Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften | RWTH AACHEN UNIVERSITY

M.MpeI als Werkzeug für die Methyltransferase-vermittelte DNA-Markierung und Methylierungsdetektion

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

Leonie Schütz (M.Ed.)

aus Erkelenz

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

Tag der mündlichen Prüfung: 21. April 2023

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Universitätsbibliothek verfügbar.

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Oktober 2019 bis September 2022 am Institut für Organische Chemie der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen (RWTH Aachen University) unter Anleitung von Prof. Dr. sc. nat. Elmar Weinhold angefertigt.

Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen und meine Promotion bereichert haben.

Ein spezieller Dank gilt meinen Forscher:innen, Bachelor- und Masterstudierenden und Azubinen. Fabian Kolodzy für die Synthese und Aktivität von Azid-Cofaktoren mit verschiedenen Linkerlängen. Polina Aseeva für die Synthese von doppeltaktivierten Cofaktoranaloga. Jennifer Dietel für die Dockingexperimente, Simulationen und Mutagenese von M.MpeI. Für die Unterstützung bei der Administration und die Korrektur dieser Arbeit. Sandra Piel für die Modifikationsreaktionen mit M.HhaI. Thomas Bissing für die Steigerung der Modifikationsausbeute durch MTAN. Tim Jansen für die Synthese und Aktivität von AdoYnTAMRA kurz und lang. Yasemin Kara für die Optimierung der enzymatischen Aktivität. Paul Lisbach für die Synthese von 6TAMRAAz. Alija Spahic für die Untersuchung der Spezifität. Jari Willems für die Untersuchung der DNA-Bindungsaffinität und Thermostabilität. Eure Betreuung war für mich eine sehr positive Erfahrung und so war es im Labor nie langweilig. Ihr habt alle eure eigenen Persönlichkeiten mit in die Forschung gebracht und ich konnte auch immer noch etwas von euch lernen. Danke!

Vielen Dank an meine Kollegin Larissa Käver. Als Team-L haben wir im Chemie-Labor super zusammen gearbeitet und uns in der Corona-Zeit nicht unterkriegen lassen. Die Kaffeepausen und die Arbeit mit dir zusammen haben mir sehr viel Spaß gemacht.

Außerdem bedanken möchte ich mich bei Sascha Peters für die Synthese von doppeltaktivierten Cofaktoranaloga und Unterstützung bei der Nutzung der HPLC. Bei Kerstin Glensk für die Expression der Enzyme und die im Rahmen der Expression entstandenen Aktivitätsgele. Dafür, dass ich bei Fragen immer auf euch zurückkommen konnte und für die vielen netten Pausen.

Ich danke Jonas Gossen, Emile de Bruyn und Prof. Dr. Giulia Rossetti für die Kooperation und die Arbeit im Bereich der Dockingexperimente und molekulardynamischen Simulationen.

Vielen Dank an Dr. Michael Meske, der mich ermutigte, die Idee der Promotion zu verfolgen.

Danke Elmar, für die Betreuung meiner Promotion, für die Unterstützung und Korrektur dieser Arbeit. Aber auch für viele Gespräche während der letzten drei Jahre, wissenschaftlich und auch persönlich. Dadurch habe ich sehr viel gelernt, über Chemie, aber auch über mich selbst.

Ein letzter Dank gilt meiner Familie, meinen Freund:innen und besonders Christian. Danke für die Unterstützung und Motivation zum Schreiben dieser Arbeit.

Eidesstattliche Erklärung

Ich, Leonie Schütz,
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:

Präsentationen:

L. Schütz, J. Gossen, G. Rossetti, E. Weinhold: *Docking simulation of the CpG-specific DNA methyltransferase M.MpeI with cofactor analogues by Schrödingers Maestro.* Neujahrssymposium, IOC, RWTH Aachen University, 10. Januar **2020**.

L. Käver, L. Schütz, F. Gularek, E. Weinhold: *Methyltransferase-Induced Labelling of DNA with Synthetic Cofactor Analogues for DNA-Barcoding.* Tag der Chemie, RWTH Aachen University, 17. Januar **2020**.

L. Schütz, J. Gossen, G. Rossetti, E. Weinhold: *Docking simulation of the CpG-specific DNA methyltransferase M.MpeI with cofactor analogues.* Virtueller EMBO

Workshop: Chemical Biology, 03.-05. September **2020**.

L. Schütz, J. Gossen, G. Rossetti, E. Weinhold: *DNA methylation detection guided by docking simulation of the CpG-specific DNA methyltransferase M.MpeI with cofactor analogues*. Virtuelle Konferenz: Advances in Chemical Biology Conference, 26.-28. Januar **2021**.

L. Schütz, J. Dietel, J. Gossen, E. de Bruyn, G. Rossetti, E.Weinhold: *Engineering CpG-specific DNA methyltransferase M.MpeI for DNA methylation detection with cofactor analogues*. Nukleinsäurechemietreffen, 15.-17. September **2021**, Bad Herrenalb, Deutschland.

L. Schütz, E. Weinhold: *Engineering CpG-specific DNA methyltransferase M.MpeI for DNA methylation detection with cofactor analogues by computational docking*. Digitales Neujahrssymposium, IOC, RWTH Aachen University, 14. Januar **2022**.

L. Schütz, J. Dietel, J. Gossen, E. de Bruyn, G. Rossetti, E.Weinhold: *Engineering CpG-specific DNA methyltransferase M.MpeI for DNA methylation detection with cofactor analogues*. GDCh Biochemie Konferenz, 29. Juni - 01. Juli **2022**, Münster, Deutschland.

Veröffentlichungen:

T. Gabrieli, Y. Michaeli, S. Avraham, D. Torchinsky, S. Margalit, L. Schütz, M. Juhasz, C. Coruh, N. Arbib, S. Zhou, J. Law, E. Weinhold, Y. Ebenstein: *Chemoenzymatic labeling of DNA methylation patterns for single-molecule epigenetic mapping. Nucleic Acids Research* **2021**, *50*, e92.

Für die Veröffentlichung habe ich die Experimente mit eM.SssI und AdoYnAzid zum Modifikations-Restriktionstests ohne und mit MTAN durchgeführt und die Transferaseaktivität von eM.SssI mit AdoYnAzid und die anschließende Click-Reaktion mit DBCO-Sulfo-Cy5 ohne und mit MTAN durch *rp*-HPLC bestimmt.

S. Margalit, Z. Tulpová, Y. Michaeli, Z. Detenis, J. Deek, S. Louzoun-Zada, G. Nifker, A. Grunwald, Y. Scher, L. Schütz, E. Weinhold, Y. Gnatek, D. Omer, B. Dekel, E. Friedman, Y.Ebenstein: *Optical Genome and Epigenome Mapping of Clear Cell Renal Cell Carcinoma*. Eingereicht am 19. Oktober **2022**, bioRxiv **2022**.
Für die Veröffentlichung habe ich das Cofaktor Analogon AdoYnATTO643 synthetisiert und massenspektrometrisch nachgewiesen.

S. Avraham, L. Schütz, L. Käver, A. Dankers, M. Koren-Michowitz, S. Margalit, Y. Michaeli, S. Zirkin, D. Torchinsky, N. Gilat, O. Bahr, E. Weinhold and Y. Ebenstein: *Simultaneous global labelling (SiGL) of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine by DNA alkylation with a synthetic cofactor and engineered methyltransferase*. Eingereicht am 2. November **2022**, bioRxiv **2022**.
Für die Veröffentlichung habe ich die Transferaseaktivität von M.MpeI (dm) mit AdoYnAzid und die anschließende Click-Reaktion mit DBCO-TAMRA durch *rp*-HPLC bestimmt. Außerdem habe ich die Kontrollen mit unspezifischer DNA durchgeführt.

G. Nifker, A. Grunwald, S. Margalit, Z. Tulpova, Y. Michaeli, H. Har-Gil, N. Maimon, E. Roichman, L. Schütz, E. Weinhold, Y. Ebenstein: *Dam Assisted Fluorescent tagging of Chromatin Accessibility (DAFCA) profiling by optical genome mapping in nano-channels arrays*. Eingereicht am 27. Dezember **2022**, ACS Nano **2022**.
Für die Veröffentlichung habe ich das Cofaktor Analogon AdoYnCF640R synthetisiert und massenspektrometrisch nachgewiesen.

F. Greiss, N. Lardon, L. Schütz, Y. Barak, S. S. Daube, E. Weinhold, V. Noireaux, R. Bar-Ziv: *A dissipative nanodevice on a single DNA*. Eingereicht am 13. Dezember **2022**, Nature Nanotechnology **2022**.
Für die Veröffentlichung habe ich das Cofaktor Analogon AdoYnBiotin synthetisiert.

Ort, Datum: Unterschrift:

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung **1**

1.1 Desoxyribonukleinsäure 1
1.2 Epigenetik 2
1.2.1 CpG-Methylierung 2
1.2.2 DNA-Methylierungsdetektion 3
1.3 DNA-Methyltransferasen 8
1.3.1 DNA-Cytosin-C5-Methyltransferasen 10
1.3.2 Aktivitätstests 10
1.4 Cofaktoranaloga 12
1.4.1 Aziridinbasierte Cofaktoranaloga 12
1.4.2 Doppelaktivierte Cofaktoranaloga 13
1.5 Click-Chemie 14

2 Zielsetzung **16**

3 Ergebnisse und Diskussion **18**

3.1 Einschrittige Markierung mit Aziridincofaktoren 18
3.1.1 Docking von Aziridincofaktoren 18
3.1.2 Synthese von 6TAMRAAz 21
3.1.3 Markierung von Plasmid-DNA und Duplex-ODN mit 6TAMRAAz durch M.MpeI, M.SssI und M.TaqI 22
3.2 Zweischrittige Markierung mit doppeltaktivierten Cofaktoranaloga . . 25
3.2.1 Dockingexperimente 26
3.2.2 Synthese und Aktivität von Azid-Cofaktoren mit verschiedenen Linkerlängen 27
3.2.3 Zweischrittige Modifikationsreaktion mit AdoYnAzid und DBCO-TAMRA 31
3.2.4 Steigerung der Modifikationsausbeute durch MTAN 33
3.2.5 Untersuchung der Spezifität 37
3.3 Einschrittige Markierung mit doppeltaktivierten Cofaktoranaloga . . 39
3.3.1 Modifikation mit M.HhaI 39
3.3.2 Sequenz- und Strukturvergleich von M.MpeI mit M.HhaI . . . 42
3.3.3 Dockingexperimente und Simulationen 45
3.3.4 Mutagenese 46
3.3.5 Expression und Reinigung 49
3.3.6 Untersuchung der enzymatischen Aktivität 50
3.3.7 Untersuchung der DNA-Bindungsaffinität und Thermostabilität 56
3.3.8 Optimierung der enzymatischen Aktivität 60

4 Zusammenfassung und Ausblick **65**

5 Experimentelles **67**
5.1 Materialien . . . 67
5.1.1 Chemikalien . . . 67
5.1.2 Puffer . . . 70
5.1.3 DNA und DNA-Marker . . . 72
5.1.4 Extinktionskoeffizienten . . . 74
5.1.5 Enzyme . . . 75
5.1.6 Zellstämme . . . 76
5.1.7 Geräte und Kits . . . 77
5.2 Methoden . . . 79
5.2.1 Dockingexperimente . . . 79
5.2.2 Dünnschichtchromatographie . . . 82
5.2.3 Säulenchromatographie . . . 82
5.2.4 RP-HPLC . . . 82
5.2.5 ^{1}H- und ^{19}F-NMR-Spektroskopie . . . 84
5.2.6 Massenspektrometrie . . . 84
5.2.7 UV/Vis-Spektroskopie . . . 84
5.2.8 Entgasen von Lösungsmitteln . . . 85
5.2.9 Linearisierung von Plasmid-DNA . . . 85
5.2.10 Agarose-Gelelektrophorese . . . 86
5.2.11 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese . . . 86
5.2.12 ODN-Hybridisierung . . . 87
5.2.13 *Electrophoretic Mobility Shift Assay* . . . 87
5.2.14 Mikroskalige Thermophorese . . . 88
5.2.15 *Thermal Shift Assay* . . . 88
5.3 Aktivitätstests . . . 89
5.3.1 ODN-Modifikation . . . 89
5.3.2 Modifikations/Restriktionstests . . . 92
5.3.3 Untersuchung der Kinetik von MTAN . . . 97
5.4 Synthesen . . . 98

6 Literaturverzeichnis **129**

7 Anhang **I**

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
BER	*Base Excision Repair*
Bp	Basenpaare
C	Cytosin
CIAP	*Calf Intestinal Alkaline Phosphatase*
CpG	5´-CG-3´ Dinukleotid
CuAAC	Kupfer (I) katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition
DBCO	Dibenzocyclooctin
DC	Dünnschichtchromatographie
DLS	*Direct Label and Stain*
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EMSA	*Electrophoretic Mobility Shift Assay*
ESI	Elektrospray-Ionisation
G	Guanin
h	Stunde
IPD	*Interpulse Duration*
LC-MS	Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie
6mA	*N*6-Methyladenin
5mC	5-Methylcytosin
4mC	*N*4-Methylcytosin
min	Minute
MR	Middle Range DNA-Leiter
MST	Mikroskalige Thermophorese
mTAG	***m****ethyltransferase-directed* ***T****ransfer of* ***A****ctivated* ***G****roups*
MTAN	Methylthioadenosin-Nukleosidase
MTase	Methyltransferase
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie (*nuclear magnetic resonance*)
OD	Optische Dichte
ODN	Oligodesoxynukleotid
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PEG	Polyethylenglycol

rp-HPLC	*reversed phase High Performance Liquid Chromatography*
RT	Raumtemperatur
REase	Restriktionsendonuklease
ref	Referenz
RMSD	*Root Mean Square Deviation*
RMSF	*Root Mean Square Fluctuation*
R_f	Retentionsfaktor
SAM	*S*-Adenosyl-L-methionin
SAH	*S*-Adenosyl-L-homocystein
SILs	Interner isotopenmarkierter Standards
SMILing DNA	***S****equence-specific* ***M****ethyltransferase-****I****nduced* ***L****abel****ing*** *of* ***DNA***
SMRT-*sequencing*	*Single-Molecule Real-Time sequencing*
SPAAC	Spannungsinduzierte (*strain-promoted*) Azid-Alkin-Cycloaddition
T	Thymin
TDG	Thymin DNA Glykosylase
TET	*Ten-Eleven Translocation*
TON	Wechselzahl (*Turn Over Number*)
TSA	*Thermal Shift Assay*
ZMW	*Zero Mode Waveguide*

1 Einleitung

1.1 Desoxyribonukleinsäure

Die Desoxyribonukleinsäure (DNA) enthält als Speicher der genetischen Erbinformation in Form der Basenabfolge den Bauplan alles Lebens auf der Erde. Durch den Aufbau zweier antiparallel verlaufender Stränge kann die DNA repliziert und die Erbinformation weitergegeben werden. Jeder Strang besteht aus 2´-Desoxyribosemolekülen, welche über Phosphordiesterbindungen verknüpft sind und je eine Nukleobase tragen. Dabei paaren Purine mit Pyrimidinen, Guanin (G) paart mit Cytosin (C) über drei und Adenin (A) mit Thymin (T) über zwei Wasserstoffbrückenbindungen (Abbildung 1).[1,2]

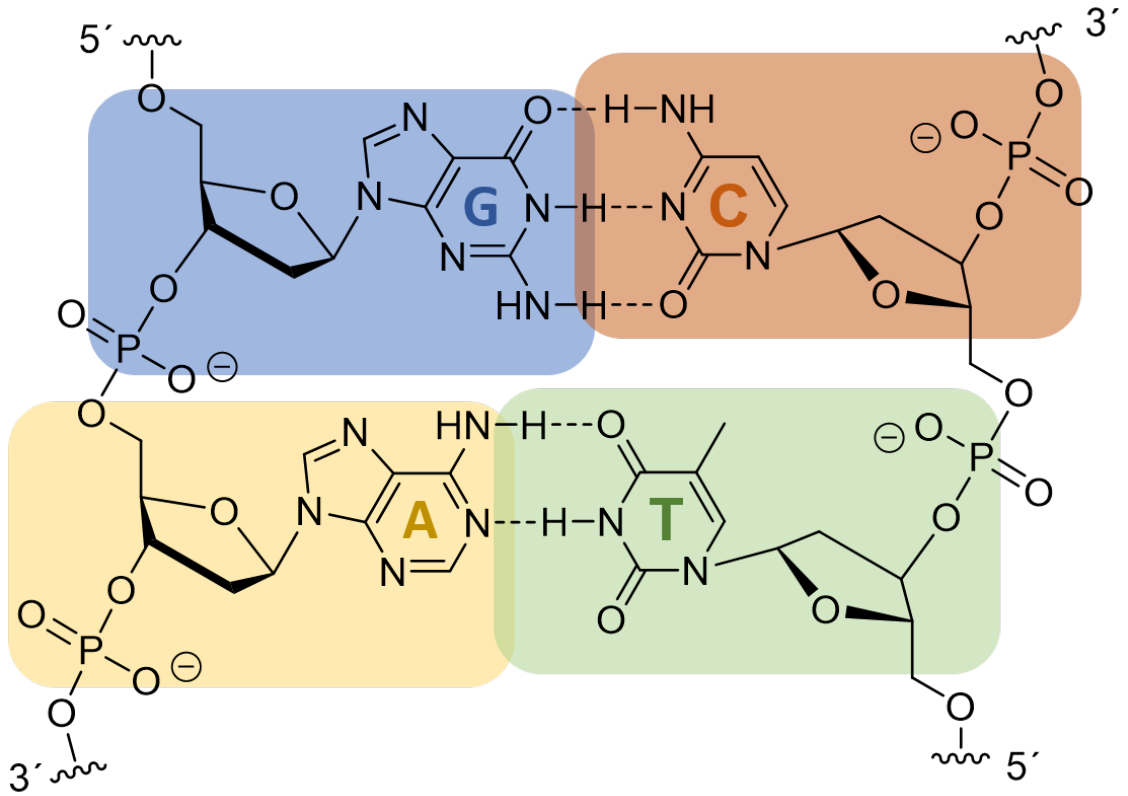


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Basenpaarung in Desoxyribonukleinsäure (DNA). Die Doppelhelix besteht aus zwei Strängen, die antiparallel angeordnet sind. Die 2´-Desoxyribose ist durch Phosphordiesterbindungen verknüpft und trägt die Nukleobasen. Dabei paart Guanin (G) mit Cytosin (C) über drei und Adenin (A) mit Thymin (T) über zwei Wasserstoffbrückenbindungen (gestrichelt).

1.2 Epigenetik

Durch den genetischen Code sind alle Baupläne für die Proteine, die in der Proteinbiosynthese durch Transkription und Translation hergestellt werden, in der DNA-Sequenz enthalten. Für die Regulation dieser Vorgänge sind oft neben Transkriptionsfaktoren epigenetische Faktoren verantwortlich, die das An- und Abschalten von Genen und somit die Transkription beeinflussen. Dazu wird nicht die DNA-Sequenz verändert, sondern es werden Zusätze auf der Meta-Ebene, sogenannte modifizierte Basen, die nicht die Watson-Crick-Basenpaarung beeinflussen, eingeführt. Bereits 1948 wurde die erste methylierte Nukleobase, 5-Methylcytosin (5mC) von Hotchkiss publiziert.[3] Weitere methylierte Basen sind *N*4-Methylcytosin (4mC) und *N*6-Methyladenin (6mA).[4,5] Alle methylierten Basen können in bakteriellen Zellen gefunden werden. Im humanen Genom liegt dagegen im wesentlichen 5-Methylcytosin vor. Daneben gibt es weitere Modifikationen des Cytosins, die durch Oxidationen gebildet werden. *Ten-eleven translocation (TET)*-Enzyme oxidieren 5mC über 5-Hydroxymethylcytosin und 5-Formylcytosin zu 5-Carboxycytosin, welches wie 5-Formylcytosin durch die Thymin-DNA-Glykosylase (TDG) aus der DNA herausgeschnitten wird und anschließend durch TDG-abhändigen *base excision repair (BER)* wieder Cytosin liefert.[6,7,8]

1.2.1 CpG-Methylierung

An dieser Stelle wird der Fokus auf 5-Methylcytosin im humanen Kontext gelegt. Die Methylgruppe wird durch DNA-Methyltransferasen (DNA-MTasen) mithilfe des Methyldonors *S*-Adenosyl-L-methionin (SAM) im CpG-Dinukleotid (5´-CG-3´) eingeführt (s. 1.3). Sie beeinflusst nicht die Watson-Crick-Basenpaarung, jedoch die Erkennung durch Transkriptionsfaktoren in der großen Furche der DNA und die Chromatinstruktur.[9–12] Im humanen Genom liegen 70 % - 80 % der Cytosinreste in CpG-Sequenzen methyliert vor.[13] Spezifische Lücken der Methylierungsmuster sind in regulatorischen Elementen, wie Promotorregionen, vorhanden. Die Methylierung der Cytosinreste beeinflusst die Zugänglichkeit der genomischen Regionen für regulatorische Proteine bzw. Proteinkomplexe und beeinflusst dadurch die Chromatinstruktur und die Transkriptionsgeschwindigkeit der Gene.[14] Das Methylierungsmuster der DNA ist dabei dynamisch und es sind komplexe Prozesse an der

Cytosinmodifikation und der aktiven Demethylierung über den oben genannten Oxidationsweg beteiligt.[14–17] Bei Krebserkrankungen sind Methylierungsmuster und Chromatinstruktur stark verändert und beinhalten genomweite Hypo- und lokale Hypermethylierung. Dabei sind verschiedene Effekte zu beobachten. Hypermethylierung von sogenannten CpG-Inseln in Promotorbereichen von DNA-Reparaturgenen können zu deren Inaktivierung durch *Gene Silencing* führen. Cytosinmethylierung in codierenden Bereichen von Genen kann außerdem zu erhöhten Mutationsraten aufgrund von spontaner Deaminierung und Umwandlung von C zu T führen. Methylierte CpGs sind darüber hinaus bevorzugte Bindungsstellen von bestimmten Karzinogenen in Zigarettenrauch. Diese formen DNA-Addukte und führen dadurch zu Mutationen von G nach T, welche häufig bei Krebstumoren von Rauchern festgestellt werden.[18] Wenn nun also Krebserkrankungen allgemein als krankhafte epigenetische Veränderungen in Tumor-Suppressor-Genen und Onkogenen verstanden werden, können globale Veränderungen wie Hypomethylierung und Hypermethylierung spezifischer lokaler Bereiche als Marker für Krebs und zur Analyse und Krebsfrüherkennung genutzt werden.[19]

1.2.2 DNA-Methylierungsdetektion

Seit der Entdeckung der modifizierten Basen in DNA wurden eine Reihe von Methoden zur Detektion dieser entwickelt. Manche sind in der Lage simultan mehrere epigenetische Veränderungen zu detektieren, andere sind auf die Detektion von 5-Methylcytosin, der häufigsten Modifikation von Cytosin im humanen Genom und deshalb auch die fünfte Base genannt, spezialisiert. Bei den Detektionsmethoden ist außerdem zwischen Bulk-Methoden, die den gesamten Anteil von 5-Methylcytosin im Vergleich zu unmodifizierten Cytosinresten angeben und Ansätzen, bei denen auch Rückschlüsse auf die Position der Modifikation geschlossen werden können, zu unterscheiden.
Bei den Bulk-Methoden ist zunächst die Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie (LC-MS) zu nennen. Hierbei handelt es sich um eine quantitative Detektion der modifizierten Base, wobei neben 5-Methylcytosin auch andere Modifikationen bestimmt werden können. Zunächst wird die zu analysierende DNA in Mononukleoside fragmentiert und diese vor der Massenanalyse durch LC separiert. Durch Hinzufügen interner isotopenmarkierter Standards (SILs) können durch eine Kalibrierkurve Rückschlüsse auf die Konzentration der Analyten gezogen werden.

Moderne Massenspektrometer sind dabei sensitiv und über einen großen Konzentrationsbereich akkurat. Die LC-MS Methode kann außerdem dazu genutzt werden, die Dynamik der DNA-Modifikationen durch Metabolismus von isotopenmarkierten Bausteinen, zum Beispiel $^{13}CD_3$-markiertem Methionin als Vorläufer von SAM, zu untersuchen.[9] Eine zweite Methode, die der Bulk-Analyse zugeordnet werden kann, ist die indirekte Bestimmung der modifizierten Cytosinreste durch Fluoreszenzmarkierung der unmodifizierten Cytosinreste und anschließende Messung der relativen Fluoreszenz der Probe.[20] Dazu werden unmethylierte Cytosinreste zunächst enzymatisch mit fluoreszierenden Reportergruppen markiert.[21] Alternativ ist eine enzymatische CpG-methylierungsabhängige Markierung von Adenin möglich.[22] In beiden Fällen wird die fluoreszenzmarkierte Probe anschließend auf einen *multi-sample array* Chip geladen und die Fluoreszenz analysiert. Parallel wird die DNA durch einen Interkalator eingefärbt und ebenfalls über den Chip analysiert. Im Bezug zu der erwarteten Fluoreszenz für die Sequenz kann der Methylierungsgrad der DNA bestimmt werden.[20]

Im Bereich der sequenzspezifischen Analysen ist zunächst die Methode der Bisulfitsequenzierung zu nennen. Die Methode macht eine direkte Bestimmung der methylierten Cytosinreste möglich. Das Prinzip beruht darauf, dass die Deaminierung von Cytosin zu Uracil bei Behandlung von Einzelstrang-DNA mit Natriumhydrogensulfit (Bisulfit) präferiert am unmodifizierten Cytosin abläuft. Die Umsatzgeschwindigkeit von 5-Methylcytosin ist im Vergleich zu Cytosin sehr gering. Das führt dazu, dass Cytosinreste bei der Behandlung mit Bisulfit vollständig umgesetzt werden und in der anschließenden PCR-Amplifikation als Thymin gelesen werden. 5-Methylcytosin wird nicht umgesetzt und wird daher in der PCR weiterhin als Cytosin gelesen. Durch DNA-Sequenzierung, z.B. Sanger-Sequenzierung, vor und nach der Behandlung mit Natriumhydrogensulfit kann also zwischen Cytosin und 5-Methylcytosin unterschieden werden. Diese Analyse gibt außerdem Aufschluss über die exakte Position der Modifikation im Genom.[23–28]

Ähnlich der Bisulfitsequenzierung ist die Methode nach Maxam und Gilbert. Hierbei wird radioaktiv markierte DNA auf vier unterschiedliche Weisen chemisch behandelt, wobei jede Behandlung zu basenspezifischen Strangbrüchen führt. Guaninreste werden durch Dimethylsulfat methyliert, Purine (A und G) durch Ameisensäure depuriniert, Pyrimidine (C und T) durch Hydrazin abgebaut und nur Cytosinreste spezifisch durch hohe Salzkonzentration mit Hydrazin umgesetzt. Anschließend wird das DNA-Rückgrat an den Reaktionsstellen durch Zugabe von Piperidin gespalten.

Gelelektrophorese der entstandenen DNA-Fragmente ermöglicht die Sequenzierung der DNA. Die Reaktion mit Hydrazin ist für 5-Methylcytosin nicht erfolgreich, sodass an dieser Stelle kein Strangbruch induziert wird. Das führt auf dem anschließenden Gel zu einer Lücke in der DNA-Leiter und der Rückschluss auf das Methylierungsmuster ist möglich.[29−31] Die Maxam-Gilbert-Methode hat gegenüber der Bisulfitsequenzierung jedoch Nachteile. Die Methylierung wird durch eine Lücke im Sequenzierungsmuster ermittelt. Dies führt dazu, dass jeder Strangbruch im Hintergrund und kleine Bandenabstände Schwierigkeiten bei der Auswertung hervorrufen. Die Bisulfit-Sequenzierung bietet also DNA-Methylierungsdetektion mit Einzelbasenauflösung. Jedoch wird die DNA bei der Behandlung mit Bisulfit geschädigt, was wiederum die Sequenzierungsdaten negativ beeinflusst. Die neu entwickelte Methode *enzymatic methyl-seq (EM-seq)* der Firma *New England BioLabs (NEB)* umgeht die Probleme der DNA-Schädigung durch Bisulfitbehandlung, indem die DNA-Methylierungsdetektion enzymatisch stattfindet.[32] Im Verfahren können 5-Methylcytosin und 5-Hydroxymethylcytosin detektiert werden, wobei eine Unterscheidung dieser nicht möglich ist. Im ersten Schritt werden zwei Enzyme, das *Ten-eleven translocation*-Enzym TET2 und die Glykosyltransferase T4-BGT, dazu genutzt, die modifizierten Basen in Oxidations- und Glykosylierungsprodukte umzuwandeln, die im Gegensatz zu Cytosin nicht von dem Enzym APOBEC3A deaminiert werden können. Im zweiten Schritt wird dann APOBEC3A genutzt, um unmodifizierte Cytosinreste zu Uracil umzuwandeln. Anschließend kann die unbehandelte und behandelte DNA durch PCR amplifiziert und durch *Illumina Sequencing* analysiert werden. Cytosinreste, die durch Deaminierung zu Uracil umgewandelt wurden, werden bei der PCR als Thymin gelesen und ergeben daher bei der Sequenzierung Thymin. Die Oxidations- und Glykosylierungsprodukte von 5-Methylcytosin und 5-Hydroxymethylcytosin werden in der PCR weiterhin als Cytosin gelesen und ergeben so auch bei der Sequenzierung Cytosin.[32] Im direkten Vergleich zwischen Bisulfitsequenzierung und EM-seq zeigten sich klare Vorteile der EM-seq Methode sowohl bei DNA-*coverage*, als auch im Bereich der Sensitivität.[32]
Zwei Methoden die dem *Third Generation Sequencing* zugeordnet werden können und die Informationen über den epigenetischen Status geben können sind das *Single-molecule real-time sequencing (SMRT sequencing)* und das *Nanopore sequencing*.[33] Gegenüber den zuvor genannten Analysemethoden besteht der Vorteil von längeren Leselängen, was die direkte Analyse gesamter Gene und deren Methylierungsmuster ermöglicht. Das SMRT-System von *Pacific Biosciences* detektiert die Modifi-

kation in nativer DNA durch die veränderte Kinetik beim Einbau der Basen.[34,35] Die Sequenzierung startet mit der Vorbereitung einer Bibliothek aus Doppelstrang-DNA, die beidseitig mit *hairpin*-Adaptern ligiert werden. Die DNA-Bibliothek wird anschließend in die SMRT-Zelle, die aus vielen Analysekammern im Nanobereich besteht, sogenannten *Zero Mode Waveguides (ZMWs)*, geladen. Die DNA-Moleküle werden zum Boden der ZMWs gezogen, wo sich eine DNA-Polymerase befindet, die unterschiedlich fluoreszenzmarkierte Nukleotide einbaut. Die vom Nukleotid emittierte Fluoreszenz wird in Echtzeit von einer Kamera detektiert. Von dieser wird nicht nur die Farbe, sondern auch die Zeit zwischen zwei Einbauten (*interpulse duration (IPD)*) und die Länge der Einbauzeit erfasst. Diese Längen verändern sich, wenn sich in der DNA eine modifizierte Base befindet.[36] Die Veränderungen sind jedoch sehr fein, sodass die Entwicklung und das Training von Modellen zur Analyse der Veränderungen für die Methylierungsdetektion hilfreich sind.[37] Sequenzierung in der Nanopore ist zum Beispiel mit verschiedenen Geräten der Firma *Oxford Nanopore Technologies* möglich. Dabei befinden sich auf einer Membran Nanoporen, an denen die Stromstärke gemessen wird. Diese ist abhängig vom Inhalt der Pore. Zunächst ergibt sich ein Grundstrom, wenn die Nanopore leer ist. Für die DNA Analyse wird doppelsträngige DNA von einer Helikase entwunden und ein einzelner Strang kann sich durch die Pore bewegen. Dabei befinden sich immer mehrere Basen gleichzeitig in der Pore. Während die DNA sich durch die Nanopore bewegt verändert sich die gemessene Stromstärke und es können so Rückschlüsse auf die DNA-Sequenz gezogen werden.[38] Eine Modifikation der Basen, wie eine Methylierung, hat einen Einfluss auf die Umgebung in der Pore und somit auf den gemessenen Strom. Durch die Erstellung von Bibliotheken und das Trainieren von Modellen kann auch hier die Analysequalität optimiert werden.[39,40] Dabei können verschiedene Modelle für eine erhöhte Genauigkeit kombiniert werden.[41] Außerdem ist ein Barcoding ganzer Gene möglich, indem die DNA zunächst mit weiteren synthetischen Proben behandelt wird.[42] Zur besseren Unterscheidung von unmodifizierten Cytosinresten und 5-Methylcytosin können diese weiter modifiziert werden, um das *base calling* zu erleichtern.

Als letzte Methode soll an dieser Stelle das *Optical Mapping* genannt werden. Es besteht aus zwei Schritten, einer sequenzspezifischen Markierung durch eine fluoreszierende Reportergruppe und die anschließende Fluoreszenzanalyse. Das Verfahren wurde 2012 von *Bionano Genomics* entwickelt und bietet sich ursprünglich zur Analyse struktureller Variationen der DNA an.[43] Dabei wird die DNA, die zuvor durch

einen Interkalator Farbstoff gefärbt wurde, in *nanochannel arrays* gestreckt. Der Aufbau besteht aus einem *flow sytem*, wobei die DNA zunächst in einer gradientiellen Region, bestehend aus unterschiedlich großen runden Hindernissen, entknäult und anschließend in einer nanofluiden Region gestreckt wird.[44] Durch Stoppen des Flusses kann die DNA in den Nanokanälen analysiert werden. Durch die neue Technology erhöht sich der Durchsatz gegenüber klassischen Sequenzierungsverfahren und durch den parallelen Betrieb werden große Datenmengen, bis zu 1300 Gigabyte Rohdaten pro Flusszelle bei humanen Proben, erzeugt.[45] Im Zusammenhang mit einem neuen Saphyr System stellte *Bionano Genomics* das *Direct Label and Stain (DLS)* vor. Dabei wird die DNA sequenzspezifisch durch eine DNA-MTase mit einem Fluorophor markiert, wodurch ein direktes Auslesen eines genomischen Barcodes möglich wird.[46,47] Im Gegensatz zu der zuvor verwendeten Markierungsmethode durch *Nicking* Enzyme ergibt sich der Vorteil, dass es keine Doppelstrangbrüche an Stellen gibt, wo zwei *nicking sites* nah beieinander liegen.[45] Aufbauend auf die genetischen Analyse der DNA soll nun die epigenetische Analyse im gleichen System analog durchgeführt werden. Dazu können ebenfalls sequenzspezifische DNA-MTasen verwendet werden, jedoch müssen diese methylierungsabhängig sein, um Aussagen über das Methylierungsmuster der DNA treffen zu können (s. 1.3.1). Ein Beispiel ist an dieser Stelle die Verwendung der DNA-MTase M.TaqI, die CpG-methylierungsabhängig Adenin in der Zielsequenz 5´-TCGA-3´ mit der fluoreszierenden Seitenkette von AdoYnTAMRA (s. 1.4.2) markiert.[48] Die Methylierungsdetektion findet an dieser Stelle invers statt, da durch das enzymatische System nur unmethylierte Cytosinreste, nicht aber methylierte Cytosinreste detektiert werden. Dadurch wird eine simultane Analyse von Genetik und Epigenetik ermöglicht.[49−51] Das System ist vielseitig einsetzbar und Markierungsmethoden weiterer modifizierter Basen, wie 5-Hydroxymethylcytosin, werden simultan erforscht.[52,53]
Die in dieser Arbeit entwickelten Ansätze zur Fluoreszenzmarkierung unmethylierter Cytosinreste in CpG-Kontexten können sowohl für das Bulk Analyseverfahren über einen *multi-sample array* Chip als auch für die Einzelmolekülanalyse zum *Mapping* durch Fluoreszenzmikroskopie verwendet werden. Im Vergleich zu bereits existierenden Markierungsverfahren mit M.TaqI bieten sie den Vorteil der Analyse des Methylierungsmusters aller CpGs und nicht nur der in TCGA-Kontexten.

1.3 DNA-Methyltransferasen

In Kapitel 1.2 wurden bereits methylierte Nukleobasen eingeführt. Für diese Methylierung sind DNA-Methyltransferasen (DNA-MTasen) verantwortlich. Sie übertragen eine Methylgruppe von dem Cofaktor und Methyldonor *S*-Adenosyl-L-methionin (SAM) (**1**) sequenzspezifisch auf die DNA und bilden dabei methylierte DNA und das Koppelprodukt *S*-Adenosyl-L-homocystein (SAH) (**2**) (Abbildung 2).[54] Der Mechanismus ist hier für die DNA-Cytosin-C5-MTasen dargestellt. Zunächst greift ein Cysteinrest aus dem PCQ-Motiv des Enzyms das Zielcytosin nukleophil an und Glutaminsäure wird deprotoniert. Dadurch wird eine kovalente Bindung zwischen DNA und Enzym geknüpft (I.). Die Zielbase wird dafür aus der DNA Doppelhelix herausgedreht und befindet sich in der Bindungstasche des Enzyms.[55–57] Anschließend wird die Methylgruppe von dem Cofaktor SAM (**1**) auf die 5-Position übertragen und es entsteht SAH (**2**) (II.). Im letzten Schritt wird die kovalente Bindung zur Zielbase durch Eliminierung gebrochen und der Komplex dissoziiert (III.).[58,59]

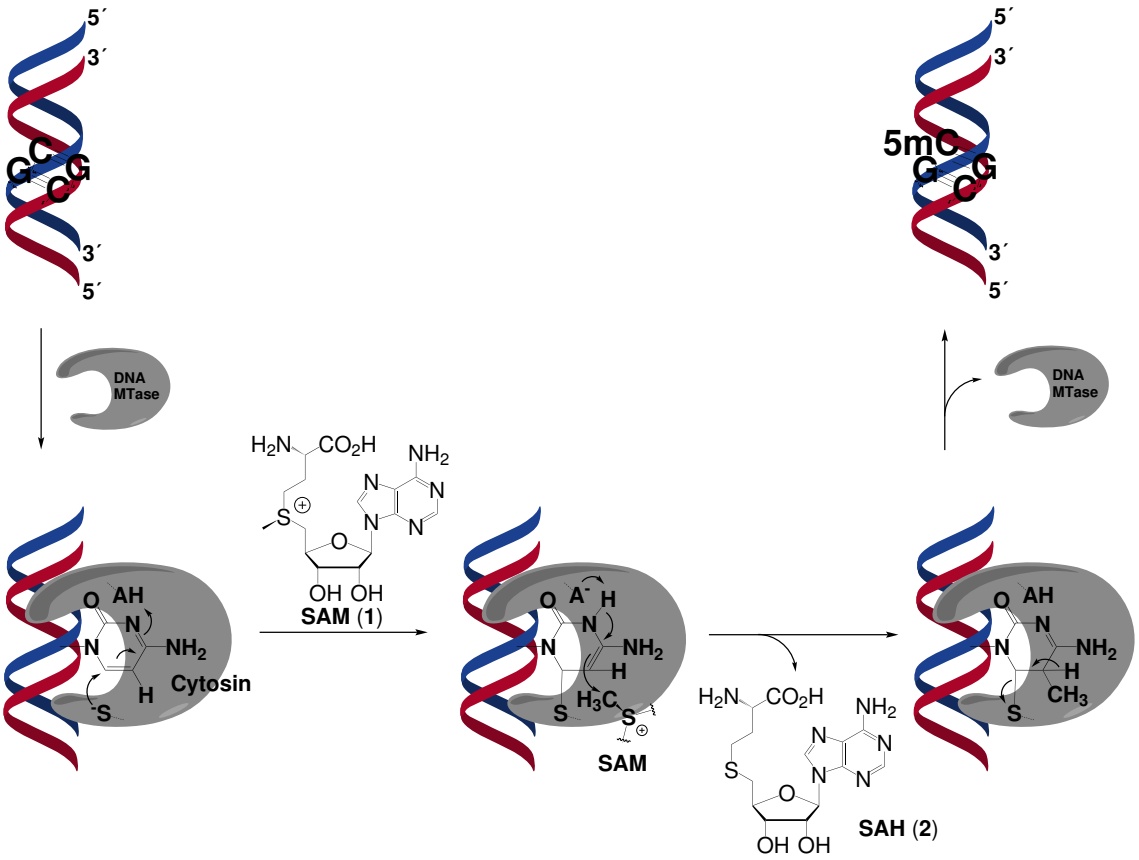


Abbildung 2: Übersicht des Mechanismus der Methylierung von Cytosin in CpG-Sequenzen durch DNA-MTasen. Zunächst wird die ausgeklappte Zielbase nukleophil von Cystein aus dem PCQ-Motiv angegriffen und Glutaminsäure wird deprotoniert. Dadurch wird eine kovalente Bindung zwischen DNA und Enzym geknüpft (I.). Anschließend wird die Methylgruppe von dem Cofaktor SAM (**1**) auf die 5-Position übertragen und es entsteht SAH (**2**) als Koppelprodukt (II.). Im letzten Schritt wird die kovalente Bindung zur Zielbase durch Eliminierung gebrochen und der Komplex dissoziiert (III.).[58,59]

Die Auswirkungen der DNA-Methylierung in Eukaryoten wurden bereits in Kapitel 1.2 diskutiert. In Prokaryoten können alle drei methylierten Basen 5-Methylcytosin (5mC), *N*4-Methylcytosin (4mC) und *N*4-Methyladenin (6mA) gefunden werden. Die DNA-MTasen sind hier Teil eines Restriktions- und Modifikationssystems (RM-Systems).[60,61] Das heißt, dass zusätzlich zu der DNA-MTase ein Restriktionsendonuklease (REase) mit der selben, meist palindromischen, Erkennungssequenz existiert. Die eigene DNA der Bakterien wird durch die DNA-MTase modifiziert und wird nicht von der kognaten REase fragmentiert. Fremd-DNA, die zum Beispiel

durch Phagen eingeschleust wird, ist nicht sequenzspezifisch methyliert und wird deshalb von der entsprechenden REase verdaut. Bakterien nutzen diesen Verteidigungsmechanismus als eine Art Immunsystem.[62,63]

1.3.1 DNA-Cytosin-C5-Methyltransferasen

In der folgenden Arbeit werden bakterielle DNA-Cytosin-C5-MTasen für die DNA-Markierung und Methylierungsdetektion verwendet. Diese zeigen gegenüber eukaryotischen DNA-MTasen eine höhere Reaktionsgeschwindigkeit und eignen sich dadurch besser für die Markierungsreaktion durch synthetische Cofaktoranaloga (s. 1.4). Die DNA-MTase M.HhaI aus *Haemophilus haemolyticus* besitzt die Erkennungssequenz 5´-G<u>C</u>GC-3´ und bildet damit bei der Methylierungsdetektion einen statistischen Anteil der CpG-Sequenzen ab.[56,64] Zu M.HhaI existiert eine REase R.HhaI mit der gleichen Erkennungssequenz 5´-GCG|C-3´. Der Bindungs- und Methylierungsmechanismus (Abbildung 2) und die Reihenfolge der Komplexbildung wurden an M.HhaI erforscht und werden für die weiteren DNA-Cytosin-C5-MTasen analog angenommen.[56,59,65]
Die DNA-MTasen M.SssI aus *Spiroplasma monobiae* und M.MpeI aus *Mycoplasma penetrans* haben die Erkennungssequenz 5´-<u>C</u>G-3´.[64,66,67] Zu diesen DNA-MTasen existieren keine REasen mit der selben Erkennungssequenz. In dem Aktivitätstest der auf dem Prinzip der RM-Systeme basiert (s. 1.3.2) wird daher die REase R.BstUI mit der Erkennungssequenz 5´-CG|CG-3´ verwendet. Diese kann die Zielsequenz nicht mehr fragmentieren, sobald mindestens einer der Cytosinreste modifiziert vorliegt. M.SssI und M.MpeI eignen sich als CpG-spezifische DNA-MTasen besonders gut für die Methylierungsdetektion, da sie die Erkennungssequenz der humanen DNA-MTasen besitzen und dadurch die Detektion aller Methylierungen ermöglichen.

1.3.2 Aktivitätstests

Zur Bestimmung der *Turn Over Number (TON)* können sogenannte Modifikations-/Restriktionstests (RM-Tests) durchgeführt werden (Abbildung 3). Sie basieren auf RM-Systemen der Prokayoten. Im ersten Schritt wird die DNA mit DNA-MTase und dem Cofaktor, in diesem Fall SAM (**1**), inkubiert. In grau sind die spezifischen

Erkennungssequenzen dargestellt. Im zweiten Schritt wird die DNA mit der REase inkubiert. Überall dort, wo eine Modifikation stattgefunden hat, ist keine Restriktion möglich. Wird die DNA fragmentiert spricht dies für eine unvollständige Modifikation der DNA. Die DNA-Fragmente können durch Agarose-Gelelektrophorese analysiert werden und es kann eine qualitative Beurteilung der Transferaseaktivität erfolgen.

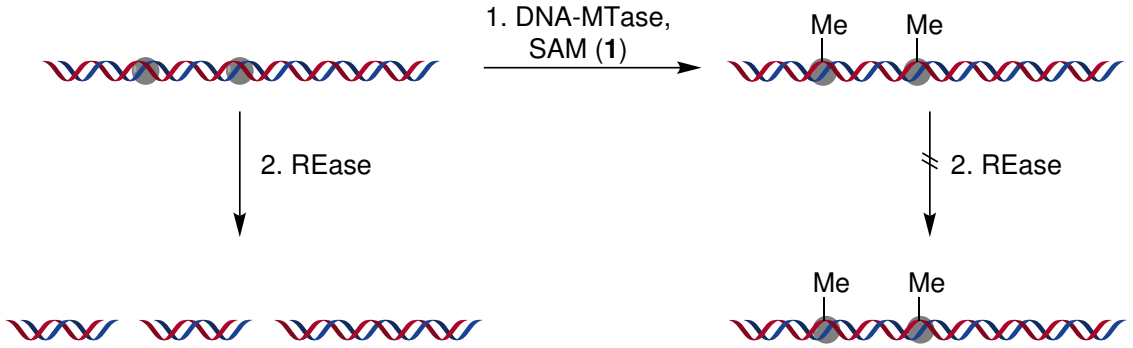


Abbildung 3: Schematische Darstellung des verwendeten qualitativen Aktivitätstest, der auf dem Prinzip der RM-Systeme basiert. Im ersten Schritt wird die DNA mit DNA-MTase und dem Cofaktor, in diesem Fall SAM (**1**), inkubiert. In grau sind die spezifischen Erkennungssequenzen dargestellt. Im zweiten Schritt wird die DNA mit der REase inkubiert. Überall dort, wo eine Modifikation stattgefunden hat, ist keine Restriktion möglich. Wird die DNA fragmentiert spricht dies für eine unvollständige Modifikation der DNA.

Die quantitative Bestimmung der Transferaseaktivität kann durch *rp*-HPLC-Analyse erfolgen. Dazu wird ein Duplex-Oligodesoxynukleotid (ODN) mit DNA-MTase und dem Cofaktor, in diesem Fall SAM (**1**) inkubiert (Abbildung 4). Die modifizierte DNA wird durch Verwendung von Nuklease P1 und Alkalischer Phosphatase (CIAP) zu Nukleosiden fragmentiert. Diese wurden per *rp*-HPLC analysiert und aus der Integration der Signalflächen die Ausbeute bezogen auf die palindromische Erkennungssequenz bestimmt.

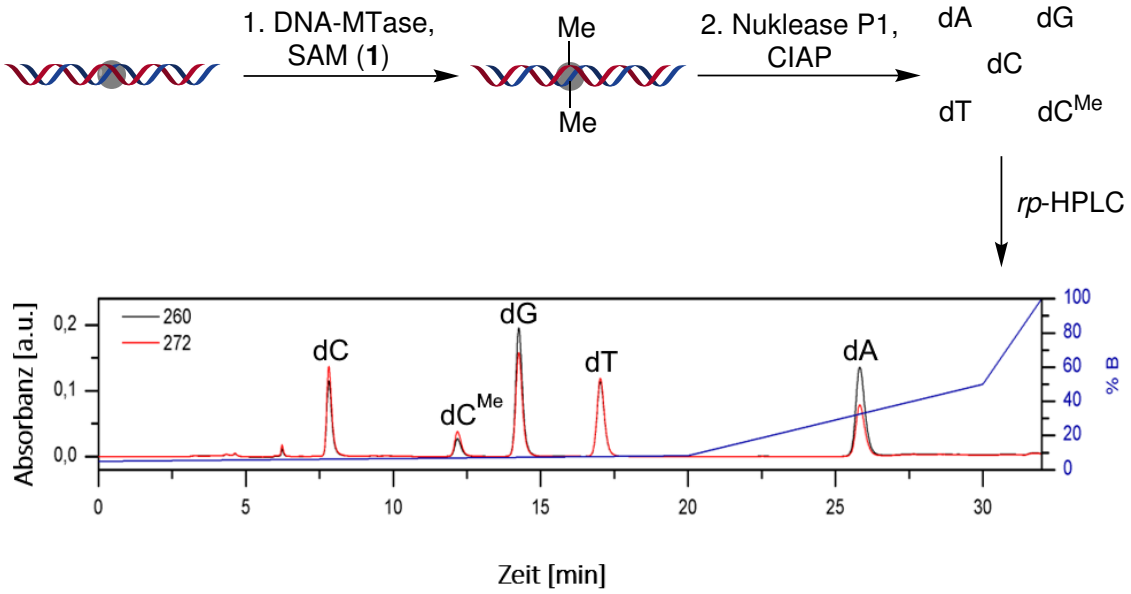


Abbildung 4: Schematische Darstellung des verwendeten quantitativen Aktivitätstest, bei dem die Transferaseaktivität durch HPLC-Analyse von fragmentierten Duplex-ODN bestimmt wird. Im ersten Schritt wird die DNA mit DNA-MTase und dem Cofaktor, in diesem Fall SAM (**1**), inkubiert. In grau ist die spezifische Erkennungssequenz dargestellt. Anschließend wird die DNA durch Verwendung von Nuklease P1 zu Nukleotiden verdaut und durch alkalische Phosphatase zu Nukleosiden dephosphoryliert. Das Nukleosidgemisch kann durch *rp*-HPLC aufgetrennt und die Transferaseaktivität mit dem jeweiligen Cofaktor aus den Peakflächen bestimmt werden.

1.4 Cofaktoranaloga

Analog zu dem natürlichen Cofaktor SAM (**1**) können für die Markierung von DNA mit DNA-MTasen synthetische Cofaktoren verwendet werden. Dazu wurden zwei Klassen von Cofaktoranaloga, aziridinbasierte und doppeltaktivierte Cofaktoranaloga, entwickelt. Diese können durch den Einsatz von Fluorophoren analog zur natürlichen Methylierungsreaktion zur sequenzspezifischen Markierung von DNA und damit zur indirekten DNA-Methylierungsdetektion (1.2.2) eingesetzt werden.[46,68,69]

1.4.1 Aziridinbasierte Cofaktoranaloga

Bei der ersten Methode, dem ***S**equence-specific **M**ethyltransferase-**I**nduced **L**abel**ing** of **DNA** (SMILing DNA)*[70] wird ein Cofaktoranalogon verwendet, bei dem das

Sulfoniumzentrum und die Aminosäureseitenkette durch Aziridin ersetzt wurde.[71] Die DNA-MTase katalysiert in diesem Fall die Kupplung von Cofaktor an DNA durch Ringöffnung des Aziridins (Abbildung 5). Die Reportergruppe ist über die 6-Position an den Cofaktor gebunden.[72–75]

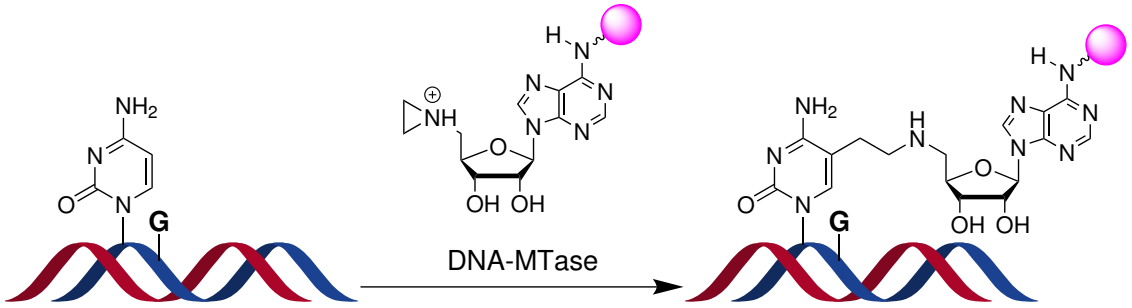


Abbildung 5: Schematische Darstellung der DNA-MTase katalysierten Kupplungsreaktion von Aziridin-Cofaktoranaloga an Cytosinreste in CpG-Sequenzen von DNA, das sogenannte *Sequence-specific Methyltransferase-Induced Labeling of DNA (SMILing DNA)*. Die rosa Kugel stellt eine Reportergruppe, z. B. einen Fluorophor, dar.

1.4.2 Doppelaktivierte Cofaktoranaloga

Die zweite Methode, der ***m****ethyltransferase-directed* ***T****ransfer of* ***A****ctivated* ***G****roups (mTAG)*,[76] basiert auf Analoga mit verlängerten Seitenketten im Vergleich zu SAM (**1**) (Abbildung 6). Essentiell bei dieser Klasse von Cofaktoranaloga ist die doppelte Aktivierung durch das Sulfoniumzentrum und die Mehrfachbindung in β-Position zum Sulfoniumzentrum. Während die Transfergeschwindigkeit für einfache verlängerte Alkylketten drastisch sinkt, erreichen doppeltaktivierte Analoga deutlich höhere TONs. Der Grund dafür liegt in der Orbitalüberlappung während des Übergangszustandes bei der nukleophilen Substitution.[77] Für die Synthese doppeltaktivierter Cofaktoranaloga wird SAH (**2**) unter leicht sauren Bedingungen mit der aktivierten Seitenkette umgesetzt.[78] Dadurch ergibt sich eine Vielzahl an Möglichkeiten für den Aufbau von Bausteinen und die schnelle und einfache Synthese weiterer Cofaktoren mit verschiedenen Reportergruppen.[76–82]

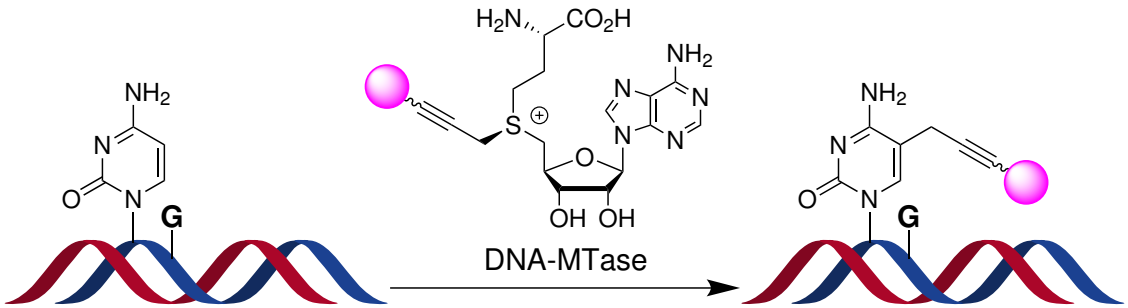


Abbildung 6: Schematische Darstellung der DNA-MTase-katalysierten Transferreaktion von doppeltaktivierten Cofaktoranaloga an Cytosinreste in CpG-Sequenzen von DNA, dem sogenannten *methyltransferase-directed Transfer of Activated Groups (mTAG)*. Die rosa Kugel stellt eine Reportergruppe, z. B. einen Fluorophor, dar.

1.5 Click-Chemie

Eine einfache und effektive Methode zur Synthese vielfältiger Cofaktoranaloga aus einem Grundbaustein ist die Click-Chemie. Außerdem eignet sie sich für bioorthogonale Markierung von funktionalisierter DNA. Erste Ideen zur Click-Chemie, die 2022 mit dem Nobelpreis in Chemie ausgezeichnet wurden, publizierte Sharpless bereits 2001.[83] Der Fokus lag hier auf der Funktion der Moleküle, statt auf der Struktur. Die Idee bestand in der Entwicklung von leistungsfähigen und selektiven chemischer Reaktionen, die in gewünschtem Maßstab sehr zuverlässig ablaufen. Die Kriterien waren breit anwendbare, modulare Reaktionen mit großen Ausbeuten ohne störende Nebenprodukte, die stereospezifisch und unter einfachen Bedingungen ablaufen sollten. Die Ausgangsverbindungen und Reagenzien sollten einfach erhältlich und die Lösemittel einfach zu verwenden und entfernen sein, um eine einfache Produktisolierung und -reinigung zu gewährleisten. Die kupferkatalysierte [3+2]-Cycloaddition von Aziden mit Alkinen (CuAAC) (Abbildung 7, oben) erfüllt die Bedingungen, die an eine Click-Reaktion gestellt wurden und führt zu der vollständigen und schnellen Verbindung der beiden Reaktanden.[84,85] Sie soll im folgenden verwendet werden, um aus einem einfachen Alkin-Cofaktorbaustein und den entsprechenden Fluorophor-Aziden fluoreszierende Cofaktoranaloga herzustellen. Die wachsende Relevanz für die Wirkstoff- und Ligandenentwicklung der Click-Chemie zeigte sich schon früh.[86]

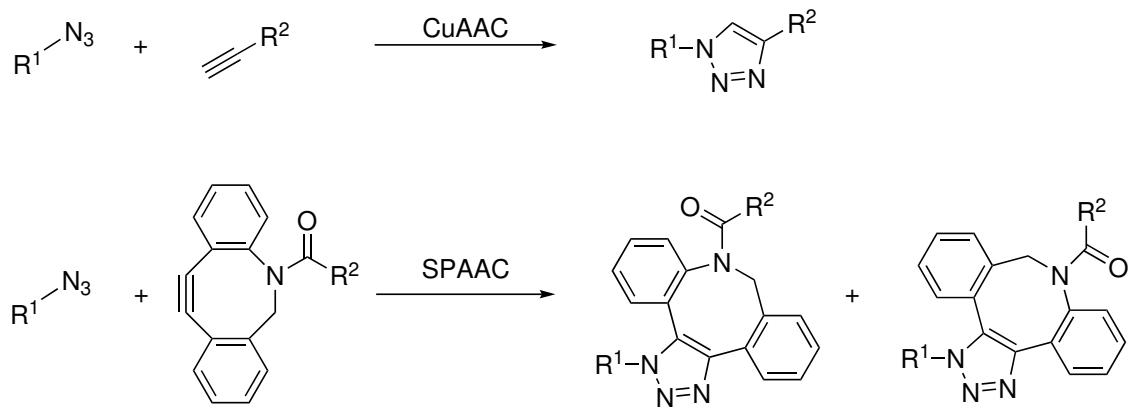


Abbildung 7: Reaktionsgleichung der verwendeten Click-Reaktionen. Oben: Kupferkatalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC). Unten: Spannungsinduzierte Azid-Alkin-Cycloaddition (SPAAC).

Aufgrund der Anwesenheit von Kupfer als Katalysator bei der Reaktion eignet sich die CuAAc nicht für die Funktionalisierung von Verbindungen in Anwesenheit von oder direkt an DNA. Eine Lösung stellt hier die von Ringspannung beschleunigte [3+2]-Cycloaddition von Aziden mit gespannten Alkinen (SPAAC) dar.[87] Zunächst wurden einfache Cyclooctine für die Reaktion verwendet. Hier dargestellt ist die Verwendung von DBCO-Reagenzien, die die selbe Funktionalität aufweisen (Abbildung 7, unten). Sie werden genutzt, um auf die DNA übertragene Azidgruppen durch DBCO-Fluorophor-Konjugate zu markieren.

