

*Dissertation zur Erhaltung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München*

**Entwicklung neuer Diagnostikmethoden für
genetische Erkrankungen basierend auf der
Click-Chemie**

Nada Raddaoui

geboren in Kasserine, Tunesien

München, 2020

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinnen von § 7 der Promotionsordnung vom 28. November 2011 von Herrn Prof. Dr. Thomas Carell von der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München betreut.

Eidesstattliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 10.01.2019

Nada Raddaoui

Dissertation eingereicht am 10.01.2019

1. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Carell
2. Gutachter: Dr. Stefanie Kellner

Tag der mündlichen Prüfung: 01.02.2019

„We will either find a way, or make one.“

Hannibal

„Look deep into nature, and then you will understand everything better.“

Albert Einstein

„Die ganze Welt ist eine sehr schmale Brücke – und die Hauptsache ist: gar keine Angst zu haben.“

Nahman von Bratzlav

für die Seele meiner Oma Khadija

Danksagung

Diese Arbeit ist das Ergebnis eines langen Weges, der in Tunesien angefangen hat und mich über Österreich bis nach Deutschland führte. Da diese Arbeit ohne die Unterstützung mehrerer Personen gar nicht möglich gewesen wäre, möchte ich mich bei diesen herzlich bedanken. Diese Personen haben mir in all den Phasen meines Aufenthalts in Europa geholfen.

Mein größter Dank gebührt meinem Doktorvater *Prof. Dr. Thomas Carell*. Ihm danke ich nicht nur für die interessante und abwechslungsreiche Themenstellung, die stete Diskussionsbereitschaft und seine großzügige Unterstützung, sondern auch für die wissenschaftliche Selbständigkeit und Freiheit, die er mir schenkte.

Dr. Stefanie Kellner danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferats und die moralische Unterstützung.

Allen Mitgliedern der *Prüfungskommission* danke ich für ihr Mitwirken an der mündlichen Prüfung.

Ich danke Frau *Slava Gärtner* für ihre stetig schnelle Hilfe in allen organisatorischen Aufgaben. *Dr. Markus Müller* danke ich für die ständige Bereitschaft zu helfen. Frau *Sabine Voß* danke ich für die herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die langjährige Freundschaft. Ich danke herzlich *Kerstin Kurz* für den reibungslosen Ablauf der Bestellungen und für die schönen Pflanzen trotz der Spinnenspuren.

Frau *Birgit Carell* danke ich für die tolle Zusammenarbeit im Rahmen der Vorbereitung des SFB1309. *Dr. Oliver Baron* und dem „Center of Integrated Protein Sciences“ CIPSM danke ich für die finanzielle Unterstützung der Forschungsprojekte.

Ich möchte mich bei meinen Kollaborationspartnern herzlich bedanken: *Dr. Leonhard Möckl*, *Prof. Dr. Christoph Bräuchle*, *Florian Geiger* und *Dr. Hanna Engelke* für die gute Zusammenarbeit, für die Bereitstellung der Mikroskope und der Messgeräte und vor allem für die Geduld bei der täglichen Messung der Screening-Experimente. *Prof. Dr. Angelika Vollmar* möchte ich danken für die Bereitstellung des FACS-Gerätes.

Dr. Magda Bienko und *Dr. Nicola Crosetto* danke ich sehr für den hervorragenden Forschungsaufenthalt in Ihrem Labor im Karolinska-Institutet in Stockholm.

Ich danke *PD Dr. Thomas Frischmuth*, Geschäftsführer der baseclick GmbH sowie allen Mitarbeitern.

Darüber hinaus danke ich *Prof. Dr. Joachim Rädler* und besonders Frau *Marilena Pinto* und *Katharina Franke* für die gute Zusammenarbeit im Rahmen vom SFB1032. Weiterhin bedanke ich mich bei meinen Kollegen in der Doktorandenvertretung *Katherine Erlich* und *Florian Schüder*.

Der Click-Subgroup danke ich für die erfolgreiche Zusammenarbeit.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe danke ich für die angenehme Atmosphäre, sowohl im Labor als auch in der Freizeit. Weiterhin danke ich der Kochgruppe für die vielen gemeinsamen kulinarischen Erlebnisse. Ebenfalls möchte ich mich bei meinen Praktikanten und Bacheloranden bedanken: *Vanda Dašková*, *Tobias Heins*, *Ken Kögel* und *Caterina Juliano*.

