



5-Formylcytosin ist vermutlich eine semipermanente Base an definierten Genompositionen

Meng Su, Angie Kirchner, Samuele Stazzoni, Markus Müller, Mirko Wagner, Arne Schröder und Thomas Carell*

Abstract: Die epigenetische Base 5-Formyl-2'-desoxycytosin (fdC) wurde kürzlich im Genom von Stammzellen entdeckt. Ihre Funktion ist bisher jedoch unbekannt. Daten aus Genomsequenzierungen zeigen eine Anreicherung in CpG-Inseln von Promotoren, weshalb eine Beteiligung an der Regulation der Transkription während der zellulären Differenzierung angenommen wird. Auch ist fdC dafür bekannt, von dem Enzym Thymin-DNA-Glykosylase (Tdg) erkannt und ausgeschnitten zu werden. Folglich wird angenommen, dass fdC als Intermediat während der aktiven Demethylierung auftritt. Um die Funktion von fdC zu verstehen, ist es von großer Bedeutung, seine Bildung und Entfernung an definierten genomischen Positionen analysieren zu können. Im Folgenden beschreiben wir eine neue derartige Methode, die sequenzspezifische chemische Derivatisierung von fdC mit Droplet Digital PCR kombiniert. Erste Ergebnisse zeigen, dass das Reparaturprotein Tdg nur 50 % der fdCs an einer bestimmten Position im Genom entfernt, was auf semipermanente Eigenschaften dieser Base hinweist.

Die DNA beinhaltet, neben der Sequenzinformation, eine epigenetische Informationsebene, die steuert, wie aktiv das kontrollierte Gen transkribiert wird.^[1] Neben den vier kanonischen Basen sind bisher vier weitere epigenetische Basen bekannt.^[2] Diese sind 5-Methylcytosin (5mdC), 5-Hydroxymethylcytosin (5hmC),^[3] 5-Formylcytosin (5fdC)^[4] und 5-Carboxycytosin (5cadC)^[5] (Abbildung 1a). In den vergangenen Jahren trugen empfindliche massenspektrometrische Methoden dazu bei, die globalen Werte der epigenetischen Basen in Stammzellen^[4,6] sowie in Geweben, einschließlich des Gehirns, zu bestimmen.^[7] Um mehr über den Gehalt und die Verteilung der epigenetischen Basen an definierten Genompositionen zu lernen, wurden verschiedene Sequenziermethoden entwickelt,^[8] wobei selektive chemische Umsetzungen der Basen unternommen wurden,^[9] manchmal in Kombination mit Bisulfitsequenzierung.^[9c,10] So konnten Informationen über die Verteilung der Basen zu einem bestimmten Zeitpunkt erhalten werden. Es ist jedoch ein Merkmal epigenetischer Information, sich kontinuierlich zu

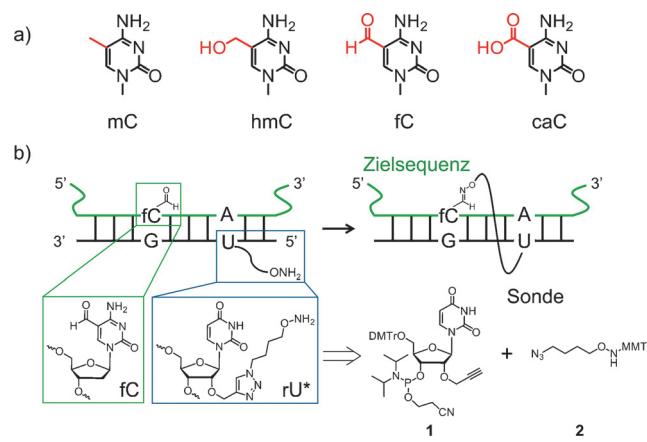


Abbildung 1. a) Strukturen der epigenetischen Cytosin-Modifikationen; b) Darstellung der fdC-Detektionsstrategie und genutzte Bausteine, einschließlich der Assemblierung des rU*-Sondenmoleküls unter Verwendung von Klick-Chemie.