2 Zielsetzung

Die Relevanz der Methylierungsdetektion in der Krebsfrüherkennung zeigt sich deutlich. Es ist wichtig, schnelle und zuverlässige Methoden zu entwickeln, die bereits aus kleinen Probenmengen relevante Schlüsse ziehen können. Dazu eignet sich die *Bulk*-Analyse der Fluoreszenz oder die Einzelmolekülanalyse durch *Optical Mapping* von DNA. Für beide Verfahren ist eine sequenzspezifische Fluoreszenzmarkierung der unmethylierten Cytosinreste in CpG-Kontexten notwendig.

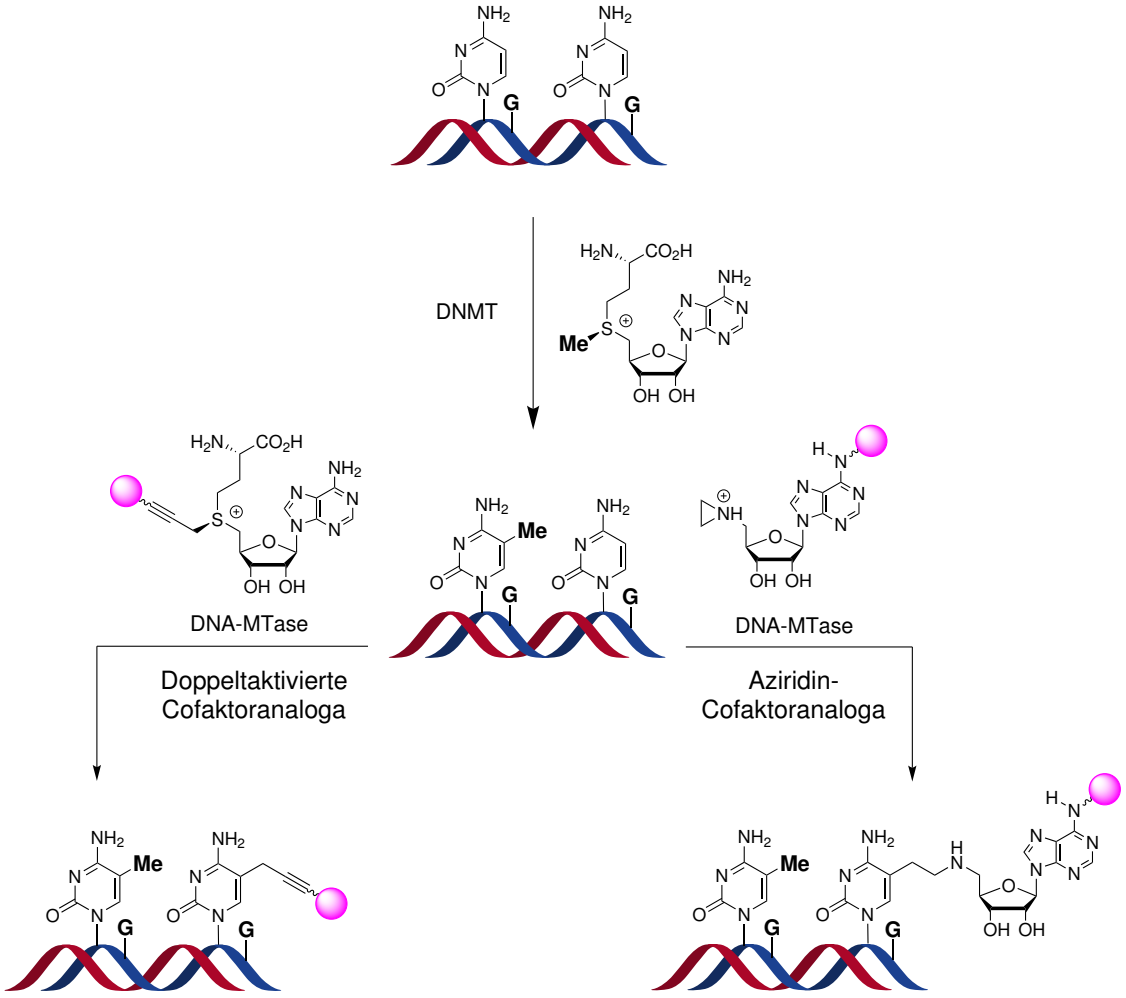


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Methylierungsdetektion durch DNA-MTasen. Im ersten Schritt werden Cytosinreste in CpG-Kontexten von der humanen DNA-MTase methyliert und es bildet sich ein Methylierungsmuster, in dem manche CpGs methyliert und andere unmethyliert vorliegen. Die unmethylierten Cytosinreste in CpG-Sequenzen können sequenzspezifisch durch DNA-MTasen mit fluoreszierenden Cofaktoranaloga markiert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen zwei Klassen von Cofaktoranaloga für die sequenzspezifische Fluoreszenzmarkierung von DNA untersucht werden. Nach der Methylierung der DNA im Menschen durch die humane DNA-MTase existiert ein dynamisches Methylierungsmuster, bei dem manche CpGs methyliert und andere unmethyliert vorliegen (Abbildung 8, oben). Synthetische fluoreszierende Cofaktoranaloga und DNA-MTasen sollen als Werkzeuge verwendet werden, um unmethylierte Cytosinreste zu markieren und so die indirekte Methylierungsdetektion zu ermöglichen (Abbildung 8, unten). Dazu sollen sowohl Aziridin-Cofaktoranaloga als auch doppeltaktivierte Cofaktoranaloga synthetisiert und die Markierungsausbeute mit diesen untersucht werden. Die Veränderung der Liganden benötigt angepasste Enzyme, damit eine Passung der Cofaktorbindungstasche und der synthetischen Cofaktoranaloga gewährleistet ist. So werden außerdem, auf Basis bereits existierender Erkenntnisse, ortspezifische Mutagenesen an der CpG-spezifischen DNA-MTase M.MpeI durchgeführt und die Stabilität und Aktivität der neu exprimierten Mutanten getestet. Begleitet werden beide Prozesse, die Synthese neuer Verbindungen und die Mutagenese von M.MpeI, durch die computergestützte Simulation des ternären Komplexes aus DNA-MTase, DNA und Cofaktor. Ziel der Arbeit ist es, eine zuverlässige Markierungsreaktion unter einfachen Bedingungen zu entwickeln, die schnelle DNA-Methylierungsdetektion mit hohen Ausbeuten ermöglicht.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Einschrittige Markierung mit Aziridincofaktoren

Der erste Ansatz der zur Markierung unmethylierter CpGs durch die DNA Methyltransferasen genutzt werden soll, ist das sequenzspezifische Methyltransferase-induzierte Labeling von DNA (*Sequence-specific methyltransferase-induced labeling of DNA) (SMILing DNA)*, welches bereits **2004** von Schmidt in *New S-adenosyl-L-methionine analogs for sequence-specific transfer of functional groups by DNA-methyltransferases* mit dem biotinylierten Aziridincofaktor 6BAz und der DNA-MTase M.SssI verwendet wurde.[88] Hier soll der analoge Ansatz, jedoch mit einer fluoreszierenden Reportergruppe anstatt des Biotins und der DNA-MTase M.MpeI, verwendet werden. Aufgrund der Homologie der Enzyme ist zu erwarten, dass mit strukturell ähnlichen Aziridincofaktoren Aktivität vorhanden sein könnte. Die Grundstruktur des Aziridincofaktors wird dazu beibehalten. Lediglich anstatt NHS-Biotin wird in der Synthese das ebenfalls kommerziell erhältliche NHS-TAMRA verwendet, um zu dem neuen Cofaktor 6TAMRAAz zu gelangen.

3.1.1 Docking von Aziridincofaktoren

Zunächst wurde *in silico* überprüft, ob eine Bindung und Kupplung des fluoreszierenden Aziridincofaktors 6TAMRAAz durch die DNA-MTase M.MpeI möglich ist. Dazu wurden Dockingexperimente mit dem Programm Maestro von Schroedinger auf Basis der Kristallstruktur von M.MpeI in Komplex mit DNA und Cofaktorprodukt SAH (4DKJ) durchgeführt.[67,89]
In einem ersten Schritt wurde das Dockingprotokoll mit SAH so aufgesetzt, dass die Pose in der Kristallstruktur reproduziert werden konnte. Das erstellte Gitter und die verwendeten Parameter wurden dann auf das Docking von 6TAMRAAz übertragen. Das Docking war erfolgreich und die Lage des Cofaktors in der Bindungstasche stimmt mit dem Adenosylteil von SAH überein. Der Aziridinring der, beim nukleophilen Angriff von Cytosin auf den Cofaktor, geöffnet und gekuppelt wird liegt in Reaktionsnähe zur C5 Position (Abbildung 9a). Die Seitenkette des Cofaktors kann durch einen natürlich vorkommenden Tunnel in der Kristallstruktur aus der Bindungstasche des Enzyms herausragen (Abbildung 9b).

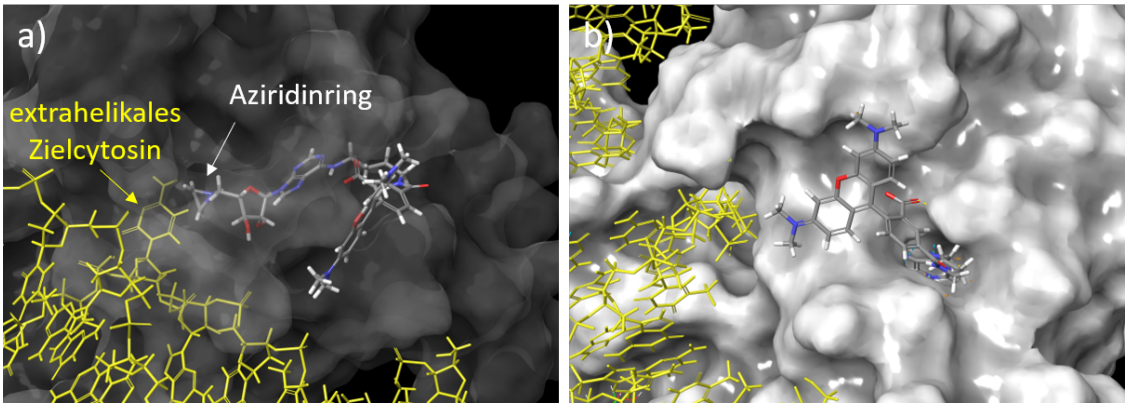


Abbildung 9: Dockingsimulation von 6TAMRAAz (**11**) in den Komplex von M.MpeI und DNA. **a**: Pose von 6TAMRAAz in der Bindungstasche. Durch die transparente Enzymoberfläche ist die Lage des Aziridinrings zum ausgeklappten Zielcytosin sichtbar. **b**: Außenansicht des Komplexes. Der Linker des Aziridincofaktors, durch den TAMRA kovalent an den Adeninrest gebunden ist, passt in einen natürlich vorkommenen Tunnel des Enzyms. Die fluoreszierende Gruppe befindet sich außerhalb der Bindungstasche auf der Enzymoberfläche.

Da das Enzym im Docking nicht flexibel, sondern starr ist, bleibt die Frage, wie der Cofaktor von außerhalb in die Bindungstasche gelangt, damit eine Kupplung stattfinden kann. Analog zu den Beobachtungen von Klimašauskas et. al. **1998** an der DNA-MTase M.HhaI wird vermutet, dass eine flexible Proteinschleife zur DNA- und Cofaktorbindung öffnen und schließen kann.[90] Bei Cofaktorbindung wird das Schließen der Schlaufe stabilisiert. Durch die konformative Änderung ändert sich auch das hydrodynamische Volumen des Komplexes von DNA und MTase und die beiden Formen sind durch unterschiedliches Laufverhalten im Polyacrylamidgel nachweisbar. Diese Schlaufe grenzt direkt an den natürlich vorkommenden Tunnel an. Durch Sequenzvergleich und Überlagerung der entsprechenden Aminosäuren in beiden Enzymen wurde *in silico* ein Model der geöffneten Schleife in M.MpeI erstellt. Sobald die Schleife sich öffnet bildet sich ein großer Spalt, durch den der Cofaktor in die Bindungstasche gelangt und die Seitenkette aus dieser herausragen kann (Abbildung 10). Das Öffnen und Schließen der katalytischen Schleife ist für die DNA-MTase M.MpeI nicht abschließend geklärt und wird nur aufgrund der Homologie zu M.HhaI angenommen.

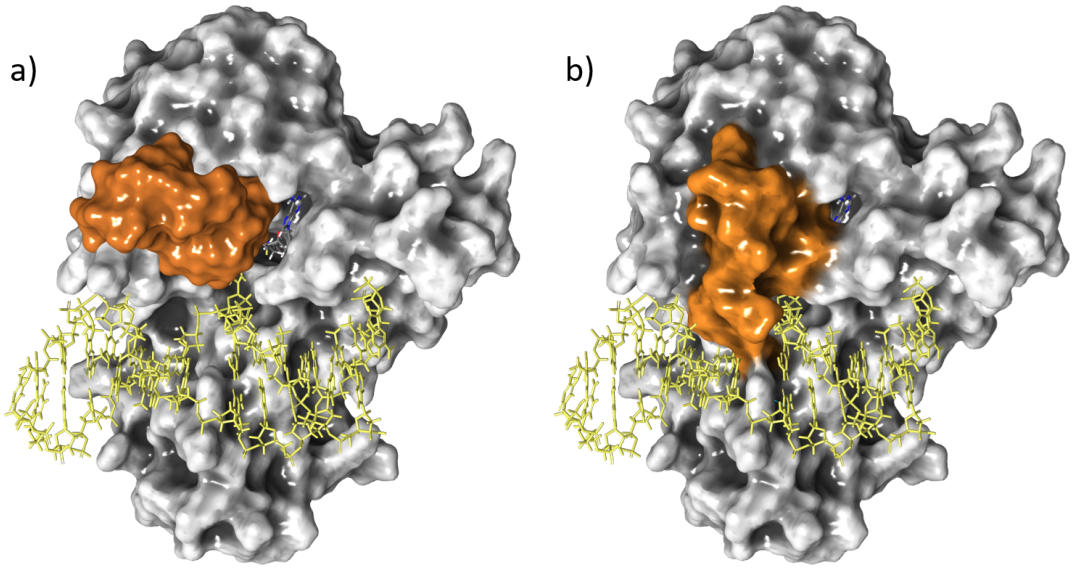


Abbildung 10: Lage der katalytischen Schleife (orange) in dem geöffneten Modell und der geschlossenen Kristallstruktur des Enzyms (grau). Die DNA ist in gelb dargestellt, der Cofaktor grau (Kohlenstoff), weiß (Wasserstoff), rot (Sauerstoff), blau (Stickstoff) und gelb (Schwefel). **a**): Modellstruktur auf Basis des Vergleichs zu M.HhaI. Die katalytische Schleife ist geöffnet, es bildet sich ein Spalt, durch den das Cofaktorprodukt SAH (**2**) sichtbar ist. **b**): Kristallstruktur 4DKJ. Die katalytische Schleife ist geschlossen. Der Adeninrest des Cofaktorprodukts ist durch den natürlich vorkommenden Tunnel sichtbar.

3.1.2 Synthese von 6TAMRAAz

Bei der Synthese von 6TAMRAAz (**11**) wurde sich an der Synthese von 6BAz von Schmidt (**2004**) und Pirotte (**2004**) orientiert.[73–75,88,91] 6TAMRAAz (**11**) wurde in sieben Stufen aus 6-Chloro-9-β-D-ribofuranosylpurin (**3**) synthetisiert. (Abbildung 11)

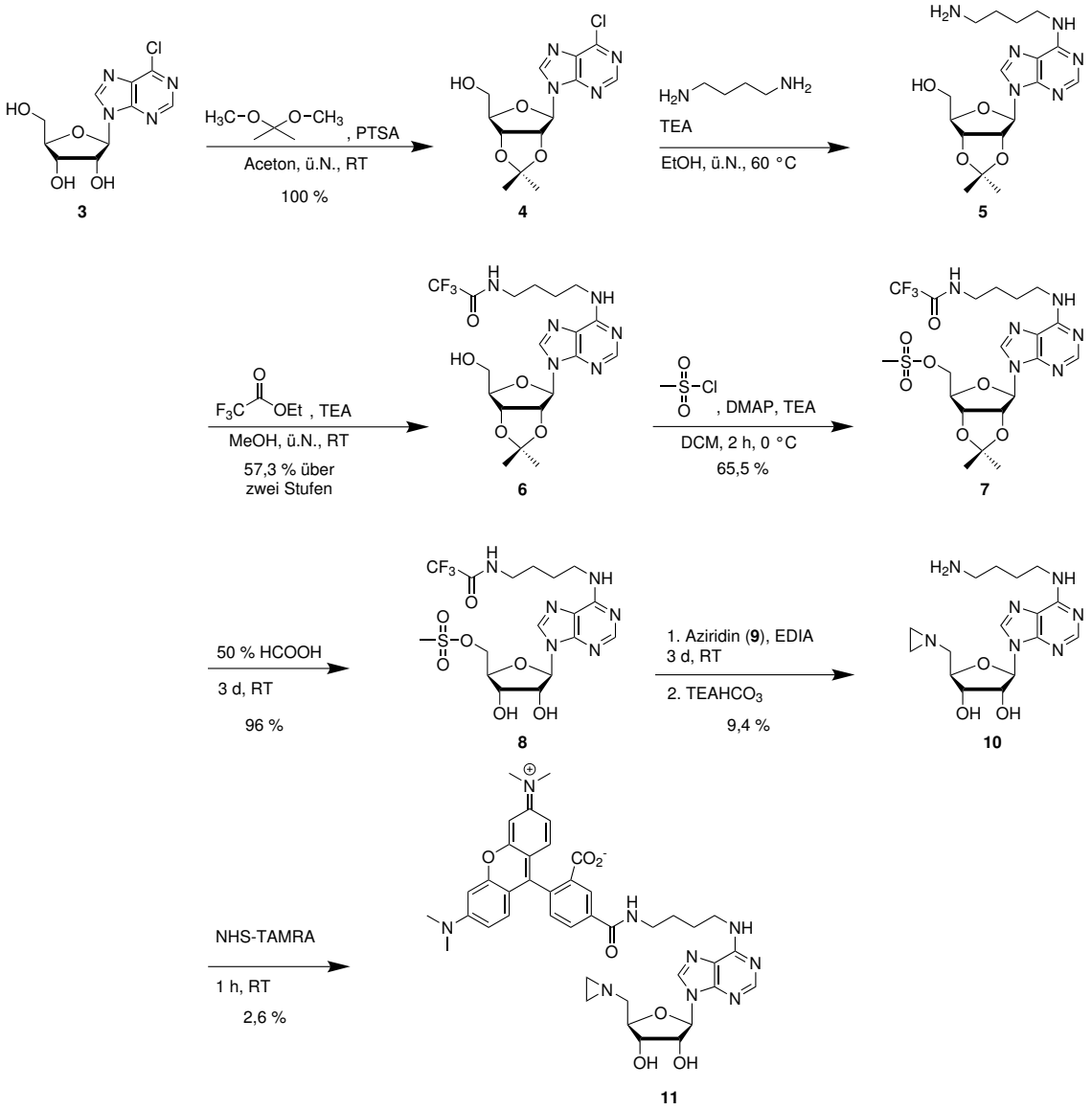


Abbildung 11: Synthese von 6TAMRAAz (**11**) aus 6-Chloro-9-(2´,3´-*O*-isopropyliden-β-D-ribofuranosyl)-purin (**3**) über sieben Stufen.

Im ersten Schritt wurden die 2´- und 3´-Hydroxygruppen von 6-Chloro-9-(2´,3´-*O*-

isopropyliden-β-D-ribofuranosyl)-purin (**3**) mit 2,2-Dimethoxypropan geschützt.[92] Anschließend wurde in der 6 Position des Puringerüsts von **4** der Linker, der später zur Bindung der Reportergruppen an den Cofaktorbaustein dient, durch aromatische Substitution des Chlorsubstituenten mit 1,4-Diaminobuten eingeführt.[93] Um einer Dimerisierung vorzubeugen, wurde mit einem Überschuss und einer entsprechend großen Verdünnung gearbeitet und die Zutropfgeschwindigkeit von 1,4-Diamobutan langsam eingestellt. Eine unvollständige Entfernung des nicht reagierten 1,4-Diaminobutans erschwerte die Ausbeutenbestimmung, sodass diese nach der Stufe und der säulenchromatographischen Aufarbeitung kombiniert über beide Schritte bestimmt wurde. Im dritten Schritt wurde die terminale Aminogruppe des Linkers von **5** als Trifluoressigsäureamid geschützt.[94] Anschließend konnte die freie 5´-Hydroxygruppe von **6** als Mesylat aktiviert werden, um nach der Entschützung der 2´- und 3´-Hydroxygruppen von **7** unter sauren Bedingungen, durch Aziridin (**9**) substituiert zu werden.[71] Aziridin wurde unmittelbar vor der Reaktion frisch mindestens zweimal auf KOH destilliert, um Reinheit durch die Kopftemperatur bei der Destillation zu überprüfen und eine mögliche Polymerisation zu vermeiden.[95] Im basischen Milieu des Triethylammoniumhydrogencarbonat-Puffers wurde die Trifluoressigsäure-Schutzgruppe des Amins im Linker entfernt und gleichzeitig der Aziridincofaktor gegen Ringöffnung und Polymerisation geschützt. Nach Aufreinigung durch *rp*-HPLC ergab sich der Cofaktorbaustein **10** zur weiteren Funktionalisierung beliebiger Art durch NHS-Kupplung. In diesem Fall wurde NHS-TAMRA zur Kupplung verwendet und der Aziridincofaktor 6TAMRAAz (**11**) nach *rp*-HPLC Aufreinigung erhalten. Die Konzentration wurde UV-spektroskopisch auf Basis der Extinktion und des Extinktionskoeffizienten von TAMRA mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes bestimmt. Um Aussagen zur Markierung von DNA mit TAMRA treffen zu können, wurde die Aktivität von M.MpeI und weiterer DNA-MTasen mit 6TAMRAAz (**11**) in zwei verschiedenen enzymatischen Aktivitätstests untersucht.

3.1.3 Markierung von Plasmid-DNA und Duplex-ODN mit 6TAMRAAz durch M.MpeI, M.SssI und M.TaqI

Die Markierungsreaktion mit 6TAMRAAz wurde zunächst zur qualitativen Überprüfung der Aktivität mit den drei verschiedenen DNA-MTasen M.MpeI, M.SssI und

M.TaqI durchgeführt. Dabei wurden jeweils zwei Reaktionsansätze mit verschiedenen Inkubationszeiten von einer Stunde und über Nacht hergestellt. Zur Kontrolle der Reaktion und zum Ausschluss falsch-positiver Ergebnisse wurden außerdem zwei Kontrollen, eine ohne Cofaktor und eine ohne MTase hergestellt. Nach der Inkubation wurde die DNA mit dem entsprechenden Restriktionsenzym versetzt und die Fragmente durch Agarose-Gelelektrophore analysiert (Abbildung 12).

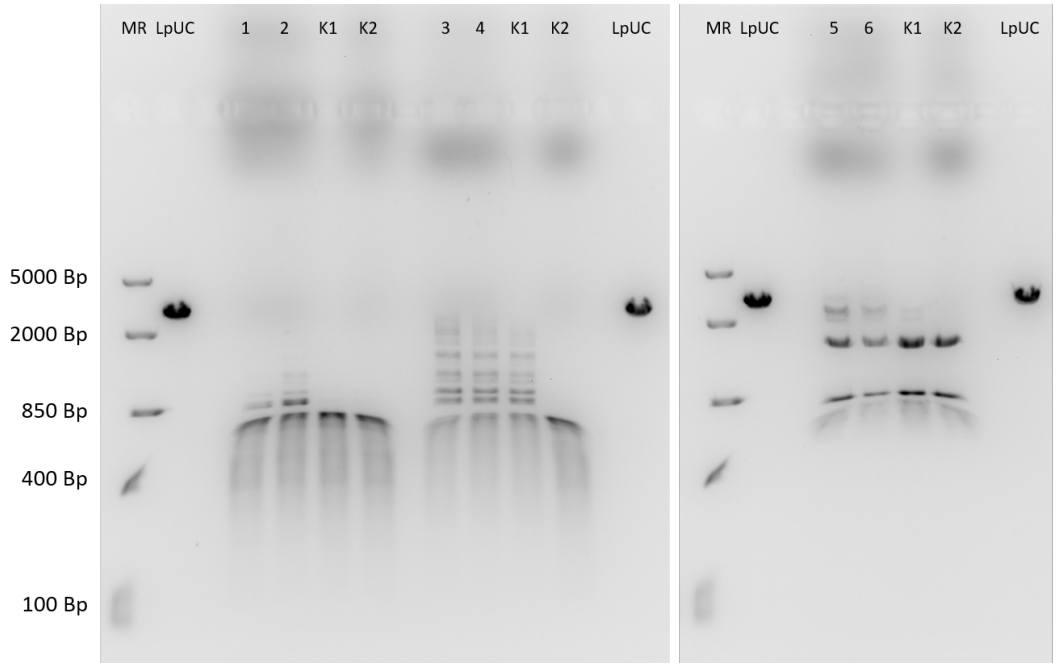


Abbildung 12: Agarosegelelektrophorese des Aktivitätstest von 6TAMRAAz (**11**) mit M.MpeI, M.SssI und M.TaqI. MR: DNA-Leiter mittlerer Länge, LpUC: R.EcoRI-linearisierte pUC-DNA Referenz, K1: Kontrolle ohne Cofaktor, K2: Kontrolle ohne MTase, 1: Reaktion mit M.MpeI für 1 h, 2: Reaktion mit M.MpeI über Nacht, 3: Reaktion mit M.SssI für 1 h, 4: Reaktion mit M.SssI über Nacht, 5: Reaktion mit M.TaqI für 1 h, 6: Reaktion mit M.TaqI über Nacht. Enzymkonzentration: 1,1 eq. bezogen auf die Erkennungssequenzen der MTase auf der DNA, DNA-Konzentration: 50 ng/µL, Cofaktorkonzentration: 40 µM.

Auf den Gelen ist zunächst eine DNA-Leiter mittlerer Länge und eine Referenz von R.EcoRI-linearisierter pUC-DNA zu sehen. In Gruppen zu je vier Spuren folgen für die DNA-MTasen die Reaktionsspuren und dann die Kontrollspuren. Für alle DNA-MTasen sind in den Reaktionsspuren oberhalb der vollständig verdauten Anteile weitere Fragmente zu erkennen, die auf eine teilweise erfolgreiche Markierungsreaktion mit 6TAMRAAz hinweisen. Für M.SssI ist außerdem in der Spur der

Kontrolle ohne Cofaktor Schutz zu erkennen, was auf eine SAM-Verunreinigung und nicht vollständige Cofaktorbefreiung der DNA-MTase hindeutet. Aufgrund der unterschiedlichen Restriktionsmuster von R.BstUI und R.TaqI sind die Aktivitäten der DNA-MTasen nur bedingt vergleichbar und durch die Gele lassen sich keine absoluten Ausbeuten treffen. Um die Aktivität quantitativ zu beurteilen wurde ein zweiter Aktivitätstest durchgeführt. Dazu wurden Duplex-ODN (24 oder 14 Bp) mit der spezifischen Erkennungssequenz der DNA-MTasen mit 6TAMRAAz (**11**) und DNA-MTase inkubiert und enzymatisch in die Nukleoside fragmentiert. Die einzelnen Nukleoside wurden durch *rp*-HPLC analysiert und auf Basis der Extinktionskoeffizienten quantifiziert. (Abbildung 13)

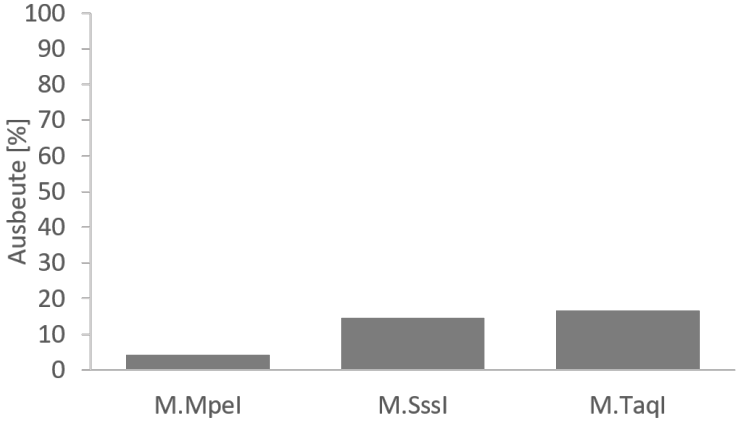


Abbildung 13: Ergebnisse der Quantifizierung der Transferaseaktivitäten von M.MpeI, M.SssI und M.TaqI mit 6TAMRAAz bestimmt durch *rp*-HPLC-Analyse des fragmentieren Duplex-ODN nach der Markierungsreaktion. Es ergaben sich Ausbeuten von 4,3 % für die Übertragung mit M.MpeI, 14,5 % mit M.SssI und 16,7 % mit M.TaqI bezogen auf zwei Zielbasen. Enzym- und DNA-Konzentration: 5 µM, Cofaktorkonzentration: 40 µM, Inkubationszeit: ü.N..

Für alle Markierungsreaktionen ergaben sich nach dem Verdau Nukleoside mit einer Absorption im 555 nm Wellenlängenbereich (Abbildung 47 - 49 im Anhang). Durch Kontrollen der Reaktion ohne MTase konnte der ursprüngliche Cofaktor 6TAMRAAz als Ursache für diese Signale ausgeschlossen werden und die Signale konnten TAMRA-modifiziertem 2´-Desoxycytidin (R_T = 32,6 min) für die Markierungsreaktion mit M.MpeI und M.SssI und TAMRA-modifiziertem 2´-Desoxyadenosin (R_T = 32,0 min) für die Reaktion mit M.TaqI zugeordnet werden. Es ergaben sich Ausbeuten von 4,3 % für die Übertragung mit M.MpeI bezogen auf zwei Zielbasen in der Erkennungssequenz, 14,5 % mit M.SssI und 16,7 % mit M.TaqI (Abbildung 13).

3.2 Zweischrittige Markierung mit doppeltaktivierten Cofaktoranaloga

Die zweite in dieser Arbeit verwendete Methode der DNA-Markierung, welche auf doppeltaktivierten Cofaktoranaloga basiert, nennt sich ***M**ethyltransferase-Directed **T**ransfer of **A**ctivated **G**roups (mTAG)* und wurde schon 2007 von Lukinavičius et. al. eingeführt.[76] Hierbei werden Analoga des natürlich vorkommenden Cofaktors und Methyldonors SAM mit synthetischen Seitenketten und DNA-MTasen genutzt, um die verlängerten Seitenketten auf die Zielbase in der DNA zu übertragen. Im Gegensatz zu aziridinbasierten Cofaktoren handelt es sich hier also um eine Transferanstatt einer Kupplungsreaktion.
Dankers entwickelte **2019** im Rahmen seiner Dissertation „Eine biochemische Domino-Reaktion zur Modifikation von biologischen Nukleophilen mit Methyltransferasen“ eine Mutante der CpG-spezifischen DNA-MTase M.MpeI, die Aktivität mit den kurzen doppeltaktivierten Cofaktoranaloga AdoYnYn (**31**) und AdoYnAzid (**17**) zeigte.[96] Diese sollte eine Alternative zu der Mutante von M.SssI (Q142A/N370A) bieten, die problematisch im Bezug auf Expression und Einkonzentrieren war.

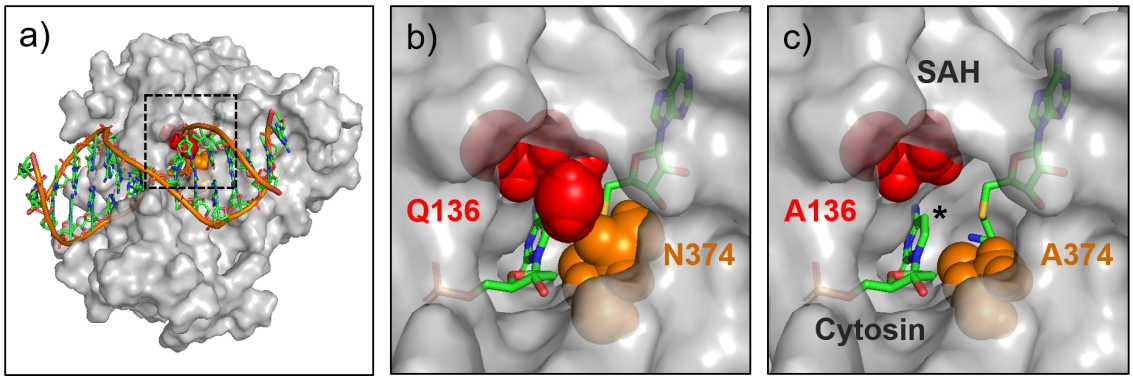


Abbildung 14: **a**) Kristallstruktur der DNA-MTase M.MpeI (4DKJ) im Komplex mit DNA und Cofaktorprodukt SAH.[67] **b**) Vergrößerte Darstellung der Box aus a. Die zu mutierenden Aminosäuren Glutamin (rot) und Asparagin (orange) sind hervorgehoben. **c**) Model der Doppelmutanten M.MpeI Q136A/N374A. Durch die Mutationen zu Alanin entsteht Platz in der Cofaktorbindungstasche (*).

Dabei orientierte er sich an Arbeiten von Klimašauskas mit der DNA-Mase M.HhaI mit der Erkennungssequenz 5´-GCGC-3´.[97] In diesem Fall wurden drei Punktmutationen in den Wildtyp der M.HhaI eingeführt, die die Cofaktorbindungstasche der

MTase vergrößerten und Platz für die synthetischen Seitenketten der doppeltaktivierten Cofaktoranaloga schufen. Die Mutation an der Position 254 von M.HhaI von Tyrosin zu Serin war in der M.MpeI natürlicherweise vorhanden. Deshalb wurden nur die beiden Mutationen an Position 82 von Glutamin zu Alanin (136 in M.MpeI) und 304 von Asparagin zu Alanin (374 in M.MpeI) übernommen und die Doppelmutante M.MpeI Q136A/N374A erzeugt. Diese Mutationen führen zu mehr Platz in der Cofaktorbindungstasche und machen die Übertragung längerer synthetischer Seitenketten möglich (Abbildung 14).

3.2.1 Dockingexperimente

Die von Dankers entwickelte Mutante M.MpeI Q136A/N374A sollte zunächst *in silico* analysiert werden, um dann computergestützte Cofaktoroptimierung zu betreiben. Die Analyse der Cofaktorbindungstasche mit dem Werkzeug *Binding Site* im Computerprogramm Maestro Schroedinger bestätigte, dass durch die eingeführten Mutationen mehr Raum für synthetische Seitenketten im Vergleich zum Wildtyp zur Verfügung steht (Abbildung 15). Jedoch legt die Analyse nahe, dass kürzere Cofaktoranaloga höhere Aktivitäten mit der MTase aufweisen, da hier eine bessere Passung in die Bindungstasche vorhanden sein könnte.

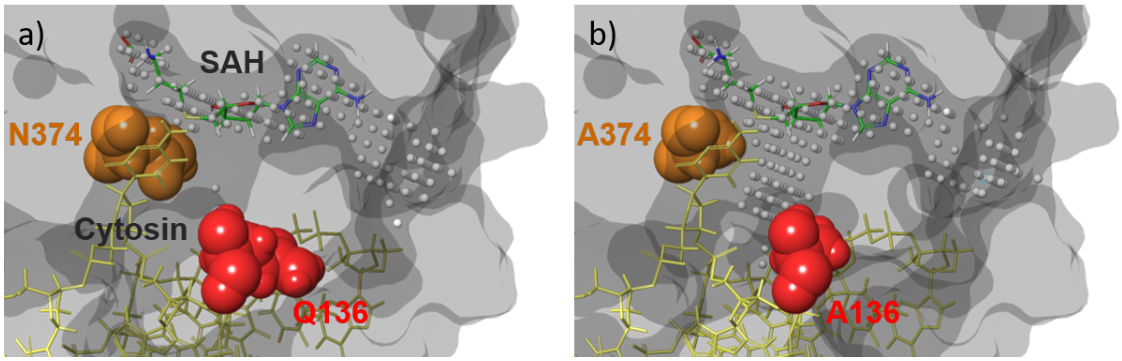


Abbildung 15: Analyse der Bindungstaschen des **a**) M.MpeI Wildtyps und der Mutante **b**) M.MpeI Q136A/N374A mit dem Programm Maestro von Schroedinger.[89] Weiße Punkte stellen die, mit dem Werkzeug *Binding Site* analysierte, Bindungstasche dar. In der Mutanten existiert mehr Platz für synthetische Seitenketten von Cofaktoranaloga.

Aufgrund der Möglichkeit der weiteren Funktionalisierung der auf die DNA übertragenen Seitenkette durch *Strain-Promoted Azide Alkyne Cycloaddition (SPAAC)*

Click-Chemie lag der Fokus bei der Optimierung auf dem Azid-Cofaktor AdoYnAzid (**17**). Dieser enthält drei Methylengruppen zwischen der aktivierenden Dreifachbindung in β-Position zum Sulfoniumzentrum und der Azidgruppe. Eine Verkürzung der Seitenkette durch Reduzierung der Methylengruppen könnte die Möglichkeit der SPAAC-Funktionalisierung bieten und gleichzeitig eine höhere Aktivität mit der Mutante M.MpeI Q136A/N374A liefern.

3.2.2 Synthese und Aktivität von Azid-Cofaktoren mit verschiedenen Linkerlängen

Um die Azid-Cofaktoren mit Seitenketten unterschiedlicher Länge miteinander vergleichen zu können, wurde zunächst der Cofaktor, den Dankers bereits verwendete, synthetisiert (Abbildung 16).

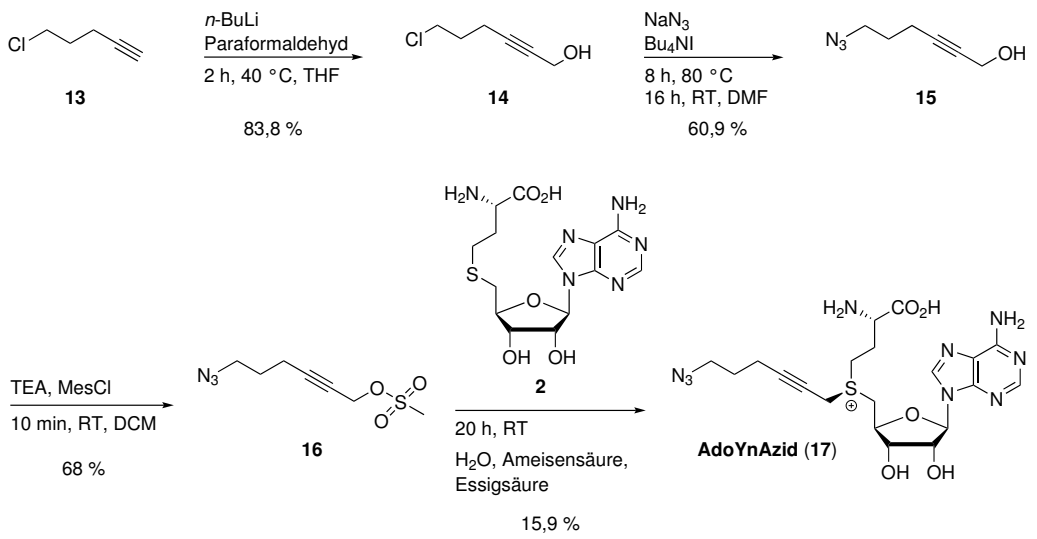


Abbildung 16: Übersicht der Synthese von AdoYnAzid (3C) (**17**) aus 5-Chlorpent-1-in (**13**) in vier Stufen.

Die Synthese von AdoYnAzid (3C) (**17**) wurde analog zu Lukinavičius ausgehend von 5-Chlorpent-1-in (**13**) durchgeführt.[79] Dieses wurde in einer Lösung aus *n*-BuLi in THF durch Paraformaldehyd hydroxymethyliert. Das Rohprodukt wurde durch Extraktion aufgereinigt und es ergab sich **14** als gelbliches Öl. Das Chlorid **14** wurde mit Azid substituiert und die Reinheit von **15** durch NMR aufgrund der ähnlichen Retentionszeiten von Edukt und Produkt bei der Chromatographie bestätigt. Zur

Kupplung an SAH (**2**) musste der Alkohol zunächst als Mesylat aktiviert werden. Der aktivierte Alkohol **16** wurde ohne weitere Aufreinigung mit SAH umgesetzt. Bei der Substitution entstehen beide Epimere am Schwefelatom des Cofaktors in vergleichbaren Mengen. Dies Epimere konnten anschließend durch *rp*-HPLC getrennt werden. Der Cofaktor AdoYnAzid (3C) (**17**) mit der Konfiguration, die dem aktiven SAM (**1**) entspricht, wurde in Elutionspuffer bei saurem pH-Wert gelagert, um den Zerfall zum Thioether zu minimieren.

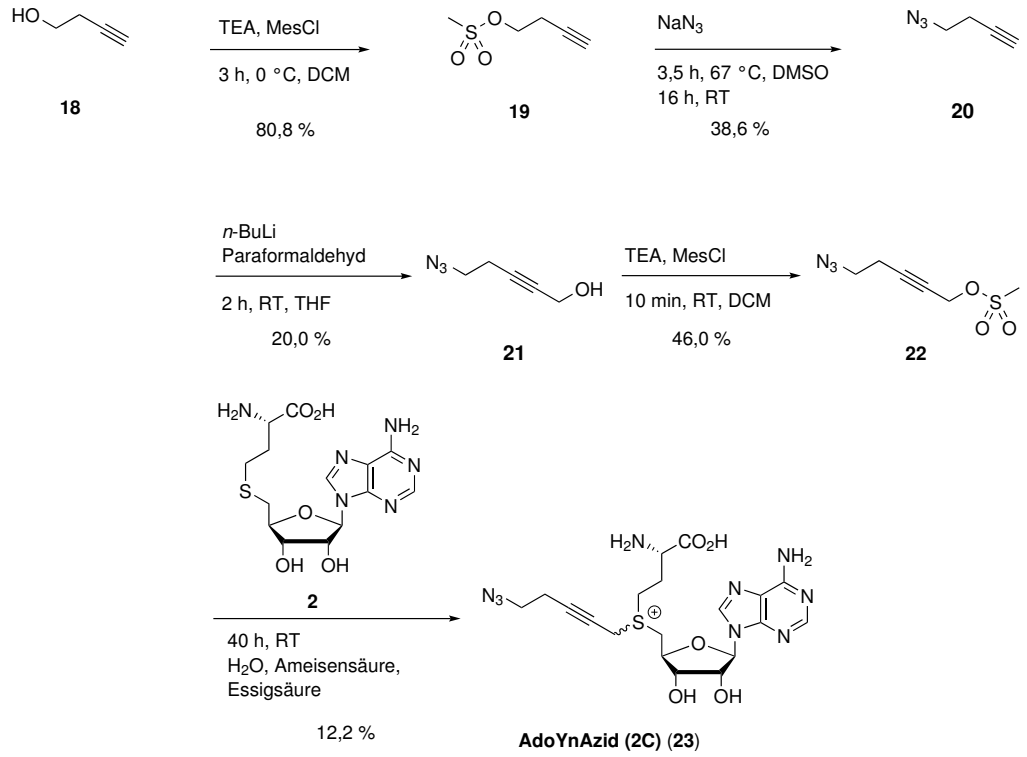


Abbildung 17: Übersicht der Synthese von AdoYnAzid (2C) (**23**) aus But-3-in-1-ol (**18**) in fünf Stufen.

Der kürzere Cofaktor AdoYnAzid (2C) (**23**) wurde entsprechend von AdoYnAzid (3C) synthetisiert (Abbildung 17). Jedoch diente ein Alkohol (But-3-in-1-ol) und kein Chlorid als Ausgangsmaterial. Dieser wurde zunächst als Mesylat **19** aktiviert, um eine Abgangsgruppe für die Substitution mit Natriumazid zu generieren. Das Azid **20** konnte nun wieder in einer Lösung aus *n*-BuLi in THF durch Paraformaldehyd hydroxymethyliert werden. Der entstandene Alkohol **21** wurde als Mesylat **22** aktiviert und ohne weitere Aufreinigung mit SAH (**2**) zu AdoYnAzid (2C) (**23**) umgesetzt. An dieser Stelle war eine Trennung der Epimere durch *rp*-HPLC aufgrund der ähnlichen Retentionszeiten nicht möglich.

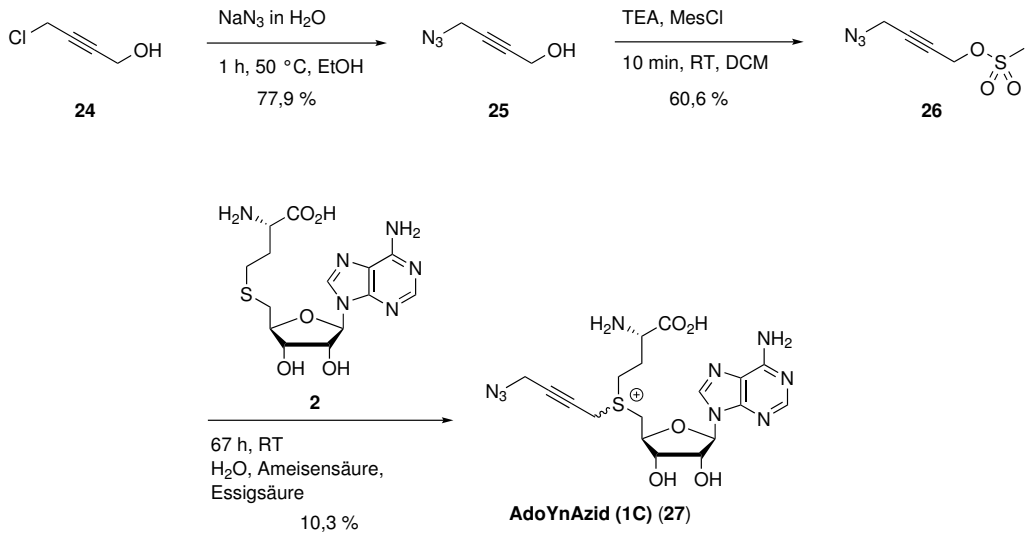


Abbildung 18: Übersicht der Synthese von AdoYnAzid (1C) (**27**) aus 4-Chlorobut-2-in-1-ol (**24**) in drei Stufen.

Der kürzeste Cofaktor AdoYnAzid (1C) (**27**) wurde nach dem gleichen Prinzip wie die beiden vorherigen Azid-Cofaktoren synthetisiert (Abbildung 18). Als Ausgangsstoff wurde 4-Chlorobut-1-in-1-ol (**24**) verwendet. Dieses wurde in einer Substitution mit Natriumazid zum Azid **25** umgesetzt. Die Reinheit wurde durch NMR nachgewiesen. Eine Aktivierung zum Mesylat **26** und Umsetzung mit SAH (**2**) führte zu dem Cofaktor AdoYnAzid (1C) (**27**). An dieser Stelle war eine Trennung der Epimere durch *rp*-HPLC aufgrund der ähnlichen Retentionszeiten ebenfalls nicht möglich. Die Aktivität der DNA-MTase M.MpeI Q136A/N374A wurde in einem Modifikations-/Restriktionstest mit allen drei Cofaktoranaloga getestet (Abbildung 19). Dafür wurden Proben ausgehend von zwei Äquivalenten M.MpeI Q136A/N374A bezogen auf die 5´-CG-3´ Erkennungssequenzen auf der DNA hergestellt und die Enzymkonzentration von Probe zu Probe halbiert. Außerdem wurden je zwei Kontrollproben, eine ohne Cofaktor und eine ohne DNA-MTase, hergestellt. M.MpeI Q136A/N374A zeigt die gleiche Aktivität mit AdoYnAzid (3C) (**17**) und AdoYnAzid (2C) (**23**). Beide Cofaktoren ergeben eine *Turn Over Number* (TON) von 0,5. Als Referenz kann eine TON von 4 mit dem natürlichen Cofaktor SAM (**1**) angegeben werden (Abbildung 50 im Anhang).

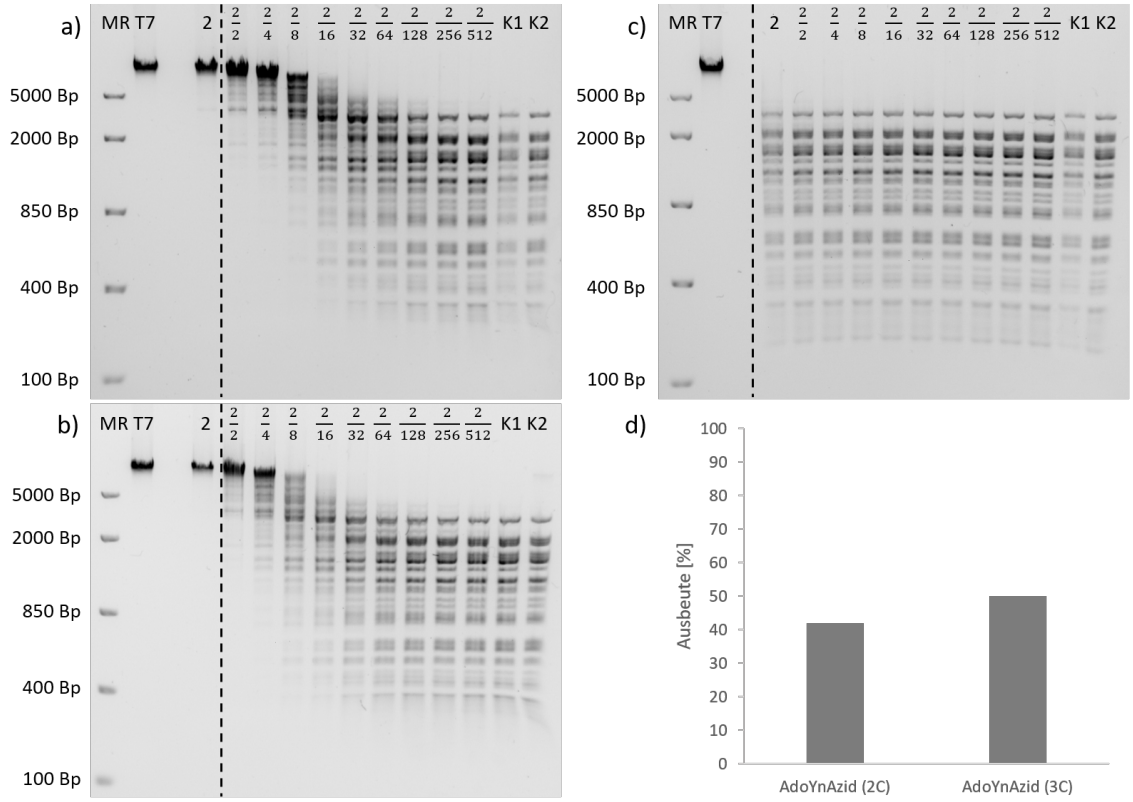


Abbildung 19: Modifikations-/Restriktionstests von M.MpeI Q136A/N374A mit den Cofaktoren **a**) AdoYnAzid (3C) (**17**), **b**) AdoYnAzid (2C) (**23**) und **c**) AdoYnAzid (1C) (**27**). Cofaktorkonzentration: 80 µM, Inkubationszeit: 1 h. MR: DNA Leiter mittlerer Länge, T7: T7-DNA Referenz, K1: Kontrolle ohne Cofaktor, K2: Kontrolle ohne MTase. Bei allen Tests wurde eine Enzym-Verdünnungsreihe ausgehend von 2 Äquivalenten MTase im Bezug auf die 5´-CG-3´ Erkennungssequenzen auf der DNA durchgeführt. M.MpeI Q136A/N374A zeigt vergleichbare Aktivität mit AdoYnAzid (3C) (**17**) und AdoYnAzid (2C) (**23**). Es ist keine Aktivität mit AdoYnAzid (1C) (**27**) vorhanden, was an der vollständigen Fragmentierung durch Restriktionsendonuklease zu erkennen ist. **d**) Ergebnisse der Quantifizierung der Transferaseaktivität mit AdoYnAzid (3C) (**17**) und AdoYnAzid (2C) (**23**) bestimmt durch *rp*-HPLC des fragmentierten Duplex-ODN nach der Modifikationsreaktion. Es ergaben sich Ausbeuten von 50 % für AdoYnAzid (3C) (**17**) und 42 % für AdoYnAzid (2C) (**23**) bezogen auf zwei Zielcytosine. Enzym- und DNA-Konzentration: 5 µM, Cofaktorkonzentration: 80 µM, Inkubationszeit: 1 h.

Die Ergebnisse der Quantifizierung der Transferaseaktivität mit AdoYnAzid (3C) (**17**) und AdoYnAzid (2C) (**23**) bestimmt durch *rp*-HPLC des fragmentierten Duplex-ODN nach der Modifikationsreaktion ergaben Ausbeuten von 50 % für AdoYnAzid (3C) (**17**) und 42 % für AdoYnAzid (2C) (**23**) bezogen auf zwei Zielcytosine (Abbildung 19 d)). Die Verkürzung der Seitenkette um eine Methylengruppe zeigt gegen-

über dem ursprünglichen Cofaktor keine kinetischen Vorteile. Aufgrund der etwas aufwendigeren Synthese und der geringeren Ausbeute werden weitere Optimierungsversuche mit dem ursprünglichen Cofaktor AdoYnAzid (3C) (**17**) durchgeführt. Für AdoYnAzid (1C) (**27**) ist keine Aktivität mit M.MpeI Q136A/N374A vorhanden. Dies kann an der vollständigen Fragmetierung der DNA durch Restriktionsendonuklease erkannt werden, da folglich keine Übertragung des Cofaktorseitenkette stattgefunden hat. *rp*-HPLC-Analysen zur Stabilität von AdoYnAzid (1C) (**27**) in Reaktionspuffer zeigten einen nahezu vollständigen Zerfall nach wenigen Minuten. Es wird vermutet, dass die Azidgruppe am gleichen C-Atom wie die Dreifachbindung die Addition von Wasser an die Dreifachbindung fördert und so der Cofaktor unbrauchbar für Markierungsreaktionen durch DNA-MTasen wird.[79]

3.2.3 Zweischrittige Modifikationsreaktion mit AdoYnAzid und DBCO-TAMRA

Folglich wurde die zweischrittige Modifikationsreaktion mit AdoYnAzid (**17**) und anschließender Click-Reaktion mit DBCO-Fluorophor-Konjugate, in diesem Fall DBCO-TAMRA, weiter untersucht. Besonderheiten der DNA-MTase M.MpeI lagen dabei zum einen bei der hohen Empfindlichkeit gegenüber gelöstem Sauerstoff und zum anderen bei der Aggregation an den Reaktionsgefäßwänden. Die Oxidation durch Luftsauerstoff ist besonders für den Cysteinrest im PCQ-Motiv entscheidend, da dieses Cystein im katalytischen Mechanismus (Abbildung 2) für die Aktivierung der Zielbase Cytosin zuständig ist. Eine Oxidation unterbindet die Funktionalität, da keine kovalente Bindung zwischen Enzym und DNA mehr hergestellt werden kann. Deshalb wurden alle Reaktionsansätze unter reduktiven Bedingungen (10 mM β-Mercaptoethanol) durchgeführt. Um die Aggregation an den Reaktionsgefäßwänden zu vermeiden, wurde den Reaktionslösungen BSA (1 x) vor der Zugabe des Enzyms zugesetzt.
Die Transferaseaktivität wurde unter unterschiedlichen Bedingungen quantitativ bestimmt. Zuerst wurden die Standardbedingungen analog zum Modifikations-/ Restriktionstest gewählt. Die Quantifizierung wurde durch *rp*-HPLC Analyse des fragmentierten Duplex-ODN nach der Modifikations- und Markierungsreaktion durchgeführt (Abbildung 20).

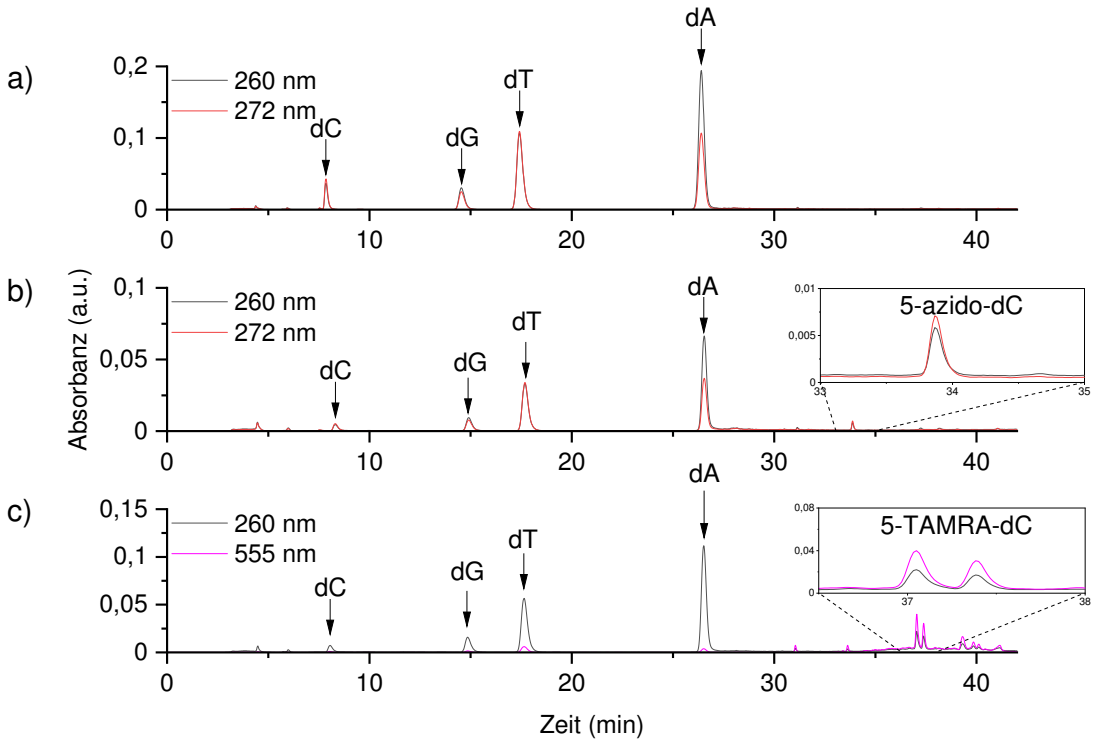


Abbildung 20: Chromatogramme der *rp*-HPLC Analyse des fragmentierten 24mer Duplex-ODN nach der **a**) Kontrollreaktion, **b**) Modifikationsreaktion mit AdoYnAzid (**17**) und **c**) Click-Reaktion mit DBCO-TAMRA. DNA-Konzentration: 5 µM, Enzymkonzentration: 50 µM, Cofaktorkonzentration: 1 mM, DBCO-TAMRA: 2 mM, Inkubationszeit: ü.N.

