

Epigenetik

Deutsche Ausgabe: DOI: 10.1002/ange.201511520
Internationale Ausgabe: DOI: 10.1002/anie.201511520

Modifizierte Nukleotide für die Diskriminierung zwischen Cytosin und dem epigenetischen Marker 5-Methylcytosin

Janina von Watzdorf[†], Kim Leitner[†] und Andreas Marx^{*}

Abstract: 5-Methyl-2'-desoxycytosin, der häufigste epigenetische DNA-Marker in eukaryotischen Zellen, spielt eine Schlüsselrolle in der Genregulierung und beeinflusst somit zahlreiche zelluläre Prozesse, wie Entwicklung und Karzinogenese. Daher kann die Detektion von 5mC als wichtiger Biomarker in der Diagnostik fungieren. Wir beschreiben hier, dass modifizierte dGTP-Analoga, wie auch modifizierte Primer, in der Lage sind, die An- oder Abwesenheit einer einzigen Methylierung von C zu detektieren, obwohl diese Modifizierung nicht direkt mit der Watson-Crick-Basenpaarung interferiert. Durch das Testen vieler verschiedener Nukleotidgerüste haben wir festgestellt, dass O⁶-modifizierte 2'-Desoxyguanosinanaloga zwischen C und 5mC diskriminieren. Diese modifizierten Nukleotide können in der positionsspezifischen Detektion von 5mC, z. B. bei Echtzeit-PCR-Methoden, Anwendung finden.

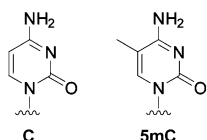


Abbildung 1. Chemische Struktur von C (links) und 5mC (rechts).

Epigenetische Modifikationen, die durch die Methylierung von Cytosinresten (5-Methyl-2'-desoxycytosin, 5mC; Abbildung 1) entstehen, beeinflussen eine Vielzahl zellulärer Prozesse und haben somit eine Auswirkung auf die Entwicklung^[1,2] und Genexpression^[3] sowie die Entstehung verschiedener Krankheiten.^[4] Es wurde häufig beobachtet, dass Gene abgeschaltet sind,^[3] wenn CpG-Dinukleotide

in den zugehörigen Promotoren erhöhte Niveaus an 5mC aufweisen; dementsprechend ist 5mC dafür bekannt, die Gentranskription zu regulieren und somit die Karzinogenese zu beeinflussen.^[5] Das Ausmaß der epigenetischen Methylierung muss im eukaryotischen Genom präzise reguliert sein, da Änderungen im Methylierungsmuster zu schwerwiegenden genetischen Fehlfunktionen führen können.^[6]

Die Detektion des Auftretens und der Verteilung von 5mC im Genom kann daher ein wichtiger Biomarker für die

Diagnostik und Therapie von Krankheiten sein.^[7] Dies erfordert effiziente Strategien für die Detektion von 5mC. Verschiedene Konzepte zur Diskriminierung zwischen Cytosin (C) und 5mC wurden bereits beschrieben und beruhen auf Endonukleaseverdau,^[8] Affinitätsanreicherung,^[9] Nanoporesequenzierung^[10] oder verschiedenen chemischen Eigenschaften bezüglich Redox-Reaktivität^[11] oder selektiver Desaminierung von C durch Natriumbisulfit.^[12]

Bisulfitsequenzierung wurde zur Routinemethode für die Detektion von 5mC mit Einzelnukleotidauflösung.^[13] Diese Methode beruht auf der selektiven, Bisulfit-vermittelten Desaminierung von C zu Uracil (U) in der Gegenwart von 5mC, das durch eine langsamere Desaminierung unbeeinflusst bleibt.^[14] Die Positionen der epigenetischen Marker können durch Vergleich der Ergebnisse konventioneller Sequenzierungsmethoden vor und nach Bisulfitbehandlung bestimmt werden, da C als Thymin (T) sequenziert wird, während 5mC als C gelesen wird.^[15]

Die Bisulfitsequenzierung kann zwar für die genomweite 5mC-Detektion verwendet werden, hat jedoch einige Nachteile. Da viele Schritte für die beiden Sequenzierläufe benötigt werden, ist die Methode zeitaufwändig und anfällig für Kontaminationen.^[16] Zusätzlich sind die Bedingungen während der Bisulfitbehandlung hart und zerstören ca. 95 % der genomischen DNA, weshalb große Mengen an DNA benötigt werden.^[17] Des Weiteren kann die Desaminierung von C zu 5mC nach der Bisulfitbehandlung unvollständig sein, was zu einem fehleranfälligen Ergebnis führt.^[18]