ändern. Um einen tieferen Einblick in die Dynamik dieser epigenetischen Information an einer definierten genomischen Position zu erhalten, müssen Methoden entwickelt werden, die diese Veränderungen verfolgbar machen, beispielsweise um die zeitliche Änderung von fdC an einer bestimmten Stelle im Genom detektieren zu können.^[11] Eine ideale Methode würde es letztendlich ermöglichen, die fdC-Dynamik an unterschiedlichen genomischen Positionen simultan zu verfolgen. Als zentrale Frage stellt sich hierbei: Sind die bereits gemessenen globalen Werte Mittelwerte verschiedener Prozesse an unterschiedlicher Positionen, oder reflektieren sie, was an einer individuellen Stelle passiert? Um diese Frage beantworten zu können, haben wir eine sequenzspezifische chemische Derivatisierungsmethode entwickelt. In Kombination mit „Droplet Digital PCR“ (ddPCR), ermöglicht unsere Methode eine direkte Verfolgung der epigenetischen Base fdC an spezifischen Positionen im Genom von Stammzellen.

Zur sequenzspezifischen Lokalisierung von fdC im Genom nutzen wir ein kleines Sondenoligonukleotid (Abbildung 1b, Tabelle S1), das einen Hydroxylamin-Anker enthält, der eine kovalente Bindung mit fdC eingehen kann, sodass der Sondenstrang sofort fest mit dem Zielstrang verbunden ist.^[4] Wir untersuchten systematisch verschiedene Linkerlängen, Ankerpunkte und Abstände. Die besten Ergebnisse erzielten wir mit einem Sondenoligonukleotid, in das wir ein 2'-O-Propargyluridin (Phosphoramidit **1**) einfügten und das Azido-C4-hydroxylamin **2** mittels Cu¹-katalysierter

[*] M. Sc. M. Su, M. Sc. A. Kirchner, M. Sc. S. Stazzoni, Dr. M. Müller, Dr. M. Wagner, M. Sc. A. Schröder, Prof. Dr. T. Carell
Center for Integrated Protein Science at the Department of Chemistry, Ludwig-Maximilians-Universität München
Butenandtstraße 5–13, 81377 München (Deutschland)
E-Mail: thomas.carell@lmu.de
Homepage: <http://www.carellgroup.de>

Hintergrundinformationen und die Identifikationsnummer (ORCID)
 einiger Autoren sind unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201605994> zu finden.

Huisgen-Reaktion (Klick-Reaktion) einbrachten.^[12] Wir schützten den Hydroxylamin-Baustein für die Klick-Reaktion mit einer Monomethoxytrityl-Gruppe (MMTr), die im Anschluss mit Essigsäure bei Raumtemperatur entfernt wurde. Diese kurze Säurebehandlung des Sondenoligonukleotids verursachte keine merkliche Depurinierung.

Nach Festphasensynthese, Klick-Modifizierung und einem finalen Aufreinigungsschritt erhielten wir Oligonukleotide mit unterschiedlichen Sequenzen und Längen, die eine rU-Hydroxylaminbase (rU*) an verschiedenen Positionen zur Reaktion mit der fdC-Base im Zielstrang enthielten. Für nachfolgende Experimente wurden 13 nt lange Oligonukleotide angefertigt. Um festzustellen, an welcher Position der Linker am Besten mit dem fdC des Zielstranges reagiert, variierten wir die Position von rU* relativ zu fdC und untersuchten verschiedene Reaktionsbedingungen. Ausgezeichnete Ergebnisse wurden erreicht, als wir die Sonde **P1**, die rU*, exakt vier Basenpaare in 5'-Richtung relativ zu fdC enthielt, mit dem fdC-Zielstrang in Gegenwart katalytischer Mengen an 4-Methoxyanilin (Abbildung 2a) hybridisierten. Mit