Des Weiteren möchte ich mich bei *Dr. Dorothea Kolof*, Frau *Sabine Voß* und *Dr. Mirko Wagner* bedanken für den vielen Spaß, den wir hatten und haben werden. Für das schnelle und gewissenhafte Korrekturlesen dieser Arbeit danke ich herzlich *Dr. Markus Müller*, *Bernd Jasper* und *Alex Schön*.

Den Mitgliedern der Bärenhöhle dank ich herzlich, dass das Schreiben der Doktorarbeit nie langweilig war: *Dr. Katharina Iwan*, *Dr. Mirko Wagner*, *Dr. René Rahimoff* und *Dr. Sidney Becker*.

Dr. Günther Rittmann und Frau *Claudia Rittmann* möchte ich ganz besonders danken für die herzliche und tolle gemeinsame Zeit in Stockdorf.

Meinen Onkeln *Dali* und *Badreddine* danke ich besonders dafür, dass sie mir den Einzug nach Europa ermöglicht haben. Weiterhin bedanke ich mich bei *Amina*, die mich bei ihrer Familie wie eine Schwester empfangen hatte.

Meine Kommilitonen und Freunde, die mich moralisch so unterstützt haben, dass ich trotz leidvoller und strapaziöser Phasen immer weitergemacht und nie aufgegeben habe: *Imen Belajouza*, *Ilhem Belajouza*, *Ikram Belajouza*, *Layla Belajouza*, *Demetria Perez*, *Alma Tursic*. Meine Dankbarkeit gilt auch Tante *Hedia Belajouza*. Ohne eure Unterstützung wäre diese Doktorarbeit nicht möglich!

Der abschließende und größte Dank gebührt meinen Eltern für die Chance, die sie mir gegeben haben, um mein Studium in Deutschland zu absolvieren, meinen Schwestern *Najeh Raddaoui* und *Dr. med. dent. Nissaf Raddaoui* und meiner Nichte *Linda*: Danke für immerwährende, selbstlose Unterstützung, sowohl während des Aufenthalts in Innsbruck, um die deutsche Sprache zu lernen, als auch während des Studiums und meiner Promotion in Deutschland. Ihr seid die beste Familie, die man sich wünschen kann! Ohne euren beständigen Rückhalt wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Publikationen:

1. **N. Raddaoui**[#], S. Stazzoni[#], L. Möckel, F. Geiger, H. Engelke, C. Bräuchle, T. Carell, Dendrimer-based Signal Amplification of Click-Labelled DNA *in situ*, *ChemBioChem* **2017**, 18 (17), 1716–1720.
2. **N. Raddaoui**[#], S. Croce[#], F. Geiger, A. Borodavka, L. Möckl, S. Stazzoni, B. Viverge, C. Bräuchle, T. Frischmuth, H. Engelke, T. Carell, Supersensitive Multifluorophore RNA-FISH for Early Virus Detection and Flow-FISH by Using Click Chemistry, *ChemBioChem* **2020**, 21, 1–6.

Weitere Publikationen:

3. A. S. Schröder, O. Kotljarova, E. Parsa, K. Iwan, **N. Raddaoui**, T. Carell, Synthesis of (*R*)-Configured 2'-Fluorinated mC, hmC, fC, and caC Phosphoramidites and Oligonucleotides, *Org. Lett.* **2016**, 18 (17), 4368-4371.
4. S. Hesse, A. Manetto, V. Cassinelli, J. Fuchs, L. Ma, **N. Raddaoui**, A. Houben, Fluorescent Labelling of *in situ* Hybridisation Probes Through the Copper-Catalysed Azide-Alkyne Cycloaddition Reaction. *Chromosome Res.* **2016**, 24, 299.
5. T. Pfaffeneder[#], F. Spada[#], M. Wagner[#], C. Brandmayr, S. Laube, D. Eisen, M. Truss, J. Steinbacher, B. Hackner, O. Kotljarova, D. Schuermann, S. Michalakis, O. Kosmatchev, S. Schiesser, B. Steigenberger, **N. Raddaoui**, G. Kashiwazaki, U. Müller, C. G. Spruijt, M. Vermeulen, H. Leonhardt, P. Schär, M. Müller, T. Carell, Tet oxidizes Thymine to 5-Hydroxymethyluracil in Mouse Embryonic Stem Cell DNA. *Nat. Chem. Biol.* **2014**, 10, 574–581.