Nukleotide, die in der Lage sind, zwischen C und 5mC zu diskriminieren, wären hochinteressant für die Entwicklung neuer Ansätze zur positionsspezifischen Detektion von 5mC. Dies ist jedoch anspruchsvoll, da die Methylierung der C5-Position von Cytosin die Watson-Crick-Basenpaarung nicht direkt beeinflusst. Wir zeigen hier eine Klasse modifizierter Nukleotide, die in von DNA-Polymerasen katalysierten Reaktionen für die Diskriminierung zwischen C und 5mC genutzt werden können. Dafür haben wir verschiedene Purinbasierte 2'-Desoxynukleotide bezüglich ihrer Fähigkeit untersucht, 5mC mittels divergierender Effizienzen für einen Einbau gegenüber von C und 5mC durch verschiedene DNA-Polymerasen zu detektieren (Abbildung 2). Wir haben festgestellt, dass mehrere O⁶-modifizierte 2'-Desoxyguanosinderivate (Abbildung 3a) mit signifikant unterschiedlicher Effizienz gegenüber von 5mC eingebaut oder ausgehend von 5mC verlängert wurden als im Fall von unmethyliertem Cytosin.

Es wurden eine Vielzahl verschieden modifizierter Nukleotide (Abbildung 2) in Kombination mit den thermostabilen DNA-Polymerasen *KlenTaq* und *KOD* exo^{−[19]} in Primerverlängerungsexperimenten untersucht, gefolgt von einer

[*] J. von Watzdorf,^[‡] K. Leitner,^[‡] Prof. Dr. A. Marx
Fachbereich Chemie, Graduiertenschule Chemische Biologie Konstanz, Universität Konstanz
Universitätsstraße 10, 78457 Konstanz (Deutschland)
E-Mail: andreas.marx@uni-konstanz.de

[†] Diese Autoren haben gleichermaßen zu der Arbeit beigetragen.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201511520> zu finden.

© 2016 Die Autoren. Veröffentlicht von Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Dieser Open Access Beitrag steht unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution License, die jede Nutzung des Beitrages in allen Medien gestattet, sofern der ursprüngliche Beitrag ordnungsgemäß zitiert wird.

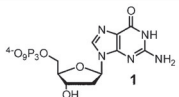
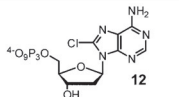
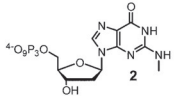
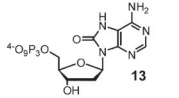
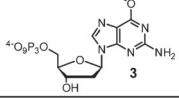
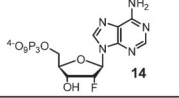
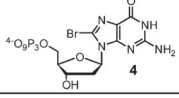
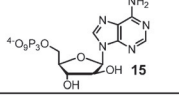
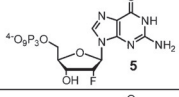
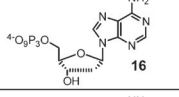
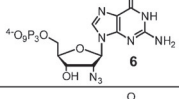
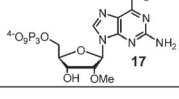
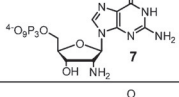
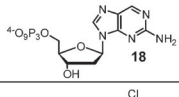
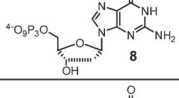
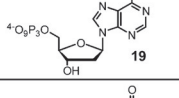
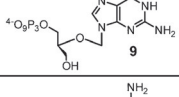
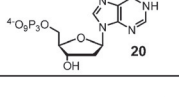
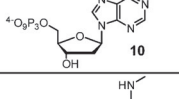
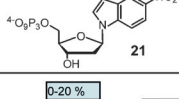
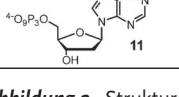
	83 % C 65 % 5mC 1.28		1 % C 1 % 5mC 1.00
	32 % C 23 % 5mC 1.39		0 % C 0 % 5mC -
	25 % C 15 % 5mC 1.67		0 % C 0 % 5mC -
	6 % C 5 % 5mC 1.20		0 % C 0 % 5mC -
	13 % C 12 % 5mC 1.08		0 % C 0 % 5mC -
	22 % C 15 % 5mC 1.47		0 % C 0 % 5mC -
	0 % C 0 % 5mC -		17 % C 11 % 5mC 1.55
	0 % C 0 % 5mC -		6 % C 5 % 5mC 1.20
	30 % C 25 % 5mC 1.14		39 % C 37 % 5mC 1.05
	10 % C 5 % 5mC 2.0		17 % C 9 % 5mC 1.89
	3 % C 2 % 5mC 1.50		