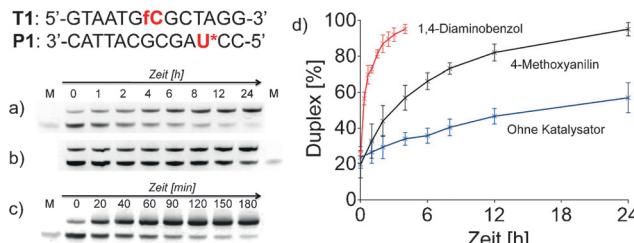


Abbildung 2. Denaturierendes PAGE-Gel zeigt die Duplexbildung zwischen **T1** und **P1** bei 25 °C: a) mit Katalysator 4-Methoxyanilin; b) ohne Katalysator; c) mit Katalysator 1,4-Diaminobenzol; d) Quantifizierung der DNA-Duplex-Bildung während der Reaktion. Schwarz: Katalysator 4-Methoxyanilin, blau: ohne Katalysator, Rot: Katalysator 1,4-Diaminobenzol. Die Fehlerbalken repräsentieren die mittlere Standardabweichung, berechnet aus dem Mittelwert dreier Replikate. Bedingungen: 2 μM Oligonukleotide, 100 mM NaCl, 10 mM NaOAc-Puffer pH 6.0, 10 mM 4-Methoxyanilin. M = Einzelstrangmarker. Der Zeitpunkt 0 befindet sich nach dem „Re-annealing“.

diesem Katalysator fand die Verknüpfungsreaktion bereits nach 24 h mit einer Ausbeute von über 95% statt. Ohne Katalysator konnte nur eine Ausbeute von 50% erhalten werden (Abbildung 2b).

Um die Reaktionsgeschwindigkeit zu steigern, wurden weitere Katalysatoren getestet. Die besten Ergebnisse lieferte hierbei 1,4-Diaminobenzol, wodurch die Verknüpfung von **T1** und **P1** bereits nach 3 h erfolgte (Abbildung 2c). Die Bildung des Doppelstranges (**T1:P1**) wurde mittels eines denaturierenden PAGE-Gels analysiert und über Fluoreszenzmessung quantifiziert (Abbildung 2d).

Wird fdC eine Base weiter entfernt von rU* eingebaut, ohne die Sonde zu verändern, ist die Reaktion verlangsamt (Abbildung S2). Die Ergebnisse zeigen, dass rU*, vier oder fünf Basen in 5'-Richtung zu fdC entfernt platziert, dem Anker ermöglicht, die Formylgruppe von fdC über die große Furche des Doppelstranges zu erreichen (Abbildung S3).

MALDI-TOF Daten bestätigten, dass sich die Verknüpfung wie erwartet bildete (Abbildung S4). Im Falle des ver-

knüpften Doppelstranges **T1:P1** erhielten wir die korrekte Molekülmasse mit m/z gefunden 8081.9 (m/z berechnet 8084.7). Wie erwartet, führte die Oxim-Bildungsreaktion zwischen **T1** und **P1** zu einer erhöhten Schmelztemperatur des hybridisierten und verknüpften Doppelstranges (Abbildung S5). Der nicht verknüpfte 13-mer-Doppelstrang schmolz typischerweise bei etwa 44 °C. Nach Bildung der Verknüpfung zeigte der Doppelstrang dagegen eine Schmelztemperatur von über 80 °C.

Da Pyrimidine mit Nukleophilen an der C6-Position in einer Michael-Reaktion reagieren können, die als Basis der Bisulfit-Sequenzierung dient, testeten wir als nächstes, ob die Reaktion mit rU* auch mit anderen Pyrimidinen möglich ist (Abbildung 3). Dabei ergab eine Hybridisierung der rU*-

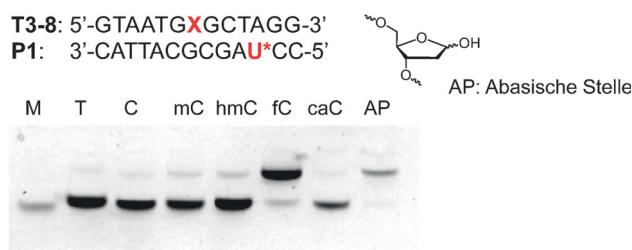


Abbildung 3. Denaturierendes PAGE Gel zeigt die Duplexbildung der Stränge **T3-8** mit **P1** bei 25 °C nach 24 h.

