zentrum und reaktiver Doppelbindung keinen signifikanten Einfluss auf die Übertragungsreaktion mit M.TaqI und M.BseCI, da mit AdoYnVB (kurz) (**16**) und AdoYnVB (lang) (**17**), die sich in ihrer Struktur nur in der Länge der Kohlenstoffkette unterscheiden, identische Aktivitäten erreicht wurden. Es konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche DNA-Adenin-*N*6-MTasen unterschiedliche Präferenzen für verschiedene vinyliche Cofaktoraloga aufgrund sterischer oder elektronischer Effekte sowie struktureller Variationen aufweisen.

Für eine erste Beurteilung der enzymatischen Aktivitäten verschiedener DNA-Cytosin-*C*5-MTasen mit den vinylichen Cofaktoraloga (**6**, **16**, **17**, **7**) wurden M.SssI (dm) (Q142A/N370A), M.MpeI (dm) (Q136A/N374A) und M.HhaI (tm) (Q82A/Y254S/N304A) untersucht. Dabei handelte es sich für alle drei DNA-MTasen um Varianten der Wildtypen. Die DNA-MTase M.HhaI (tm) war die einzige der getesteten DNA-Cytosin-*C*5-MTasen, die Aktivität mit den vinylichen Cofaktoraloga AdoYnVB (kurz) (**16**), AdoYnVB (lang) (**17**) und AdoYnNorb (**7**) zeigte (Tabelle 4.2). Somit existiert neben den DNA-Adenin-*N*6-MTasen M.TaqI und M.BseCI mit der DNA-Cytosin-*C*5-MTase M.HhaI (tm) auch eine direkt CpG-methylierungsabhängige DNA-MTase, für die Aktivität mit den vinylichen Cofaktoraloga (**16**, **17**, **7**) ermittelt werden konnte.

Tabelle 4.1: Übersicht der Aktivitäten von DNA-Adenin-*N*6-MTasen mit AdoMet-Analoga.

Analogon	#	c _{Cof} (μM)	DNA-MTase	TON (h ⁻¹)
AdoVB	6	80	M.TaqI	64
AdoYnVB (kurz)	16	80	M.TaqI	16
AdoYnVB (lang)	17	80	M.TaqI	16
AdoYnNorb	7	80	M.TaqI	16
AdoVB	6	80	M.BseCI	0,8
AdoYnVB (kurz)	16	80	M.BseCI	1,6
AdoYnVB (lang)	17	80	M.BseCI	1,6
AdoYnNorb	7	80	M.BseCI	1,6

Tabelle 4.2: Aktivitäten des natürlichen Cofaktors AdoMet und der vinylischen Cofektoranaloga mit DNA-Cytosin-C5-MTasen.

	AdoMet (1)	AdoVB (6)	AdoYnVB (kurz) (16)	AdoYnVB (lang) (17)	AdoYnNorb. (7)
M.SssI (dm, <u>CG</u>)	+	-	-	-	-
M.MpeI (dm, <u>CG</u>)	+	-	-	-	-
M.HhaI (tm) (G <u>C</u> GC) (1 Åq.)	+	-	-	-	+
M.HhaI (tm) (G <u>C</u> GC) (10 Åq.)	+	-	+	+	+

+/-: Aktivität der DNA-MTase mit dem jeweiligen Cofaktor/fehlende Aktivität der DNA-MTase mit dem jeweiligen Cofaktor.

DNA-Methylierungsdetektion: Zur Fluoreszenzmarkierung der epigenetischen Modifikation 5mC wurde sowohl eine zweistufige als auch eine einstufige DNA-Markierungsreaktion durchgeführt. Für das *two-step DNA-labelling* erfolgte im ersten Schritt eine Enzymkatalysierte Modifikation mit den DNA-MTasen M.TaqI und M.HhaI (*high density DNA-labelling*) oder M.BseCI (*low density DNA-labelling*) und einem doppeltaktivierten Cofaktoranalogen (**6**, **16**, **17**, **7**) zur sequenzspezifischen Übertragung eines Reportermoleküls auf T7-Phagen-DNA. Im zweiten Reaktionsschritt erfolgte eine Klick-Reaktion (IEDDA) mit verschiedenen fluoreszierenden Tetrazinkonjugaten (Abb. 4.1 links). Für die einstufige Markierung wurde die Seitenkette eines fluoreszierenden Cofaktoranalogs (**8**, **20**) direkt sequenzspezifisch auf λ -Phagen-DNA oder PCR- λ -DNA übertragen (Abbildung 4.1, links). Dabei kamen ebenfalls entweder die DNA-MTase M.TaqI oder M.BseCI zum Einsatz. Durch die DNA-MTase M.BseCI (*low density*) konnte eine Reaktionsausbeute mittels Fluoreszenzmikroskopie und einem automatisierten Algorithmus von Dr. Felix Schilcher^[165] ermittelt werden. Die beste Kombination für die *two-step* Markierungsreaktion bestand dabei für den Einsatz des Cofaktoranalogs AdoYnNorb (**7**) mit Pyrimidyl-Tetrazin-TAMRA (**22**). Es konnte somit die gewünschte Reaktivitätssteigerung für AdoYnNorb (**7**) mit gespannter Doppelbindung gegenüber dem Einsatz der Cofaktoraloga mit aromatischer Vinylmodifikation erreicht werden. Mit durchschnittlich 1,5 gefundenen Fluorophoren auf den DNA-Strängen statt der erwarteten 3, ist die Umsatzausbeute dabei jedoch nach wie vor nicht quantitativ. Weiterhin konnte mit der DNA-Cytosin-C5-MTase M.HhaI (tm) und AdoYnNorb (**7**) sowie Pyrimidyl-Tetrazin-TAMRA (**22**) eine direkt CpG-spezifische DNA-MTase identifiziert werden, mit der *two-step labelling*-Reaktionen direkt am Cytosin durchgeführt werden konnten. Außerdem wurden zwei verschiedene fluoreszierende Pyrimidyl-Tetrazinkonjugate (TAMRA und ATTO643) untersucht, die ähnliche Ergebnisse für die Markierung mit M.TaqI und AdoYnNorb (**7**) mit T7-DNA lieferten. Somit konnten zwei verschiedene Fluorophore gefunden werden, die zur orthogonalen Detektion der epigenetischen Modifikationen 5mC und 5hmC eingesetzt werden könnten.

Für die einstufige Modifikation wurde PCR- λ -DNA mit der CpG-abhängigen DNA-MTase M.TaqI und AdoYnTAMRA (**8**) bzw. AdoYnCF640R (**20**) zur Methylierungsdetektion markiert, da hierfür gute Ergebnisse in einer früheren Arbeit erzielt werden konnten.^[165] Das eingesetzte Substrat enthielt in der Sequenz nur eine palindromische TCGA-Position für M.TaqI und konnte somit zur Ermittlung der Reaktionsausbeute genutzt werden. Für die Modifikation mit AdoYnTAMRA (**8**) ergab sich, verglichen mit der zweistufigen Reaktion, eine höhere Reaktionsausbeute von 86 %, für die Modifikation mit AdoYnCF640R (**20**)

hingegen nur 63 %. Der niedrigere Wert für den CF-Fluorophor kann mit dem spezifischen Aufbau des verwendeten Mikroskops erklärt werden, da für den roten Laser (640 nm) bei der Bildaufnahme ein schlechtes Signal-Rausch-Verhältnis zu beobachten ist und die Auswertung somit erschwert. Die Reaktionsausbeute wurde zusätzlich auf einem kurzen Duplex-ODN mit M.TaqI und verschiedenen fluoreszierenden Cofaktoranaloga (**8**, **20**, **25**, **26**) mittels *rp*-HPLC quantifiziert. Aufgrund der einen palindromischen Erkennungssequenz für M.TaqI könnten maximal zwei Zieladenine markiert werden, was einem 100 %igen Umsatz entsprechen würde. Für alle untersuchten fluoreszierenden Cofaktoranaloga (**8**, **20**, **25**, **26**) konnte eine fast vollständige beidseitige Markierung der Zieladenine mit Reaktionsausbeuten zwischen 87 % und 93 % erreicht werden. Als bester roter Cofaktor für die einstufige Methylierungsdetektion wurde AdoYnCF640R (**20**) mit einer Ausbeute von 93,3 % identifiziert.

In dieser Arbeit konnte weiterhin eine erste genomische Human-DNA Probe (Brustkrebszelllinie, UK Aachen) zur Quantifizierung des Methylierungsgrades mit AdoYnTAMRA (**8**) markiert werden. Die Proben wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Yuval Ebenstein der Tel Aviv University in Israel auf einem *multi-sample array* Chip zur Bestimmung der Gesamtfluoreszenz und damit der epigenetischen Information im Genom analysiert. Demnach waren 45 % der CpG-Sequenzen in der untersuchten genomischen Human-DNA nicht methyliert und 55 % lagen methyliert vor.

DNA-Hydroxymethylierungsdetektion: Zur Fluoreszenzmarkierung der epigenetischen Modifikation 5hmC wurde eine *two-step labelling*-Reaktion durchgeführt. Dazu erfolgte im ersten Schritt zunächst eine enzymatische Modifikation mittels DNA- β -GT und dem Cofaktor UDP-6-Azidoglucose (**10**), bei dem das Zuckermolekül mit einer Azidgruppe direkt auf PCR- λ -DNA übertragen wurde. Im zweiten Schritt wurde die übertragene Azidgruppe mit DBCO-PEG4-5/6-TAMRA (**14**) zur Fluoreszenzmarkierung in einer spannungsinduzierten 1,3 dipolaren Cycloaddition (SPAAC) umgesetzt (Abbildung 4.1, rechts). Das untersuchte PCR- λ -Substrat enthielt in der Sequenz nur eine hmC-Modifikation und konnte deshalb zur Bestimmung der Reaktionsausbeute eingesetzt werden. Es konnte ein Reaktionsumsatz für die Markierung von 5hmC über zwei Schritte von 39 % ermittelt werden. Da die zweistufige Markierung des 5hmC anscheinend nicht vollständig ablief, wurden die Ausbeuten der beiden Reaktionsschritte zusätzlich mittels *rp*-HPLC an einem kurzen Duplex-ODN quantifiziert. Hierfür konnte eine deutlich höhere Reaktionsausbeute von 91 % für die Gesamtreaktion über zwei Schritte bestimmt werden. Beide Einzelmodifikationen zur Markierung von 5mC und 5hmC lieferten demnach mit HPLC-Quantifizierung sehr gute Reaktionsausbeuten von über

90 %. Für die Quantifizierung der Reaktionsausbeute der *two-step labelling* Reaktion ist der HPLC-Assay gegenüber der *Single-spot*-Analyse zu bevorzugen, da diese *Quenching*-Probleme zeigt und damit nicht quantitativ ist.

Orthogonale DNA-Markierung: Das übergeordnete Ziel der Arbeit war die gleichzeitige (orthogonale) Fluoreszenzmarkierung der epigenetischen Modifikationen 5mC und 5hmC auf einem DNA-Substrat zur späteren Gehaltsbestimmung der beiden epigenetischen Nukleobasen. Dazu wurde PCR- λ -DNA mit einer M.TaqI-Erkennungssequenz und einer hmC-Modifikation mit M.TaqI und AdoYnCF640R (**20**) sowie DNA- β -GT, UDP-6-Azidoglucose (**10**) und DBCO-PEG₄-5/6-TAMRA (**14**) in einem Reaktionsgefäß markiert (Abbildung 4.1).

Die quantifizierten Ausbeuten für die orthogonale Reaktion lagen bei 46 % für die Markierung von 5hmC und bei 76 % für die Markierung von 5mC. Somit konnten für die orthogonale Bestimmung beider epigenetischer Modifikationen auf einem DNA-Substrat sogar leicht höhere Reaktionsausbeuten beobachtet werden, als bei Betrachtung der Einzelreaktionen. Um die Reaktionsausbeute der orthogonalen Reaktion in einer *one-pot*-Reaktion zusätzlich genauer quantifizieren zu können, wurde eine Analyse mittels *rp*-HPLC durchgeführt. Dazu wurden zwei Duplex-ODN in einem Reaktionsgemisch genutzt, die jeweils nur eine spezifische Position für die eingesetzten Enzyme M.TaqI und DNA- β -GT aufwiesen. Dabei erfolgte der Reaktionsansatz einmal durch gleichzeitige Zugabe beider Enzyme und Cofaktoren und einmal durch sukzessive Zugabe, wobei die Hydroxymethylierungsreaktion zuerst durchgeführt wurde, um eine Inhibierung der DNA- β -GT durch die M.TaqI zu verhindern. Während die Methylierungsreaktion vollständig stattfindet (98-100 % Umsatz), läuft die Fluoreszenzmarkierung von 5hmC über zwei Schritte zu 60-80 % ab. Durch den sukzessiven Reaktionsansatz konnte die Reaktionsausbeute für die Detektion von 5hmC über zwei Schritte von 60 auf 80 % gesteigert werden, was für eine Inhibierung der DNA- β -GT bei gleichzeitigem Ansatz mit M.TaqI in einem Reaktionsgefäß für den Einsatz von kurzen Duplex-ODN spricht. Dieses Ergebnis deckt sich mit der HPLC-Untersuchung der Einzelreaktion (3.5.2), da hier ebenfalls 80 % für die Quantifizierung bei $\lambda = 260$ nm erreicht wurde. Aus jetziger Sicht wäre es daher sinnvoll, die orthogonale Reaktion zur parallelen Markierung von 5mC und 5hmC als *one-pot*-Reaktion nicht gleichzeitig ablaufen zu lassen, sondern beide Enzymreaktionen sukzessive durchzuführen, wobei die Hydroxymethylierungsdetektion zuerst durchgeführt werden sollte.

Ausblick: Um die Reaktionsausbeute für das *two-step DNA-labelling* weiter zu verbessern, könnte ein noch reaktiveres Dienophil für die IEDDA Klick-Reaktion eingesetzt werden. Dabei ist die Ringspannung sehr entscheidend, weshalb es sinnvoll wäre, ein Cofaktoranalogen zu synthetisieren, das statt einer Norbornenfunktionalität ein trans-Cycloocten (TCO) in der Struktur enthält. TCO ist eines der schnellsten Dienophile in der IEDDA-Reaktion und das kleinste stabile Cycloalkan mit einer trans-konfigurierten Doppelbindung.^[138,142,174]

Außerdem sollte für die orthogonale Markierung von 5mC und 5hmC genomische Human-DNA aus verschiedenen Gewebetypen analysiert werden, um den jeweiligen epigenetischen Status ermitteln zu können. Dazu wäre jedoch der Einsatz einer Cytosin-spezifischen DNA-MTase mit der Erkennungssequenz CpG, die in der Lage ist, große Reportergruppen, wie beispielsweise Fluorophore, direkt auf das Cytosin zu übertragen, für die Methylierungsdetektion von großer Bedeutung. In bisher durchgeführten Untersuchungen konnte jedoch keine DNA-Cytosin-C5-MTase ermittelt werden, die eine CpG-Erkennungssequenz aufweist und eine Übertragung von fluoreszierenden Reportergruppen in einem Schritt erlaubt. Aus diesem Grund müsste eine neue Variante einer CpG-spezifischen DNA-MTase (M.MpeI oder M.SssI) synthetisiert werden, um das aktive Zentrum der DNA-MTase so zu verändern, dass auch größere Cofaktoren wie beispielsweise AdoYnNorb (**7**) (*two-step labelling*) oder AdoYnTAMRA (**8**) (*one-step labelling*) direkt auf Cytosin übertragen werden können. Somit könnten alle CpG-Sequenzen zur Methylierungsdetektion in eukaryotischer DNA ermittelt werden und nicht nur solche, die innerhalb der TCGA Sequenz der bisher genutzten CpG-abhängigen DNA-MTase M.TaqI liegen. Diese kann aufgrund der Länge der Erkennungssequenz (TCGA) nur lediglich 5,5 % aller CpG-Sequenzen innerhalb des menschlichen Genoms (hg38) erfassen^[175].

Weiterhin müssten für die Bildgebung der fluoreszenzmarkierten DNA-Proben bessere Verfahren genutzt werden, um die Reaktionsausbeuten der *low-density labelling*-Reaktionen besser quantifizieren zu können. Dazu könnte die Methode der hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopie verwendet werden. Eine Automatisierung der Messungen am Fluoreszenzmikroskop sowie eine automatisierte Auswertungsmethode würden ebenfalls dazu beitragen, die Messungen und Ergebnisse verlässlicher und repräsentativer zu gestalten. Generell sollten sowohl für die Einzelreaktionen zur Methylierungs- und Hydroxymethylierungsdetektion sowie zur orthogonalen Markierung beider epigenetischer Marker auf einem Substrat weitere Optimierungen stattfinden, um die Reaktionsausbeuten weiterhin zu verbessern, damit eine vollständige Markierung der Positionen stattfindet. Dadurch würde es zukünftig möglich werden, Variationen des 5mC- und 5hmC-Gehalts

innerhalb der DNA frühzeitig und ohne großen invasiven Aufwand detektieren und bewerten zu können. Für die Früherkennung in der Krebsdiagnostik ist dies von großem Interesse.

5. Experimenteller Teil

5.1 Verwendete Materialien und Geräte

5.1.1 Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten technischen Lösungsmittel wurden vor Verwendung destilliert. Das verwendete Reinstwasser, (MilliQ-Wasser), wurde mit einer Milli-Q Academic- und einer vorgeschalteten Elix 3 Essential-Anlage aufbereitet ($\sigma = 18,2 \text{ m}\Omega \text{ cm}^{-1}$). In Tabelle 5.1 sind alle verwendeten Chemikalien in alphabetischer Reihenfolge aufgeführt.

Tabelle 5.1: Liste der verwendeten Chemikalien und deren Bezugsquelle.

Chemikalie	Bezugsquelle
Acetonitril (p.a.)	Thermo Fisher Scientific
Acylamid/Bisacrylamid	Serva
Agarose	Sigma-Aldrich
Ameisensäure	CHEM Solute
Ammoniumpersulfat (APS)	AppliChem
1-(Azidomethyl)-4-vinylbenzol	
Bis-Tris-HCl	
Borsäure	Gerbu Biotechnik
Bromphenolblau	Serva
Bovine Serum Albumin (BSA, 100x)	New England Biolabs
Deuteriertes Chloroform CDCl_3	Sigma-Aldrich
1-(Chlormethyl)-4-vinylbenzol	
DBCO-PEG ₄ -5/6-TAMRA	Jena Bioscience
Diethylether	Hoesch
Dimethylformamid (99,8 %, DMF)	Arcos Organics
1,4-Dithio-D,L-threitol (DTT)	Gerbu Biotechnik
Essigsäure (96 %)	Merck
Ethanol p.a.	ChemSolute
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Gerbu Biotechnik
GelRed™	Biotium
Glycerin	Gerbu Biotechnik
Kaliumacetat	Fluka
Kupfersulfat	Riedel de Haën
Magnesiumacetat	Fluka
Magnesiumchlorid Hexahydrat	J. T. Baker
Magnesiumsulfat	Merck
β -Mercaptoethanol	Serva

Chemikalie	Bezugsquelle
Acetonitril (p.a.)	Thermo Fisher Scientific
6-Methyl-Tetrazin-5-TAMRA	Jena Bioscience
Natriumascorbat	Fluka
Natriumazid	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid	Gerbu Biotechnik
Natriumhydroxid	Sigma-Aldrich
Natriumsulfat	
Pyrimidyl-Tetrazin-AF647	Jena Bioscience
Pyrimidyl-Tetrazin-ATTO643	Jena Bioscience
Pyrimidyl-Tetrazin-5-TAMRA	Jena Bioscience
S-Adenosyl-L-Homocystein (AdoHcy)	Sigma-Aldrich
S-Adenosyl-L-Methionin (AdoMet)	Knoll Bioreserach
Salpetersäure (65 %)	ChemSolute
Salzsäure (37 %)	ChemSolute
SeaPlaque™-Agarose	Lonza
Tetrazin-5-TAMRA	Jena Bioscience
Trifluoressigsäure (TFA)	Arcos Organics
Trimethyl-[3-(trimethoxysilyl)-propyl]- ammoniumchlorid	TCI
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-acetat (Tris- Acetat)	Gerbu Biotechnik
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris-Base)	Gerbu Biotechnik
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-hydrochlorid (Tris-HCl)	AppliChem
Tris(3-hydroxypropyltriazolmethyl) amin (THPTA)	Dr. Sophie Willnow (AK Weinhold)
UDP-6-Azidoglucose	Jena Bioscience
Vinyltrimethoxysilan	TCI
Zinksulfat	
YOYO™-1 Iodid	Invitrogen

5.1.2 Pufferlösungen

Für alle verwendeten Pufferlösungen sind nachfolgend die Ausgangskonzentrationen angegeben. Sie wurden vor Verwendung entsprechend mit Wasser verdünnt. Die jeweilige Verdünnung ist an entsprechender Stelle angegeben. Die Zusammensetzung der Puffer sowie deren zugehörige pH-Werte sind in Tabelle 5.2 angegeben. Die benötigten pH-Werte wurden

mithilfe eines pH-Meters und NaOH_{aq} (10 M/ 1 M) bzw. HCl_{aq} (5 M/ 1 M) bei Raumtemperatur eingestellt.

Tabelle 5.2: Pufferlösungen und deren Zusammensetzung.

Bezeichnung	Zusammensetzung
β-Agarase Puffer (10x)	Bis-Tris-HCl (100 mM), EDTA (10 mM), pH 6,5
Gel-Ladepuffer (6x) (6xLB)	Bromphenolblau (0,25 %, w/v), Glycerin (30 %), Reinstwasser (70 %)
CIAP-Puffer (10x)	Tris-HCl (100 mM), MgCl ₂ (10 mM), pH 9,0
CutSmart-Puffer (10x)	Tris-Acetat (200 mM), Magnesiumacetat (100 mM), Kaliumacetat (500 mM), BSA (1 mg/mL), pH 7,9
M.BseCI-Puffer (10x)	Tris-HCl (100 mM), EDTA (100 mM), β-Mercaptoethanol (50 mM), pH 7,4
EcoDam-Puffer (10x)	Tris-HCl (1500 mM), EDTA (100 mM), DTT (20 mM), pH 8,0
M.HhaI-Puffer (10x)	Tris-HCl (100 mM), Natriumchlorid (500 mM), EDTA (0.5 mM), β-Mercaptoethanol (20 mM), pH 7,4
M.MpeI-Puffer (10x)	Tris-HCl (500 mM), Natriumchlorid (1 M), Glycerin (50 %), pH 7,5
NEB 4-Puffer (10x)	Tris-Acetat (200 mM), Magnesiumacetat (100 mM), Kaliumacetat (500 mM), DTT (10 mM), pH 7,9
NukleaseP1-Puffer (10x)	Zinksulfat (2 mM), Natriumacetat (200 mM), pH 5,3
M.SssI-Puffer (10x)	Tris-HCl (100 mM), Natriumchlorid (500 mM), DTT (10 mM), pH 7.9
Pfu-Puffer PCR (10x)	Tris-HCl (200 mM), Ammoniumsulfat (100 mM), Kaliumchlorid (100 mM), BSA (1 mg/mL), Triton x-100 (1 % (v/v)), Magnesiumsulfat (20mM), pH 8,8
TBE-Puffer (5x)	Tris-Base (445 mM), Borsäure (445 mM), EDTA (10 mM), pH 8
TE-Puffer (10x)	Tris-HCl (100 mM), EDTA (10 mM), pH 8.0

5.1.3 Marker, Plasmid- und Phagen-DNA

Die in dieser Arbeit verwendeten DNA-Marker sowie Plasmid- und Phagen-DNA sind in der nachfolgenden Tabelle 5.3 zuzüglich der jeweiligen Bezugsquelle aufgeführt. Alle Marker als auch die Phagen-DNA wurden bis zur Verwendung bei 4 °C, Plasmid-DNA bei -20 °C gelagert.

Tabelle 5.3: Verwendete DNA-Substrate und -Marker sowie deren Bezugsquelle.