Im Fall der Standardbedingungen wurde der 24mer Duplex-ODN (5 µM) mit einem Äquivalent M.MpeI Q136A/N374A und AdoYnAzid (**17**, 80 µM) für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die einzelnen Nukleoside wurden durch *rp*-HPLC analysiert und wie in 5.3.1 beschrieben, auf Basis der Extinktionskoeffizienten quantifiziert. Es wurde eine Transferaseaktivität von 41 % ermittelt. Eine Steigerung der Transferaseaktivität konnte durch simultane Erhöhung der Enzym- und Cofaktorkonzentration sowie der Inkubationszeit erreicht werden. Der 24mer Duplex-ODN (5 µM) wurde mit zehn Äquivalenten M.MpeI Q136A/N374A und einem großen Überschuss AdoYnAzid (**17**) (1 mM) über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Aktivität konnte so auf 79 % Umsatz gesteigert und somit annähernd verdoppelt werden. Anschließend wurde DBCO-TAMRA in doppelter Konzentration zum Azid-Cofaktor ohne vorherige Aufreinigung der Reaktionsmischung zugesetzt und die SPAAC-Click-Reaktion über Nacht bei 37 °C durchgeführt. Die Click-Reaktion lief vollstängig ab. Die Ausbeute wurde über die Abnahme des Signals für das Azid-modifizierte Desoxycytidin

bestimmt. Somit ergab sich eine kombinierte Ausbeute von 79 % für die Markierungsreaktion über zwei Schritte (Abbildung 21).

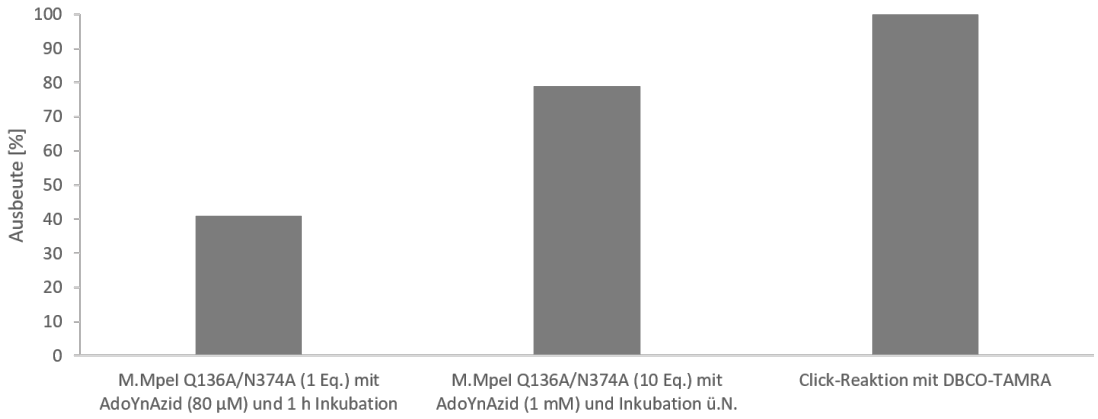


Abbildung 21: Ergebnisse der Quantifizierung der Transferaseaktivität mit AdoYnAzid (**17**) bestimmt durch *rp*-HPLC des fragmentierten 24mer Duplex-ODN nach der Modifikationsreaktion. Es ergaben sich Ausbeuten von 41 % für AdoYnAzid (**17**) unter Standardbedingungen (Enzym- und DNA-Konzentration: 5 µM, Cofaktorkonzentration: 80 µM, Inkubationszeit: 1 h.) und 79 % für AdoYnAzid (**17**) unter gesteigerten Bedingungen (DNA-Konzentration: 5 µM, Enzymkonzentration: 50 µM, Cofaktorkonzentration: 1 mM, Inkubationszeit: ü.N.) bezogen auf zwei Zielcytosine. Die anschließende SPAAC-Click-Reaktion mit DBCO-TAMRA lief vollständig ab.

3.2.4 Steigerung der Modifikationsausbeute durch MTAN

Das Cofaktorprodukt *S*-Adenosyl-L-homocystein (SAH, **2**), welches bei der Modifikationsreaktion nach der Übertragung der Seitenkette entsteht ist ein natürlicher Inhibitor für DNA-MTasen, da er im Allgemeinen eine vergleichbare Affinität wie SAM (**1**) zu den Enzymen aufweist und so nach der Reaktion die Cofaktorbindungstasche blockieren kann. Ein weiterer Weg die Modifikationsausbeute zu steigern ist daher, das Cofaktorprodukt SAH (**2**) *in situ* zu entfernen. Dazu wird hier die enzymatische Fragmentation mittels Methylthioadenosin-Nukleosidase (MTAN) gewählt. MTAN setzt SAH (**2**) zu *S*-Ribosyl-L-homocystein und Adenin um (Abbildung 22).[98]

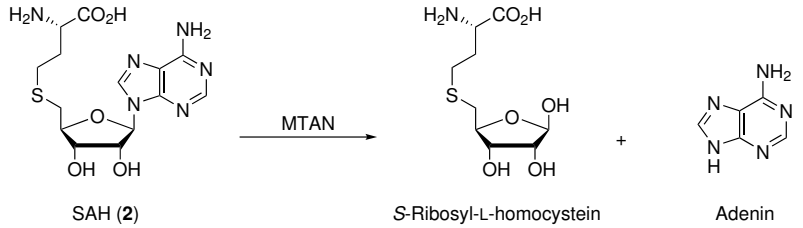


Abbildung 22: Fragmentierung von SAH (**2**) durch das Enzym Methylthioadenosinnukleosidase (MTAN) zu *S*-Ribosyl-L-homocystein und Adenin.[98]

MTAN aus *E.coli* wurde arbeitskreisintern von Kerstin Glensk nach einer Vorschrift von Lee et al. 2001 exprimiert, gereinigt und zur Verfügung gestellt.[99] Zunächst sollte die Aktivität des Enzyms ermittelt werden. Dazu wurde der Umsatz von SAH (**2**) zu Adenin durch *rp*-HPLC über eine Reaktionszeit von 40 min verfolgt. Die Anfangskonzentration von SAH (**2**) betrug 1 mM und die des Biokatalysators MTAN 0,1 µM. Die Zusammensetzung der Reaktionslösung wurde gegen die Reaktionszeit aufgetragen und aus der Steigung der linearen Regression eine TON von 172 min^{-1} bzw. 2,87 s^{-1} bestimmt (Abbildung 23). Der Vergleich mit dem Literaturwert von $2,6 \pm 0,1\ s^{-1}$ bestätigt die erfolgreiche Expression des aktiven Enzyms.[98]

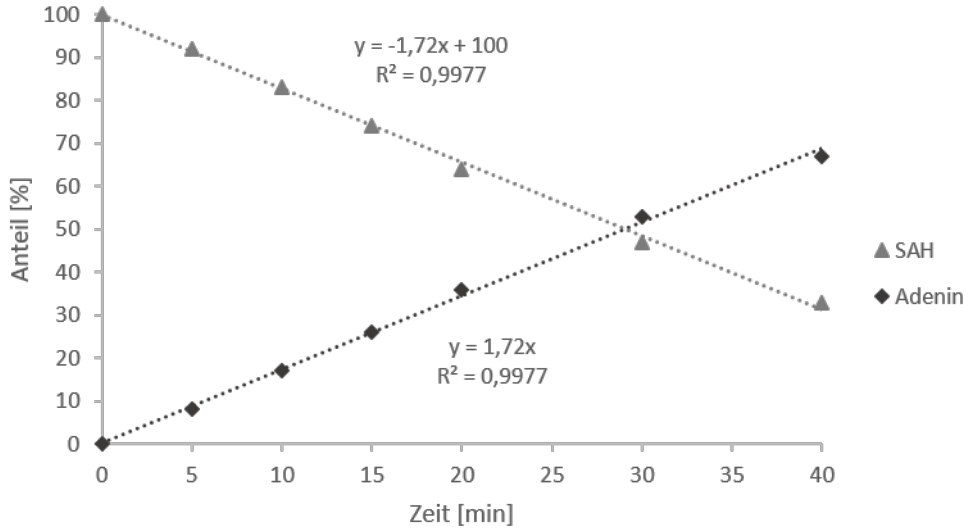


Abbildung 23: *rp*-HPLC Analyse des Umsatzes von SAH (**2**) (1 mM) zu Adenin in Gegenwart von MTAN (0,1 µM). Durch die Steigung der linearen Regression kann eine TON von 172 min^{-1} ermittelt werden.

Der Einfluss von MTAN auf die Modifikationsreaktion wurde zunächst im Modifikations-/Restriktionstests mit M.MpeI Q136A/N374A untersucht. Außerdem wurden

die gleichen Tests mit der verwandten M.SssI Q142A/N370A (3.2) durchgeführt. Die Reaktionsbedingungen entsprachen den Standardbedingungen mit einem Äquivalent Enzym bezogen auf die Erkennungssequenz 5´-CG-3´ auf der DNA. Als Cofaktor wurde AdoYnAzid (**17**) (80 µM) verwendet und die Reaktion wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert. Als Vergleich wurde der gleiche Test ohne und mit MTAN (2 µM) durchgeführt (Abbildung 24).

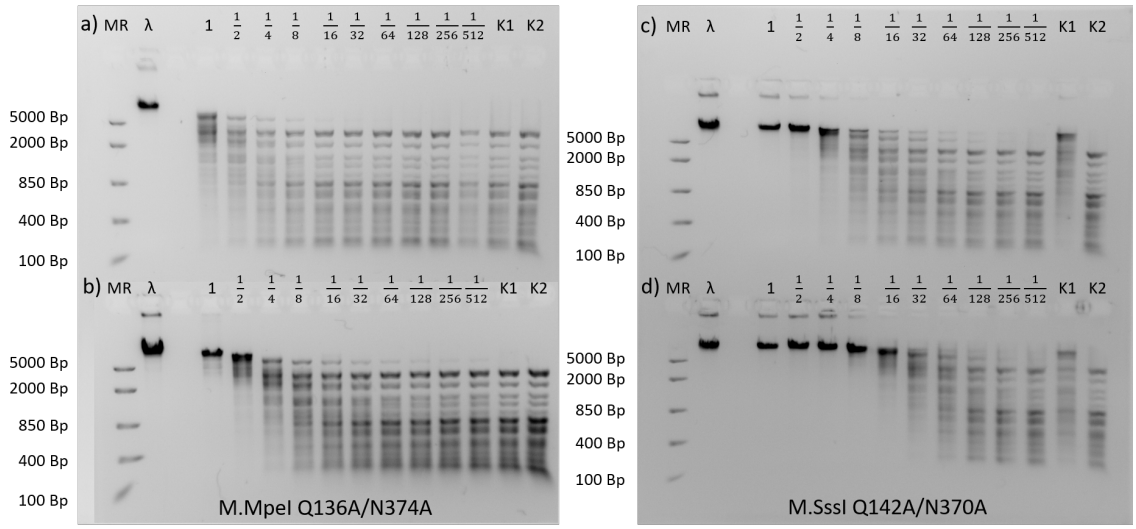


Abbildung 24: Agarose-Gelelektrophorese der Aktivitätstests von M.MpeI Q136A/N374A ohne (**a**)) und mit (**b**)) MTAN und von M.SssI Q142A/N370A ohne (**c**)) und mit (**d**)) MTAN (2 µM). AdoYnAzid (**17**): 80 µM, Inkubation: 1 h bei 37 °C. MR: DNA Leiter mittlerer Länge, λ: λ-DNA Referenz, K1: Kontrolle ohne Cofaktor, K2: Kontrolle ohne MTase. Bei allen Tests wurde eine Enzym-Verdünnungsreihe ausgehend von 1 Äquivalent MTase im Bezug auf die 5´-CG-3´ Erkennungssequenzen auf der DNA durchgeführt. Es wird deutlich, dass die TON der Enzyme um das zweifache steigt, was an dem Schutz in mindestens einer weiteren Spur des Gels sichtbar wird.

Die Aktivität der Enzyme stieg in beiden Fällen durch Verwendung von MTAN um den Faktor zwei. Dies ist an dem Schutz vor Restriktion in den Spuren mit niedrigerer Enzymkonzentration sichtbar.
Die Aktivität der DNA-MTasen M.MpeI Q136A/N374A und M.SssI Q142A/N370A ohne und mit MTAN (2 µM) wurde außerdem durch *rp*-HPLC Analyse bestimmt. Dazu wurde 24mer Duplex-ODN mit der spezifischen Erkennungssequenz der MTasen mit AdoYnAzid (**17**) (80 µM) modifiziert, durch Click-Reaktion mit einem DBCO-Fluorophor-Konjugat (DBCO-TAMRA: 160 µM oder DBCO-Sulfo-Cy5: 700 µM) markiert und enzymatisch fragmentiert. Die einzelnen Nukleoside wurden

durch *rp*-HPLC analysiert und wie in 5.3.1 beschrieben, auf Basis der Extinktionskoeffizienten quantifiziert. Die Ausbeute des zweiten Schritts wurde durch Abnahme des mit Azid-modifizierten Desoxycytidins berechnet. Die Click-Reaktion lief immer vollständig ab, sodass die Gesamtausbeute der zweischrittigen Markierungsreaktion allein von der DNA-Modifikation mit Azid abhängt. Die Ausbeute der DNA-Modifikation bezogen auf zwei Zielcytosine wurde graphisch dargestellt (Abbildung 25).

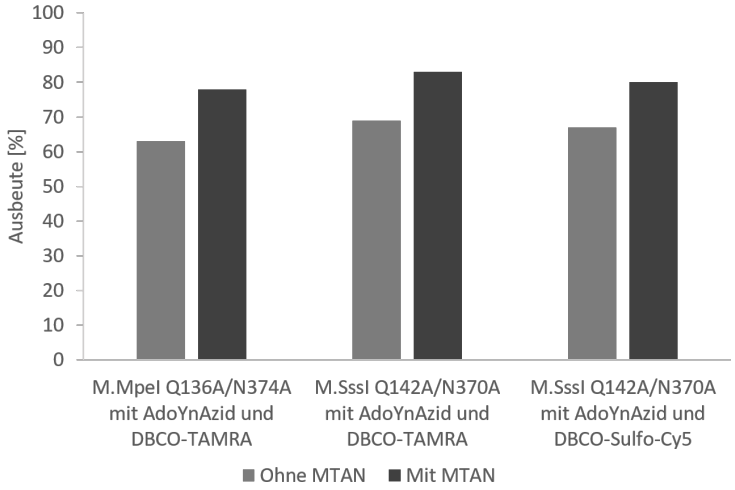


Abbildung 25: Ergebnisse der Quantifizierung der Transferaseaktivitäten von M.MpeI Q136A/N374A und M.SssI Q142A/N370A ohne und mit MTAN bestimmt durch *rp*-HPLC Analyse des fragmentieren Duplex-ODN nach der Markierungsreaktion. Es ergaben sich Ausbeuten von 63 % ohne und 78 % mit MTAN für die Übertragung mit M.MpeI Q136A/N374A und 69 % bzw. 67 % ohne und 83 % bzw. 80 % mit MTAN für die Übertragung mit M.SssI Q142A/N370A bezogen auf zwei Zielcytosine. Enzym- und DNA-Konzentration: 5 µM, Cofaktorkonzentration: 80 µM. Inkubationszeit: ü.N.. DBCO-TAMRA: 160 µM, DBCO-Sulfo-Cy5: 700 µM. MTAN: 2 µM.

Es wird deutlich, dass die Verwendung von MTAN wie zuvor (Abbildung 24) in beiden Fällen einen positiven Effekt auf die Modifikationsreaktion zeigt. Unterschiede in den Aktivitäten lassen sich durch die unterschiedlichen Testverfahren begründen. Im Fall der Modifikations-/Restriktionstests liegt eine sehr lange DNA mit sehr vielen Erkennungssequenzen vor während im HPLC-Test ein Duplex-ODN mit einer Erkennungssequenz verwendet wird. Außerdem wird im M/R-Test die Modifikation nur einer Zielbase bestimmt, da die REasen bereits hemimethylierte Erkennungssequenzen zumeist nicht mehr fragmentieren. Somit kann auch nur die Kinetik der

ersten Übertragung betrachtet werden. Beim HPLC-Test dagegen, kann zwischen der Modifikation der ersten und der zweiten Zielbase nicht unterschieden werden. Trotz dessen ist in beiden Enzym-Tests eine Modifikationssteigerung durch die Verwendung von MTAN deutlich zu erkennen.

3.2.5 Untersuchung der Spezifität

M.MpeI Q136A/N374A wurde als Alternative zu M.SssI Q142A/N370A entwickelt und zeigt nach Optimierung der Reaktionsparameter vergleichbare Aktivität. Darüber hinaus bietet M.MpeI Q136A/N374A den Vorteil der höheren Ausbeute bei der Expression und der Möglichkeit, das Enzym höher zu Konzentrieren, ohne dass es aggregiert. Dadurch lassen sich auch Reaktionsansätze mit höheren DNA-Konzentrationen realisieren. Zum weiteren Vergleich der Enzyme wurde außerdem die Spezifität untersucht. Dazu wurde der bereits beschriebene Test zur Quantifizierung der Transferaseaktivität mit beiden Wildtyp und Mutanten Enzymen mit SAM als Cofaktor auf unspezifischer DNA durchgeführt (Abbildung 26). Es wurde das gleiche 12mer Duplex-ODN verwendet, nur die 5´-CG-3´ Zielsequenz wurde durch 5´-GC-3´ ersetzt.

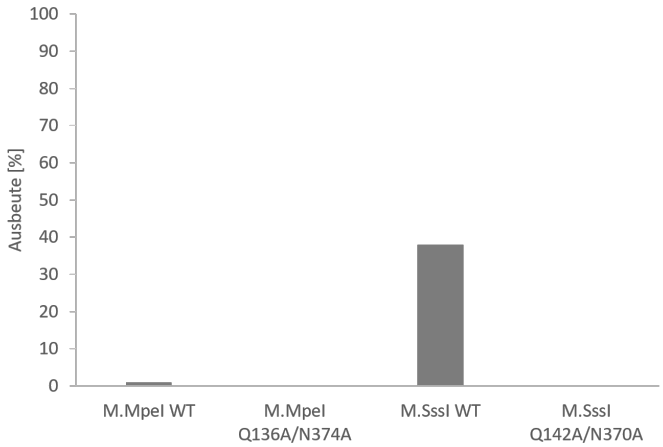


Abbildung 26: Ergebnisse der Quantifizierung der Transferaseaktivitäten von M.MpeI, M.MpeI Q136A/N374A, M.SssI und M.SssI Q142A/N370A durch *rp*-HPLC Analyse des fragmentieren unspezifischen Duplex-ODN nach Inkubation mit SAM. Es ergaben sich Ausbeuten von 1 % für die Übertragung mit M.MpeI WT und 38 % für die Übertragung mit M.SssI WT bezogen auf alle möglichen Cytosine. Die Mutanten zeigten keine Aktivität mit unspezifischer DNA. Enzym- und DNA-Konzentration: 5 µM, Cofaktorkonzentration: 80 µM, Inkubation: 1 h.

Beide Wildtyp Enzyme zeigten Aktivität mit unspezifischer DNA. Für M.MpeI WT ergab sich eine Ausbeute von 1 %, für M.SssI WT von 38 %. Die Ausbeuten wurden auf alle Cytosinreste im Duplex-ODN bezogen, da es aufgrund der Unspezifigkeit keine Zielcytosine gibt. Beide Mutanten zeigten keine Aktivität mit unspezifischer DNA. Die Spezifität kann also nicht also mögliches Entscheidungskriterium für eins der beiden Enzyme verwendet werden, wenn die Mutanten verglichen werden.

3.3 Einschrittige Markierung mit doppeltaktivierten Cofaktoranaloga

3.3.1 Modifikation mit M.HhaI

Die DNA-MTase M.HhaI besitzt die Erkennungssequenz 5´-GCGC-3´ und modifiziert den ersten Cytosinrest in der Erkennungssequenz. Sie ist prinzipiell auch zur CpG-Methylierungsdetektion geeignet, hat aber im Vergleich zu den 5´-CG-3´-spezifischen Enzymen den Nachteil, dass nur eine Teilmenge der CpGs analysiert werden kann. Die Mutante der DNA-MTase M.HhaI Q82A/Y254S/N304A, welche als Vorbild für die Mutationen von sowohl M.MpeI als auch M.SssI diente, zeigt ein erweitertes Aktivitätsspektrum mit doppeltaktivierten Cofaktoranaloga im Vergleich zu den 5´-CG-3´ spezifischen DNA-MTasen. Zusätzlich zu kurzen verlängerten Seitenketten, wie die der Cofaktoranaloga AdoYnAzid (**17**) und AdoYnYn (**31**), ist M.HhaI Q82A/Y254S/N304A in der Lage, lange verlängerte Seitenketten, die Reportergruppen wie Fluorophore enthalten, direkt in einem Schritt auf die DNA zu übertragen. Die Transferaseaktivität von M.HhaI Q82A/Y254S/N304A soll daher nicht nur als zweischrittige Markierungsreaktion, sondern auch direkt in einem Schritt durch die Verwendung fluoreszierender doppeltaktivierter Cofaktoranaloga untersucht werden. Dazu wurden zunächst doppeltaktivierte fluoreszierende Cofaktoranaloga auf Basis von AdoYnYn (**31**) durch kupferkatalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) mit Fluorophor-Azid-Konjugaten hergestellt. Die Aktivität dieser wurde zunächst in einem Standard Modifikations-/Restriktionstest mit der Adenin-spezifischen DNA-MTase M.TaqI getestet. Alle synthetisierten Cofaktoren zeigten Aktivität in der Markierungsreaktion (Abbildung 27).

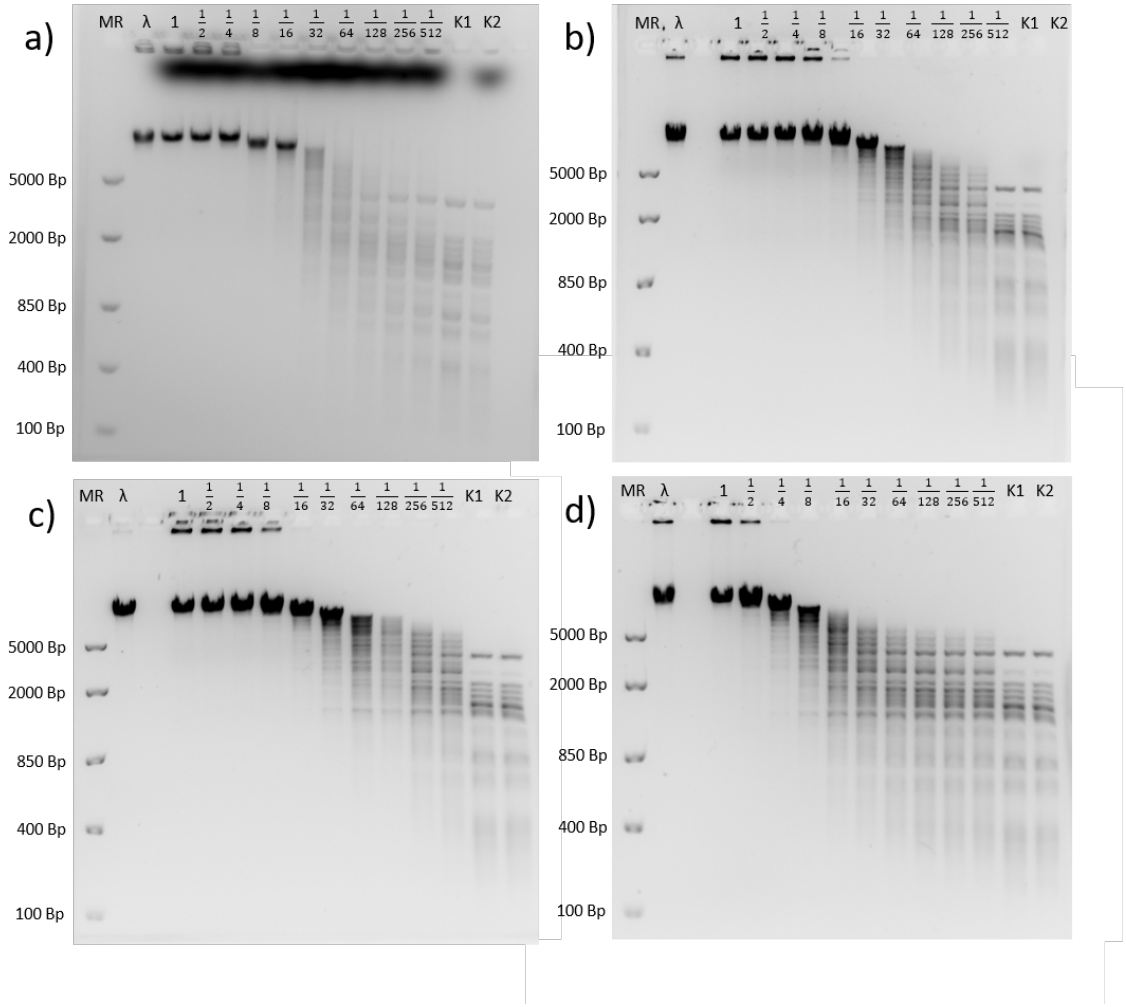


Abbildung 27: Aktivitätstests der fluoreszierenden Cofaktoranaloga mit M.TaqI. Cofaktorkonzentration: 80 µM, Inkubation: 1 h bei 65 °C. MR: DNA-Leiter mittlerer Länge, λ: λ-DNA Referenz, K1: Kontrolle ohne Cofaktor, K2: Kontrolle ohne MTase. Bei allen Tests wurde eine Enzym Verdünnungsreihe ausgehend von 1 Äquivalent MTase im Bezug auf die 5´-TCGA-3´ Erkennungssequenzen auf der DNA durchgeführt. **a**) AdoYnTAMRA (**32**), **b**) AdoYnATTO643 (**33**), **c**) AdoYnCF640R (**34**), **d**) AdoYnAF647 (**35**). Alle verwendeten Cofaktoren zeigten Aktivität.

Daraufhin wurden analoge Modifikations-/Restriktionstests mit M.HhaI Q82A/Y254S/N304A und diversen Cofaktoranaloga durchgeführt und die TON des Enzyms bestimmt (Abbildung 51 - 53 im Anhang). Für den natürlichen Cofaktor SAM ergab sich eine TON von 2 - 4 je nach verwendetem Puffer (CutSmart-Puffer/M.HhaI-Puffer). Die Azid-Cofaktoren AdoYnAzid (3C) (**17**) und AdoYnAzid (2C) (**23**) zeigten auch hier eine vergleichbare Aktivität bei einer TON von 4. Die fluoreszierenden Cofaktoren zeigten mit M.HhaI Q82A/Y254S/N304A eine

geringere Aktivität als mit M.TaqI, aber auch diese lag für AdoYnTAMRA, AdoYnCF640R und AdoYnATTO643 in einem ähnlichen Bereich leicht unter 1. Lediglich AdoYnAF647 zeigte in keiner der Spuren deutlichen Schutz, sodass keine TON bestimmbar war. Es lässt sich jedoch festhalten, dass sie deutlich kleiner als 1 ist.
Auch mit M.HhaI Q82A/Y254S/N304A wurden Tests zur Quantifizierung der Transferaseaktivität mit kurzen Duplex-ODN (24mer) durchgeführt. Dabei wurde einerseits die zweischrittige Markierungsreaktion mit Azid-Cofaktoren und Click-Reaktion mit DBCO-TAMRA (Abbildung 28) und andererseits die einschrittige Markierungsreaktion mit fluoreszierenden Cofaktoranaloga untersucht.

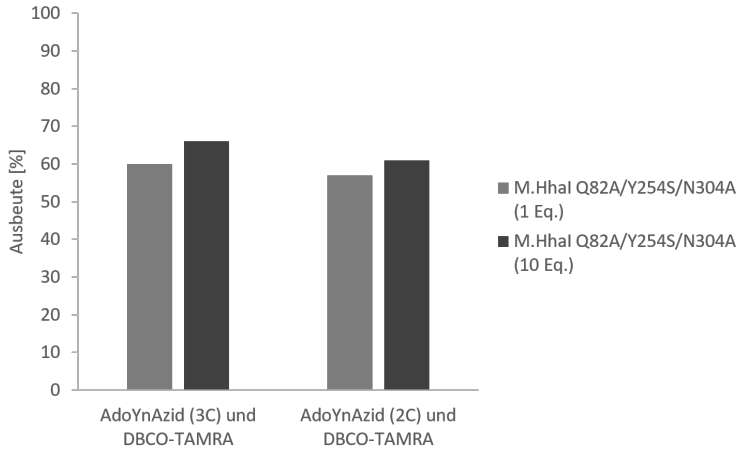


Abbildung 28: Quantifizierung der Transferaseaktivität von M.HhaI Q82A/Y254S/N304A mit Azid-Cofaktoren. Dargestellt sind Gesamtausbeuten der zweischrittigen Markierungsreaktion, wobei die Click-Reaktion im zweiten Schritt immer vollständig ablief. Im Vergleich von einem Äquivalent zu zehn Äquivalenten sind nur minimale Umsatzverbesserungen messbar. Die Aktivität mit AdoYnAzid steigt von 60 % auf 66 %. Die Aktivität mit AdoYnAzid (2C) steigt von 57 % auf 61 %. DNA-Konzentration: 5 µM, Enzymkonzentration: 5 µM/50 µM, Cofaktorkonzentration: 80 µM. DBCO-TAMRA 160 µM, Inkubation 1 h.

In der zweischrittigen Markierungsreaktion wurden AdoYnAzid (3C) (**17**) und AdoYnAzid (2C) (**23**) zur Modifikation des Duplex-ODN verwendet. Beide Azid-Cofaktoren zeigten wie zuvor mit M.MpeI Q136A/N374A ähnliche Aktivitäten von 60 % und 57 %. Analog zu 3.2.3 steigt auch hier die Transferaseaktivität bei gesteigerten Enzymäquivalenten auf 66 % bzw. 61 %. Jedoch ist der Anstieg in Relation geringer, da nicht auch die Cofaktorkonzentration und Inkubationszeit gesteigert bzw. verlängert wurden.
Aufgrund der niedrigen TON wurde die einschrittige Markierungsreaktion nicht mit

AdoYnAF647 durchgeführt. Für die Markierungsreaktion mit AdoYnTAMRA ergab sich eine Ausbeute von 83 %, mit AdoYnCF640R 116 % und mit AdoYnATTO643 54 %. Die Ausbeutenberechnung der einschrittigen Markierung mit Fluorophoren ist durch den nicht vorhandenen *Second Order Filter* (5.3.1) bei der gleichzeitigen Messung von zwei Wellenlängen unter und über 350 nm fehlerbehaftet. Dadurch ist es möglich, dass rechnerisch Ausbeuten > 100 % zustande kommen. Die Untersuchung der Spezifität von M.HhaI Q82A/Y254S/N304A zeigte keine Methylierung unspezifischer DNA-Sequenzen, sodass an dieser Stelle davon ausgegangen wird, dass keine Cytosinreste außerhalb der beiden Zielcytosine in der palindromischen 5´-G<u>C</u>GC-3´ Sequenz modifiziert wurden. Es wird jedoch deutlich, dass sowohl die einschrittige als auch die zweischrittige Markierung von DNA mit M.HhaI mit verschiedenen Reportergruppen erfolgreich ist. Die Ausbeuten sind im Vergleich zu den 5´-CG-3´ spezifischen DNA-MTasen leicht erhöht und es ist eine direkte Fluoreszenzmarkierung mit fluoreszierenden Cofaktoranaloga möglich.

3.3.2 Sequenz- und Strukturvergleich von M.MpeI mit M.HhaI

Nachdem die zweischrittige Markierung mit M.MpeI Q136A/N374A durch Variation der Parameter und Verwendung von MTAN soweit optimiert worden war, bestand die Überlegung, eine einschrittige Markierung analog zu M.HhaI Q82A/Y254S/ N304A mit M.MpeI Varianten zu entwickeln. Trotz hoher Homologie von M.MpeI und M.HhaI von 27 % und Einführung der analogen Mutationen war M.MpeI Q136A/ N374A nicht in der Lage, doppeltaktivierte Cofaktoranaloga mit sterisch anspruchsvollen Seitenketten umzusetzen. Der Vergleich der Enzymsequenzen wurde mit dem *Basic Local Alignement Search Tool* (BLAST) des *National Center for Biotechnology Information* durchgeführt.[100,101] Daher sollte *in silico* analysiert werden, wo strukturelle Unterschiede zwischen den Enzymen liegen und welche Aminosäuren die Aktivität mit größeren Cofaktoranaloga blockieren. Mit Maestro Schroedinger wurden die Modelle der mutierten Enzyme M.MpeI Q136A/N374A und M.HhaI Q82A/Y254S/N304A übereinander gelegt und verglichen. Dazu wurde die Oberfläche von M.HhaI Q82A/Y254S/N304A als Netz dargestellt und die Aminosäuren von M.MpeI Q136A/N374A als einzelne Atome, um zu erkennen, welche Aminosäuren über die Oberfläche von M.HhaI Q82A/Y254S/N304A hinausragen.

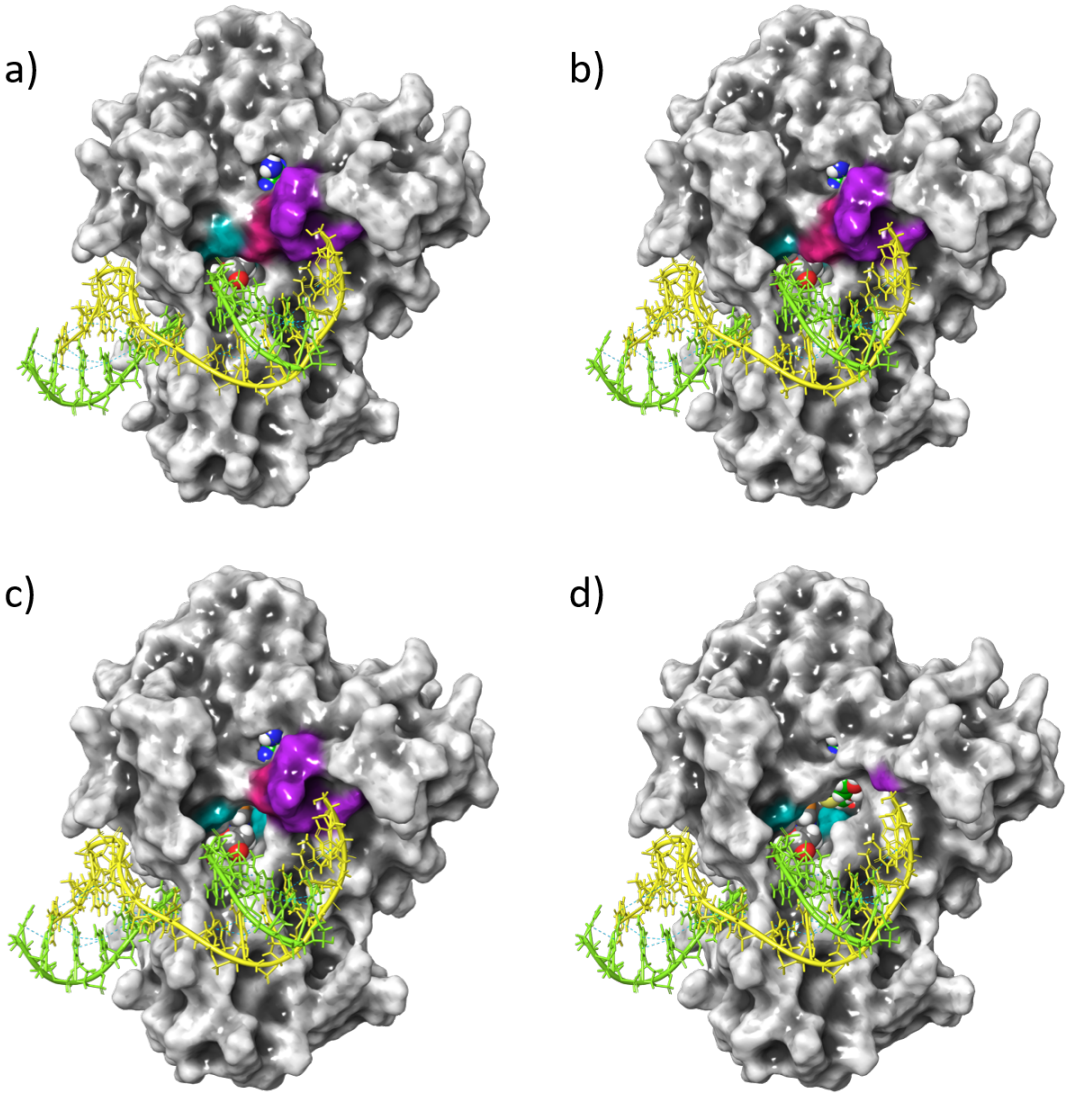


Abbildung 29: Strukturvergleich von **a**) M.MpeI, **b**) M.MpeI Q136A/N374A, **c**) M.MpeI K81A/Q136A/N374A und **d**) M.MpeI Δ78-83/Q136A/N374A mit Maestro Schroedinger. In hellblau sind die beiden Punktmutationen gezeigt, die von Dankers eingeführt wurden. In magenta die Aminosäure K81, die in M.MpeI vorhanden ist, nicht aber in M.HhaI, und den Zugang zur Cofaktorbindungstasche versperrt. In violett dargestellt ist die Schlaufe, bestehend aus den Aminosäuren 78 - 83, deren Entfernung ebenfalls Raum für lange Seitenketten doppeltaktivierter Cofaktoranaloga bieten könnte. Abbildung übernommen von Dietel.[102]

Dabei konnte eine Aminosäure identifiziert werden, die eine besondere Lage in M.MpeI Q136A/N374A hat. Es handelt sich um Lysin an Position 81 (Abbildung 29, magenta). Die Aminosäure liegt vor einem Tunnel, der in M.HhaI Q82A/Y254S/N304A vorhanden ist und Platz für die sterisch anspruchsvolleren Seitenketten der

doppeltaktivierten Cofaktoranaloga bietet. Eine Mutation dieser Aminosäure könnte also dazu führen, dass auch M.MpeI zur direkten Markierung von DNA verwendet werden könnte.

Darüber hinaus wurde ein Sequenzvergleich der homologen Enzyme M.HhaI, M.SssI und M.MpeI mit dem Programm Jalview in Kombination mit dem Werkzeug Clustal vom Max Planck Institut durchgeführt (Abbildung 30).[103–106] Die Übereinstimmungen sind in blau eingefärbt, hellblau bedeutet, dass die Übereinstimmung in zwei der Enzyme vorhanden ist, dunkelblau bedeutet, dass die Übereinstimmung in allen drei Enzymen vorhanden ist. Dargestellt sind außerdem die bereits untersuchten Mutationen von Klimašauskas (Abbildung 30, pink).[97] Wobei von den drei M.HhaI Mutationen in M.MpeI und M.SssI nur zwei eingeführt werden können, da die dritte von Tyrosin zu Serin natürlicherweise vorhanden ist. Die Aminosäure K81 in M.MpeI, die sich vor dem Tunnel zur Cofaktorbindungstasche befinden und in der Struktur von M.HhaI nicht vorhanden ist, ist in orange dargestellt. Lysin an Position 81 befindet sich in einer flexiblen Schlaufenregion, die in M.HhaI nicht vorhanden ist (Abbildung 30, gelb). Neben der Einführung einer verkleinernden Punktmutation, z.B. K81A, gäbe es auch die Möglichkeit den gesamten Schlaufenbereich in M.MpeI zu entfernen.

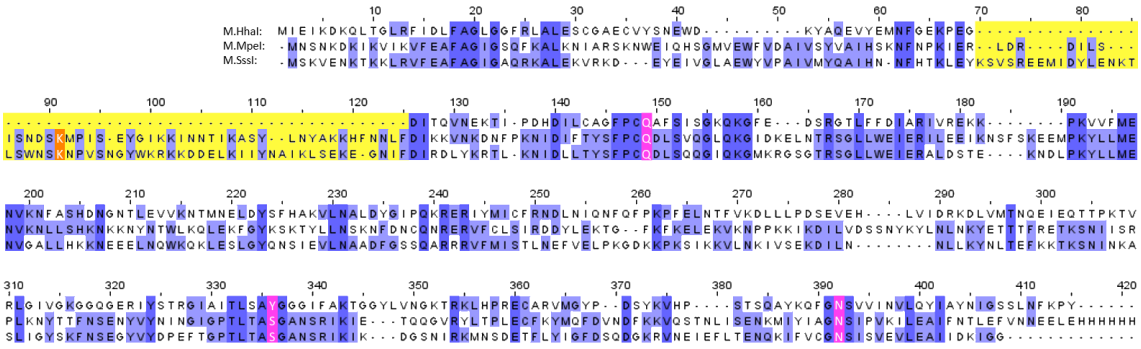


Abbildung 30: Sequenzvergleich der homologen Enzyme M.HhaI, M.MpeI und M.SssI in dem Programm Jalview.[103] Übereinstimmungen sind in blau gefärbt, hellblau bedeutet, dass die Übereinstimmung in zwei der Enzyme vorhanden ist, dunkelblau bedeutet, dass die Übereinstimmung in allen drei Enzymen vorhanden ist. Dargestellt in pink ist die Mutationen von Klimašauskas.[97] In orange Lysin 81 und in gelb ein flexibler Schlaufenbereich, der in M.MpeI und M.SssI vorhanden ist, jedoch nicht in M.HhaI. Abbildung adaptiert von Dietel.[102]

Dadurch würde viel zusätzlicher Platz für die synthetischen Seitenketten doppeltaktivierter Cofaktoranaloga entstehen. Nach Entfernen der gesamten Schlaufe *in*

silico und Analyse der neuen Oberfläche wurde deutlich, dass ein großer hydrophober Bereich des Enzyms freigelegt wird und Kontakt mit dem Lösungsmittel hat. Dies wurde als negativ für die Löslichkeit des Enzyms eingeschätzt. Ein großer Eingriff in die Sequenz der DNA-MTase könnte auch die Spezifität, sowohl der DNA- als auch der Cofaktorbindung beeinflussen, und generell zu Instabilität führen. Die evolutionäre Entstehung und Aufgabe der zusätzlichen Schlaufe, die in M.MpeI und M.SssI jedoch nicht in M.HhaI existiert, wurde jedoch nicht abschließend untersucht. Eine Notwendigkeit für die katalytische Aktivität wird nicht gesehen, da die Schlaufe in M.HhaI nicht vorhanden ist und die katalytische Übertragung hier ebenso funktionstüchtig ist, wie in den anderen C5-spezifischen DNA-MTasen. Um die Stabilität des Enzyms zu erhalten wurde aber nur ein kürzerer Bereich von sechs Aminosäuren (Position 78 bis 83) ausgewählt, der sich direkt vor dem Tunnel zur Cofaktorbindungstasche und neben der katalytischen Schlaufe befindet (Abbildung 29 violett und Abbildung 54 im Anhang). Dieser wurde entfernt und die entstehenden C- und N-Termini durch eine neue Peptidbindung verknüpft (Abbildung 55 im Anhang). Hier zeigte die Oberflächenanalyse nur einen kleinen exponierten hydrophoben Bereich. Die Cofaktorbindung und Stabilität der beiden Mutanten M.MpeI K81A/Q136A/N374A und M.MpeI Δ78-83/Q136A/N374A wurde in Dockingexperimenten und Simulationen weiter untersucht.

3.3.3 Dockingexperimente und Simulationen

Die Dockingexperimente und Simulationen wurden im Rahmen der Masterarbeit von Dietel 2021 "*Protein Engineering of DNA Cytosine-C5 Methyltransferase M.MpeI to Expand Cofactor Specificity*", durchgeführt und bereits in dieser beschrieben. An dieser Stelle wird daher nur auf das Konzept und die grundsätzliche Planung eingegangen. Weitere Ansätze zur Mutation und vertiefende Diskussionen sind in der Masterarbeit zu finden.[102] Nachdem die beiden möglichen Mutationen durch Struktur- und Sequenzvergleich als interessante Ziele identifiziert wurden, konnten sie in Maestro Schroedinger als Modell umgesetzt werden, um anschließend Dockingexperimente durchzuführen. Für die Punktmutation wurde das Mutationswerkzeug verwendet und die Energie der Proteinstruktur anschließend minimiert. Für die Deletion der sechs Aminosäuren wurden diese manuell entfernt. Die entstehenden Enden wurden durch eine neue Peptidbindung zwischen C- und N-Terminus verbunden und die Energie der Struktur wurde ebenfalls minimiert. Anschließend wurden Gitter

analog zu den vorherigen Dockingexperimenten erstellt und die Position von SAH aus der Kristallstruktur von M.MpeI (4DKJ) nachgebildet. Um im Docking sterisch anspruchsvollere Cofaktoranaloga unterbringen zu können, wurde die Boxgröße maximal gewählt. Außerdem wurden Cofaktorfragmente von AdoYnTAMRA (**32**) mit nur teilweise vorhandenem Fluorophor erstellt, da das Hauptaugenmerk auf die Seitenkette und die Möglichkeit, aus der Cofaktorbindungstasche hinauszuragen und nicht auf den speziellen Fluorophor gelegt wurde (Abbildung 56 im Anhang). Die Dockingexperimente waren für beide Mutanten erfolgreich.
Um die Stabilität der mutierten Enzyme zu beurteilen und zu sehen, ob sich nach der Mutation möglicherweise Bereiche des Enzyms so verschieben, dass der Tunnel sich wieder schließt, wurden molekular dynamische Simulationen über einen Zeitraum von 150 ns durchgeführt (Abbildung 57 im Anhang). Es wird deutlich, dass die mutierten Enzyme stabil sind, was an der geringen quadratischen mittleren Abweichung (RMSD) der Positionen der Aminosäuren zu erkennen ist. Bei der Entfernung der Schlaufe der sechs Aminosäuren wird eine etwas größere RMSD beobachtet, was aber nicht auf eine Instabilität hindeutet. Nach der Simulation wird eine Auswahl der Bilder (*frames*) der Mutanten erneut für Dockingexperimente verwendet, um auszuschließen, dass durch interne Bewegung der Enzyme die Cofaktoranaloga nicht mehr binden können. Die Dockingexperimente waren auch nach der Simulation erfolgreich, sodass beide Mutanten durch *in vitro* Mutagenese hergestellt wurden.

3.3.4 Mutagenese

Die ortsspezifische Mutagenese wurde mit dem Plasmid pET28a-M.MpeI Q136A N374A-His6 von Dankers[96] durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt. Somit konnte auf die bereits vorhandenen Mutationen aufgebaut werden.

Punktmutation zu M.MpeI K81A/Q136A/N374A

Für die Punktmutationen K81A war der Austausch von mindestens zwei Basen im Gen notwendig, um das Codon AAA was für Lysin kodiert, zu GCA für Alanin auszutauschen. Dazu wurden zwei Primer für eine inverse PCR entwickelt, die die entsprechenden mutierten Sequenzen und dadurch Fehlpaarungen zum Ursprungsplasmid enthielten (Tabelle 4, K81A V und K81A R). Aufgrund des niedrigen GC-Gehalts des M.MpeI-Gens war eine Herausforderung beim Primerdesign, die nötige

Stabilität für die Primerhybridisierung in der PCR zu erreichen. Die PCR verläuft nur linear und nicht exponentiell, da die polymerisierten Stränge aufgrund der Polymerisationsrichtung und der Primerbindungsstelle nicht erneut als Templat dienen können. Um eine Hybridisierung der Primer untereinander zu verhindern, wurden zwei PCR-Ansätze mit je einem Primer durchgeführt und die entstandenen Einzelstränge anschließend hybridisiert. An dieser Stelle ist nach der PCR keine Ligation notwendig, da durch die Überhänge der Enden davon ausgegangen werden kann, dass sich ein zirkulares Plasmid bildet. Nach der PCR folgte ein Verdau hemimethylierter DNA durch R.DpnI, um nicht mutierte DNA, welche zuvor aus *E.coli* extrahiert wurde, zu entfernen. PCR und Verdau dienten zur Vervielfältigung und Selektion des mutierten Plasmids. Nach Transformation elektrokompetenter *E.coli* DH5α Zellen mit dem mutierten Plasmid wurde auf Agar-Platten mit Kanamycin ausplattiert und Flüssigkulturen mit Einzelkolonien angeimpft.

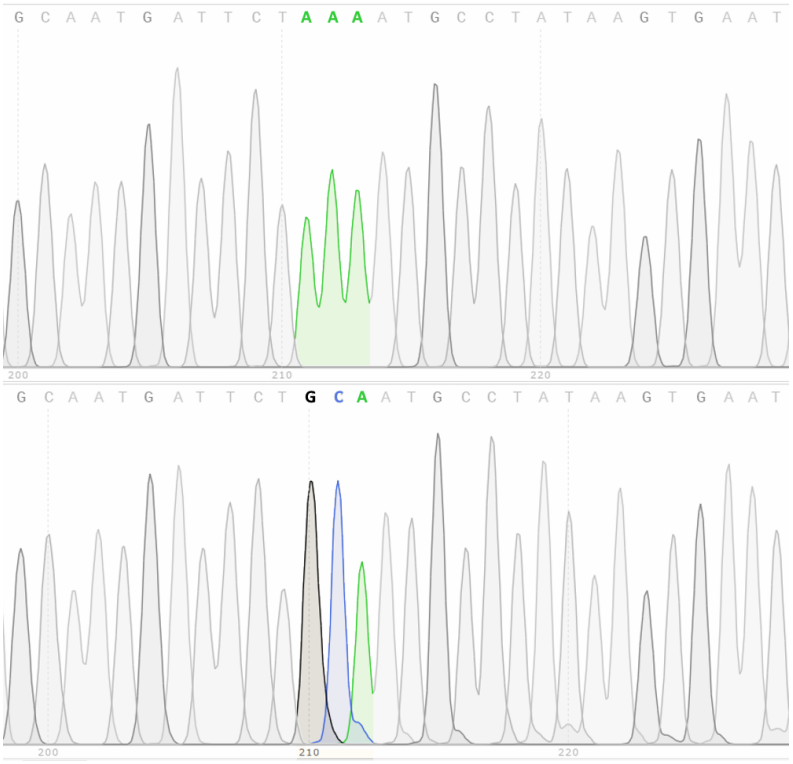


Abbildung 31: Auswertung der Sanger-Sequenzierung von den Plasmiden pET28a-M.MpeIQ136A/N374A-His6 und pET28a-M.MpeIK81A/Q136A/N374A-His6 nach ortsspezifischer Mutagenese dargestellt in SnapGene.[107] Es wird deutlich, dass eine vollständige Mutation von AAA zu GCA stattgefunden hat.

Um die erfolgreiche Mutation zu bestätigen, wurden die Plasmide mit dem QIAprep

Spin Miniprep Kit extrahiert und durch Sanger-Sequenzierung analysiert (Abbildung 31). Es wird deutlich, dass bei einem gewählten Klon eine vollständige Mutation von AAA zu GCA stattgefunden hat. Außerdem wurde das gesamte DNA-MTase-Gen sequenziert und analysiert (Tabelle 4, zusätzliche Primer für die Sequenzierung V1, V2, V3, R1, R2, R3 und R4), um ungewollte zusätzliche Mutationen ausschließen zu können.

Schlaufen Deletion zu M.MpeI Δ78-83/Q136A/N374A

Für die Deletion der Aminosäuren 78 bis 83 in M.MpeI Q136A/N374A mussten im Gen die 18 kodierenden Basen entfernt werden. Dazu wurden zwei Primer entwickelt, die jeweils am 3´ Ende des zu entfernenden Bereichs starteten (Tabelle 4, LD V und LD R). Diese waren an den 5´-Enden phosphoryliert, um eine anschließende Ligation zu ermöglichen, da die Plasmide aufgrund der stumpfen Enden nicht in zirkularer Form vorlagen und dies die Tranformation erschweren würde. Beim Primerdesign musste wieder auf eine entsprechende Länge und gut bindende Enden geachtet werden, um die Hybridisierung in der PCR zu ermöglichen. Es handelt sich hierbei um exponentielle PCR, bei der die neu polymerisierten Stränge ebenfalls als Templat dienten. Ab dem zweiten Zyklus wird der überschüssige Bereich zwischen den Primern nicht mehr abgelesen und liegt so am Ende der PCR nur in einem sehr geringen Teil der DNA-Stränge vor. Nach der PCR folgte der Verdau hemimethylierter DNA durch R.DpnI, um nicht mutierte DNA zu entfernen. PCR und Verdau dienten zur Vervielfältigung und Selektion des mutierten Plasmids. Nach Transformation chemisch kompetenter *E.coli* DH5α Zellen mit dem mutierten Plasmid, wurde auf Agar-Platten mit Kanamycin ausplattiert und Flüssigkulturen mit Einzelkolonien angeimpft. Um die erfolgreiche Mutation zu bestätigen, wurden Plasmide mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit extrahiert und durch Sanger-Sequenzierung analysiert (Abbildung 32). Die Deletion der 18 Basen war erfolgreich, was daran zu erkennen ist, dass es in der Sequenzierung keine Restsignale für die Basen gibt. Auch hier wurde das DNA-MTasen-Gen vollständig sequenziert, um ungewollte Mutationen auszuschließen.

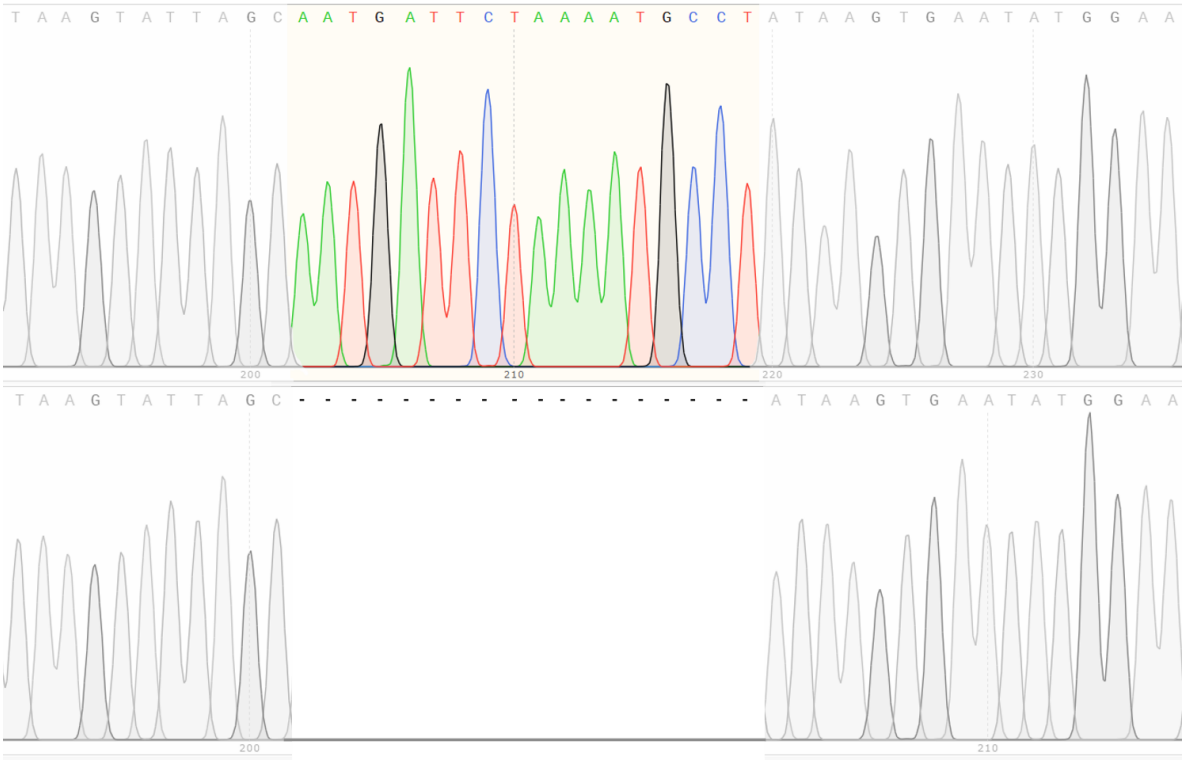


Abbildung 32: Auswertung der Sanger-Sequenzierung von den Plasmiden pET28a-M.MpeIQ136A/N374A-His6 und pET28a-M.MpeIΔ78-83/Q136A/N374A-His6 nach ortsspezifischer Mutagenese dargestellt in SnapGene.[107] Es wird deutlich, dass eine vollständige Deletion stattgefunden hat, weil keine Restsignale der ursprünglichen Aminosäuren in dem Sequenzvergleich zu erkennen sind.

3.3.5 Expression und Reinigung

Nach erfolgreicher Mutagenese wurden chemisch kompetente Expressionszellen *E.coli* SG1709 mit den mutierten Plasmiden transformiert. Die Zellen wurden ausplattiert und anschließend Flüssigkulturen mit Einzelkolonien angeimpft. Das Volumen wurde sukzessiv auf zweimal 2,5 L erhöht. Nachdem die Kulturen einen OD_{600} von 0,7 - 0,8 erreichten, wurde die Expression durch Zugabe von IPTG induziert und die Bakterien 20 h bei 190 rpm und 20 °C inkubiert. Erfolgreiche Induktion wurde durch SDS-PAGE überprüft.[102] Nach Zellaufschluss durch Ultraschall, wurde das Zielenzym mit His_6-Tag aus dem Lysat durch Nickel-NTA-Chromatographie gereinigt. Fraktionen mit hohem Anteil an Enzym und geringer Verunreinigung wurden

zusammengefügt und durch Kationen-Austausch-Chromatographie von natürlich gebundenem Cofaktor befreit. Nach Dialyse über Nacht in Dialyse-Puffer konnte die Reinheit der DNA-MTasen M.MpeI K81A/Q136A/N374A (47,1 kDa) und M.MpeI Δ78-83/Q136A/N374A (46,5 kDa) durch SDS-PAGE kontrolliert werden (Abbildung 33).[102] Im Laufverhalten ist der Molekulargewichtsunterschied von ca. 600 Da zwischen den Enzymen sichtbar. Bis zur Verwendung fand die Lagerung in Dialyse-Puffer bei - 20 °C statt.

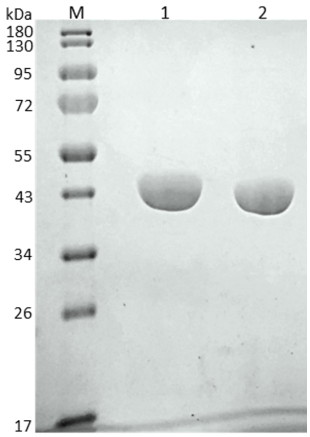


Abbildung 33: SDS-Gel nach erfolgreicher Expression und Reinigung der mutierten Enyzme M.MpeI K81A/Q136A/N374A (47,1 kDa, Spur 1) und M.MpeI Δ78-83/Q136A/N374A (46,5 kDa, Spur 2). Als Größenvergleich wurde ein Proteinmarker (*Prestained Protein Ladder*) aufgetragen, dessen Molekulargewichte angegeben sind. Im Laufverhalten ist der Gewichtsunterschied von ca. 600 Da zwischen den Enzymen sichtbar.

3.3.6 Untersuchung der enzymatischen Aktivität

Um die enzymatische Aktivität der mutierten DNA-MTasen zu untersuchen, wurde zunächst ein Standard Modifikations/Restriktionstest mit dem natürlichen Cofaktor SAM (**1**) durchgeführt (Abbildung 34). Die Aktivität von M.MpeI Q136A/N374A und M.MpeI K81A/Q136A/N374A liegt im selben Bereich mit einer TON von 1. M.MpeI Δ78-83/Q136A/N374A zeigt so gut wie keine Aktivität mit SAM (**1**) nach einer Stunde Inkubation, was an der vollständigen Fragmentierung durch Restriktionsendonuklease zu erkennen ist.