Veröffentlichungen auf Konferenzen:

1. **Posterpresentation:** "Imaging of Single mRNA Molecules *in situ*". 9th ÖGMBT Annual Meeting, Innsbruck, **Österreich**, September 2017.
2. **Posterpresentation:** "Nanomolecules meet Click Chemistry". SFB1032 Annual Workshop, Tutzing, **Deutschland**, März 2017.
3. **Posterpresentation:** "Imaging of Single mRNA Molecules *in situ*". Conference Slovenski kemijski dnevi 2016, Portoroz, **Slovenia**, September 2016.
4. **Vortrag:** "DiagnosClick: New Probes for Fluorescence *in situ* Hybridisation based on Click Chemistry". SciLifeLab, Karolinska Institutet, Stockholm, **Schweden**, März 2016.

Weitere besuchte Konferenzen:

5. Scientific Oktobefest, München, **Deutschland**, September 2013 and 2016.
6. SFB1032-Evaluierung, München, **Deutschland**, Februar 2016.
7. Ischia Advanced School of Organic Chemistry, Ischia, **Italien**, September 2014.
8. Nanoagents retreat, SFB1032 Annual Meeting, Frauenchiemsee, **Deutschland**, Februar 2014.

Ehrenamtliche Aufgaben:

9. Doktorandenvertretung für den Sonderforschungsbereich SFB1032 „Nanoagents“, November 2017 – November 2018.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	9
Zusammenfassung.....	11
Summary.....	22
1. Einführung.....	32
1.1. Molekulare Einsicht in die genetischen Krankheiten am Beispiel von Leukämie	32
1.1.1. Die Anatomie der Chromosomen und ihre Aberrationen.....	32
1.1.2. Zytogenetik in hämatologischen Krankheiten: Spezial-fall Leukämie.....	36
1.2. Diagnostik der genetischen Krankheiten <i>via</i> Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung	37
1.2.1. Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung: Geschichte einer 40 Jahre alten Methode.....	37
1.2.1.1. Detektion genomischer DNA-Abschnitte <i>in situ</i> : DNA-FISH.....	38
1.2.1.2. Detektion von mRNA-Molekülen <i>in situ</i> : mRNA-FISH.....	41
1.2.1.3. FISH gekoppelt mit Durchflusszytometrie: Flow-FISH.....	44
1.2.2. FISH versus quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion RT-PCR	46
1.3. Einschränkungen der verwendeten Diagnostikmethoden: Muss die Probe länger oder dichter gelabelt sein?.....	47
1.3.1. DNA-FISH	47
1.3.2. mRNA-FISH.....	48
1.3.3. Lösungsversuche für die mit FISH verbundenen Probleme.....	49
1.4. Die Kupfer-katalysierte Alkin-Azid-Cycloaddition CuAAC: die „Click-Reaktion“.....	52
1.4.1. CuAAC für den Proliferationsassay	57
1.4.2. CuAAC für DNA- und mRNA-FISH.....	61
2. Aufgabenstellung	66

3. Veröffentlichte Arbeiten.....	67
3.1. „Supersensitive Multifluorophore RNA-FISH for Early Virus Detection and Flow-FISH using Click Chemistry”.....	67
3.2. „Dendrimer-based Signal Amplification of Click- Labelled DNA <i>in situ</i> “	89
4. Ausblick.....	124
5. Abkürzungen	125
6. Literaturverzeichnis	127

Zusammenfassung

Jede Krankheit kann man vermutlich auf eine genetische Störung zurückführen.^[1] Die Methoden u. a. zur Detektion von Chromosomenaberrationen sind daher von großer Bedeutung für Diagnostik und Therapiezwecke.^[2-5]

Heutzutage beruht die Diagnostik von genetischen Krankheiten auf der Detektion des entsprechenden defekten Gens ^[5] oder auf der Messung entweder des jeweiligen Transkripts durch die quantitative „real-time-Polymerase Chain Reaction“ (RT-qPCR)^[6, 7] oder des jeweiligen Proteins *via* z.B. Massenspektrometrie^[8, 9]. Auch die Durchflusszytometrie wird als Standardmethode verwendet, um für Krebszellen spezifische Oberflächenproteine zu detektieren und zu quantifizieren. Vor allem wird sie für die Analyse des Zellzyklus bei der Diagnose benutzt. Ein Vorteil der Methode ist die gleichzeitige Analyse einer großen Anzahl von Zellen (z.B. Blutzellen). Eine Abweichung in der Zellproliferationsrate oder eine Anomalität in der Zellvermehrung deuten auf eine genetische Mutation hin.^[10]