DNA	Bezugsquelle
FastRuler Low Range DNA Ladder (#SM1103)	Thermo Fisher Scientific
FastRuler Middle Range DNA Ladder (#SM1113)	Thermo Fisher Scientific
FastRuler High Range DNA Ladder (#SM1123)	Thermo Fisher Scientific
FastRuler Ultra Low Range DNA Ladder (#SM1233)	Thermo Fisher Scientific
T7-Phagen DNA	Bioron
λ -Phagen-DNA	Thermo Fisher Scientific
pUC19-Plasmid DNA	Thermo Fisher Scientific

5.1.4 Oligodesoxynukleotide und Primer

Die in dieser Arbeit verwendeten und in Tabelle 5.4 aufgelisteten Oligodesoxynukleotide (Duplex-ODN) wurden von Integrated DNA Technologie in gefriergetrockneter Form sowie HPLC aufgereinigt bezogen. Vor Verwendung wurden Stammlösungen (1 mM, 100 μ M) in Wasser hergestellt und bei -20 °C gelagert. Die eingestellte Konzentration dieser Stammlösungen wurde mithilfe der UV-/Vis-Spektroskopie verifiziert und gegebenenfalls korrigiert. Die für die PCR verwendeten Primer wurden ebenfalls in gefriergetrockneter Form sowie in dem Reinheitsgrad *standard desalted* erhalten und auf eine Konzentration von 10 μ M oder 100 μ M mit Reinstwasser eingestellt. Diese wurden bis zur Verwendung ebenfalls bei -20 °C gelagert.

Tabelle 5.4: Bezeichnung der verwendeten Oligodesoxynukleotide und Primer sowie der zugehörigen Sequenz.

Bezeichnung	Sequenz
14+/TCGA	5'-GCC GCT CGA TGC CG-3'
14-/TCGA	5'-CGG CAT CGA GCG GC-3'
14+/GATC	5'-GCC GCG ATC TGC CG-3'
14-/GATC	5'-CGG CAG ATC GCG GC-3'
13mer hmC+	5'-TGT CAG 5hmCGC ATG A-3'
13mer hmC-	5'-TCA TGC GCT GAC A-3'
Forward-Primer	5'-CTC ATG CTG AAA ACG TGG T-3'
Reversed-Primer	5'-GGA CAG GAC 5hmCAG CAT ACG-3'
5'-TAMRA-Primer	5'-TAMRA TGG ACA GGA CCA GCA TACG-3'

5.1.5 Enzyme

Tabelle 5.5 zeigt die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme, die teilweise kommerziell erworben, teilweise arbeitskreisintern von Kerstin Glensk hergestellt wurden. Aufgelistet ist hier sowohl die Enzymklasse, die jeweilige Spezifität (charakteristische Erkennungssequenz) als auch die zugehörige Bezugsquelle, wobei die Zielbase innerhalb der palindromischen Erkennungssequenz der DNA-Methyltransferasen (MTasen) hervorgehoben wurde. Bei der Katalyse durch die DNA-MTasen M.BseCI, M.TaqI sowie EcoDam wird die N6-Position von Adenin modifiziert, während bei M.HhaI, M.MpeI sowie M.SssI die C5-Position von Cytosin modifiziert wird. Bei diesen C-MTasen handelt es sich jedoch nicht um den Wildtyp, sondern um Varianten, bei denen verschiedene Aminosäuren zur Verbesserung der Übertragungsreaktion ausgetauscht wurden. Die ausgetauschten Aminosäuren der jeweiligen Varianten sind in Klammern hinter der jeweiligen DNA-MTase aufgeführt. Für die Restriktionsendonukleasen des Typs II (REasen) ist die Position der Hydrolyse in der jeweiligen palindromischen Erkennungssequenz durch einen Pfeil hervorgehoben.

Tabelle 5.5: Verwendete Enzyme sowie die zugehörige Enzymklasse, Spezifität und Bezugsquelle.

Enzym	Klasse	Spezifität	Bezugsquelle
β-Agarase I	Glycanohydrolase	-	New England Biolabs
CIAP	Phosphatase	-	Takara Bio
Nuklease P1	Endonuklease	-	New England Biolabs
ProteinaseK	Serinprotease	-	Qiagen
T4-Phage β-Glucosyltransferase	Hexosyltransferase	5'- hmC -3'	New England Biolabs
M.TaqI	DNA-MTase	5'-TCGA A -3'	K. Glensk (AK Weinhold)
M.BseCI	DNA-MTase	5'-ATCG AT -3'	K. Glensk (AK Weinhold)
EcoDam	DNA-MTase	5'-G ATC -3'	K. Glensk (AK Weinhold)
M.HhaI (Q82A/Y254S/N304A)	DNA-MTase	5'-G CGC -3'	K. Glensk (AK Weinhold)
M.MpeI (Q136A/N374A)	DNA-MTase	5'- CG -3'	K. Glensk (AK Weinhold)
M.SssI (Q142A/N370A)	DNA-MTase	5'- CG -3'	K. Glensk (AK Weinhold)

5. Experimenteller Teil

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.MboI	REase Typ II	5'- [▼] GATC-3'	New England Biolabs
R.HhaI	REase Typ II	5'-GCG [▼] C-3'	New England Biolabs
R.BstUI	REase Typ II	5'-CG [▼] CG-3'	New England Biolabs

5.1.6 Kits

Nachfolgend sind alle in dieser Arbeit verwendeten Kits sowie deren Verwendungszweck und Bezugsquelle aufgelistet.

Tabelle 5.6: Liste der verwendeten Kits sowie der Verwendungszweck und zugehörige Bezugsquelle.

Kits	Verwendungszweck	Bezugsquelle
QIAquick® PCR-Purification Kit	Aufreinigung enzymatischer DNA-Modifikationen	Qiagen
Oligo Clean & Concentrator™ Kit	Aufreinigung genomischer Human-DNA	Zymo Research
Cytiva illustra™ NAP™ Säulen	Aufreinigung von Duplex-ODN	Thermo Fisher Scientific
Bionano Prep™ DNA Labeling Kit (DLS)	Fluoreszenzmarkierung von DNA (<i>genome mapping</i>)	Bionano Genomics

5.1.7 Geräte

Alle verwendeten Geräte sind in Tabelle 5.7 in alphabetischer Reihenfolge aufgelistet.

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

Gerät	Modellbezeichnung	Hersteller
Analysewaage	Modell B121S	Sartorius
Autoklav	Varioklav Dampfsterilisator	H+P Labortechnik GmbH
Gefriertrocknungsanlage	Alpha 1-2	Christ
Geldokumentationssystem	Gel iX System	Intas
	Digitale CCD-Kamera	
	UV-Transilluminator (312 nm)	
	Filter (540 ± 50 nm)	
Gelelektrophoresekammer	Sub-Cell GT Mini	Bio-Rad
Heizblock	HLC HBT 130	Ditabis
HPLC	Waters 1525	Waters
	binäres Pumpensystem	
	2487 Dual Absorbance Detektor	
Inkubator (37 °C)	Function Line	Heraeus
Inkubator (65 °C)	Modell Mini 10	MWG
Mikrowelle	Micromat	AEG
pH-Meter	Calimatic 766	Knick
	Elmetron IJ44C	
Pipetten	Pipetman	Gilson
	(2; 10; 20; 100; 200; 1000 µL)	
Polyacrylamid- Gelelektrophoresekammer	Mini PROTEAN® 3 System	Bio-Rad
Reinstwasseranlage	MilliQ Academic	Millipore
	Elix 3 Essential	
Rührplatte	IKAMAG RCT	IKA
Schüttelinkubator	Modell 3031	GFL
Spannungsquelle	PowerPac 300	Bio-Rad
Thermocycler	Mastercycler Personal	Eppendorf
Tischzentrifuge	Centrifuge 5425 D	Eppendorf
Trockenschrank	T6060	Heraeus
Ultraschallbad	Palsson Ultrasonischer Reiniger 2 l	Allpax
UV/Vis-Spektrometer	Cary 3E UV/Visible	Varian
Vortexer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries

5.2 Instrumentelle Methoden

5.2.1 *rp*-HPLC

Die Analysen und Aufreinigungen der synthetischen AdoMet-Analoga sowie die Untersuchung einzelner Nukleoside erfolgten mit einer HPLC-Anlage von Waters mit einem binären Pumpensystem und einem Dual-UV/Vis-Detektor. Verwendet wurden analytische Prontosil C-18 Trennsäulen (5,0 μm , 250 x 4,6 mm, Vorsäule: 5,0 μm , 20 x 4,0 mm) oder präparative Prontosil C-18 Trennsäulen (5,0 μm , 250 x 20 mm, Vorsäule: 5,0 μm , 20 x 4,0 mm) von Bischoff. In der nachfolgenden Tabelle 5.8 sind zunächst die Eluentenzusammensetzungen aufgeführt, wobei zwischen neutralen und sauren Systemen, je nach Verwendungszweck, unterschieden werden kann. Die genutzten Eluenten wurden vor Benutzung mit einem Polyamid-Filter (0,2 μm , Sartorius) filtriert, um kleinere Partikel sowie Staub zu entfernen. Die Detektion der einzelnen Verbindungen erfolgte je nach verwendeter Methode und zu untersuchendem Analyten bei unterschiedlichen Wellenlängen (260/272 nm, 260/555 nm oder 260/600 nm), welche an entsprechender Stelle nochmals angegeben werden. Weiterhin wurden zur Auftrennung der untersuchten Substanzen verschiedene Gradienten (Tabelle 5.9 – 5.14) eingesetzt, die in analytisch und präparativ unterteilt werden können. Vor Analyse der jeweiligen Verbindung wurde das System mindestens 15 min auf Startbedingungen bis zur Einstellung einer konstanten Basislinie equilibriert. Die Steuerung des HPLC-Systems sowie die Aufzeichnung der Daten erfolgte mit der Software Waters Breeze (Version 3.02).

Tabelle 5.8: HPLC Eluentenzusammensetzung (neutral und sauer).

Eluent	Zusammensetzung
A (neutral, N)	100 % Reinstwasser, Triethylammoniumacetat (10 mM)
B (neutral, N)	70 % Acetonitril, 30 % Reinstwasser, Triethylammoniumacetat (10 mM)
A (sauer, S)	100 % Reinstwasser, 0,01 % Trifluoressigsäure
B (sauer, S)	70 % Acetonitril, 30 % Reinstwasser, 0,01 % Trifluoressigsäure

Tabelle 5.9: Methode N1
(Duplex-DNA)^a.

t (min)	% A	% B
0	95	5
20	91,8	8,2
30	50	50
32	0	100
42	0	100
53	95	5
55	95	5

^aFluss: 1 mL/min

Tabelle 5.10: Methode N2
(Nukleoside)^a.

t (min)	% A	% B
0	95	5
20	91,8	8,2
42	0	100
47	0	100
48	95	5
60	95	5

Tabelle 5.11: Methode S1 (sauer, analytisch).

t (min)	Fluss (mL/min)	% A	% B
0	1	93	7
30	1	75	25
31	1	0	100
34	1	0	100
35	1	93	7
40	1	93	7

Tabelle 5.12: Methode S2 (sauer, präparativ).

t (min)	Fluss (mL/min)	% A	% B
0	10	93	7
20	10	81	19
21	10	0	100
24	10	0	100
30	10	93	7
40	10	93	7

Tabelle 5.13: Methode S3 (sauer, analytisch).

t (min)	Fluss (mL)	% A	% B
0	1	83	17
10	1	77	23
30	1	0	100
40	1	0	100
41	1	83	17

Tabelle 5.14: Methode S4 (sauer, präparativ).

t (min)	Fluss (mL)	% A	% B
0	10	83	17
10	10	77	23
30	10	0	100
40	10	0	100
41	10	83	17

5.2.2 NMR-Spektroskopie

Die ^1H -NMR-Spektren wurden am institutseigenen Spektrometer Varian VNMRS 300 (300 MHz) gemessen. Alle Spektren wurden dabei in dem Lösungsmittel CDCl_3 aufgenommen und die chemische Verschiebung im Vergleich zu dem Restsignal des nicht deuterisierten Lösungsmittels (CHCl_3 : $\delta=7.26$ ppm) in ppm angegeben. Für die Analyse werden folgende Abkürzungen verwendet: s = Singulett, dd = Doppeldoublett und m = Multiplett. Die Kopplungskonstanten (J) werden in Hertz (Hz) angegeben.

5.2.3 Massenspektrometrie

Für diese Arbeit wurden ESI-Massenspektren (Elektronenspray-Ionisation) mit dem Gerät LTQ-Orbitrap xL der Firma ThermoFisher Scientific am Institut für Organische Chemie aufgenommen. Die Proben wurden dafür zuvor lyophilisiert.

5.2.4 UV-/Vis-Spektroskopie

Die UV-/Vis-Spektroskopie wurde einerseits zur Bestimmung der Konzentration der synthetisierten AdoMet-Analoga sowie der gelösten Duplex-ODN, andererseits zur Aufnahme von UV-Spektren fluoreszierender Substanzen genutzt. Dazu wurde das Gerät Cary 3E der Firma Varian mit der Software Cary WinUV (Version 3.0) verwendet. Für die einzelnen Messungen wurden Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm eingesetzt. Zunächst wurde eine Referenzmessung durchgeführt, indem eine Basislinie des Lösungsmittels ohne die jeweilige Substanz aufgenommen wurde, die dann von der jeweils nächsten Messung als Korrekturfaktor subtrahiert wurde. Zur Konzentrationsbestimmung der neu synthetisierten AdoMet-Analoga wurde zunächst durch Ausbeutenabschätzung aus der HPLC-Analyse und dem Volumen eine Konzentration abgeschätzt. Anschließend wurden die Proben so verdünnt, dass auf Grundlage des Lambert-Beer'schen Gesetzes die Extinktion (basierend auf literaturbekannten Extinktionskoeffizienten) einen Wert von 0,5 ergeben würde. Die exakte Konzentration der Probe wurde daraufhin aus der gemessenen Absorbanz bei der Wellenlänge 260 nm unter Einbezug des jeweiligen Verdünnungsfaktors bestimmt. Die spezifischen UV-Spektren für die fluoreszierenden Substanzen wurden im Bereich von 200 – 800 nm aufgenommen, wobei ebenfalls zunächst eine Basislinie in dem Medium aufgenommen wurde, in dem die zu untersuchenden Proben gelöst waren. Es wurden folgende Extinktionskoeffizienten verwendet:

$$\epsilon_{\text{TAMRA555}} = 84,000 \text{ L/mol*cm}$$

$$\epsilon_{\text{CF640R}} = 105,000 \text{ L/mol*cm}$$

$$\epsilon_{\text{ATTO643}} = 150,000 \text{ L/mol*cm}$$

$$\epsilon_{\text{AF647}} = 270,000 \text{ L/mol*cm}$$

5.2.5 Agarosegel-Elektrophorese

Zur Auftrennung und Analyse von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Länge wurde die Agarosegel-Elektrophorese genutzt. Die Agarose-Gele wurden hergestellt, indem eine Mischung von Agarose (0,21 – 0,6 g; $\omega = 0,7 - 2,0 \%$) in TBE-Puffer (0,5 x; 30 mL) in einer Mikrowelle (700 W) mehrfach bis zur vollständigen Auflösung zum Sieden gebracht wurde. Evaporiertes Wasser wurde anschließend mit Reinstwasser aufgefüllt. Zum Anfärben der DNA-Fragmente wurde der Interkalator GelRed (3 μL ; $\varphi = 1:10\,000$) zugegeben und die Lösung erneut aufgeköcht. Nach etwa 1 min Abkühlen auf RT wurde die gesamte Lösung in eine Elektrophoresekammer überführt und mit einem Kamm entsprechend der gewünschten

Anzahl an Geltaschen (8 oder 15) versehen. Nach vollständiger Aushärtung des Agarosegels (>30 min) wurde der Kamm vorsichtig entfernt und die Kammer mit TBE-Laufpuffer (0,5 x; 300 mL) gefüllt, sodass das gesamte Gel mit Flüssigkeit bedeckt war. Die Analyseproben (2 - 20 µL, ca 50 - 100 ng) wurden in die Taschen des Gels mit einer Pipette aufgetragen, wobei die äußere Tasche meist eine Referenzprobe mit definierten DNA-Banden (Low Range/Middle Range/High Range DNA Marker) enthielt. Durch Anlegen einer Gleichspannung (90 V) wurde die Elektrophorese gestartet und bis zum Erreichen der gewünschten Laufstrecke durchgeführt ($\approx 30 - 45$ min). Abschließend wurden die aufgetrennten DNA-Fragmente durch die Anregung des gebundenen Interkalators bei einer Wellenlänge von 312 nm sichtbar gemacht und mithilfe eines Geldokumentationssystems der Firma Intas fotografiert sowie dokumentiert.

5.2.6 Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE)

Die Analyse von kurzen Duplex-ODN erfolgte durch native Polyacrylamidgel-Elektrophorese, für die ein 15 %iges Polymer-Gel hergestellt wurde. Im ersten Schritt wurde eine Acrylamid-Lösung zwischen zwei Glasplatten, die in eine spezielle Halterung gespannt waren, gefüllt, mit einem Kamm entsprechender Geltaschen (10-15) versehen und anschließend auspolymerisiert (30 min). Dazu wurden Acrylamid/Bisacrylamid (4 mL, 30 %), APS (0,1 mL, 0,1 %) und TEMED (4 µL) mit NEB4-Puffer (1x, 1 mL) versetzt, auf 10 mL mit Reinstwasser aufgefüllt und zwischen die Glasplatten pipettiert. Für die Elektrophorese wurde zunächst der Gelkamm entfernt und anschließend die Glasplatten in die Elektrophorese-Apparatur eingespannt. Die innere und äußere Kammer wurde daraufhin bis zur Markierung mit NEB4-Laufpuffer (1x) befüllt. Die Proben wurden mit Ladepuffer (1/5 des Volumens) angefärbt und 10 pmol der zu untersuchenden einzel- bzw. doppelsträngigen ODN in die Geltasche aufgetragen. Zur späteren Identifikation der einzelnen DNA-Fragmente diente eine Referenzprobe mit definierten DNA-Banden (Ultra Low Range Marker), die in die äußeren Taschen gefüllt wurde. Nach ca. 30 min bei einer angelegten Spannung von 130 V wurden die beiden Glasplatten vorsichtig entfernt und das Gel in eine Lösung aus NEB4-Puffer (1x, 150 mL) und dem Interkalator GelRed (3 µL) für 30 min auf einem Schüttelinkubator (50 rpm) inkubiert. Abschließend wurden die aufgetrennten DNA-Fragmente durch die Anregung des Interkalators bei einer Wellenlänge von 312 nm sichtbar gemacht und mithilfe eines Geldokumentationssystems der Firma Intas fotografiert sowie dokumentiert.

5.2.7 Plug-Aufreinigung

Zur Aufreinigung modifizierter DNA-Proben wurden Agarose-Plugs genutzt. Zur Herstellung definierter Plugs wurde zunächst *SeaPlaque* Agarose (0,02 g, 2 %) mit TE-Puffer (1x, 1 mL) gemischt, für 10 min bei 80 °C erhitzt und durch mehrmaliges Vortexen vollständig gelöst. Die hergestellte Agaroselösung und die entsprechende DNA-Probe wurden bei 45 °C für 5 min inkubiert und anschließend mit gleichen Volumina 1:1 gemischt, wobei ein Gesamtvolumen von 80 µL nicht überschritten werden durfte. Das Gemisch wurde anschließend in eine vorgefertigte Plug-Form der Firma Bio-Rad gefüllt und bei 4 °C für ca. 10-15 min ausgehärtet. Zur Aufreinigung der Probe wurden die erstarrten Plugs aus ihrer Form gedrückt und siebenmal für 10 min oder dreimal über Nacht in jeweils frischem TE-Puffer (1x, 50 mL) geschüttelt. Nach diesem Waschschrift wurden die Plugs in einem Mikroreaktionsgefäß bei 75 °C aufgeschmolzen, mit β-Agarase (2 µL, 1 U/µL) zur Verhinderung eines erneuten Erstarrens versetzt und 1 h bei 43 °C inkubiert. Erfolgte anschließend noch eine Agarosegel-Elektrophorese, wurden die Proben nochmals bei 65 °C für 20 min zur Inaktivierung der β-Agarase inkubiert.

5.2.8 Polymerase-Kettenreaktion

Für die Herstellung eines definierten PCR-Produktes (1052 Bp) wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) verwendet, bei der die Ausgangserbsubstanz vervielfältigt wird. Dazu wurde λ-Phagen-DNA als Templat verwendet, wobei durch definierte Primer im Endprodukt genau eine Erkennungssequenz für M.TaqI (5'-TCGA-3') und einmal die epigenetische Base 5hmC eingebaut wurden. Dazu wurde zunächst eine Lösung (50 µL) aus Desoxynukleosidtriphosphaten (0,2 mM), Taq-DNA-Polymerase Puffer (1x), dem Enzym Taq-DNA-Polymerase (0,02 U/µL), Forward Primer (0,4 µM), Reversed Primer (0,4 µM) und λ-Phagen-DNA (4 ng/µL) hergestellt. Anschließend wird die Reaktion im Thermocycler nach dem in Tabelle 5.15 beschriebenen Temperaturprogramm durchgeführt und die erhaltene DNA-Menge durch Agarosegel-Elektrophorese und Vergleich mit λ-DNA-Standard quantifiziert.

Tabelle 5.15: PCR-Temperaturprogramm für die Synthese eines PCR Produktes (1052 Bp) aus λ -DNA-Templat.

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	95 °C	30 s	1 x
	95 °C	30 s	
Primeranlagerung	53 °C	60 s	30 x
Verlängerung	68 °C	90 s	
	68 °C	600 s	1 x

5.2.9 Modifikations-/Restriktionstests doppeltaktivierter AdoMet-Analoga

Nachfolgend werden verschiedene Modifikations-/Restriktionstests zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität von synthetischen Cofektoranaloga sowohl mit DNA-Adenin-*N*6-MTasen als auch für DNA-Cytosin-*C*5-MTasen beschrieben. Bei Letzteren handelt es sich dabei nicht um den Wildtyp der Enzyme, sondern um mutierte Varianten, für die Aminosäuren an bestimmten Positionen zur Vergrößerung der Cofaktor-Bindungstasche und somit zur Erweiterung der Spezifität ausgetauscht wurden. Dies ist an entsprechender Stelle hervorgehoben.

5.2.9.1 Aktivitätstest mit M.TaqI

Zur Quantifizierung der Aktivität der DNA-Adenin-*N*6-MTase M.TaqI wurden Modifikations-/Restriktionstests durchgeführt. Überprüft wurde dabei sowohl der natürliche Cofaktor AdoMet (**1**) als auch synthetisch hergestellte AdoMet-Analoga. Zum einen handelte es sich um Cofaktoren mit terminaler oder gespannter Doppelbindung (AdoVB (**6**), AdoYnVB (kurz) (**16**), AdoYnVB (lang) (**17**), AdoYnNorb (**7**)) und zum anderen um Cofaktoren, die eine fluoreszierende Reportergruppe tragen (AdoYnTAMRA (**8**), AdoYnATTO643 (**25**), AdoYnCF640R (**20**), AdoYnAF647 (**26**)). Nachfolgend ist ein Reaktionsansatz mit dem natürlichen Cofaktor AdoMet (**1**) beschrieben, der analog auch mit den oben genannten Cofektoranaloga durchgeführt werden kann. Dabei muss auf die Ausgangskonzentrationen des jeweiligen Analogons geachtet und das Gesamtvolumen entsprechend mit Reinstwasser angepasst werden. Bei gering konzentrierten AdoMet-Analoga wurde zusätzlich der pH-Wert überprüft.