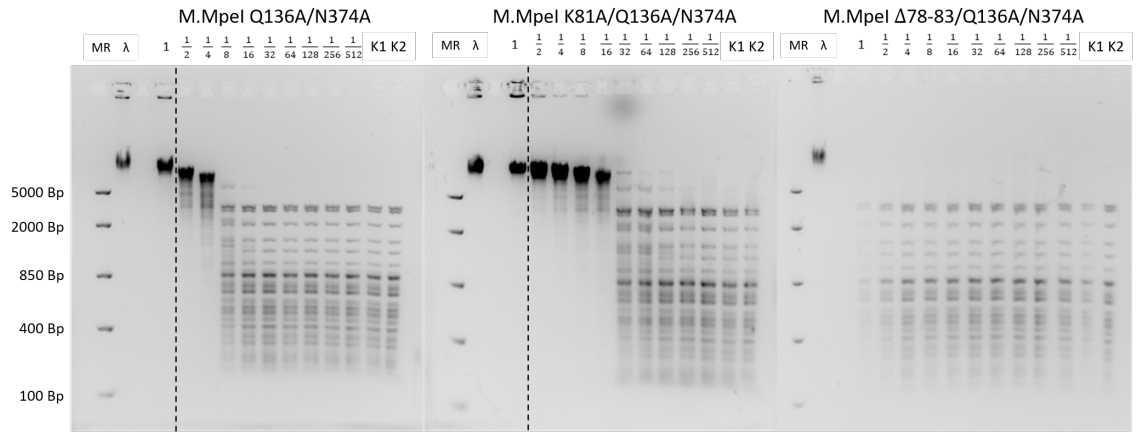


Abbildung 34: Modifikations/Restriktionstests von M.MpeI Q136A/N374A, M.MpeI K81A/Q136A/N374A und M.MpeI Δ78-83/Q136A/N374A mit dem Cofaktor SAM (**1**). Cofaktorkonzentration: 80 µM, Inkubation: 1 h bei 37 °C. MR: DNA-Leiter mittlerer Länge, λ: λ-DNA Referenz, K1: Kontrolle ohne Cofaktor, K2: Kontrolle ohne DNA-MTase. Bei allen Tests wurde eine Enzym Verdünnungsreihe ausgehend von einem Äquivalent DNA-MTase im Bezug auf die 5´-CG-3´-Erkennungssequenzen der DNA durchgeführt. M.MpeI K81A/Q136A/N374A zeigt die gleiche Aktivität von einer TON von 1 mit SAM (**1**) wie M.MpeI Q136A/N374A. Es ist so gut wie keine Aktivität von M.MpeI Δ78-83/Q136A/N374A mit SAM (**1**) vorhanden, was an der vollständigen Fragmetierung durch Restriktionsendonuklease zu erkennen ist.

Eine geringere Aktivität der DNA-MTase mit entfernter Schlaufe und mit dem natürlichen Cofaktor SAM (**1**) ist durchaus verständlich, da die Passung von Enzym und Ligand durch die große Veränderung der Cofaktorbindungstasche schlechter wird. Um die Aktivität zu steigern, wurden verschiedene Parameter, wie Inkubationszeit und Konzentration von Cofaktor und Enzym, variiert und die Transferaseaktivität durch *rp*-HPLC analysiert (Abbildung 58 im Anhang). Es wird deutlich, dass erst durch kombinierte Steigerung aller Parameter Aktivität von M.MpeI Δ78-83/Q136A/N374A mit SAM (**1**) festgestellt werden kann. Es ergab sich eine maximale Modifikationsausbeute von 29 %.

Anschließend wurde der gleiche Test mit gesteigerten Reaktionsbedingungen mit dem fluoreszierenden Cofaktoranalogon AdoYnTAMRA (**32**) und allen drei Mutanten durchgeführt (Abbildung 59 im Anhang). Dabei ergaben sich Ausbeuten von 2 % für M.MpeI Q136A/N374A, 4 % für M.MpeI K81A/Q136A/N374A und 10 % für M.MpeI Δ78-83/Q136A/N374A. Dies stellt eine fünffache Steigerung der Aktivität durch die Entfernung der Schlaufe vor der Cofaktorbindungstasche dar.

Zur Analyse der Lage des Cofaktoranalogons in der vergrößerten Bindungstasche von

M.MpeI Δ78-83/Q136A/N374A wurden weitere Dockingexperimente durchgeführt (Abbildung 35 und Abbildung 60 im Anhang). Es wurde vermutet, dass ein verlängerter Linker zwischen Schwefel und Triazolring (*) dazu führen könnte, dass die Übertragung begünstigt wird, weil der sterisch anspruchsvolle Teil der Seitenkette dann weiter außerhalb des Tunnels liegen würde und so mehr Platz hätte.

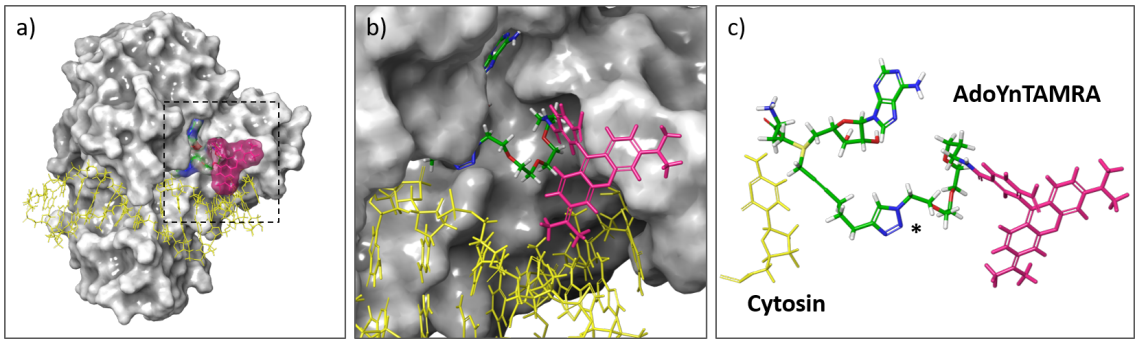


Abbildung 35: **a**) Dockingexperiment durchgeführt mit M.MpeI Δ78-83/Q136A/N374A (graue Oberflächendarstellung) und dem Cofaktoranalogon AdoYnTAMRA (**32**). Aus der DNA (gelb) ist das Zielcytosin ausgeklappt. Das Cofaktoranalogon AdoYnTAMRA (**32**) (C grün, N blau, H weiß, O rot, S gelb, TAMRA pink) wurde in die Bindungstasche gedockt. **b**) Vergrößerte Darstellung der Außenansicht des Tunnels. **c**) Darstellung ohne Enzymoberfläche, zur besseren Sichtbarkeit von Cytosin und Cofaktoranalogon. Durch den bei der Mutation entstandenen Platz, kann die verlängerte synthetische Seitenkette mit Triazolring (*) und die fluoreszierende Gruppe (pink) aus der Bindungstasche hinausragen.

Der Triazolring entsteht bei der Synthese von AdoYnTAMRA (**32**) durch CuAAC-Click-Reaktion von AdoYnYn (kurz) (**31**) mit TAMRA-PEG_3-Azid (Abbildung 36). Um den Linker zwischen Schwefel und Triazolring zu verlängern, muss also ein längerer Cofaktor *Building Block* synthetisiert werden. Die Synthese der beiden fluoreszierenden Cofaktoranaloga AdoYnTAMRA (kurz) (**32**) und AdoYnTAMRA (lang) (**40**) sind in Abbildung 36 und 37 dargestellt. Die Synthesen von AdoYnTAMRA (kurz) (**32**) und AdoYnTAMRA (lang) (**40**) laufen analog ab und orientieren sich an einer Vorschrift von Lukinavičius.[79]

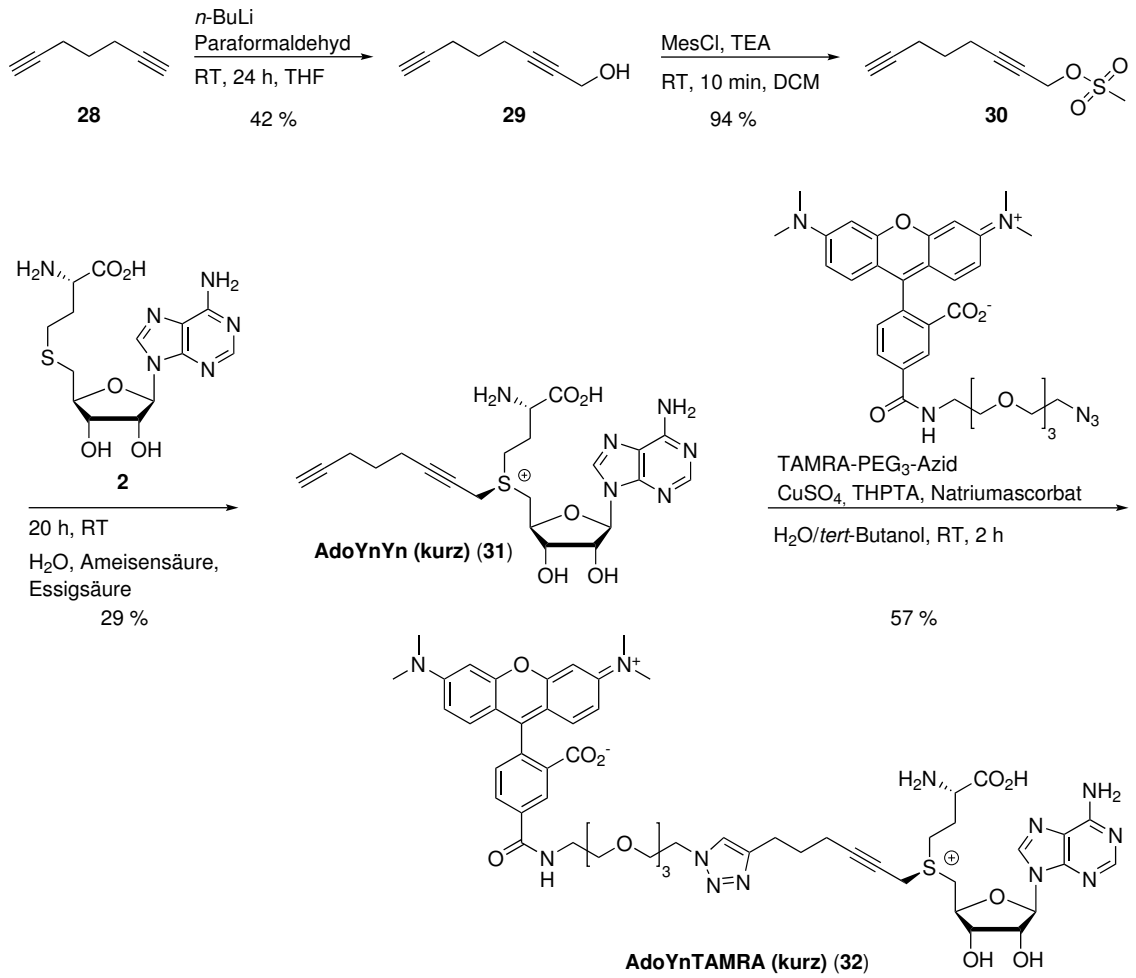


Abbildung 36: Übersicht der Synthese von AdoYnTAMRA (kurz) (**32**) aus AdoYnYn (kurz) (**31**) und TAMRA-PEG$_3$-Azid.

Im ersten Schritt wurde Hepta-1,6-diin (**28**) oder Deca-1,9-diin (**36**) mit *n*-BuLi und Paraformaldehyd hydroxymethyliert. Der entstandene Alkohol **29** oder **37** wurde als Mesylat aktiviert und mit SAH (**2**) zu AdoYnYn (kurz) (**31**) oder AdoYnYn (lang) (**39**) umgesetzt. Die entstandenen Epimere konnten durch *rp*-HPLC getrennt werden. Die Alkyn-Cofaktoren eignen sich als *Building Block* und bieten durch CuAAc-Click-Chemie die Möglichkeit der Funktionalisierung, zum Beispiel durch Fluorophor-Azid Konjugate. In diesem Fall wurde für beide fluoreszierenden Cofaktoranaloga TAMRA-PEG$_3$-Azid verwendet, sodass diese sich nur durch die Länge zwischen Schwefel und Triazolring unterscheiden. Die Click-Chemie wurde kupferkatalysiert in wässriger Lösung durchgeführt und nach 2 h durch *rp*-HPLC aufgereinigt.

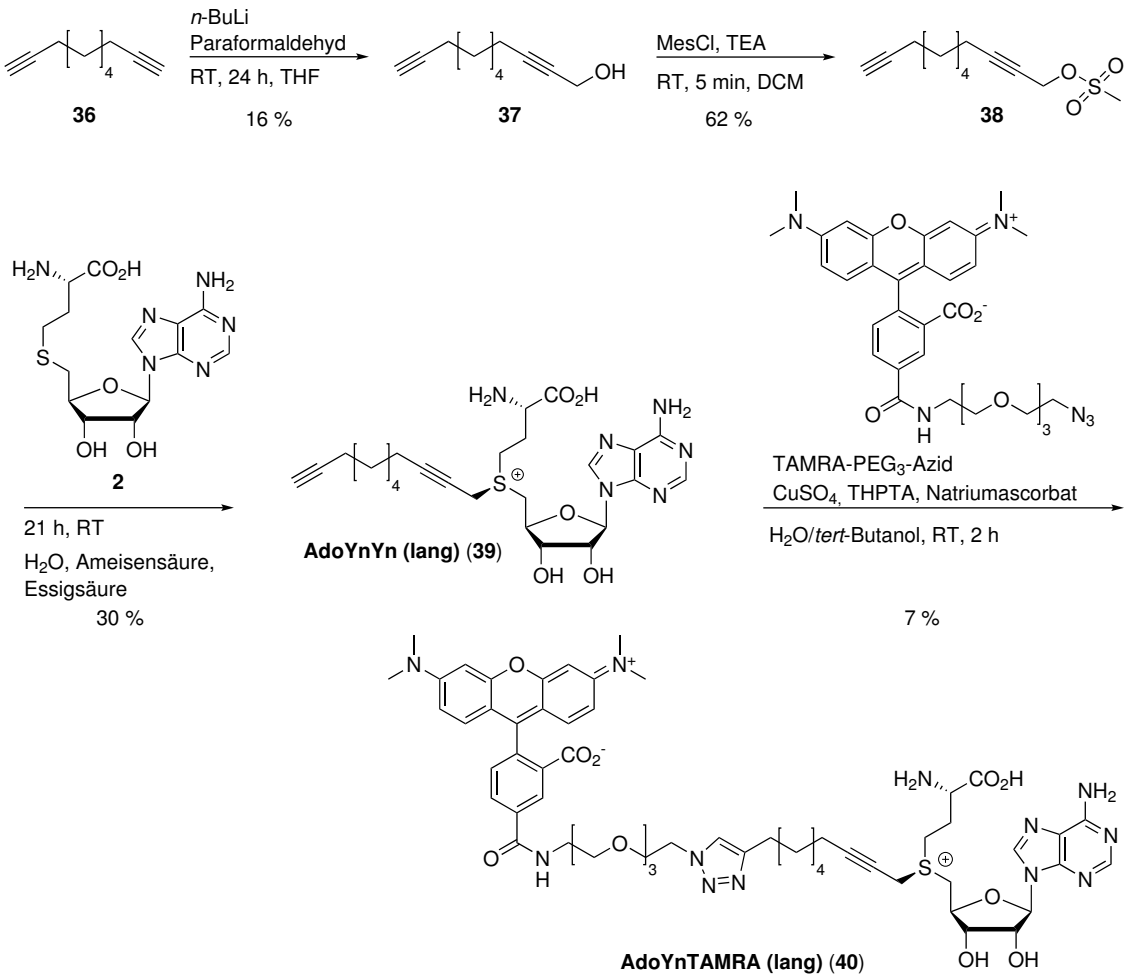


Abbildung 37: Übersicht der Synthese von AdoYnTAMRA (lang) (**40**) aus AdoYnYn (lang) (**39**) und TAMRA-PEG$_3$-Azid.

Die Aktivität der synthetisierten fluoreszierenden Cofaktoranaloga wurde zunächst in einem Standard-Modifikations/Restriktionstest mit M.TaqI getestet. Beide Cofaktoren zeigten Aktivität mit einer TON von acht (Abbildung 61 im Anhang). Anschließend wurde ein Modifikations/Restriktionstest und eine Analyse der Markierungsreaktion durch *rp*-HPLC mit den gesteigerten Reaktionsbedingungen (1 mM Cofaktor, 10 Äquivalente DNA-MTase und Inkubation über Nacht) mit M.MpeI Δ78-83/Q136A/N374A und den beiden TAMRA-Cofaktoranaloga durchgeführt (Abbildung 38).

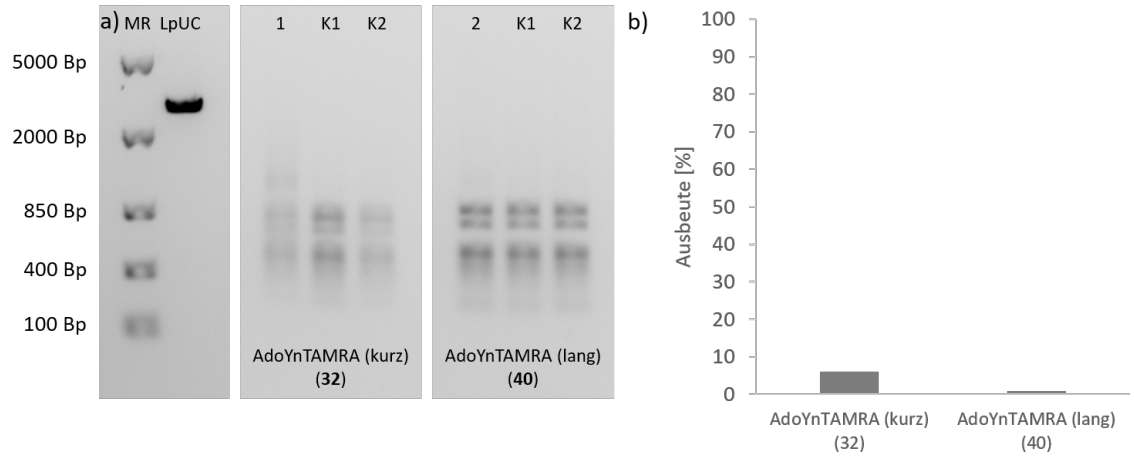


Abbildung 38: **a**) Modifikations/Restriktionstests von M.MpeI Δ78-83/Q136A/N374A mit dem Cofaktor AdoYnTAMRA (kurz) (**32**) (Spur 1) und AdoYnTAMRA (lang) (**40**) (Spur 2). Cofaktorkonzentration: 1 mM, Inkubation: ü.N. bei 37 °C. Enzymkonzentration 10 Äquivalente im Bezug auf die 5´-CG-3´ Erkennungssequenzen linearisierter pUC (LpUC) DNA. MR: DNA-Leiter mittlerer Länge, LpUC: LpUC-DNA Referenz, K1: Kontrolle ohne Cofaktor, K2: Kontrolle ohne DNA-MTase. Mit AdoYnTAMRA (kurz) (**32**) ist geringe Aktivität zu erkennen. AdoYnTAMRA (lang) (**40**) zeigt keine Aktivität. **b**) Ergebnisse der Quantifizierung der Transferaseaktivität mit AdoYnTAMRA (kurz) (**32**) und AdoYnTAMRA (lang) (**40**) bestimmt durch *rp*-HPLC des fragmentierten 24mer Duplex-ODN nach der Markierungsreaktion. Es ergaben sich Ausbeuten von 6,1 % für AdoYnTAMRA (kurz) (**32**) und 1,0 % für AdoYnTAMRA (lang) (**40**) bezogen auf zwei Zielcytosine des Duplex-ODN. Enzymkonzentration 50 µM, DNA-Konzentration: 5 µM, Cofaktorkonzentration: 1 mM, Inkubation: ü.N bei 37 °C.

Der Modifikations/Restriktionstest zeigte Aktivität für M.MpeI Δ78-83/Q136A/N374A mit AdoYnTAMRA (kurz) (**32**), was durch leichten Schutz vor Restriktion in Spur 1 (Abbildung 38 a)) sichtbar ist. Für AdoYnTAMRA (lang) (**40**) ist keine Aktivität zu erkennen. In Spur 2 ist das gleiche Fragmentierungsmuster wie in den Kontrollen zu beobachten. Die Quantifizierung der Transferaseaktivität durch *rp*-HPLC des fragmentierten Duplex-ODN nach der Markierungsreaktion zeigt Ausbeuten von 6,1 % für AdoYnTAMRA (kurz) (**32**) und 1,0 % für AdoYnTAMRA (lang) (**40**) (Abbildung 38 b)), was mit dem Trend des Modifikations/Restriktionstest übereinstimmt. Die Abweichung von ca. 4 % zur vorherigen Durchführung des analogen Tests mit AdoYnTAMRA (kurz) (**32**), der eine Ausbeute von 10 % ergab, liegt im Fehlerbereich. Es lässt sich festhalten, dass eine Erhöhung der Aktivität von M.MpeI Δ78-83/Q136A/N374A durch einen größeren Abstand zwischen Schwefel und Tria-

zolring nicht erreicht werden konnte. Es wird davon ausgegangen, dass eine sterische Hinderung aufgrund einer kurzen Linkerlänge ausgeschlossen werden kann. Allerdings scheinen intermolekulare Wechselwirkungen zwischen Enzym und Seitenkette des Cofaktoranalogons einen Einfluss auf die Bindung zu haben. Diese Wechselwirkungen sind wegen des größeren Abstands bei AdoYnTAMRA (lang) (**40**) eventuell nicht möglich und somit wird die Aktivität erniedrigt. Zudem ist die Gesamtausbeute der Synthese des kürzeren Cofaktors höher. Für weitere Markierungsreaktionen soll daher AdoYnTAMRA (kurz) (**32**) verwendet werden.

3.3.7 Untersuchung der DNA-Bindungsaffinität und Thermostabilität

Die Aktivität der DNA-MTasen hängt unmittelbar von der Bindung von DNA und Cofaktoren ab. Damit die Übertragung der Seitenkette stattfinden kann, muss der ternäre Komplex korrekt gebildet werden. Dazu bindet die DNA in eine Furche der DNA-MTase und klappt dort die Zielbase aus. Der Cofaktor bindet anschließend in die Cofaktorbindungstasche und die Seitenkette befindet sich in unmittelbarer Nähe zur Zielbase. Bei den Cytosin-C5 spezifischen DNA-MTasen muss sich die katalytische Schlaufe schließen, damit das katalystische Cystein im PCQ-Motiv den Pyrimidinring als Nukleophil aktivieren kann. Erst dann kann der nukleophile Angriff erfolgen und die Seitenkette auf die C5-Position von Cytosin übertragen werden. Durch die durchgeführten Mutationen ist es möglich, dass die DNA- oder die Cofaktorbindung der DNA-MTasen gestört ist. Darüber hinaus ist es möglich, dass die gesamte Stabilität der Enzyme durch die Mutationen abgenommen hat und das Enzym durch die Komplexierung der Substrate nicht mehr ausreichend stabilisiert wird. Deshalb werden im folgenden Bindungs- und Stabilitätstests mit dem M.MpeI-Wildtyp und den Mutanten durchgeführt.

EMSA

Beim *Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)* wird ein unterschiedliches elektrophoretisches Laufverhalten der DNA und des DNA-Protein-Komplexes genutzt, um die Komplexbildung zu untersuchen. Das Duplex-ODN wurde mit Cy5 markiert, sodass das Laufverhalten von DNA und DNA-Enzym-Komplex auf dem Polyacrylamid-Gel durch einen Fluoreszenzscanner analysiert werden kann. Der pI von M.MpeI und Mutanten liegt bei 9,33 - 9,37, bei dem verwendeten pH-Wert des Laufpuffers

von 8,0 besitzen die Enzyme also eine positive Gesamtladung.[108,109] Die freie DNA ist negativ geladen und wandert daher in dem Gel weiter, als der DNA-Enzym-Komplex aufgrund des Einflusses der positiven Ladung des Enzyms. Bei dem verwendeten System überwiegt scheinbar die positive Ladung des basischen Enzyms gegenüber der negativen Ladung des Duplex-ODN, sodass der DNA-Enzym-Komplex gar nicht in das Gel hinein wandert. Die Komplexbildung wird daher indirekt über die Abnahme der DNA-Menge kalkuliert. Dazu wird die Annahme getroffen, dass die Menge komplexierter DNA der Menge an DNA der jeweiligen Spur subtrahiert von der Referenz-DNA entspricht (Abbildung 62 - 65 im Anhang). Anschließend wurde der K_D aufgrund des Dissoziationsgleichgewichts eines 1:1 DNA-Protein-Komplexes berechnet (Tabelle 12 im Anhang).

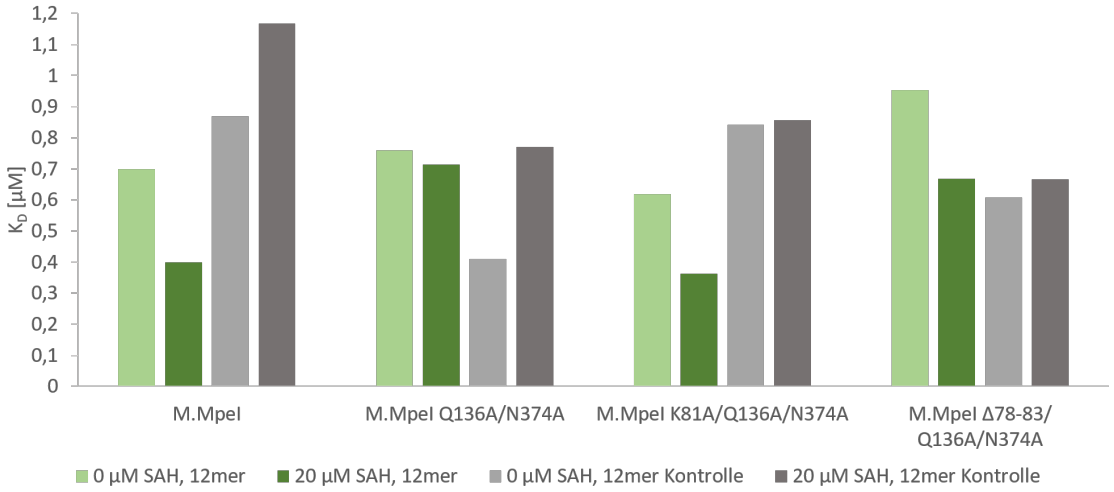


Abbildung 39: Ermittelte Bindungskonstanten K_D von M.MpeI und den Mutanten M.MpeI Q136A/N374A, M.MpeI K81A/Q136A/N374A und M.MpeI Δ78-83/Q136A/N374A gegenüber spezifischer (12mer) und unspezifischer DNA (12mer Kontrolle) durch *Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)*. Außerdem wurde der Einfluss von SAH (**2**) (20 µM) getestet. Die berechneten Werte für K_D basieren auf einer Kurvenanpassung an ein 1:1 Bindungsgleichgewicht und der Methode der Summe der kleinsten Fehlerquadrate. Für die Bindung der spezifischen DNA ist für alle Enzyme ein stabilisierender Effekt durch Zugabe von SAH (**2**) zu sehen. Die Bindung der unspezifischen DNA wird nicht durch SAH begünstigt.

Es wurde die Bindung des Wildtypen und der M.MpeI-Mutanten an spezifische DNA (12mer) und der Einfluss der ternären Bindung von SAH (**2**) untersucht (Abbildung 39, hell- und dunkelgrün). Als Kontrolle dazu wurde die gleiche DNA ohne Zielsequenz (5´-GC-3´ statt 5´-CG-3´) jeweils ohne und mit SAH (**2**) verwendet

(Abbildung 39, hell- und dunkelgrau). Für die Bindung der spezifischen DNA ist für den Wildtyp sowie für alle Mutanten ein stabilisierender Effekt, in Form der Verringerung des K_D-Wertes und damit einer Verbesserung der Bindung, zu sehen. Die Bindung unspezifischer DNA liegt im ähnlichen Bereich zu der spezifischen DNA, hier ist jedoch keine Stabilisierung des Komplexes durch Zugabe von SAH (**2**) zu beobachten.

MST

Bei der Mikroskaligen Thermophorese (MST) wird der Effekt der unterschiedlichen Diffusions-Geschwindigkeiten verschiedengroßer Teilchen in Lösung verwendet. Auch hier wird Cy5-markiertes Duplex-ODN verwendet, um die Bewegung zu verfolgen.

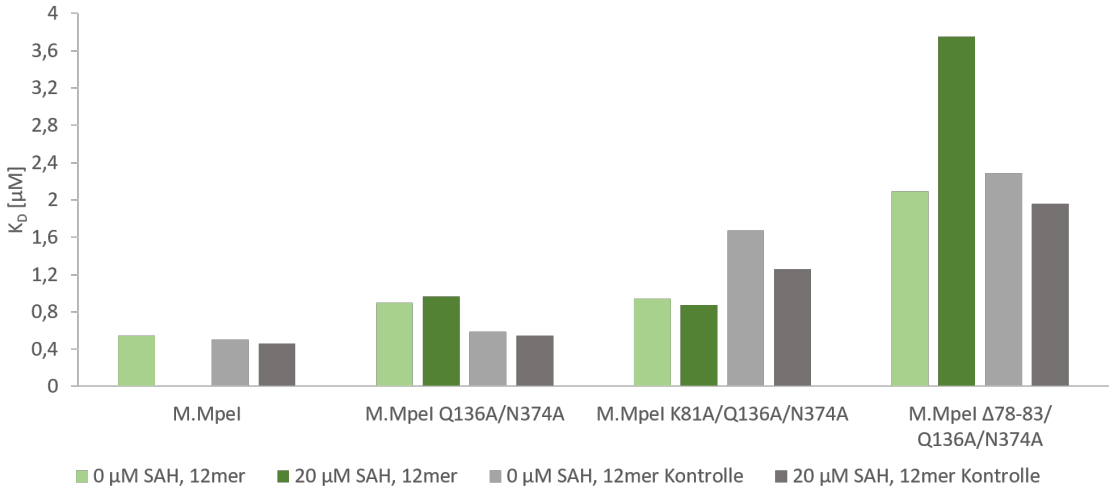


Abbildung 40: Ermittelte Bindungskonstanten K_D von M.MpeI und den Mutanten M.MpeI Q136A/N374A, M.MpeI K81A/Q136A/N374A und M.MpeI Δ78-83/Q136A/N374A gegenüber spezifischer (12mer) und unspezifischer DNA (12mer Kontrolle) durch Mikroskalige Thermophorese (MST). Außerdem wurde der Einfluss von SAH (**2**) (20 µM) getestet. Die berechneten Bindungskonstanten basieren auf einer Kurvenanpassung an ein 1:1 Bindungsgleichgewicht durch die Software *MO.Affinity Analysis v2.3* von Nanotemper. Ein deutlicher stabilisierender Effekt ist an dieser Stelle nur für die Bindung des M.MpeI Wildtyps an spezifische DNA zu beobachten.

Dabei wird davon ausgegangen, dass die freie DNA aufgrund des kleineren hydrodynamischen Volumens eine größere Diffusionsgeschwindigkeit besitzt, als der Komplex aus DNA und Enzym. Nach Einschalten eines Lasers erwärmt sich ein Volumenbereich der Kapillare und die gemessene Fluoreszenz ändert sich je nach Anteil des

DNA-Protein-Komplexes unterschiedlich stark. Durch eine Kurvenanpassung an ein 1:1 Bindungsgleichgewicht durch die Analysesoftware *MO.Affinity Analysis v2.3* von Nanotemper wurden Bindungskonstanten K_D bestimmt (Abbildung 66 - 69 und Tabelle 13 im Anhang). Die Bindungsaffinitäten von spezifischer und unspezifischer DNA liegen im ähnlichen Bereich (Abbildung 40, hellgrün und hellgrau). Ein deutlicher stabilisierender Effekt auf die Bindung durch Zugabe von SAH (**2**) ist nur für den M.MpeI-Wildtyp zu beobachten (Abbildung 40, dunkelgrün und dunkelgrau).

TSA

Die thermische Stabilität der Enzyme wurde durch *Thermal Shift Assay (TSA)* untersucht und gibt durch den Schmelzpunkt (Wendepunkt der Denaturationskurve) die unterschiedliche Stabilität von Wildtyp und Mutanten an. Eine größere Bindungsaffinität zwischen Enzym und Ligand spiegelt sich in einer höheren Schmelztemperatur und damit höheren thermischen Stabilität wider.

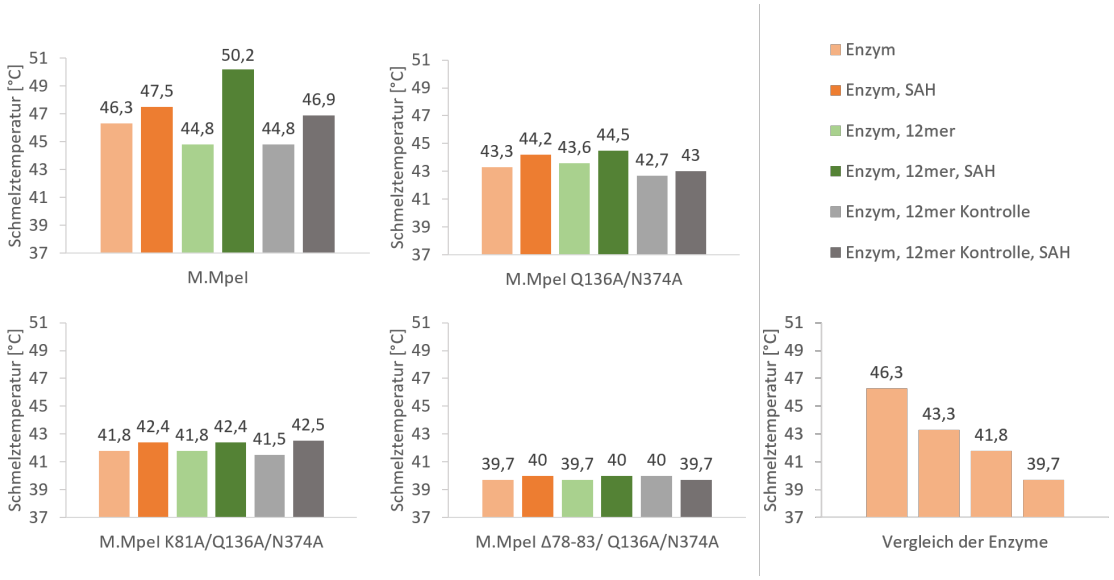


Abbildung 41: Ermittelte Schmelzpunkte von M.MpeI und den Mutanten M.MpeI Q136A/N374A, M.MpeI K81A/Q136A/N374A und M.MpeI Δ78-83/Q136A/N374A durch *Thermal Shift Assay (TSA)*. Untersucht wurde außerdem der Einfluss von Kombinationen von SAH (**2**), spezifischer DNA (12mer) und unspezifischer DNA (12mer Kontrolle). Es wird deutlich, dass die Thermostabilität der Mutanten durch zunehmende Mutationen abnimmt.

Gemessen wurden die Schmelzpunkte der einzelnen Enzyme und der Einfluss von spezifischer und unspezifischer DNA (12mer und 12mer Kontrolle), sowie durch die

Zugabe von SAH (**2**) (Abbildung 41 sowie Abbildung 70 und 71 im Anhang). Es wird deutlich, dass die Thermostabilität der Mutanten durch zunehmende Mutationen abnimmt. So zeigte der Wildtyp noch einen Schmelzpunkt von 46,3 °C, M.MpeI Δ78-83/Q136A/N374A jedoch nur noch von 39,7 °C, was nur noch leicht oberhalb der Inkubationstemperatur für die Aktivitätsassays von 37 °C liegt. In allen Fällen ist ein stabilisierender Effekt durch Zugabe von SAH (**2**) in Form einer Schmelzpunkterhöhung messbar. Dies wird damit begründet, dass die Flexibilität des Enzyms durch die Bindung des Cofaktorprodukts in der Cofaktorbindungstasche abnimmt und die Enzyme weniger offen sind. Die größte Steigerung der Schmelztemperatur wurde für den ternären Komplex aus M.MpeI-Wildtyp, spezifischer DNA und Cofaktorprodukt SAH (**2**) gemessen und betrug 3,9 °C bezogen auf das Enzym alleine. Es wird außerdem deutlich, dass der Einfluss der Bindung von Cofaktorprodukt und DNA (spezifisch und unspezifisch) mit zunehmenden Mutationen abnimmt.

3.3.8 Optimierung der enzymatischen Aktivität

Die Erkenntnisse über die Thermostabilität sollen in Kombination mit vorangegangenen Resultaten aus 3.3.6 zur Optimierung der enzymatischen Aktivität von M.MpeI Δ78-83/Q136A/N374A genutzt werden. Dort wurde bereits eine wesentliche Verbesserung durch Steigerung der Cofaktor- und DNA-MTase-Konzentration und Verlängerung der Reaktionszeit (1 mM Cofaktor, 10 Äquivalente DNA-MTase, Inkubation über Nacht) festgestellt. Es wurden zunächst Versuche mit dem Cofaktor SAM (**1**) in der Methylierungsreaktion durchgeführt. Neben der Reaktionstemperatur wurden die Einflüsse von pH-Wert und Salzkonzentration auf die Übertragungsgeschwindigkeit untersucht. Mit den optimierten Parametern wurde abschließend die Markierungsreaktion mit AdoYnTAMRA (kurz) (**32**) durchgeführt, um den Vergleich zu der zuvor maximalen gemessenen Ausbeute von 10 % zu ziehen.

Temperatur

Die Experimente zur Thermostabilität von M.MpeI Δ78-83/Q136A/N374A gaben Hinweise darauf, dass eine geringere Reaktionstemperatur die Übertragungsreaktion begünstigen könnten, da bereits bei 37 °C eine Denaturierung deutlich sichtbar wurde. Dagegen wird allgemein die Reaktionsgeschwindigkeit durch die Temperaturerniedrigung verlangsamt. Die beiden Effekte sollten also antagonistisch sein. Es

wurden Reaktionsansätze bei 4 °C, 20 °C, 37 °C und 45 °C durchgeführt, um den Einfluss der Temperatur auf die Übertragungsreaktion der Methylgruppe zu untersuchen (Abbildung 42).

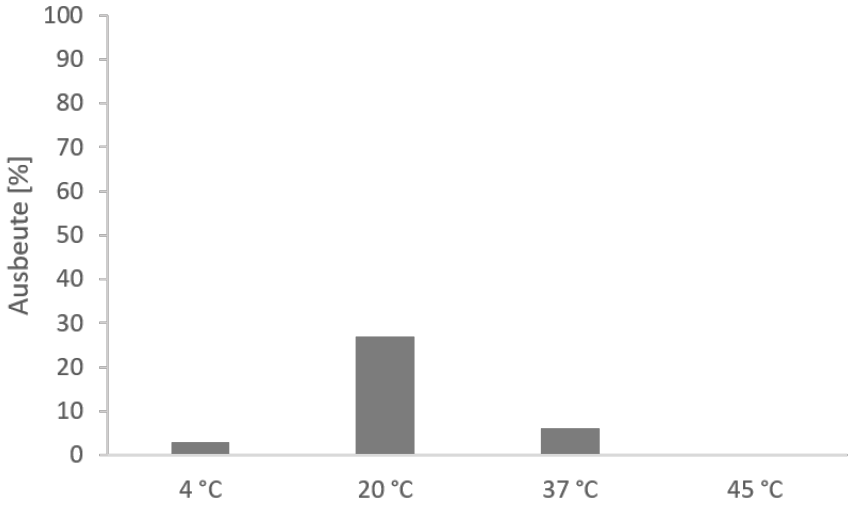


Abbildung 42: Ergebnisse der Quantifizierung der Transferaseaktivität von M.MpeI Δ78-83/Q136A/N374A mit SAM (**1**) bei verschiedenen Inkubationstemperaturen bestimmt durch *rp*-HPLC des fragmentierten 12mer Duplex-ODN nach der Modifikationsreaktion. Es ergaben sich Ausbeuten von 3 % bei 4 °C, 27 % bei 20 °C, 6 % bei 37 °C und 0 % bei 45 °C bezogen auf zwei Zielcytosine. Enzymkonzentration 50 µM, DNA-Konzentration: 5 µM, SAM-Konzentration: 1 mM, Inkubation: ü.N bei 4 °C, 20 °C, 37 °C und 45 °C.

Die höchste Ausbeute von 27 % ergab sich bei einer Reaktionstemperatur von 20 °C. Die erhöhte Stabilität der DNA-MTase hat also den größeren Einfluss und überwiegt bei der Übertragungsreaktion. Bei den beiden extremen Temperaturen von 4 °C und 45 °C ist annähernd keine Übertragung mehr zu beobachten. An diesen Stellen verringert sich die Reaktionsgeschwindigkeit entweder aufgrund der niedrigen Temperatur oder der Denaturierung des Enzyms.

pH-Wert

Parallel wurde der Einfluss des pH-Werts auf die Reaktion untersucht. Zusätzlich zum pH-Wert von 7,5 des M.MpeI-Reaktionspuffers wurden zwei kleinere (5,5 und 6,5) und zwei größere (8,5 und 9,5) pH-Werte bei einer Inkubationstemperatur von 37 °C getestet (Abbildung 43, dunkelgrau). Zum Einen hat der pH-Wert einen Einfluss auf die Ladung des Enzyms. Mit niedrigerem pH-Wert wird die Ladung des

Enzyms positiver, was die DNA-Bindung positiv beeinflussen sollte. Mit höherem pH-Wert, bei 9,5 sogar größer als der pI, wird das Enzym zunächst neutraler und dann sogar negativ geladen, was zu einer geringeren Affinität zur DNA führen sollte. Zum Anderen beeinflusst der pH-Wert die Stabilität des Cofaktors. Im Basischen ist die Carbonsäure deprotoniert und ein Abbau durch intramolekulare Cyclisierung zum γ-Butyrolacton begünstigt. Es bildet sich der Thioether und eine Übertragungsreaktion ist nicht mehr möglich.

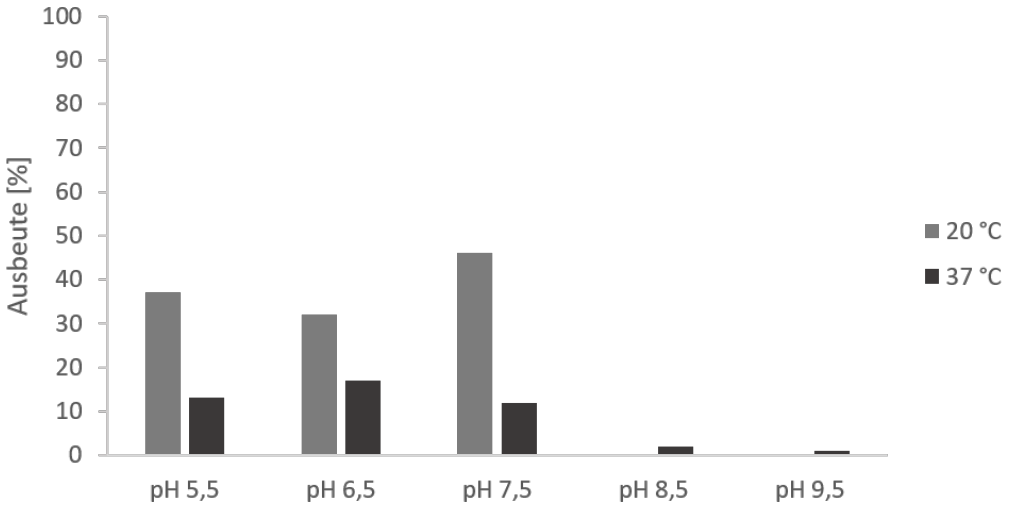


Abbildung 43: Ergebnisse der Quantifizierung der Transferaseaktivität von M.MpeI Δ78-83/Q136A/N374A mit SAM (**1**) bei verschiedenen pH-Werten des Reaktionspuffers bestimmt durch *rp*-HPLC des fragmentierten 12mer Duplex-ODN nach der Modifikationsreaktion. Es ergaben sich Ausbeuten von 13 % bei pH 5,5, 17 % bei pH 6,5, 12 % bei pH 7,5, 2 % bei pH 8,5 und 1 % bei pH 9,5 bei 37 °C und 37 % bei pH 5,5, 32 % bei pH 6,5 und 46 % bei pH 7,5 bei 20 °C bezogen auf zwei Zielcytosine. Enzymkonzentration 50 µM, DNA-Konzentration: 5 µM, SAM-Konzentration: 1 mM, Inkubation: ü.N bei 20 °C/37 °C.

Bei Betrachtung der Ergebnisse wird deutlich, dass die Ausbeute der Übertragungsreaktion bei basischeren pH-Werten wahrscheinlich aufgrund der basischen Instabilität des Cofaktors sehr stark abnimmt. Bei pH 8,5 und 9,5 ergaben sich nur Ausbeuten von 1 - 2 %. Zwischen pH 5,5 und 7,5 lagen die Ausbeuten dafür zwischen 12 und 17 %. An dieser Stelle kann ein Querverweis zum vorherigen Experiment gezogen werden. Dort lag die Ausbeute für die Probe bei pH 7,5 und 37 °C bei 6 %. Die Abweichung von 6 % liegt im Fehlerbereich des Tests. Die absoluten Unterschiede sind außerdem weniger relvant, als der zu beobachten Trend. Nach den Ergebnissen der Temperaturvariation wurden die drei erfolgreicheren Enzymreaktionen bei

pH-Werten 5,5, 6,5 und 7,5 noch einmal bei einer Inkubationstemperatur von 20 °C wiederholt (Abbildung 43, hellgrau). Hier ergaben sich gesteigerte Reaktionsausbeuten für die Methylierung zwischen 32 % und 46 %, wobei das Optimum bei einem pH-Wert von 7,5, also dem ursprünglichen Reaktionspuffer lag. Die Abweichung zu der analogen Probe im vorherigen Test von ca. 19 % ist vergleichweise groß und begründet sich, zusätzlich zum annehmbaren Fehlerbereich, durch Unterschiede in der Qualität der Entgasung des Puffers und dem Alter der verwendeten Enzymcharge.

Salzkonzentration

Für die Analyse des Einflusses der Salzkonzentration wurden neben dem Standardreaktionspuffer (1 x) Puffer mit einer höheren (1,5 x) und niedrigeren (0,5 x) Salzkonzentration verwendet (Abbildung 44).

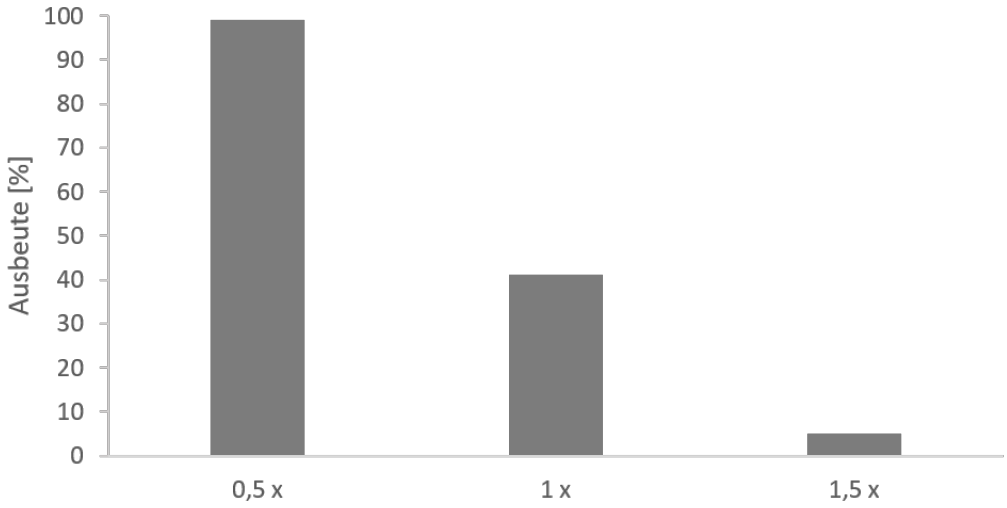


Abbildung 44: Ergebnisse der Quantifizierung der Transferaseaktivität von M.MpeI Δ78-83/Q136A/N374A mit SAM (**1**) bei verschiedenen Salzkonzentrationen des Reaktionspuffers bestimmt durch *rp*-HPLC des fragmentierten 12mer Duplex-ODN nach der Modifikationsreaktion. Es ergaben sich Ausbeuten von 99 % bei 0,5 x, 41 % bei 1,0 x und 5 % bei 1,5 x bezogen auf zwei Zielcytosine. Enzymkonzentration: 50 µM, DNA-Konzentration: 5 µM, SAM-Konzentration: 1 mM, Inkubation: ü.N bei 20 °C.

Weniger Salz hat allgemein den Effekt, dass die Bindung von DNA und Enzym stärker und die Dissoziation verlangsamt wird. Unter *Single-Turnover*-Bedingungen begünstigt dies die Reaktion. Mehr Salz führt dagegen allgemein zu einer schwächeren Bindung und bringt so Vorteile unter *Multiple-Turnover*-Bedingungen, da

die DNA-MTase bei schnellerer Dissoziation mehr Katalysezyklen pro Zeiteinheit bewältigen kann. Es wird deutlich, dass eine geringere Salzkonzentration zu stark erhöhten Ausbeuten führt und im Fall von 0,5 x Standardreaktionspuffer die Methylierungsreaktion nahezu vollständig ablief. Die Erhöhung der Salzkonzentration auf 1,5 x hat einen negativen Einfluss auf die Übertragung. Die Probe bei 1 x, welche wiederum zu den vorherigen Experimenten vergleichbar ist, zeigt nur eine geringe Abweichung von 5 % zu 46 % und liegt damit im Fehlerbereich des Tests. Der Trend wird an dieser Stelle deutlich sichtbar. Anschließend wurde die Markierungsreaktion mit AdoYnTAMRA (kurz) (**32**) und 0,5 x Standardreaktionspuffer getestet (Abbildung 45).

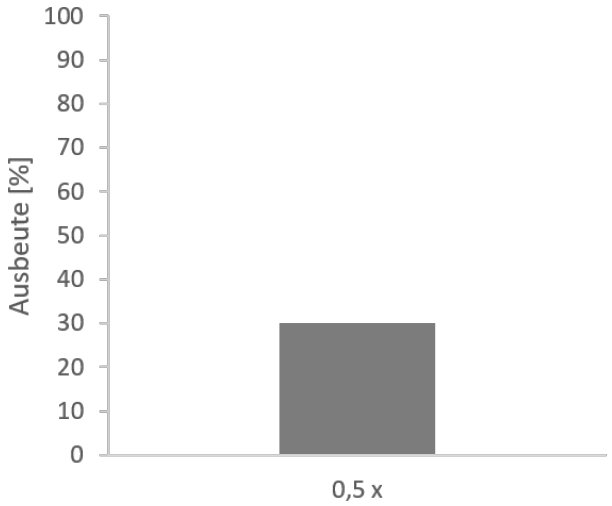


Abbildung 45: Ergebnisse der Quantifizierung der Transferaseaktivität von M.MpeI Δ78-83/Q136A/N374A mit AdoYnTAMRA (kurz) (**32**) bestimmt durch *rp*-HPLC des fragmentierten 12mer Duplex-ODN nach der Markierungsreaktion. Es ergaben sich Ausbeuten von 30 % mit 0,5 x Standardreaktionspuffer bezogen auf zwei Zielcytosine. Enzymkonzentration: 50 µM, DNA-Konzentration: 5 µM, AdoYnTAMRA-Konzentration: 1 mM, Inkubation: ü.N bei 20 °C.

Die Ausbeute war hier mit 30 % dreimal so hoch, wie vor der Reaktionsoptimierung. Abschließend lässt sich festhalten, dass die Markierung unmethylierter Cytosinbasen in 5´-CG-3´-Sequenzen mithilfe fluoreszierender Cofaktoranaloga und der DNA-Cytosin-C5-MTase M.MpeI Δ78-83/Q136A/N374A mit einer Ausbeute von 30 % möglich ist.

4 Zusammenfassung und Ausblick

Gegenstand dieser Arbeit war die Entwicklung und Optimierung von Markierungsmethoden unmethylierter Cytosinreste in CpG-Kontexten. Es wurden zwei verschiedene Klassen an Cofaktoranaloga mit fluoreszierenden Reportergruppen synthetisiert. Außerdem wurden doppeltaktivierte Cofaktoranaloga mit endständigen Azidgruppen synthetisiert, die nach Übertragung auf die DNA die Möglichkeit der Markierung auf der DNA durch SPAAC bieten. Darüber hinaus wurden Mutanten der CpG-spezifischen DNA-MTase M.MpeI entwickelt, die in der Lage sind, verlängerte Seitenketten der doppeltaktivierten Cofaktoranaloga zu übertragen. Die Möglichkeiten bei der Synthese und Mutagenese wurden durch Dockingexperimente und Computersimulationen abgewägt und ausgewertet.

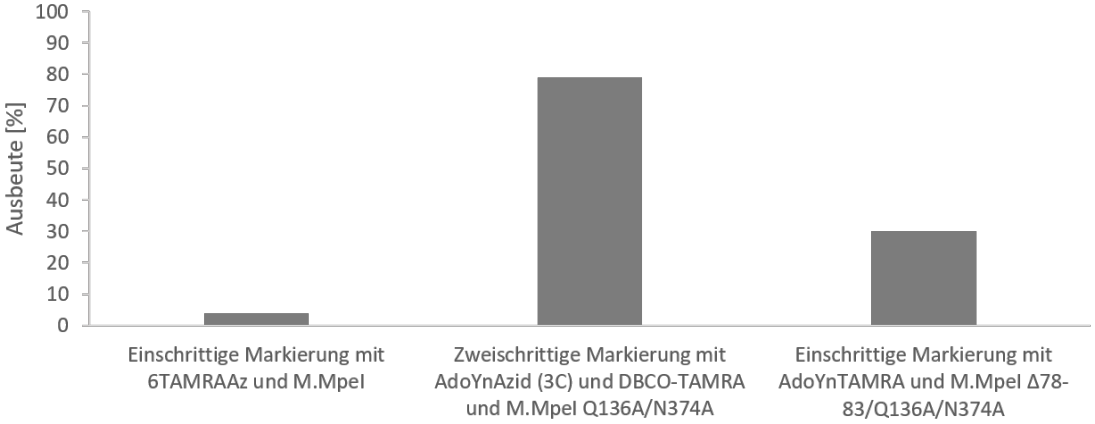


Abbildung 46: Darstellung der Ausbeuten der in dieser Arbeit untersuchten Markierungsreaktionen mit der DNA-MTase M.MpeI und ihrer Mutanten als Werkzeug für die Methylierungsdetektion. In den einzelnen Kategorien ergaben sich Ausbeuten von 4 % für die einschrittige Markierung mit 6TAMRAAz und M.MpeI, 79 % für die zweischrittige Markierung mit AdoYnAzid (3C) und DBCO-TAMRA und M.MpeI Q136A/N374A und 30 % für die einschrittige Markierung mit AdoYnTAMRA und M.MpeI Δ78-81/Q136A/N374A.

Für die in dieser Arbeit untersuchten Markierungsreaktionen ergaben sich Ausbeuten von 4 % für die einschrittige Markierung mit 6TAMRAAz und dem Wildtypen von M.MpeI, 79 % für die zweischrittige Markierung mit AdoYnAzid (3C) und der Mutante M.MpeI Q136A/N374A gefolgt von einer Click-Reaktion mit DBCO-TAMRA sowie 30 % für die einschrittige Markierung mit AdoYnTAMRA und der

Mutante M.MpeI Δ78-81/Q136A/N374A.
Die Reaktivität des Aziridin-Cofaktoranalogons 6TAMRAAz war recht gering. Diese Markierungsreaktion eignet sich daher nicht, um Methylierungsdetektionen durchzuführen.
Die größte Ausbeute der Markierungsreaktion liegt im Fall der zweischrittigen Reaktion mit AdoYnAzid und der Mutante M.MpeI Q136A/N374A und DBCO-TAMRA vor. Hier ist der Zeitaufwand aufgrund der zweischrittigen Reaktion um einen Tag größer, als bei der einschrittigen Markierung mit AdoYnTAMRA und der Mutante M.MpeI Δ78-81/Q136A/N374A, die eine Ausbeute von 30 % liefert. Hier kann der zeitliche Aspekt je nach Anwendung gegen die Ausbeute abgewogen werden.
Für die Zukunft ist eine weitere Untersuchung der CpG-spezifischen DNA-MTasen durchaus sinnvoll. Durch die gleiche Zielsequenz wie die humanen DNA-MTasen bietet M.MpeI den Vorteil, direkte Methylierungsdetektion aller CpGs durchführen zu können. Optimierungen bezüglich der Enzymstabilität der mutierten Enzyme hatten bereits einen großen Einfluss auf die Ausbeute der Markierungsreaktion in einem Schritt. Daraus wird deutlich, dass ein grundlegender Zusammenhang zwischen Struktur des Komplexes und seiner Funktion besteht. Weitere Untersuchungen können zu einem besseren Verständnis der Zusammenhänge zwischen Komplexbildung und Übertragungsreaktion führen und so eine zielgerichtete Vorgehensweise voranbringen. Dazu sind weitere Analysen des Bindungs- und Reaktionsmechanismus von M.MpeI im Vergleich zu den Mutanten notwendig und interessant.
Einen Ausblick bietet eine Kooperation mit dem Unternehmen Dynamic Biosensors GmbH, bei der in einem dynamischen Biosensor die Bindung der DNA-MTasen an DNA und der Einfluss des Cofaktors auf die Bindung und die induzierte konformationelle Änderungen untersucht werden.

5 Experimentelles

5.1 Materialien

5.1.1 Chemikalien

Wasser wurde durch eine Milli-Q Academic Anlage mit Elix 3 Essential System gereinigt. Der Widerstand betrug $\sigma = 18.2\ \mathrm{M\Omega cm^{-1}}$. Für enzymatische Arbeiten wurde das Wasser zusätzlich 20 min bei 120 °C autoklaviert. Alle kommerziell erhältlichen Chemikalien waren vom Reinheitsgrad p.a..

Tabelle 2: Liste der verwendeten Chemikalien und deren Bezugsquelle.

Chemikalie	**Bezugsquelle**
Acetonitril	Fisher Scientific
Acrylamid/*N,N´*-Methylen-bisacrylamid 37,5:1, 30 % (w/v)	Serva
S-Adenosyl-L-homocystein (SAH)	Sigma-Aldrich
S-Adenosyl-L-methionin (SAM)	New England Biolabs
AF647-Azid	Jena Bioscience GmbH
Agar	AppliChem Panreac
Agarose	Sigma-Aldrich
Ameisensäure	CHEM Solute
Ammoniumchlorid	BASF
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Serva
Adenosintriphosphat (ATP)	Gerbu
ATTO643-Azid	ATTO-Tec GmbH
Borsäure	Th. Geyer
Bovines Serumalbumin (BSA)	NEB
Bromphenolblau	Serva
tert.-Butanol	Fluka
n-Butyllithium (*n*-BuLi)	Acros Organics
Calciumchlorid	Fluka
5-Carboxytetramethylrhodamin-PEG3-Azid (5-TAMRA-PEG3-Azid)	baseclick GmbH

Tabelle 2: Liste der verwendeten Chemikalien und deren Bezugsquelle.