Abbildung 2. Strukturen der modifizierten dNTP-Analoga, einschließlich des prozentualen Einbaus gegenüber von C oder 5mC durch *KODexo*⁻ im Einzelnukleotideinbau durch Primerverlängerung. 50 μ M dGTP oder dN*TP und 5 nM *KODexo*⁻ wurden eingesetzt; die Reaktionen wurden nach 20 min gestoppt. Diskriminierungsverhältnisse wurden durch die Berechnung des Quotienten aus prozentualem Einbau gegenüber von C und prozentualem Einbau gegenüber von 5mC bestimmt.

Analyse durch denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) und Visualisierung durch Autoradiographie. Beide DNA-Polymerasen waren in der Lage, verschieden modifizierte Nukleotide gegenüber von beiden Templaten, die C oder 5mC enthielten, einzubauen, auch wenn die Einbaueffizienzen niedriger waren als bei unmodifiziertem dGTP (**1**; Abbildung 2). *KODexo*⁻ zeigte das höchste Potenzial für die gewünschte Anwendung, weil hier besonders große Unterschiede in den Einbaueffizienzen während des Prozessierens der Nukleotide *O*⁶-Methyl-dGTP (**3**), dATP (**10**) und 5-Nitro-1-indolyl-2'-desoxyribose-5'-triphosphat (**21**) beobachtet werden konnten. Da die modifizierten dATP-

Analoga (Nukleotide **11–16**) verminderte Einbaueffizienzen wie auch verminderte Diskriminierungen zwischen beiden Templaten zeigten und die Synthese von Derivaten des Nukleotids **21** langwierig und aufwendig zu sein scheint, haben wir uns dazu entschieden, uns für die weitere Derivatisierung auf *O*⁶-Methyl-dGTP (**3**) zu fokussieren. Die DNA-Polymerase *KlenTaq* zeigte keinen signifikanten Unterschied in den Einbaueffizienzen, weder für dGTP noch für die modifizierten Nukleotide (Abbildung S1 der Hintergrundinformationen).

Anschließend wollten wir das System durch die Synthese und funktionelle Evaluierung der *O*⁶-alkylierten dGTPs optimieren. Die *O*⁶-alkylierten dGTP-Derivate wurden ausgehend von kommerziell erhältlichem 2'-Desoxyguanosin synthetisiert, das nach bekannten Vorschriften acetyliert und darauffolgend in 6-Position chloriert wurde (Abbildung S2).^[20] Die verschiedenen Alkoxygruppen wurden durch die Reaktion von **22** mit den jeweiligen Natriumalkoholaten in Position 6 eingeführt. Die somit erhaltenen Nukleoside **23a–c** wurden in die entsprechenden dNTPs überführt (Abbildung S2).^[21,22]

Im Anschluss wurde das Potenzial von *O*⁶-Methyl-, *O*⁶-Ethyl-, *O*⁶-Propyl- und *O*⁶-Isopropyl-dGTP in Bezug auf divergierende Effizienzen für den Einbau gegenüber von C und 5mC untersucht. Beide DNA-Polymerasen waren in der Lage, alle vier Nukleotidanaloga gegenüber von C und 5mC einzubauen, auch wenn die Einbaueffizienz mit steigendem sterischem Anspruch der eingeführten Modifikationen abnahm (Abbildungen 3b und S4). *KODexo*⁻ zeigte dabei das höchste Potenzial für die gewünschte Anwendung, da hier besonders große Unterschiede in den Effizienzen für den Einbau gegenüber von C im Vergleich zu 5mC während der Prozessierung der Nukleotide dGTP, *O*⁶-Methyl-, *O*⁶-Ethyl-,