Zunächst wurde eine Reaktionslösung (242 μ L) bestehend aus CutSmart-Puffer (1x), genomischer T7-DNA (50 ng/ μ L) und AdoMet (**1**) (80 μ M) angesetzt, gut gemischt und auf

zehn Mikroreaktionsgefäße aufgeteilt. Dabei wurden in das erste Gefäß 38 μL und in neun weiteren Gefäße 20 μL pipettiert (im Folgenden mit Probe 1-10 bezeichnet). Anschließend wurden 2 μL einer M.TaqI-Enzymlösung (4,26 μM , 1 Äq. pro Erkennungssequenz bei 111 TCGA-Stellen auf T7-DNA) zu Probe 1 sowie 1 μL zu einer Kontrolllösung 1 (19 μL , 50 ng/ μL T7-DNA, 1x CutSmart-Puffer) hinzugegeben. Zu einer weiteren Kontrolllösung 2 (20 μL , 50 ng/ μL T7-DNA, 80 μM AdoMet (**1**)) wurde keine DNA-MTase hinzugefügt. Nachdem Probe 1 vorsichtig aber gründlich durchmischt wurde, wurden 20 μL mit einer Pipette entnommen, in Probe 2 überführt und erneut gemischt. Analog wurde für die acht weiteren Reaktionsgefäße verfahren, sodass eine Verdünnungsreihe mit jeweils halbierten M.TaqI-Enzymkonzentration erhalten wurde. Die letzten 20 μL aus Probe 10 wurden verworfen. Alle Proben sowie die beiden Kontrollansätze wurden für 1 h bei 65 °C inkubiert. Anschließend wurde zu jeder Probe eine Restriktionslösung (30 μL , 1x CutSmart-Puffer, 0,33 U/ μL R.TaqI) hinzugegeben, gründlich durchmischt und erneut 1 h bei 65 °C inkubiert. Daraufhin wurde Proteinase K (1 μL , >0,6 U/ μL) zu den Proben 1-10 sowie zu beiden Kontrollansätzen zugegeben und für 30 min bei 53 °C inkubiert. Alle Proben wurden abschließend mit dem Ladepuffer 6xLB (10 μL) versetzt und mittels Agarosegel-Elektrophorese analysiert (0,1 μg DNA, 0,7 - 1 % Agarose, 0,5x TBE-Puffer, 90 V, 45 min).

5.2.9.2 Aktivitätstest mit M.BseCI

Zur Quantifizierung der Aktivität der DNA-Adenin-*N*6-MTase M.TaqI wurden Modifikations-/Restriktionstests durchgeführt. Überprüft wurde dabei sowohl der natürliche Cofaktor AdoMet (**1**) als auch synthetisch hergestellte AdoMet-Analoga. Dabei handelte es sich um Cofaktoren mit terminaler oder gespannter Doppelbindung (AdoVB (**6**), AdoYnVB (kurz) (**16**), AdoYnVB (lang) (**17**), AdoYnNorb (**7**)) als auch um den fluoreszierenden Cofaktor AdoYnTAMRA (**8**). Nachfolgend ist ein Reaktionsansatz mit dem natürlichen Cofaktor AdoMet (**1**) beschrieben, der analog auch mit den oben genannten Cofaktoranaloga durchgeführt werden kann. Dabei muss auf die Ausgangskonzentrationen des jeweiligen Analogons geachtet und das Gesamtvolumen entsprechend mit Reinstwasser angepasst werden. Bei gering konzentrierten AdoMet-Analoga wurde zusätzlich der pH-Wert überprüft.

Zunächst wurde eine Reaktionslösung (230 μL) bestehend aus M.BseCI-Puffer (1x), genomischer T7-DNA (50 ng/ μL) und AdoMet (**1**) (80 μM , bzw. 10 μM für AdoYnTAMRA (**1**)) angesetzt, gut gemischt und auf zehn Mikroreaktionsgefäße aufgeteilt. Dabei wurden in das erste Gefäß 38 μL und in alle neun weiteren Gefäße 20 μL (im Folgenden mit Probe 1-10 bezeichnet) pipettiert. Anschließend wurden 2 μL einer M.BseCI-Enzymlösung (1,15 μM ,

10 Äq. pro Erkennungssequenz bei drei ATCGAT-Stellen auf T7-DNA) zu Probe 1 sowie 1 µL zu einer Kontrolllösung 1 (19 µL, 50 ng/µL T7-DNA, 1x M.BseCI-Puffer) hinzugegeben. Zu einer weiteren Kontrolllösung 2 (20 µL, 50 ng/µL T7-DNA, 80 µM AdoMet (**1**)) wurde keine DNA-MTase hinzugefügt. Nachdem Probe 1 vorsichtig aber gründlich durchmischt wurde, wurden 20 µL mit einer Pipette entnommen, in Probe 2 überführt und erneut gemischt. Analog wurde für die acht weiteren Reaktionsgefäße verfahren, sodass eine Verdünnungsreihe mit jeweils halbierten M.BseCI-Enzymkonzentration erhalten wurde. Die letzten 20 µL aus Probe 10 wurden verworfen. Alle Proben sowie die beiden Kontrollansätze wurden für 1 h bei 55 °C inkubiert. Anschließend wurde zu jedem Mikroreaktionsgefäß eine Restriktionslösung (30 µL, 1 x CutSmart-Puffer, 13,33 mM Magnesiumacetat, 0,33 U/µL R.ClaI) hinzugegeben, gründlich durchmischt und erneut 1 h bei 37 °C inkubiert. Daraufhin wurde Proteinase K (1 µL, >0,6 U/µL) zu den Proben 1-10 sowie zu beiden Kontrollansätzen zugegeben und für 30 min bei 53 °C inkubiert. Alle Proben wurden abschließend mit dem Ladebuffer 6xLB (10 µL) versetzt und mittels Agarosegel-Elektrophorese analysiert (0,1 µg DNA, 0,7 - 1 % Agarose, 0,5x TBE-Puffer, 90 V, 45 min).

5.2.9.3 Aktivitätstest mit EcoDam

Zur Quantifizierung der Aktivität der DNA-Adenin-N⁶-MTase EcoDam wurden Modifikations-/Restriktionstests durchgeführt. Überprüft wurde dabei sowohl der natürliche Cofaktor AdoMet (**1**) als auch synthetisch hergestellte AdoMet-Analoga. Dabei handelte es sich einerseits um den Cofaktor AdoYnNorb (**7**), der eine gespannte Doppelbindung aufweist, und andererseits um den fluoreszierenden Cofaktor AdoYnTAMRA (**8**). Nachfolgend ist ein Reaktionsansatz mit dem natürlichen Cofaktor AdoMet (**1**) beschrieben, der analog auch mit den oben genannten Cofektoranaloga durchgeführt werden kann. Dabei muss auf die Ausgangskonzentrationen des jeweiligen Analogons geachtet und das Gesamtvolumen entsprechend mit Reinstwasser angepasst werden. Bei gering konzentrierten AdoMet-Analoga wurde zusätzlich der pH-Wert überprüft.

Zunächst wurde eine Reaktionslösung (242 µL) bestehend aus EcoDam-Puffer (1x), genomischer λ-DNA (50 ng/µL) und AdoMet (**1**) (40 µM) angesetzt, gut gemischt und auf zehn Mikroreaktionsgefäße aufgeteilt. Dabei wurden in das erste Gefäß 38 µL und in alle neun weiteren Gefäße 20 µL pipettiert (im Folgenden mit Probe 1-10 bezeichnet). Anschließend wurden 2 µL eine EcoDam-Enzymlösung (3,62 µM, 1 Äq. pro Erkennungssequenz bei 116 GATC-Stellen auf λ-DNA) zu Probe 1 sowie 1 µL zu einer Kontrolllösung 1 (19 µL, 50 ng/µL λ-DNA, 1x EcoDam-Puffer) hinzugegeben. Zu einer weiteren Kontrolllösung 2 (20 µL,

50 ng/ μ L λ -DNA, 40 μ M AdoMet (**1**)) wurde keine DNA-MTase hinzugefügt. Nachdem Probe 1 vorsichtig aber gründlich durchmischt wurde, wurden 20 μ L mit einer Pipette entnommen, in Probe 2 überführt und erneut gemischt. Analog wurde für die acht weiteren Reaktionsgefäße verfahren, sodass eine Verdünnungsreihe mit jeweils halbiertem EcoDam-Enzymkonzentration erhalten wurde. Die letzten 20 μ L aus Probe 10 wurden verworfen. Alle Proben sowie die beiden Kontrollansätze wurden für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde zu jeder Probe eine Restriktionslösung (30 μ L, R.MboI-Puffer (1x), Magnesiumacetat (13,33 mM), R.MboI (0,33 U/ μ L)) hinzugegeben, gründlich durchmischt und erneut 1 h bei 37 °C inkubiert. Daraufhin wurde Proteinase K (1 μ L, >0,6 U/ μ L) zu den Proben 1-10 sowie zu beiden Kontrollansätzen zugegeben und für 30 min bei 53 °C inkubiert. Alle Proben wurden abschließend mit dem Ladepuffer 6xLB (10 μ L) versetzt und mittels Agarosegel-Elektrophorese analysiert (0,1 μ g DNA, 1 % Agarose, 0,5x TBE-Puffer, 90 V, 45 min).

5.2.9.4 Aktivitätstest mit M.SssI (Q142A/N370A, dm)

Zur Überprüfung der Aktivität der DNA-Cytosin-C5-MTase M.SssI (dm) wurden Modifikations-/Restriktionstests durchgeführt. Bei dieser DNA-MTase handelt es sich um eine Variante, bei der zwei Aminosäuren ausgetauscht sind. Glutamin an der Position 142 ist zu Alanin und Asparagin an der Position 370 zu Alanin mutiert, um die Cofaktor-Bindungstasche zu vergrößern und damit die Spezifität zu erweitern. Überprüft wurde sowohl der natürliche Cofaktor AdoMet (**1**) als auch synthetisch hergestellte AdoMet-Analoga. Dabei handelte es sich um Cofaktoren mit terminaler oder gespannter Doppelbindung (AdoVB (**6**), AdoYnVB (kurz) (**16**), AdoYnVB (lang) (**17**) und AdoYnNorb (**7**)). Nachfolgend ist ein Reaktionsansatz mit dem natürlichen Cofaktor AdoMet (**1**) beschrieben, der analog auch mit den oben genannten Cofektoranaloga durchgeführt werden kann. Dabei muss auf die Ausgangskonzentrationen des jeweiligen Analogons geachtet und das Gesamtvolumen entsprechend mit Reinstwasser angepasst werden. Bei gering konzentrierten AdoMet-Analoga wurde zusätzlich der pH-Wert überprüft.

Zunächst wurde eine Modifikationslösung (20 μ L, 1x M.SssI-Puffer, 50 ng/ μ L λ -DNA, 80 μ M AdoMet (**1**), 4,86 μ M M.SssI (dm)), eine Kontrolllösung 1 (20 μ L, 1x M.SssI-Puffer, 50 ng/ μ L λ -DNA, 4,86 μ M M.SssI (dm)) sowie eine weitere Kontrolllösung 2 ohne DNA-MTase (20 μ L, 1x M.SssI-Puffer, 50 ng/ μ L λ -DNA, 80 μ M AdoMet (**1**)) angesetzt. Die Zugabe der DNA-MTase entsprach dabei 1 Äq. bezogen auf die CpG-Erkennungssequenzen (3113 Stellen auf λ -DNA). Nachdem vorsichtig aber gründlich durchmischt wurde, wurden alle Proben für 1 h bei 37 °C inkubiert, gefolgt von einer Hitzeinaktivierung für 20 min bei 65 °C. Anschließend wurde

zu jeder Probe eine Restriktionslösung (30 μL , 1x CutSmart-Puffer, 0,33 U/ μL R.BstUI) hinzugegeben, gründlich durchmischt und erneut 1 h bei 60 °C inkubiert. Daraufhin wurde Proteinase K (1 μL , >0,6 U/ μL) zum Modifikationsansatz sowie zu beiden Kontrollansätzen zugegeben und für 30 min bei 53 °C inkubiert. Alle Proben wurden abschließend mit dem Ladepuffer 6xLB (10 μL) versetzt und mittels Agarosegel-Elektrophorese analysiert (0,1 μg DNA, 0,7 - 1 % Agarose, 0,5x TBE-Puffer, 90 V, 45 min).

5.2.9.5 Aktivitätstest mit M.MpeI (Q136A/N374A, dm)

Zur Überprüfung der Aktivität der DNA-Cytosin-C5-MTase M.MpeI (dm) wurden Modifikations-/Restriktionstests durchgeführt. Bei dieser DNA-MTase handelt es sich um eine Variante, bei der zwei Aminosäuren ausgetauscht sind. Glutamin an der Position 136 ist zu Alanin und Asparagin an Position 374 zu Alanin mutiert, um die Cofaktor-Bindungstasche zu vergrößern und damit die Spezifität zu erweitern. Überprüft wurde sowohl der natürliche Cofaktor AdoMet (**1**) als auch synthetisch hergestellte AdoMet-Analoga. Dabei handelte es sich um Cofaktoren mit terminaler oder gespannter Doppelbindung (AdoVB (**6**), AdoYnVB (kurz) (**16**), AdoYnVB (lang) (**17**) und AdoYnNorb (**7**)). Nachfolgend ist ein Reaktionsansatz mit dem natürlichen Cofaktor AdoMet (**1**) beschrieben, der analog auch mit den oben genannten Cofaktoranaloga durchgeführt werden kann. Dabei muss auf die Ausgangskonzentrationen des jeweiligen Analogons geachtet und das Gesamtvolumen entsprechend mit Reinstwasser angepasst werden. Bei gering konzentrierten AdoMet-Analoga wurde zusätzlich der pH-Wert überprüft.

Für diesen Modifikationsansatz wurde pUC19-Plasmid-DNA zunächst linearisiert. Dazu wurde eine Restriktionslösung (100 μL , 1x CutSmart-Puffer, 100 ng/ μL pUC19-Plasmid-DNA, 0,4 U/ μL R.EcoRI) 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Lösung nach Herstellerangaben mit dem *QIAquick® PCR-Purification Kit* aufgereinigt. Eine Überprüfung der erfolgreichen Linearisierung erfolgte durch Agarosegel-Elektrophorese, indem die durch die Restriktionsendonuklease R.EcoRI linearisierte pUC19-Plasmid-DNA neben der zirkulären Ausgangsform aufgetragen wurde. Für die anschließenden Modifikations-/Restriktionstests wurden Modifikationsansatz sowie zwei Kontrolllösungen in Mikroreaktionsgefäßen angesetzt. Die Modifikationslösung (20 μL , 1x M.MpeI-Puffer, 1x BSA, 10 mM β -Mercaptoethanol, 50 ng/ μL linearisierte pUC19-Plasmid-DNA, 80 μM AdoMet (**1**), 9,86 M.MpeI (dm)), eine Kontrolllösung 1 (20 μL , 1x M.MpeI-Puffer, 1x BSA, 10 mM β -Mercaptoethanol, 50 ng/ μL linearisierte pUC19-Plasmid-DNA, 9,86 μM M-MpeI (dm)) sowie eine weitere Kontrolllösung 2 ohne DNA-MTase (20 μL , 1x M.MpeI-Puffer, 1x BSA, 10 mM β -Mercaptoethanol, 50 ng/ μL

linearisierte pUC19-Plasmid-DNA, 80 μ M AdoMet (**1**)) wurden vorbereitet. Die Zugabe der DNA-MTase entsprach dabei 2 Äq. bezogen auf die CpG-Erkennungssequenzen (173 Stellen auf pUC19-Plasmid-DNA). Nachdem vorsichtig aber gründlich durchmischt wurde, wurden alle Proben für 1 h bei 37 °C inkubiert und nach Zugabe von Proteinase K (1 μ L, >0,6 U/ μ L) die Inkubation bei 37 °C für 1 h wiederholt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz sowie beide Kontrollansätze gemäß Anleitung mit dem *QIAquick® PCR-Purification Kit* aufgereinigt, mit einer Restriktionslösung (30 μ L, 1x CutSmart-Puffer, 0,33 U/ μ L R.BstUI) versetzt und 1 h bei 60 °C inkubiert. Erneut erfolgte eine Zugabe von Proteinase K (1 μ L, >0,6 U/ μ L) und eine anschließende Inkubation für 30 min bei 53 °C. Alle Proben wurden abschließend mit dem Ladepuffer 6xLB (10 μ L) versetzt und mittels Agarosegel-Elektrophorese analysiert (0,1 μ g DNA, 1 % Agarose, 0,5x TBE-Puffer, 90 V, 45 min).

5.2.9.6 Aktivitätstest mit M.HhaI (Q82A/Y254S/N304A, tm)

Zur Quantifizierung der Aktivität der DNA-Cytosin-C5-MTase M.HhaI (tm) wurden Modifikations-/Restriktionstests durchgeführt. Bei dieser DNA-MTase handelt es sich um eine Variante, bei der drei Aminosäuren ausgetauscht sind. Glutamin ist an der Position 82 zu Alanin, Tyrosin an Position 254 zu Serin und Asparagin an Position 304 zu Alanin mutiert, um die Cofaktor-Bindungstasche zu vergrößern und damit die Spezifität zu erweitern. Überprüft wurde sowohl der natürliche Cofaktor AdoMet (**1**) als auch synthetisch hergestellte AdoMet-Analoga. Dabei handelte es sich um Cofaktoren mit terminaler oder gespannter Doppelbindung (AdoVB (**6**), AdoYnVB (kurz) (**16**), AdoYnVB (lang) (**17**) und AdoYnNorb (**7**)). Nachfolgend ist ein Reaktionsansatz mit dem natürlichen Cofaktor AdoMet (**1**) beschrieben, der analog auch mit den oben genannten Cofaktoranaloga durchgeführt werden kann. Dabei muss auf die Ausgangskonzentrationen des jeweiligen Analogons geachtet und das Gesamtvolumen entsprechend mit Reinstwasser angepasst werden. Bei gering konzentrierten AdoMet-Analoga wurde zusätzlich der pH-Wert überprüft.

Zunächst wurde eine Reaktionslösung (242 μ L) bestehend aus M.HhaI-Puffer (1x), genomischer λ -DNA (50 ng/ μ L) und AdoMet (**1**) (80 μ M) angesetzt, gut gemischt und auf zehn Mikroreaktionsgefäße aufgeteilt. Dabei wurden in das erste Gefäß 38 μ L und in alle neun weiteren Gefäße 20 μ L pipettiert (im Folgenden mit Probe 1-10 bezeichnet). Anschließend wurden 2 μ L einer M.HhaI-Enzymlösung (67,16 μ M, 10 Äq. pro Erkennungssequenz bei 215 GCGC-Stellen auf λ -DNA) zu Probe 1 sowie 1 μ L zu einer Kontrolllösung 1 (19 μ L, 50 ng/ μ L λ -DNA, 1x M.HhaI-Puffer) hinzugegeben. Zu einer weiteren Kontrolllösung 2 (20 μ L, 50 ng/ μ L λ -DNA, 80 μ M AdoMet (**1**)) wurde keine DNA-MTase hinzugefügt. Nachdem Probe

1 vorsichtig aber gründlich durchmischt wurde, wurden 20 µL mit einer Pipette entnommen, in Probe 2 überführt und erneut gemischt. Analog wurde für die acht weiteren Reaktionsgefäße verfahren, sodass eine Verdünnungsreihe mit jeweils halbiertem M.HhaI-Enzymkonzentration erhalten wurde. Die letzten 20 µL aus Probe 10 wurden verworfen. Alle Proben sowie die beiden Kontrollansätze wurden für 1 h bei 37 °C inkubiert, gefolgt von einer Hitzeinaktivierung für 20 min bei 65 °C. Anschließend wurde zu jeder Probe eine Restriktionslösung (30 µL, 1x CutSmart-Puffer, 6,66 mM Magnesiumacetat, 0,33 U/µL R.HhaI) hinzugegeben, gründlich durchmischt und erneut 1 h bei 37 °C inkubiert. Daraufhin wurde Proteinase K (1 µL, >0,6 U/µL) zu den Proben 1-10 sowie zu beiden Kontrollansätzen zugegeben und für 30 min bei 53 °C inkubiert. Alle Proben wurden abschließend mit dem Ladepuffer 6xLB (10 µL) versetzt und mittels Agarosegel-Elektrophorese analysiert (0,1 µg DNA, 0,7 - 1 % Agarose, 0,5x TBE-Puffer, 90 V, 45 min).

5.2.10 HPLC-Quantifizierungstest

Zur Quantifizierung der enzymatischen Modifikationsreaktionen sowie der anschließenden Klick-Reaktion wurde eine Analysemethode mittels HPLC verwendet. Dazu wurden modifizierte Duplex-ODN in die einzelnen Nukleosidbausteine fragmentiert und mittels HPLC quantifiziert. Überprüft werden sollte zunächst die einstufige Modifikationsreaktion mit M.TaqI und den verschiedenen AdoMet-Analoga AdoYnNorb (7), AdoYnTAMRA (8), AdoYnCF640R (20), AdoYnATTO643 (25) und AdoYnAF647 (26), gefolgt von EcoDam mit AdoYnTAMRA (8). Außerdem wurde die zweistufige Markierung von 5hmC durch das Enzym DNA-β-GT, den Cofaktor UDP-6-Azidoglucose (10) und DBCO-PEG_{4-5/6}-TAMRA (14) untersucht, wobei die Ausbeute der beiden Einzelreaktionen hinsichtlich der Vollständigkeit analysiert werden sollte. Weiterhin erfolgte eine Quantifizierung für die orthogonale Reaktion dieser beiden Modifikationen in einer *one-pot*-Reaktion.

5.2.10.1 Duplex-ODN -Hybridisierung und einstufige Modifikation mit M.TaqI

Es wurde eine Lösung (100 µL) bestehend aus CutSmart-Puffer (1x), den beiden Duplex-ODN 14+TCGA und 14-TCGA (50 µM, 5.1.4) und Reinstwasser angesetzt, für 3 min bei 95 °C inkubiert und für 30 min auf Raumtemperatur abgekühlt. Das hybridisierte Produkt (1 nmol in neutralem HPLC-Puffer A) wurde mittels Umkehrphasen-HPLC und Methode N1 (5.2.1) analysiert.

Anschließend wurde zur Modifikation eine Lösung (100 µL) bestehend aus CutSmart-Puffer (1x), Duplex-ODN (10 µM, 1 nmol), Cofaktoranalogen (40 µM) und M.TaqI (10 µM, 1 Äq. pro Erkennungssequenz bezogen auf eine TCGA Stelle auf dem Duplex) angesetzt, vorsichtig durchmischt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Der modifizierte Duplex wurde zur Beseitigung von überschüssigem Cofaktor-Analogen sowie anderen Verunreinigungen durch Gelfiltration mit einer NAP-5-Säule (5.1.6) aufgereinigt. Dabei wurde die Säule zunächst mit Nuklease P1-Puffer (10 ml, 1x) equilibriert, die gesamte Modifikationslösung (100 µL) aufgetragen und 400 µL Nuklease P1-Puffer (1x) hinzugegeben, bevor mit Nuklease P1-Puffer (500 µL, 1x) eluiert wurde.

5.2.10.2 Duplex-ODN -Hybridisierung und einstufige Modifikation mit EcoDam

Es wurde eine Lösung (100 µL) bestehend aus EcoDam-Puffer (1x), den beiden Duplex-ODN 14-\GATC und 14-\GATC (50 µM, 5.1.4) und Reinstwasser angesetzt, für 3 min bei 95 °C inkubiert und für 30 min auf Raumtemperatur abgekühlt. Das hybridisierte Produkt (1 nmol in neutralem HPLC-Puffer A) wurde mittels Umkehrphasen-HPLC und Methode N1 (5.2.1) analysiert.

Anschließend wurde zur Modifikation eine Lösung (100 µL) bestehend aus EcoDam-Puffer (1x), Duplex-ODN (10 µM, 1 nmol), Cofaktoranalogen (40 µM) und EcoDam (10 µM, 1 Äq. pro Erkennungssequenz bezogen auf eine GATC Stelle auf dem Duplex) angesetzt, vorsichtig durchmischt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Der modifizierte Duplex wurde zur Beseitigung von überschüssigem Cofaktor-Analogen sowie anderen Verunreinigungen durch Gelfiltration mit einer NAP-5-Säule (5.1.6) aufgereinigt. Dabei wurde die Säule zunächst mit Nuklease P1-Puffer (10 ml, 1x) equilibriert, die gesamte Modifikationslösung (100 µL) aufgetragen und 400 µL Nuklease P1-Puffer (1x) hinzugegeben, bevor mit Nuklease P1-Puffer (500 µL, 1x) eluiert wurde.