Chemikalie	**Bezugsquelle**
CF640R-Azid	Biotium
6-Chloro-9-β-D-ribofuranosylpurin	Sigma Aldrich
6-Chloro-9-(2´,3´-*O*-isopropyliden-β-D-ribofuranosyl)-purin	abcr GmbH
Chloroform	AppliChem
5-Chlor-pent-1-in	Sigma-Aldrich
DBCO-5(6)-Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA)	Jena Bioscience GmbH
DBCO-Sulfo-Cy5	Jena Bioscience GmbH
Desoxyadenosintriphosphat (dATP)	Thermo Scientific
Desoxycytidintriphosphat (dCTP)	Thermo Scientific
Desoxyguanosintriphosphat (dGTP)	Thermo Scientific
Desoxythymidintriphosphat (dTTP)	Thermo Scientific
Deuteriertes Chloroform $CDCl_3$	Sigma-Aldrich
Deuteriertes Dimethylsulfoxid (DMSO)	Eurisotop
1,4-Diaminobutan	Sigma Aldrich
Dichlormethan (DCM)	Fisher Scientific
Diethylether	Hoesch
Diisopropylethylamin	Sigma Aldrich
4-(Dimethylamino)-pyridin	Sigma Aldrich
N,N-Dimethylformamid (DMF)	Acros Organics
2,2-Dimethoxypropan	Fluka
Dimethylsulfoxid (DMSO), extra trocken über Molekularsieb	Acros Organics
1,4-Dithio-D,L-threitol (DTT)	Gerbu
Ethanol	CHEM Solute
Ethylacetat	Hoesch
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Gerbu
Essigsäure (96 %)	Merck
GelRed (10000x)	Biotium
Glycerin	Gerbu
Hefe-Extrakt	BD

Tabelle 2: Liste der verwendeten Chemikalien und deren Bezugsquelle.

Chemikalie	**Bezugsquelle**
4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonsäure (HEPES)	Gerbu
Imidazol	Sigma Aldrich
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Gerbu
Kaliumacetat	Fluka
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumhydroxid	Grüssing
Kanamycin (Kan)	Gerbu
Kieselgel 60 M	Macherey-Nagel
Kieselgelplatte 60 F_{254}	Merck
Kupfersulfat	Riedel de Haën
Magnesiumacetat Tetrahydrat	Merck
Magnesiumchlorid	Sigma Aldrich
Magnesiumsulfat	Merck
β-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich
Methanol	Fisher Scientific
Methansulfonsäurechlorid	Merck
2-(*N*-Morpholino)ethansulfonsäure (MES)	Gerbu
Natriumacetat	Merck
Natriumascorbat	Fluka
Natriumazid	Acros Organics
Natriumhydrogencarbonat	Merck
Natriumchlorid	Gerbu
Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat	Gerbu
Natriumhydroxid	Sigma-Aldrich
Paraformaldehyd	Acros Organics
Salpetersäure (65 %)	CHEM Solute
Salzsäure (37 %)	CHEM Solute
Schwefelsäure (98 %)	Merck
Tetrabutylammoniumiodid (TBAI)	Fluka
Tetrahydrofuran (THF)	Acros Organics

Tabelle 2: Liste der verwendeten Chemikalien und deren Bezugsquelle.

Chemikalie	**Bezugsquelle**
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	GE Healthcare
p-Toluolsulfonsäure	Fluka
Triethylamin	Grüssing GmbH
Triethylammoniumacetat (TEAAc)	Merck
Trifluoressigsäure (TFA)	Acros Organics
Tris-Base	Fluka
Tris-HOAc	Fluka
Tris-HCl	AppliChem
Tris(3-hydroxypropyltriazolmethyl)-amin (THPTA)	Dr. Sophie Willnow (AK Weinhold)
Triton	Fluka
YOYO-1	Thermo Scientific
Zinksulfat	Sigma Aldrich

5.1.2 Puffer

Für alle verwendeten Puffer sind hier die Stammlösungen dargestellt. Diese werden bei der Verwendung verdünnt. Die Verdünnung ist an entsprechender Stelle angegeben.

Tabelle 3: Liste der verwendeten Puffer und deren Zusammensetzung.

Bezeichnung	**Zusammensetzung**
Agarosegel-Ladepuffer (LB) (6 x)	Bromphenolblau (0,25 %, w/v), Glycerin (30 %)
Bindungs-Puffer (10 x)	Tris-HCl (250 mM), NaCl (500 mM), BSA (1 mg/mL), β-Mercaptoethanol (100 mM), Tween-20 (0,5 %), pH 7,5
CIAP-Puffer (10 x)	Tris-HCl (500 mM), $MgCl_2$ (10 mM), pH 9,0
CutSmart-Puffer (10 x)	Tris-HOAc (200 mM), $Mg(OAc)_2$ (100 mM), KOAc (500 mM), BSA (1 mg/mL), pH 7,9

Tabelle 3: Liste der verwendeten Puffer und deren Zusammensetzung.

Bezeichnung	**Zusammensetzung**
Dialyse-Puffer (1 x)	Tris-HCl (50 mM), NaCl (100 mM), β-Mercaptoethanol (10 mM), Glycerin (50 %), pH 7,5
Elutions-Puffer (1 x)	Tris-HCl (50 mM), NaCl (500 mM), Imidazol (50 - 250 mM), pH 7,5
HPLC-Puffer A sauer (1 x)	TFA (0,01 %), pH 2,75
HPLC-Puffer B sauer (1 x)	TFA (0,01 %), Acetonitril (70 %), pH 2,75
HPLC-Puffer A neutral (1 x)	TEAAc (10 mM), pH 7,0
HPLC-Puffer B neutral (1 x)	TEAAc (10 mM), Acetonitril (70 %), pH 7,0
HPLC-Puffer A basisch (1 x)	$TEAHCO_3$ (10 mM), NaN_3 (1 mM), pH 8,6
HPLC-Puffer B basisch (1 x)	$TEAHCO_3$ (10 mM), NaN_3 (1 mM), Acetonitril (70 %), pH 8,6
M.HhaI-Puffer (10 x)	Tris-HCl (100 mM), NaCl (500 mM), EDTA (0.5 mM), β-Mercaptoethanol (20 mM), pH 7,4
M.MpeI-Puffer (10 x)	Tris-HCl (500 mM), NaCl (1 M), Glycerin (50 %), pH 7,5
M.SssI-Puffer (10 x)	Tris-HCl (100 mM), NaCl (500 mM), DTT (10 mM), pH 7,9
MTAN-Puffer (1 x)	NaH_2PO_4 (50 mM), β-Mercaptoethanol (1 mM), pH 7,5
M.Taq-Puffer für Aziridin-Cofaktoren (10 x)	Tris-HOAc (200 mM), $Mg(OAc)_2$ (100 mM), KOAc (500 mM), Triton X-100 (0,1 %), pH 6,0
NEB4-Puffer (10 x)	Tris-HOAc (200 mM), $Mg(OAc)_2$ (100 mM), KOAc (500 mM), pH 7,9
Nuklease P1-Puffer (10 x)	$ZnSO_4$ (2 mM), NaOAc (200 mM), pH 5,3
TBE-Puffer (5 x)	Tris-Base (450 mM), Borsäure (450 mM), EDTA (100 mM), pH 8,0
TE-Puffer (10 x)	Tris-HCl (100 mM), EDTA (10 mM), pH 8,0

5.1.3 DNA und DNA-Marker

Tabelle 4: Liste der verwendeten DNA und Marker und deren Bezugsquelle.

Bezeichnung	**Bezugsquelle**
24mer +	
5´-ATT ATT ATT ATT AGC GCA TTA TTA-3´	IDT DNA
24mer -	
5´-TAA TAA TGC GCT AAT AAT AAT AAT-3´	IDT DNA
12mer +	
5´-GTC AGC GCA TCC-3´	IDT DNA
12mer Cy5 +	
5´-/Cy5/-GTC AGC GCA TCC-3´	IDT DNA
12mer -	
5´-GGA TGC GCT GAC-3´	IDT DNA
12mer Kontrolle +	
5´-GTC AGG CCA TCC-3´	IDT DNA
12mer Kontrolle Cy5 +	
5´-/Cy5/-GTC AGG CCA TCC-3´	IDT DNA
12mer Kontrolle -	
5´-GGA TGG CCT GAC-3´	IDT DNA
14mer +	
5´-GCC GCT CGA TGC CG-3´	IDT DNA
14mer -	
5´-CGG CAT CGA GCG GC-3´	IDT DNA
FastRuler DNA Ladder (MR)	Thermo Scientific
FastRuler DNA Ladder (LR)	Thermo Scientific
FastRuler DNA Ladder (ULR)	Thermo Scientific
K81A V	
5´-GAC AGA GAT ATT TTA AGT ATT AGC AAT GAT TCT GCA ATG CC-3´	IDT DNA
K81A R	
5´-CCA TAT TCA CTT ATA GGC ATT GCA GAA TCA TTG C-3´	IDT DNA
λ-DNA	Thermo Scientific

Tabelle 4: Liste der verwendeten DNA und Marker und deren Bezugsquelle.

Bezeichnung	**Bezugsquelle**
LD V	
P-5´-ATA AGT GAA TAT GGA ATC AAA AAA ATA AAT AAC ACT ATT AAA GCA AGT TAT TTG AAT TAT GCA-3´	IDT DNA
LD R	
P-5´-GCT AAT ACT TAA AAT ATC TCT GTC TAA TCG CTC AAT TTT AGG ATT AAA ATT TTT TGA ATG AAT TGC-3´	IDT DNA
Mass Ruler DNA Ladder (HR)	Thermo Scientific
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific
pET28a-M.MpeIQ136A/N374A-His6	Dr. Andreas Dankers
pUC19	Thermo Scientific
pBR322	Thermo Scientific
Sequenzierung V1	
5´-GAC GCA ATT GTT TCA TAT GTG GC-3´	IDT DNA
Sequenzierung V2	
5´-GGT TAA AGC AGT TAG AAA AAT TTG G-3´	IDT DNA
Sequenzierung V3	
5´-GGT GTA AGA TAT TTA ACA CCA CTT G-3´	IDT DNA
Sequenzierung R1	
5´-GTG GTG GTG GTG GTG G-3´	IDT DNA
Sequenzierung R2	
5´-GAG GTC TTG AAA TGA TGT TG-3´	IDT DNA
Sequenzierung R3	
5´-CTC CCA TAA TAA ACC ACT TCT AGT G-3´	IDT DNA
Sequenzierung R4	
5´-GTC AAA TAA ATT ATT AAA GTG TTT TTT TGC-3´	IDT DNA

5.1.4 Extinktionskoeffizienten

Extinktionskoeffizienten von dA, dC, dG und dT wurden bei 254 nm[110] und von 5mdC bei 277 nm[111] aus der Dissertation von Dr. Christiane Beuck (2004) bezogen.[112] Durch gemessene UV-Spektren der Verbindungen wurden die Extinktionskoeffizienten auf 260 nm umgerechnet. Für Modifikationen an der 5-Position von 2´-Desoxycytidin wurde der Extinktionskoeffizient gleich dem von 5mdC gesetzt. Für fluoreszierende Modifikationen wurde der Extinktionskoeffizient des jeweiligen Fluorophors bei der unten genannten Wellenlänge genutzt. Die Extinktionskoeffizienten der verwendeten ODN bei 260 nm wurden den Datenblättern der Firma IDT DNA entnommen.

Tabelle 5: Liste der verwendeten Extinktionskoeffizienten bei spezifischen Wellenlängen für die Nukleoside.

Nukleosid	λ **[nm]**	ϵ $[\frac{\mathrm{L}}{\mathrm{cm \cdot mol}}]$	**Literatur**
dA	260	15663	C. Beuck
dC	260	7009	C. Beuck
dT	260	8902	C. Beuck
dG	260	11715	C. Beuck
5mdC	260	5435	C. Beuck
5-azido-dC	260	5435	C. Beuck
5-Cy5-dC	646	251000	Jena Bioscience GmbH
5-TAMRA-dC	555	84000	Jena Bioscience GmbH
6-TAMRA-dA	555	84000	Jena Bioscience GmbH
5-CF640R-dC	640	105000	Biotium
5-ATTO643-dC	643	150000	ATTO-Tec GmbH
5-AF647-dC	647	270000	Jena Bioscience GmbH

Tabelle 6: Liste der verwendeten Extinktionskoeffizienten der ODN.[113]

ODN Bezeichnung	λ **[nm]**	ϵ $[\frac{\mathrm{L}}{\mathrm{cm \cdot mol}}]$
24mer +	260	242800
24mer -	260	254200
12mer +	260	109600

Tabelle 6: Liste der verwendeten Extinktionskoeffizienten der ODN.[113]

ODN Bezeichnung	λ **[nm]**	ϵ $[\frac{\mathrm{L}}{\mathrm{cm \cdot mol}}]$
12mer Cy5 +	260	119600
12mer -	260	113400
12mer Kontrolle +	260	110200
12mer Kontrolle Cy5 +	260	120200
12mer Kontrolle -	260	114000
14mer +	260	122700
14mer -	260	129700

5.1.5 Enzyme

Tabelle 7: Liste der verwendeten Enzyme, deren Zielsequenz und deren Bezugsquelle.

Enzym	**Sequenz**	**Bezugsquelle**
Blunt/TA Ligase Master Mix	-	NEB
Calf intestinal alkaline phosphatase (CIAP)	-	Takara Bio
M.HhaI	GCGC	Fermentas
M.HhaI	GCGC	Kerstin Glensk (AK Weinhold)
M.HhaI (Q82A/Y254S/N304A)	GCGC	Kerstin Glensk (AK Weinhold)
M.MpeI	CG	Kerstin Glensk (AK Weinhold)
M.MpeI (Q136A/N374A)	CG	Kerstin Glensk (AK Weinhold)
M.MpeI (K81A/Q136A/N374A)	CG	Kerstin Glensk und Jennifer Dietel (AK Weinhold)
M.MpeI (Δ78-83/Q136A/N374A)	CG	Kerstin Glensk und Jennifer Dietel (AK Weinhold)
M.SssI	CG	Kerstin Glensk (AK Weinhold)

Tabelle 7: Liste der verwendeten Enzyme, deren Zielsequenz und deren Bezugsquelle.

Enzym	**Sequenz**	**Bezugsquelle**
M.SssI (Q142A/N370A)	CG	Kerstin Glensk (AK Weinhold)
M.TaqI	TCGA	Kerstin Glensk (AK Weinhold)
MTAN	-	Kerstin Glensk (AK Weinhold)
Nuklease P1	-	NEB
Phusion DNA Polymerase	-	NEB
Proteinase K	-	QIAGEN
R.BstUI	CGCG	NEB
R.ClaI	ATCGAT	NEB
R.DpnI	GATC	NEB
R.HhaI	GCGC	NEB
R.TaqI	TCGA	Thermo Scientific

5.1.6 Zellstämme

Tabelle 8: Liste der *Escherichia coli* Stämme mit ihrem Genotypen.

Zellstamm	**Genotyp**
DH5α	*fhuA2 lac(del)U169 phoA glnV44 Φ80' lacZ(del)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*
SG1709 (ScarabXpress T7 Lac)	*F (proAB+lacIqlacZAMA5 TnlO (tet$^{\Gamma}$)) hs dR mcrB aroDl 39 A(araABC-leu)1619 AlacXIA galUgalKrpsL thi*
ER1821	*F^{-} glnV44 e14^{-}(McrA^{-}) rfbD1? relA1? endA1 spoT1? thi^{-}1 Δ(mcrCmrr) 114:IS10*

5.1.7 Geräte und Kits

Tabelle 9: Liste der verwendeten Geräte bzw. Kits mit Modelbezeichnung und Hersteller.

Gerät	**Model**	**Hersteller**
Agarose-Gelelektrophoresekammer	MiniSub Cell GT	Bio-Rad
Analysewaage	BP121S	Sartorius
Autoklav	Varioklav Dampfsterilisator	H+P Labortechnik GmbH
Bunsenbrenner	Brennerkappe mit Butan-/Propangaskartusche	Camping Gaz GmbH
DNA-Reingungssäulen	NAP-5 > 10 bp	Cytiva
DNA-Reinigungskit	QIAquick PCR Purification Kit 100 bp - 10 kbp	QIAGEN
DNA Reingingskit	Plasmid Mini Kit 20 µg	QIAGEN
Elektroporator	Micro Pulser	Bio-Rad
FPLC	BioLogic DuoFlow mit BioFrac Fraktionssammler und Abimed Minipuls 3 Peristaltikpumpe	Bio-Rad, Gilson
Gefriertrocknungsanlage	ALPHA 1-2	CHRIST
Geldokumentationssystem	Gel iX mit digitaler schwarz-weiß CCD-Kamera, UV-Transilluminator (312 nm), Kaltlichtweißplatte, Filter (540 nm ± 50 nm), Software Intas GDS	Intas
Geldokumentationssystem	ChemiDoc MP Imaging System	Bio-Rad
Hamilton Spritzen	10 µL, 100 µL, 1 mL, 10 mL, 30 mL	Hamilton Co.
Heizblock	HBT 130	HLC
HPLC	Waters 1525 mit binärem Pumpensystem, 2487 Dual Absorbance Detektor	Waters

Tabelle 9: Liste der verwendeten Geräte bzw. Kits mit Modelbezeichnung und Hersteller.

Gerät	**Model**	**Hersteller**
HPLC-Säulen	ProntoSIL C18 AQ	Bischoff
Inkubator	Function Line	Heraeus
Kapillare für MST	Monolith NT.115	Nanotemper
Mikrowelle	Mikromat	AEG
MST-Gerät	Monolith X	Nanotemper
pH-Meter	766 Calimatic, IJ44C Elektrode	Knick
Pipetten	Pipetman: 2 µL, 10 µL, 20 µL, 100 µL, 200 µL, 1000 µL	Gilson Inc.
Polyacrylamid-Gelelektrophoresekammer	Mini-Protean 3 Cell System	Bio-Rad
Quarzküvetten	Suprasil QS (500 µL)	Hellma
Filter für HPLC-Eluenten	Regenerated Cellulose (Porengröße 0,45 µm, Dicke 170 µm)	Sartorius
Reinstwasseranlage	MilliQ Academic mit vorgeschalteter Elix 3 Anlage	Millipore
Rotationsverdampfer	Base Hei VAP Value	Heidolph
Rührplatte	IKAMAG RCT	IKA
Schüttelinkubator	Innova 4330	New Brunswick Scientific
Thermocycler	Mastercycler Personal	Eppendorf
Tischzentrifuge	miniSpin plus	Eppendorf
Tischzentrifuge	Microzentrifuge 5415D	Eppendorf
Trockenschrank	T6060	Heraeus
TSA-Gerät	CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad
Spannungsquelle	Powerpac 300	Bio-Rad
Ultraschallgerät	Sonorex	Bandelin
UV/Vis-Spektrometer	Cary 3E UV/Visible	Varian
Vortexer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Zentrifuge	Avanti J20 mit Rotor (JA-17, JS-3)	Beckman-Coulter

5.2 Methoden

5.2.1 Dockingexperimente

Die Dockingexperimente wurden in Zusammenarbeit mit dem *Institute for Advanced Simulations (IAS)/Computational Biomedicine (IAS-5/INM-9)* des Forschungszentrums Jülich unter Anleitung von Dr. Giulia Rossetti mit dem Programm Maestro (Version 2019-3) von Schroedinger durchgeführt.[89]

PDB Strukturen

Die Kristallstrukturen der DNA-MTasen, die in dieser Arbeit verwendet wurden, wurden von der PDB Datenbank *RCSB PDB Protein Data Bank* bezogen.[114] Für M.HhaI wurde die Struktur 1MHT verwendet, für M.MpeI der Eintrag 4DKJ.[56,67] In beiden Cokristallstrukturen ist ein Fluoratom kovalent an die 5-Position des ausgeklappten Zielcytosins gebunden. Da dieses die Dockingexperimente beeinflussen würde, wurde es in Maestro Schroedinger entfernt.

Protein-Vorbereitung

Für die Protein-Vorbereitung wurde das in Maestro Schroedinger vorhandene Werkzeug *Protein Preparation Wizard* genutzt.[115] Für die Aufbereitung wurden die Standardeinstellungen des Programms verwendet. Folgende Auswahlmöglichkeiten wurden gewählt: *Assign bond orders, Use CDD database, Add Hydrogens, Create zero-order bonds to metals, Create disulfide bonds, Delate waters beyond 5 Å from het groups, Generate het states using Epik pH: 7.0 +/- 2.0.* Nach der Aufbereitung wurde das ausgeklappte Cytosin wie oben bereits beschrieben angepasst, sodass es sich in der initialen Struktur für das Docking um unmodifiziertes Cytosin handelt. Daraufhin wurden unter der Reinigungsoption die Schritte Optimierung, Wasserentfernung und Minimierung durchgeführt. Folgende Auswahlmöglichkeiten wurden gewählt: *Sample water orientations, Use PROPKA pH: 7.0, Remove waters beyond hets 3.0 Å, Force field OPLS3e.*

Liganden-Vorbereitung

Für die Liganden-Vorbereitung wurden die synthetischen Doppeltaktivierten Cofaktoranaloga auf Basis des in der Kristallstruktur vorhandenen SAH erstellt, indem die Seitenkette am Schwefel manuell hinzugefügt wurde. Dabei ist auf die korrekte Stereochemie analog zum biologisch aktiven SAM zu achten. Für Aziridin-Cofaktoren wurde die Aminosäure-Seitenkette entfernt und das Sulfoniumzentrum durch Aziridin ersetzt. Die verlängerte Seitenkette an der 6-Position wurde manuell hinzugefügt. In der Liganden-Vorbereitung mit dem Werkzeug *LigPrep* wurden folgende Einstellungen gewählt: *Force field OPLS3e, Generate possible states at target pH 7.0 +/- 2.0, Using Epik, Desalt, Generate Tautomers, Determine chiralities from 3D structure, Generate at most: 32 per ligand, Output format: Maestro.*[89] Die Liganden wurden nach der Vorbereitung auf korrekte Stereochemie überprüft.

Grid-Vorbereitung

Die Gitter für die Dockingexperimente wurden mit dem Werkzeug *Receptor Grid Generation* erstellt.[89] Das Gitter definiert dabei den Raum des Enzyms, in den der Ligand, hier der Cofaktor, gedockt werden soll. Die Gitter wurden auf Basis der umgebenden Aminosäuren definiert und durch Wahl unterschiedlicher Freiheitsgrade in der Rotation so angepasst, bis das Docking von SAH die Kristallstruktur reproduzierte. Die Gitter wurden für jede Mutante neu erstellt und orientierten sich immer an der Kristallstruktur des Wildtyp-Enzyms. Je nach Größe der zu dockenden Liganden wurde die Größe des Gitters festgelegt. Die Gittergröße variierte zwischen 15 Å und der maximalen Größe von 36 Å. Folgende Aminosäuren der Struktur 4DKJ wurden zur Definition des ursprünglichen Gitters genutzt: 17-23, 44-47, 50, 80, 112-115, 132-134, 154, 157, 374-376. Rotierbare Gruppen waren dabei: 4182, 5103, 7138.

Docking

Die Dockingexperimente wurden mit dem Werkzeug *Ligand Docking* in Maestro Schroedinger, welches auf Glide (*Grid-based Ligand Docking with Energetics*) basiert, durchgeführt.[116] Dabei werden Interaktionen zwischen kleinen Molekülen (Liganden) und Rezeptoren untersucht. Der Rezeptor ist starr und der kleinere Ligand flexibel. Hier sind die Cofaktoranaloga die Liganden und die Enzym-DNA-Komplexe werden als Rezeptor betrachtet. Das Ergebnis des Dockings, welches den Liganden in der Bindungstasche des Rezeptors zeigt, wird als Pose bezeichnet. Die Posen

werden auf Basis der Interaktionen des Liganden mit dem Rezeptor evaluiert und entsprechend ihres *Scores* geordnet. Bei größeren Liganden ist es möglich, die *Core* oder SMARTS (*SMiles ARbitrary Target Specification*)[117] Funktion von Maestro zu nutzen. Dabei werden bestimmte Atomgruppen, in diesem Fall Zucker- und Adeninrest, des Cofaktors definiert und die Freiheitsgrade bezüglich Flexibilität beim Docking im Bezug auf eine Referenzstruktur eingeschränkt. Diese Funktion wurde für Dockings des Cofaktoranalogons AdoYnTAMRA mit SAH der Kristallstruktur oder molekulardynamischer Simulation als Referenz verwendet. Die Toleranz der mittleren quadratischen Abweichung (*root-mean-square deviation* RMSD) wurde auf 3 Å gesetzt. Für die Posen der Liganden wurde in der Ausgabe der Dockingeinstellungen des Werkzeugs *Ligand Docking* folgende Einstellungen gewählt: *Pose viewer file (includes receptor), Perform post-docking minimization, Number of poses per ligand to include: 10, Write per-residue interaction scores for residues within 12.0 Å of grid center, Compute RMSD to input ligand geometries.*

Molekulardynamische Simulationen

Die Molekulardynamischen Simulationen wurden von Jonas Gossen oder Emile de Bruyn unter Anleitung von Dr. Giulia Rossetti am *Institute for Advanced Simulations (IAS)/Computational Biomedicine (IAS-5/INM-9)* des Forschungszentrums Jülich durchgeführt. Die Simulationen wurden mit der Desmond Implementierung in der Schroedinger Version 2019-4 durchgeführt. Die Vorbereitung des Enzym-DNA-Cofaktor-Komplexes wurde mit dem *Protein Preparation* Werkzeug unter Standardeinstellungen durchgeführt.[115] Um den Komplex wurde zunächst eine TIP3P-Box gelegt, wobei die Abmessungen in jede Raumrichtung 10 Å größer waren als der Komplex. Es wurden Gegenionen zur Neutralisation eingeführt (6 Na^+-Ionen). Die Salzkonzentration von 0,15 M Natriumchlorid wurde gewählt, um ungefähr physiologischen Bedingungen zu entsprechen. Nach dem fünfschrittigen Standard-Relaxationsprotokoll wurde die Simulation isothermisch und isobar (*isothermal-isobaric ensemble, NPT ensemble*) bei einer Temperatur von 300 K und 1,01 bar durchgeführt.[118] Als Kraftfeld wurde OPLS-3e verwendet.[119]

5.2.2 Dünnschichtchromatographie

Zur dünnschichtchromatographischen Überprüfung des Reaktionsfortschritts und Charakterisierung der synthetisierten Verbindungen wurden auf TLC Silica Gel 60 F254 Glasplatten von Merck verwendet. UV-aktive Verbindungen wurden unter UV-Licht bei den Wellenlängen 254 nm und 312 nm sichtbar gemacht. Zum Anfärben wurden die DC-Platten in Kaliumpermanganat- oder Cerammoniummolybdat-Lösung getaucht und mit der Heizpistole erhitzt. Zur Herstellung der Kaliumpermanganat-Lösung wurde Kaliumpermanganat (3 g) und Kaliumcarbonat (20 g) in einer wässrigen Lösung von Natronlauge (0,1 %, 300 mL) gelöst. Die Cerammoniummolybdat-Lösung wurde aus Ammoniummolybdat (10 g) und Cersulfat (4 g) in verdünnter Schwefelsäure (400 mL, 1/10) hergestellt.

5.2.3 Säulenchromatographie

Zur säulenchromatographischen Aufreinigung synthetisierter Verbindungen wurde Kieselgel der Firma Macherey-Nagel mit 0.063 - 0.2 mm Korngröße als stationäre Phase verwendet. Die Zusammensetzung der mobilen Phase ist entsprechend in der jeweiligen Synthesevorschrift angegeben.

5.2.4 RP-HPLC

Reversed-phase HPLC wurde zur Analyse des Reaktionsfortschritts bei der Synthese, zur Charakterisierung und Quantifizierung der Verbindungen genutzt. Das System bestand aus binärem Pumpemsystem HPLC Waters 1525 und einem Dual Wavelength Detektor Waters 2487 Dual λ Absorbance. Folgende ProntoSIL C18 AQ Säulen der Firma Bischoff wurden eingesetzt: Analytisch: 250 x 4,6 mm, 5 µm, 120 Å mit C18 Vorsäule 8,0 mm x 4,0 mm, 5 µm, 120 Å, Fluss 1 mL/min; Semipräparativ: 250 x 8,0 mm, 5 µm, 120 Å mit C18 Vorsäule 33 mm x 8,0 mm, 5 µm, 120 Å, Fluss 3 mL/min; Präparativ: 250 x 20 mm, 5 µm, 120 Å mit C18 Vorsäule 30 mm x 20 mm, 5 µm, 120 Å, Fluss 10 mL/min. Die Steuerung des Systems, Speicherung der Daten und Analyse der Läufe, wie Retentionszeitbestimmung und Integration der Signale, erfolgte mit dem Programm Empower 3. Die gemessenen Wellenlängen sind an entsprechender Stelle im Methodenteil vermerkt. Das Pumpensystem wurde je nach

System mit verschiedenen Puffern A und B betrieben (s. Tabelle 10) und es wurden verschiedene Gradienten zur Auftrennung verwendet (s. Tabelle 11). Die verwendeten Puffer wurden wie unter 5.2.8 beschrieben durch Filtration entgast. Zur Analyse wurde die Probe in einem Gemisch aus Puffer A und Puffer B entsprechend der Startbedingung des jeweiligen Gradienten verdünnt. Zur Analyse wurden Mengen zwischen 250 pmol und 1 nmol aufgetragen. Bei der präparativen HPLC wurde die zu reinigende Probenmenge sukzessive erhöht, um eine Überladung der Säule zu vermeiden. Vor Injektion wurde die Säule 5 min mit 100 % Puffer B gespült und anschließend mindestens 15 min bei Startbedingungen der entsprechenden Methode equilibriert, bis sich eine stabile Basislinie einstellte.

Tabelle 10: Liste der verwendeten Puffersysteme für *rp*-HPLC.

System	**Puffer A**	**Puffer B**
System 1	0,01 % TFA, 100 % Reinstwasser	0,01 % TFA, 70 % Acetonitril, 30 % Reinstwasser
System 2	10 mM TEAAc, 100 % Reinstwasser	10 mM TEAAc, 70 % Acetonitril, 30 % Reinstwasser
System 3	10 mM $TEAHCO_3$, 100 % Reinstwasser, 1 mM NaN_3	10 mM $TEAHCO_3$, 70 % Acetonitril, 30 % Reinstwasser, 1 mM NaN_3

Tabelle 11: Liste der verwendeten Gradienten für rp-HPLC.

Methode	**Gradient**
Methode 1	0 - 30 min (7 - 25 % Puffer B), 30 - 31 min (25 - 100 % Puffer B)
Methode 2	0 - 10 min (17 - 23 % Puffer B), 10 - 30 min (23 - 100 % Puffer B)
Methode 3	0 - 30 min (3 - 12 % Puffer B), 30 - 31 min (12 - 100 % Puffer B)
Methode 4	0 - 20 min (3 - 10 % Puffer B), 20 - 21 min (10 - 100 % Puffer B)
Methode 5	0 - 10 min (12 - 20 % Puffer B), 10 - 40 min (20 - 100 % Puffer B)
Methode 6	0 - 20 min (5 - 8,2 % Puffer B), 20 - 42 min (8,2 - 100 % Puffer B)
Methode 7	0 - 15 min (0 - 10 % Puffer B), 15 - 20 min (10 - 100 % Puffer B)
Methode 8	0 - 5 min (10 % Puffer B), 5 - 20 min (10 - 30 % Puffer B), 20 - 25 min (30 - 100 % Puffer B)

Tabelle 11: Liste der verwendeten Gradienten für rp-HPLC.

Methode	Gradient
Methode 9	0 - 5 min (20 % Puffer B), 5 - 10 min (20 - 45 % Puffer B), 10 - 20 min (45 - 50 % Puffer B), 20 - 25 min (50 - 100 % Puffer B)

5.2.5 ^{1}H- und ^{19}F-NMR-Spektroskopie

^{1}H-NMR- und ^{19}F-NMR-Spektren wurden bei Raumtemperatur mit folgenden Geräten gemessen: Varian VNMRS 600 (600 MHz), Bruker AVANCHE NEO (600 MHz), Varian Inova 400 (400 MHz), Varian VNMRS 400 (400 MHz), Bruker AVANCHE NEO (400 MHz), Mercury 300 (300 MHz) und Varian VNMRS 300 (300 MHz). Alle Spektren wurden entweder in $CDCl_3$ oder deuteriertem DMSO aufgenommen. Das gewählte Lösemittel ist in der Synthesevorschrift vermerkt. Die chemischen Verschiebungen δ werden für ^{1}H-NMR in Relation zu Tetramethylsilan (δ = 0.00 ppm) und für ^{19}F-NMR in Relation zu $CFCl_3$ angegeben. Es werden folgende Abkürzungen verwendet: s = Singulett, d = Dublett, dd = Doppeldublett, ddd = Dreifachdublett, t = Triplett, tt = Doppeltriplett, q= Quartett, quin. = Quintett, m = Multiplett. Die Kopplungskonstanten (J) sind unter Angabe der Art der Kopplung in Hertz [Hz] angegeben.

5.2.6 Massenspektrometrie

Massenspektren wurde mit dem Gerät ThermoFisher Scientific LTQ-Orbitrap XL aufgenommen und mit positiver Elektronenspray-Ionisation durchgeführt.

5.2.7 UV/Vis-Spektroskopie

Zur Konzentrationsbestimmung UV-aktiver Verbindungen wurde UV/Vis-Spektroskopie verwendet und die gemessenen Intensitäten auf Grundlage des Extinktionskoeffizienten der Substanzen durch das Lambert-Beer´sche Gesetz umgerechnet. Es wurden Quarzküvetten der Firma Hellma der Schichtdicke 1 cm mit dem Volumen 500 µL verwendet. Zunächst wurden Lösungen durch Einwaage hergestellt und auf

Basis der Extinktionskoeffizienten verdünnt, sodass eine Extinktion von 0,5 resultieren sollte. Nach der Messung wurde die tatsächliche Konzentration durch die gemessene Extinktion, den Extinktionskoeffizienten und die Verdünnung berechnet. Bei fluoreszierenden Molekülen wurde der spezifische Extionktionskoeffizient des Fluorophors bei der Wellenlänger seiner maximalen Extinktion verwendet. Alle verwendeten Extinktionskoeffizienten sind in den Synthesevorschriften oder in Tabelle 5 und 6 unter 5.1.4 angegeben. Zum Nullabgleich für die Messungen wurde das Lösemittel ohne die zu messende Substanz verwendet.

5.2.8 Entgasen von Lösungsmitteln

Zum Entgasen von Lösungsmitteln für HPLC oder enzymatische Modifikationsreaktionen wurden verschiedene Methoden genutzt. Lösungsmittel für die HPLC wurden durch Filtration über regenerierte Cellulosefilter mit einer Porengröße von 0,45 µm und einer Dicke von 170 µm filtriert. Steriles Wasser für die enzymatischen Modifikationsreaktionen wurde in speziellen vakuumfesten Schottglasflaschen mit Vakuumanschluss 15 min im Ultraschallbad unter Vakuum entgast. Puffer für enzymatische Modifikationsreaktionen wurden mit der *Freeze-Pump-Thaw* Methode entgast. Dazu wurden die Puffer mithilfe von flüssigem Stickstoff im Kolben eingefroren und danach Vakuum angelegt. Das Vakuum wurde geschlossen, der Kolben jedoch nicht belüftet und die Puffer wurden auftauen gelassen. Diese Vorgehensweise wurde drei Mal wiederholt.

5.2.9 Linearisierung von Plasmid-DNA

Zur Linearisierung von pUC19 Plasmid-DNA wurde eine Lösung aus pUC19-DNA (0,1 µg/µL) und R.EcoRI (0,4 U/µL) in NEB4-Puffer (1x) hergestellt. Die Lösung wurde 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die DNA nach Packungsanweisung mit dem QIA quick PCR Purifikation-Kit aufgereinigt und in 50 µL Elutionspuffer eluiert. Zur Überprüfung der Restriktion wurde Agagorose-Gelelektrophorese (s. 5.2.10) mit ungeschnittener pUC19-DNA als Referenz durchgeführt. LpUC19-DNA wurde bis zur Verwendung in Elutionspuffer bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

5.2.10 Agarose-Gelelektrophorese

Agarose-Gelelektrophorese wurde in MiniSub Cell GT Gelkammern durchgeführt. Die Gele wurden unmittelbar vor der Verwendung frisch hergestellt. Dazu wurde Agarose (0,3 g, 1 %) in TBE-Puffer (30 mL, 0,5 x) durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst. Der Lösung wurde GelRed (3 µL) zugegeben und das durch Erhitzen verdampfte Wasser mit MilliQ Wasser aufgefüllt. Die Gellösung wurde zum Aushärten in die Gelkammer überführt und für die Taschen des Gels wurde entweder ein Kamm mit 8 oder mit 15 Platzhaltern eingesetzt. Nach einer halben Stunde war das Gel ausgehärtet und Kamm und Begrenzungen der Gelkammer wurden entfernt. Das Gel wurde mit TBE-Puffer (0,5 x) bis zur Markierung der Kammer vollständig übergossen. Die Proben (2 - 6 µL, ca. 100 ng DNA) wurden in LB-Puffer (1 x) aufgetragen. Als Referenz wurde in der äußersten Tasche ein Marker der mittleren DNA-Länge aufgetragen (Fast Ruler Middle Range, Banden: 5000, 2000, 850, 400, 100) und in der zweiten Tasche die verwendete unverdaute DNA. Die Gelelektrophorese wurde 20 - 45 min je nach Laufstrecke bei 90 V durchgeführt. Zur Dokumentation wurde das Gel nach der Elektrophorese unter UV-Licht (312 nm) mit Hilfe einer Kamera und der Software Intas fotografiert. Die Belichtungszeit betrug standardmäßig 1,52, konnte jedoch bei schwacher Bandenintensität verlängert werden.

5.2.11 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde in Mini Protean 3 Cell System Gelkammern durchgeführt. In der Kammer konnten zwei elektrophoretische Trennungen mit parallelen Bedingungen durchgeführt werden. Die Gellösung wurde je nach Anwendung hergestellt. Für die Hybridisierungsüberprüfung wurden 10 mL einer Lösung bestehend aus Acrylamid/*N,N´*-Methylenbisacrylamid (37,5:1, 12 %), APS (0,1 %) und TEMED (4,0 µL, 4,47 mM) in NEB-Puffer (1 x, DTT frei) hergestellt. Für die EMSA wurden 10 mL einer Lösung bestehend aus Acrylamid/*N,N´*-Methylenbisacrylamid (37,5:1, 7,5 %), APS (0,1 %) und TEMED (4,0 µL, 4,47 mM) in TBE-Puffer (0,5 x) hergestellt. Die Lösung wurde nach gründlichem Durchmischen direkt zum Polymerisieren zwischen die Glasplatten pipettiert. Dabei wurde ein Kamm mit 10 oder 15 Platzhaltern eingesetzt. Nach der Polymerisation wurden die Gele entweder direkt verwendet oder über Nacht in feuchtem Küchenpapier im Kühlschrank gelagert. Für die Gelelektrophorese wurden die Gele in die Kammer

eingespannt. Diese wurde mit NEB-Puffer (1 x, DTT frei) oder TBE-Puffer (0,5 x) außen bis zur Markierung und innen bis über den Rand der Taschen befüllt. Als Referenz wurde in der äußersten Tasche ein Marker mit sehr kurzen DNA-Längen aufgetragen (Fast Ruler Ultra Low Range, Banden: 200, 100, 50, 20, 10). Für die Hybridisierungsüberprüfung wurden DNA-Proben (10 pmol DNA) in LB-Puffer (1 x) aufgetragen und 1 h bei Raumtemperatur eine Spannung von 130 V angelegt. Das Gel wurde eine halbe Stunde in GelRed-Lösung (3 µL GelRed in 50 mL NEB4-Puffer 1 x) auf dem Schüttelinkubator angefärbt. Zur Dokumentation wurde das Gel nach der Elektrophorese unter UV-Licht (312 nm) mit Hilfe einer Kamera und der Software Intas fotografiert. Die Belichtungszeit betrug standardmäßig 1,52 sec, konnte jedoch bei schwacher Bandenintensität verlängert werden. Für die EMSA wurden Cy5-markierte Proben (0,1 pmol) in einem Wasser-Glycerin-Gemisch (10 %) aufgetragen und 2 h bei 4 °C eine Spannung von 40 V angelegt. Das Gel wurde mithilfe des ChemieDoc MP Imaging Sysmtems in Kombination mit der Software ImageLab von Bio-Rad im Cy5-Blot fotografiert.

5.2.12 ODN-Hybridisierung

Die DNA-Einzeltränge wurden HPLC-aufgereinigt bezogen. Zunächst wurden die Einzelstränge in Wasser gelöst und die Konzentration durch UV/Vis-Spektroskopie bestimmt (5.2.7). Es wurde eine Lösung der beiden komplementären Einzelstränge (je 50 µM) in CutSmart-Puffer (1 x) hergestellt und 3 min auf 100 °C im Heizblock erhitzt. Die Lösung wurde über 30 min auf Raumtemperatur abkühlen gelassen und die Hybridisierung durch native Polyacrylamid-Gelelektrophore (5.2.11) überprüft.

5.2.13 *Electrophoretic Mobility Shift Assay*

Für die *Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA)* wurden Proben (je 20 µL) aus Cy5-markierter DNA (10 nM, 12mer Duplex oder 12mer Duplex-Kontrolle), SAH (0 - 80 µM) und M.MpeI WT oder Mutanten (Titration ab 10 µM mit Halbierung der Konzentration) in M.MpeI-Puffer (1 x) hergestellt. Die Proben wurden 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden wie in 5.2.11 beschrieben durch native Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und fotografiert. Die Gele wurden

mit der Software ImageJ analysiert und die Intensität der Banden bestimmt. Durch die Abnahme der DNA-Konzentration wurde auf Basis des Dissoziationsgleichgewichts der K_D-Wert berechnet. Dabei wurde aufgrund des hohen Überschusses an Enzym die Enzymkonzentration gleich der Einwaagekonzentration gesetzt.

5.2.14 Mikroskalige Thermophorese

Für die mikroskalige Thermophorese (MST) wurden Proben (je 24 µL) aus Cy5-markierter DNA (30 nM, 12mer Duplex oder 12mer Duplex Kontrolle), SAH (0 µM/ 20 µM) und M.MpeI WT oder Mutanten (Titration ab 13,8 µM mit Halbierung der Konzentration) in Bindungs-Puffer (1 x) hergestellt. Die Proben wurden 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in Monolith Kapillaren NT.115 aufgenommen. Es wurden je 16 Kapillare pro Messung in das Nanotemper Monolith MST-Gerät eingelegt. Die Messungen wurden bei 22 °C mit folgenden Einstellungen vorgenommen: *Excitation Color = Nano - RED, Excitation Power: 20% (Auto-detect), MST Power: Medium.* Die aufgenommenen Daten wurden mit der Software MO.control analysiert und Bindungskonstanten K_D mit der Software *MO.Affinity Analysis v2.3* bestimmt.

5.2.15 *Thermal Shift Assay*

Thermal shift assays (TSA) wurden von Jari Willems an der TU Eindhoven durchgeführt. Es wurden Proben (je 40 µL) aus M.MpeI WT oder Mutanten (5 µM), mit und ohne DNA (25 µM, 12mer Duplex oder 12mer Duplex-Kontrolle), mit und ohne SAH (25 µM) und ProteoOrange Farbstoff (5 x) in M.MpeI-Puffer (1 x) mit β-Mercaptoethanol (10 mM) hergestellt. Die Lösungen wurden 1 h bei 4 °C inkubiert und anschließend in einer Platte mit 96 Kammern analysiert. Messungen wurden mit dem Gerät *CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System* durchgeführt. Die Proben wurden von 25 °C bis 80 °C erhitzt. Schmelzpunkte wurden durch die Software CFX Manager 3.1 im negativen Modus bestimmt.

5.3 Aktivitätstests

5.3.1 ODN-Modifikation

Modifikation von ODN Duplex-ODN wurden wie in Kapitel 5.2.12 beschrieben durch Hybridisierung der Einzelstränge hergestellt. Für die unterschiedlichen DNA-MTasen wurden ODN entsprechend der Erkennungssequenz gewählt. Das 14mer wurde für Modifikationsreaktionen mit M.TaqI verwendet und enthält die Erkennungssequenz 5´-TCGA-3´. Das 24mer wurden für Modifikationsreaktionen mit M.HhaI, M.MpeI und M.SssI verwendet und es enthält die spezifische Erkennungssequenz 5´-GCGC-3´ bzw. die darin enthaltene 5´-CG-3´-Sequenz. Das 12mer wurde für Modifikationsreaktionen mit M.MpeI verwendet und es enthält die spezifische Erkennungssequenz 5´-CG-3´.

M.MpeI Im Folgenden ist die Standardmodifikationsreaktion beschrieben. Anpassungen bei Parametern sind an entsprechender Stelle im Diskussionsteil vermerkt.
1. Schritt: Eine Lösung (100 µL bei der einschrittigen Markierung und 200 µL bei der zweischrittigen Markierung) aus M.MpeI WT oder Mutante (5 µM, 1 Eq.), 12mer oder 24mer ODN (5 µM, 5 µM Erkennungssequenzen, 1 Eq.), Cofaktor (80 µM), β-Mercaptoethanol (10 mM) und BSA (0,1 mg/mL) in M.MpeI-Puffer (1 x, entgast nach 5.2.8 durch *Freeze-Pump-Thaw*) wurde hergestellt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Kontrollen wurden analog ohne Enzym oder ohne Cofaktor hergestellt. Proteinase K (1 µL, 20 µg/µL) wurde zugegeben und die Inkubation wurde 1 h bei 37 °C fortgesetzt. Anschließend wurde die Proteinase K bei 80 °C 30 min hitzeinaktiviert.
2. Schritt: Im Fall der zweischrittigen Markierung wurde die Lösung halbiert und einer Hälfte wurde Clickreagenz (DBCO-5(6)-TAMRA in DMSO, 10 mM, 1,6 µL) für eine Endkonzentration von 160 µM zugesetzt. Der Click-Ansatz wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert.

M.SssI Im Folgenden ist die Standardmodifikationsreaktion beschrieben. Anpassungen bei Parametern sind an entsprechender Stelle im Diskussionsteil vermerkt.
1. Schritt: Eine Lösung (100 µL bei der einschrittigen Markierung und 200 µL bei der zweischrittigen Markierung) aus M.SssI WT oder Mutante (5 µM, 1 Eq.), 24mer

ODN (5 µM, 5 µM Erkennungssequenzen, 1 Eq.) und Cofaktor (80 µM) in M.SssI-Puffer (1 x) wurde hergestellt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Kontrollen wurden analog ohne Enzym oder ohne Cofaktor hergestellt. Proteinase K (1 µL, 20 µg/µL) wurde zugegeben und die Inkubation wurde 1 h bei 37 °C fortgesetzt. Anschließend wurde die Proteinase K bei 80 °C 30 min hitzeinaktiviert.
2. Schritt: Im Fall der zweischrittigen Markierung wurde die Lösung halbiert und einer Hälfte wurde Clickreagenz (DBCO-5(6)-TAMRA in DMSO, 10 mM, 1,6 µL oder DBCO-sulfo-Cy5 in DMSO, 10 mM, 7,5 µL) für eine Endkonzentration von 160 µM bzw. 700 µM zugesetzt. Der Click-Ansatz wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert.

M.HhaI Im Folgenden ist die Standardmodifikationsreaktion beschrieben. Anpassungen bei Parametern sind an entsprechender Stelle im Diskussionsteil vermerkt.
1. Schritt: Eine Lösung (100 µL bei der einschrittigen Markierung und 200 µL bei der zweischrittigen Markierung) aus M.HhaI WT oder Mutante (5 µM, 1 Eq.), 24mer ODN (5 µM, 5 µM Erkennungssequenzen, 1 Eq.) und Cofaktor (80 µM) in M.HhaI-Puffer (1 x) wurde hergestellt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Kontrollen wurden analog ohne Enzym oder ohne Cofaktor hergestellt. Die DNA-MTase wurde bei 65 °C 20 min deaktiviert.
2. Schritt: Im Fall der zweischrittigen Markierung wurde die Lösung halbiert und einer Hälfte wurde Clickreagenz (DBCO-5(6)-TAMRA in DMSO, 10 mM, 1,6 µL) für eine Endkonzentration von 160 µM zugesetzt. Der Click-Ansatz wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert.

M.TaqI Eine Lösung (50 µL) aus M.TaqI (5 µM, 1 Eq.), 14mer ODN (5 µM, 5 µM Erkennungssequenzen, 1 Eq.) und 6TAMRAAz (**11**) (40 µM) in M.Taq-Puffer für Aziridin-Cofaktoren (1 x) wurde hergestellt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Kontrollen wurden analog ohne Enzym oder ohne Cofaktor hergestellt. Proteinase K (1 µL, 20 µg/µL) wurde zugegeben und die Inkubation wurde 1 h bei 37 °C fortgesetzt. Anschließend wurde die Proteinase K bei 80 °C 30 min hitzeinaktiviert. Die Lösung wurde mit MilliQ-Wasser auf ein Gesamtvolumen von 100 µL aufgefüllt.

Enzymatische Fragmentierung Die Reaktionslösung (100 µL) wurde mit NAP5-Säulen nach Packungsanleitung des Herstellers aufgereingt. Für die Equilibrierung der Säulen wurde Nuklease P1-Puffer (1 x, 10 mL) und für die Elution der DNA Nuklease P1-Puffer (1 x, 0,5 mL) verwendet. Die Lösung wurde 10 min auf 100 °C erhitzt und im Eis 2 min abgekühlt. Es wurde Nuklease P1 (3 µL, 10 U/µL) zugesetzt und 2 h bei 37 °C inkubiert. CIAP (1,5 µL, 0,6 U/µL), CIAP-Puffer (10 x, 60 µL) und MilliQ-Wasser bis zu einem Gesamtvolumen von 600 µL wurden zugegeben und die Proben über Nacht bei 37 °C inkubiert.

HPLC-Analyse Die Nukleoside wurden durch analytische *rp*-HPLC aufgetrennt (System 2, Methode 6). Messungen wurden standardmäßig bei den Wellenlängen 260 nm/272 nm durchgeführt. Für Modifikationen mit TAMRA wurden Messungen bei 260 nm/555 nm, mit Cy5 bei 260 nm/646 nm, mit CF640R bei 260 nm/640 nm, mit ATTO643 bei 260 nm/643 nm und mit AF647 bei 260 nm/647 nm durchgeführt. Die Signale der Nukleoside dC, dG, dT, dA, 5mdC und 5-azido-dC wurden bei 260 nm und die Signale TAMRA-modifizierter Nukleoside bei 555 nm, Cy5-modifizierter Nukleoside bei 646 nm, CF640R-modifizierter Nukleoside bei 640 nm, ATTO643-modifizierter Nukleoside bei 643 nm und AF647-modifizierter Nukleoside bei 647 nm, integriert.

Quantifizierung Zur Quantifizierung wurden die erhaltenen Integralflächen mit den spezifischen Extinktionskoeffizienten (Tabelle 5, 5.1.4) normiert. Die normierten Flächen wurden summiert und durch die Anzahl der Nukleoside im verwendeten ODN-Duplex dividiert, um die gemittelte normierte Fläche für ein Nukleosid zu erhalten. Die normierten Flächen der Nukleoside wurden durch die normierte Fläche eines Nukleosids dividiert, um die experimentelle Anzahl der Nukleoside pro Signal zu bestimmen. Ausbeuten für modifizierte Nukleoside wurden berechnet, indem die Anzahl des modifizierten Nukleosids durch die Summe des modifizierten und unmodifizierten Nukleosids dividiert und auf die Anzahl modifizierbarer Nukleoside im Bezug auf die Gesamtzahl an Nukleosiden bezogen wurde. Die Ausbeute von 5-TAMRA-dC und 5-Cy5-dC in der zweischrittigen Markierung wurde durch Abnahme von 5-azido-dC bestimmt. Bei der simultanen Messung von Wellenlängen über und unter 350 nm ist es nicht möglich, bei dem verwendeten Detektor *2487 Dual Absorbance* den *Second Order Filter* einzusetzen. Dadurch ist das Verhältnis

der Signale der beiden gemessenen Wellenlänge zueinander fehlerbehaftet. Um diesen Effekt auszugleichen wird ein Korrekturfaktor von 2 verwendet, um die Nukleosidanzahl des modifizierten Nukleosids nach oben zu korrigieren. Dieser Korrekturfaktor wurde empirisch bestimmt, indem eine Probe des fragmentierten markierten ODN-Duplex einmal im *Dual-Wavelength*-Modus und einmal im *Single-Wavelength*-Modus mit Umstellen der gemessenen Wellenlänge von 260 nm auf die Wellenlänge des Fluorophors gemessen wurde. Der Korrekturfaktor von 2 bestätigt sich auch im Vergleich der Quantifizierung der zweischrittigen Markierungreaktion. Wird die Reaktion wie beschrieben über die Abnahme des Azid-modifizierten Nukleosids bestimmt ist die Ausbeute doppelt so groß, wie bei der direkten Quantifizierung über das Signal des Fluorophor-modifizierten Nukleosids durch den Extinktionskoeffizienten ohne Korrekturfaktor.

5.3.2 Modifikations/Restriktionstests

Zur Bestimmung der TON der DNA-MTasen mit dem natürlichen Cofaktor SAM (**1**) und diversen Cofaktoranaloga wurden Modifikations/Restriktionstests (M/R-Tests) durchgeführt. Die M/R-Tests sind im Folgenden mit Standardparametern und λ-DNA aufgeführt. Abweichungen von diesen sind an entsprechender Stelle im Diskussionsteil vermerkt. Analog können Tests auf LpUC19-DNA durchgeführt werden. Zur Linearisierung von pUC19-DNA siehe Kapitel 5.2.9. Hierbei muss darauf geachtet werden, dass die Menge an DNA-MTase an die Anzahl der jeweiligen Erkennungssequenzen auf LpUC19-DNA angepasst wird.

Doppeltaktivierte Cofaktoranaloga

M.MpeI Wildtyp und Mutanten Es wurde eine Reaktionslösung (242 µL) aus BSA (0,1 mg/mL), β-Mercaptoethanol (10 mM), λ-DNA (50 ng/µL) und Cofaktor (80 µM) in M.MpeI-Puffer (1 x, entgast nach 5.2.8 durch *Freeze-Pump-Thaw*) hergestellt. Analog wurden zwei Lösungen (20 µL) als Kontrollen hergestellt. Eine Kontrolle ohne Cofaktor enthielt BSA (0,1 mg/mL), β-Mercaptoethanol (10 mM), λ-DNA (50 ng/µL) und DNA-MTase (4,86 µM, entspricht 1 eq. bezogen auf 3113 5´-CG-3´-Erkennungssequenzen) in M.MpeI-Puffer (1 x) und eine Kontrolle ohne DNA-MTase enthielt BSA (0,1 mg/mL), β-Mercaptoethanol (10 mM), λ-DNA

(50 ng/µL) und Cofaktor (80 µM) in M.MpeI-Puffer (1 x). Die Reaktionslösung wurde auf 10 Mikroreaktionsgefäße aufgeteilt, wobei in das erste 38 µL (37,64 µL für M.MpeI Q136A/N374A) und in die Gefäße 2 bis 10 je 20 µL pipettiert wurden. Zu Gefäß 1 wurde anschließend DNA-MTase (2 µL einer 97,25 µM Lösung (2,36 µL für M.MpeI Q136A/N374A), Endkonzentration 4,86 µM, entspricht 1 eq. bezogen auf 3113 5´-CG-3´-Erkennungssequenzen) zugegeben. Die Lösung wurde gut durchmischt, 20 µL entnommen und in Gefäß 2 überführt. Sukzessive wurde dieser Vorgang wiederholt, um eine Verdünnungsreihe der DNA-MTase ab einem Äquivalent bezogen auf die Erkennungssequenzen zu erhalten. Die letzten 20 µL aus Gefäß 10 wurden verworfen. Alle Reaktionsansätze und die Kontrollen wurden 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde den Proben Proteinase K (1 µL, 20 µg/µL) zugesetzt und die Inkubation 1 h bei 37 °C fortgesetzt. Die Proteinase K wurde bei 80 °C 30 min hitzeinaktiviert. Es wurde eine Restriktions-Lösung (396 µL) aus R.BstUI (0,33 U/µL) in CutSmart-Puffer (1 x) hergestellt, 30 µL dieser Lösung zu jeder Probe gegeben und 1 h bei 60 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde den Proben Proteinase K (1 µL, 20 µg/µL) zugesetzt und die Inkubation 30 min bei 53 °C fortgesetzt. Die Proben wurden durch Agarose-Gelelektrophorese (5.2.10) analysiert und dokumentiert.

M.SssI Q142A/N370A Es wurden zwei Reaktionslösungen hergestellt. Die erste Lösung (40 µL) aus λ-DNA (50 ng/µL), Cofaktor (80 µM) und M.SssI Q142A/N370A (4,86 µM, entspricht 1 eq. bezogen auf 3113 5´-CG-3´-Erkennungssequenzen) in M.SssI-Puffer (1 x). Die zweite Lösung (210 µL) aus λ-DNA (50 ng/µL) und Cofaktor (80 µM) in M.SssI-Puffer (1 x). Analog wurden zwei Lösungen (20 µL) als Kontrollen hergestellt. Eine Kontrolle ohne Cofaktor enthielt λ-DNA (50 ng/µL) und DNA-MTase (4,86 µM, entspricht 1 eq. bezogen auf 5´-CG-3´-3113 Erkennungssequenzen) in M.SssI-Puffer (1 x) und eine Kontrolle ohne DNA-MTase enthielt λ-DNA (50 ng/µL) und Cofaktor (80 µM) in M.SssI-Puffer (1 x). Die zweite Reaktionslösung wurde auf 9 Mikroreaktionsgefäße aufgeteilt, wobei in jedes der Gefäße 20 µL pipettiert wurden. Aus der ersten Reaktionslösung wurden nach gutem Durchmischen 20 µL entnommen und in das erste Gefäß der aufgeteilten Lösung überführt. Sukzessive wurde dieser Vorgang wiederholt, um eine Verdünnungsreihe der DNA-MTase ab einem Äquivalent bezogen auf die Erkennungssequenzen zu erhalten. Die letzten 20 µL aus Gefäß 10 wurden verworfen. Alle Reaktionsansätze und die Kontrollen wurden 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die

DNA-MTase 20 min bei 65 °C hitzeinaktiviert. Es wurde eine Restriktions-Lösung (396 µL) aus R.BstUI (0,33 U/µL) in CutSmart-Puffer (1 x) hergestellt, 30 µL dieser Lösung zu jeder Probe gegeben und 1 h bei 60 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde den Proben Proteinase K (1 µL, 20 µg/µL) zugesetzt und die Inkubation 30 min bei 53 °C fortgesetzt. Die Proben wurden durch Agarose-Gelelektrophorese (5.2.10) analysiert und dokumentiert.