Sonde mit einem dT bzw. dC, mdC, hmdC und cadC (**T3-8**) enthaltenden Zielstrang keine Reaktion. Eine Reaktion wurde jedoch mit einer abasischen Stelle festgestellt. Dies ist von Bedeutung, da fdC und cadC Substrate der Basenexzisionsreparatur sind und daher im Prinzip Vorläufer von abasischen Stellen sein könnten.^[13] In diesem Sinne zeigt rU* immer die Präsenz von fdC und potenziell auch von abasischen Stellen aus fdC und cadC an. Anschließend wandelten wir die Möglichkeit, fdC zu detektieren, in eine Methode um, einzelne fdC-Basen an einer bestimmten Position in ganzen Genomen zu detektieren. Zu diesem Zweck verknüpften wir Chemie mit Amplifikation durch ddPCR^[14] und Datenanalyse.

Zunächst wurde genomische DNA (**Tg**) aus murinen embryonalen Stammzellen (mESCs) zu verschiedenen Zeitpunkten während des so genannten „Primings“ aus naiven Stammzellen isoliert. Außerdem isolierten wir genomische DNA aus mESCs mit und ohne Reparaturenzym Tdg (Tdg^{-/-}), um so die Entfernung und Reparatur von fdC und cadC zu verhindern. Weiterhin isolierten wir genomische DNA aus Stammzellen ohne die drei DNA-Methyltransferasen (Dnmt1, 3a und 3b). In diesen Zellen entsteht kein mdC, weshalb sie nicht fähig sind, auch die weiter oxidierten epigenetischen Basen xdc (x = hm, f und ca) herzustellen. Genomische DNA hieraus fungiert in unseren Experimenten als Negativkontrolle. Analysiert wurden zwei verschiedene bereits bekannte fdC-Positionen, an denen ein unterschiedlich hoher fdC-Gehalt beschrieben wurde.^[10c]

Zunächst fokussierten wir uns auf die 30020539ste-Position des Chromosoms 16 *Mus musculus* (MM9) im Exon 3 von 632428C04Rik. RedBS-Sequenzierungen zufolge enthält diese Stelle zu 23% fdC. Die zweite Stelle ist die 8846677ste

Position des Chromosoms 15 und befindet sich in nichtkodierender DNA. Der gleichen Studie zufolge enthält diese Position zu 32% fdC.

Zur Untersuchung der ersten Position, ließen wir eine rU*-enthaltende 25-mer Sonde (**P2, SI**) mit **Tg** unter 1,4-Diaminobenzol-Katalyse reagieren. In Abwesenheit von fdC bildet sich keine kovalente Bindung zwischen **P2** und **Tg**. Um den Überschuss an Sonde zu entfernen, luden wir den **Tg:P2**-Komplex auf eine NEB Monarch DNA Cleanup Säule und spülten mit Waschpuffer, um Oligonukleotide kürzer als 50 nt zu eluieren, was ungebundenem **P2** entspricht. Nach dem Waschen eluierten wir **Tg:P2** mit TE-Puffer. Die UV/Vis-Analyse des Eluats zeigte ein typisches gDNA-Spektrum. Als nächstes gaben wir einen 70-mer 5'-phosphorylierten Reporterstrang (**R1, SI**) zu, der mit einem 18 nt langen Abschnitt in direkter Nachbarschaft zum Sondenstrang hybridisiert, und ligierten diese Sonde mit dem Reporter bei 60°C mit Ampligase, um den **R1-P2**-Duplex herzustellen (Abbildung 4a). Als nächstes gaben wir zwei Primerpaare zum Assay (blaue und grüne Pfeile, Abbildung 4a), um das Ligationsprodukt relativ zum Zielduplex zu vervielfältigen. Von Bedeutung ist hierbei, dass die blauen Primer lediglich das **R1-P2**-Hybrid der Sonde aus dem Ligationsschritt binden, während die grünen Primer die Gegenwart von gDNA signalisieren. Die