5.2.10.3 Duplex-ODN - Hybridisierung und einstufige Modifikation mit β-GT

Zunächst wurde der Duplex hergestellt, indem eine Lösung (100 µL) aus CutSmart-Puffer (1x), den beiden Einzelsträngen 13mer hmC⁺ und 13mer hmC⁻ (50 µM, 5.1.4) sowie Reinstwasser angesetzt und für 3 min bei 95 °C inkubiert wurde. Daraufhin wurde die Lösung bei Raumtemperatur 30 min abgekühlt und das Produkt (1 nmol in neutralem HPLC-Puffer A) mittels Umkehrphasen-HPLC und Methode N1 (5.2.1) analysiert.

Anschließend wurde zur Modifikation eine Lösung (100 µL) bestehend aus CutSmart-Puffer (1x), Duplex-ODN (20 µM, 2 nmol), UDP-6-Azidoglucose (**10**) (40 µM) und dem Enzym DNA-β-GT (1,72 U/µL) angesetzt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Zur weiteren Verwendung wurde die Probe aufgeteilt (je 50 µL, 1 nmol), sodass die Hälfte der Probe aus dem ersten Modifikationsschritt für den zweiten Schritt der Klick-Reaktion genutzt werden kann (5.2.10.3). Die Modifikation des ersten Reaktionsschrittes mit DNA-β-GT und UDP-6-Azidoglucose (**10**) wurde zur Beseitigung von überschüssigem Cofaktor sowie anderen Verunreinigungen durch Gelfiltration mit einer NAP-5-Säule (5.1.6) aufgereinigt. Dabei wurde die Säule zunächst mit Nuklease P1-Puffer (10 ml, 1 x) equilibriert. Die Probe (50 µL, 1 nmol) wurde mit Reinstwasser auf 100 µL aufgefüllt, das gesamte Volumen auf die Gelfiltrationssäule aufgetragen und 400 µL Nuklease- P1 Puffer (1x) hinzugegeben, bevor mit Nuklease P1-Puffer (500 µL, 1 x) eluiert wurde.

5.2.10.4 Klick-Chemie (SPAAC) mit DBCO-PEG₄-5/6-TAMRA

Zur Überprüfung des zweiten Reaktionsschrittes der zweistufigen Markierung wurde die verbliebene Probenlösung (50 µL) mit DBCO-PEG₄-5/6-TAMRA (**14**) (160 µM) versehen, gut durchmischt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Reaktionslösung wurde zur Beseitigung von überschüssigem Fluorophor sowie anderen Verunreinigungen durch Gelfiltration mit einer NAP-5-Säule (5.1.6) aufgereinigt. Dabei wurde die Säule zunächst mit Nuklease P1-Puffer (10 ml, 1x) equilibriert. Die Probe (54 µL, 1 nmol) wurde mit Reinstwasser auf 100 µL aufgefüllt, das gesamte Volumen auf die Gelfiltrationssäule aufgetragen und 400 µL Nuklease-P1-Puffer (1x) hinzugegeben, bevor mit Nuklease P1-Puffer (500 µL, 1x) eluiert wurde.

5.2.10.5 Duplex-ODN -Hybridisierung und orthogonale Modifikationsreaktion

Zunächst wurde Duplex hybridisiert, indem eine Lösung (70 µL) aus CutSmart-Puffer (1x), den beiden Einzelsträngen 13mer hmC⁺ und 13mer hmC⁻ (50 µM, 5.1.4), den beiden Einzelsträngen 14⁺\TCGA und 14⁻\TCGA (50 µM, 5.1.4) sowie Reinstwasser angesetzt und für 3 min bei 95 °C inkubiert wurde. Daraufhin wurde die Lösung bei Raumtemperatur 30 min abgekühlt.

Sukzessiver Ansatz:

Zur Modifikation wurde eine Lösung (100 µL) bestehend aus CutSmart-Puffer (1x), DNA Duplex (13mer hmC⁺/ 13mer hmC⁻ (10 µM, 1 nmol)), DNA Duplex (14⁺\TCGA/ 14⁻\TCGA (10 µM, 1 nmol)), UDP-6-Azidoglucose (**10**) (40 µM) und dem Enzym DNA-β-

GT (1,77 U/ μ L) angesetzt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Daraufhin wurde das Cofaktoranalogen AdoYnCF640R (**20**) (40 μ M) und M.TaqI (10 μ M, 1 Äq. pro Erkennungssequenz bezogen auf eine TCGA Stelle auf dem Duplex-ODN) sowie DBCO-PEG₄-5/6-TAMRA (**14**) (160 μ M) (5.2.10.4) hinzugegeben, gut durchmischt und erneut bei 37 °C über Nacht inkubiert. Die Modifikationslösung wurde zur Beseitigung von überschüssigem Fluorophor sowie anderen Verunreinigungen durch Gelfiltration mit einer NAP-5-Säule (5.1.6) aufgereinigt. Dabei wurde die Säule zunächst mit Nuklease P1-Puffer (10 ml, 1x) equilibriert. Die Probe (102 μ L, 2 nmol) wurde auf die Gelfiltrationssäule aufgetragen und 400 μ L Nuklease P1-Puffer (1x) hinzugegeben, bevor mit Nuklease P1-Puffer (500 μ L, 1x) eluiert wurde.

Gleichzeitiger Ansatz:

Zur Modifikation wurde eine Lösung (100 μ L) bestehend aus CutSmart-Puffer (1x), DNA Duplex (13mer hmC+/ 13mer hmC- (10 μ M, 1 nmol)), DNA Duplex (14+\'TCGA/ 14-\'TCGA (10 μ M, 1 nmol)), AdoYnCF640R (**20**) (40 μ M), UDP-6-Azidoglucose (**10**) (40 μ M), M.TaqI (10 μ M, 1 Äq. pro Erkennungssequenz bezogen auf eine TCGA Stelle auf dem Duplex-ODN) und dem Enzym β -GT (1,77 U/ μ L) angesetzt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Es erfolgte die zweite Stufe der Klick-Reaktion (5.2.10.4), indem die gesamte Probenlösung (100 μ L) mit DBCO-PEG₄-5/6-TAMRA (**14**) (160 μ M) versehen, gut durchmischt und über Nacht bei 37 °C inkubiert wurde. Die Modifikationslösung wurde zur Beseitigung von überschüssigem Fluorophor sowie anderen Verunreinigungen durch Gelfiltration mit einer NAP-5-Säule (5.1.6) aufgereinigt. Dabei wurde die Säule zunächst mit Nuklease P1-Puffer (10 ml, 1x) equilibriert. Die Probe (104 μ L, 2 nmol) wurde auf die Gelfiltrationssäule aufgetragen und 400 μ L Nuklease P1-Puffer (1x) hinzugegeben, bevor mit Nuklease P1-Puffer (500 μ L, 1x) eluiert wurde.

5.2.10.6 Enzymatische Fragmentierung und Analyse der Zusammensetzung

Modifizierter Duplex wurde nach der Aufreinigung über eine NAP-5-Säule und Elution in Nuklease P1-Puffer (500 μ L, 1x) durch Erhitzen (100 °C, 10 min) aufgeschmolzen und anschließend direkt für 2 min auf Eis gestellt. Zur Fragmentierung des Doppelstrangs in die einzelnen Nukleotide wurde das Enzym Nuklease P1 (1 μ L, 1 U/ μ L) zugegeben und die Lösung für 2 h bei 37 °C inkubiert. Sofort im Anschluss erfolgte die Dephosphorylierung in die einzelnen Nukleoside durch Zugabe von Reinstwasser (36 μ L), CIAP-Puffer (60 μ L, 10x) sowie CIAP (3 μ L, 0,16 U/ μ L) und eine Inkubation bei 37 °C über Nacht. Die Fragmentierung des modifizierten Duplex wurde durch die analytische Umkehrphasen-HPLC in HPLC-Puffer

A (neutral) mit Methode N2 (5.2.1, 260/272 nm, 260/555 nm, 260/600 nm) analysiert. Die modifizierten Nukleoside wurden außerdem isoliert, gefriergetrocknet und am institutseigenen Massenspektrometer charakterisiert.

5.2.11 Fluoreszenzmikroskopie

5.2.11.1 Oberflächenmodifikation

Deckgläser (8 Stück, 22 x 22 mm) und Objektträger (5 Stück, 24 x 50 mm) wurden zur Reinigung in einer speziellen Teflonhalterung platziert und über Nacht (ca. 16 h) bei RT in Königswasser (60 mL HCl/HNO₃, 3:1) inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Plättchen fünfmal mit Reinstwasser, fünfmal mit Ethanol p.a. und abschließend zur Entfernung von restlichem Ethanol nochmals mit Reinstwasser gewaschen. Dabei wurde darauf geachtet, dass jedes einzelne Plättchen gründlich mit einer Spritzflasche abgespült wurde. Anschließend erfolgte die Modifikation der Plättchen zur späteren Streckung der DNA durch Silanisierung. Dazu wurden die Objektträger in einer wässrigen Lösung (200 mL) mit Vinyltrimethoxysilan (120 µL) und die Deckgläschen in einer wässrigen Lösung (200 mL) mit Trimethyl-[3-(trimethoxysilyl)-propyl]-ammoniumchlorid (396 µL) über Nacht im Schüttelinkubator bei 65 °C und 90 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurden die modifizierten Plättchen erneut fünfmal mit Reinstwasser sowie fünfmal mit Ethanol p.a. gewaschen und vor Verwendung unter Argonstrom getrocknet.

5.2.11.2 Probenvorbereitung

Vor Herstellung der Mikroskopielösung wurde die modifizierte DNA mittels *Plug*-Aufreinigung (5.2.7) zunächst von überschüssigem Cofaktor befreit. Unmittelbar vor der Analyse mit dem Fluoreszenzmikroskop wurde eine Lösung (16 µL) mit modifizierter T7-DNA (0,8 – 8 ng), dem Interkalator YOYO-1 (0,38 µM, 0,5 Äq./Bp) und DTT (200 mM) in TE-Puffer (1x) angesetzt und gründlich aber vorsichtig durchmischt.

5.2.11.3 Fluoreszenzmikroskopie

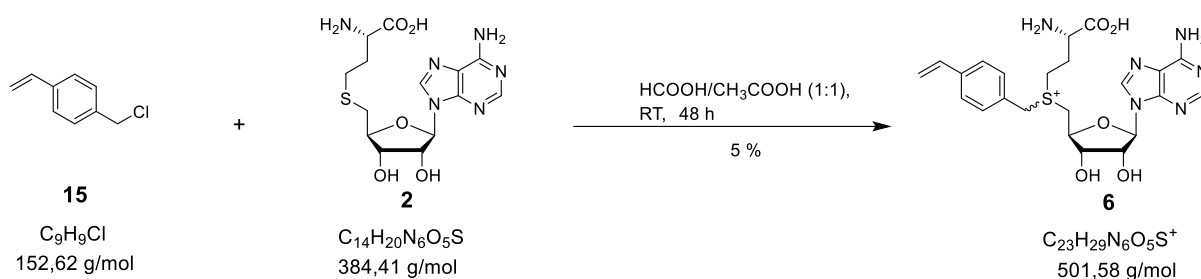
Die Fluoreszenzmikroskopie wurde am Institut für Physikalische Chemie der RWTH Aachen University in der Arbeitsgruppe von Prof. Dominik Wöll durchgeführt und von dessen Mitarbeitern Pia Lenßen, Thomas Schmidt, Lukas Schubert und Laura Hoppe-Alvarez unterstützend begleitet. Für die Analyse wurde ein kommerzielles *spinning disc* Konfokal-

Fluoreszenzmikroskop (VisiScope Confocal-CSUX1, Visitron Systems) mit Nikon Ti und Andor EMCCD Kamera verwendet. Das oberflächensilanisierte Deckglas wurde auf dem modifizierten Objektträger platziert und die zu analysierende Mikroskopiellösung (1 μ L) an den Rand des Deckgläschens pipettiert, sodass die DNA unter Einfluss von Kapillarkräften zwischen beide Glasplättchen gezogen und somit gestreckt wurde. Die Probenträger wurden für die Aufnahmen unter dem Fluoreszenzmikroskop auf einem xyz-Piezotisch (P-545.3R7, Physik Instrumente) fixiert und die emittierte Fluoreszenz gemessen. Dazu erfolgte die Anregung der Fluorophore YOYO-1, TAMRA, CF640R und ATTO643 durch verschiedene Laser. Die Anregung der YOYO-1-Fluoreszenz ($\lambda^{\text{Ex}} = 491 \text{ nm}$, $\lambda^{\text{Em}} = 509 \text{ nm}$; $\epsilon_{491 \text{ nm}} = 99,000 \text{ L/mol/cm}$)^[176] erfolgte bei einer Wellenlänge von 488 nm (iBeam Smart 488S-HP, Toptica, Gräfelfing) mit einer Belichtungszeit von 50 ms sowie einer Laserstärke von 12 mW. Die Anregung der TAMRA-Fluoreszenz ($\lambda^{\text{Ex}} = 556 \text{ nm}$, $\lambda^{\text{Em}} = 563 \text{ nm}$; $\epsilon_{556 \text{ nm}} = 84,000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ gemäß den Literaturangaben des Herstellers Jena Bioscience GmbH) erfolgte mit einem Laser der Wellenlänge 561 nm (DPSS Jive, Cobolt, Solna, Schweden) mit einer Belichtungszeit von 100 ms und einer Laserstärke von 150 mW. Für die Anregung der roten Fluorophore CF640R ($\lambda^{\text{Ex}} = 642 \text{ nm}$, $\lambda^{\text{Em}} = 662 \text{ nm}$; $\epsilon_{642} = 105,000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ gemäß Literaturangabe des Herstellers Biotium) sowie ATTO643 ($\lambda^{\text{Ex}} = 643 \text{ nm}$, $\lambda^{\text{Em}} = 665 \text{ nm}$; $\epsilon_{643} = 150,000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ gemäß Literaturangabe des Herstellers ATTO-TEC GmbH) wurde ein Laser mit der Wellenlänge 640 nm (iBeam Smart 640-CD, Toptica, Gräfelfing) verwendet. Die Belichtungszeit für die Aufnahmen betrug 100 ms bei einer Laserintensität von 15-30 mW.

5.3 Synthesen doppeltaktivierter AdoMet-Analoga

Nachfolgend sind die Synthesevorschriften für die doppeltaktivierten AdoMet-Analoga mit endständiger vinylischer Reportergruppen und etwaige Zwischenstufen aufgeführt. Bei der Synthese von AdoVB (**6**) sowie bei dem Zwischenprodukt 1-(Azidomethyl)-4-vinylbenzol (**18**) handelt es sich um literaturbekannte Verbindungen. Die Durchführung für diese Synthesen erfolgten somit in Anlehnung an die genannten Literaturquellen.

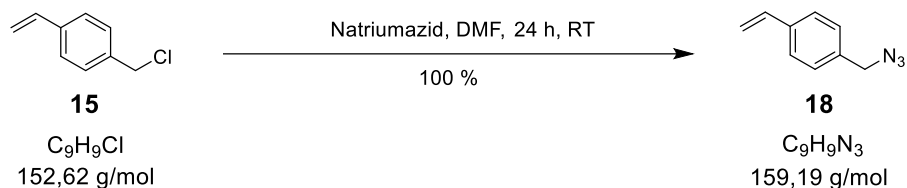
5.3.1 AdoVB (**6**) ^[119]



Für die Synthese von AdoVB (**6**) wurde eine literaturbekannte Reaktionsvorschrift nach Rentmeister *et al.* ^[119] verwendet. AdoHcy (**2**) (10 mg, 26 μ mol, 1 Äq.) wurde in einem Gemisch aus Essigsäure und Ameisensäure (1,5 mL, 1:1) gelöst und in einem Eisbad auf 0 °C abgekühlt. Anschließend wurde 1-(Chlormethyl)-4-vinylbenzol (**15**) (400 μ L, 2,84 mmol, 109 Äq.) tropfenweise zu der rührenden Lösung hinzugegeben. Der Reaktionsansatz wurde 6 d bei RT gerührt, wobei eine Umsatzverfolgung durch *rp*-HPLC nach 0 d und nach 48 d (analytisch, Methode S1 (5.2.1), UV-Detektion bei 260/272 nm) erfolgte. Nach Ablauf der Reaktion wurde diese durch Zugabe von Reinstwasser (10 mL) abgebrochen und die wässrige Phase dreimal mit Diethylether (5 mL) extrahiert, bevor das Produkt **6** durch *rp*-HPLC isoliert wurde (präparativ, Methode S2 (5.2.1), UV-Detektion bei 260/272 nm). Nach Einengen des Produktes **6** durch Gefriertrocknung bis zu einem Volumen von ca. 1 mL wurde die Konzentration mittels UV/Vis-Spektroskopie bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt ($\epsilon_{260} = 15400 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Das erhaltene Produkt **6** wurde in wässriger Lösung mit TFA (pH 4,0) bei -20 °C bis zur Verwendung gelagert.

Ausbeute: 1,3 μ mol (5 %)

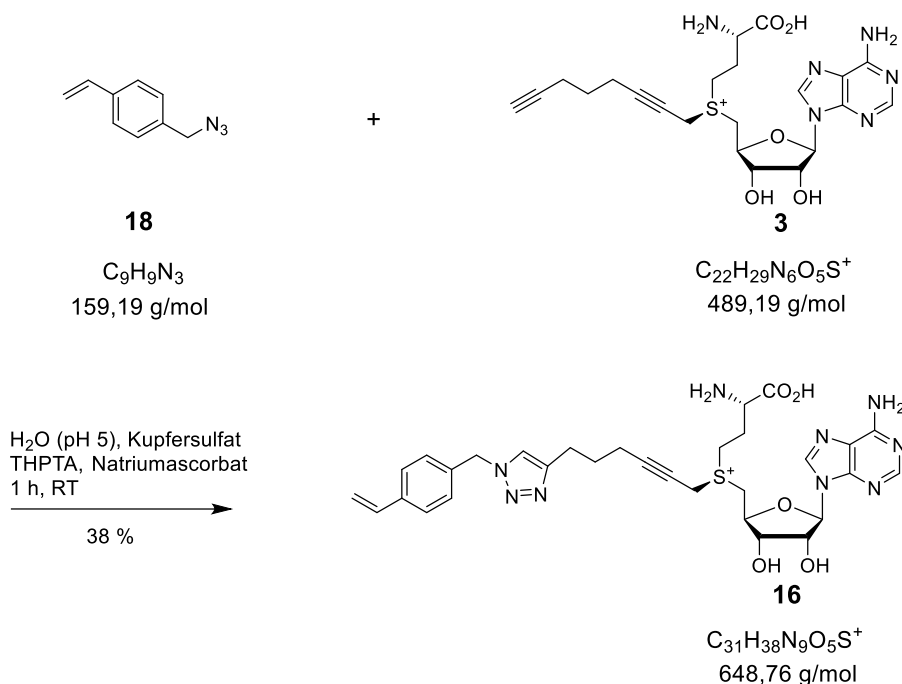
MS (ESI, pos., 70 eV): *m/z* (%): 501,19 [*M*⁺] (100)

5.3.2 1-(Azidomethyl)-4-vinylbenzol (**18**)^[148]

Angelehnt an die Literaturvorschrift nach Stansbury *et al.*^[148] wurde 1-(Chlormethyl)-4-vinylbenzol (**15**) (5,00 g, 32,8 mmol, 1 Äq.) in einem Rundkolben in DMF (40 mL) gelöst. Zu diesem Gemisch wurde Natriumazid (6,38 g, 98,3 mmol, 3 Äq.) zugegeben und der Ansatz 24 h bei RT gerührt. Anschließend wurde die Reaktion mit Reinstwasser (100 mL) abgebrochen und dreimal mit Diethylether (50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden weiterhin dreimal mit Reinstwasser gewaschen und über Natriumsulfat für 1 h getrocknet. Der Feststoff wurde abfiltriert und das Lösungsmittel abschließend unter Vakuum entfernt, bevor das Produkt **18** als leicht gelbliche, ölige Flüssigkeit erhalten wurde.

Ausbeute: 5,0 g (96 %)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 7,43 (d, 2H), 7,28 (d, 2H), 6,72 (dd, J =17,6 Hz, 10,9 Hz, 1H), 5,77 (dd, J =17,6 Hz, 0,8 Hz, 1H), 5,28 (dd, J =10,8 Hz, 0,7 Hz, 1H), 4,30 (s, 2H) ppm.

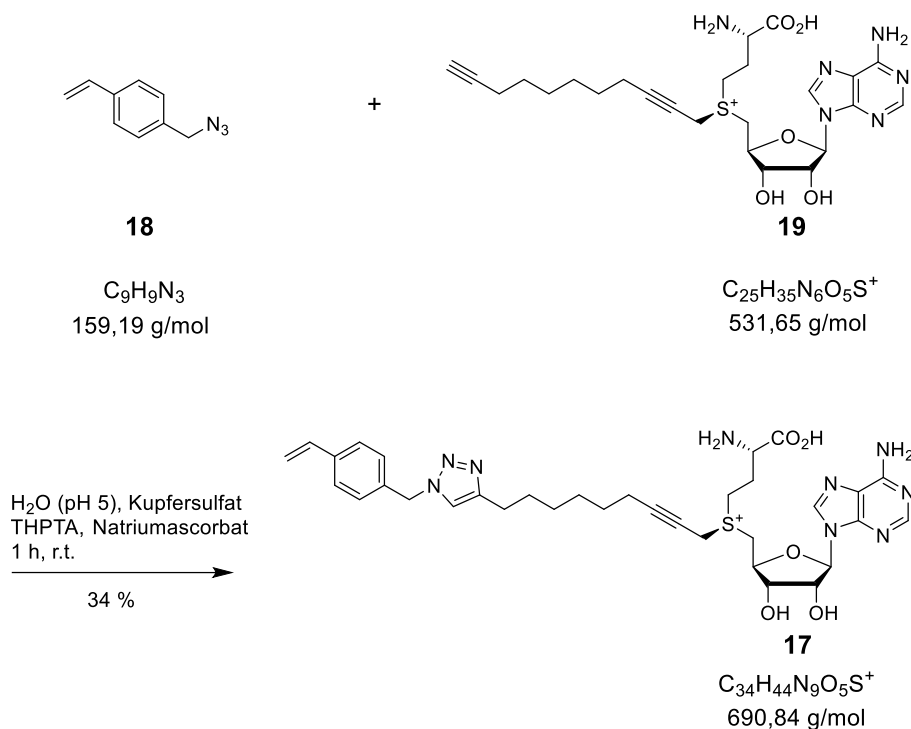
5.3.3 AdoYnVB (kurz) (**16**)

In einem Mikroreaktionsgefäß wurden wässrige Lösungen aus THPTA (8,33 μ L, 60 mM, 500 nmol, 1 Äq.), Kupfersulfat (2 μ L, 250 mM, 500 nmol, 1 Äq.) und Natriumascorbat (83,3 μ L, 500 mM, 41,65 μ mol, 83,3 Äq.) vorgelegt. Anschließend wurde das doppeltaktivierte AdoMet-Analogon AdoYnYn (kurz) (**3**) (34,3 μ L, 35 mM, 1,20 μ mol, 2,4 Äq.) hinzugefügt, welches arbeitskreisintern von Dr. Felix Schilcher zur Verfügung gestellt wurde. Die Lösung wurde mit verdünnter Schwefelsäure auf pH 5,0 angesäuert, eine wässrige Lösung von 1-(Azidomethyl)-4-vinylbenzol (**18**) (174,6 μ L, 6,87 mM, 1,2 μ mol, 2,4 Äq.) zugegeben und anschließend der Ansatz für 1 h bei RT gerührt. Der Reaktionsumsatz wurde durch *rp*-HPLC nach 0 h und 1 h (analytisch, Methode S3 (5.2.1), UV-Detektion bei 260/272 nm) verfolgt und nach vollständigem Ablauf der Reaktion (1 h) wurde das Produkt **16** durch *rp*-HPLC isoliert (präparativ, Methode S4 (5.2.1), UV-Detektion bei 260/272 nm). Nach Einengen des Produktes **16** durch Gefriertrocknung bis zu einem Volumen von ca. 1 mL, wurde die Konzentration durch UV/Vis-Spektroskopie bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt ($\epsilon_{260} = 15400 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Das erhaltene Produkt **16** wurde in wässriger Lösung mit TFA (pH 4,0) bei -20 °C bis zur Verwendung gelagert.