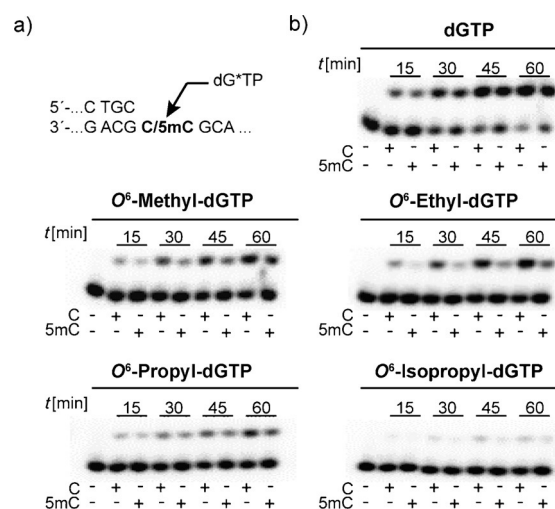


Abbildung 3. a) Verwendete partielle Primer/Template-Sequenz. b) PAGE-Analyse der Einzelnukleotideinbau-Primerverlängerungs-Experimente von dGTP, *O*⁶-Methyl-, *O*⁶-Ethyl-, *O*⁶-Propyl- und *O*⁶-Isopropyl-dGTP, die gegenüber von einem Template prozessiert wurden, das C enthält, im Vergleich zu einem Template, das 5mC enthält (unter Verwendung von *KODexo*⁻). 50 μ M dGTP oder dG*TP und 5 nM *KODexo*⁻ wurden eingesetzt; Reaktionen wurden nach angegebenen Zeitpunkten gestoppt.

*O*⁶-Propyl- und *O*⁶-Isopropyl-dGTP beobachtet werden konnten (Abbildung 3b). Auch wenn die Einbaueffizienzen dieser modifizierten Nukleotide geringer waren als die von natürlichem dGTP, konnte doch eine deutlich erhöhte Diskriminierung zwischen beiden Templaten beobachtet werden (Abbildung 3b). Wie zuvor schon berichtet, wird *O*⁶-Methyl-dGTP ebenfalls gegenüber von T prozessiert,^[23] was wir nun auch für die anderen *O*⁶-Alkyl-dGTP-Derivate zeigen konnten (Abbildung S5). Im Unterschied dazu zeigte die DNA-Polymerase *KlenTaq* erneut keine bemerkenswerten Unterschiede in den Einbaueffizienzen, weder für dGTP noch für die modifizierten Nukleotide (Abbildung S4).

Um diese Beobachtungen weiter zu prüfen, haben wir kinetische Untersuchungen^[24] für die Prozessierung von dGTP, *O*⁶-Methyl-, *O*⁶-Ethyl-, *O*⁶-Propyl- und *O*⁶-Isopropyl-dGTP gegenüber von C und 5mC durchgeführt (Tabelle 1 und S2, Abbildung S7). Der Vergleich der katalytischen Effizienzen ($k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$), die für die Umsetzung von dGTP und der modifizierten Nukleotide gegenüber C oder 5mC im Templatstrang bestimmt wurden, bestätigt alle Tendenzen, die in den qualitativen Primerverlängerungsreaktionen beobachtet wurden. Die Einbaueffizienzen der modifizierten Nukleotide nahmen mit steigender sterischer Hinderung der Modifikationen ab (Tabellen 1 und S2). Das Verhältnis der katalytischen Effizienz, die während des Einbaus des entsprechenden Nukleotids gegenüber von C im Vergleich zu 5mC beobachtet wurde, variierte. Die beste Diskriminierung konnte für die Umsetzung von *O*⁶-Ethyl-dGTP beobachtet werden, da sich die katalytischen Effizienzen $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ für den Einbau gegenüber C und 5mC um den Faktor 4.2 unterschieden (Tabellen 1 und S2).

Daraufhin untersuchten wir den Effekt der geschilderten Modifikationen, wenn sie am 3'-Terminus des Primerstranges eingebaut und direkt gegenüber von C oder 5mC positioniert wurden.^[25] Hierfür wurden die modifizierten Nukleoside in

Phosphoramidite überführt, die in einer DNA-Festphasensynthese der modifizierten Primerstränge eingesetzt wurden (Abbildung S3). Da die Methyl- und Ethylmodifikationen in *O*⁶-Methyl-dGTP und *O*⁶-Ethyl-dGTP die vielversprechendsten Ergebnisse lieferten, konzentrierten wir uns auf diese Modifikationen (Abbildung 3, Tabelle S1).