Amplifikation wurde mit zwei verschiedenen TaqMan-Sonden verfolgt, die eine Fluoreszenz bei 520 und 556 nm aufweisen. Diese relative Detektion ist notwendig, um auf die Menge an zugegebener gDNA normalisieren zu können. Da die konventionelle Echtzeit-PCR bei einer Differenz geringer als dem zehnfachen Unterschied ungenaue Ergebnisse liefert, nutzten wir für unsere Studien die ddPCR. Bei dieser Methode werden kleine Tropfen gebildet, wobei im Optimalfall pro Tropfen maximal ein komplettes Analysekonstrukt enthalten ist, wie in Abbildung 4a gezeigt. Die PCR-Reaktionen finden in den Tropfen statt und erzeugen ein spezifisches Signal. Anschließendes Fluoreszenz-basiertes Zählen jedes einzelnen Tropfens führt zu Werten, aus denen die exakte Menge an fdC, auch bei geringen Werten, berechnet werden kann. Ein repräsentativer Graph ist in Abbildung 4b gezeigt. Leere Tropfen ergeben kein PCR-Signal (schwarze Punkte in Abbildung 4b). Tropfen, die nur **Tg** enthalten, ergeben das PCR-Signal der grünen Primer (grüne Punkte in Abbildung 4b). Blaue Signale werden erhalten, wenn das ligierte Produkt **R1-P2** während des Ligationsprozesses (60°C für 10 h) von **Tg** dissoziiert. Rote Signale werden schließlich aus Tropfen erzeugt, die beide PCR-Produkte enthalten. Für die Berechnung der Werte wird auf die Hintergrundinformation verwiesen.

Mit dieser Methode untersuchten wir zunächst Stammzellen ohne Tdg-Enzym ($Tdg^{-/-}$). Ein eher hoher Wert von 28.5% fdC konnte an der ersten Position gemessen werden (Abbildung 4c), was mit den Ergebnissen aus redBS-Sequenzierungen gut übereinstimmt.^[10c] Als wir jedoch das Experiment in Stammzellen mit intaktem Tdg-Reparaturenzym durchführten ($Tdg^{+/+}$), wurden an dieser Position nur noch 15.7% fdC gemessen (Abbildung 4c). Dies ist von großer Bedeutung, da es zeigt, dass Tdg nur die Hälfte der fdCs an einer bestimmten Stelle entfernt, und ungewöhnlich, da Reparaturenzyme dafür bekannt sind, quasi alle möglichen Substrate zu finden. Dieses Ergebnis unterstreicht die hohe Dynamik der fdC-Bildung und Reparatur an einer bestimmten Position im Genom. Als wir den fdC-Gehalt an dieser Stelle in Stammzellen ohne DNA-Methyltransferase (Dnmt TKO) untersuchten, fiel der fdC-Wert wie erwartet auf etwa 5%. Dies zeigt, dass die gemessenen Werte in den $Tdg^{+/+}$ -Zellen real und keine Artefakte sind. Um weiterhin aufzuklären, ob die fdC-Werte einzelner Positionen (Abbildung 4c) den globalen genomischen fdC-Werten folgen, quantifizierten wir zudem die absoluten Werte an fdC in diesen Zellen (Abbildung 4d). Diese globalen Daten sind in guter Übereinstimmung mit den Daten der fdC-Quantifizierungen einzelner Positionen. Aufgrund unserer neuen Daten ist es eher unwahrscheinlich, dass fdC an einer Stelle komplett entfernt und an einer anderen gänzlich vor der Reparatur geschützt wird. Stattdessen wird fdC an einer Position in einer Zellpopulation eher teilweise entfernt. Alternativ könnte Tdg fdC unterschiedlich auf den beiden Chromosomen entfernen, was jedoch weiterer Untersuchung bedarf.

Um unsere Daten verifizieren zu können, wiederholten wir die Tdg-Studie an einer zweiten Position (884667stes Nukleosid des Chromosoms 15). Für diese Stelle entwarfen wir einen neuen Sondenstrang **P3** und einen neuen Reporterstrang **R2** und führten die ddPCR erneut mit zwei Pri-