Ausbeute: 38 %

MS (ESI, pos., 70 eV): m/z (%): 648,27 [M^+] (100), 569,20 [Thioether+Na] $^+$ (56)

5.3.4 AdoYnVB (lang) (17)



In einem Mikroreaktionsgefäß wurden Wasser (222 μ L) sowie wässrige Lösungen aus THPTA (8,33 μ L, 60 mM, 500 nmol, 1 Äq.), Kupfersulfat (2 μ L, 250 mM, 500 nmol, 1 Äq.) und Natriumascorbat (83,3 μ L, 500 mM, 41,65 μ mol, 83,3 Äq.) vorgelegt. Anschließend wurde das doppeltaktivierte AdoMet-Analogon AdoYnYn (lang) (19) (343 μ L, 3,50 mM, 1,20 μ mol, 2,4 Äq.) hinzugefügt, welches arbeitskreisintern von Dr. Felix Schilcher zur Verfügung gestellt wurde. Die Lösung wurde mit verdünnter Schwefelsäure auf pH 5,0 angesäuert, eine Lösung aus 1-(Azidomethyl)-4-vinylbenzol (18) (174,6 μ L, 6,87 mM, 1,20 μ mol, 2,4 Äq.) zugegeben und anschließend für 1 h bei RT gerührt. Der Fortschritt der Reaktion wurde durch *rp*-HPLC nach 0 h und 1 h (analytisch, Methode S3 (5.2.1), UV-Detektion bei 260/272 nm) verfolgt und nach vollständigem Ablauf der Reaktion (1 h) wurde das Produkt 17 durch *rp*-HPLC isoliert (präparativ, Methode S4 (5.2.1), UV-Detektion bei 260/272 nm). Das Produkt wurde durch Gefriertrocknung bis zu einem Volumen von ca. 1 mL, eingengt und die Konzentration wurde mittels UV/Vis-Spektroskopie bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt ($\epsilon_{260} = 15400 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Das erhaltene Produkt 17 wurde in wässriger Lösung mit TFA (pH 4,0) bei -20 °C bis zur Verwendung gelagert.

Ausbeute: 34 %

MS (ESI, pos., 70 eV): m/z (%): 690,317 [M^+] (55), 611,26 [Thioether+Na] $^+$ (25)

5.4 Zweistufige DNA-Markierung zur DNA-Methylierungsdetektion

Für die nachfolgende zweistufige Modifikations/-Markierungsreaktion wurde zunächst genomische T7-Phagen-DNA, zur Analyse mittels Fluoreszenzmikroskopie, mit den DNA MTasen M.BseCI, M.TaqI oder M.HhaI (tm) sowie den vinylischen Cofaktoranaloga AdoVB (6), AdoYnVB (kurz (16) /lang (17)) oder AdoYnNorb (7) (synthetisiert von Leonie Schütz, AK Weinhold) modifiziert. Anschließend erfolgte eine Diels-Alder Klick-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf unter Verwendung verschiedener Tetrazin-Konjugate.

5.4.1 DNA-Markierung mit M.BseCI

Modifikationslösungen (50 μ L) bestehend aus M.BseCI-Puffer (1x), genomischer T7-Phagen-DNA (50 ng/ μ L) und AdoYnVB (lang (17) oder AdoYnNorb (7) (80 μ M) wurden in einem Mikroreaktionsgefäß angesetzt und gut durchmischt. Anschließend wurde jeweils die DNA-MTase M.BseCI (58 nM, 2,88 pmol, 10 Äq. bezogen auf 5'-ATCGAT-3'-Erkennungssequenzen) hinzugefügt. Außerdem wurde eine Kontrolllösung 1 mit M.BseCI aber ohne Cofaktor (20 μ L, 50 ng/ μ L T7-DNA, 1x M.BseCI-Puffer, 58 nM M.BseCI) und eine weitere Kontrolllösung 2 mit Cofaktor aber ohne DNA- MTase (20 μ L, 50 ng/ μ L T7-DNA, 1x M.BseCI-Puffer, 80 μ M Cofaktoranalogon) hergestellt. Nach vorsichtiger aber gründlicher Durchmischung der Proben folgte eine Inkubation bei 55 °C für 1 h. Zu Teilen aller Proben (je 10 μ L) wurde Restriktionslösung (15 μ L, 1x CutSmart-Puffer, 6,66 mM Magnesiumacetat, 0,33 U/ μ L R.ClaI) hinzugegeben und erneut 1 h bei 37 °C inkubiert. Daraufhin wurde Proteinase K (1 μ L, >0,6 U/ μ L) zu den Modifikationslösungen sowie zu den Kontrollansätzen zugegeben und für 30 min bei 53 °C inkubiert. Alle Proben wurden abschließend mit dem Gel-Ladepuffer 6xLB (5 μ L) versetzt und mittels Agarosegel-Elektrophorese analysiert (0,1 μ g DNA, 0,7 - 1 % Agarose, 0,5x TBE-Puffer, 90 V, 45 min).

Der restliche Teil der Modifikationslösung (40 μ L) wurde daraufhin mit Hilfe von Agarose-Plugs aufgereinigt. Die Lösungen wurden zunächst bei 45 °C mit einer Agaroselösung (40 μ L, 2 %, SeaPlaque-Agarose, 1x TE-Puffer) versetzt, das Gemisch in vorgefertigte Plug-Formen der Firma Bio-Rad überführt und bei 4 °C für ca. 10-15 min gelagert. Anschließend wurden die ausgehärteten Agarose-Plugs zur Aufreinigung aus den Formen gedrückt und siebenmal für 10 min, jeweils in frischem TE-Puffer (1x, 50 mL), auf einem Schüttelinkubator gewaschen. Nach diesen Waschschritten wurden die Plugs in Mikroreaktionsgefäßen bei 75 °C aufgeschmolzen, mit β -Agarase (2 μ L, 1 U/ μ L) versetzt und 1 h bei 43 °C inkubiert. Die Proben wurden

daraufhin nochmals bei 65 °C für 20 min zur Inaktivierung der β -Agarase inkubiert. Für den zweiten Markierungsschritt wurden je 20 μ L Reaktionslösung mit 20 μ L einer Lösung des jeweiligen Tetrazin-Konjugats (**21**, **13**, **22**), gelöst in DMSO, (200 μ M) versetzt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am darauffolgenden Tag erfolgte erneut eine *Plug*-Aufreinigung der Proben analog zum oben beschriebenen Vorgehen für den ersten Modifikationsschritt. Die weitere Probenvorbereitung für die Analyse mittels Fluoreszenzmikroskopie erfolgte wie in Abschnitt 5.2.11.2 beschrieben.

5.4.2 DNA-Markierung mit M.TaqI

Modifikationslösungen (50 μ L) bestehend aus CutSmart-Puffer (1x), genomischer T7-Phagen-DNA (50 ng/ μ L) und AdoVB (**6**) oder AdoYnNorb (**7**) (80 μ M) wurden in Mikroreaktionsgefäßen angesetzt und gut durchmischt. Anschließend wurde die DNA-MTase M.TaqI (213 nM, 10,65 pmol, 1 Äq. bezogen auf 5'-TCGA-3'-Erkennungssequenzen) hinzugefügt. Außerdem wurde eine Kontrolllösung 1 mit M.TaqI aber ohne Cofaktor (20 μ L, 50 ng/ μ L T7-DNA, 1x CutSmart-Puffer, 213 nM M.TaqI) und eine weitere Kontrolllösung 2 mit Cofaktor aber ohne DNA- MTase (20 μ L, 50 ng/ μ L T7-DNA, 1x CutSmart-Puffer, 80 μ M Cofektoranalogon) hergestellt. Nach vorsichtiger aber gründlicher Durchmischung der Proben folgte eine Inkubation bei 65 °C für 1 h. Zu Teilen aller Proben (je 10 μ L) wurde Restriktionslösung (15 μ L, 1x CutSmart-Puffer, 0,33 U/ μ L R.TaqI) hinzugegeben und erneut 1 h bei 65 °C inkubiert. Daraufhin wurde Proteinase K (1 μ L, >0,6 U/ μ L) zu den Modifikationslösungen sowie zu den Kontrollansätzen zugegeben und für 30 min bei 53 °C inkubiert. Alle Proben wurden abschließend mit dem Gel-Ladepuffer 6xLB (5 μ L) versetzt und mittels Agarosegel-Elektrophorese analysiert (0,1 μ g DNA, 0,7 - 1 % Agarose, 0,5x TBE-Puffer, 90 V, 45 min).

Der restliche Teil der Modifikationslösungen (40 μ L) wurde daraufhin mit Hilfe von Agarose-*Plugs* aufgereinigt. Die Lösungen wurden zunächst bei 45 °C mit einer Agaroselösung (40 μ L, 2 %, *SeaPlaque*-Agarose, 1x TE-Puffer) versetzt, in vorgefertigte *Plug*-Formen der Firma Bio-Rad überführt und bei 4 °C für ca. 10-15 min gelagert. Anschließend wurden die ausgehärteten Agarose-*Plugs* zur Aufreinigung aus den Formen gedrückt und siebenmal für 10 min, jeweils in frischem TE-Puffer (1x, 50 mL), auf einem Schüttelinkubator gewaschen. Nach diesen Waschschritten wurden die *Plugs* in Mikroreaktionsgefäßen bei 75 °C aufgeschmolzen, mit β -Agarase (2 μ L, 1 U/ μ L) versetzt und 1 h bei 43 °C inkubiert. Die Proben wurden daraufhin

nochmals bei 65 °C für 20 min zur Inaktivierung der β -Agarase inkubiert. Für den zweiten Markierungsschritt wurden je 20 μ L Reaktionslösung mit 20 μ L einer Lösung des jeweiligen Tetrazin-Konjugats (**21**, **13**, **22**, **23**, **24**) (200 μ M), gelöst in DMSO, versetzt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am darauffolgenden Tag erfolgte erneut eine *Plug*-Aufreinigung der Proben analog zum oben beschriebenen Vorgehen für den ersten Modifikationsschritt. Die weitere Probenvorbereitung für die Analyse mittels Fluoreszenzmikroskopie erfolgte wie in Abschnitt 5.2.11.2 beschrieben.

5.4.3 DNA-Markierung mit M.HhaI

Eine Modifikationslösung (50 μ L) bestehend aus M.HhaI-Puffer (1x), genomischer T7-Phagen-DNA (50 ng/ μ L) und AdoYnNorb (**7**) (80 μ M) wurde in einem Mikroreaktionsgefäß angesetzt und gut durchmischt. Anschließend wurde die DNA-MTase M.HhaI (tm) (2,05 μ M, 102,6 pmol, 10 Äq. bezogen auf 5'-GCGC-3'-Erkennungssequenzen) hinzugefügt. Außerdem wurde M.HhaI (tm) zu einer Kontrolllösung 1 (20 μ L, 50 ng/ μ L T7-DNA, 1x M.HhaI-Puffer, 2,05 μ M M.HhaI (tm)) hinzugegeben. Zu einer weiteren Kontrolllösung 2 (20 μ L, 50 ng/ μ L T7-DNA, 1x M.HhaI-Puffer, 80 μ M AdoYnNorb (**7**)) wurde keine DNA-MTase zugefügt. Nach vorsichtiger aber gründlicher Durchmischung der Proben folgte eine Inkubation bei 37 °C für 1 h, gefolgt von einer Hitzeinaktivierung der DNA-MTase bei 65 °C für 20 min. Zu Teilen aller Proben (je 10 μ L) wurde Restriktionslösung (15 μ L, 1x CutSmart-Puffer, 6,66 mM Magnesiumacetat, 0,33 U/ μ L R.HhaI) hinzugegeben und erneut 1 h bei 37 °C inkubiert. Daraufhin wurde Proteinase K (1 μ L, >0,6 U/ μ L) zur Modifikationslösung sowie zu beiden Kontrollansätzen zugegeben und für 30 min bei 53 °C inkubiert. Alle Proben wurden abschließend mit dem Gel-Ladepuffer 6xLB (5 μ L) versetzt und mittels Agarosegel-Elektrophorese analysiert (0,1 μ g DNA, 0,7 - 1 % Agarose, 0,5x TBE-Puffer, 90 V, 45 min).

Der restliche Teil der Modifikationslösung (40 μ L) wurde daraufhin mit Hilfe von Agarose-*Plugs* aufgereinigt. Die Lösung wurde zunächst bei 45 °C mit einer Agaroselösung (40 μ L, 2 %, *SeaPlaque*-Agarose, 1x TE-Puffer) versetzt, in eine vorgefertigte *Plug*-Form der Firma Bio-Rad überführt und bei 4 °C für ca. 10-15 min gelagert. Anschließend wurde das ausgehärtete Agarose-*Plug* zur Aufreinigung aus seiner Form gedrückt und siebenmal für 10 min, jeweils in frischem TE-Puffer (1x, 50 mL), auf einem Schüttelinkubator gewaschen. Nach diesen Waschschritten wurde das *Plug* in einem Mikroreaktionsgefäß bei 75 °C aufgeschmolzen, mit β -Agarase (2 μ L, 1 U/ μ L) versetzt und 1 h bei 43 °C inkubiert. Die Probe wurde daraufhin

nochmals bei 65 °C für 20 min zur Inaktivierung der β -Agarase inkubiert. Für den zweiten Markierungsschritt wurden je 20 μ L Reaktionslösung mit 20 μ L einer Lösung des jeweiligen Tetrazin-Konjugats (**22**) (200 μ M), gelöst in DMSO, versetzt und über Nacht bei 37 °C geklickt. Am darauffolgenden Tag erfolgte erneut eine *Plug*-Aufreinigung der Proben analog zum oben beschriebenen Vorgehen für den ersten Modifikationsschritt. Die weitere Probenvorbereitung für die Analyse mittels Fluoreszenzmikroskopie erfolgte wie in Abschnitt 5.2.11.2 beschrieben

5.5 Einstufige DNA-Markierungen mit fluoreszierenden Reportergruppen

Für die nachfolgenden einstufigen Markierungsreaktionen wurden sowohl genomische T7-Phagen-DNA, genomische Human-DNA aus einer Brustkrebszelllinie als auch PCR- λ -DNA zur Analyse mittels Fluoreszenzmikroskopie verwendet. Je nach DNA-Substrat wurden die DNA-MTasen M.BseCI, M.TaqI oder EcoDam sowie die fluoreszierenden Cofaktoranaloge AdoYnTAMRA (**8**) (synthetisiert von Sascha Peters, AK Weinhold) oder AdoYnCF640R (**20**) (synthetisiert von Polina Aseeva, AK Weinhold) eingesetzt.

5.5.1 DNA-Markierung von λ -Phagen-DNA mit M.BseCI

Markierungslösungen (40 μ L) bestehend aus M.BseCI-Puffer (1x), genomischer λ -Phagen-DNA (50 ng/ μ L) und AdoYnTAMRA (**8**) oder AdoYnCF640R (**20**) (80 μ M) wurden in Mikroreaktionsgefäßen angesetzt und gut durchmischt. Anschließend wurde die DNA-MTase M.BseCI (58 nM, 2,3 pmol, 10 Äq. bezogen auf 5'-ATCGAT-3'-Erkennungssequenzen) hinzugefügt. Außerdem wurde M.BseCI zu einer Kontrolllösung 1 (20 μ L, 50 ng/ μ L T7-DNA, 1x M.BseCI-Puffer, 58 nM M.BseCI) hinzugegeben. Zu weiteren Kontrolllösungen 2 (20 μ L, 50 ng/ μ L T7-DNA, 1x M.BseCI-Puffer, 80 μ M Cofaktoranalogon) wurde keine DNA-MTase zugefügt. Nach vorsichtiger aber gründlicher Durchmischung der Proben folgte eine Inkubation bei 55 °C für 1 h. Zu Teilen aller Proben (je 10 μ L) wurde Restriktionslösung (15 μ L, 1x CutSmart-Puffer, 6,66 mM Magnesiumacetat, 0,33 U/ μ L R.ClaI) hinzugegeben und erneut 1 h bei 37 °C inkubiert. Daraufhin wurde Proteinase K (1 μ L, >0,6 U/ μ L) zu allen Proben zugegeben und für 30 min bei 53 °C inkubiert. Alle Proben wurden abschließend mit dem Gel-Ladepuffer 6xLB (5 μ L) versetzt und mittels Agarosegel-Elektrophorese analysiert (0,1 μ g DNA, 0,7 – 1 % Agarose, 0,5x TBE-Puffer, 90 V, 45 min).

Der restliche Teil der Markierungslösung (30 µL) wurde daraufhin mit Hilfe von Agarose-*Plugs* aufgereinigt. Die Lösungen wurden zunächst bei 45 °C mit einer Agaroselösung (30 µL, 2 %, *SeaPlaque*-Agarose, 1x TE-Puffer) versetzt, in vorgefertigte *Plug*-Formen der Firma Bio-Rad überführt und bei 4 °C für ca. 10-15 min gelagert. Anschließend wurden die ausgehärteten Agarose-*Plugs* zur Aufreinigung aus den Formen gedrückt und siebenmal für 10 min, jeweils in frischem TE-Puffer (1x, 50 mL), auf einem Schüttelinkubator gewaschen. Nach diesen Waschschritten wurden die *Plugs* in Mikroreaktionsgefäßen bei 75 °C aufgeschmolzen, mit β -Agarase (2 µL, 1 U/µL) versetzt und 1 h bei 43 °C inkubiert. Die Proben wurden daraufhin nochmals bei 65 °C für 20 min zur Inaktivierung der β -Agarase inkubiert. Die weitere Probenvorbereitung für die Analyse mittels Fluoreszenzmikroskopie erfolgte wie in Abschnitt 5.2.11.2 beschrieben.

5.5.2 DNA-Markierung von PCR- λ -DNA mit M.TaqI

Modifikationslösungen (20 µL) bestehend aus CutSmart-Puffer (1x), PCR- λ -DNA (50 ng/µL) und AdoYnTAMRA (**8**) oder AdoYnCF640R (**20**) (80 µM) wurden in Mikroreaktionsgefäßen angesetzt und gut durchmischt. Anschließend wurde die DNA-MTase M.TaqI (72 nM, 1,44 pmol, 1 Äq. bezogen auf 5'-TCGA-3'-Erkennungssequenzen) hinzugefügt. Außerdem wurde M.TaqI ebenfalls zu einer Kontrolllösung (20 µL, 50 ng/µL PCR- λ -DNA, 1x CutSmart-Puffer, 72 nM M.TaqI) hinzugegeben. Nach vorsichtiger aber gründlicher Durchmischung der Proben folgte eine Inkubation bei 37 °C über Nacht. Am darauffolgenden Tag wurden die Probe sowie die Kontrolllösung nach Herstellerangaben mit dem *QIAquick® PCR-Purification Kit* aufgereinigt und in 20 µL des mitgelieferten EB-Puffers eluiert. Zu Teilen aller Proben (je 10 µL) wurde Restriktionslösung (15 µL, 1x CutSmart-Puffer, 0,33 U/µL R.TaqI) hinzugegeben und 1 h bei 65 °C inkubiert. Daraufhin wurde Proteinase K (1 µL, >0,6 U/µL) zur Markierungslösung sowie zum Kontrollansatz zugegeben und für 30 min bei 53 °C inkubiert. Alle Proben wurden abschließend mit dem Gel-Ladepuffer 6xLB (5 µL) versetzt und mittels Agarosegel-Elektrophorese analysiert (0,1 µg DNA, 1 % Agarose, 0,5x TBE-Puffer, 90 V, 45 min). Der restliche Teil der Modifikationslösung (10 µL) wurde für die folgende Analyse mittels Fluoreszenzmikroskopie gemäß Abschnitt 5.2.11.2 aufbereitet.

5.5.3 DNA-Markierung von genomischer Human-DNA mit M.TaqI

Eine Markierungslösung (20 µL) bestehend aus CutSmart-Puffer (1x), genomischer Human-DNA (Brustzelllinie, 50 ng/µL), AdoYnTAMRA (8) (10 µM) und DNA-MTase M.TaqI (20 nM, 0,4 pmol, 0,1 Äq. bezogen auf 5'-TCGA-3'-Erkennungssequenzen in λ-DNA) wurde in einem Mikroreaktionsgefäß angesetzt und gut durchmischt. Außerdem wurde M.TaqI zu einer Kontrolllösung (10 µL, 50 ng/µL genomische Human-DNA, 1x CutSmart-Puffer, 20 nM M.TaqI) hinzugegeben und beide Proben für 1 h bei 65 °C inkubiert. Zu einem Teil der Proben (4 µL) wurde Restriktionslösung (6 µL, 1x CutSmart-Puffer, 0,33 U/µL R.TaqI) hinzugegeben und erneut 1 h bei 65 °C inkubiert. Daraufhin wurde Proteinase K (1 µL, >0,6 U/µL) zur Markierungslösung sowie zum Kontrollansatz zugegeben und für 30 min bei 53 °C inkubiert. Alle Proben wurden abschließend mit dem Gel-Ladepuffer 6xLB (2 µL) versetzt und mittels Agarosegel-Elektrophorese analysiert (0,1 µg DNA, 1 % Agarose, 0,5x TBE-Puffer, 90 V, 45 min).

Die restliche Markierungslösung (16 µL) wurde gemäß den Herstellerangaben mit dem *Oligo Clean & Concentrator*TM Kit von Zymo Research aufgereinigt. Von den erhaltenen 25 µL Probe wurden 10 µL für die folgende Quantifizierung des Fluoreszenzsignals mittels Fluoreszenzmikroskopie auf einem *Multi-sample-Array-Chip* zur Tel Aviv University nach Israel geschickt.

5.5.4 DNA-Markierung von genomischer Human-DNA mit EcoDam

Eine Markierungslösung (20 µL) bestehend aus EcoDam-Puffer (1x), genomischer Human-DNA (Brustzelllinie, 50 ng/µL), AdoYnTAMRA (8) (10 µM) und DNA-MTase EcoDam (2 µM, 40 pmol, 10 Äq. bezogen auf 5'-GATC-3'-Erkennungssequenzen in λ-DNA) wurde in einem Mikroreaktionsgefäß angesetzt und gut durchmischt. Außerdem wurde EcoDam zu einer Kontrolllösung (10 µL, 50 ng/µL genomische Human-DNA, 1x EcoDam-Puffer, 2 µM EcoDam) hinzugegeben und beide Proben für 2 h bei 37 °C inkubiert. Zu einem Teil der Proben (4 µL) wurde Restriktionslösung (6 µL, 1x Fermentas-Puffer R, 6,66 mM Magnesiumacetat, 0,33 U/µL R.MboI) hinzugegeben und erneut 1 h bei 37 °C inkubiert. Daraufhin wurde Proteinase K (1 µL, >0,6 U/µL) zur Markierungslösung sowie zum Kontrollansatz zugegeben und für 30 min bei 53 °C inkubiert. Alle Proben wurden abschließend mit dem Gel-Ladepuffer 6xLB (2 µL) versetzt und mittels Agarosegel-Elektrophorese analysiert (0,1 µg DNA, 1 % Agarose, 0,5x TBE-Puffer, 90 V, 45 min).