Nach ihrer Synthese wurden mit den Primersträngen Primerverlängerungsstudien durchgeführt (Abbildung 4b). Wiederum wurden beide Modifikationen von beiden getesteten DNA-Polymerasen akzeptiert, da alle drei Primer verlängert wurden, auch wenn dies für die modifizierten Primer in einem geringeren Ausmaß zutraf als für den unmodifizierten (Abbildungen 4b und S6). Interessanterweise wurde

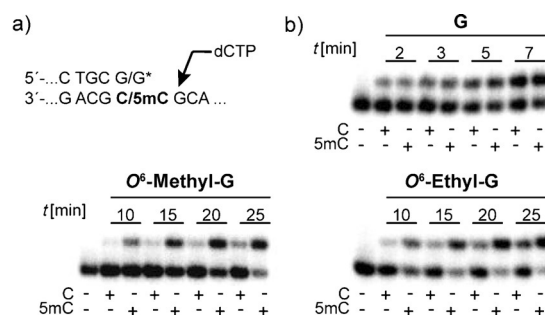


Abbildung 4. a) Sequenzkontext des verwendeten Primer/Templat-Komplexes. b) PAGE-Analyse der Einzelnukleotideinbau-Primerverlängerungs-Experimente für den Einbau nach einem Basenpaar aus C oder 5mC und dem am 3'-Terminus unmodifizierten G- oder den modifizierten *O*⁶-Methyl-G- und *O*⁶-Ethyl-G-Primern (unter Verwendung von *KlenTaq*). 50 μM dCTP und 0.1 nM *KlenTaq* wurden für G verwendet, 10 nM *KlenTaq* wurden für *O*⁶-Methyl-G und *O*⁶-Ethyl-G eingesetzt; Reaktionen wurden nach angegebenen Zeitpunkten gestoppt.

Tabelle 1: Kinetische Analyse der Einzelnukleotideinbau-Primerverlängerung gegenüber von C oder 5mC durch *KODexo*⁻.^[a]

(3'-)Nukleotid	Templat	$K_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ [s ⁻¹ μM^{-1}]	Verhältnis
dGTP	C	1.5 \pm 0.1	1.36
	5mC	1.1 \pm 0.6	
<i>O</i> ⁶ -Methyl-dGTP	C	0.16 \pm 0.02	2.58
	5mC	0.062 \pm 0.010	
<i>O</i> ⁶ -Ethyl-dGTP	C	0.14 \pm 0.02	4.24
	5mC	0.033 \pm 0.007	
<i>O</i> ⁶ -Propyl-dGTP	C	0.105 \pm 0.015	1.08
	5mC	0.097 \pm 0.011	
<i>O</i> ⁶ -Isopropyl-dGTP	C	0.031 \pm 0.005	1.48
	5mC	0.021 \pm 0.004	
G	C	8.7 \pm 1.3	3.48
	5mC	30.3 \pm 3.4	
<i>O</i> ⁶ -Methyl-G	C	0.0043 \pm 0.0008	6.72
	5mC	0.0289 \pm 0.0079	
<i>O</i> ⁶ -Ethyl-G	C	0.0066 \pm 0.0002	3.53
	5mC	0.0233 \pm 0.0080	

[a] Das Verhältnis wurde aus dem Quotienten aus $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ (C) und $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ (5 mC) (Nucleotideinbau) oder dem Quotienten aus $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ (5 mC) und $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ (C) (Verlängerung des modifizierten Primers) berechnet.

bei der Verwendung der *KODexo*⁻ keine signifikante Diskriminierung zwischen C und 5mC gefunden, weder für den unmodifizierten Primer noch für die modifizierten (Abbildung S6). Dagegen zeigte die DNA-Polymerase *KlenTaq* für beide modifizierten Primer eine bemerkenswerte Diskriminierung (Abbildung 4b). Die Verlängerung des unmodifizierten Primers durch Umsetzung von dCTP unterschied sich nur marginal in der Einbaueffizienz zwischen der Verlängerung ausgehend von C und derjenigen ausgehend von 5mC. Im Unterschied dazu zeigte die Verlängerung der modifizierten Primer, die entweder *O*⁶-Methyl-G oder *O*⁶-Ethyl-G am 3'-Ende enthielten, eine starke Diskriminierung zwischen beiden Templaten (Abbildung 4b).