Obwohl diese Methoden gut etabliert sind und in fast jedem Diagnostiklabor verwendet werden, bleiben sie indirekte Nachweismethoden. Direkte Informationen bekommt man mit der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung FISH, die es ermöglicht, die betreffenden Gene *in situ* sichtbar zu machen.^[11] Hiermit wird ein Ziel-Gen mit einer fluoreszierenden Sonde markiert und in seinem ursprünglichen Platz in der Zelle mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie detektiert.^[12] Wichtige Informationen, die durch das Aufschließen der Zellen und das Isolieren der DNA oder RNA verloren gehen können, bleiben mit der FISH erhalten. Sie ermöglicht es, Informationen auf der Ebene einzelner Zellen zu gewinnen.^[13] Außerdem kann die Expressionsaktivität von einer Zelle zur anderen unterschieden werden. Expressionsaktive Zellen werden von den expressionsstillen differenziert. ^[14, 15]

Die Detektionsgrenze erkrankter Zellen ist ein ernstes Problem, denn Krebspatienten müssen trotz erster Erfolgszeichen nach der Therapie wiederholt und regelmäßig medizinisch kontrolliert werden.^[16] Erst nach fünf Jahren ohne Rückfall der Krankheit (Remission) können die behandelnden Ärzte und die betroffenen Patienten von Therapieerfolg sprechen. Trotz der Entwicklung sowohl neuer Farbstoffe als auch unzähliger neuer Methoden für die Fluoreszenzmikroskopie, die ein verbessertes Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis anbieten, ist die Detektionsgrenze weiterhin der

limitierende Faktor. Diese Methoden beruhen auf der Herstellung von Sonden, die willkürlich mit Farbstoffen versehen werden. Die ungenaue limitierte Markierung in einer uneinheitlichen Sondenherstellung führt zu unterschiedlichen Ergebnissen.

In dieser Arbeit wurde die in der Gruppe von Thomas Carell für Nukleinsäuren entwickelte Cu(I)-katalysierte Alkin-Azid-Cykloaddition (CuAAC) benutzt, um neue mit fluoreszenten Farbstoffen markierten Sonden zu entwickeln, die eine bessere Sensitivität und ein niedrigeres Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis bieten.^[17-20]

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde ein „*Proof of concept*“ für die CuAAC-basierte „*messenger*“ Ribonukleinsäure-FISH-Methode (mRNA-FISH) entwickelt. Diese Methode wurde mit dem Ziel entwickelt, sich auf die Detektion der Transkripte zu konzentrieren, da ihre Anzahl in der Zelle stets höher als die Anzahl der entsprechenden Gene ist. Wenn Desoxynukleinsäure (DNA)-Abschnitte kranker Zellen detektiert werden und die Anzahl dieser Zellen z.B. im Blut sehr gering ist, dann entgehen sie oft der Detektion. Beim Umstieg auf die mRNA-Ebene könnte dieses Problem gelöst werden, da mehr mRNA-Moleküle in der Zelle vorhanden sind. Für die Entwicklung der neuen Methode wurde die 720-mer lange mRNA vom „*Enhanced Green Fluorescent Protein*“ eGFP als Target festgelegt und 10 Anti-sense-Oligonukleotide entworfen, die komplementär dazu sind (ein sogenanntes SONDENSET). Jedes Oligonukleotid besitzt 22 Nukleotide und drei Alkylgruppen, die durch eine CuAAC-Reaktion mit jeweils einem Farbstoffazid gekoppelt wurden (**Abbildung I**). Das Gelingen der Click-Reaktion wurde mittels HPLC und MALDI-TOF bestätigt. Für die Experimente wurden sowohl eGFP-stabile als auch mit einem eGFP-Vektor transfizierte humane Zellen verwendet.