Die restliche Markierungslösung (16 µL) wurde gemäß den Herstellerangaben mit dem *Oligo Clean & Concentrator*TM Kit von Zymo Research aufgereinigt. Von den erhaltenen 25 µL Probe wurden 10 µL für die folgende Quantifizierung des Fluoreszenzsignals mittels Fluoreszenzmikroskopie auf einem *Multi-sample-Array-Chip* zur Tel Aviv University nach Israel geschickt.

5.6 Zweistufige DNA-Markierung zur DNA-Hydroxymethylierungdetektion

Eine Modifikationslösung (50 µL) bestehend aus CutSmart-Puffer (1x), PCR-λ-DNA (20 ng/µL), UDP-6-Azidoglucose (**10**) (80 µM) und β-GT (0,66 U/µL) wurde in einem Mikroreaktionsgefäß angesetzt, gut durchmischt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Für den zweiten Schritt zur Markierung wurde der Ansatz mit einem Überschuss an DBCO-PEG₄-5/6-TAMRA (**14**) (160 µM) versetzt und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Am darauffolgenden Tag erfolgte zur Entfernung noch freier Fluorophore sowie anderer Verunreinigungen eine Aufreinigung mit dem *QIAquick® PCR-Purification Kit* nach Anleitung des Herstellers (Elution in 50 µL). Die weitere Probenvorbereitung für die Analyse mittels Fluoreszenzmikroskopie erfolgte wie in Abschnitt 5.2.11.2 beschrieben.

5.7 Orthogonale DNA-Modifikation

Eine Modifikationslösung (50 µL) bestehend aus CutSmart-Puffer (1x), PCR-λ-DNA (20 ng/µL), AdoYnCF640R (**20**) (40 µM), UDP-6-Azidoglucose (**10**) (40 µM), M.TaqI (30 nM, 1,44 pmol, 1 Äq. bezogen auf 5'-TCGA-3'-Erkennungssequenzen) und β-GT (0,66 U/µL) wurde in einem Mikroreaktionsgefäß angesetzt, gut durchmischt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Für den zweiten Schritt der 5hmC-Markierung wurde der Ansatz mit einem Überschuss an DBCO-PEG₄-5/6-TAMRA (**14**) (80 µM) versetzt und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Am darauffolgenden Tag erfolgte zur Entfernung noch freier Fluorophore sowie anderer Verunreinigungen eine Aufreinigung mit dem *QIAquick® PCR-Purification Kit* nach Anleitung des Herstellers (Elution in 50 µL). Die weitere Probenvorbereitung für die Analyse mittels Fluoreszenzmikroskopie erfolgte wie in Abschnitt 5.2.11.2 beschrieben.

6. Literaturverzeichnis

- [1] O. T. Avery, C. M. MacLeod, M. McCarty, *J. Exp. Med.* **1944**, 79, 137.
- [2] R. R. Sinden (Ed.), *DNA Structure and Function*, Academic Press, San Diego, Kalifornien, USA **1994**.
- [3] W. Saenger (Ed.), *Principles of Nucleic Acid Structure*, Springer-Verlag, New York **1984**.
- [4] J. M. Berg, A. Held, L. Stryer, C. Lange, K. Mahlke, G. Maxam, L. Seidler, N. Zellerhoff, B. Häcker, B. Jarosch (Eds.), *Stryer Biochemie*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg **2007**.
- [5] G. M. Blackburn, M. G. Gait (Eds.), *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*, RSC Press **2006**.
- [6] F. H. C. Crick, J. D. Watson, *Proc. R. Soc. London, Sev. A* **1954**, 223, 80.
- [7] J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature* **1953**, 171, 737.
- [8] R. Rudner, J. D. Karkas, E. Chargaff, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1968**, 60, 921.
- [9] E. Chargaff, R. Lipshitz, C. Green, *J. Biol. Chem.* **1952**, 195, 155.
- [10] J. E. Krebs, E. S. Goldstein, S. T. Kilpatrick (Eds.), *Lewin's Genes X*, Jones and Bartlett Publishers, Massachusetts **2009**.
- [11] Z. Shakked, D. Rabinovich, W. B. T. Cruse, E. Egert, O. Kennard, G. Sala, S. A. Salisbury, M. A. Viswamitra, *Proc. R. Soc. London, Sev. A* **1981**, 213, 479.
- [12] H. R. Drew, R. M. Wing, T. Takano, C. Broka, S. Tanaka, R. E. Itakura, R. E. Dickerson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, 78, 2179.
- [13] A. H. J. Wang, G. J. Quigley, F. J. Kolpak, J. L. Crawford, J. H. van Boom, G. van der Marel, A. Rich, *Nature* **1979**, 282, 680.
- [14] R. Dickerson, H. Drew, B. Conner, R. Wing, A. Fratini, M. Kopka, *Science* **1982**, 216, 475.
- [15] B. N. Conner, C. Yoon, J. L. Dickerson, R. E. Dickerson, *J. Mol. Biol.* **1984**, 174, 663.
- [16] A. Cerreta, *Dissertation (EPFL), Schweiz: Frequency Modulation Atomic Force Microscopy on Biomolecules* **2013**.
- [17] T. M. Jovin, D. M. Soumpasis, *Ann. Rev. Phys. Chem.* **1987**, 38, 521.
- [18] F. H. C. Crick, L. Barnett, S. Brenner, R. J. Watts-Tobin, *Nature* **1961**, 192, 1227.
- [19] I. Ahmad, D. N. Rao, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1996**, 31, 361.
- [20] S. Kumar, X. Cheng, S. Klimasauskas, S. Mi, J. Posfai, R. J. Roberts, G. G. Wilson, *Nucleic Acids Res.* **1994**, 22, 1.

- [21] S. Klimasauskas, E. Weinhold, *Trends Biotechnol.* **2007**, 25, 99.
- [22] R. J. Roberts, T. Vincze, J. Posfai, D. Macelis, *Nucleic Acids Res.* **2005**, 33, D230-D232.
- [23] X. Cheng, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1995**, 24, 293.
- [24] H. Pues, N. Bleimling, B. Holz, J. Wölcke, E. Weinhold, *Biochemistry* **1999**, 38, 1426.
- [25] D. Ratel, J.-L. Ravanat, F. Berger, D. Wion, *BioEssays* **2006**, 28, 309.
- [26] D. Wion, J. Casadesús, *Nat. Rev. Microbiol.* **2006**, 4, 183.
- [27] T. Barbeyron, K. Kean, P. Forterre, *J. Bacteriol. Res.* **1984**, 160, 586.
- [28] D. Summerer, *Angew. Chem.* **2015**, 127, 10862.
- [29] E. S. Gromova, A. V. Khoroshaev, *Mol. Biol.* **2003**, 37, 260.
- [30] G. G. Wilson, N. E. Murray, *Annu. Rev. Genet.* **1991**, 25, 585.
- [31] M. Reuter, D. H. Krüger, D. Scholz, H. A. Rosenthal, *Allg. Mikrobiol.* **1980**, 20, 345.
- [32] H. O. Smith, D. Nathans, *J. Mol. Biol.* **1973**, 81, 419.
- [33] T. Naito, K. Kusano, I. Kobayashi, *Science* **1995**, 267, 897.
- [34] J. P. Jost, A. P. Saluz (Eds.), *DNA-Methylation: Molecular Biology and Significance*, Birkhauser Verlag, Basel **1993**.
- [35] X. Cheng, R. J. Roberts, *Nucleic Acids Res.* **2001**, 29, 3784.
- [36] S. Klimasauskas, S. Kumar, R. J. Roberts, X. Cheng, *Cell* **1994**, 76, 357.
- [37] S. Klimasauskas, T. Szyperski, S. Serva, K. Wüthrich, *EMBO Journal* **1998**, 17, 317.
- [38] R. J. Roberts, X. Cheng, *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, 67, 181.
- [39] J. R. Horton, K. Liebert, M. Bekes, A. Jeltsch, X. Cheng, *J. Mol. Biol.* **2006**, 358, 559.
- [40] J. Deen, C. Vranken, V. Leen, R. K. Neely, K. P. F. Janssen, J. Hofkens, *Angew. Chem.* **2017**, 56, 5182.
- [41] C. Schmutte, P. A. Jones, *Biol. Chem.* **1998**, 379, 389.
- [42] J. Labahn, J. Granzin, G. Schluckebier, D. P. Robinson, W. E. Jack, I. Schildkraut, W. Saenger, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1994**, 91, 10957.
- [43] F. Barany, B. Slatko, M. Danzitz, D. Cowburn, I. Schildkraut, G. G. Wilson, *Gene* **1992**, 112, 91.
- [44] A. Athanasiadis, Y. Papanikolau, M. Rina, M. Papadovasilaki, Z. Dauter, K. Petratos, V. Bouriotis, M. Kokkinidis, *Acta. Cryst., Sect. D: Struct. Biol.* **1997**, 53, 477.
- [45] M. Rina, V. Bouriotis, *Gene* **1993**, 133, 91.
- [46] W. Choe, S. Chandrasegaran, M. Ostermeier, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, 334, 1233.
- [47] X. Cheng, S. Kumar, J. Posfai, J. W. Pflugrath, R. J. Roberts, *Cell* **1993**, 74, 299.
- [48] S. Kumar, X. Cheng, J. W. Pflugrath, R. J. Roberts, *Biochemistry* **1992**, 31, 8648.

- [49] M. Wojciechowski, H. Czapinska, Bochtler, *PNAS USA* **2013**, *110*, 105.
- [50] P. Albert, B. Varga, N. Zsibrita, A. Kiss, *PloS one* **2018**, *13*, e0197232.
- [51] P. Renbaum, D. Abrahamove, A. Fainsod, G. G. Wilson, S. Rottem, A. Razin, *Nucleic Acids Res.* **1990**, *18*, 1145.
- [52] T. H. Bestor, *Hum. Mol. Genet.* **2000**, *9*, 2395.
- [53] M. Okano, D. W. Bell, D. A. Haber, E. Li, *Cell* **1999**, *99*, 247.
- [54] F. Shafiei, F. Rahnama, L. Pawella, M. D. Mitchell, P. D. Gluckman, P. E. Lobie, *Oncogene* **2008**, *27*, 2602.
- [55] A. D. Goldberg, C. D. Allis, E. Bernstein, *Cell* **2007**, *128*, 635.
- [56] R. Jaenisch, A. Bird, *Nat. Genet.* **2003**, *33*, 245.
- [57] Moore, L., D., T. Le, G. Fan, *Neuropsychopharmacology* **2013**, *38*, 23.
- [58] G. D. Markham, E. W. Hafner, C. W. Tabor, H. Tabor, *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 9082.
- [59] G. L. Cantoni, *J. Biol. Chem.* **1953**, *204*, 403.
- [60] F. Schlenk, R. E. DePalma, *J. Biol. Chem.* **1957**, *229*, 1037.
- [61] S. C. Lu, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2000**, *32*, 391.
- [62] Y. Gruenbaum, R. Stein, H. Cedar, A. Razin, *FEBS Lett.* **1981**, *124*, 67.
- [63] W. Doerfler, *Angew. Chem.* **1984**, *96*, 917.
- [64] S. Kumar, V. Chinnusamy, T. Mohapatra, *Front. Genet.* **2018**, *9*, 640.
- [65] R. D. Hotchkiss, *J. Biol. Chem.* **1948**, *175*, 315.
- [66] S. K. T. Ooi, T. H. Bestor, *Cell* **2008**, *133*, 1145.
- [67] K. D. Robertson, *Nat. Rev. Genet.* **2005**, *6*, 597.
- [68] A. P. Feinberg, R. Ohlsson, S. Henikoff, *Nat. Rev. Genet.* **2006**, *7*, 21.
- [69] P. A. Jones, S. B. Baylin, *Nature Rev. Genet.* **2002**, *3*, 415.
- [70] S. Schiesser, B. Hackner, T. Pfaffeneder, M. Müller, C. Hagemeyer, M. Truss, T. Carell, *Angew. Chem.* **2012**, *51*, 6516.
- [71] S. Kriaucionis, N. Heintz, *Science* **2009**, *324*, 929.
- [72] M. Tahiliani, K. P. Koh, Y. Schen, W. A. Pastor, Y. Bandukwala, Y. Brudno, S. Agarwal, L. M. Iyer, D. R. Liu, L. Aravind, A. Rao, *Science* **2009**, *324*, 930.
- [73] P. W. S. Hill, R. Amouroux, P. Hajkova, *Genomics* **2014**, *104*, 324.
- [74] Y. F. He, B. Z. Li, P. Liu, Y. Wang, Q. Tang, J. Ding, Y. Jia, Z. Chen, L. Li, Y. Sun, Li, X. Dai, Q., C. X. Song, K. Zhang, C. He, G. L. Xu, *Science* **2011**, *333*, 1303.
- [75] S. Ito, L. Shen, Q. Dai, S. C. Wu, L. B. Collins, J. A. Swnberg, C. He, Y. Zhang, *Science* **2011**, *333*, 1300.

- [76] K. Iwan, R. Rahimoff, A. Kirchner, F. Spada, A. S. Schröder, O. Kosmatchev, S. Ferizaj, J. Steinbacher, E. Parsa, M. Müller, T. Carell, *Nat. Chem. Biol.* **2018**, *14*, 72.
- [77] C. Popp, Dean, W., Feng, S., S. J. Cokus, S. Andrews, M. Pellegrini, S. E. Jacobsen, W. Reik, *Nature* **2010**, *463*, 1101.
- [78] S. Cortellino, J. Xu, M. Sannai, R. Moore, E. Caretti, A. Cigliano, M. Le Coz, K. Devarajan, A. Wessels, D. Soprano, L. K. Abramowitz, M. S. Bartolomei, F. Rambow, M. R. Bassi, T. Bruno, M. Fanciulli, C. Renner, A. J. Klein-Szanto, Y. Matsumoto, D. Kobi, I. Davidson, C. Alberti, L. Larue, A. Bellacosa, *Cell* **2011**, *146*, 67.
- [79] K. A. Haushalter, M. W. T. Stukenberg, M. W. Kirschner, G. L. Verdine, *Curr. Biol.* **1999**, *9*.
- [80] M. Bochtler, A. Kolano, G.-L. Xu, *Bioassays* **2016**, *39*, 1.
- [81] G. Nifker, M. Levy-Sakin, Y. Berkov-Zrihen, T. Shahal, Gabrieli, T. Fridman, M., Y. Ebenstein, *ChemBioChem* **2015**, *16*, 1857.
- [82] M. R. Branco, G. Ficiz, W. Reik, *Nat. Rev. Genet.* **2012**, *13*, 7.
- [83] N. W. Penn, R. Suwalski, C. O'Riley, K. Bojanowski, R. Yura, *Biochem. J.* **1972**, *126*.
- [84] D. Globisch, M. Münzel, M. Müller, S. Michalakakis, M. Wagner, S. Koch, T. Brückl, M. Biel, T. Carell, *PloS one* **2010**, *5*, e15367.
- [85] S. Ito, A. C. D'Alessio, O. V. Taranova, K. Hong, L. C. Sowers, Y. Zhang, *Nature* **2010**, *466*, 1129.
- [86] M. Ko, Y. Huang, A. M. Jankowska, U. J. Pape, M. Tahiliani, H. S. Bandukwala, J. An, E. D. Lamperti, K. P. Koh, R. Ganetzky, X. S. Liu, L. Aravind, S. Agarwal, J. P. Maciejewski, A. Rao, *Nature* **2010**, *468*, 839.
- [87] M. C. Haffner, A. Chaux, A. K. Meeker, D. M. Esopi, J. Gerber, L. G. Pellakuru, A. Toubaji, P. Argani, C. Iacobuzio-Donahue, W. G. Nelson, G. J. Netto, A. M. de Marzo, S. Yegnasubramanian, *Oncotarget* **2011**, *2*, 627.
- [88] S.-G. Jin, Y. Jiang, R. Qiu, T. A. Rauch, Y. Wang, G. Schackert, D. Krex, Q. Lu, G. P. Pfeifer, *Cancer Res.* **2011**, *71*, 7360.
- [89] S. M. Kinney, H. G. Chin, R. Vaisvila, J. Bitinaite, Y. Zheng, P.-O. Estève, S. Feng, H. Stroud, S. E. Jacobsen, S. Pradhan, *J. Biol. Chem* **2011**, *286*, 24685.
- [90] V. K. C. Ponnaluri, K. C. Ehrlich, G. Zhang, M. Lacey, D. Johnston, S. Pradhan, M. Ehrlich, *Epigenetics* **2017**, *12*, 123.
- [91] D.-Q. Shi, I. Ali, J. Tang, W.-C. Yang, *Frontiers in genetics* **2017**, *8*, 100.

- [92] K. E. Szulwach, X. Li, Y. Li, C.-X. Song, H. Wu, Q. Dai, H. Irier, A. K. Upadhyay, M. Gearing, A. I. Levey, A. Vasanthakumar, L. A. Godley, Q. Chang, X. Cheng, C. He, P. Jin, *Nat. Neurosci.* **2011**, *14*, 1607.
- [93] S. E. B. Taylor, Y. H. Li, P. Smeriglio, M. Rath, W. H. Wong, N. Bhutani, *J. Bone Miner. Res.* **2016**, *31*, 524.
- [94] M. A. Hahn, R. Qiu, X. Wu, A. X. Li, H. Zhang, J. Wang, J. Jui, S.-G. Jin, Y. Jiang, G. P. Pfeifer, Q. Lu, *Cell Rep.* **2013**, *3*, 291.
- [95] C.-X. Song, J. Diao, A. T. Brunger, S. R. Quake, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2016**, *113*, 4338.
- [96] W. Li, M. Liu, *J. Nucleic Acids* **2011**, *2011*, 1.
- [97] S. Margalit, S. Avraham, T. Shahal, Y. Michaeli, N. Gilat, P. Magod, M. Caspi, S. Loewenstein, G. Lahat, D. Friedmann-Morvinski, R. Kariv, R. Rosin-Arbesfeld, S. Zirkin, Y. Ebenstein, *Int. J. Cancer* **2020**, *146*, 115.
- [98] M. Bachman, S. Uribe-Lewis, X. Yang, M. Williams, A. Murrell, S. Balasubramanian, *Nat. Chem.* **2014**, *6*, 1049.
- [99] N. Gilat, T. Tabachnik, A. Shwartz, T. Shahal, D. Torchinsky, Y. Michaeli, G. Nifker, S. Zirkin, Y. Ebenstein, *Clin. Epigenet.* **2017**, *9*, 70.
- [100] S. Li, L. A. Papale, Q. Zhang, A. Madrid, L. Chen, P. Chopra, S. Keleş, P. Jin, R. S. Alisch, *Neurobiol. Dis.* **2016**, *86*, 99.
- [101] F. Wang, Y. Yang, X. Lin, J.-Q. Wang, Y.-S. Wu, W. Xie, D. Wang, S. Zhu, Y.-Q. Liao, Q. Sun, Y.-G. Yang, H.-R. Luo, C. Guo, C. Han, T.-S. Tang, *Hum. Mol. Genet.* **2013**, *22*, 3641.
- [102] S. I. Sherwani, H. A. Khan, *Gene* **2015**, *570*, 17.
- [103] A. Madrid, L. A. Papale, R. S. Alisch, *Epigenomics* **2016**, *8*, 981.
- [104] P. W. Laird, *Hum. Mol. Genet.* **2005**, *14*, 65-76.
- [105] A. Fadda, D. Gentilini, L. Moi, L. Barault, V. P. Leoni, P. Sulas, L. Zorcolo, A. Restivo, F. Cabras, F. Fortunato, C. Zavattari, L. Varesco, V. Gismondi, M. R. de Miglio, A. M. Scanu, F. Colombi, P. Lombardi, I. Sarotto, E. Loi, F. Leone, S. Giordano, F. Di Nicolantonio, A. Columbano, P. Zavattari, *Int. J. Cancer* **2018**, *143*, 907.
- [106] M. Tong, S. Gao, W. Qi, C. Shi, M. Qiu, F. Yang, S. Bai, H. Li, Z. Wang, Z. Sun, L. Wang, Y. Che, *Oncol. Lett.* **2019**, *18*, 2304.
- [107] G. P. Pfeifer, W. Xiong, M. A. Hahn, S.-G. Jin, *Cell Tissue Res.* **2014**, *356*, 631.
- [108] A. Portela, M. Esteller, *Nat. Biotechnol.* **2010**, *28*, 1057.
- [109] B. K. Dunn, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2003**, *983*, 28.

- [110] A. Jeltsch, *ChemBioChem* **2002**, 3, 274.
- [111] G. Vilkaitis, E. Merkiene, S. Serva, E. Weinhold, S. Klimasauskas, *J. Biol. Chem* **2001**, 276, 20924.
- [112] J. C. Wu, D. V. Santi, *J. Biol. Chem.* **1987**, 262, 4778.
- [113] C. Dalhoff, G. Lukinavicius, S. Klimasauskas, E. Weinhold, *Nat. Chem. Biol.* **2006**, 2, 31.
- [114] G. Lukinavicius, V. Lapiene, Z. Stasevskij, C. Dalhoff, E. Weinhold, S. Klimasauskas, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 2758.
- [115] G. Lukinavičius, M. Tomkuvienė, V. Masevičius, S. Klimasauskas, *ACS Chem. Biol.* **2013**, 8, 1134.
- [116] G. M. Hanz, B. Jung, A. Giesbertz, M. Juhasz, E. Weinhold, *JoVE* **2014**, 93, e52014.
- [117] A. Gottfried, E. Weinhold, *Biochem. Soc. Trans.* **2011**, 39, 623.
- [118] F. Schlenk, J. L. Dainko, *Biochim. Biophys. Acta* **1975**, 385, 312.
- [119] J. M. Holstein, D. Stummer, A. Rentmeister, *Chem. Sci.* **2015**, 6, 1362.
- [120] M. Tomkuvienė, M. Mickutė, G. Vilkaitis, S. Klimasauskas, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2019**, 55, 114.
- [121] 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.
- [122] F. Muttach, N. Mulhmann, D. Reichert, L. Anhäuser, A. Rentmeister, *Chem. Sci.* **2017**, 8, 7947.
- [123] 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.
- [124] J. Deen, S. Wang, S. van Snick, V. Leen, K. Janssen, J. Hofkens, R. K. Neely, *Nucleic Acids Res.* **2018**, 46, e64.
- [125] N. O. Wand, D. A. Smith, A. A. Wilkinson, A. E. Rushton, Busby, S. J. W., I. B. Styles, R. K. Neely, *Nucleic Acids Res.* **2019**, 47, 68.
- [126] T. Gilboa, C. Torfstein, M. Juhasz, A. Grunwald, Y. Ebenstein, E. Weinhold, A. Meller, *ACS nano* **2016**, 10, 8861.
- [127] R. K. Neely, J. Deen, J. Hofkens, *Biopolymers* **2011**, 95, 298.
- [128] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 2004.
- [129] R. Huisgen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1963**, 2, 565.
- [130] S. I. Presolski, V. P. Hong, M. G. Finn, *Curr. Protoc. Chem. Biol.* **2011**, 3, 153.
- [131] N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 15046.
- [132] G. Wittig, A. Krebs **1961**, 94, 3260.