M.HhaI Q82A/Y254S/N304A Es wurde eine Reaktionslösung (242 µL) aus λ-DNA (50 ng/µL) und Cofaktor (80 µM) in M.HhaI-Puffer (1 x) hergestellt. Analog wurden zwei Lösungen (20 µL) als Kontrollen hergestellt. Eine Kontrolle ohne Cofaktor enthielt λ-DNA (50 ng/µL) und DNA-MTase (0,34 µM, entspricht 1 eq. bezogen auf 215 5´-GCGG-3´-Erkennungssequenzen) in M.HhaI-Puffer (1 x) und eine Kontrolle ohne DNA-MTase enthielt λ-DNA (50 ng/µL) und Cofaktor (80 µM) in M.HhaI-Puffer (1 x). Die Reaktionslösung wurde auf 10 Mikroreaktionsgefäße aufgeteilt, wobei in das erste 38 µL und in die Gefäße 2 bis 10 je 20 µL pipettiert wurden. Zu Gefäß 1 wurde anschließend DNA-MTase (2 µL einer 6,72 µM Lösung, Endkonzentration 0,34 µM, entspricht 1 eq. bezogen auf 215 5´-GCGC-3´-Erkennungssequenzen) zugegeben. Die Lösung wurde gut durchmischt und 20 µL entnommen und in Gefäß 2 überführt. Sukzessive wurde dieser Vorgang wiederholt, um eine Verdünnungsreihe der DNA-MTase ab einem Äquivalent bezogen auf die Erkennungssequenzen zu erhalten. Die letzten 20 µL aus Gefäß 10 wurden verworfen. Alle Reaktionsansätze und die Kontrollen wurden 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die DNA-MTase 20 min bei 65 °C hitzeinaktiviert. Es wurde eine Restriktions-Lösung (396 µL) aus R.HhaI (0,33 U/µL) und Magnesiumacetat (6,67 mM) in CutSmart-Puffer (1 x) hergestellt, 30 µL dieser Lösung zu jeder Probe gegeben und 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde den Proben Proteinase K (1 µL, 20 µg/µL) zugesetzt und die Inkubation 30 min bei 53 °C fortgesetzt. Die Proben wurden durch Agarose-Gelelektrophorese (5.2.10) analysiert und dokumentiert.

M.TaqI Es wurde eine Reaktionslösung (242 µL) aus λ-DNA (50 ng/µL) und Cofaktor (80 µM) in CutSmart-Puffer (1 x) hergestellt. Analog wurden zwei Lösungen (20 µL) als Kontrollen hergestellt. Eine Kontrolle ohne Cofaktor enthielt λ-DNA (50 ng/µL) und DNA-MTase (0,19 µM, entspricht 1 eq. bezogen auf 121 5´-TCGA-

3´Erkennungssequenzen) in CutSmart-Puffer (1 x) und eine Kontrolle ohne DNA-MTase enthielt λ-DNA (50 ng/µL) und Cofaktor (80 µM) in CutSmart-Puffer (1 x). Die Reaktionslösung wurde auf 10 Mikroreaktionsgefäße aufgeteilt, wobei in das erste 38 µL und in die Gefäße 2 bis 9 je 20 µL pipettiert wurden. Zu Gefäß 1 wurde anschließend DNA-MTase (2 µL, Endkonzentration 0,19 µM, entspricht 1 eq. bezogen auf 121 5´-TCGA-3´-Erkennungssequenzen) zugegeben. Die Lösung wurde gut durchmischt und 20 µL entnommen und in Gefäß 2 überführt. Sukzessive wurde dieser Vorgang wiederholt, um eine Verdünnungsreihe der DNA-MTase ab einem Äquivalent bezogen auf die Erkennungssequenzen zu erhalten. Die letzten 20 µL aus Gefäß 10 wurden verworfen. Alle Reaktionsansätze und die Kontrollen wurden 1 h bei 65 °C inkubiert. Es wurde eine Restriktions-Lösung (396 µL) aus R.TaqI (0,33 U/µL) in CutSmart-Puffer (1 x) hergestellt, 30 µL dieser Lösung zu jeder Probe gegeben und 1 h bei 65 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde den Proben Proteinase K (1 µL, 20 µg/µL) zugesetzt und die Inkubation 30 min bei 53 °C fortgesetzt. Die Proben wurden durch Agarose-Gelelektrophorese (5.2.10) analysiert und dokumentiert.

Aziridin-Cofaktoranaloga

M.MpeI Es wurden zwei Reaktionslösungen (20 µL) aus BSA (0,1 mg/mL), β-Mercaptoethanol (10 mM), LpUC-DNA (50 ng/µL), 6TAMRAAz (**11**) (40 µM) und M.MpeI (5,37 µM, entspricht 1,1 eq. bezogen auf 173 5´-CG-3´-Erkennungssequenzen) in M.MpeI-Puffer (1 x, entgast nach 5.2.8 durch *Freeze-Pump-Thaw*) hergestellt. Analog wurden zwei Lösungen (20 µL) als Kontrollen hergestellt. Eine Kontrolle ohne 6TAMRAAz (**11**) enthielt BSA (0,1 mg/mL), β-Mercaptoethanol (10 mM), LpUC-DNA (50 ng/µL) und DNA-MTase (5,37 µM, entspricht 1,1 eq. bezogen auf 173 5´-CG-3´-Erkennungssequenzen) in M.MpeI-Puffer (1 x) und eine Kontrolle ohne DNA-MTase enthielt BSA (0,1 mg/mL), β-Mercaptoethanol (10 mM), LpUC-DNA (50 ng/µL) und 6TAMRAAz (**11**) (40 µM) in M.MpeI-Puffer (1 x). Die Reaktionsansätze wurden 1 h und über Nacht und die Kontrollen wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde den Proben Proteinase K (1 µL, 20 µg/µL) zugesetzt und die Inkubation 1 h bei 37 °C fortgesetzt. Die Proteinase K wurde bei 80 °C 30 min hitzeinaktiviert. Es wurde eine Restriktions-Lösung (132 µL) aus R.BstUI (0,33 U/µL) in CutSmart-Puffer (1 x) hergestellt, 30 µL dieser Lösung

zu jeder Probe gegeben und 1 h bei 60 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde den Proben Proteinase K (1 µL, 20 µg/µL) zugesetzt und die Inkubation 30 min bei 53 °C fortgesetzt. Die Proben wurden durch Agarose-Gelelektrophorese (5.2.10) analysiert und dokumentiert.

M.SssI Es wurden zwei Reaktionslösungen (20 µL) aus LpUC-DNA (50 ng/µL), 6TAMRAAz (**11**) (40 µM) und M.SssI (5,37 µM, entspricht 1,1 eq. bezogen auf 173 5´-CG-3´-Erkennungssequenzen) in M.SssI-Puffer (1 x) hergestellt. Analog wurden zwei Lösungen (20 µL) als Kontrollen hergestellt. Eine Kontrolle ohne 6TAMRAAz (**11**) enthielt LpUC-DNA (50 ng/µL) und DNA-MTase (5,37 µM, entspricht 1,1 eq. bezogen auf 173 5´-CG-3´-Erkennungssequenzen) in M.SssI-Puffer (1 x) und eine Kontrolle ohne DNA-MTase enthielt LpUC-DNA (50 ng/µL) und 6TAMRAAz (**11**) (40 µM) in M.SssI-Puffer (1 x). Die Reaktionsansätze wurden 1 h und über Nacht und die Kontrollen wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde den Proben Proteinase K (1 µL, 20 µg/µL) zugesetzt und die Inkubation 1 h bei 37 °C fortgesetzt. Die Proteinase K wurde bei 80 °C 30 min hitzeinaktiviert. Es wurde eine Restriktions-Lösung (132 µL) aus R.BstUI (0,33 U/µL) in CutSmart-Puffer (1 x) hergestellt, 30 µL dieser Lösung zu jeder Probe gegeben und 1 h bei 60 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde den Proben Proteinase K (1 µL, 20 µg/µL) zugesetzt und die Inkubation 30 min bei 53 °C fortgesetzt. Die Proben wurden durch Agarose-Gelelektrophorese (5.2.10) analysiert und dokumentiert.

M.TaqI Es wurden zwei Reaktionslösungen (20 µL) aus LpUC-DNA (50 ng/µL), 6TAMRAAz (**11**) (40 µM) und M.TaqI (0,09 µM, entspricht 1,1 eq. bezogen auf 3 5´-TCGA-3´-Erkennungssequenzen) in M.TaqI-Puffer für Aziridin-Cofaktoren (1 x) hergestellt. Analog wurden zwei Lösungen (20 µL) als Kontrollen hergestellt. Eine Kontrolle ohne 6TAMRAAz (**11**) enthielt LpUC-DNA (50 ng/µL) und DNA-MTase (0,09 µM, entspricht 1,1 eq. bezogen auf 3 5´-TCGA-3´-Erkennungssequenzen) in M.TaqI-Puffer für Aziridin-Cofaktoren (1 x) und eine Kontrolle ohne DNA-MTase enthielt LpUC-DNA (50 ng/µL) und 6TAMRAAz (**11**) (40 µM) in M.TaqI-Puffer für Aziridin-Cofaktoren (1 x). Die Reaktionsansätze wurden 1 h und über Nacht und die Kontrollen wurden über Nacht bei 60 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde den Proben Proteinase K (1 µL, 20 µg/µL) zugesetzt und die Inkubation 1 h bei 37 °C fortgesetzt. Die Proteinase K wurde bei 80 °C 30 min hitzeinaktiviert.

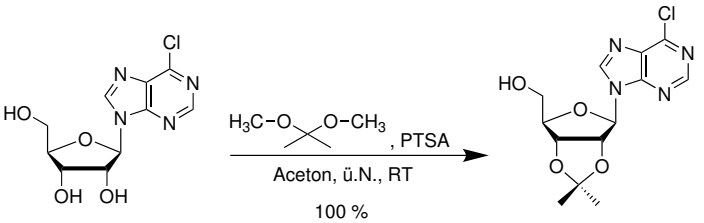
Es wurde eine Restriktions-Lösung (132 µL) aus R.TaqI (0,33 U/µL) in CutSmart-Puffer (1 x) hergestellt, 30 µL dieser Lösung zu jeder Probe gegeben und 1 h bei 60 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde den Proben Proteinase K (1 µL, 20 µg/µL) zugesetzt und die Inkubation 30 min bei 53 °C fortgesetzt. Die Proben wurden durch Agarose-Gelelektrophorese (5.2.10) analysiert und dokumentiert.

5.3.3 Untersuchung der Kinetik von MTAN

Zur Bestimmung der TON von MTAN aus *E.coli* wurde eine Lösung aus SAH (**2**) (1 mM) und MTAN (0,1 µM) in M.MpeI-Puffer (1x) hergestellt. Die Reaktionslösung wurde bei 37 °C inkubiert und 0 min, 5 min, 10 min, 15 min, 20 min, 30 min, 40 min und 60 min nach MTAN-Zugabe durch analytische rp-HPLC analysiert (System 1, Methode 7). In Excel (Version Microsoft Office Professional Plus 2019) wurde eine lineare Regression durchgeführt und durch die Steigung der Geraden die TON bestimmt.

5.4 Synthesen

5.4.1 6-Chloro-9-(2´,3´-*O*-isopropyliden-β-D-ribofuranosyl)-purin[92]



3
$C_{10}H_{11}ClN_4O_4$
286,67 g/mol

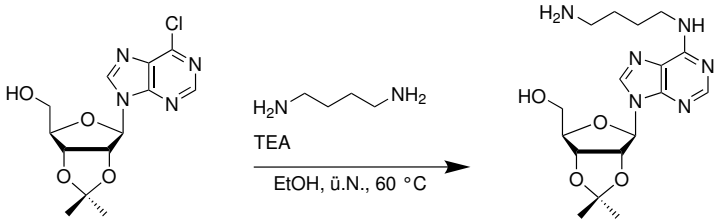
4
$C_{13}H_{15}ClN_4O_4$
326,74 g/mol

6-Chloro-9-β-D-ribofuranosylpurin (**3**) (1,00 g, 3,49 mmol) wurde in Aceton (20 mL) suspendiert. Dazu wurden 2,2-Dimethoxypropan (1,46 g, 14,02 mmol) und PTSA (0,54 g, 3,14 mmol) gegeben. Nach 1 h Rühren bei Raumtemperatur ergab sich eine klare Lösung. Die Lösung wurde über Nacht gerührt und mit Natriumcarbonatlösung (45 mL, 0,5 M) gequencht. Das organische Lösungmittel wurde am Rotationsverdampfer bei 40 °C entfernt. Die wässrige Phase wurde mit Chloroform (4 x 25 mL) extrahiert und die gesammelten organischen Phasen mit gesättigter Natriumchloridlösung (3 x 20 mL) gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Filtration wurde das Lösemittel unter Vakuum entfernt. Das Produkt **4** wurde als weißer Feststoff erhalten (1,17 g, 3,59 mmol, 100 % Ausbeute).

^{1}**H-NMR** (600 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 1,38 (s, 3H, Isopropyliden-CH_3a), 1,65 (s, 3H, Isopropyliden-CH_3b), 3,82 - 3,98 (m, 2H, H5´), 4,54 - 4,56 (m, 1H, H4´), 5,08 - 5,13 (m, 1H, H3´), 5,17 - 5,24 (m, 1H, H2´), 5,98 (d, ^3J = 4,65 Hz, 1H, H1´), 8,25 (s, 1H, H8), 8,76 (s, 1H, H2).

MS (ESI+): m/z (rel. Häufigkeit): ber. $C_{13}H_{15}ClN_4O_4$ 326,08; gem. 345,12 (100) $[M+H_2O+H]^+$, 349,07 (65) $[M+Na]^+$.

5.4.2 *N*6-(4"-Aminobutyl)-2´,3´-*O*-(isopropyliden)adenosin[93]



4
$C_{13}H_{15}ClN_4O_4$
326,74 g/mol

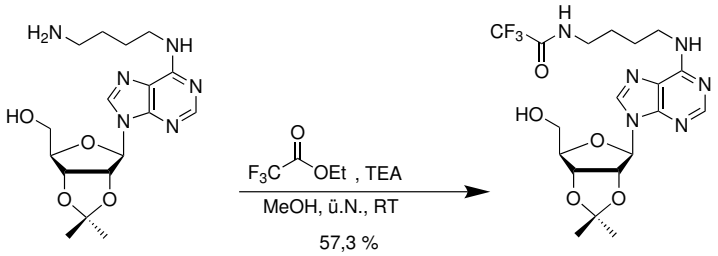
5
$C_{17}H_{26}N_6O_4$
378,43 g/mol

1,4-Diaminobutan (1,05 g, 11,9 mmol) und Triethylamin (1,7 mL, 11,9 mmol) wurden in Ethanol (5 mL) gelöst. Dazu wurde langsam eine Lösung aus 6-Chloro-9-(2´,3´-*O*-isopropyliden-β-D-ribofuranosyl)-purin (**4**) (0,97 g, 2,97 mmol) in Ethanol (50 mL) zugetropft. Anschließend wurde die Reaktion auf 60 °C erhitzt und 18 h gerührt. Die Reaktion wurde durch DC (CH_2Cl_2/MeOH, 93:7, $R_f = 0$) verfolgt. Das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt. Durch Reste von 1,4-Diaminobutan wurde die Ausbeute kombiniert über zwei Stufen nach säulenchromatographischer Aufarbeitung in 5.4.3 bestimmt. Das Produkt **5** wurde als blassgelber Feststoff erhalten.

^{1}**H-NMR** (400 MHz, [D$_6$]DMSO): δ [ppm] = 1,30 (s, 3H, Isopropyliden-CH$_3$a), 1,52 (s, 3H, Isopropyliden-CH$_3$b), 1,55 - 1,60 (m, 4H, H2", H3"), 2,54 - 2,59 (m, 2H, H4"), 3,46 - 3,56 (m, 4H, H1", H5´), 4,17 - 4,21 (m, 1H, H4´), 4,94 (dd, ^3J = 6,16 Hz, ^3J = 2,48 Hz, 1H, H3´), 5,32 (dd, ^3J = 6,12 Hz, ^3J = 2,90 Hz, 1H, H2´), 6,10 (d, ^3J = 3,14 Hz, 1H, H1´), 7,87 - 7,97 (br. s, 1H, 6-NH), 8,16 - 8,23 (br. s, 1H, H8), 8,32 (s, 1H, H2).

MS (ESI+): m/z (rel. Häufigkeit): ber. $C_{17}H_{26}N_6O_4$ 378,20; gem. 379,21 (100) [M+H]$^+$, 669,31 (40) [Dimer+H]$^+$.

5.4.3 *N*6-(4“-(Trifluoracetamido)butyl)-2´,3´-*O*-(isopropyliden)adenosin



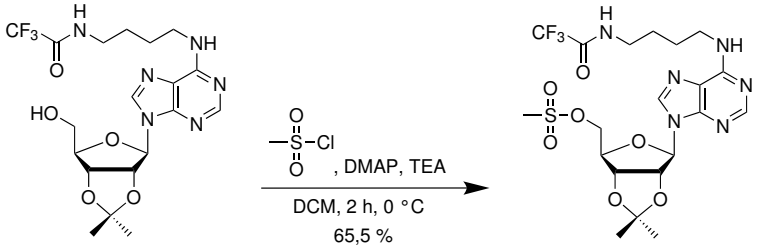
Es wurde eine Lösung von **5** (1,12 g, 2,97 mmol) und Triethylamin (0,96 mL, 6,92 mmol) in Methanol (50 mL) hergestellt. Dazu wurde Trifluoressigsäureethylester (2,5 mL, 20,8 mmol) gegeben. Die Reaktion wurde 18 h bei Raumtemperatur gerührt und per DC verfolgt (CH_2Cl_2/MeOH, 93:7, R_f = 0,31). Das Lösungsmittel wurde unter Vakuum entfernt. Das blassgelbe Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (EtOAc) aufgereinigt und das Produkt **6** (0,81 g, 1,47 mmol, 57,3 % über zwei Stufen) als farbloser Feststoff erhalten.

^{1}**H-NMR** (300 MHz, [D$_6$]DMSO): δ [ppm] = 1,31 (s, 3H, Isopropyliden-CH$_3$a), 1,53 (s, 3H, Isopropyliden-CH$_3$b), 1,57 - 1,61 (m, 4H, H2", H3"), 3,18 - 3,23 (m, 2H, H4"), 3,40 - 3,60 (m, 4H, H1", H5´), 4,16 - 4,23 (m, 1H, H4´), 4,95 (dd, ^3J = 6,17 Hz, ^3J = 2,51 Hz, 1H, H3´), 5,22 (t, ^3J = 5,55 Hz, 1H, 5´-OH), 5,32 (dd, ^3J = 6,15 Hz, ^3J = 3,06 Hz, 1H, H2´), 6,11 (d, ^3J = 3,09 Hz, 1H, H1´), 7,92 (br. s, 1H, 6-NH), 8,21 (br. s, 1H, H8), 8,34 (s, 1H, H2), 9,31-9,41 (m, 1H, Amid-NH).

^{19}**F-NMR** (282 MHz, [D$_6$]DMSO): δ [ppm] = -74,38 (CF$_3$).

MS (ESI+): m/z (rel. Häufigkeit): ber. $C_{19}H_{25}F_3N_6O_5$ 474,18; gem. 475,2 (100) [M+H]$^+$, 497,2 (9) [M+Na]$^+$, 303,1 (4) [*N*6-(4“-(Trifluoracetamido)butyladenin+H]$^+$.

5.4.4 *N*6-(4"-(Trifluoracetamido)butyl)-2´,3´-*O*-(isopropyliden)-5´-*O*-mesyl-adenosin



6
$C_{19}H_{25}F_3N_6O_5$
474,44 g/mol

7
$C_{20}H_{27}F_3N_6O_7S$
552,53 g/mol

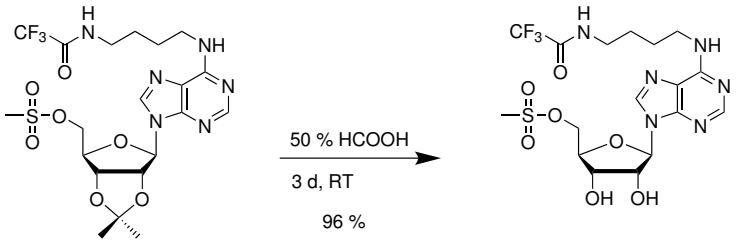
Es wurde eine Lösung aus **6** (768 mg, 1,65 mmol), Triethylamin (6 mL, 43,28 mmol) und DMAP (202 mg, 1,65 mmol) in trockenem CH_2Cl_2 (60 mL) hergestellt. Zum Zutropfen von Methansulfonsäurechlorid (1,28 mL, 16,5 mmol) wurde die Lösung im Eisbad gekühlt und anschließend 2 h bei 0 °C gerührt. Die Reaktion wurde per DC verfolgt (CH_2Cl_2/MeOH, 95:5, R_f = 0,23). Durch Zugabe von eiskalter, ges. $NaHCO_3$-Lösung (15 mL) wurde die Reaktion beendet. Die wässrige Phase wurde mit eiskaltem Chloroform (3 x 20 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit $MgSO_4$ getrocknet. Nach Filtration wurde das Lösemittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt durch Säulenchromatographie aufgereinigt (CH_2Cl_2/MeOH, 95:5). Das Produkt **7** (448 mg, 0,81 mmol, 49,2 %) wurde als farbloser Feststoff erhalten.

^{1}**H-NMR** (400 MHz, [D$_6$]DMSO): δ [ppm] = 1,32 (s, 3H, Isopropyliden-CH_3a), 1,54 (s, 3H, Isopropyliden-CH_3b), 1,52 - 1,66 (m, 4H, H2", H3"), 3,09 (s, 3H, Mesyl-CH_3), 3,17 - 3,22 (m, 2H, H4"), 3,24 - 3,27 (m, 2H, H1"), 4,29 - 4,54 (m, 3H, H4´ und H5´), 5,06-5,11 (m, 1H, H3´), 5,43 (dd, ^3J = 6,24 Hz, ^3J = 2,36 Hz, 1H, H2´), 6,24 (d, ^3J = 2,35 Hz, 1H, H1´), 7,92 (br. s, 1H, 6-NH), 8,22 (br. s, 1H, H8), 8,29 (s, 1H, H2), 9,35-9,44 (m, 1H, Amid-NH).

^{19}**F-NMR** (282 MHz, [D$_6$]DMSO): δ [ppm] = -74,38 (CF_3).

MS (ESI+): m/z (rel. Häufigkeit): ber. $C_{20}H_{27}F_3N_6O_7S$ 552,16; gem. 457,2 (100) [Cyclonukleosid], 553,2 (1) $[M+H]^+$.

5.4.5 *N*6-(4“-(Trifluoracetamido)butyl)-5´-*O*-mesyl-adenosin[71]



7
$C_{20}H_{27}F_3N_6O_7S$
552,53 g/mol

8
$C_{17}H_{23}F_3N_6O_7S$
512,46 g/mol

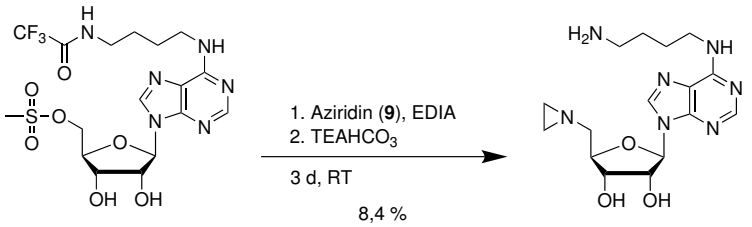
Das Nukleosid **7** (76,5 mg, 0,15 mmol) wurde in wässriger Ameisensäure (50 %, 20 mL) gelöst und 3 d bei Raumtemperatur gerührt. Währenddessen wurde die Reaktion per DC (CH_2Cl_2/MeOH, 95:5, R_f = 0,17) verfolgt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter Hochvakuum entfernt und Lösemittelreste mit einem Wasser/Methanol-Gemisch (1:1, 3 x 10 mL) coevaporiert. Das Produkt **8** (73,0 mg, 0,14 mmol, 96 %) wurde als farbloses Pulver erhalten.

^{1}**H-NMR** (400 MHz, [D_6]DMSO): δ [ppm] = 1,49 - 1,60 (m, 4H, H2", H3"), 3,15 (s, 3H, Mesyl-CH_3), 3,19 - 3,21 (m, 2H, H4"), 3,24 - 3,28 (m, 2H, H1"), 4,10 - 4,16 (m, 1H, H4´), 4,24 (dd, ^3J = 9,48 Hz, ^3J = 4,70 Hz, 1H, H3´), 4,38 - 4,48 (m, 2H, H5´), 4,65 (dd, ^3J = 10,60 Hz, ^3J = 5,32 Hz, 1H, H2´), 5,46 (d, ^3J = 5,35 Hz, 1H, H1´), 7,88 (br. s, 1H, 6-NH), 8,21 (br. s, 1H, H8), 8,30 (s, 1H, H2), 9,35-9,40 (m, 1H, Amid-NH).

^{19}**F-NMR** (376 MHz, [D_6]DMSO): δ [ppm] = -74,39 (CF_3).

MS (ESI+): m/z (rel. Häufigkeit): ber. $C_{17}H_{23}F_3N_6O_7S$ 512,13; gem. 535,1 (100) $[M+Na]^+$, 513,2 (19) $[M+H]^+$, 417,1 (13) [Cyclonukleosid].

5.4.6 5´-*N*-Aziridinyl-*N*6-(4“-aminobutyl)-5´-desoxyadenosin



8

$C_{17}H_{23}F_3N_6O_7S$
512,46 g/mol

10

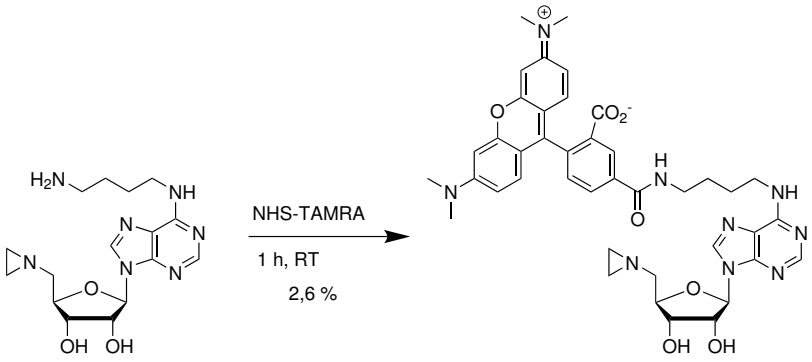
$C_{16}H_{25}N_7O_3$
363,42 g/mol

Es wurde eine Lösung aus **8** (130 mg, 0,25 mmol) in Ethyldiisopropylamin (3 mL, 18 mmol) hergestellt. Dazu wurde frisch destilliertes Aziridin (**9**) (1,1 mL, 17,9 mmol) zugetropft. Die Lösung wurde 3 d bei Raumtemperatur gerührt und die Reaktion durch analytische *rp*-HPLC (System 3, Methode 8, Wellenlängen 260 nm/ 272 nm, R_t = 18 min) verfolgt. Überschüssiges Aziridin und das Lösemittel wurden unter Hochvakuum entfernt und der gelbliche Rückstand in $TEAHCO_3$-Puffer (2 mL, 10 mM, pH 8,6) aufgenommen. Das Rohprodukt wurde durch semipräparative *rp*-HPLC (System 3, Methode 8, Wellenlängen 260 nm/272 nm, R_t = 17,6 min) aufgereinigt und die Ausbeute UV-spektroskopisch bestimmt. Das Produkt **10** (7,7 mg, 21,1 µmol, 8,4 %) wurde bei - 80 °C in Elutionspuffer bis zur weiteren Verwendung gelagert.

MS (ESI+): m/z (rel. Häufigkeit): ber. $C_{16}H_{25}N_7O_3$ 363,20; gem. 364,21 (100) $[M+H]^+$.

UV-Absorption: (95 % Ethanol) $\epsilon_{268\ nm} = 16800\ \frac{L}{cm \cdot mol}$.[91]

5.4.7 6TAMRAAz

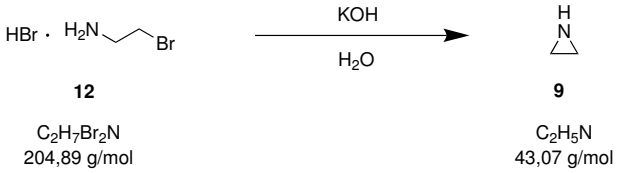


Das in Elutionspuffer gelagerte Nukleosid **10** (2,52 mg, 6,92 µmol) wurde eingeengt (3,67 mM) und mit TAMRA-NHS (3,6 mg, 6,83 µmol) in trockenem DMSO (0,6 mL) versetzt. Die Reaktion wurde 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und durch analytische *rp*-HPLC (System 3, Methode 9, Wellenlängen 260 nm/555 nm, R_t = 16 min) verfolgt. Die Reaktionsmischung wurde durch semipräparative *rp*-HPLC (System 3, Methode 9, Wellenlängen 260 nm/555 nm), aufgetrennt und das Produkt 6TAMRAAz (**11**) (R_t = 15-16 min) nach Entfernen des Elutionspuffers durch Gefriertrocknung als dunkelroter Feststoff erhalten (137 µg, 176 nmol, 2,6 %).

MS (ESI+): m/z (rel. Häufigkeit): ber. $C_{41}H_{45}N_9O_7$ 775,34; gem. 776,35 (100) $[M+H]^+$.

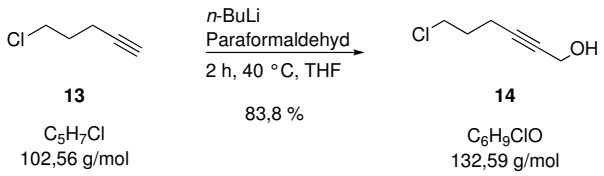
UV-Absorption: $\epsilon_{555\ \mathrm{nm}} = 84000\ \frac{\mathrm{L}}{\mathrm{cm \cdot mol}}$.

5.4.8 Azidirin[95,120]



Es wurde KOH (70,1 g, 1,25 mol) in Wasser (125 mL) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Dazu wurde 2-Bromethylamin-Hydrobromid (**12**) (12,5 g, 61 mmol) gegeben. Die Lösung wurde sich erwärmen gelassen und 2 h bei Raumtemperatur gerührt.[120] Um Verunreinigungen durch Wasser auszuschließen, wurde Azirdin mindestens zweimal auf trockenes KOH destilliert, bis eine Kopftemperatur von 55°C konstant erhalten wurde. Aziridin (**9**) (1,3 g, 31 mmol, 51 %) wurde als farblose Flüssigkeit erhalten und unmittelbar für weitere Reaktionen eingesetzt. Eine Lagerung bei 4 °C ist möglich, aber vor der Verwendung wurde Aziridin dann noch einmal frisch destilliert.

5.4.9 6-Chlorhex-2-in-1-ol



13

C_5H_7Cl
102,56 g/mol

83,8 %

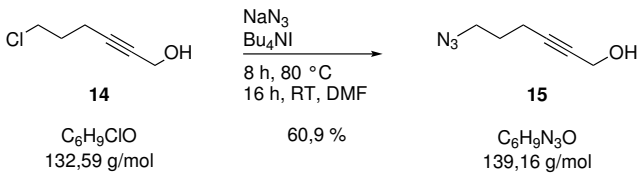
14

C_6H_9ClO
132,59 g/mol

Unter Argon als Schutzgas wurde eine Lösung aus 5-Chlorpent-1-in (**13**) (1,10 g, 10,7 mmol) in THF (9.5 mL) in einem ausgeheizten Kolben hergestellt. Die Lösung wurde in einer Kältemischung aus Aceton und Trockeneis auf - 78 °C gekühlt. Es wurde tropfenweise *n*-BuLi (6,70 mL, 10,7 mmol, 1,6 M in Hexan) hinzugegeben. Die Kältemischung wurde entfernt, Paraformaldehyd (0,805 g, 26,8 mmol) zugesetzt und die Reaktionsmischung 2 h bei 40 °C gerührt. Die Lösung wurde mit ges. Ammoniumchlorid-Lösung (10 mL) versetzt und mit Ether (3 x 20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. Ammoniumchlorid-Lösung (2 x 20 mL) und ges. Natriumchlorid-Lösung (2 x 20 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und nach Filtration das Lösemittel unter Vakuum entfernt. Das Produkt **14** wurde als gelbliches Öl erhalten (1,19 g, 8,97 mmol, 83,8 %).

^{1}**H-NMR** (600 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 1,96 (quin, ^3J = 6,6 Hz, 2H, $ClCH_2C\mathbf{H}_2CH_2$), 2,42 (tt, ^3J = 6,8 Hz, ^5J = 2,2 Hz, 2H, $ClCH_2CH_2C\mathbf{H}_2$), 3,64 (t, ^3J = 6,3 Hz, 2H, $ClC\mathbf{H}_2CH_2$), 4,24 (t, ^5J = 2,2 Hz, 2H, $C\mathbf{H}_2OH$).

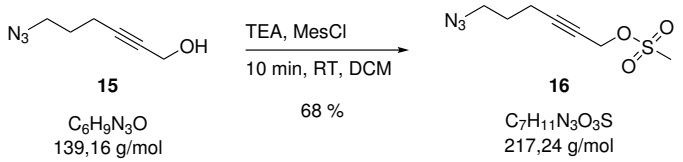
5.4.10 6-Azidohex-2-in-1-ol



Es wurde eine Lösung aus 6-Chlorhex-2-in-1-ol (**14**) (1,0 g, 7,54 mmol) in DMF (50 mL) hergestellt. Dazu wurde unter Rühren Natriumazid (1,47 g, 22,6 mmol) und Tetrabutylammoniumiodid (0,278 g, 0,754 mmol) gegeben. Die Lösung wurde 8 h bei 80 °C und anschließend über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde Essigsäureethylester (40 mL) hinzugefügt und die Lösung mit Wasser (2 x 20 mL) und ges. Natriumchlorid-Lösung (2 x 20 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und nach Filtration das Lösemittel unter Vakuum entfernt. Das Produkt **15** wurde als gelbliches Öl erhalten (0,64 g, 4,59 mmol, 60,9 %). Das ^{1}H-NMR-Spektrum enthielt kein verbleibendes Signal für das Edukt (**14**), sodass auf eine vollständige Substitution geschlossen werden konnte und auf eine destillative Aufarbeitung verzichtet wurde.

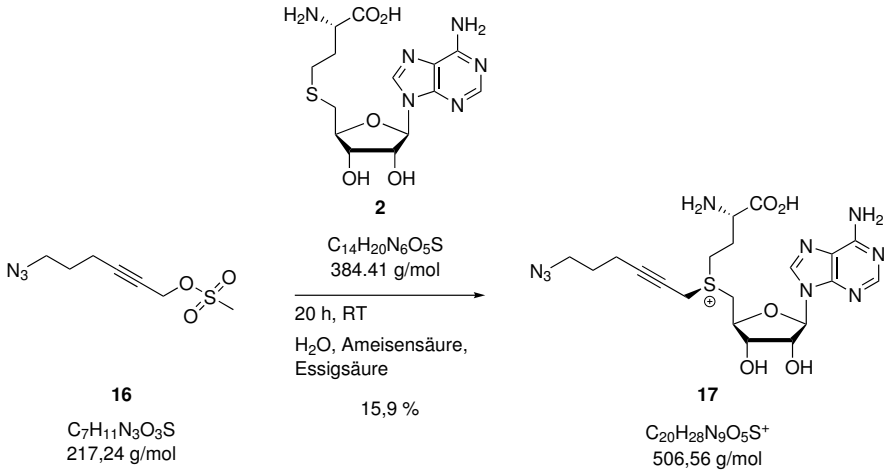
^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 1,77 (quin, ^3J = 6,7 Hz, 2H, $N_3CH_2C\mathbf{H}_2CH_2$), 2,34 (tt, ^3J = 6,9 Hz, ^5J = 2,2 Hz, 2H, $N_3CH_2CH_2C\mathbf{H}_2$), 3,40 (t, ^3J = 6,6 Hz, 2H, $N_3C\mathbf{H}_2CH_2$), 4,25 (t, ^5J = 2,2 Hz, 2H, $C\mathbf{H}_2OH$).

5.4.11 6-Azidohex-2-in-1-ylmethansulfonat



Bei 0 °C wurde eine Lösung aus 6-Azidohex-2-in-1-ol (**15**) (348 mg, 2,50 mmol), Methansulfonsäurechlorid (252 µL, 3,25 mmol) und Triethylamin (592 µL, 4,25 mmol) unter Argon als Schutzgas in DCM (4 mL) hergestellt. Die Lösung wurde 10 min bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde mit Wasser (2 mL) versetzt und mit Salzsäure (2 mL, 1 M) und ges. Natriumchloridlösung (2 mL) gewaschen. Das Lösemittel wurde unter Vakuum entfernt und der aktivierte Alkohol **16** (369 mg, 1,7 mmol, 68 %) direkt in der nächsten Stufe eingesetzt.

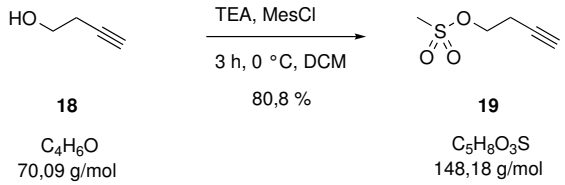
5.4.12 AdoYnAzid (3C)



AdoYnAzid (3C) (**17**) wurde auf Basis einer modifizierten Reaktionsvorschrift nach Lukinavičius *et. al.* hergestellt.[79] In einer Mischung aus Wasser, Ameisensäure und Essigsäure (1:1:1, 2,1 mL) wurden SAH (**2**) (20,0 mg, 52,0 µmol) und 6-Azidohex-2-in-ylmethansulfonat (**16**) (362 mg, 1,67 mmol) gelöst. Die Lösung wurde 20 h bei Raumtemperatur gerührt und währenddessen der Reaktionsfortschritt per analytischer *rp*-HPLC verfolgt (System 1, Methode 7, Wellenlängen 260 nm/272 nm, R_t = 15 min). Die Lösung wurde mit Ether (2 mL) gewaschen und durch präparative *rp*-HPLC aufgereinigt (System 1, Methode 7, Wellenlängen 260 nm/272 nm, R_t = 18 min). Das biologisch inaktive Epimer (R_t = 13,5 min) konnte erfolgreich abgetrennt werden. Produkthaltige Fraktionen wurden gesammelt, vereinigt und durch Gefriertrocknung bis zu einer gewünschten Konzentration eingeengt. Diese wurde UV-spektroskopisch auf Basis des Extinktionskoeffizienten von Adenosin (15400 $\frac{L}{cm \cdot mol}$) bei 260 nm bestimmt (8,28 µmol, 15,9 %). Der Cofaktor **17** wurde in Elutionspuffer bei - 20 °C gelagert.

MS (ESI+): *m/z* (rel. Häufigkeit): ber. $C_{20}H_{28}N_9O_5S^+$ 506,19; gem. 506,19 (100) $[M^+]$, 427,13 (24) $[Thioether+Na]^+$, 405,15 (41) $[Thioether+H]^+$, 250,10 (51) [5´-Desoxyadenosylrest]$^+$.

5.4.13 But-3-in-1-ylmethansulfonat

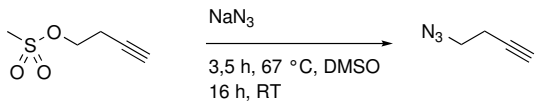


Unter Argon als Schutzgas wurde eine Lösung aus But-3-in-1-ol (**18**) (5,4 mL, 4,53 g, 64,6 mmol) und Triethylamin (15,0 mL, 107 mmol) in trockenem DCM (50 mL) hergestellt und im Eisbad auf 0 °C gekühlt. Methansulfonsäurechlorid (8,28 mL, 107 mmol) wurde in trockenem DCM (20 mL) gelöst und während 3 h unter starkem Rühren zu der Reaktionslösung zugetropft. Es bildete sich ein Niederschlag, welcher durch Zugabe von Wasser (35 mL) gelöst wurde. Die organische Phase wurde mit Wasser (2 x 35 mL) gewaschen und das Lösemittel unter Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde durch Vakuumdestillation aus der erhaltenen orangenen Lösung aufgereinigt (Kopftemperatur: 90 °C) und der aktivierte Alkohol **19** als farblose Flüssigkeit erhalten (7,73 g, 52,2 mmol, 80,8 %)

^{1}**H-NMR** (300 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 2,06 (t, ^4J = 2,6 Hz, 1H, $CH_2CC\mathbf{H}$), 2,65 (dt, ^3J = 6,8 Hz, ^4J = 2,6 Hz, 2H, $SO_2OCH_2C\mathbf{H}_2$), 3,05 (s, 3H, $C\mathbf{H}_3SO_2O$), 4,30 (t, ^3J = 6,8 Hz, 2H, $SO_2OC\mathbf{H}_2CH_2$).

MS (ESI+): *m/z* (rel. Häufigkeit): ber. $C_5H_8O_3S$ 148,02; gem. 171,01 (47) $[M+Na]^+$.

5.4.14 4-Azidobut-1-in



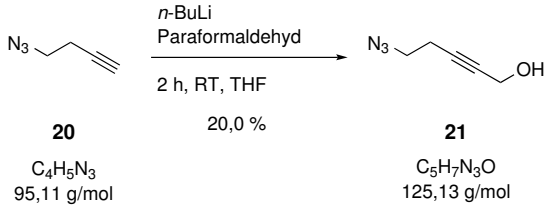
19
$C_5H_8O_3S$
148,18 g/mol

20
$C_4H_5N_3$
95,11 g/mol

Es wurde eine Lösung aus But-3-in-1-ylmethansulfonat (**19**) (2,01 g, 13,6 mmol) und Natriumazid (2,24 g, 34,5 mmol) in DMSO (70 mL) hergestellt. Die Lösung wurde 3,5 h bei 67 °C und anchließend über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde mit Wasser (30 mL) versetzt und mit Diethylether (3 x 100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel unter Vakuum reduziert, jedoch aufgrund der hohen Flüchtigkeit von **20** nicht vollständig entfernt. Das Azid **20** wurde als gelbliches Öl erhalten.

^{1}**H-NMR** (300 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 2,06 (t, ^4J = 2,6 Hz, 1H, $CH_2CC\mathbf{H}$), 2,48 (dt, ^3J = 6,9 Hz, ^4J = 2,6 Hz, 2H, $N_3CH_2C\mathbf{H}_2$), 3,42 (t, ^3J = 6,9 Hz, 2H, $N_3C\mathbf{H}_2CH_2$).

5.4.15 5-Azidopent-2-in-1-ol



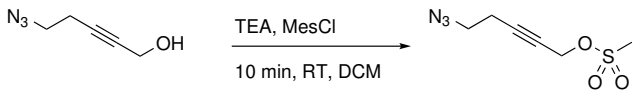
20
$C_4H_5N_3$
95,11 g/mol

21
$C_5H_7N_3O$
125,13 g/mol

Unter Argon als Schutzgas wurde eine Lösung von 4-Azidobut-1-in (**20**) (355 mg, 4,21 mmol) in THF (10 mL) in einem ausgeheizten Kolben hergestellt. Die Lösung wurde in einer Kältemischung aus Aceton und Trockeneis auf - 78 °C herunter gekühlt. Es wurde tropfenweise *n*-BuLi (2,9 mL, 4,63 mmol, 1,6 M in Hexan) hinzugegeben. Die Lösung wurde 1 h bei - 78 °C gerührt. Die Kältemischung wurde entfernt, Paraformaldehyd (317 mg, 10,5 mmol) zugesetzt und 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde mit ges. Ammoniumchlorid-Lösung (10 mL) versetzt und mit Ether (3 x 20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. Natriumchlorid-Lösung (1 x 20 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und nach Filtration das Lösemittel unter Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatograpisch aufgearbeitet (Pentan/Diethylether, 1:1, R_f = 0,50). Das Produkt **21** wurde als gelbliches Öl erhalten (93,2 mg, 745 µmol, 20,0 %).

^{1}**H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 1,64 (chem. Verschiebung ist konzentrationsabhängig, t, ^3J = 6,0 Hz, $CH_2O\mathbf{H}$), 2,25 (tt, ^3J = 6,8 Hz, ^5J = 2,1 Hz, 2H, $N_3CH_2C\mathbf{H}_2$), 3,39 (t, ^3J = 6,8 Hz, 2H, $N_3C\mathbf{H}_2CH_2$), 4,26 (dt, ^3J = 6,0 Hz, ^5J = 2,1 Hz, 2H, $C\mathbf{H}_2OH$).

5.4.16 5-Azidopent-2-in-1-ylmethansulfonat



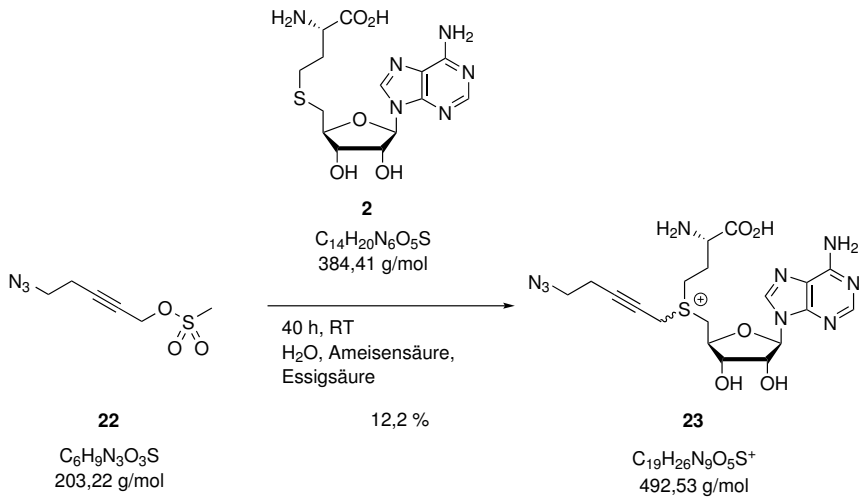
21
$C_5H_7N_3O$
125,13 g/mol

22
$C_6H_9N_3O_3S$
203,22 g/mol

Unter Argon als Schutzgas wurde eine Lösung aus 5-Azidopent-2-in-1-ol (**21**) (124 mg, 992 µmol) und Triethylamin (237 µL, 1,7 mmol) in trockenem DCM (3 mL) hergestellt und im Eisbad auf 0 °C gekühlt. Methansulfonsäurechlorid (102 µL, 1,31 mmol) wurde in trockenem DCM (1 mL) gelöst und unter starkem Rühren zu der Reaktionslösung zugetropft. Der Reaktionsansatz wurde 10 min bei Raumtemperatur gerührt. Es bildete sich ein Niederschlag, welcher durch Zugabe von Wasser (2 mL) gelöst wurde. Die organische Phase wurde mit konz. Salzsäure (2 mL) und ges. Natriumchlorid-Lösung (2 mL) gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und nach Filtration wurde das Lösemittel unter Vakuum entfernt. Das Produkt **22** wurde als gelbliches Öl erhalten (92,6 mg, 456 µmol, 46,0 %).

^{1}**H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 2,56 (tt, ^3J = 6,6 Hz, ^5J = 1,8 Hz, 2H, $N_3CH_2C\mathbf{H}_2$), 3,12 (s, 3H, $CH_2OSO_2\mathbf{CH}_3$), 3,43 (t, ^3J = 6,6 Hz, 2H, $N_3C\mathbf{H}_2CH_2$), 4,85 (t, ^5J = 1,8 Hz, 2H, $C\mathbf{H}_2OSO_2CH_3$).

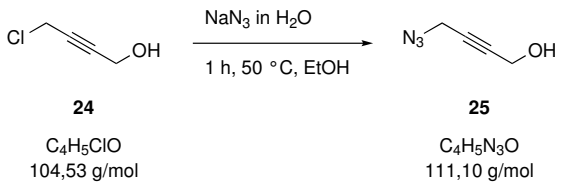
5.4.17 AdoYnAzid (2C)



In einer Mischung aus Wasser, Ameisensäure und Essigsäure (1:1:1, 2,1 mL) wurden SAH (**2**) (4,4 mg, 11,5 µmol) und 5-Azidopent-2-in-1-ylmethansulfonat (**22**) (67,7 mg, 333 µmol) bei 0 °C im Eisbad gelöst. Die Lösung wurde 40 h bei Raumtemperatur gerührt und währenddessen der Reaktionsfortschritt per analytischer *rp*-HPLC verfolgt (System 1, Methode 3, Wellenlängen 260 nm/272 nm, R_t = 19,6 min, biologisch inaktives Epimer R_t = 17,1 min). Die Lösung wurde mit Wasser (2 mL) verdünnt, mit Ether (3 x 5 mL) gewaschen und durch präparative *rp*-HPLC aufgereinigt (System 1, Methode 3, Wellenlängen 260 nm/272 nm, R_t = 20 min). Das biologisch inaktive Epimer konnte nicht abgetrennt werden. Produkthaltige Fraktionen wurden gesammelt, vereinigt und durch Gefriertrocknung bis zu einer gewünschten Konzentration eingeengt. Diese wurde UV-spektroskopisch auf Basis des Extinktionskoeffizienten von Adenosin (15400 $\frac{L}{cm \cdot mol}$) bei 260 nm bestimmt. Für die Berechnung der Ausbeute wurde die Annahme getroffen, dass beide Epimere zu gleichen Teilen vorliegen. Der Cofaktor **23** (1,40 µmol, 12,2 %) wurde in Elutionspuffer bei - 20 °C gelagert.

MS (ESI+): *m/z* (rel. Häufigkeit): ber. $C_{19}H_{26}N_9O_5S^+$ 492,18; gem. 492,18 (12) $[M^+]$.

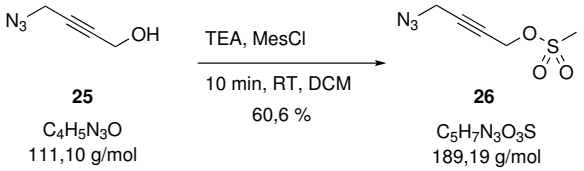
5.4.18 4-Azidobut-2-in-1-ol



Es wurde eine Lösung aus 4-Chlorobut-2-in-1-ol (**24**) (431 mg, 4,12 mmol) in Ethanol (5 mL) hergestellt. Natriumazid (1,04 g, 16,1 mmol) wurde in Wasser (5 mL) gelöst und zu der Lösung des Chlorids zugetropft. Die Reaktion wurde 1 h bei 50 °C gerührt und in Eiswasser (50 mL) überführt. Die wässrige Phase wurde mit Ether (3 x 30 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit Eiswasser (30 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und nach Filtration das Lösemittel unter Vakuum reduziert, jedoch aufgrund der hohen Flüchtigkeit von **25** nicht vollständig entfernt. Das Azid **25** wurde als gelbliches Öl erhalten. Das ^{1}H-NMR-Spektrum enthielt kein verbleibendes Signal für das Edukt (**24**), sodass auf eine vollständige Substitution geschlossen werden konnte und auf eine destillative Aufarbeitung verzichtet wurde.[121,122]

^{1}**H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 1,81 (chem. Verschiebung ist konzentrationsabhängig, s, 1H, $CH_2O\mathbf{H}$), 3,96 (s, 2H, $N_3C\mathbf{H}_2$), 4,35 (s, 2H, $C\mathbf{H}_2OH$).

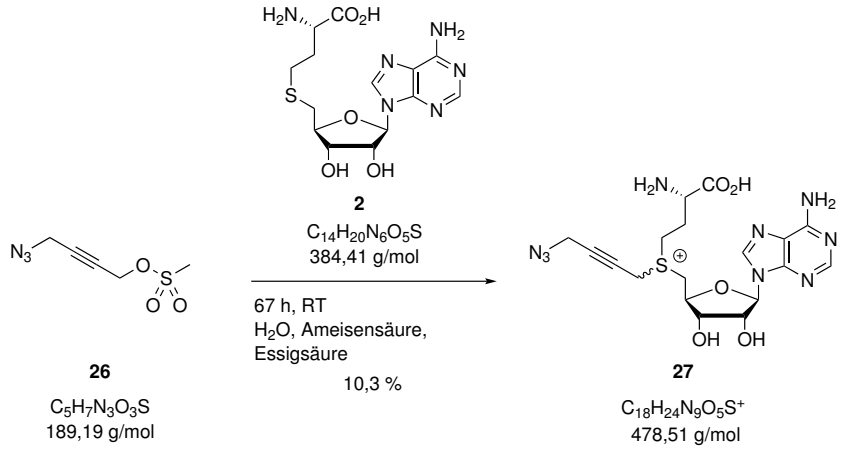
5.4.19 4-Azidobut-2-in-1-ylmethansulfonat



Unter Argon als Schutzgas wurde eine Lösung aus 4-Azidobut-2-in-1-ol (**25**) (79,7 mg, 717 µmol) und Triethylamin (181 µL, 1,3 mmol) in trockenem DCM (3 mL) hergestellt und im Eisbad auf 0 °C gekühlt. Methansulfonsäurechlorid (72 µL, 936 µmol) wurde in trockenem DCM (1 mL) gelöst und unter starkem Rühren zu der Reaktionslösung zugetropft. Der Reaktionsansatz wurde 10 min bei Raumtemperatur gerührt. Es bildete sich ein Niederschlag, welcher durch Zugabe von Wasser (2 mL) gelöst wurde. Die organische Phase wurde mit konz. Salzsäure (2 mL) und ges. Natriumchlorid-Lösung (2 mL) gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und nach Filtration wurde das Lösemittel unter Vakuum entfernt. Das Produkt **26** wurde als gelbliches Öl erhalten (82,3 mg, 435 µmol, 60,6 %).

^{1}**H-NMR** (600 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 3,12 (s, 3H, $CH_2OSO_2\mathbf{CH}_3$), 4,00 (t, ^5J = 1,7 Hz, 2H, $N_3C\mathbf{H}_2$), 4,93 (t, ^5J = 1,7 Hz, 2H, $C\mathbf{H}_2OSO_2CH_3$).

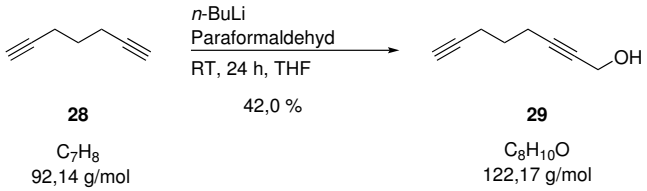
5.4.20 AdoYnAzid (1C)



In einer Mischung aus Wasser, Ameisensäure und Essigsäure (1:1:1, 2,1 mL) wurden SAH (**2**) (12,5 mg, 32,5 µmol) und 4-Azidobut-2-in-1-ylmethansulfonat (**26**) (176 mg, 930 µmol) bei 0 °C im Eisbad unter Argon als Schutzgas gelöst. Die Lösung wurde 67 h bei Raumtemperatur gerührt und währenddessen der Reaktionsfortschritt per analytischer *rp*-HPLC verfolgt (System 1, Methode 4, Wellenlängen 260 nm/272 nm, R_t = 11,2 min, biologisch inaktives Epimer R_t = 10,8 min). Die Lösung wurde mit Wasser (2 mL) verdünnt, mit Ether (3 x 5 mL) gewaschen und durch präparative *rp*-HPLC aufgereinigt (System 1, Methode 4, Wellenlängen 260 nm/272 nm, R_t = 11 min). Das biologisch inaktive Epimer konnte nicht abgetrennt werden. Produkthaltige Fraktionen wurden gesammelt, vereinigt und durch Gefriertrocknung bis zu einer gewünschten Konzentration eingeengt. Diese wurde UV-spektroskopisch auf Basis des Extinktionskoeffizienten von Adenosin (15400 $\frac{L}{cm \cdot mol}$) bei 260 nm bestimmt. Für die Berechnung der Ausbeute wurde die Annahme getroffen, dass beide Epimere zu gleichen Teilen vorliegen. Der Cofaktor **27** (3,36 µmol, 10,3 %) wurde in Elutionspuffer bei - 20 °C gelagert.

MS (ESI+): *m/z* (rel. Häufigkeit): ber. $C_{18}H_{24}N_9O_5S^+$ 478,16; gem. 478,16 (28) $[M^+]$, 385,13 (20) $[SAH+H]^+$, 377,11 (4) [Thioether +H]$^+$, 250,09 (36) [Adenosinrest]$^+$, 136,06 (54) [5´-Desoxyadenosylrest+H]$^+$.

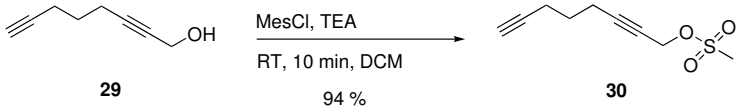
5.4.21 Octa-2,7-diin-1-ol



Unter Argon als Schutzgas wurde eine Lösung von Hepta-1,6-diin (**28**) (1,63 g, 17,7 mmol) in trockenem THF (35 mL) in einem ausgeheizten Kolben hergestellt. Die Lösung wurde in einer Kältemischung aus Aceton und Trockeneis auf - 78 °C gekühlt. Es wurde tropfenweise *n*-BuLi (8,5 mL, 13,6 mmol, 1,6 M in Hexan) und nach 10 min Paraformaldehyd (408 mg, 13,6 mmol) zugesetzt. Die Kältemischung wurde entfernt und es wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde mit ges. Ammoniumchlorid-Lösung (10 mL) und Ether (20 mL) versetzt und die wässrige Phase mit Ether (3 x 5 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. Ammoniumchlorid-Lösung (2 x 5 mL) und ges. Natriumchlorid-Lösung (2 x 5 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und nach Filtration das Lösemittel unter Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatograpisch aufgearbeitet (Pentan/Ethylacetat, 5:2). Das Produkt **29** wurde als gelbliches Öl erhalten (690 mg, 5,65 mmol, 42,0 %).

^{1}**H-NMR** (600 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 1,57 - 1,65 (m, 1H, OH), 1,73 (quin, ^3J = 7,0 Hz, 2H, $HCCCH_2C\mathbf{H}_2$), 1,96 (t, ^4J = 2,7 Hz, 1H, **H**CC), 2,31 (td, ^3J = 7,0 Hz, ^4J = 2,7 Hz, 2H, $HCCC\mathbf{H}_2$), 2,36 (tt, ^3J = 7,0 Hz, ^5J = 2,2 Hz, 2H, $HCCCH_2CH_2C\mathbf{H}_2$), 4,20 - 4,29 (m, 2H, $C\mathbf{H}_2OH$).

5.4.22 Octa-2,7-diin-1-ylmethansulfonat



29

$C_8H_{10}O$
122,17 g/mol

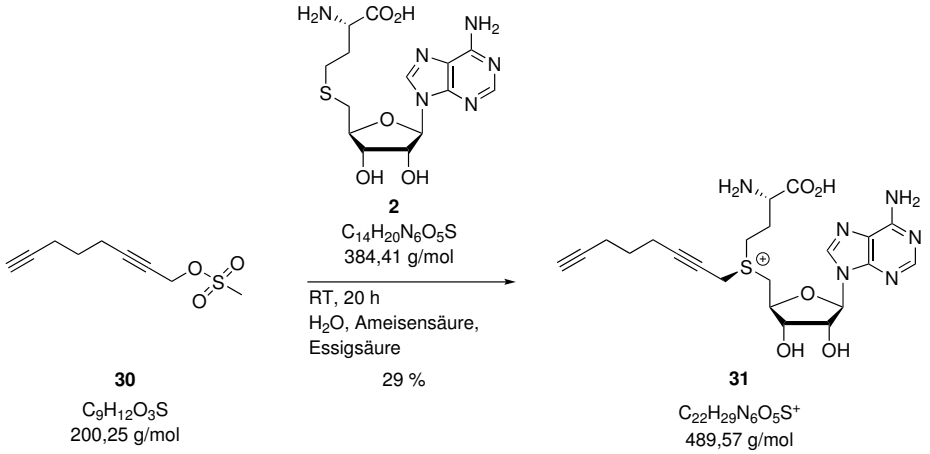
30

$C_9H_{12}O_3S$
200,25 g/mol

Bei 0 °C wurde eine Lösung aus Octa-2,7-diin-1-ol (**29**) (600 mg, 4,91 mmol), Methansulfonsäurechlorid (494 µL, 6,38 mmol) und Triethylamin (1,16 mL, 8,35 mmol) unter Argon als Schutzgas in trockenem DCM (8 mL) hergestellt. Die Lösung wurde 5 min bei 0 °C gerührt. Die Lösung wurde mit Wasser (2 mL) versetzt und mit Salzsäure (1 mL, 1 M) und ges. Natriumchloridlösung (1 mL) gewaschen. Das Lösemittel wurde unter Vakuum entfernt und der aktivierte Alkohol **30** (924 mg, 4,62 mmol, 94 %) direkt in der nächsten Stufe eingesetzt.