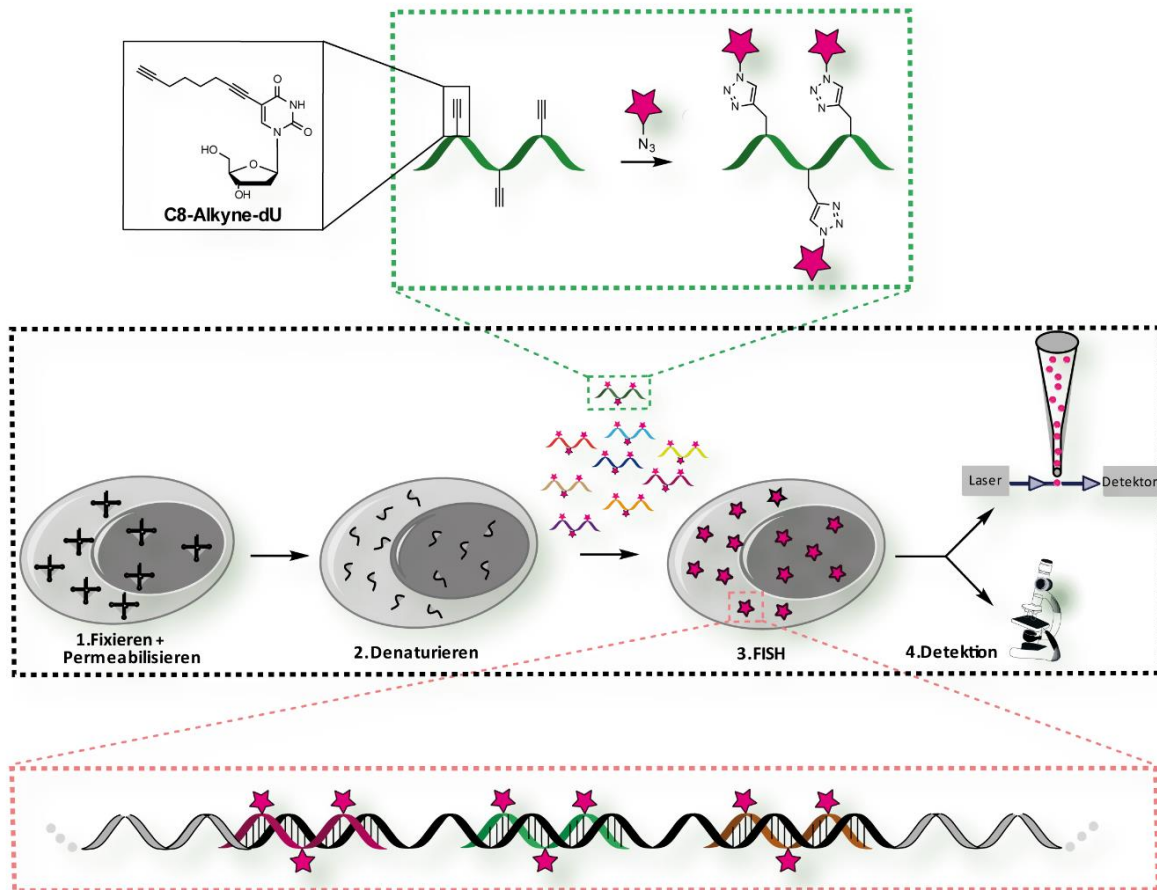


Abbildung I: Das Protokoll für mRNA-FISH mit CuAAC-markierten Sonden. 10 Oligonukleotide mit je drei Alkinmodifikationen wurden einzeln mit einem fluoreszenten Farbstoffazid *via* Click-Chemie konjugiert. Nach der CuAAC-Reaktion wurden die Oligonukleotide durch Ethanol-Fällung aufgereinigt und zu einem Sondenset zusammengemischt. Nach dem Fixieren und permeabilisieren der Zellen, wurden die mRNA-Moleküle denaturiert. Das Sondenset wurde im Hybridisierungspuffer zu den Zellen gegeben. Die *in-situ*-Hybridisierung dauert von vier bis zu mehreren Stunden. Nachdem der Überfluss an Sonden gewaschen ist, können die mRNA-Moleküle mittels Durchflusszytometrie und/oder Mikroskopie detektiert werden.