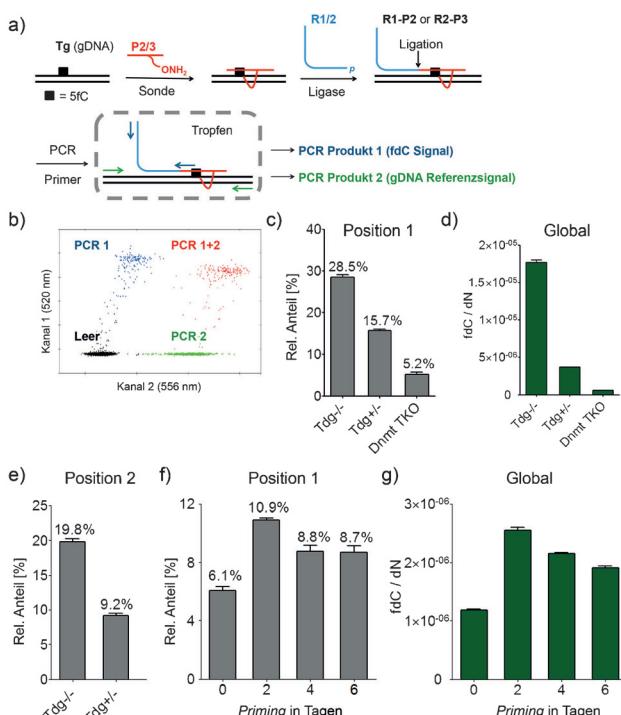


Abbildung 4. Die fdC-Sequenzierungsmethode: a) schematische Repräsentation der Methode, schwarze Linie: gDNA; rote Segmente: fdC-Sonde; blaue Segmente: Reporterstränge; Pfeile: PCR-Primerpaare; b) Typischer 2D-Plot der Tropfen-Fluoreszenz; c) Cluster-Verhältnisse der Position 1 in $Tdg^{-/-}$, $Tdg^{+/+}$ und Dnmt-TKO-mES-Zellen; d) globale fdC-Quantifizierung in $Tdg^{-/-}$, $Tdg^{+/+}$ und Dnmt-TKO-mES-Zellen mittels unserer LC-MS Methode; e) Cluster-Verhältnisse der Position 2 in $Tdg^{-/-}$ und $Tdg^{+/+}$ -mES-Zellen; f) Cluster-Verhältnisse der Position 1 in Wildtyp-mES-Zellen an verschiedenen Tagen während des Primings; g) Globale Quantifizierungsdaten der Wildtyp-mES-Zellen, gemessen durch LC-MS.

merpaaren durch (Abbildung S5). Vergleicht man die Daten aus $Tdg^{-/-}$ -Zellen mit den Daten aus $Tdg^{+/+}$ -Zellen, ist an dieser Position wieder ein 50%iger Rückgang des fdC-Gehalts erkennbar. Dies ist in vollständiger Übereinstimmung mit den Daten der ersten Position (Abbildung 4e).

Schließlich führten wir eine Untersuchung durch, bei der wir die Entwicklung von fdC an der ersten Position während des „Primings“ von Stammzellen aus naiven Zellen beobachteten (Abbildung 4f). An dieser Position ist ein Anstieg der fdC-Werte, besonders in der frühen Priming-Phase, zu beobachten. Es folgen ein geringer Abfall und schließlich stabile Werte (Abbildung 4f), was wiederum in Übereinstimmung mit den globalen Messwerten ist, die wir durch unsere bereits beschriebene Methode bestimmten (Abbildung 4g).

Die Tatsache, dass unsere Methode in der Lage ist, die beschriebenen globalen Werte an einer einzelnen genetischen Position zu reproduzieren, stimmt uns positiv, dass wir mit unserer Methode verlässlich das wiedergeben können, was an einer definierten Stelle geschieht. Da die Daten der individuellen Positionen und die globalen Werte korrelieren, haben wir erste Hinweise, dass die beschriebenen globalen Trends tatsächlich wiedergeben, was an einer einzelnen fdC enthaltenden Position geschieht, anstatt den Mittelwert unterschiedlicher Dynamiken an verschiedenen Positionen abzubilden. Ein interessantes Ergebnis dieser Studie ist hierbei, dass das Reparaturenzym Tdg nur die Hälfte der fdC-Basen an einer bestimmten Stelle im Genom einer mESC-Population entfernt, was auf semipermanente Eigenschaften der Base an definierten genetischen Positionen schließen lässt.

Experimentelles

Verknüpfung der Sonde: gDNA-Lösung (1.2 μ g), fdC-Sonde (1 μ m, 2 μ L), Na_2HPO_4 - Na_2HPO_4 -Puffer (200 mM, pH 6.0, 2 μ L), wässr. $NaCl$ (1.5 M, 2 μ L) und doppelt destilliertes H_2O (dd H_2O) wurden zu einem Endvolumen von 18 μ L zusammengegeben. Die Mischung wurde 3 min auf 95°C erhitzt und schnell auf 25°C abgekühlt. 1,4-Diaminobenzol in Wasser (10 mM, 2 μ L) wurde zugegeben und das Reaktionsgefäß 6 h bei 25°C geschüttelt. Vor Aufreinigung mit dem NEB Monarch PCR DNA Cleanup Kit, wurde die Reaktionsmischung mit wässr. Na_2HPO_4 (200 mM, 40 μ L) neutralisiert.