^{1}**H-NMR** (600 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 1,75 (quin, ^3J = 7,0 Hz, 2H, $HCCCH_2C\mathbf{H}_2$), 1,97 (t, ^4J = 2,6 Hz, 1H, **H**CC), 2,31 (td, ^3J = 7,0 Hz, ^4J = 2,6 Hz, 2H, $HCCC\mathbf{H}_2$), 2,36 - 2,45 (m, 2H, $HCCCH_2CH_2C\mathbf{H}_2$), 3,11 (s, 3H, $SC\mathbf{H}_3$), 4,84 (t, ^5J = 2,2 Hz, 2H, $C\mathbf{H}_2OS$).

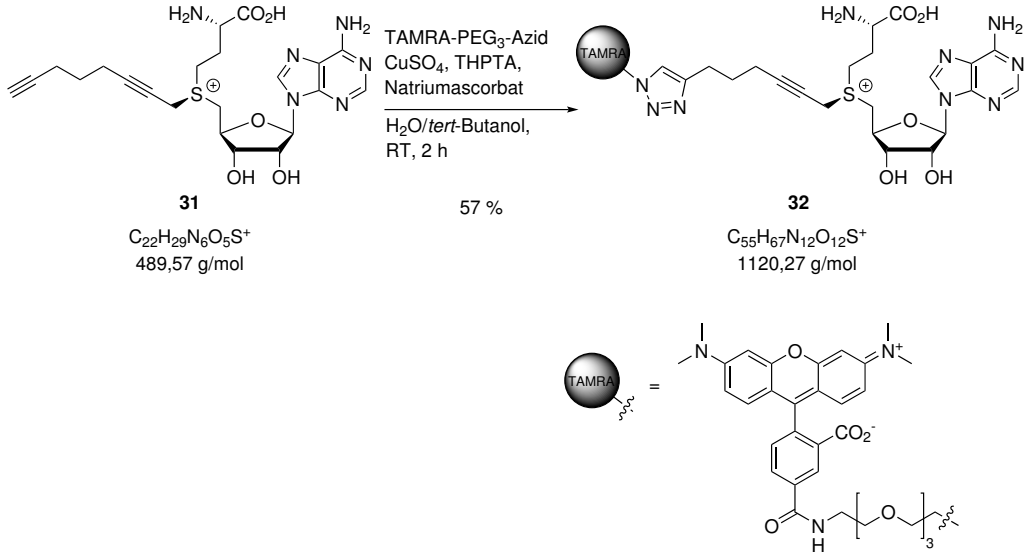
5.4.23 AdoYnYn (kurz)



In einer Mischung aus Wasser, Ameisensäure und Essigsäure (1:1:1, 2,1 mL) wurden SAH (**2**) (20,0 mg, 52,0 µmol) und Octa-2,7-diin-1-ylmethansulfonat (**30**) (335 mg, 1,67 mmol) gelöst. Die Lösung wurde 16 h bei Raumtemperatur gerührt und währenddessen per analytischer *rp*-HPLC verfolgt (System 1, Methode 1, Wellenlängen 260 nm/272 nm, R_t = 13,7 min). Die Lösung wurde mit Ether (2 mL) gewaschen und durch präparative *rp*-HPLC aufgereinigt (System 1, Methode 1, Wellenlängen 260 nm/272 nm, R_t = 22,9 min). Das biologisch inaktive Epimer (R_t = 21,7 min) konnte erfolgreich abgetrennt werden. Produkthaltige Fraktionen wurden gesammelt, vereinigt und durch Gefriertrocknung bis zu einer gewünschten Konzentration eingeengt. Diese wurde UV-spektroskopisch auf Basis des Extinktionskoeffizienten von Adenosin (15400 $\frac{L}{cm \cdot mol}$) bei 260 nm bestimmt. Der Cofaktor **31** wurde in Elutionspuffer bei - 20 °C gelagert (14,8 µmol, 29 %).

MS (ESI+): *m/z* (rel. Häufigkeit): ber. $C_{22}H_{29}N_6O_5S^+$ 489,19; gem. 489,19 (100) $[M]^+$.

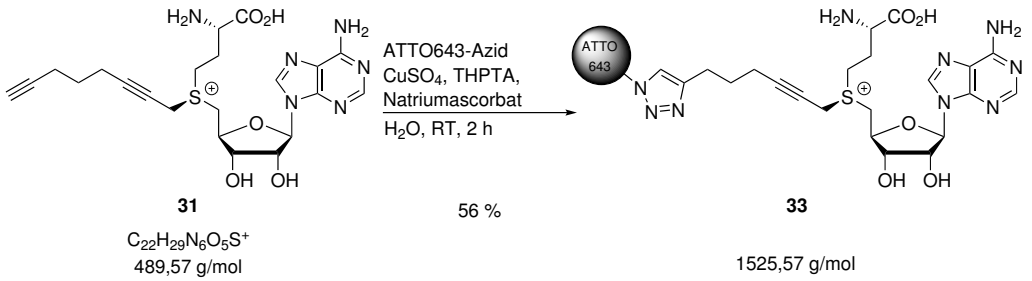
5.4.24 AdoYnTAMRA (kurz)[50,51,123,124]



Es wurde eine wässrige Lösung (5,63 mL) bestehend aus AdoYnYn (kurz) (**31**) (5,23 µmol), TAMRA-PEG_3-Azid (5,23 µmol in 1,5 mL *tert*-Butanol), Natriumascorbat (218 µmol), Kupfersulfat (2,62 µmol) und THPTA (2,62 µmol) hergestellt und der pH-Wert mit verdünnter Schwefelsäure auf 5 eingestellt. Der Reaktionsansatz wurde lichtgeschützt bei Raumtemperatur gerührt. Der Reaktionsfortschritt wurde durch analytische *rp*-HPLC verfolgt (System 1, Methode 2, Wellenlängen 260 nm/ 555 nm, R_t= 23,9 min). Die Reaktion wurde nach 2 h durch Einfrieren der Lösung beendet und das Produkt durch präparative *rp*-HPLC aufgereinigt (System 1, Methode 2, Wellenlängen 260 nm/555 nm, R_t= 22,8 min) aufgereinigt. Produkthaltige Fraktionen wurden gesammelt, vereinigt und durch Gefriertrocknung bis zu einer gewünschten Konzentration eingeengt. Diese wurde UV-spektroskopisch auf Basis des Extinktionskoeffizienten von TAMRA (84000 $\frac{\mathrm{L}}{\mathrm{cm \cdot mol}}$) bei 555 nm bestimmt. Der Cofaktor **32** wurde in Elutionspuffer bei - 20 °C gelagert (2,98 µmol, 57 %).

MS (ESI+): *m/z* (rel. Häufigkeit): ber. $C_{55}H_{67}N_{12}O_{12}S^+$ 1119,47; gem. 1119,48 (4) $[M]^+$, 560,24 (58) $[M+H]^{2+}$.

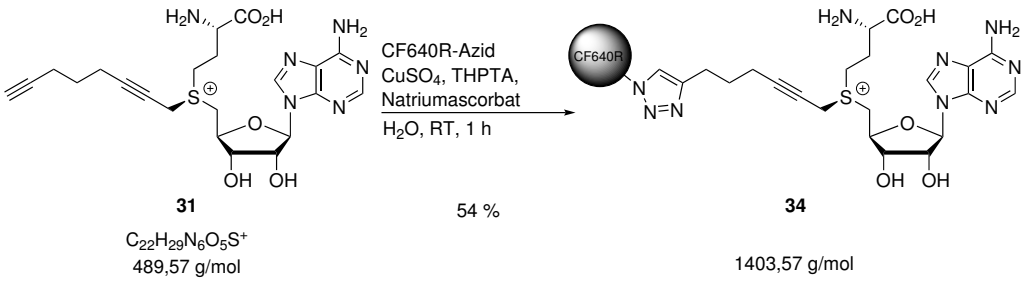
5.4.25 AdoYnATTO643



Es wurde eine wässrige Lösung (400 µL) bestehend aus AdoYnYn (kurz) (**31**) (1,04 µmol), ATTO643-Azid (0,87 µmol, M^+ = 1036 g/mol), Natriumascorbat (25 µmol), Kupfersulfat (0,44 µmol) und THPTA (0,44 µmol) hergestellt und der pH-Wert mit verdünnter Schwefelsäure auf 5 eingestellt. Der Reaktionsansatz wurde lichtgeschützt bei Raumtemperatur gerührt. Der Reaktionsfortschritt wurde durch analytische *rp*-HPLC verfolgt (System 1, Methode 2, Wellenlängen 260 nm/640 nm, R_t= 26,1 min). Die Reaktion wurde nach 2 h durch Einfrieren der Lösung beendet und das Produkt durch präparative *rp*-HPLC aufgereinigt (System 1, Methode 2, Wellenlängen 260 nm/640 nm, R_t= 25,0 min) aufgereinigt. Produkthaltige Fraktionen wurden gesammelt, vereinigt und durch Gefriertrocknung bis zu einer gewünschten Konzentration eingeengt. Diese wurde UV-spektroskopisch auf Basis des Extinktionskoeffizienten von ATTO643 (150000 $\frac{\mathrm{L}}{\mathrm{cm \cdot mol}}$) bei 643 nm bestimmt. Der Cofaktor **33** wurde in Elutionspuffer bei - 20 °C gelagert (0,58 µmol, 56 %).

MS (ESI+): *m/z* (rel. Häufigkeit): gem. 762,84 (100) $[M]^{2+}$.

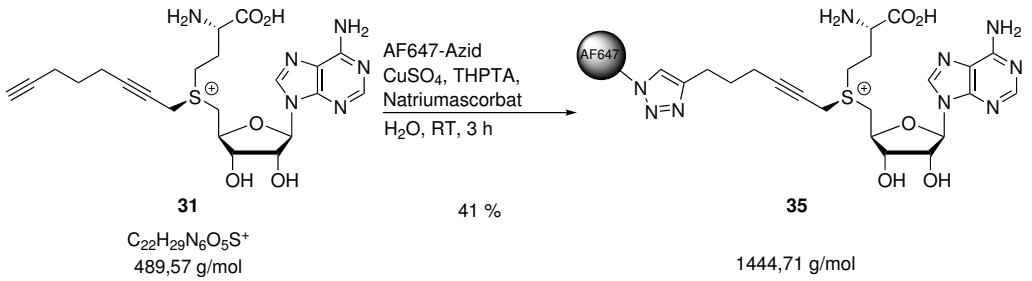
5.4.26 AdoYnCF640R[125,126]



Es wurde eine wässrige Lösung (500 µL) bestehend aus AdoYnYn (kurz) (**31**) (600 nmol), CF640R-Azid (500 nmol, M = 914 g/mol), Natriumascorbat (21 µmol), Kupfersulfat (250 nmol) und THPTA (250 nmol) hergestellt und der pH-Wert mit verdünnter Schwefelsäure auf 5 eingestellt. Der Reaktionsansatz wurde lichtgeschützt bei Raumtemperatur gerührt. Der Reaktionsfortschritt wurde durch analytische *rp*-HPLC verfolgt (System 1, Methode 2, Wellenlängen 260 nm/640 nm, R_t= 19,4 min). Die Reaktion wurde nach 1 h durch Einfrieren der Lösung beendet und das Produkt durch präparative *rp*-HPLC aufgereinigt (System 1, Methode 2, Wellenlängen 260 nm/640 nm, R_t= 19,8 min) aufgereinigt. Produkthaltige Fraktionen wurden gesammelt, vereinigt und durch Gefriertrocknung bis zu einer gewünschten Konzentration eingeengt. Diese wurde UV-spektroskopisch auf Basis des Extinktionskoeffizienten von CF640R (105000 $\frac{L}{cm \cdot mol}$) bei 642 nm bestimmt. Der Cofaktor **34** wurde in Elutionspuffer bei - 20 °C gelagert (272 nmol, 54 %).

MS (ESI+): *m/z* (rel. Häufigkeit): gem. 1403,47 (15) $[M]^+$.

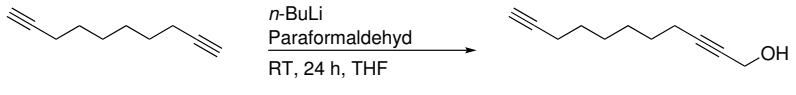
5.4.27 AdoYnAF647



Es wurde eine wässrige Lösung (831 µL) bestehend aus AdoYnYn (kurz) (**31**) (1,0 µmol), AF647-Azid (1,0 µmol, M = 955,14 g/mol), Natriumascorbat (41,7 µmol), Kupfersulfat (0,5 µmol) und THPTA (0,5 µmol) hergestellt und der pH-Wert mit verdünnter Schwefelsäure auf 5 eingestellt. Der Reaktionsansatz wurde lichtgeschützt bei Raumtemperatur gerührt. Der Reaktionsfortschritt wurde durch analytische *rp*-HPLC verfolgt (System 1, Methode 2, Wellenlängen 260 nm/ 647 nm, R_t= 18,1 min). Die Reaktion wurde nach 3 h durch Einfrieren der Lösung beendet und das Produkt durch präparative *rp*-HPLC aufgereinigt (System 1, Methode 2, Wellenlängen 260 nm/647 nm, R_t= 16,5 min) aufgereinigt. Produkthaltige Fraktionen wurden gesammelt, vereinigt und durch Gefriertrocknung bis zu einer gewünschten Konzentration eingeengt. Diese wurde UV-spektroskopisch auf Basis des Extinktionskoeffizienten von AF647 (270000 $\frac{\mathrm{L}}{\mathrm{cm \cdot mol}}$) bei 647 nm bestimmt. Der Cofaktor **35** wurde in Elutionspuffer bei - 20 °C gelagert (407 nmol, 41 %).

MS (ESI+): *m/z* (rel. Häufigkeit): gem. 1444,46 (8) $[M]^+$.

5.4.28 Undeca-2,10-diin-1-ol



36
$C_{10}H_{14}$
134,22 g/mol

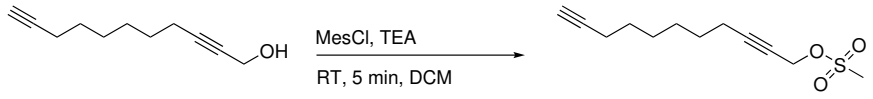
16,0 %

37
$C_{11}H_{16}O$
164,25 g/mol

Unter Argon als Schutzgas wurde eine Lösung von Deca-1,9-diin (**36**) (1,64 g, 12,2 mmol) in trockenem THF (35 mL) in einem ausgeheizten Kolben hergestellt. Die Lösung wurde in einer Kältemischung aus Aceton und Trockeneis auf - 78 °C gekühlt. Es wurde tropfenweise *n*-BuLi (5,88 mL, 9,4 mmol, 1,6 M in Hexan) und nach 10 min Paraformaldehyd (282 mg, 9,4 mmol) zugesetzt. Die Kältemischung wurde entfernt und es wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde mit ges. Ammoniumchlorid-Lösung (10 mL) und Ether (20 mL) versetzt und die wässrige Phase mit Ether (3 x 5 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. Ammoniumchlorid-Lösung (2 x 5 mL) und ges. Natriumchlorid-Lösung (2 x 5 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und nach Filtration das Lösemittel unter Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatograpisch aufgearbeitet (Pentan/Ethylacetat, 5:1). Das Produkt **37** wurde als gelbliches Öl erhalten (250 mg, 1,52 mmol, 16,0 %).

^{1}**H-NMR** (600 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 1,38 - 1,44 (m, 4H, $HCCCH_2CH_2C\mathbf{H}_2C\mathbf{H}_2$), 1,50 - 1,55 (m, 4H, $HCCCH_2C\mathbf{H}_2CH_2CH_2C\mathbf{H}_2$), 1,93 (t, ^4J = 2,6 Hz, 1H, **H**CC), 2,19 (td, ^3J = 7,1 Hz, ^4J = 2,7 Hz, 2H, $HCCC\mathbf{H}_2$), 2,22 (tt, ^3J = 7,1 Hz, ^5J = 2,2 Hz, 2H, $HCCC\mathbf{H}_2CH_2CH_2CH_2CH_2C\mathbf{H}_2$), 4,23 (t, ^5J = 2,3 Hz, 2H, $C\mathbf{H}_2OH$).

5.4.29 Undeca-2,10-diin-1-ylmethansulfonat



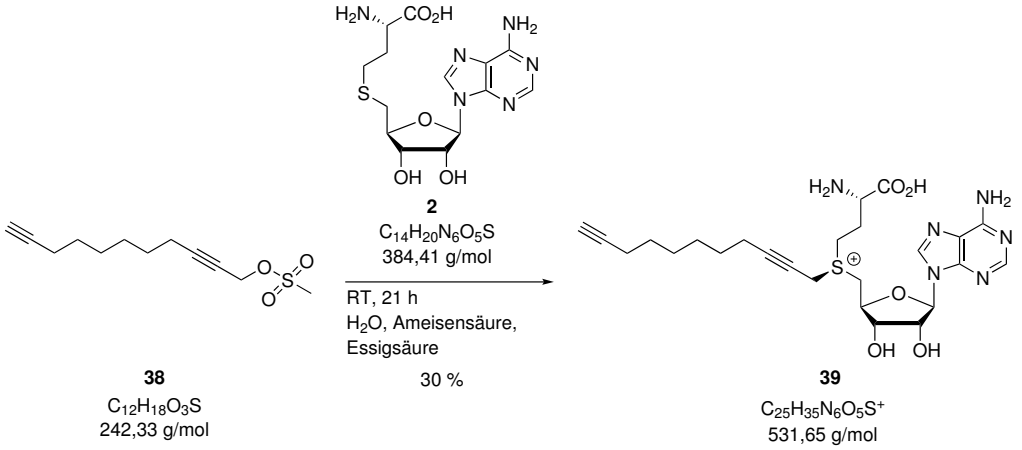
37
$C_{11}H_{16}O$
164,25 g/mol

38
$C_{12}H_{18}O_3S$
242,33 g/mol

Bei 0 °C wurde eine Lösung aus Undeca-2,10-diin-1-ol (**37**) (458,7 mg, 2,79 mmol), Methansulfonsäurechlorid (281 µL, 3,63 mmol) und Triethylamin (0,66 mL, 4,75 mmol) unter Argon als Schutzgas in trockenem DCM (8 mL) hergestellt. Die Lösung wurde 5 min bei 0 °C gerührt. Die Lösung wurde mit Wasser (2 mL) versetzt und mit Salzsäure (1 mL, 1 M) und ges. Natriumchloridlösung (1 mL) gewaschen. Das Lösemittel wurde unter Vakuum entfernt und der aktivierte Alkohol **38** (420 mg, 1,74 mmol, 62 %) direkt in der nächsten Stufe eingesetzt.

^{1}**H-NMR** (600 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 1,36 - 1,43 (m, 4H, $HCCCH_2CH_2C\mathbf{H}_2C\mathbf{H}_2$), 1,48 - 1,56 (m, 4H, $HCCCH_2C\mathbf{H}_2CH_2CH_2C\mathbf{H}_2$), 1,93 (t, ^4J = 2,7 Hz, 1H, **H**CC), 2,18 (td, ^3J = 7,0 Hz, ^4J = 2,7 Hz, 2H, $HCCC\mathbf{H}_2$), 2,24 (tt, ^3J = 7,1 Hz, ^5J = 2,2 Hz, 2H, $HCCCH_2CH_2$ $CH_2CH_2CH_2C\mathbf{H}_2$), 3,09 (s, 3H, $SC\mathbf{H}_3$), 4,83 (t, ^5J = 2,2 Hz, 2H, $C\mathbf{H}_2OS$).

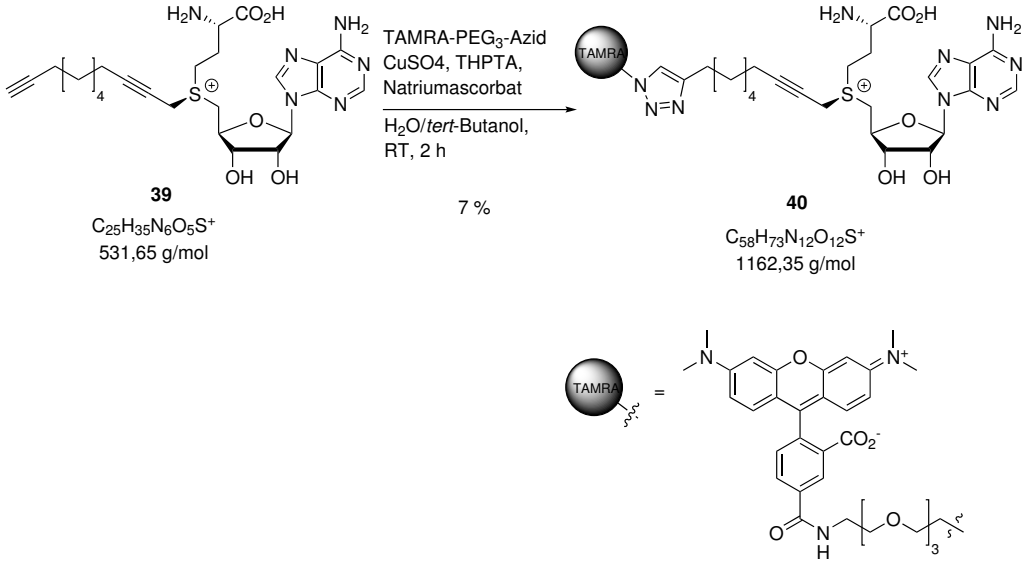
5.4.30 AdoYnYn (lang)



In einer Mischung aus Wasser, Ameisensäure und Essigsäure (1:1:1, 2,1 mL) wurden SAH (**2**) (10,0 mg, 26,0 µmol) und Undeca-2,10-diin-1-ylmethansulfonat (**38**) (245 mg, 1,01 mmol) gelöst. Die Lösung wurde 21 h bei Raumtemperatur gerührt und währenddessen per analytischer *rp*-HPLC verfolgt (System 1, Methode 2, Wellenlängen 260 nm/272 nm, R_t = 18,0 min). Die Lösung wurde mit Ether (2 mL) gewaschen und durch präparative *rp*-HPLC aufgereinigt (System 1, Methode 5, Wellenlängen 260 nm/272 nm, R_t = 19,2 min). Das biologisch inaktive Epimer (R_t = 17,0 min) konnte erfolgreich abgetrennt werden. Produkthaltige Fraktionen wurden gesammelt, vereinigt und durch Gefriertrocknung bis zu einer gewünschten Konzentration eingeengt. Diese wurde UV-spektroskopisch auf Basis des Extinktionskoeffizienten von Adenosin (15400 $\frac{L}{cm \cdot mol}$) bei 260 nm bestimmt. Der Cofaktor **39** wurde in Elutionspuffer bei - 20 °C gelagert (7,81 µmol, 30 %).

MS (ESI+): *m/z* (rel. Häufigkeit): ber. $C_{25}H_{35}N_6O_5S^+$ 531,24; gem. 531,24 (100) $[M]^+$.

5.4.31 AdoYnTAMRA (lang)



Es wurde eine wässrige Lösung (2,24 mL) bestehend aus AdoYnYn (lang) (**39**) (2,68 µmol), TAMRA-PEG$_3$-Azid (2,95 µmol in 0,5 mL *tert*-Butanol), Natriumascorbat (112 µmol), Kupfersulfat (1,34 µmol) und THPTA (1,34 µmol) hergestellt und der pH-Wert mit verdünnter Schwefelsäure auf 5 eingestellt. Der Reaktionsansatz wurde lichtgeschützt bei Raumtemperatur gerührt. Der Reaktionsfortschritt wurde durch analytische *rp*-HPLC verfolgt (System 1, Methode 2, Wellenlängen 260 nm/ 555 nm, R_t= 20,6 min). Die Reaktion wurde nach 2 h durch Einfrieren der Lösung beendet und das Produkt durch präparative *rp*-HPLC aufgereinigt (System 1, Methode 2, Wellenlängen 260 nm/555 nm, R_t= 23,6 min) aufgereinigt. Produkthaltige Fraktionen wurden gesammelt, vereinigt und durch Gefriertrocknung bis zu einer gewünschten Konzentration eingeengt. Diese wurde UV-spektroskopisch auf Basis des Extinktionskoeffizienten von TAMRA (84000 $\frac{\mathrm{L}}{\mathrm{cm \cdot mol}}$) bei 555 nm bestimmt. Der Cofaktor **40** wurde in Elutionspuffer bei - 20 °C gelagert (0,19 µmol, 7 %).

MS (ESI+): *m/z* (rel. Häufigkeit): ber. $C_{58}H_{73}N_{12}O_{12}S^+$ 1161,52; gem. 1161,52 (8) $[M]^+$, 581,26 (100) $[M+H]^{2+}$.

6 Literaturverzeichnis

[1] J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature* **1953**, *171*, 737-738.

[2] J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature* **1953**, *171*, 964-967.

[3] R. D. Hotchkiss, *J. Biol. Chem.* **1948**, *175*, 315-332.

[4] A. Janulaitis, S. Klimašauskas, M. Petrušyte, V. Butkus, *FEBS Lett.* **1983**, *161*, 131-134.

[5] D. B. Dunn, J. D. Smith, *Biochem. J.* **1958**, *68*, 627-636.

[6] S. Kriaucionis, N. Heintz, *Science* **2009**, *324*, 929-930.

[7] M. Tahiliani, K. Peng Koh, Y. Shen, W. A. Pastor, H. Bandukwala, Y. Brudno, S. Agarwal, L. M. Iyer, D. R. Liu, L. Aravind, A. Rao, *Science* **2009**, *324*, 930-935.

[8] Y.-F. He, B.-Z. Li, Z. Li, P. Liu, Y. Wang, Q. Tang, J. Ding, Y. Jia, Z. Chen, L. Li, Y. Sun, X. Li, Q. Dai, C.-X. Song, K. Zhang, C. He, G.-L. Xu, *Science* **2011**, *333*, 1303-1307.

[9] E.-A. Raiber, R. Hardisty, P. v. Delft, S. Balasubramanian, *Nat. Rev. Chem.* **2017**, *1*, 1-14.

[10] P. B. Becker, S. Ruppert, G. Schutz, *Cell* **1987**, *51*, 435-443.

[11] I. Kovesdi, R. Reichel, J. R. Nevins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 2180-2184.

[12] G. C. Prendergast, D. Lawe, E. B. Ziff, *Cell* **1991**, *65*, 395-407.

[13] M. M. Suzuki, A. Bird, *Nat. Rev. Genet.* **2008**, *9*, 465-476.

[14] S. Kumar, V. Chinnusamy, *Front. Genet.* **2018**, *9*, 640.

[15] F. Watt, P. L. Molloy, *Genes Dev.* **1988**, *2*, 1136-1143.

[16] S. M. M. Iguchi-Ariga, W. Schaffner, *Genes Dev.* **1989**, *3*, 612-619.

[17] M. Comb, H. M. Goodman, *Nucleic Acids Res.* **1990**, *18*, 3975-3982.

[18] P. A. Jones, S. B. Baylin, *Nat. Rev. Genet.* **2002**, *3*, 415.

[19] A. P. Feinberg, R. Ohlsson, S. Henikoff, *Nat. Rev. Genet.* **2006**, *7*, 21-33.

[20] T. Shahal, N. Gilat, Y. Michaeli, O. Redy-Keisar, D. Shabat, Y. Ebenstein, *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 8231.

[21] T. Gabrieli, Y. Michaeli, S. Avraham, D. Torchinsky, S. Margalit, L. Schütz, M. Juhasz, C. Coruh, N. Arbib, Z. S. Zhou, J. A. Law, E. Weinhold, Y. Ebenstein, *Nucleic Acids Res.* **2022**, *50*, e92.

[22] L. Käver, *Dissertation RWTH Aachen University*, **2022**.

[23] M. Frommer, L. E. McDonald, D. S. Millar, C. M. Collis, F. Watt, G. W. Grigg, P. L. Molloy, C. L. Paul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 1827-1831.

[24] H. Hayatsu,Y. Wataya, K. Kai, S. Iida, *Biochemistry* **1970**, *9*, 2858-2866.

[25] R. Shapiro, R. E. Servis, M. Welcher, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 422-424.

[26] R. Shapiro, B. Braverman, J. B. Louis, R. E. Servis, *J. Biol. Chem.* **1973**, *248*, 4060-4064.

[27] H. Hayatsu, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **1976**, *16*, 75-124.

[28] R. Y.-H. Wang, C. W. Gehrke, M. Ehrlich, *Nucleic Acids Res.* **1980**, *8*, 4777-4790.

[29] M. J. Booth, E.-A. Raiber, S. Balasubramanian, *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 2240-2254.

[30] A. M. Maxam, W. Gilbert, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1977**, 74, 560.

[31] H. Ohmori, J. I. Tomizawa, A. M. Maxam, *Nucleic Acids Res.* **1978**, *5*, 1479.

[32] R. Vaisvila, V. K. C. Ponnaluri, Z. Sun, B. W. Langhorst, L. Saleh, S. Guan, N. Dai, M. A. Campbell, B. S. Sexton, K. Marks, M. Samaranayake, J. C. Samuelson, H. E. Church, E. Tamanaha, I. R. Corrêa Jr., S. Pradhan, E. T. Dimalanta, T. C. Evans Jr., L. Williams, T. B. Davis, *Genome Res.* **2021**, *31*, 1280-1289.

[33] Q. Gouil, A. Keniry, *Essays Biochem.* **2019**, *63*, 639-648.

[34] A. Rhoads, K. F. Au, *Genomics, Proteomics Bioinf.* **2015**, *13*, 278-289.

[35] https://www.pacb.com/wp-content/uploads/application-brief-measuring-dna-methylation-with-5-base-hifi-sequencing.pdf (Zugriff: 01.01.2023)

[36] S. Ardui, A. Ameur, J. R. Vermeesch, M. S. Hestand, *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, 2159-2168.

[37] O. Y. O. Tse, P. Jiang, S. H. Cheng, W. Peng, H. Shang, J. Wong, S. L. Chan, L. C. Y. Poon, T. Y. Leung, K. C. A. Chan, R. W. K. Chiu, Y. M. D. Lo, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2021**, *118*, 1-11.

[38] L. Xu, M. Seki, *J. Hum. Genet.* **2020**, *65*, 25-33.

[39] J. T. Simpson, R. E. Workman, P. C. Zuzarte, M. David, L. J. Dursi, W. Timp, *Nat. Methods* **2017**, *14*, 407-410.

[40] A. C. Rand, M. Jain, J. M. Eizenga, A. Musselman-Brown, H. E. Olsen, M. Akeson, B. Paten, *Nat. Methods* **2017**, *14*, 411-413.

[41] Z. W.-S. Yuen, A. Srivastava, R. Daniel, D. McNevin, C. Jack, E. Eyras, *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 3438.

[42] A. Singer, S. Rapireddy, D. H. Ly, A. Meller, *Nano Lett.* **2012**, *12*, 1722-1728.

[43] https://bionanogenomics.com/support-page/dna-labeling-kit-dls/ (Zugriff: 02.01.2023)

[44] E. T. Lam, A. Hastie, C. Lin, D. Ehrlich, S. K. Das, M. D. Austin, R. Deshpande, H. Cao, N. Nagarajan, M. Xiao, P.-Y. Kwok, *Nat. Biotech.* **2012**, *30*, 771-777.

[45] Y. Yuan, C. Y.-L. Chung, T.-F. Chan, *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **2020**, *18*, 2051-2062.

[46] H. Zohar, S. J. Muller, *Nanoscale* **2011**, *3*, 3027-3039.

[47] V. Müller, F. Westerlund, *Lap Chip* **2017**, *17*, 579-590.

[48] M. Nelson, M. McClelland, *Nucleic Acids Res.* **1991**, *19*, Supplement 2045-2071.

[49] M. Levy-Sakin, Y. Ebenstein, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2013**, *24*, 690-698.

[50] A. Grunwald, M. Dahan, A. Giesbertz, A. Nilsson, L. K. Nyberg, E. Weinhold, T. Ambjörnsson, F. Westerlund, Y. Ebenstein, *Nucleic Acids Research* **2015**, *43*, e117.

[51] H. Sharim, A. Grunwald, T. Gabrieli, Y. Michaeli, S. Margalit, D. Torchinsky, R. Arielly, G. Nifker, M. Juhasz, F. Gularek, M. Almalvez, B. Dufault, S. S. Chandra, A. Liu, S. Bhattacharya, Y. - W. Chen, E. Vilain, K. R. Wagner, J. Pevsner, J. Reifenberger, E. T. Lam, A. R. Hastie, H. Cao, H. Barseghyan, E. Weinhold, Y. Ebenstein, *Genome Res.* **2019**, *29*, 646-656.

[52] C.-X. Song, J. Diao, A. T. Brunger, S. R. Quake, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, 4338-4343.

[53] J. Jeffet, S. Margalit, Y. Michaeli, Y. Ebenstein, *Essays Biochem.* **2021**, *65*, 51-66.

[54] A. Jeltsch, *ChemBioChem* **2002**, *3*, 274-293.

[55] K. M. Reinisch, L. Chen, G. L. Verdine, W. N. Lipscomb, *Cell* **1995**, *82*, 143.

[56] S. Klimasauskas, S. Kumar, R. J. Roberts, X. Cheng, *Cell* **1994**, *76*, 357-369.

[57] K. Goedecke, M. Pignot, R. S. Goody, A. J. Scheidig, E. Weinhold, *Nat. Struct. Biol.* **2001**, *8*, 121.

[58] D. A. Erlanson, L. Chen, G. L. Verdine, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 12583-12584.

[59] J. C. Wu, D. Santi, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 4778-4786.

[60] G. G. Wilson, N. E. Murray, *Annu. Rev. Genet.* **1991**, *25*, 585.

[61] J. Heitman in *Genetic Engineering* (Ed.: J. K. Setlow), Plenum Press, New York, **1993**, 57-108.

[62] A. Pingoud, A. Jeltsch, *Eur. J. Biochem.* **1997**, *246*, 1.

[63] A. Pingoud, A. Jeltsch, *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 3705.

[64] The Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, D193-197.

[65] W. M. Lindstrom, J. Flynn, N. O. Reich, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 4912.

[66] P. Renbaum, D. Abrahamove, A. Fainsod, G. G. Wilson, S. Rottem, A. Razin, *Nucleic Acids Res.* **1990**, *18*, 1145-1152.

[67] C. H. Wojciechowski, M. Bochtler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 105-110.

[68] A. Gottfried, E. Weinhold, *Biochem. Soc. Trans.* **2011**, *39*, 623-628.

[69] G. M. Hanz, B. Jung, A. Giesbertz, M. Juhasz, E. Weinhold, *J. Vis. Exp.* **2014**, *93*, e52014.

[70] G. Pljevaljčić, M. Pignot, E. Weinhold, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3486-3492.

[71] G. Pljevaljčić, F. Schmidt, E. Weinhold, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 265-269.

[72] F. H.-G. Schmidt, M. Hüben, B. Gider, F. Renault, M.-P. Teulade-Fichou, E. Weinhold, *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 40-48.

[73] G. Braun, M. Diechtierow, S. Wilkinson, F. Schmidt, M. Hüben, E. Weinhold, N. O. Reich, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 476-479.

[74] S. Wilkinson, M. Diechtierow, R. A. Estabrook, F. Schmidt, M. Hüben, E. Weinhold, N. O. Reich, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 470-475.

[75] S. Kim, A. Gottfried, R. R. Lin, T. Dertinger, A. S. Kim, S. Chung, R. A. Colyer, E. Weinhold, S. Weiss, Y. Ebenstein, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 3578-3581.

[76] G. Lukinavičius, V. Lapienė, Z. Staševskij, C. Dalhoff, E. Weinhold, S. Klimašauskas, *J. Am. Chem Soc.* **2007**, *129*, 2758-2759.

[77] C. Dalhoff, G. Lukinavičius, S. Klimašauskas, E. Weinhold, *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 31-32.

[78] C. Dalhoff, G. Lukinavičius, S. Klimašauskas, E. Weinhold, *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 1879-1886.

[79] G. Lukinavičius, M. Tomkuvienė, V. Masevičius, S. Klimašauskas, *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 1134-1139.

[80] J. Deen, C. Vranken, V. Leen, R. K. Neely, K. P. F. Janssen, J. Hofkens, *Angew. Chem.* **2017**, *129*, 5266-5285.

[81] M. Tomkuvienė, M. Mickutė, G. Vilkaitis, S. Klimašauskas, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2019**, *55*, 114-123.

[82] V. Goyvaerts, S. Van Snick, L. D. Huys, R. Vitale, M. H. Lauer, S. Wang, V. Leen, W. Dehaena, J. Hofkens, *Chem. Commun.* **2020**, *56*, 3317-3320.

[83] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 2056-2075.

[84] Q. Wang, T. R. Chan, R. Hilgraf, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, M. G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3192-3193.

[85] C. W. Tornoe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem* **2002**, *67*, 3057-3064.

[86] H. C. Kolb, K. B. Sharpless, *Drug Discovery Today* **2003**, *8*, 1128-1137.

[87] N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046-15047.

[88] F. Schmidt, *Dissertation RWTH Aachen University*, **2004**.

[89] Schrödinger Release 2021-1: Maestro, Schrödinger, LLC, New York, NY, **2021**.

[90] S. Klimašauskas, T. Szyperski, S. Serva, K. Wütherich, *EMBO J.* **1998**, *17*, 317-324.

[91] K. Pierotte, *Diplomarbeit RWTH Aachen University*, **2004**.

[92] F. Kappler, A. Hampton, *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 2545-2551.

[93] J. C. Bressi, J. Choe, M. T. Hough, F. S. Buckner, W. C. Van Voorhis, C. L. M. J. Verlinde, W. G. J. Hol, M. H. Gelb, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 4135-4150.

[94] T. J. Curphey, *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 2805-2807.

[95] S. Gabriel, *Chem. Ber.* **1888**, *21*, 2664-2669.

[96] A. Dankers, *Dissertation RWTH Aachen University*, **2019**.

[97] G. Lukinavičius, A. Lapinaitė, G. Urbanavičiūtė, R. Gerasimaitė, S. Klimašauskas, *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 11594-11602.

[98] J. E. Lee, W. Luong, D. J. T. Huang, K. A. Cornell, M. K. Riscoe, P. L. Howell, *Biochemistry* **2005**, *44*, 11049-11057.

[99] J. E. Lee, K. A. Cornell, M. K. Riscoe, P. L. Howell, *Acta Cryst.* **2001**, *D57*, 150-152.

[100] S. F. Altschul, T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D. J. Lipman, *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 3389-3402.

[101] S. F. Altschul, J. C. Wootton, E. M. Gertz, R. Agarwala, A. Morgulis, A. A. Schäffer, Y.-K. Yu, *FEBS J.* **2005**, *272*, 5101-5109.

[102] J. Dietel, *Masterarbeit RWTH Aachen University*, **2021**.

[103] A. M. Waterhouse, J. B. Procter, D. M. A. Martin, M. Clamp, G. J. Barton, *Bioinformatics* **2009**, *25*, 1189-1191.

[104] F. Sievers, A. Wilm, D. Dineen, T. J. Gibson, K. Karplus, W. Li, R. Lopez, H. McWilliam, M. Remmert, J. Söding, J. D. Thompson, D. G. Higgins, *Mol. Syst. Biol.* **2011**, *7*, 1-6.

[105] F. Gabler, S.-Z. Nam, S. Till, M. Mirdita, M. Steinegger, J. Söding, A. N. Lupas, V. Alva, *Curr. Protoc. Bioinf.* **2020**, *72*, e108.

[106] L. Zimmermann, A. Stephens, S.-Z. Nam, D. Rau, J. Kübler, M. Lozajic, F. Gabler, J. Söding, A. N. Lupas, V. Alva, *J. Mol. Biol.* **2018**, *430*, 2237-2243.

[107] SnapGene Software (von Insightful Science; verfügbar unter snapgene.com, Zugriff: 05.01.23).

[108] E. Gasteiger, C. Hoogland, A. Gattiker, S. Duvaud, M.R. Wilkins, R.D. Appel, A. Bairoch, *The Proteomics Protocols Handbook* **2005**, 571-607.

[109] https://web.expasy.org/compute_pi/ (Zugriff: 05.01.23)

[110] B. A. Connolly, Oligodeoxynucleotides containing modified bases. In Oligonucleotides and Analogues - A Practical Approach, (F. Eckstein, Herausgeber). IRL Press at Oxford University Press, New York, (**1991**), Kapitel 7.

[111] J. J. Fox, D. Van Praag, I. Wempen, I. L. Doerr, L. Cheong, J. E. Knoll, M. L. Eidinoff, A. Bendich, G. B. Brown, *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 178-187.

[112] C. Beuck, *Dissertation RWTH Aachen University*, **2004**.

[113] IDT DNA Spec Sheets, Reference No. 232827634, 232827633, 230800179, 230800181, 230800180, 231740837, 231740839, 231740838, 233153197, 233153198.

[114] H. Berman, K. Heinrich, H. Nakamura, *Nat. Struct. Biol.* **2003**, *10*, 980.

[115] G. M. Sastry, M. Adzhigirey, T. Day, R. Annabhimoju, W. Sherman, *J. Comput. Aid. Mol. Des.* **2013**, *27*, 221-234.

[116] R. A. Friesner, J. L. Banks, R. B. Murphy, T. A. Halgren, J. J. Klicic, D. T. Mainz, M. P. Repasky, E. H. Knoll, D. E. Shaw, M. Shelley, J. K. Perry, P. Francis, P. S. Shenkin, *J. Med. Chem* **2004**, *47*, 1739-1749.

[117] R. A. Friesner, R. B. Murphy, M. P. Repasky, L. L. Frye, J. R. Greenwood, T. A. Halgren, P. C. Sanschagrin, D. T. Mainz, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 6177-6196.

[118] K. J. Bowers, E. Chow, H. Xu, R. O. Dror, M. P. Eastwood, B. A. Gregersen, J. L. Klepeis, I. Kolossvary, M. A. Moraes, F. D. Sacerdoti, *SC '06: Proceedings of the 2006 ACM/IEEE Conference on Supercomputing* **2006**, *1*, 43.

[119] E. Harder, W. Damm, J. Maple, C. Wu, M. Reboul, J. Y. Xiang, L. Wang, D. Lupyan, M. K. Dahlgren, J. L. Knight, J. W. Kaus, Cerutti, *J. Chem. Theory Comput.* **2016**, *21*, 281 - 296.

[120] G. Hanz, *Dissertation RWTH Aachen University*, **2016**.

[121] K. Banert, *Chem. Ber.* **1989**, *122*, 911-918.

[122] https://scifinder-n.cas.org/searchDetail/substance/63bc2b0a82c9174d71b5ed94/substanceSpectra (Zugriff: 09.01.2023)

[123] T. Gilboa, C. Torfstein, M. Juhasz, A. Grunwald, Y. Ebenstein, E. Weinhold, A. Meller, *ACS Nano* **2016**, *10*, 8861-8870.

[124] S. Flade, J. Jasper, M. Gieß, M. Juhasz, A. Dankers, G. Kubik, O. Koch, E. Weinhold, D. Summerer, *ACS Chem. Biol.* **2017**, *12*, 1719-1725.

[125] O. N. Assad, T. Gilboa, J. Spitzberg, M. Juhasz, E. Weinhold, A. Meller, *Adv. Mater.* **2017**, *29*, 1605442.

[126] C. Heck, D. Torchinsky, G. Nifker, F. Gularek, Y. Michaeli, E. Weinhold, Y. Ebenstein, *Nanoscale* **2020**, *12*, 20287-20291.

7 Anhang

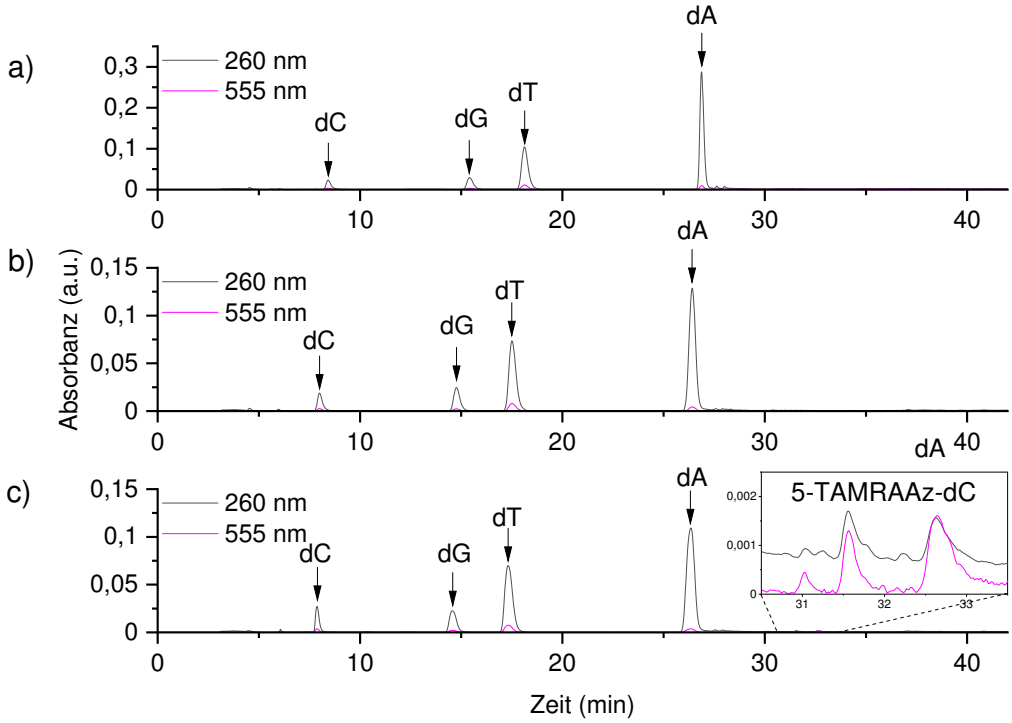


Abbildung 47: Chromatogramme der *rp*-HPLC Analyse des fragmentierten 24mer Duplex-ODN nach der **a**) Kontrollreaktion ohne DNA-MTase, **b**) Kontrollreaktion ohne Cofaktor und **c**) Markierungsreaktion mit M.MpeI und 6TAMRAAz (**11**). Enzym- und DNA-Konzentration: 5 µM, Cofaktorkonzentration: 40 µM, Inkubationszeit: ü.N..

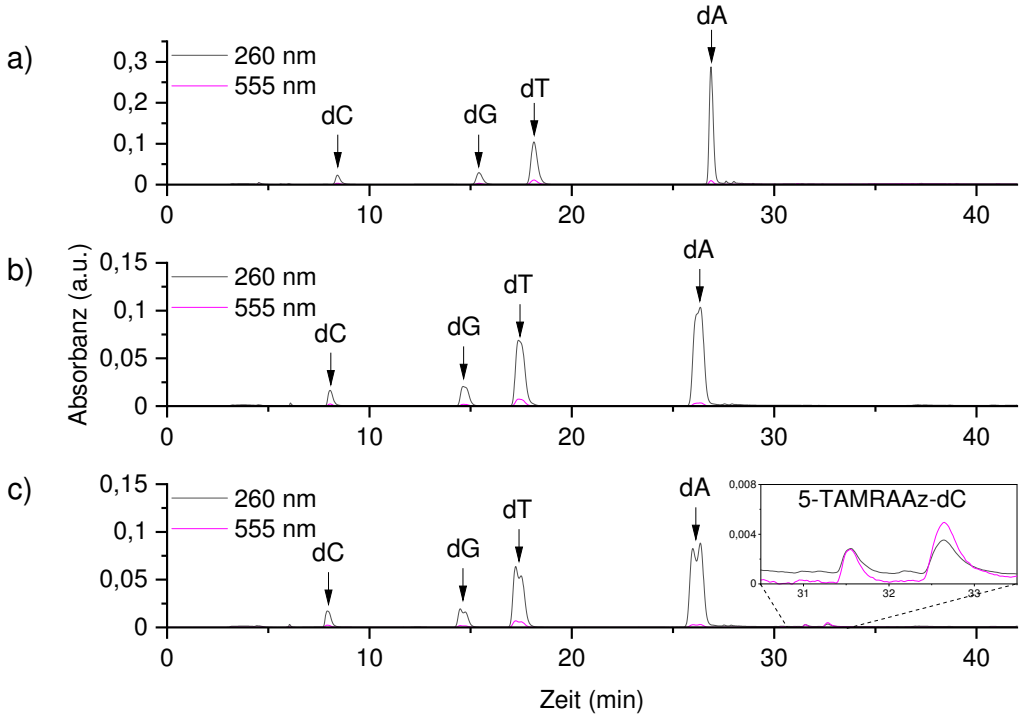


Abbildung 48: Chromatogramme der *rp*-HPLC Analyse des fragmentierten 24mer Duplex-ODN nach der **a**) Kontrollreaktion ohne DNA-MTase, **b**) Kontrollreaktion ohne Cofaktor und **c**) Markierungsreaktion mit M.SssI und 6TAMRAAz (**11**). Enzym- und DNA-Konzentration: 5 µM, Cofaktorkonzentration: 40 µM, Inkubationszeit: ü.N..

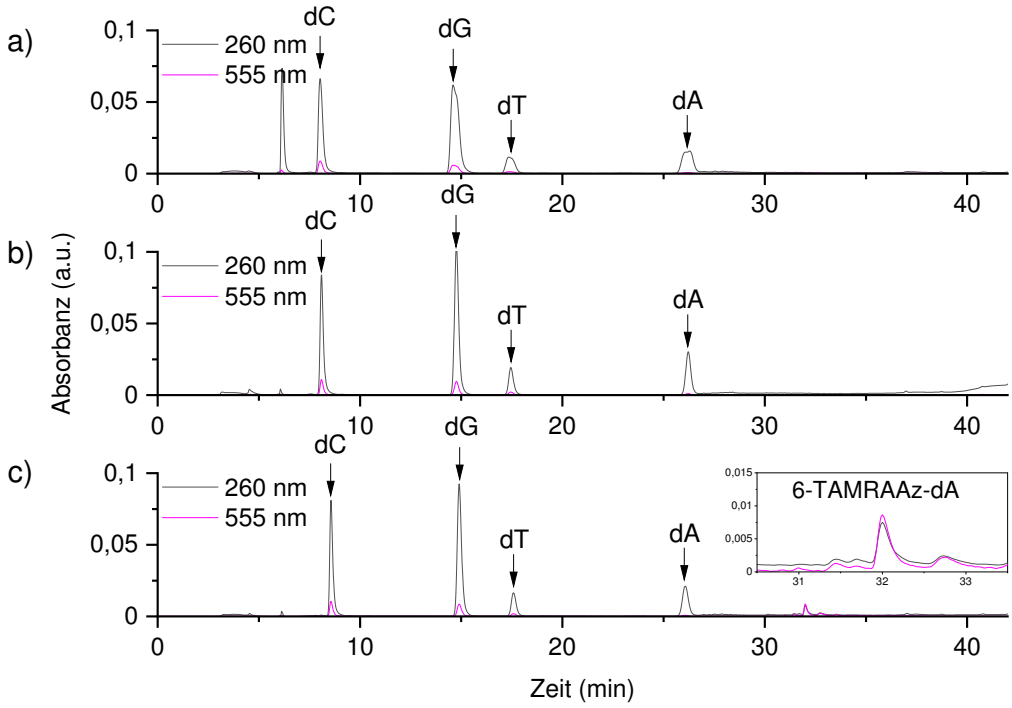


Abbildung 49: Chromatogramme der *rp*-HPLC Analyse des fragmentierten 14mer Duplex-ODN nach der **a**) Kontrollreaktion ohne DNA-MTase, **b**) Kontrollreaktion ohne Cofaktor und **c**) Markierungsreaktion mit M.TaqI und 6TAMRAAz (**11**). Enzym- und DNA-Konzentration: 5 µM, Cofaktorkonzentration: 40 µM, Inkubationszeit: ü.N..

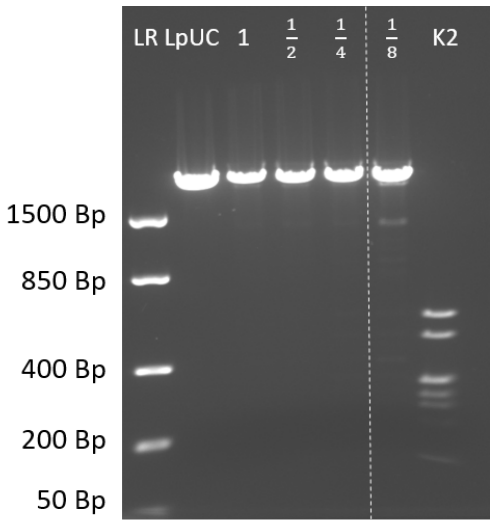


Abbildung 50: Agarose-Gelelektrophorese des Modifikations-/Restriktionstests von M.MpeI Q136A/N374A mit dem Cofaktor SAM (**1**) durchgeführt von Kerstin Glensk. Cofaktorkonzentration: 80 µM, Inkubation: 1 h bei 37 °C. LR: DNA Leiter kurzer Länge, LpUC: R.EcoRI-linearisierte pUC-DNA Referenz, K2: Kontrolle ohne MTase. Es wurde eine Enzym-Verdünnungsreihe ausgehend von 1 Äquivalent MTase im Bezug auf die 5´-CG-3´ Erkennungssequenzen auf der DNA durchgeführt. Die ermittelte TON beträgt 4.

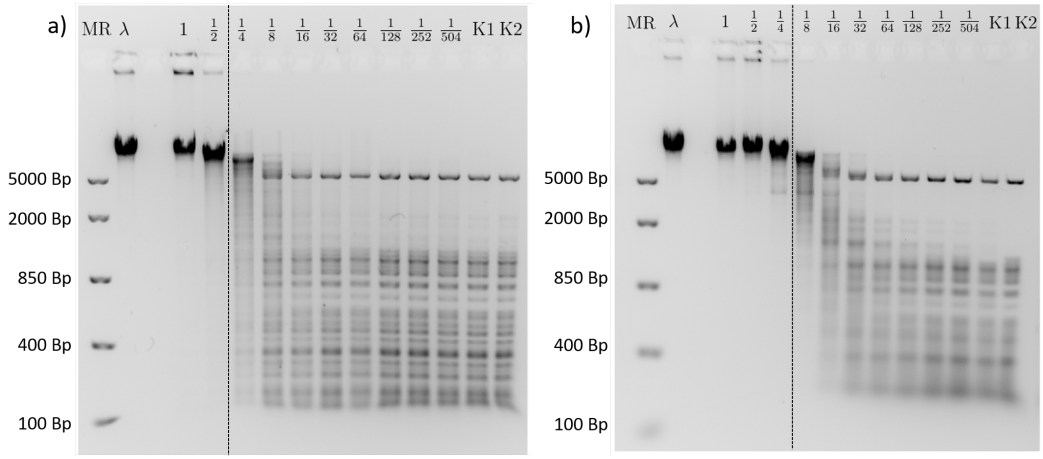


Abbildung 51: Agarose-Gelelektrophorese des Modifikations-/Restriktionstests von M.HhaI Q82A/Y254S/N304A mit dem Cofaktor SAM (**1**) **a**) in M.HhaI-Puffer und **b**) in CutSmart-Puffer. Cofaktorkonzentration: 80 µM, Inkubation: 1 h bei 37 °C. MR: DNA Leiter mittlerer Länge, λ: λ-DNA Referenz, K1: Kontrolle ohne Cofaktor, K2: Kontrolle ohne MTase. Es wurde eine Enzym-Verdünnungsreihe ausgehend von 1 Äquivalent MTase im Bezug auf die 5´-GCGC-3´ Erkennungssequenzen auf der DNA durchgeführt. Die ermittelte TON beträgt 2 für M.HhaI-Puffer und 4 für CutSmart-Puffer.

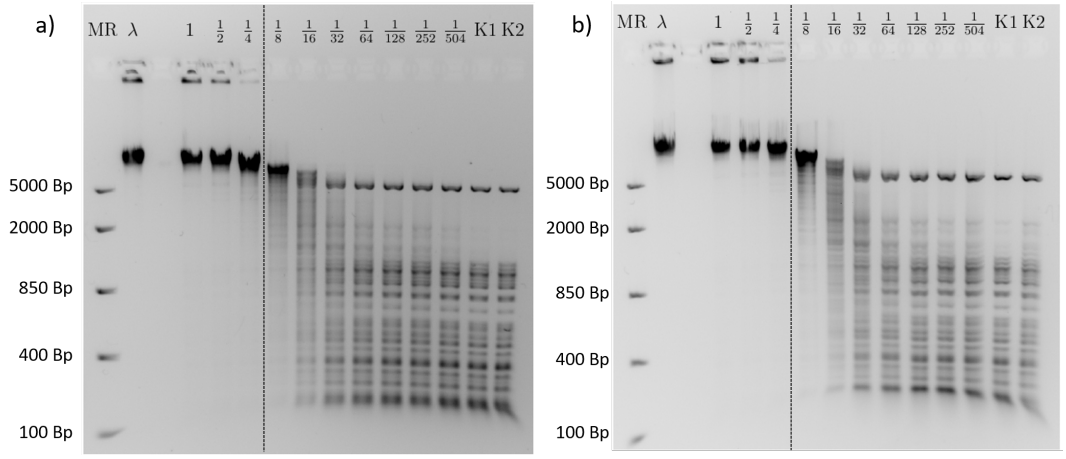


Abbildung 52: Agarose-Gelelektrophorese des Modifikations-/Restriktionstests von M.HhaI Q82A/Y254S/N304A **a**) mit dem Cofaktor AdoYnAzid (3C) (**17**) und **b**) mit dem Cofaktor AdoYnAzid (2C) (**23**). Cofaktorkonzentration: 80 µM, Inkubation: 1 h bei 37 °C. MR: DNA Leiter mittlerer Länge, λ: λ-DNA Referenz, K1: Kontrolle ohne Cofaktor, K2: Kontrolle ohne MTase. Es wurde eine Enzym Verdünnungsreihe ausgehend von 1 Äquivalent MTase im Bezug auf die 5´-GCGC-3´ Erkennungssequenzen auf der DNA durchgeführt. Die ermittelte TON beträgt 4.