- [133] R. Turner, A. D. Jarrett, P. Goebel, B. J. Mallon, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *95*, 790.
- [134] K. Shea, J. S. Kim, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 4846.
- [135] X. Ning, J. Guo, M. A. Wolfert, G.-J. Boons, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 2285.
- [136] C.-X. Song, K. E. Szulwach, Y. Fu, Q. Dai, C. Yi, X. Li, Y. Li, C.-H. Chen, W. Zhang, X. Jian, J. Wang, L. Zhang, T. J. Looney, B. Zhang, L. A. Godley, L. M. Hicks, B. T. Lahn, P. Jin, C. He, *Nat. Biotechnol.* **2011**, *29*, 68.
- [137] M. R. Karver, R. Weissleder, S. A. Hilderbrand, *Angew. Chem.* **2012**, *51*, 920.
- [138] M. L. Blackman, M. Royzen, J. M. Fox, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13518.
- [139] N. K. Devaraj, R. Weissleder, S. A. Hilderbrand, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 2297.
- [140] B. L. Oliveira, Z. Guo, G. J. L. Bernardes, *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 4895.
- [141] H.-S. Han, N. K. Devaraj, J. Lee, S. A. Hilderbrand, R. Weissleder, M. G. Bawendi, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 7838.
- [142] S. Mayer, K. Lang, *Synthesis* **2017**, *49*, 830.
- [143] E. Kozma, O. Demeter, P. Kele, *ChemBioChem* **2017**, *18*, 486.
- [144] M. Best, A. Degen, M. Baalman, T. T. Schmidt, R. Wombacher, *ChemBioChem* **2015**, *16*, 1158.
- [145] P. A. Jones, S. B. Baylin, *Cell* **2007**, *128*, 683.
- [146] J. M. Sidorova, N. Li, D. C. Schwartz, A. Folch, R. J. Monnat, *Nat. Protoc.* **2009**, *4*, 849.
- [147] K. Alder, O. Diels, *Justus Liebig Ann. Chem.* **1928**, *460*, 98.
- [148] J. Liu, C. Uhler, P. K. Shah, F. Sun, J. W. Stansbury, *RSC advances* **2016**, *6*, 64791.
- [149] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057.
- [150] V. V. Rostovtsev, D. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *41*, 2596.
- [151] L. Schütz, *Masterarbeit RWTH Aachen University* **2019**.
- [152] R. J. Roberts, D. Macelis, *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 248.
- [153] H.-M. Eun (Ed.), *Enzymology Primer for Recombinant DNA Technology*, Academic Press, San Diego **1996**.
- [154] M. McClelland, *Nucleic Acids Res.* **1981**, *9*, 6795.
- [155] S. Sato, C. A. Hutchinson, J. I. Harris, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1977**, *74*, 542.
- [156] M. Martin, *Dissertation RWTH Aachen University* **2013**.
- [157] K. Goedecke, M. Pignot, R. S. Goody, A. J. Scheidig, E. Weinhold, *Nat. Struct. Biol.* **2001**, *8*, 121.
- [158] H. Mayer, R. Grosschedl, H. Schütte, G. Hobom, *Nucleic Acids Res.* **1981**, *9*, 4833.

- [159] A. J. Dankers, *Dissertation RWTH Aachen University* **2019**.
- [160] D. Lang, *J. Mol. Biol.* **1970**, *54*, 557.
- [161] 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.
- [162] B. Kundukad, J. Yan, P. S. Doyle, *Soft matter* **2014**, *10*, 9721.
- [163] J. Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, J.-Y. Tinevez, et al., *Nat. Methods* **2012**, *9*, 676.
- [164] C. A. Schneider, W. S. Rasband, C. A. Schneider, W. S. Rasband, K. W. Eliceiri, *Nat. Methods* **2012**, *9*, 671.
- [165] F. Schilcher, *Dissertation RWTH Aachen University* **2021**.
- [166] T. Shahal, N. Gilat, Y. Michaeli, O. Redy-Keisar, D. Shabat, Y. Ebenstein, *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 8231.
- [167] S. Margalit, S. Avraham, T. Shahal, Y. Michaeli, N. Gilat, P. Magod, M. Caspi, S. Loewenstein, G. Lahat, D. Friedmann-Morvinski, R. Kariv, R. Rosin-Arbesfeld, S. Zirkin, Y. Ebenstein, *Int. J. Cancer* **2020**, *146*, 115.
- [168] M. Jiang, I. Popa, P. Maroni, M. Borkovec, *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp* **2010**, *360*, 20.
- [169] M. McClelland, M. Nelson, *Gene* **1988**, *74*, 169.
- [170] M. J. Ziller, H. Gu, F. Müller, J. Donaghey, L. T.-Y. Tsai, O. Kohlbacher, P. L. de Jager, E. D. Rosen, D. A. Bennett, B. E. Bernstein, A. Gnirke, A. Meissner, *Nature* **2013**, *500*, 477.
- [171] C. Beuck, *Dissertation RWTH Aachen University* **2004**.
- [172] I. Villar-Menéndez, M. Blanch, S. Tyebji, T. Pereira-Veiga, J. L. Albasanz, M. Martín, I. Ferrer, E. Pérez-Navarro, M. Barrachina, *Neuromolecular Med.* **2013**, *15*, 295.
- [173] T. Davis, R. Vaisvila, *JoVE* **2011**, *48*, 1.
- [174] R. Selvaraj, J. M. Fox, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17*, 753.
- [175] UCSC Genome Browser Home. <https://genome.ucsc.edu/>. **Stand 2021**.
- [176] S. Gurrieri, K. S. Wells, I. D. Johnson, C. Bustamante, *Anal. Biochem.* **1997**, *249*, 44.

Anhang

A Zusätzliche Ergebnisse

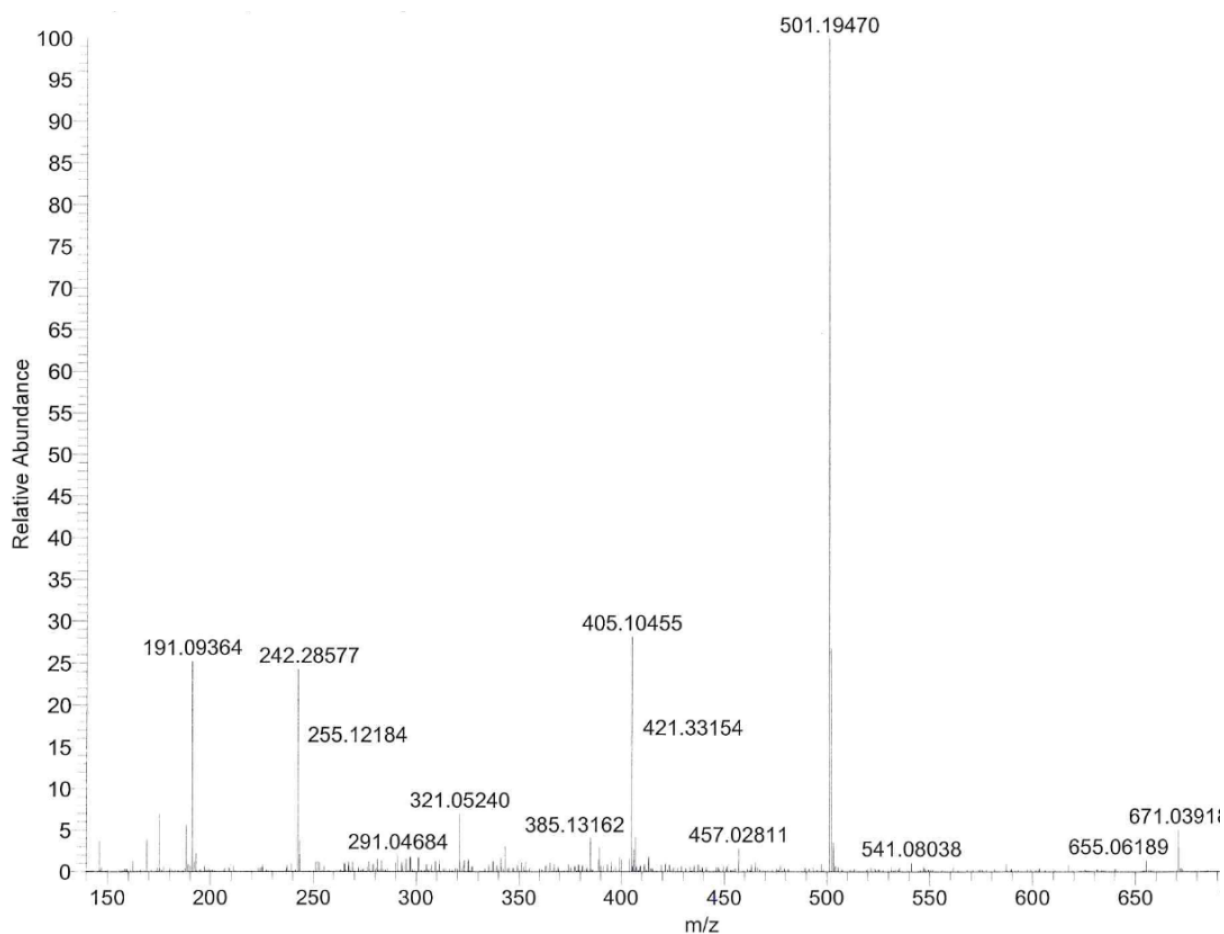


Abbildung A1: ESI-Massenspektrum von AdoVB (6).

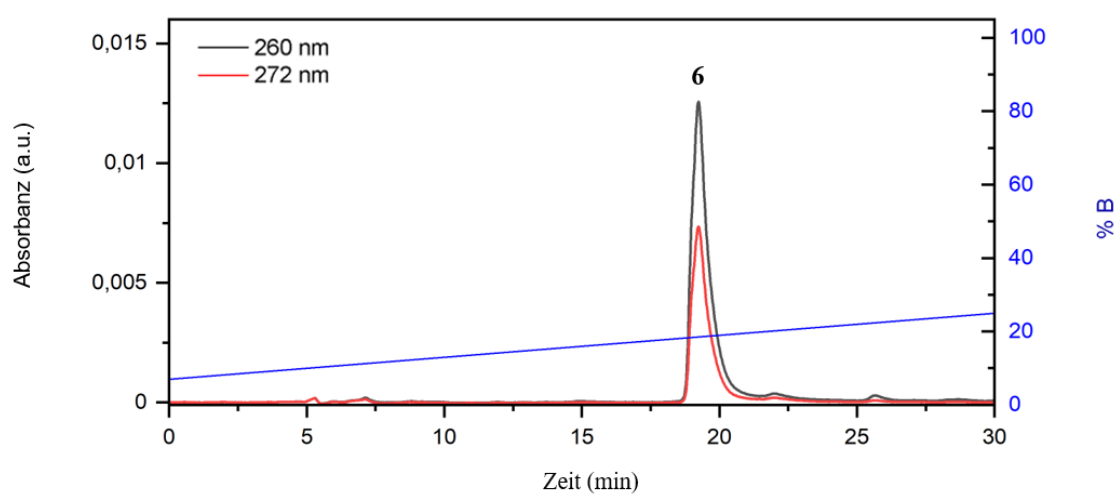


Abbildung A2: HPLC-Analyse der Einzelinjektion für das reaktive AdoMet-Analogon AdoVB (6) nach Aufreinigung und Einengen durch Gefriertrocknung. Ca. 2 % Thioether sind entstanden.

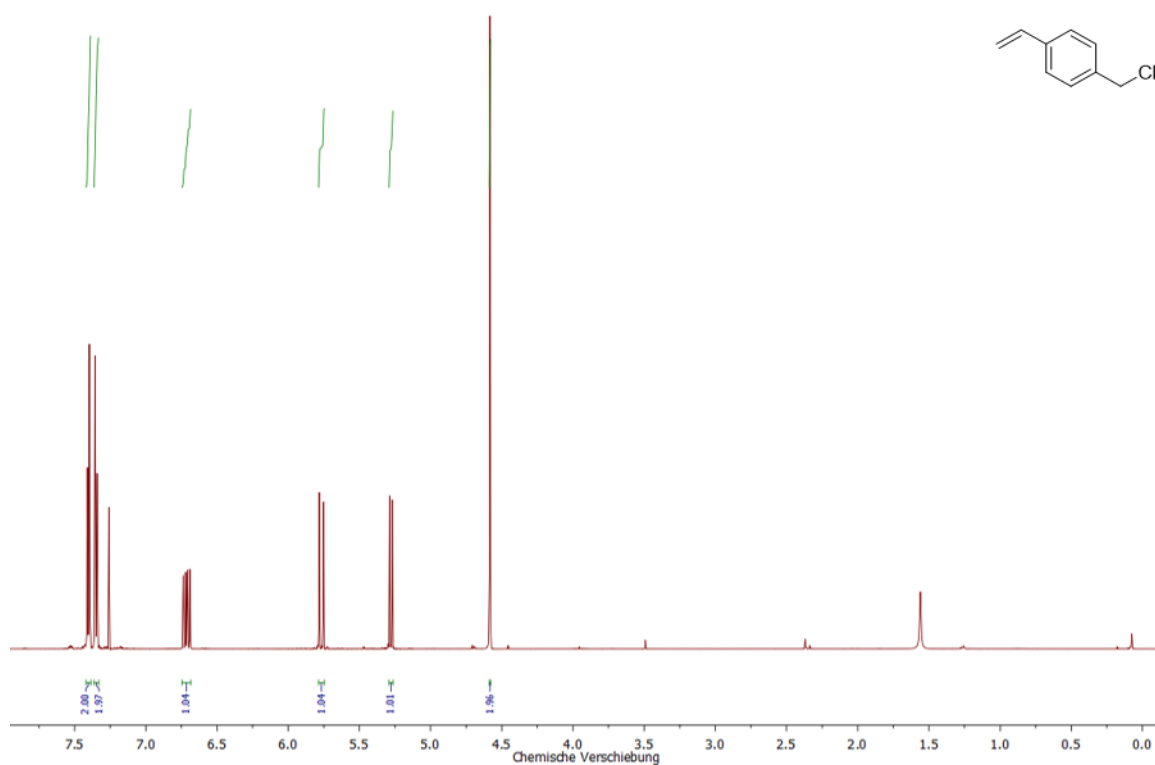


Abbildung A3: 300 MHz ¹H-NMR-Spektrum von 1-(Chlormethyl)-4-vinylbenzol (**15**) in deuteriertem Chloroform.

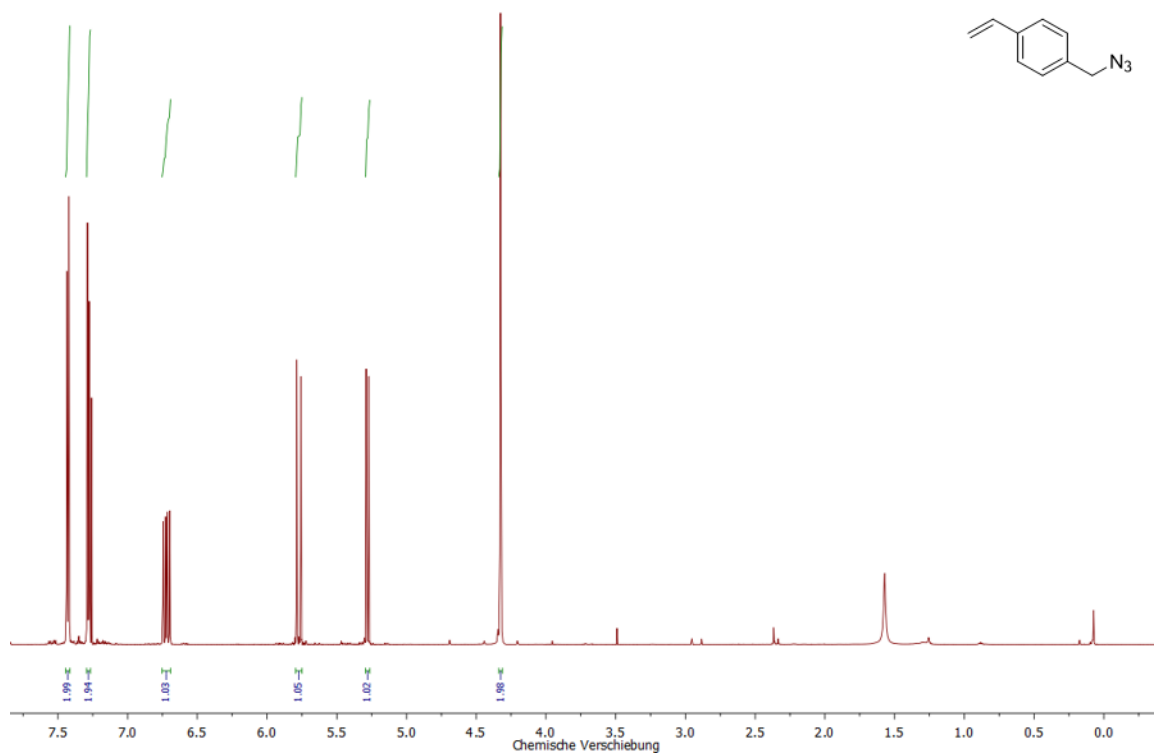


Abbildung A4: 300 MHz ^1H -NMR-Spektrum von 1-(Azidomethyl)-4-vinylbenzol (**18**) in deuteriertem Chloroform.

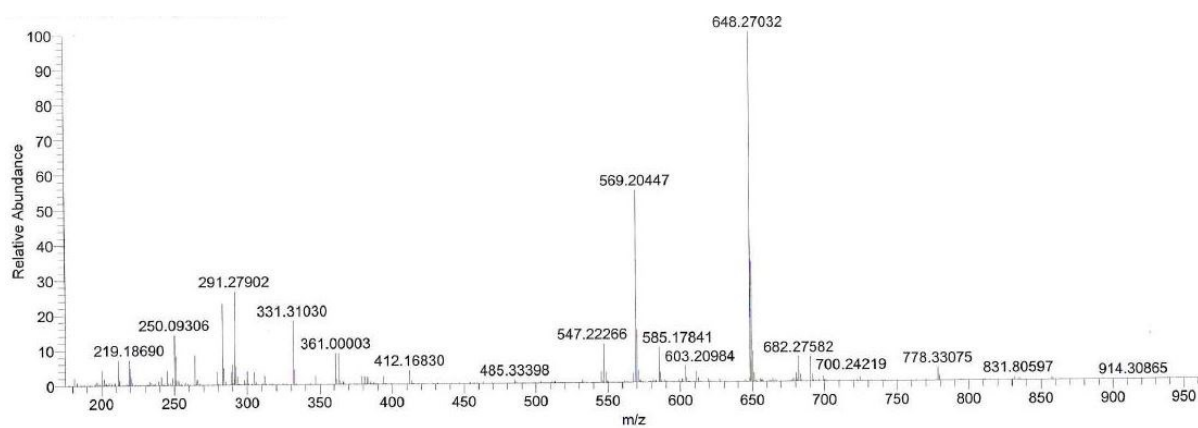


Abbildung A5: ESI-Massenspektrum von AdoYnVB (kurz) (**16**).

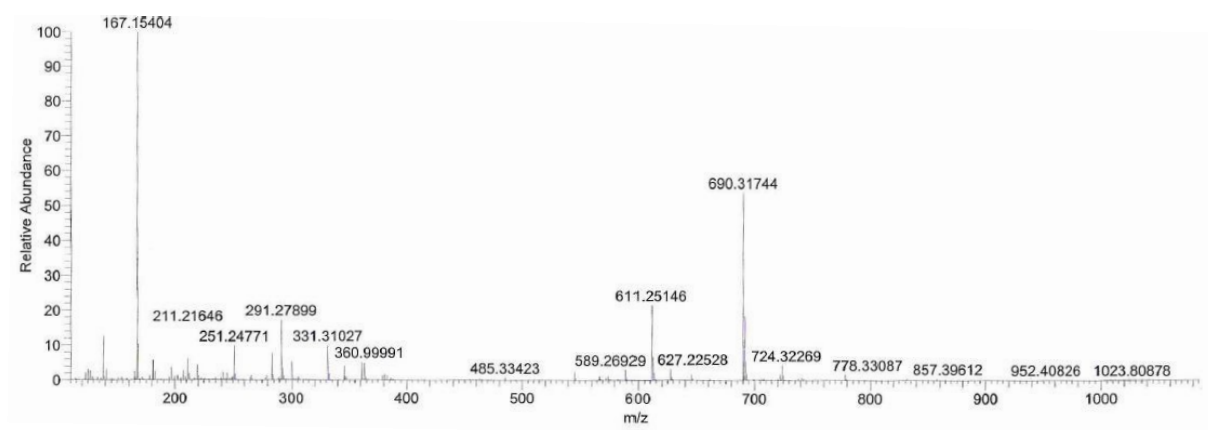


Abbildung A6: ESI-Massenspektrum von AdoYnVB (lang) (**17**).

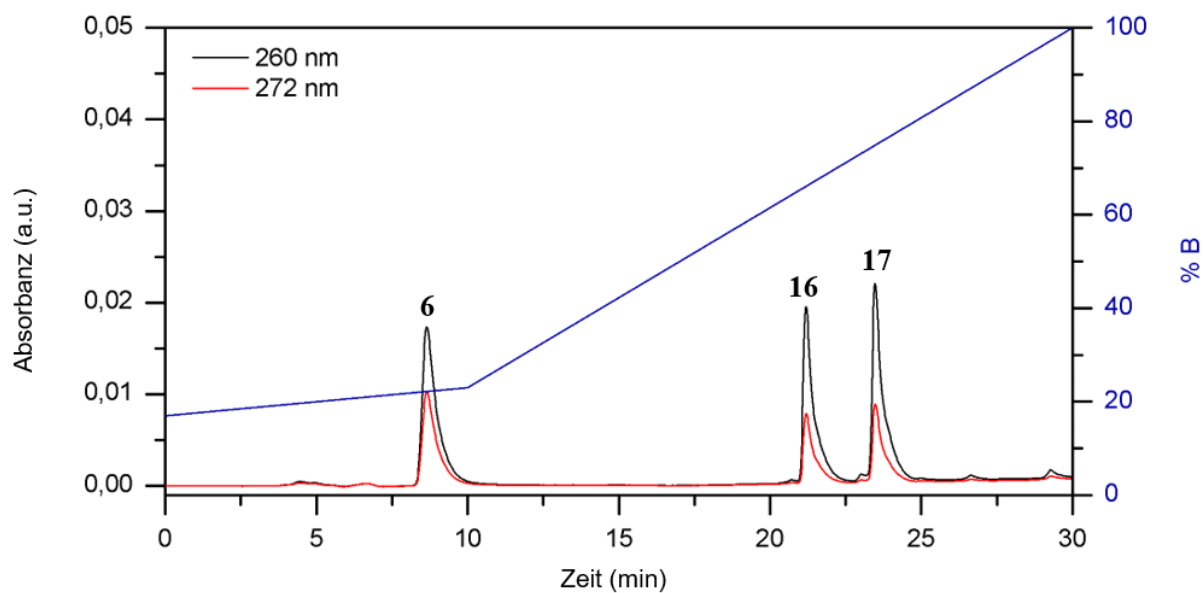


Abbildung A7: HPLC-Analyse der Coinjektion (je 2 nmol) für die AdoMet-Analoga AdoVB (**6**), AdoYnVB (kurz) (**16**) und AdoYnVB (lang) (**17**).

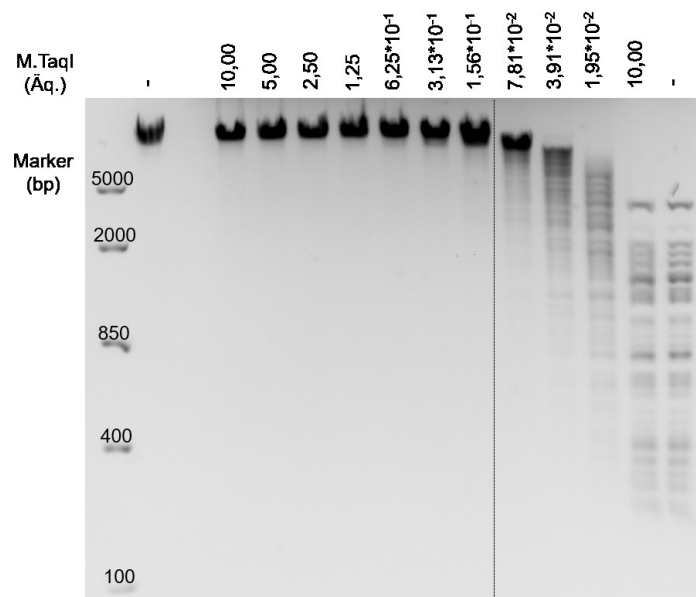


Abbildung A8: Gelelektrophoretische Analyse der Aktivitätstests von M.TaqI mit AdoYnTAMRA (8). Die Konzentrationen der λ -DNA sowie des Cofaktoranalogs (80 μ M) sind in jeder Spur konstant, die Konzentration der M.TaqI halbiert sich in jeder Spur ausgehend von 37,8 μ M (10 Äq.). Verdaut wurde mit R.TaqI (10 U). Erste Spur: DNA-Marker (MR); zweite Spur: λ -Referenzbande (100 ng) unverdaut ohne Cofaktor und MTase; Spur 13: Kontrolle mit 10 Äq. M.TaqI, ohne Cofaktoranalogen; Spur 14: Kontrolle ohne DNA-MTase mit Cofaktoranalogen. Die gestrichelte Linie zeigt die Grenze der noch vollständig modifizierten λ -DNA an. AdoYnTAMRA (8) weist eine TON = 6,4 h⁻¹ auf.