Ligation: Die zuvor beschriebene gDNA-Lösung (300 ng), Reporterstrang (20 nm, 1 μ L), Ampligase-Reaktionspuffer (10 \times , 2 μ L), Ampligase von Epicentre (10 U) und dd H_2O wurden bis zu einem Endvolumen von 20 μ L zusammengegeben. Die Mischung wurde für 3 min bei 95°C erhitzt, dann 1 min bei 94°C, 1 h für 60°C und wieder auf 94°C (10 Zyklen) temperiert. Danach wurde das Reaktionsgemisch mit Tris-HCl-Puffer (200 mM, pH 7.6, 50 μ L) verdünnt, bevor es mittels NEB Monarch PCR DNA Cleanup Kit gereinigt wurde.

Droplet Digital PCR wurde auf einem Bio-Rad QX100 ddPCR-System durchgeführt. Für die Reaktion wurden gDNA (6 ng), vier Primer (jeweils 18 μ m, 1 μ L), zwei TaqMan-Sonden (jeweils 5 μ m, 1 μ L), Digital-PCR-Supermix für Sonden (kein dUTP, 2 \times , 10 μ L) und dd H_2O gemischt; das Endvolumen betrug 20 μ L. PCR-Zyklus: 95°C für 10 min, 94°C für 30 s und 64°C für 1 min (35 Zyklen), dann folgten 98°C für 10 min und schließlich wurde mit 2°C s $^{-1}$ auf 12°C abgekühlt. Eine detaillierte Beschreibung ist den Hintergrundinformationen zu entnehmen.

Danksagung

Wir danken K. Hufnagel für die Herstellung der Phosphoramidite der verwendeten epigenetischen Basen. Dieses Projekt wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft SFB 1032 und den Excellence Cluster CiPSM (EXC 114) gefördert. Weiterhin wurde das Projekt durch das „Horizon 2020 Research and Innovation Program“ der Europäischen Union (Förder-Nr. 642023 (ITN clickgene)) unterstützt.

Stichwörter: 5-Formylcytosin · Droplet Digital PCR · Epigenetische Base · Genomische DNA · Klick-Chemie

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 11797–11800
Angew. Chem. **2016**, *128*, 11974–11978