Interessanterweise erwies sich die Verlängerung der modifizierten Primer als effizienter, wenn sie mit 5mC gepaart waren. Zur Bestätigung dieser Befunde wurden kinetische Untersuchungen^[24] mit *KlenTaq* in Verbindung mit dem unmodifizierten sowie den beiden modifizierten Primern, deren 3'-Enden jeweils gegenüber von C oder 5mC paaren, durchgeführt (Tabelle S3 und Abbildung S8). Diese Experimente bestätigen, dass beide modifizierten Primer mit einer geringeren Effizienz verlängert wurden als der unmodifizierte Primer und dass die Verlängerung der Primer ausgehend von 5mC effizienter verläuft. Dabei führt der Primer, der die Modifikation *O*⁶-Methyl-G am 3'-Terminus trägt, zur besten

Diskriminierung zwischen C und 5mC (Tabellen 1 und S3). Die katalytischen Effizienzen (k_{cat}/K_M) für beide Reaktionen unterschieden sich um den Faktor 6.7 (Tabelle 1).

Das unterschiedliche Verhalten der DNA-Polymerasen *KlenTaq* und *KOD exo⁻* bei der Umsetzung der modifizierten Nukleotide im Kontext mit C und 5mC ist erstaunlich. Strukturdaten beider Enzyme, die an einen Primer und ein Templat gebunden sind, zeigen signifikant unterschiedliche Interaktionsmuster des jeweiligen Proteins mit seinem Substrat.^[26] Dieser Unterschied könnte der Ursprung der beobachteten Effekte sein.

Als nächstes untersuchten wir, ob diese Entdeckungen in Polymerasekettenreaktions(PCR)-Experimenten anwendbar sind. Hierfür setzten wir die DNA-Polymerase *KlenTaq* und einen Primer ein, der am 3'-Terminus modifiziert ist und ein Basenpaar mit einem methylierten oder unmethylierten Cytosin in menschlicher genomischer DNA (gDNA) bildet (Abbildung 5). Dafür entwarfen wir einen Vorwärtsprimer,

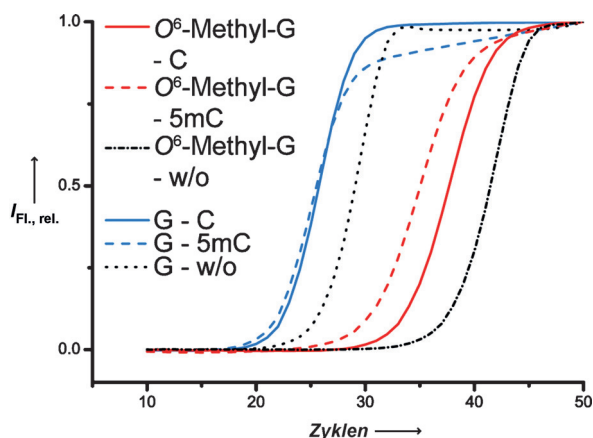


Abbildung 5. Echtzeit-PCR unter Verwendung des unmodifizierten (blau) und des am 3'-Terminus modifizierten Primers (rot) von C (durchgehende Linien) und 5mC (gestrichelte Linien) in menschlicher HeLa-gDNA, katalysiert durch die *KlenTaq*-DNA-Polymerase. PCR-Kurven repräsentieren mehrfache Experimente.

der zu einem 155-bp-PCR-Produkt führen sollte, und untersuchten eine bestimmte CpG-Position in der Promotorregion von NANOG in gDNA.^[1,27] Wir nutzten gereinigte gDNA von HeLa-Zellen, da gezeigt wurde, dass diese Position unmethyliert vorliegt.^[27b] Ebenso wurde eine enzymatisch vollständig methylierte HeLa-gDNA als Kontrolle verwendet. Wir konnten in Echtzeit-PCR-Experimenten demonstrieren, dass die Diskriminierung zwischen unmethyliertem und methyliertem Cytosin in gDNA durch die Verwendung des am 3'-Terminus mit *O*⁶-Methyl-G modifizierten Primers im Vergleich zu seinem unmodifizierten Gegenstück verbessert wird (Abbildung 5). Die Verwendung der HeLa-gDNA führt zu einer verzögerten Amplifikation von 2.95 ± 0.80 (Mittelwert \pm Standardabweichung, $n = 5$) Zyklen im Vergleich zur vollständig methylierten gDNA, wenn sie mit dem am 3'-Terminus modifizierten Primer gepaart ist. Dagegen führt der Einsatz des unmodifizierten Primers zu einer verzögerten Amplifikation von 0.80 ± 0.23 (Mittelwert \pm Standardabweichung, $n = 5$) Zyklen im Fall der unmodifizierten HeLa-gDNA (Abbildung 5).