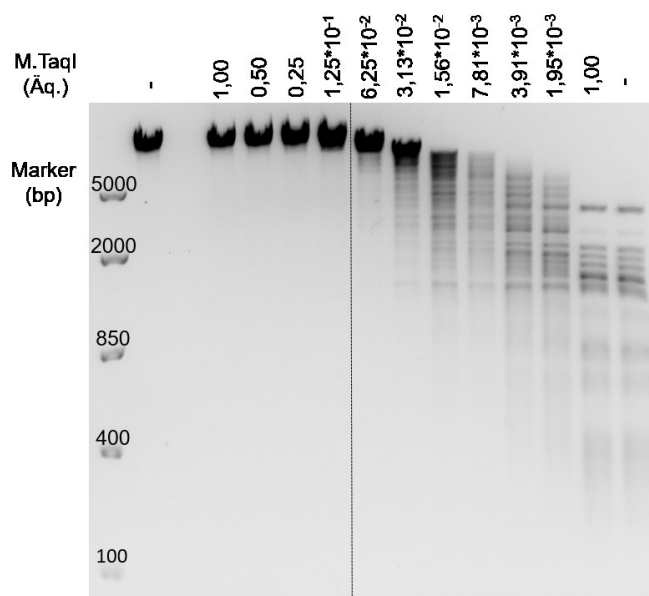


Abbildung A9: Gelelektrophoretische Analyse des Aktivitätstests von M.TaqI mit AdoYnCF640R (**20**). Die Konzentrationen der λ-DNA sowie des Cofaktoranalogs (80 μM) sind in jeder Spur konstant, die Konzentration der M.TaqI halbiert sich in jeder Spur ausgehend von 0,19 μM (1 Äq.). Verdaut wurde mit R.TaqI (10 U/μg DNA). Erste Spur: DNA-Marker (MR); zweite Spur: λ-Referenzbande (100 ng) unverdaut ohne Cofaktor und MTase; Spur 13: Kontrolle mit 1 Äq. M.TaqI, ohne Cofaktoranalogen; Spur 14: Kontrolle ohne DNA-MTase mit Cofaktoranalogen. Die gestrichelte Linie zeigt die Grenzkonzentration der noch vollständig modifizierten λ-DNA. Es wurde eine TON = 8 h⁻¹ erreicht.

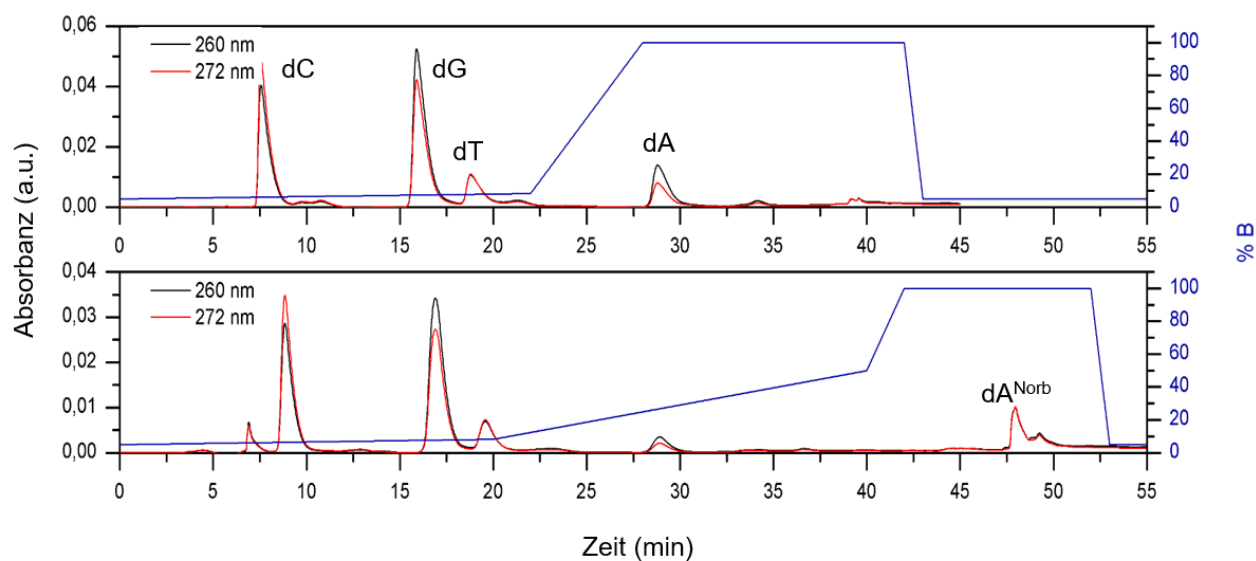


Abbildung A10: HPLC-Analyse der Modifikation von M.TaqI (1 Äq. bezogen auf TCGA-Erkennungssequenz) mit AdoYnNorb (**7**) und Duplex-ODN nach der Fragmentierung in die Einzelnukleoside mittels Nuklease P1 und CIAP. Vergleich zwischen der Fragmentierung des Kontrolllaufs (Duplex-ODN ohne Cofaktor und DNA-MTase, oben) und der Fragmentierung der Modifikation mit AdoYnNorb (**7**) (unten).

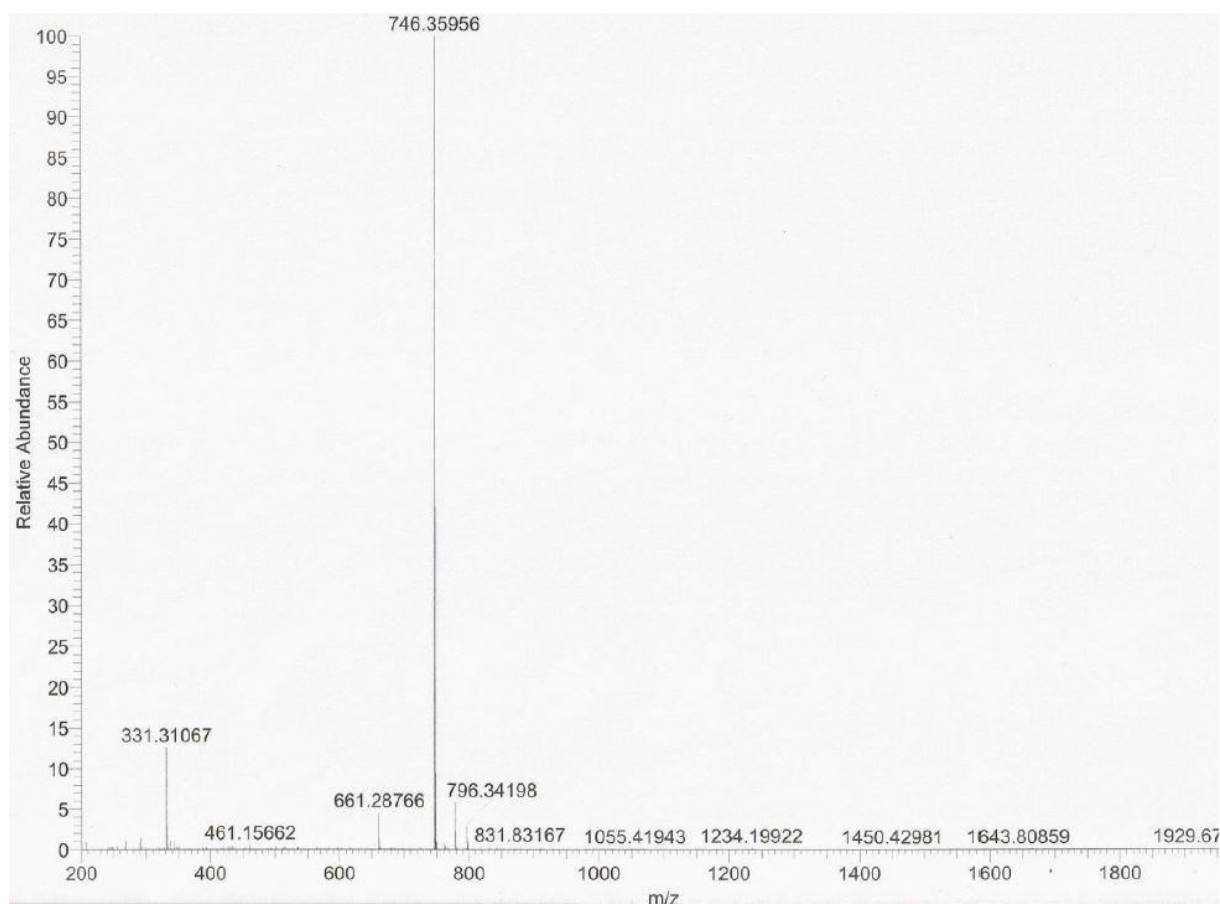


Abbildung A11: ESI-Massenspektrum von modifiziertem Adenin (dA^{Norb}). MS(ESI+): m/z (rel. Häufigkeit): 746,36 (100) $[M+Na^+]$.

Tabelle A1: Quantifizierung der Anzahl der Nukleoside für die Duplex-ODN -Modifikation von M.TaqI (1 Äq.) mit AdoYnNorb (7).

Nukleosid	Anzahl _{soll}	Duplex	AdoYnNorb
dC	11	11,7	11,8
dG	11	10,8	11,1
dT	3	2,9	2,7
dA	1-2	2,6	0,9
dA ^{Mod.}	1-2	-	1,5

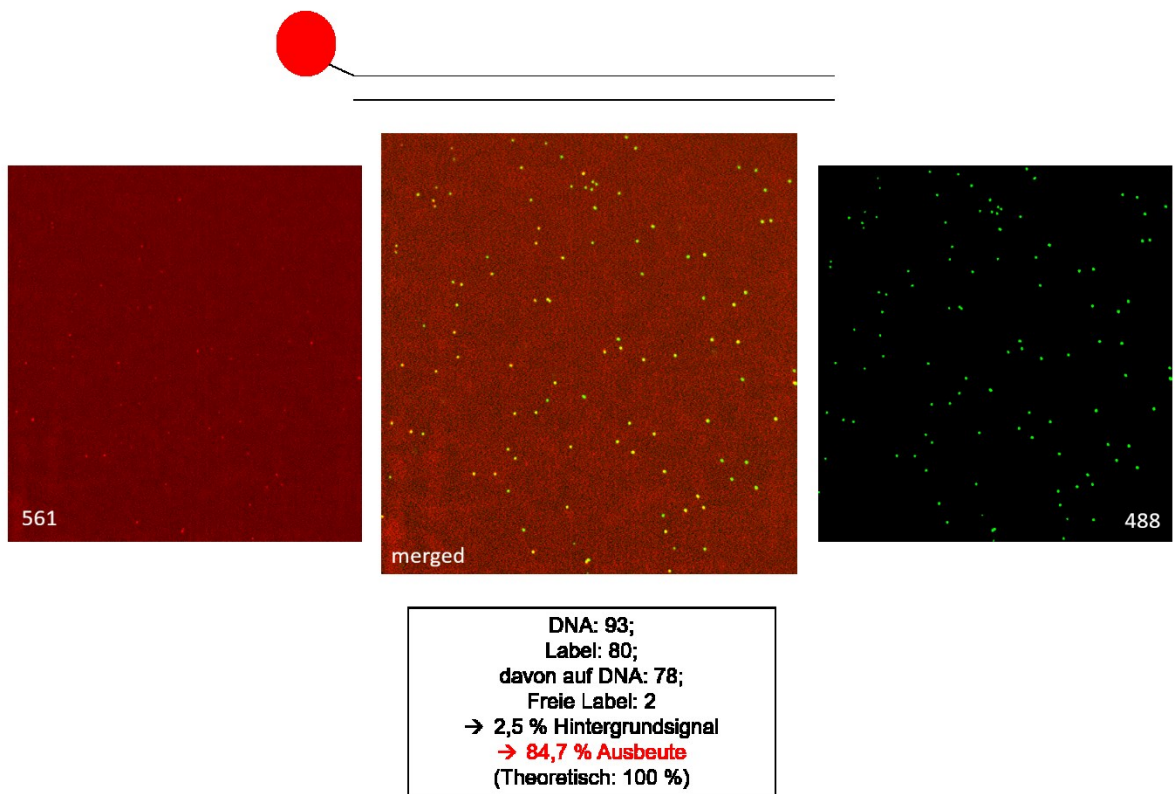
PCR- λ -Substrat mit internem TAMRA-Standard

Abbildung A12: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des PCR- λ -Substrats mit internem TAMRA-Standard für den DNA-Kanal: grün, Aufnahmen bei 488 nm und den Label-Kanal: rot, Aufnahmen bei 561 nm sowie ein Kompositbild der beiden Kanäle.

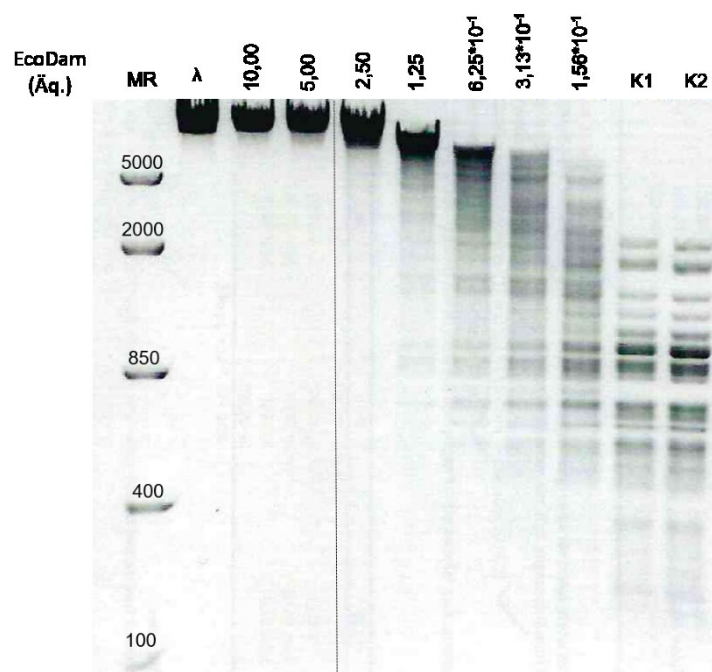


Abbildung A13: Gelelektrophoretische Analyse des Aktivitätstests von EcoDam mit AdoYnTAMRA (8). Die Konzentrationen der λ -DNA sowie des Cofaktoranalogs (10 μ M) sind in jeder Spur konstant, die Konzentration der EcoDam halbiert sich in jeder Spur ausgehend von 0,18 μ M (1 Äq.). Verdaut wurde mit R.Mbol (10 U/ μ g DNA). Erste Spur: DNA-Marker (MR); zweite Spur: λ -Referenzbande (100 ng) unverdaut ohne Cofaktor und MTase; K1: Kontrolle mit 10 Äq. M.EcoDam, ohne Cofaktoranalogon; K2: Kontrolle ohne DNA-MTase mit Cofaktoranalogon. Die gestrichelte Linie zeigt die Grenzkonzentration der noch vollständig modifizierten λ -DNA. Es wurde eine TON = 0,2 h⁻¹ ermittelt.

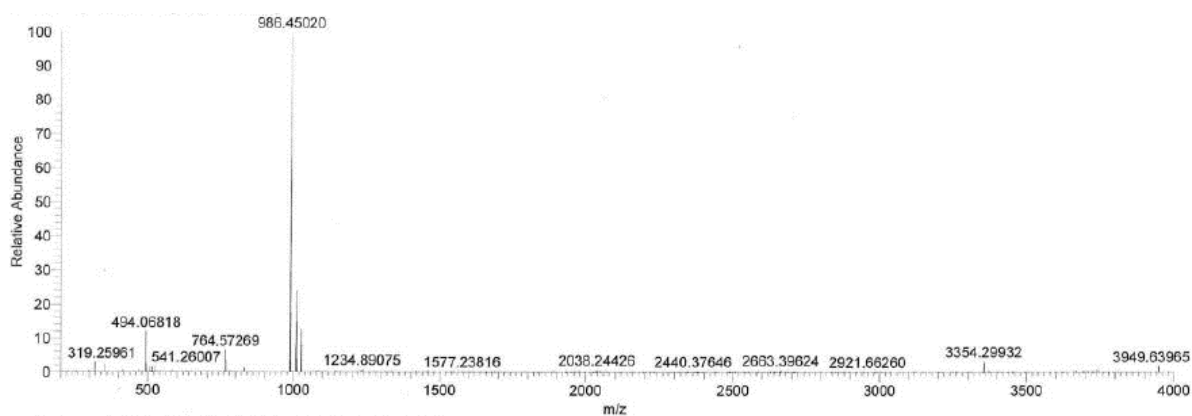


Abbildung A14: ESI-Massenspektrum des TAMRA-modifizierten Adenins (dA^{TAMRA}) (Peak3). MS(ESI+): m/z (rel. Häufigkeit): 986,45 (100) [M+H⁺]

B DNA-Sequenzen

B.1 PCR- λ -Sequenz (1052 Bp)

GGACAGGAC**5hmC**AGCATACGATCTGCCGTCAGTCCCGCCTGATTGCCGGAAAGG
 ACCAGCGTTTTGTTGAAATCGGACAGGGTTGAGTTGCCCTGATACCAGGCATACG
 CCAGCGCACCGGTTCGCCACCGCCAGCGAGGTGGCCCCCACCATCGGCAGGGTGA
 TCGCACCGGCAAGCCCCCTGAACATGGGGATCATCCCGCCGAAGGAGTCCTTCAC
 CTGCCCCCCCCTGTTGCAGCAGGATCAGCCACGGACTTTGCCCCGCCTGCAAGCTGC
 GTGGCCACGTCGGTGAACCTGTGCAGGCAGCATACGCATGGCGGCTTTATACTGCC
 CGACGGAAATCCCCGCTTTCTGTGCAGCCAGCGCCTGTCGGCTCAGCGACTGTTC
 AACGACTGCCGCTGTTTTTTTCGCATCACTTTCCGTACCAGAAAAATGACGCCTGA
 CTCTGGCCATCTGCTCGTCAAATCTGGCCGCATCCAGACTCAAATCAACGACCAG
 ATCGCCTACCGGTTTCAGCCATACCGGACTCCTCCTGCGATCCCTTCTGATACTGTC
 ATCAGCATTACGTCATCCTCCGTCATGTCCGCCACATCCGGGGAAGCGGGGATAA
 CTTCAATCCCGTCCGGGCCAAAGCGGACACCTCCGGCAAGCCCTGCCGCTTTCTG
 CATCAGCACATCATCTTCAGGCTCTTCGTCAGCCTCGCGCCGGTTCAGCAGACTG
 AAATCCAGCGGATGCATATCCGGATCGCTGAAAAACAGGCTGAGCACGGTGTAC
 GTCAGCCCCGAAAAGTGCATATCCAGCAGAACATCATGAAAATAATGGGTACTG
 TAAAAGCGGTGCCAGTCGGCATACTCCGTGGATGACATCCCGGCAAGCATGGCA
 CGCCAGTCGGGTTCGCCCCATCTCACGCGCCAGTTTCAGGGCAAAACTCAGCTCAC
 CG**TCGA**ACACTTTCCCGCAGAAACAGGCTCTGCGGGCCCCGGCGTCCTCTGTCTGT
 TCAGGGGCATTATTACACAAACTCATACATACCAGACAGCCGGTACACCACGT
 TTTCAGCATGAG

Es wurden die folgenden Erkennungssequenzen markiert:

M.TaqI (5'-TCGA-3') → rot, fett

DNA- β -GT (hmC) → blau, fett

Danksagung

Abschließend möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mir während der gesamten Promotion mit Rat und Tat zur Seite standen und mich stets bekräftigt und unterstützt haben.

An erster Stelle gebührt mein Dank meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Elmar Weinhold für die freundliche Übernahme des Prüferamtes und für die Ermöglichung meiner Promotion in seinem Arbeitskreis mit der Forschung an einem sehr spannenden Thema. Elmar, vielen Dank für die jahrelange Unterstützung und stetige Motivation, die zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben und für die unermüdliche Geduld und Zeit bei der Beantwortung jeglicher Fragen.

Außerdem möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Markus Albrecht recht herzlich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Überdies gebührt ein ganz besonderer Dank meinen Forschern- und Forscherinnen sowie Bachelorstudenten/-innen Alexandra Knops, Sarah Roeb, Mersiha Mahic, Laura Hillebrand, Patricia Pereira Simões, Sabrina Schönameier, Calogero Quaranta und Rim Mhamdi für die tatkräftige Unterstützung meiner Forschung durch fleißige Laborarbeit. Es war mir eine Ehre mit euch zusammenzuarbeiten und ich wünsche euch für euren weiteren Werdegang viel Erfolg.

Ganz besonders möchte ich mich weiterhin bei unseren Kooperationspartnern bedanken. Einerseits danke ich dem gesamten Team von Prof. Dr. Yuval Ebenstein von der Tel Aviv University in Israel für die anregenden Meetings, die schnelle Beantwortung sämtlicher Fragen, die Messung meiner Proben sowie für die herzliche Aufnahme und die schöne Zeit bei euch in Tel Aviv. Weiterhin gilt ein besonderer Dank Dr. Barbara Zschörnig und Dr. André Krause (Jena Bioscience GmbH) für die Synthese und Bereitstellung sämtlicher Tetrazin- und DBCO-Konjugate, die maßgeblich zum Erfolg dieser Forschung beigetragen haben. Barbara und Matthias, danke für die schöne Zeit gemeinsam mit euch in Israel.

Ein großes Dankeschön gilt weiterhin allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern unseres Arbeitskreises für die angenehme und lustige Atmosphäre vor allem während der gemeinsamen Mittagspausen und für die ständige Hilfsbereitschaft innerhalb des Teams. Ein ganz besonderer Dank gilt zunächst Sascha Peters sowie Kerstin Glensk für die nervenaufreibende Herstellung von verschiedenen DNA-MTasen sowie Cofaktoranaloge. Außerdem möchte ich mich bei meinen ehemaligen Arbeitskollegen Dr. Miriam Rauser und Dr. Felix Schilcher an dieser Stelle

für die sehr lustige Reise nach Israel bedanken, es war eine wahnsinnige Erfahrung mit euch und ich habe die Woche da sehr genossen. Felix, vielen Dank für die ständige Unterstützung während der gesamten Zeit, in der wir Laborsitznachbarn waren und für dein offenes Ohr – du hast mich stets wieder aufgebaut, wenn es mal schwerer wurde. Weiterhin ein großes Dankeschön an Leonie Schütz für die sehr schöne gemeinsame Zeit als Laborteam, für die lustigen Mittags- und Kaffeepausen, für die Messungen am Mikroskop und vor allem für deine geduldige Unterstützung jeglicher Art sowie die konstruktive und sehr hilfreiche Korrektur dieser Arbeit.

Zuletzt und insbesondere danke ich darüber hinaus meinen Eltern, meiner Schwester, meinen Freunden und meinem Freund Christian für die Geduld und das Verständnis während der gesamten Promotionszeit. Danke, dass ihr mich immer aufgebaut habt, wenn es mal vermeintlich nicht weiterging oder ich an mir gezweifelt habe. Christian, ich danke dir, dass du stets an meiner Seite stehst und mich immer wieder motiviert hast. Ich freue mich auf unsere gemeinsame Zukunft zusammen mit unserem Sohn.