In einem ersten Ansatz wurden die bereits mit Farbstoffaziden versehenen Sonden in die fixierten und permeabilisierten Zellen eingeschleust und mit den Target mRNA-Molekülen *in situ* hybridisiert (Click-prä-Hybridisierung). In einem zweiten Ansatz wurde das Sondenset mit freien Alkinen erst in die Zellen eingeschleust und mit der mRNA hybridisiert. Anschließend erfolgte eine *in-situ*-CuAAC-Reaktion, um die freien Alkine mit jeweils einem Farbstoffazid zu versehen (Click-post-Hybridisierung). Als Positiv-Kontrolle wurde das kommerziell-erhältliche mRNA-FISH-Sondenset des Markführers Stellaris® verwendet, das auf einer Arbeit von Raj *et al.* basiert.^[21] Alle Schritte im mRNA-FISH-Protokoll wurden für die durch CuAAC-Reaktion generierten

Sonden getestet und optimiert. Eine Reihe von Screeningstests wurde durchgeführt: um die optimale Konzentration des Sondensets zu ermitteln, die optimale Dauer und Temperatur der Hybridisierung zu finden, die Anzahl der verwendeten Oligonukleotide festzulegen, darüberhinaus wurden Waschschrte und -lösungen nach der Hybridisierung bzw. nach der CuAAC *in situ* optimiert. **Abbildung II** zeigt das Ergebnis der beiden auf CuAAC-basierten mRNA-FISH-Konzepte anhand der eGFP-mRNA als Target. In **Abbildung II-A** sind die Ergebnisse der Click-prä-Hybridisierung dargestellt. Der direkte Vergleich zwischen den CuAAC- mit den kommerziell-erhältlichen Sonden zeigt, dass mit den neuen Sonden eine Erhöhung der Signalintensität erreicht wurde. Das Signal der CuAAC-Sonden ist fast drei Mal höher als das der kommerziellen. Der Hintergrund, der von den unspezifischen Bindungen der CuAAC-Sonden verursacht ist, ist zwar gesteigert als die Kontrolle, das allgemeine Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis ist aber höher und die Detektion der einzelnen Moleküle und ihrer Quantifizierung ist ohne komplizierte Dekonvolutionssoftware möglich.

In den Mikroskopiebilder sind die einzelnen eGFP-mRNA-Moleküle erkennbar. Die Zellen, die kein eGFP exprimieren (kein grünes Signal), zeigten ebenso kein rotes Signal und somit keine mRNA-Moleküle.

In **Abbildung II-B** ist das Ergebnis der Click-post-Hybridisierung zu sehen. Die beste Äquivalentenzahl des Farbstoffes für die Click-Reaktion wurde ermittelt. Auch mit dieser Methode ist es uns gelungen, eine gute Signalintensität zu bekommen, die es uns ermöglicht die mRNA-Moleküle *in situ* zu detektieren.