Fazit: Wir haben festgestellt, dass *O*⁶-modifizierte 2'-Desoxyguanosinanaloga die An- oder Abwesenheit einer einzelnen Methylierung eines Cytosinrestes im Templatstrang detektieren können, auch wenn diese Modifikation nicht direkt mit der Watson-Crick-Basenpaarung interferiert. Bemerkenswerterweise wurden gegensätzliche Trends beobachtet, wenn der Einbau oder die Verlängerung der modifizierten Nukleotide untersucht wurde: Im ersten Fall diskriminiert die DNA-Polymerase *KOD exo⁻* am besten zwischen C und 5mC durch effizienteren Einbau gegenüber von C; im zweiten Fall zeigt die DNA-Polymerase *KlenTaq* Diskriminierung zwischen beiden Cytosinen durch effizientere Verlängerung ausgehend von 5mC.

Des Weiteren waren wir in der Lage, unsere Entdeckungen auf ein Echtzeit-PCR-System für die Analyse des Methylierungszustandes eines einzelnen C-Restes in menschlicher gDNA zu übertragen. Unsere Ergebnisse belegen das Potenzial, modifizierte Nukleotide für die Anwendung bei der positionsspezifischen 5mC-Detektion durch Echtzeit-PCR zu nutzen, die zum Erzielen eines höheren Durchsatzes parallelisiert werden kann, ohne dass dabei eine Bisulfitbehandlung nötig ist. Zukünftige Untersuchungen werden auf die Entwicklung von DNA-Polymerasen in Kombination mit modifizierten Nukleotiden abzielen, um höhere Selektivitäten zu erreichen und den zugrunde liegenden Mechanismus besser zu beleuchten.

Danksagung

Wir danken dem Europäischen Forschungsrat (Advanced Grant 339834). Ebenso danken wir der Graduiertenschule Chemische Biologie Konstanz für die Unterstützung.

Stichwörter: 5-Methylcytosin · DNA-Methylierung · DNA-Polymerase · Epigenetik · Polymerasekettenreaktion

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 3229–3232
Angew. Chem. **2016**, 128, 3284–3288

- [1] J. Yu, M. A. Vodyanik, K. Smuga-Otto, J. Antosiewicz-Bourget, J. L. Frane, S. Tian, J. Nie, G. A. Jonsdottir, V. Ruotti, R. Stewart, I. I. Slukvin, J. A. Thomson, *Science* **2007**, 318, 1917–1920.
- [2] E. Li, T. H. Bestor, R. Jaenisch, *Cell* **1992**, 69, 915–926.
- [3] P. A. Jones, D. Takai, *Science* **2001**, 293, 1068–1070.
- [4] J. A. Law, S. E. Jacobsen, *Nat. Rev. Genet.* **2010**, 11, 204–220.
- [5] a) M. R. Estecio, J. Gallegos, C. Vallot, R. J. Castoro, W. Chung, S. Maegawa, Y. Oki, Y. Kondo, J. Jelinek, L. Shen, H. Hartung, P. D. Aplan, B. A. Czerniak, S. Liang, J. P. Issa, *Genome Res.* **2010**, 20, 1369–1382; b) P. A. Jones, S. B. Baylin, *Nat. Rev. Genet.* **2002**, 3, 415–428.
- [6] J. P. Thomson, P. J. Skene, J. Selfridge, T. Clouaire, J. Guy, S. Webb, A. R. Kerr, A. Deaton, R. Andrews, K. D. James, D. J. Turner, R. Illingworth, A. Bird, *Nature* **2010**, 464, 1082–1086.
- [7] a) M. Rodríguez-Paredes, M. Esteller, *Nat. Med.* **2011**, 17, 330–339; b) H. Heyn, M. Esteller, *Nat. Rev. Genet.* **2012**, 13, 679–692; c) P. W. Laird, *Nat. Rev. Cancer* **2003**, 3, 253–266.
- [8] J. Kaput, T. W. Sneider, *Nucleic Acids Res.* **1979**, 7, 2303–2322.