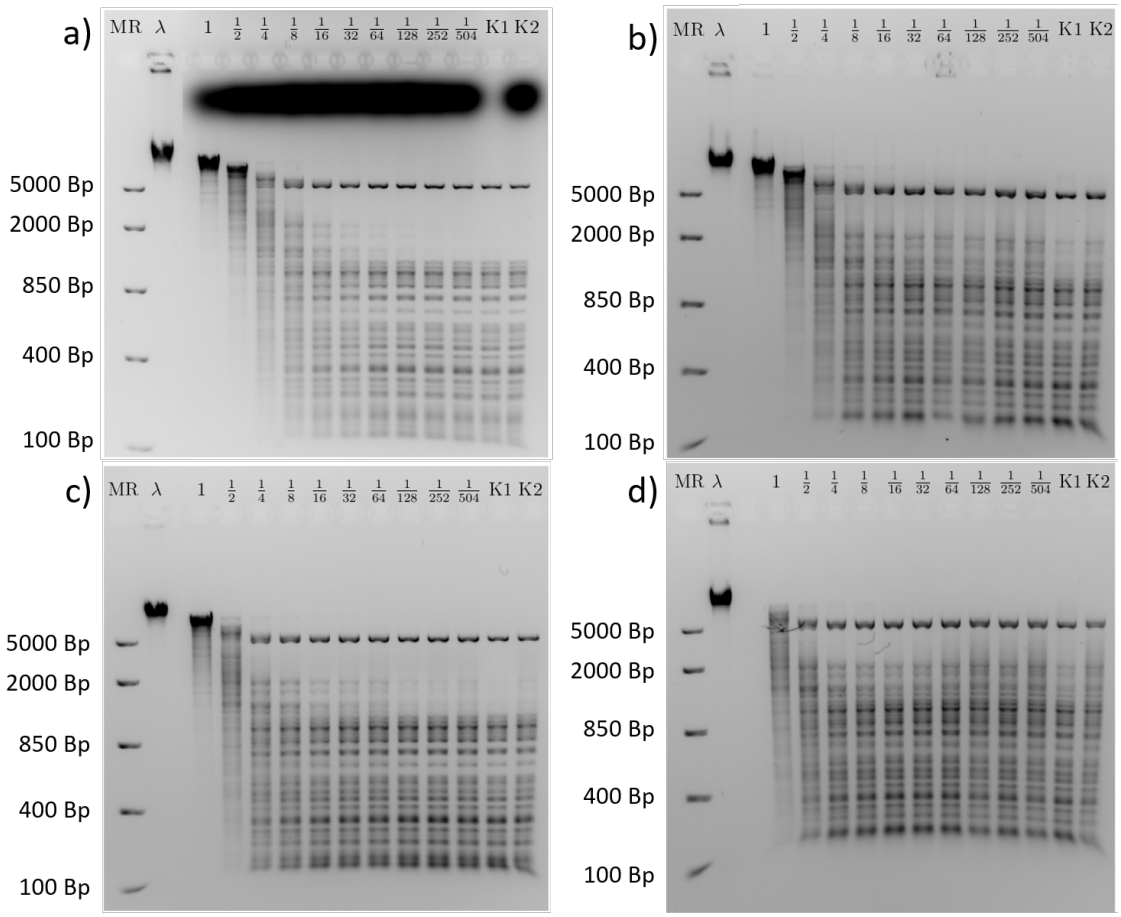


Abbildung 53: Agarose-Gelelektrophorese des Modifikations-/Restriktionstests von M.HhaI Q82A/Y254S/N304A mit den Cofaktoranaloga **a**) AdoYnTAMRA (**32**), **b**) AdoYnATTO643 (**33**), **c**) AdoYnCF640R (**34**) und **d**) AdoYnAF647 (**35**). Cofaktorkonzentration: 80 µM, Inkubation: 1 h bei 37 °C. MR: DNA Leiter mittlerer Länge, λ: λ-DNA Referenz, K1: Kontrolle ohne Cofaktor, K2: Kontrolle ohne MTase. Es wurde eine Enzym Verdünnungsreihe ausgehend von 1 Äquivalent MTase im Bezug auf die 5´-GCGC-3´ Erkennungssequenzen auf der DNA durchgeführt. Die ermittelte TON ist ca. 1 für AdoYnTAMRA, AdoYnATTO643 und AdoYnCF640R. Die TON für AdoYnAF647 ist deutlich kleiner als 1.

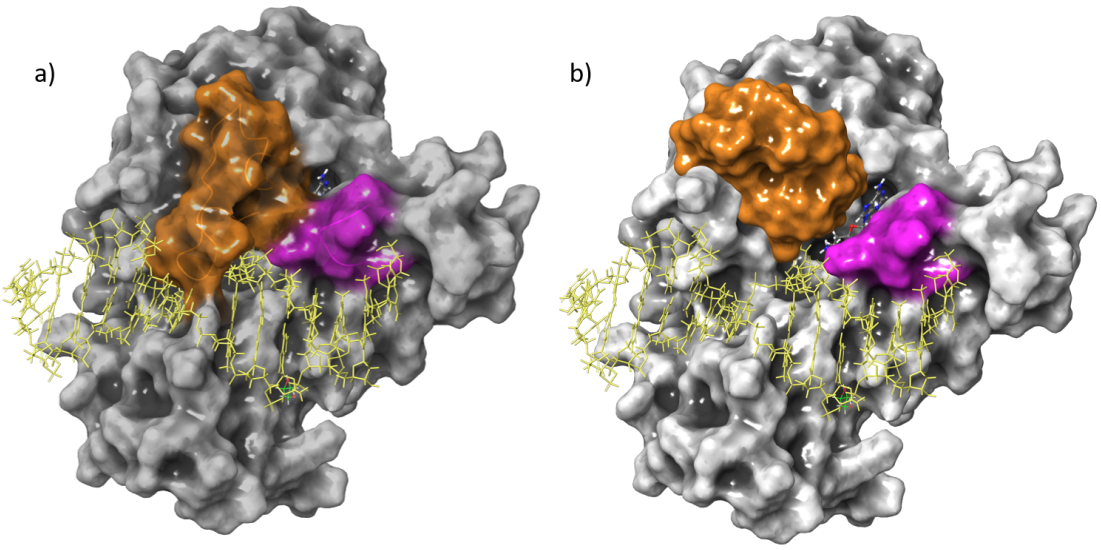


Abbildung 54: Lage der Schlaufen (katalytische Schlaufe in orange und in M.MpeI Δ78-83/Q136A/N374A entfernte Schlaufe in violett) in der Kristallstruktur und dem Model. a): Kristallstruktur 4DKJ. Die katalytische Schlaufe ist vorhanden und geschlossen. Das Enzym ist teilweise transparent dargestellt. Das Adenin des Cofaktorprodukts SAH (**2**) ist durch den natürlich vorkommenden Tunnel sichtbar. b): Modellstruktur auf Basis des Vergleichs zu M.HhaI mit geöffneter katalytischer Schlaufe. Die katalytische Schlaufe ist geöffnet, es bildet sich ein Spalt, durch den das Cofaktorprodukt SAH (**2**) sichtbar ist.

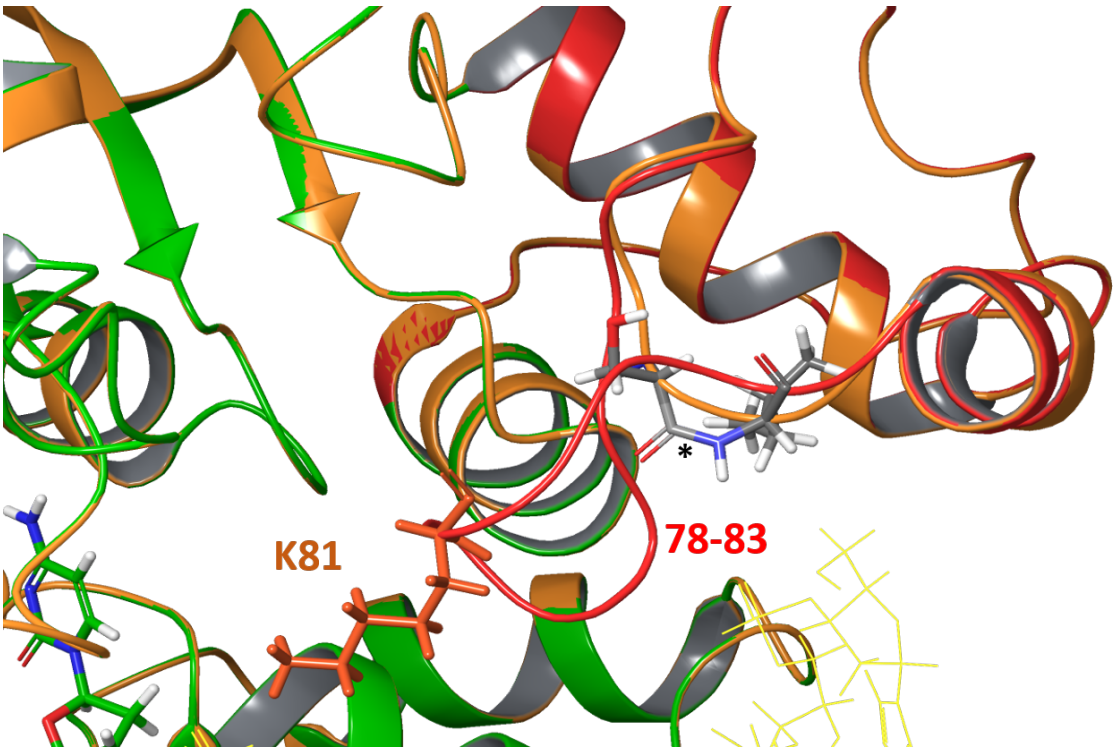


Abbildung 55: Vergrößerte Darstellung der möglichen Mutationen. In orange Lysin 81, welches vor den Tunnel ragt. In rot die Schlaufe bestehend aus den Aminosäuren 78 bis 83, welche entfernt werden kann, um mehr Platz für die Übertragung von langen synthetischen Seitenketten zu schaffen. Beim Entfernen der Schlaufe werden N- und C-Terminus über eine neue Peptidbindung verbunden (*).

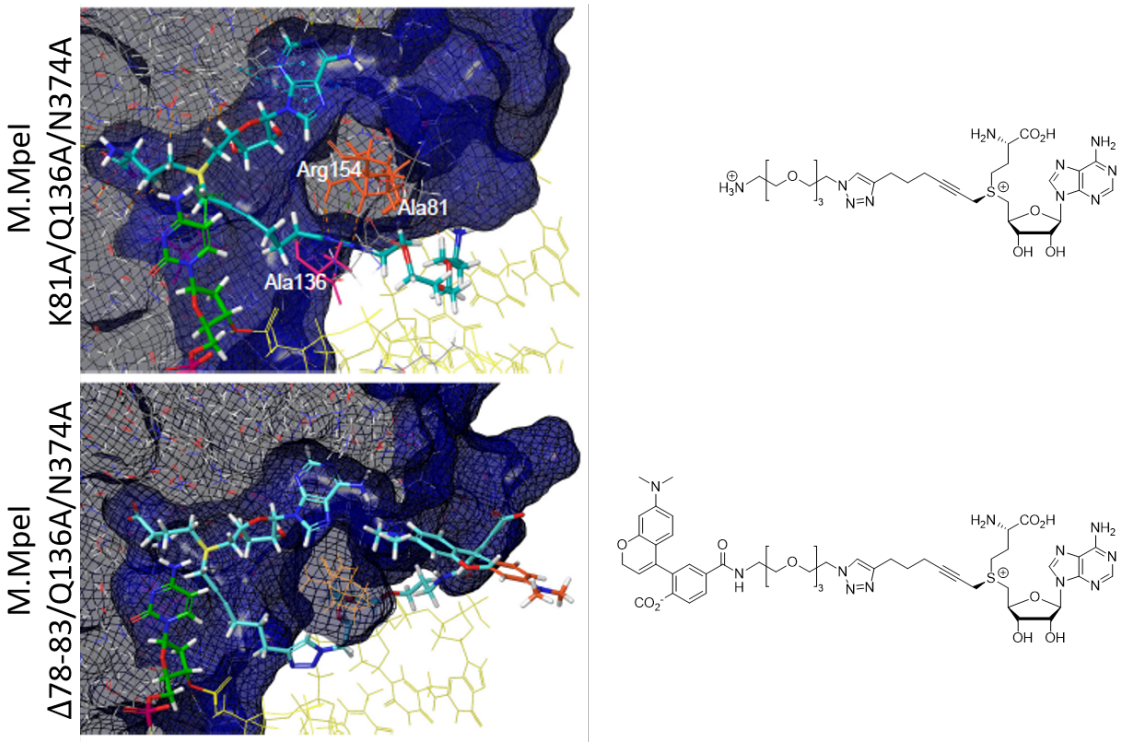


Abbildung 56: Dockingexperimente sterisch anspruchsvoller Cofaktoranalogafragmente (rechts) in die Mutanten M.MpeI K81A/Q136A/N374A und M.MpeI Δ78-83/Q136A/N374A. Die Enzymoberfläche ist als Netzstruktur in blau dargestellt. Das Ziecytosin (grün) ist aus der DNA ausgeklappt und befindet sich in der Bindungstasche. Die sterisch anspruchsvollen Cofaktoranaloga (türkis) befinden sich in der Cofaktorbindungstasche. Die Kernstruktur stimmt mit dem SAH aus der Kristallstruktur 4DKJ überein. Die langen Seitenketten ragen aus der Cofaktorbindungstasche heraus. Für das Docking wurden die dargestellten Fragmente der Struktur von AdoYnTAMRA (**32**) verwendet und nach dem Docking teilweise ergänzt (unteres Bild, orange). Abbildung übernommen von Dietel.[102]

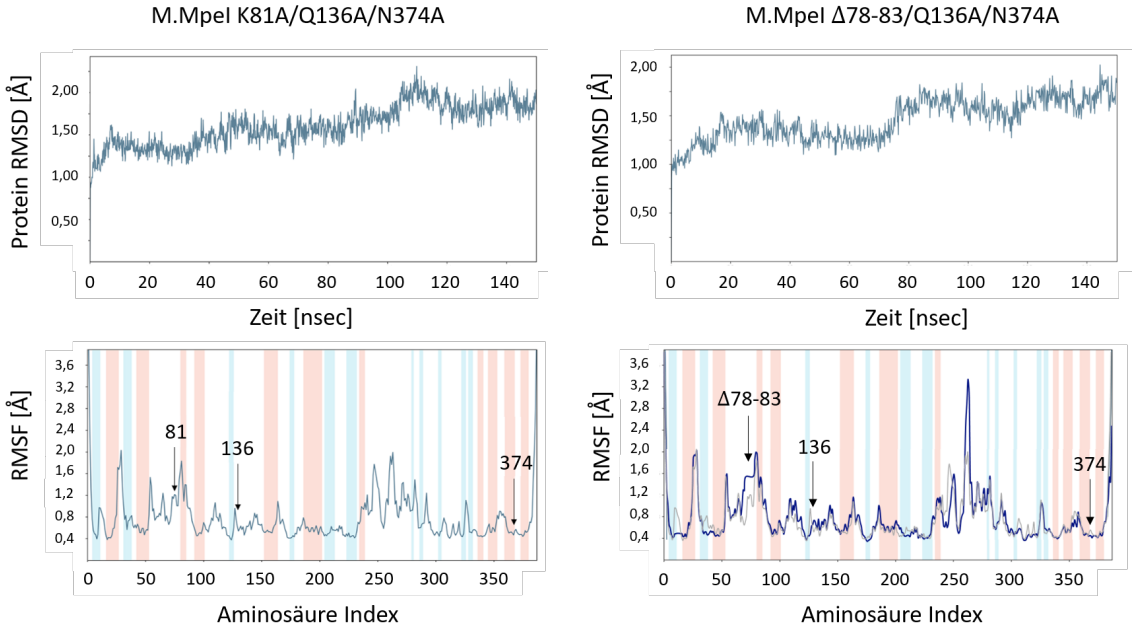


Abbildung 57: Zur Beurteilung der Stabilität der Mutanten M.MpeI K81A/Q136A/N374A und M.MpeI Δ78-83/Q136A/N374A wurden molekular dynamische Simulationen über einen Zeitraum von 150 ns durchgeführt. Es wird deutlich, dass die mutierten Enzyme stabil sind, was an der geringen quadratischen mittleren Abweichung der Positionen der Aminosäuren (*Root Mean Square Deviation* RMSD) und einer geringen lokalen Veränderungen der Proteinkette (*Root Mean Square Fluctuation* RMSF) zu erkennen ist. Zur Berechnung der RMSD wird die Proteinposition in Bezug zu einer Referenzstruktur gesetzt, dadurch ergibt sich der Startwert von 1 Å. Rosa Bereiche stehen für α-Helices und blaue Bereiche für β-Faltblätter in der Sekundärstruktur. Abbildung adaptiert von Dietel.[102]

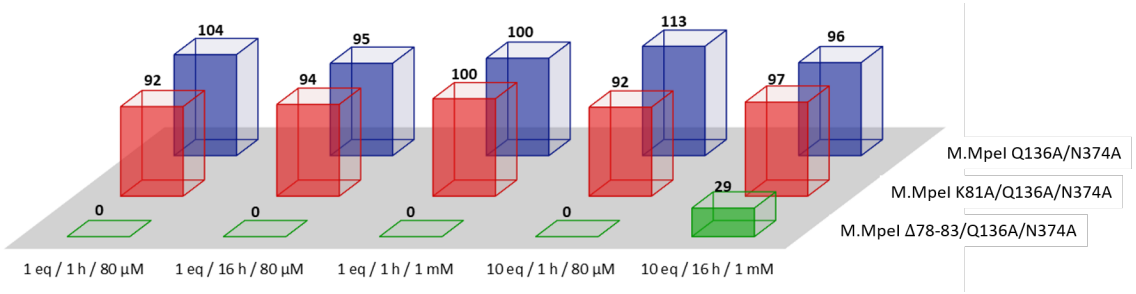


Abbildung 58: Ergebnisse der Quantifizierung der Methyltransferaseaktivität von M.MpeI Q136A/N374A, M.MpeI K81A/Q136A/N374A und M.MpeI Δ78-83/Q136A/N374A mit SAM (**1**) bei verschiedenen Inkubationszeiten, Cofaktor- und Enzymkonzentrationen bestimmt durch *rp*-HPLC des fragmentierten 24mer Duplex-ODN nach der Modifikationsreaktion. Es wird deutlich, dass M.MpeI Δ78-83/Q136A/N374A nur für eine Kombination aus gesteigerten Bedingungen Aktivität mit dem natürlichen Cofaktor SAM (**1**) zeigt. Abbildung übernommen von Dietel.[102]

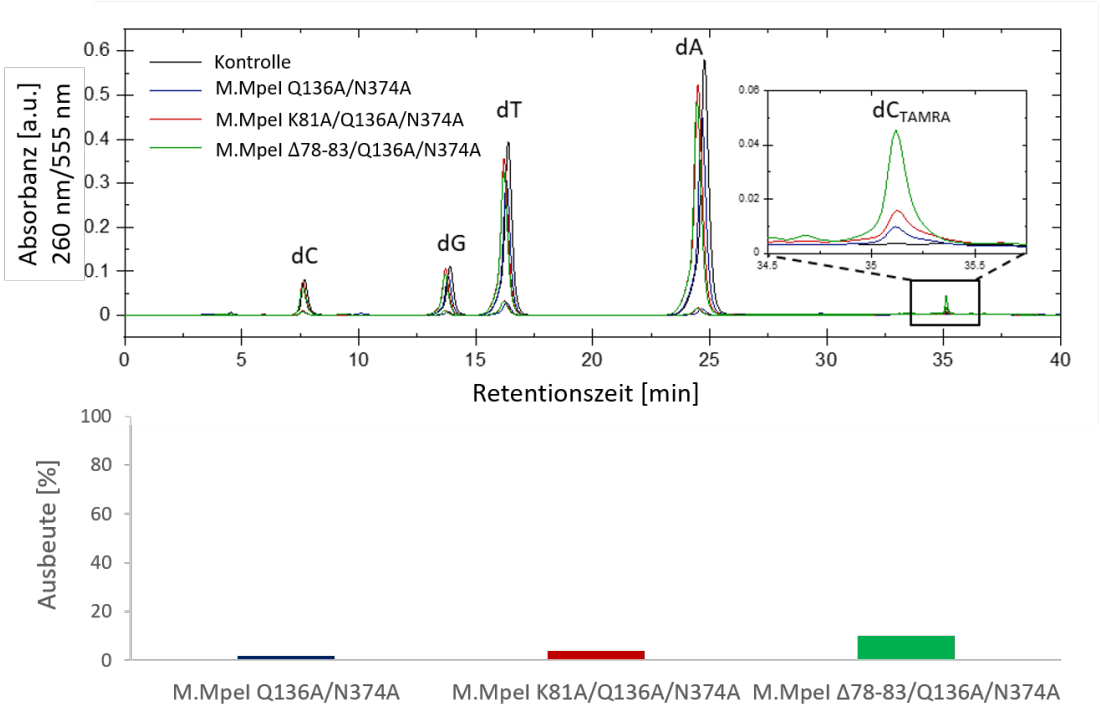


Abbildung 59: Oben: Chromatogramme der *rp*-HPLC Analyse des fragmentierten 24mer Duplex-ODN nach der Markierungsreaktion mit AdoYnTAMRA (**32**). Unten: Ergebnisse der Quantifizierung der Transferaseaktivität von M.MpeI Q136A/N374A, M.MpeI K81A/Q136A/N374A und M.MpeI Δ78-83/Q136A/N374A mit AdoYnTAMRA (**32**). Es ergaben sich Ausbeuten von 2 % für M.MpeI Q136A/N374A, 4 % für M.MpeI K81A/Q136A/N374A und 10 % für M.MpeI Δ78-83/Q136A/N374A. Abbildung adaptiert von Dietel.[102]

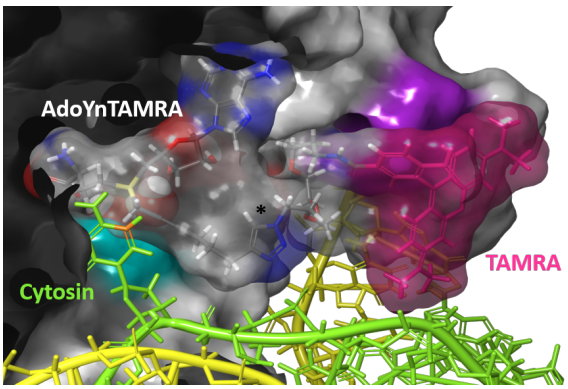


Abbildung 60: Dockingexperiment durchgeführt mit M.MpeI Δ78-83/Q136A/N374A (graue Oberflächendarstellung) und dem Cofaktoranalogon AdoYnTAMRA (**32**). Aus der DNA (gelb und grün) ist das Zielcytosin ausgeklappt (grün). Das Cofaktoranalogon AdoYnTAMRA (**32**) (grau und pink) wurde in die Bindungstasche gedockt. Durch den bei der Mutation entstandenen Platz, kann die verlängerte synthetische Seitenkette mit Triazolring (*) und die fluoreszierende Gruppe (pink) aus der Bindungstasche hinausragen.

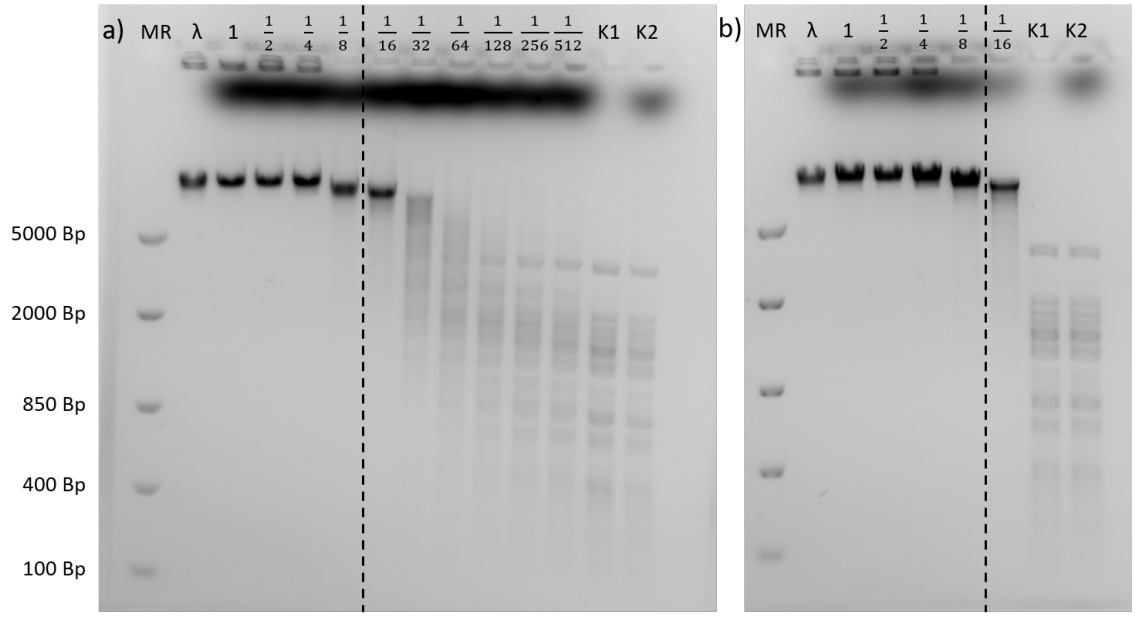


Abbildung 61: Agarose-Gelelektrophorese des Modifikations-/Restriktionstests von M.TaqI mit dem Cofaktor AdoYnTAMRA (kurz) (**32**) (**a)**) und AdoYnTAMRA (lang) (**40**) (**b)**). Cofaktorkonzentration: 80 µM, Inkubation: 1 h bei 65 °C. MR: DNA Leiter mittlerer Länge, λ: λ-DNA Referenz, K1: Kontrolle ohne Cofaktor, K2: Kontrolle ohne DNA-MTase. Es wurde eine Enzym-Verdünnungsreihe ausgehend von 1 Äquivalent DNA-MTase im Bezug auf die 5´-TCGA-3´ Erkennungssequenzen der λ-DNA durchgeführt. Die ermittelte TON ist 8 sowohl für AdoYnTAMRA (kurz) (**32**) als auch für AdoYnTAMRA (lang) (**40**).

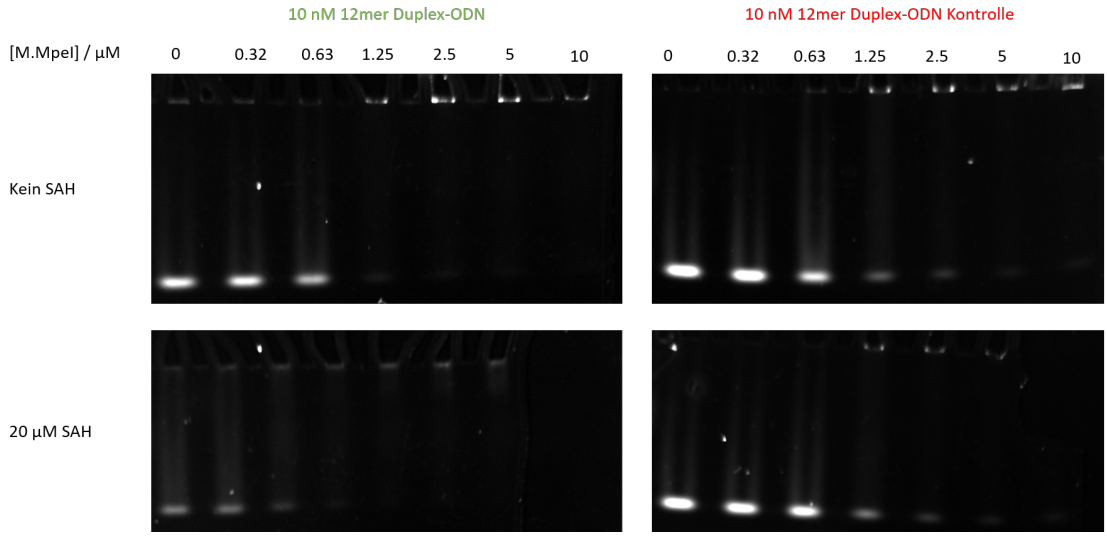


Abbildung 62: EMSA mit M.MpeI und spezifischer DNA (12mer) und unspezifischer DNA (12mer Kontrolle). Es wurde der Einfluss von SAH (**2**) auf die DNA-Bindung untersucht.

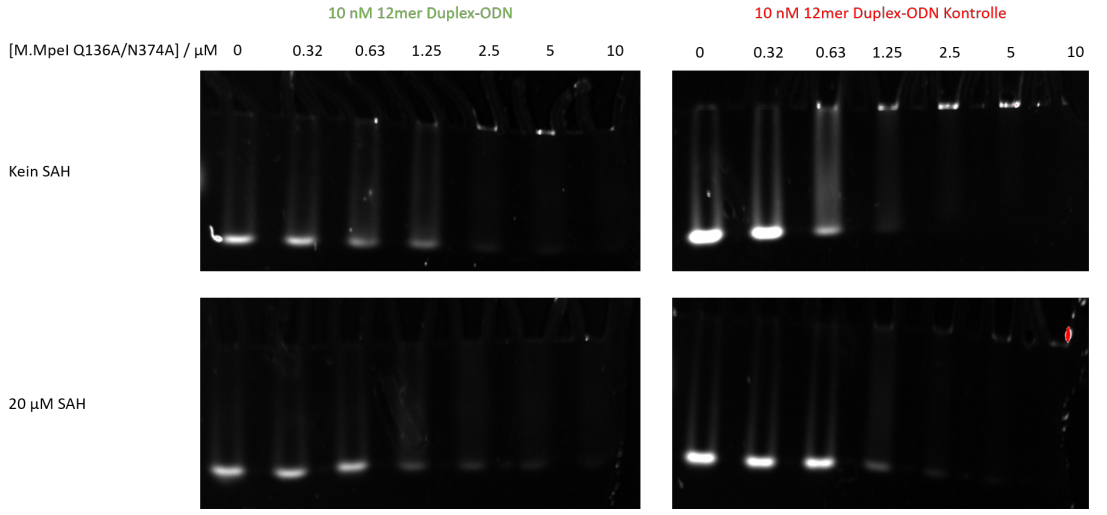


Abbildung 63: EMSA mit M.MpeI Q136A/N374A und spezifischer DNA (12mer) und unspezifischer DNA (12mer Kontrolle). Es wurde der Einfluss von SAH (**2**) auf die DNA-Bindung untersucht.

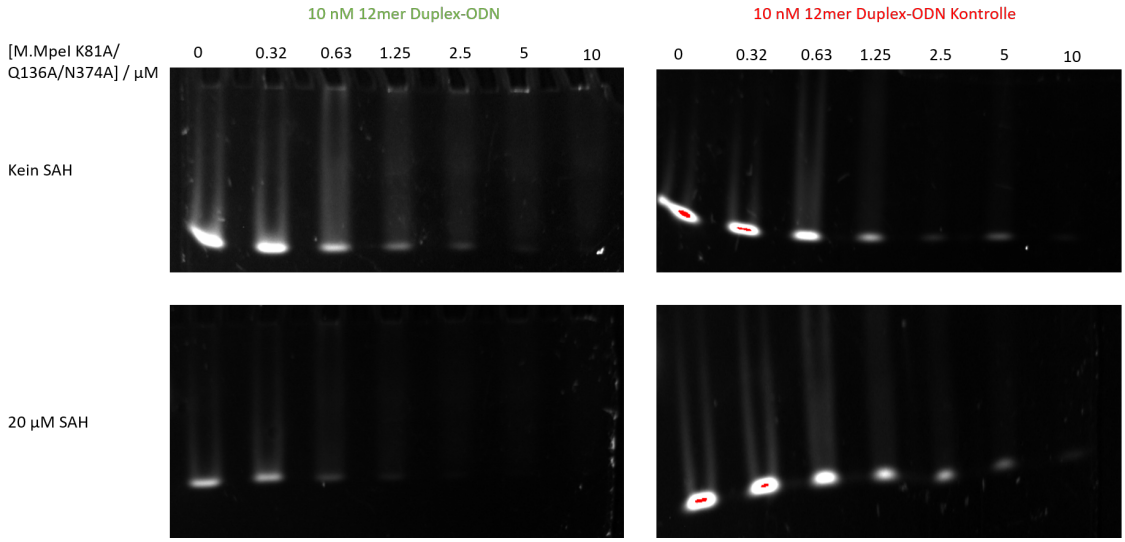


Abbildung 64: EMSA mit M.MpeI K81A/Q136A/N374A und spezifischer DNA (12mer) und unspezifischer DNA (12mer Kontrolle). Es wurde der Einfluss von SAH (**2**) auf die DNA-Bindung untersucht.

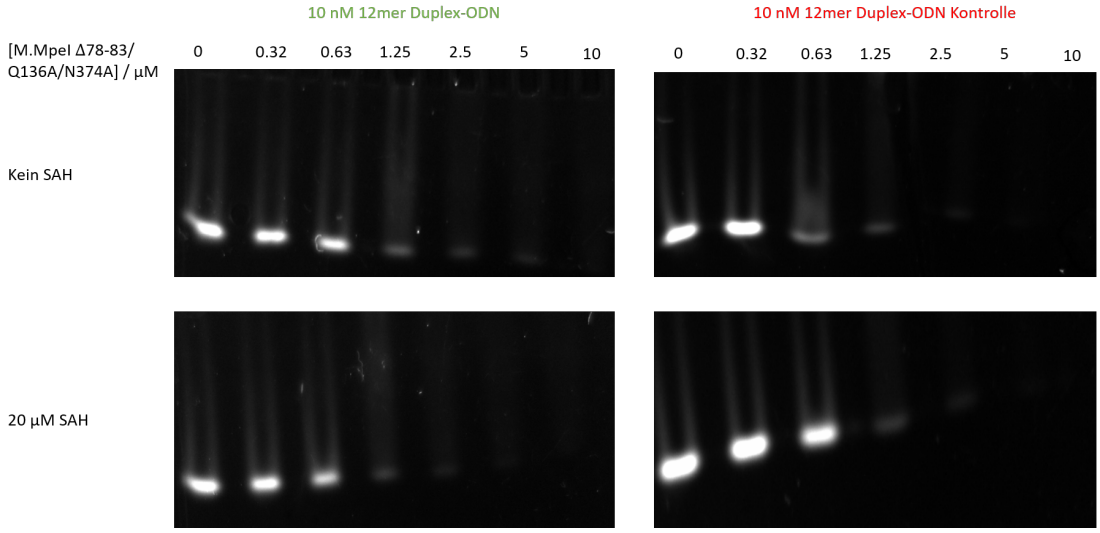


Abbildung 65: EMSA mit M.MpeI Δ78-83/Q136A/N374A und spezifischer DNA (12mer) und unspezifischer DNA (12mer Kontrolle). Es wurde der Einfluss von SAH (**2**) auf die DNA-Bindung untersucht.

Tabelle 12: Berechnete Bindungskonstanten K_D [µM] für M.MpeI und die Mutanten M.MpeI Q136A/N374A, M.MpeI K81A/Q136A/N374A und M.MpeI Δ78-83/Q136A/N374A ohne und mit SAH (**2**) (20 µM) basierend auf den EMSA-Messungen.

Enzym	**0 µM SAH, 12mer**	**20 µM SAH, 12mer**	**0 µM SAH, 12mer Kontrolle**	**20 µM SAH, 12mer Kontrolle**
M.MpeI	0,70	0,40	0,87	1,17
M.MpeI Q136A/N374A	0,76	0,71	0,41	0,77
M.MpeI K81A/Q136A/N374A	0,62	0,36	0,84	0,86
M.MpeI Δ78-83/Q136A/N374A	0,95	0,67	0,61	0,67

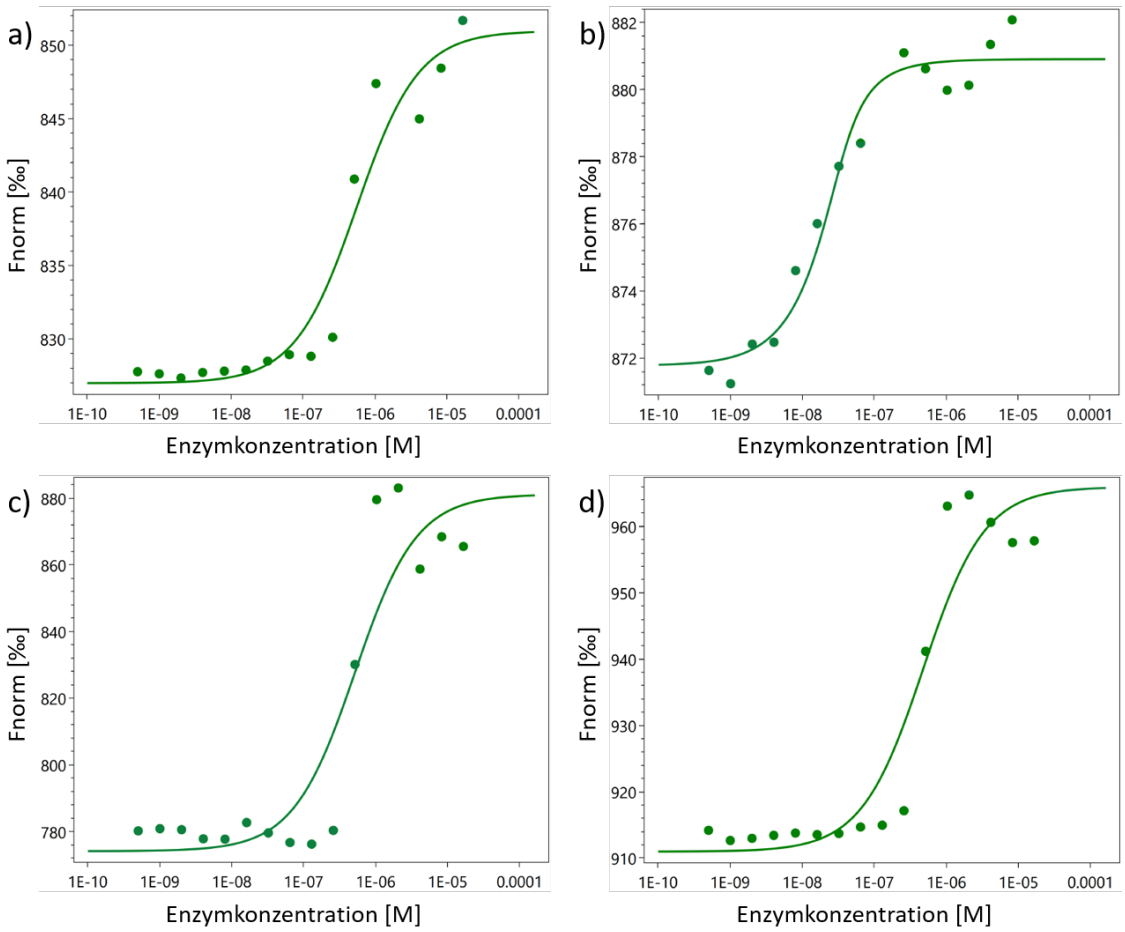


Abbildung 66: Mikroskalige Thermophorese mit M.MpeI und spezifischer DNA (12mer) und unspezifischer DNA (12mer Kontrolle). Es wurde der Einfluss von SAH (**2**) auf die DNA-Bindung untersucht. **a**) 12mer Duplex DNA ohne SAH (**2**), **b**) 12mer Duplex DNA mit SAH (**2**) (20 µM), **c**) 12mer Kontrolle Duplex DNA ohne SAH (**2**) und **d**) 12mer Kontrolle Duplex DNA mit SAH (**2**) (20 µM).

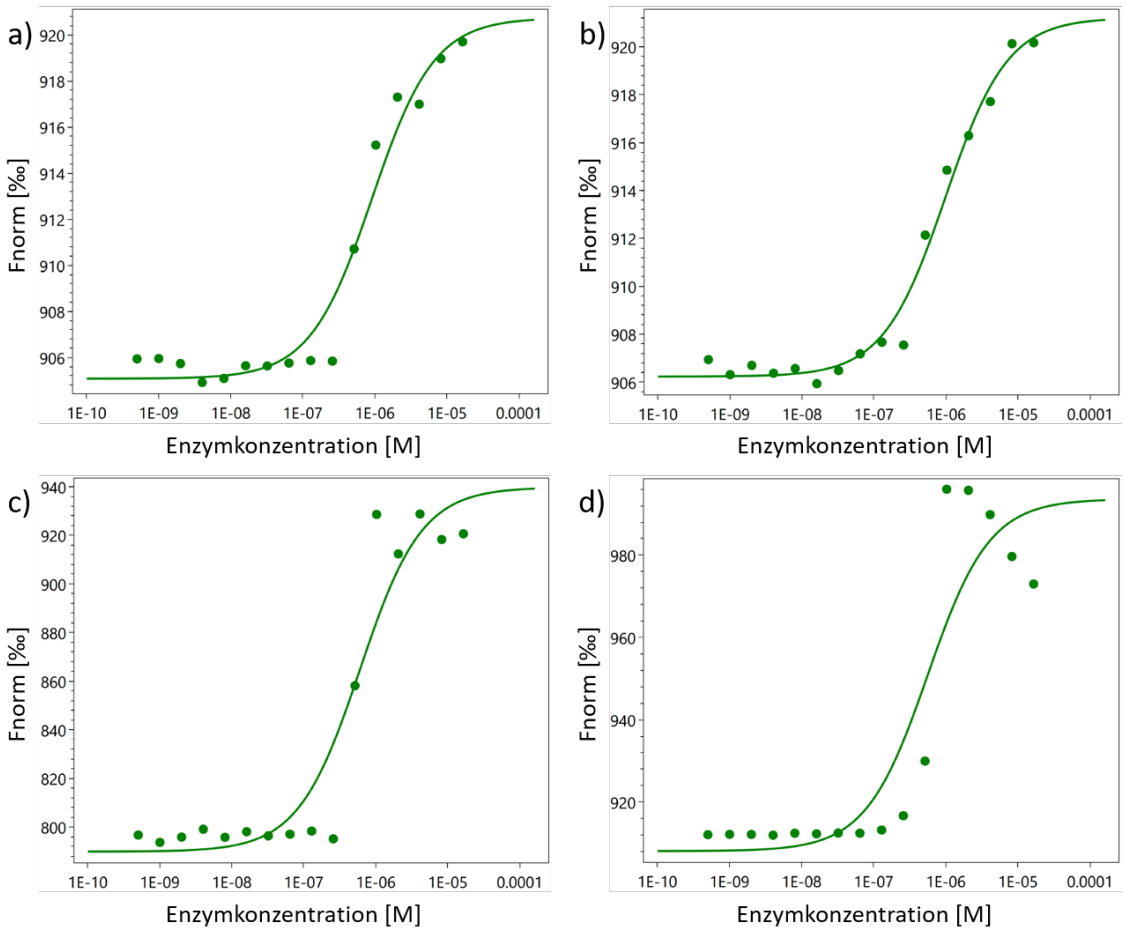


Abbildung 67: Mikroskalige Thermophorese mit M.MpeI Q136A/N374A und spezifischer DNA (12mer) und unspezifischer DNA (12mer Kontrolle). Es wurde der Einfluss von SAH (**2**) auf die DNA-Bindung untersucht. **a**) 12mer Duplex DNA ohne SAH (**2**), **b**) 12mer Duplex DNA mit SAH (**2**) (20 µM), **c**) 12mer Kontrolle Duplex DNA ohne SAH (**2**) und **d**) 12mer Kontrolle Duplex DNA mit SAH (**2**) (20 µM).

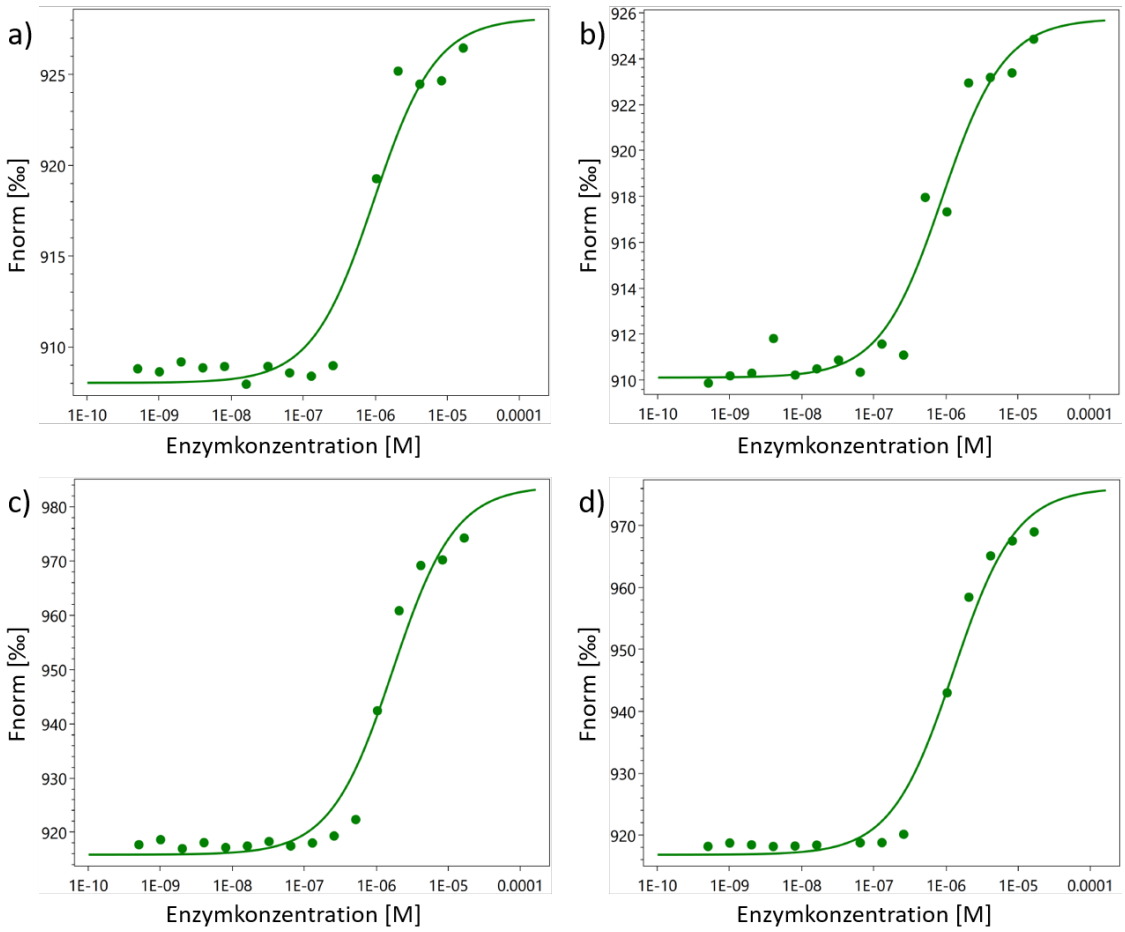


Abbildung 68: Mikroskalige Thermophorese mit M.MpeI K81A/Q136A/N374A und spezifischer DNA (12mer) und unspezifischer DNA (12mer Kontrolle). Es wurde der Einfluss von SAH (**2**) auf die DNA-Bindung untersucht. **a**) 12mer Duplex DNA ohne SAH (**2**), **b**) 12mer Duplex DNA mit SAH (**2**) (20 µM), **c**) 12mer Kontrolle Duplex DNA ohne SAH (**2**) und **d**) 12mer Kontrolle Duplex DNA mit SAH (**2**) (20 µM).

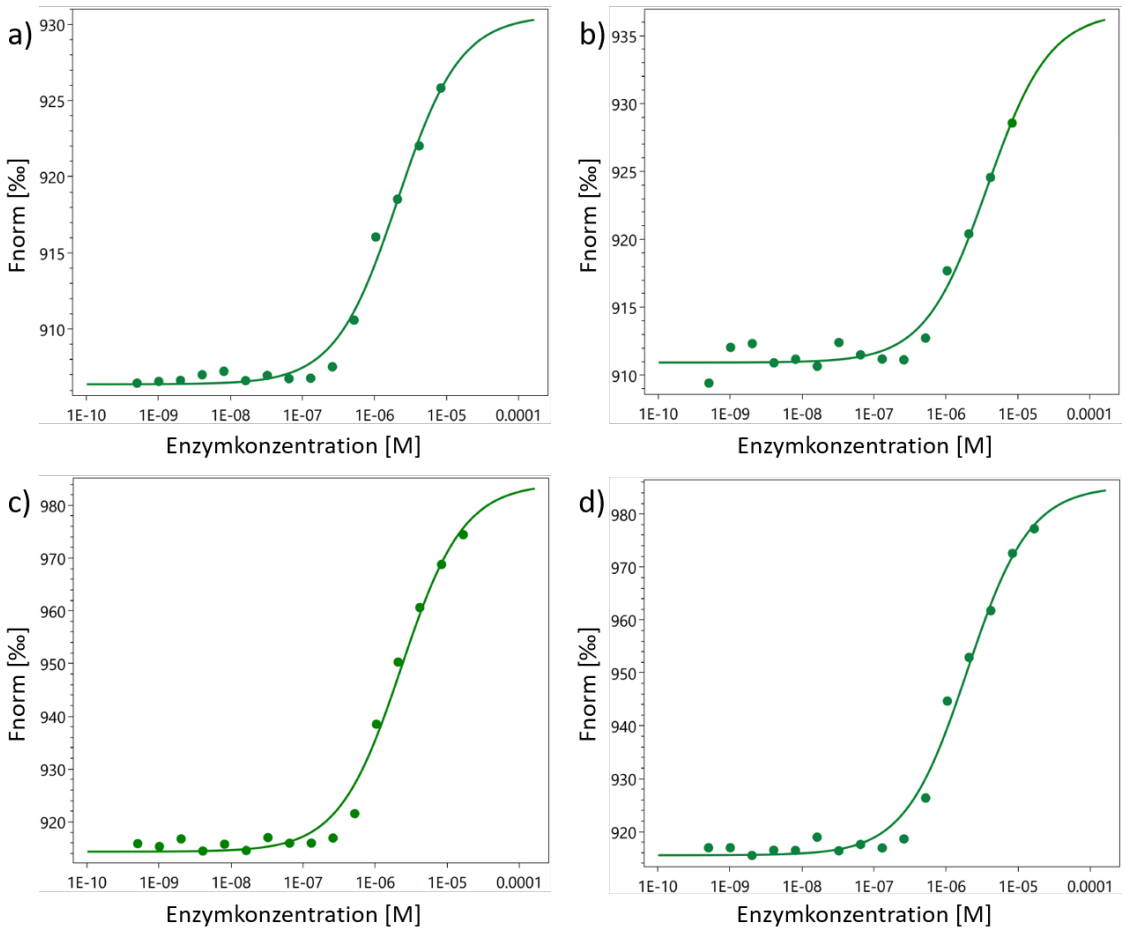


Abbildung 69: Mikroskalige Thermophorese mit M.MpeI Δ78-83/Q136A/N374A und spezifischer DNA (12mer) und unspezifischer DNA (12mer Kontrolle). Es wurde der Einfluss von SAH (**2**) auf die DNA-Bindung untersucht. **a**) 12mer Duplex DNA ohne SAH (**2**), **b**) 12mer Duplex DNA mit SAH (**2**) (20 µM), **c**) 12mer Kontrolle Duplex DNA ohne SAH (**2**) und **d**) 12mer Kontrolle Duplex DNA mit SAH (**2**) (20 µM).

Tabelle 13: Berechnete Bindungskonstanten K_D [µM] für M.MpeI und die Mutanten M.MpeI Q136A/N374A, M.MpeI K81A/Q136A/N374A und M.MpeI Δ78-83/Q136A/N374A ohne und mit SAH (**2**) (20 µM) basierend auf den MST-Messungen.

Enzym	**0 µM SAH, 12mer**	**20 µM SAH, 12mer**	**0 µM SAH, 12mer Kontrolle**	**20 µM SAH, 12mer Kontrolle**
M.MpeI	0,54	0,01	0,50	0,46
M.MpeI Q136A/N374A	0,90	0,97	0,59	0,55
M.MpeI K81A/Q136A/N374A	0,94	0,88	1,67	1,26
M.MpeI Δ78-83/Q136A/N374A	2,09	3,75	2,29	1,96

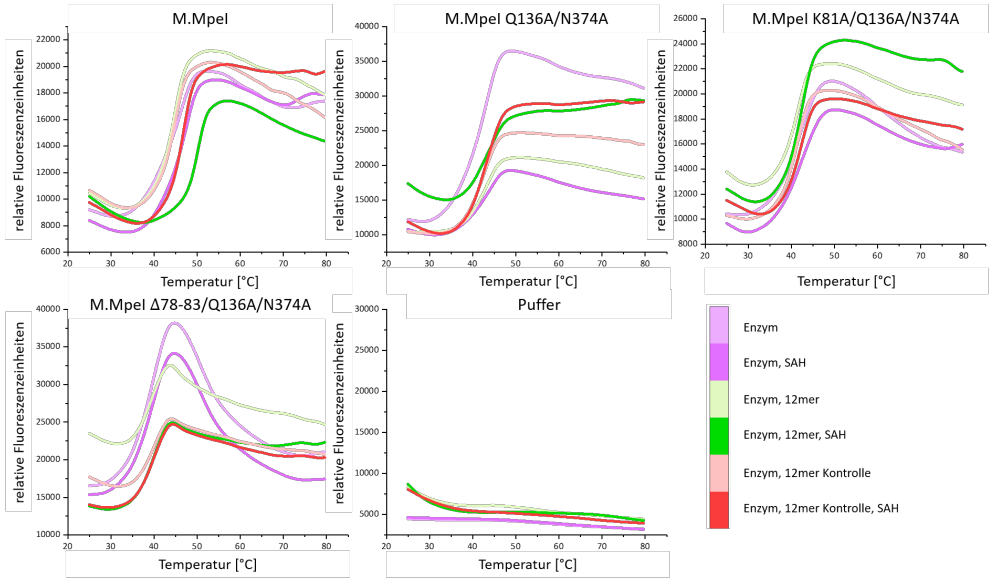


Abbildung 70: *Thermal Shift Assay (TSA)*: Rohdaten der Messungen der Schmelzpunkte von M.MpeI und den Mutanten M.MpeI Q136A/N374A, M.MpeI K81A/Q136A/N374A und M.MpeI Δ78-83/Q136A/N374A. Untersucht wurde der Einfluss von Kombinationen von SAH (**2**), spezifischer DNA (12mer) und unspezifischer DNA (12mer Kontrolle).

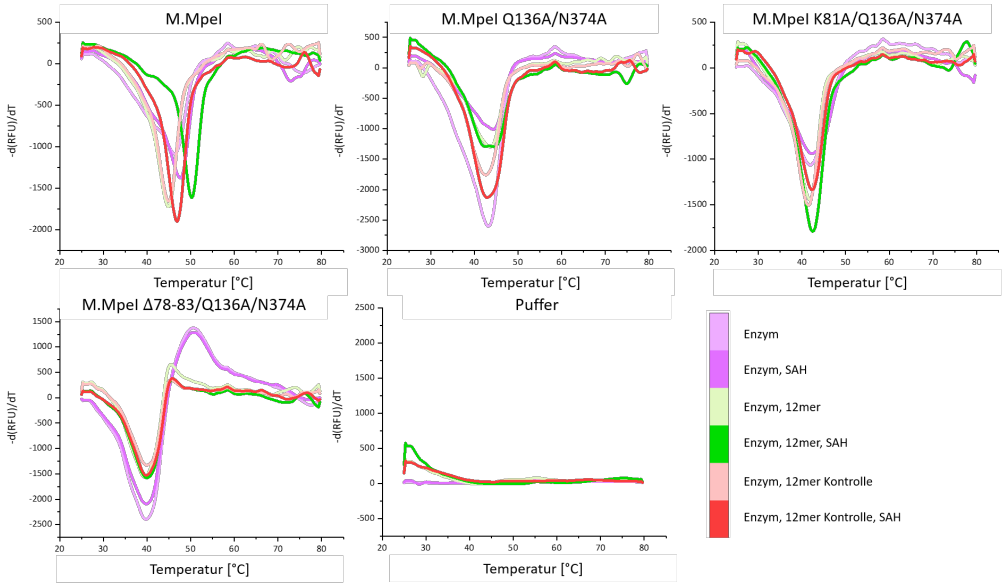


Abbildung 71: *Thermal Shift Assay (TSA)*: Ableitung der Rohdaten der Messungen der Schmelzpunkte von M.MpeI und den Mutanten M.MpeI Q136A/N374A, M.MpeI K81A/Q136A/N374A und M.MpeI Δ78-83/Q136A/N374A. Untersucht wurde der Einfluss von Kombinationen von SAH (**2**), spezifischer DNA (12mer) und unspezifischer DNA (12mer Kontrolle).

Aminosäuresequenz von M.MpeI Wildtyp:

MNSNKDKIKVIKVFEAFAGIGSQFKALKNIARSKNWEIQHSGMVEWFVDAIVSYVAIHSKNFNPKIERLD
RDILSISNDSKMPISEYGIKKINNTIKASYLNYAKKHFNNLFDIKKVNKDNFPKNIDIFTYSFPCQDLSV
QGLQKGIDKELNTRSGLLWEIERILEEIKNSFSKEEMPKYLLMENVKNLLSHKNKKNYNTWLKQLEKFGY
KSKTYLLNSKNFDNCQNRERVFCLSIRDDYLEKTGFKFKELEKVKNPPKKIKDILVDSSNYKYLNLNKYE
TTTFRETKSNIISRPLKNYTTFNSENYVYNINGIGPTLTASGANSRIKIETQQGVRYLTPLECFKYMQFD
VNDFKKVQSTNLISENKMIYIAGNSIPVKILEAIFNTLEFVNNEELEHHHHHH

Aminosäuresequenz von M.MpeI Q136A/N374A:

MNSNKDKIKVIKVFEAFAGIGSQFKALKNIARSKNWEIQHSGMVEWFVDAIVSYVAIHSKNFNPKIERLD
RDILSISNDSKMPISEYGIKKINNTIKASYLNYAKKHFNNLFDIKKVNKDNFPKNIDIFTYSFPC<u>A</u>DLSV
QGLQKGIDKELNTRSGLLWEIERILEEIKNSFSKEEMPKYLLMENVKNLLSHKNKKNYNTWLKQLEKFGY
KSKTYLLNSKNFDNCQNRERVFCLSIRDDYLEKTGFKFKELEKVKNPPKKIKDILVDSSNYKYLNLNKYE
TTTFRETKSNIISRPLKNYTTFNSENYVYNINGIGPTLTASGANSRIKIETQQGVRYLTPLECFKYMQFD
VNDFKKVQSTNLISENKMIYIAG<u>A</u>SIPVKILEAIFNTLEFVNNEELEHHHHHH

Aminosäuresequenz von M.MpeI K81A/Q136A/N374A:

MNSNKDKIKVIKVFEAFAGIGSQFKALKNIARSKNWEIQHSGMVEWFVDAIVSYVAIHSKNFNPKIERLD
RDILSISNDS<u>A</u>MPISEYGIKKINNTIKASYLNYAKKHFNNLFDIKKVNKDNFPKNIDIFTYSFPC<u>A</u>DLSV
QGLQKGIDKELNTRSGLLWEIERILEEIKNSFSKEEMPKYLLMENVKNLLSHKNKKNYNTWLKQLEKFGY

KSKTYLLNSKNFDNCQNRERVFCLSIRDDYLEKTGFKFKELEKVKNPPKKIKDILVDSSNYKYLNLNKYE
TTTFRETKSNIISRPLKNYTTFNSENYVYNINGIGPTLTASGANSRIKIETQQGVRYLTPLECFKYMQFD
VNDFKKVQSTNLISENKMIYIAGASIPVKILEAIFNTLEFVNNEELEHHHHHH

Aminosäuresequenz von M.MpeI Δ78-83/Q136A/N374A:

MNSNKDKIKVIKVFEAFAGIGSQFKALKNIARSKNWEIQHSGMVEWFVDAIVSYVAIHSKNFNPKIERLD
RDILSIS ISEYGIKKINNTIKASYLNYAKKHFNNLFDIKKVNKDNFPKNIDIFTYSFPCADLSVQGLQK
GIDKELNTRSGLLWEIERILEEIKNSFSKEEMPKYLLMENVKNLLSHKNKKNYNTWLKQLEKFGYKSKTY
LLNSKNFDNCQNRERVFCLSIRDDYLEKTGFKFKELEKVKNPPKKIKDILVDSSNYKYLNLNKYETTTFR
ETKSNIISRPLKNYTTFNSENYVYNINGIGPTLTASGANSRIKIETQQGVRYLTPLECFKYMQFDVNDFK
KVQSTNLISENKMIYIAGASIPVKILEAIFNTLEFVNNEELEHHHHHH