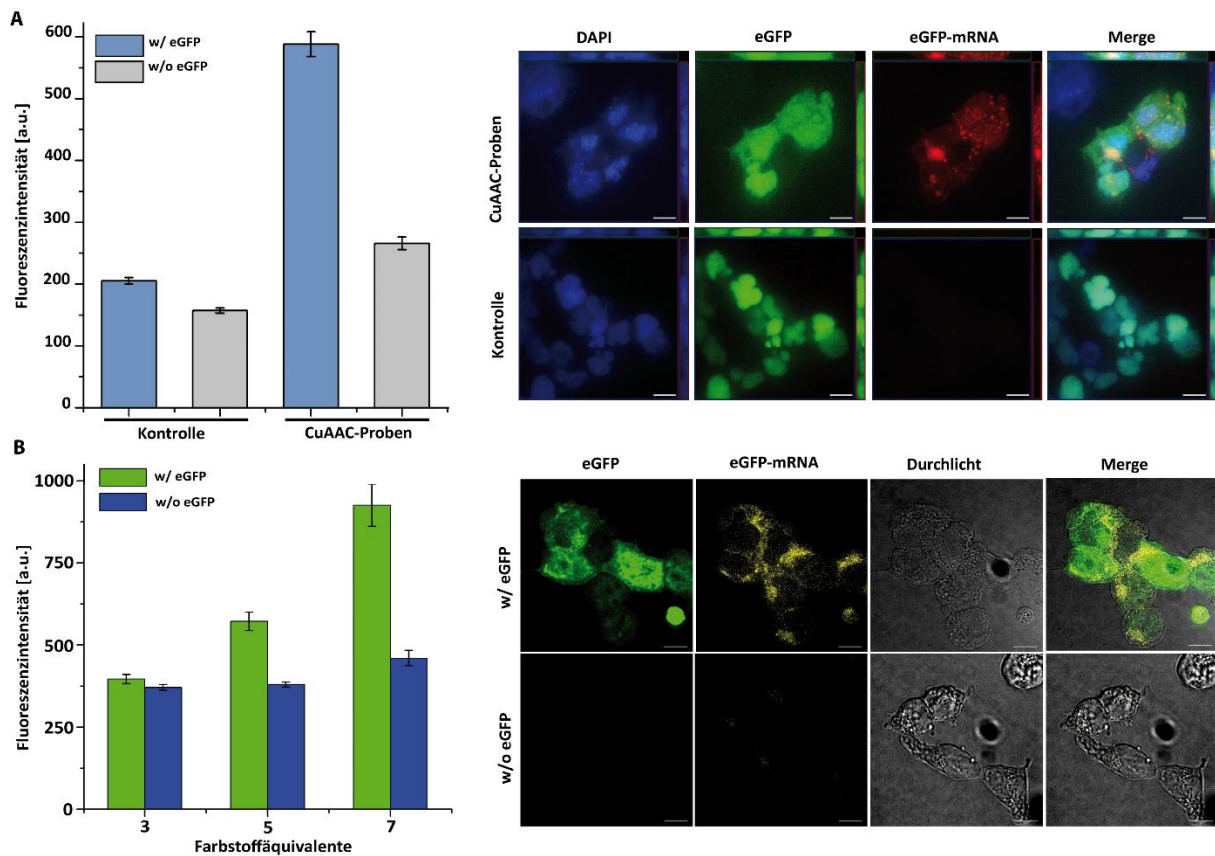


Abbildung II: Vergleich der CuAAC- mit den kommerziellen Sonden für mRNA-FISH. **A:** HEK-293T-Zellen wurden mit einem eGFP-exprimierenden Plasmid transfiziert. Zellen ohne eGFP wurden als Kontrolle benutzt. Nach dem Fixieren und permeabilisieren, erfolgte die Hybridisierung entweder mit rot-markierten CuAAC- oder kommerziellen Sonden gegen eGFP-mRNA. Auch Zellen ohne eGFP wurden mit den Sonden behandelt, um deren Hintergrund (unspezifische Bindungen) zu ermitteln. Die Signalintensität beider Sonden sets wurden gemessen. Die Mikroskopiebilder sind eine Projektion von 10 z-Stacks von den Zellen. Die CuAAC-Sonden sind als kleine rote Spots zu sehen, nachdem der Hintergrund substrahiert wurde. Die negativ-Kontrolle zeigt kein signifikantes spezifisches Signal. **B:** HEK-293T-Zellen wurden mit den Sonden gegen eGFP-mRNA hybridisiert. Danach erfolgte eine CuAAC-Reaktion *in situ*. Anhand der Anzahl der Farbstoffäquivalente war es möglich, auch mit dieser Methode ein gutes Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis zu erzielen.

Neben den Analysen mittels Fluoreszenzmikroskopie wurde die Kompatibilität des neuentwickelten Protokolls mit der Durchflusszytometrie getestet. Dabei wurde gezeigt, dass die CuAAC-basierten Sonden für die Durchflusszytometrie geeignet sind und ebenfalls ein gutes Signal liefern. Dieses Signal konnte sogar mit 75% weniger Sondenmenge als beim Standardprotokoll erreicht werden (**Abbildung III**).