- [1] P. A. Jones, *Nat. Rev. Genet.* **2012**, *13*, 484–492.
- [2] T. Carell, C. Brandmayr, A. Hienzsch, M. Müller, D. Pearson, V. Reiter, I. Thoma, P. Thumbs, M. Wagner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 7110–7131; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 7220–7242.
- [3] a) S. Kriaucionis, N. Heintz, *Science* **2009**, *324*, 929–930; b) M. Tahiliani, K. P. 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.
- [4] T. Pfaffeneder, B. Hackner, M. Truss, M. Müntzel, M. Müller, C. Deiml, C. Hagemeier, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 7008–7012; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 7146–7150.
- [5] a) S. Ito, L. Shen, Q. Dai, S. C. Wu, L. B. Collins, J. A. Swenberg, C. He, Y. Zhang, *Science* **2011**, *333*, 1300–1303; b) 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.
- [6] S. Schiesser, B. Hackner, T. Pfaffeneder, M. Müller, C. Hagemeier, M. Truss, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 6516–6520; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 6622–6626.
- [7] a) M. Müntzel, D. Globisch, T. Brückl, M. Wagner, V. Welzmilller, S. Michalakis, M. Müller, M. Biel, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 5375–5377; *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 5503–5505; b) D. Globisch, M. Müntzel, M. Müller, S. Michalakis, M. Wagner, S. Koch, T. Brückl, M. Biel, T. Carell, *PLoS ONE* **2010**, *5*, e15367; c) M. Wagner, J. Steinbacher, T. F. J. Kraus, S. Michalakis, B. Hackner, T. Pfaffeneder, A. Perera, M. Müller, A. Giese, H. A. Kretzschmar, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 12511–12514; *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 12691–12695.
- [8] a) N. Plongthongkum, D. H. Diep, K. Zhang, *Nat. Rev. Genet.* **2014**, *15*, 647–661; b) M. J. Booth, E.-A. Raiber, S. Balasubramanian, *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 2240–2254.
- [9] a) W. A. Pastor, U. J. Pape, Y. Huang, H. R. Henderson, R. Lister, M. Ko, E. M. McLoughlin, Y. Brudno, S. Mahapatra, P. Kapranov, M. Tahiliani, G. Q. Daley, X. S. Liu, J. R. Ecker, P. M. Milos, S. Agarwal, A. Rao, *Nature* **2011**, *473*, 394–397; b) E.-A. Raiber, D. Beraldi, G. Ficz, H. Burgess, M. Branco, P. Murat, D. Oxley, M. Booth, W. Reik, S. Balasubramanian, *Genome Biol.* **2012**, *13*, R69; c) C.-X. Song, K. E. Szulwach, Q. Dai, Y. Fu, S.-Q. Mao, L. Lin, C. Street, Y. Li, M. Poidevin, H. Wu, J. Gao, P. Liu, L. Li, G.-L. Xu, P. Jin, C. He, *Cell* **2013**, *153*, 678–691; d) B. Xia, D. Han, X. Lu, Z. Sun, A. Zhou, Q. Yin, H. Zeng, M. Liu, X. Jiang, W. Xie, C. He, C. Yi, *Nat. Methods* **2015**, *12*, 1047–1050.
- [10] a) M. Yu, G. C. Hon, K. E. Szulwach, C.-X. Song, L. Zhang, A. Kim, X. Li, Q. Dai, Y. Shen, B. Park, J.-H. Min, P. Jin, B. Ren, C. He, *Cell* **2012**, *149*, 1368–1380; b) M. J. Booth, M. R. Branco, G. Ficz, D. Oxley, F. Krueger, W. Reik, S. Balasubramanian, *Science* **2012**, *336*, 934–937; c) M. J. Booth, G. Marsico, M. Bachman, D. Beraldi, S. Balasubramanian, *Nat. Chem.* **2014**, *6*, 435–440; d) X.

- Lu, C.-X. Song, K. Szulwach, Z. Wang, P. Weidenbacher, P. Jin, C. He, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 9315–9317.
- [11] a) A. Nomura, K. Sugizaki, H. Yanagisawa, A. Okamoto, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 8277–8279; b) J. Duprey, G. A. Bullen, Z.-Y. Zhao, D. M. Bassani, A. F. A. Peacock, J. Wilkie, J. H. R. Tucker, *ACS Chem. Biol.* **2016**, *11*, 717–721.
- [12] a) P. M. E. Gramlich, S. Warncke, J. Gierlich, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 3442–3444; *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 3491–3493; b) J. Willibald, J. Harder, K. Sparrer, K.-K. Conzelmann, T. Carell, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 12330–12333.
- [13] A. Maiti, A. C. Drohat, *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 35334–35338.
- [14] B. J. Hindson, K. D. Ness, D. A. Masquelier, P. Belgrader, N. J. Heredia, A. J. Makarewicz, I. J. Bright, M. Y. Lucero, A. L. Hiddessen, T. C. Legler, T. K. Kitano, M. R. Hodel, J. F. Petersen, P. W. Wyatt, E. R. Steenblock, P. H. Shah, L. J. Bousse, C. B. Troup, J. C. Mellen, D. K. Wittmann, N. G. Erndt, T. H. Cauley, R. T. Koehler, A. P. So, S. Dube, K. A. Rose, L. Montesclaros, S. Wang, D. P. Stumbo, S. P. Hodges, S. Romine, F. P. Milanovich, H. E. White, J. F. Regan, G. A. Karlin-Neumann, C. M. Hindson, S. Saxonov, B. W. Colston, *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 8604–8610.
- [15] M. Wendeler, L. Grinberg, X. Wang, P. E. Dawson, M. Baca, *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25*, 93–101.

Eingegangen am 20. Juni 2016

Online veröffentlicht am 25. August 2016