- [9] S. H. Cross, J. A. Charlton, X. Nan, A. P. Bird, *Nat. Genet.* **1994**, 6, 236–244.
- [10] W. W. Li, L. Gong, H. Bayley, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 4350–4355; *Angew. Chem.* **2013**, 125, 4446–4451.
- [11] a) T. Wang, T. Hong, T. Tang, Q. Zhai, X. Xing, W. Mao, X. Zheng, L. Xu, J. Wu, X. Weng, S. Wang, T. Tian, B. Yuan, B. Huang, L. Zhuang, X. Zhou, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 1240–1243; b) S. Bareyt, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 181–184; *Angew. Chem.* **2008**, 120, 187–190.
- [12] 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.
- [13] H. Hayatsu, Y. Wataya, K. Kazushige, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, 92, 724–726.
- [14] R. Shapiro, S. C. Agarwal, *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, 90, 474–478.
- [15] B. Akhtar-Zaidi, R. Cowper-Sal-lari, O. Corradin, A. Saiakhova, C. F. Bartels, D. Balasubramanian, L. Myeroff, J. Lutterbaugh, A. Jarrar, M. F. Kalady, J. Willis, J. H. Moore, P. J. Tesar, T. Laframboise, S. Markowitz, M. Lupien, P. C. Scacheri, *Science* **2012**, 336, 736–739.
- [16] a) S. J. Clark, A. Statham, C. Stirzaker, P. L. Molloy, M. Frommer, *Nat. Protoc.* **2006**, 1, 2353–2364; b) K. R. Pomraning, K. M. Smith, M. Freitag, *Methods* **2009**, 47, 142–150.
- [17] C. Grunau, S. J. Clark, A. Rosenthal, *Nucleic Acids Res.* **2001**, 29, e65–65.
- [18] a) D. P. Genereux, W. C. Johnson, A. F. Burden, R. Stoger, C. D. Laird, *Nucleic Acids Res.* **2008**, 36, e150; b) J. Harrison, C. Stirzaker, S. J. Clark, *Anal. Biochem.* **1998**, 264, 129–132.
- [19] J. Ito, D. K. Braithwaite, *Nucleic Acids Res.* **1991**, 19, 4045–4057.
- [20] V. Nair, F. Zhang, X. Ma, E. Bonsu, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2009**, 28, 408–423.
- [21] M. Yoshikawa, T. Kato, T. Takenish, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1969**, 42, 3505.
- [22] T. Kovács, L. Ötvös, *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 4525–4528.
- [23] a) J. S. Eadie, M. Conrad, D. Toorchien, M. D. Topal, *Nature* **1984**, 308, 201–203; b) L. A. Dodson, R. S. Foote, S. Mitra, W. E. Masker, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1982**, 79, 7440–7444.
- [24] a) J. Petruska, M. F. Goodman, M. S. Boosalis, L. C. Sowers, C. Cheong, I. Tinoco, Jr., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, 85, 6252–6256; b) M. S. Boosalis, J. Petruska, M. F. Goodman, *J. Biol. Chem.* **1987**, 262, 14689–14696; c) S. Creighton, M. M. Huang, H. Cai, N. Arnheim, M. F. Goodman, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 2633–2639.
- [25] J. Aschenbrenner, M. Drum, H. Topal, M. Wieland, A. Marx, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53, 8154–8158; *Angew. Chem.* **2014**, 126, 8293–8297.
- [26] K. Bergen, K. Betz, W. Welte, K. Diederichs, A. Marx, *Chem-BioChem* **2013**, 14, 1058–1062.
- [27] a) Y. Tay, J. Zhang, A. M. Thomson, B. Lim, I. Rigoutsos, *Nature* **2008**, 455, 1124–1128; b) X. Q. Wang, R. K. Ng, X. Ming, W. Zhang, L. Chen, A. C. Chu, R. Pang, C. M. Lo, S. W. Tsao, X. Liu, R. T. Poon, S. T. Fan, *PLoS One* **2013**, 8, e72435.

Eingegangen am 11. Dezember 2015

Online veröffentlicht am 2. Februar 2016