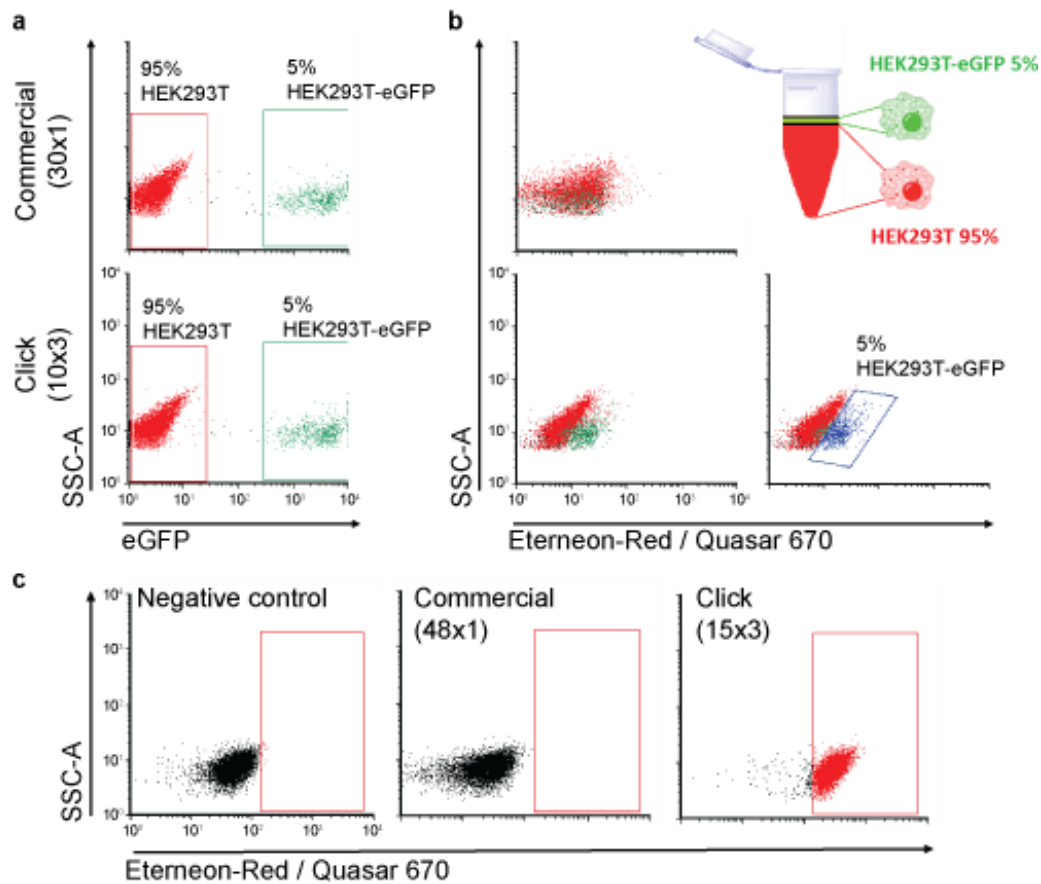


Abbildung III: Flow-FISH Analysen. (a): 5% HEK293T-eGFP und 95% HEK293T wurden in einer Suspension gemischt, in der eine Hybridisierung mit den kommerziellen und CuAAC-markierten Proben gegen eGFP-mRNA durchgeführt wurde. Die durchflusszytometrische Analyse zeigte, dass die CuAAC-markierten Proben eine bemerkenswerte Verschiebung des Signals ergeben. (b) Bei Verwendung der kommerziellen Sonden ist diese Verschiebung nur möglich, wenn die vierfache Menge der Sonden verwendet wird. (c) Flow-FISH wurde auch zum Nachweis eines endogenen ABL-Transkripts verwendet. In den Negativkontrollen wurden die Zellen nur mit Hybridisierungspuffer behandelt, um die Autofluoreszenz der Zellen zu bestimmen.

Die nächste Frage war, ob das neue Sondendesign die Detektion von anspruchsvollen RNA-Targets ermöglicht, die mit herkömmlichen FISH-Sondendesigns nicht einfach abgebildet werden können, z.B. hochstrukturierte RNA, die nur begrenzt strangförmige Regionen zur Sondenbindung trägt. Mit einem herkömmlichen FISH-Sondendesign können solche RNAs nicht nachgewiesen werden.

Wir untersuchten diese Frage, indem wir auf ein ~1 kb RNA-Virus-Transkript abzielten, das aus dem Rotavirus A (RVA)-Gensegment 7 hergestellt wurde. Wir planten, dieses Transkript kurz nach der Virusinfektion nachzuweisen, wenn die Konzentration des Transkripts voraussichtlich sehr niedrig ist. Dieses spezifische Target hat zusätzlich

eine ausgedehnte Sekundärstruktur, die nur wenige Sondenstrangbindungsstellen bietet. Für das Experiment fixierten wir Rotavirus-infizierte Zellen 4 Stunden nach der Infektion und inkubierten sie mit dem CuAAC-Sondenset. Um den Nachweis virusinfizierter Zellen zu erleichtern, nutzten wir eine stabile Zelllinie, die das an eGFP fusionierte Rotavirus-Nichtstrukturprotein (NSP5) exprimiert, und eine mock-infizierte MA104-Zelllinie. Wir waren in der Lage, die RVA-Transkripte 4 Stunden nach der Infektion nachzuweisen (**Abbildung IV**). Die Negativkontrolle zeigte kein entsprechendes Signal.

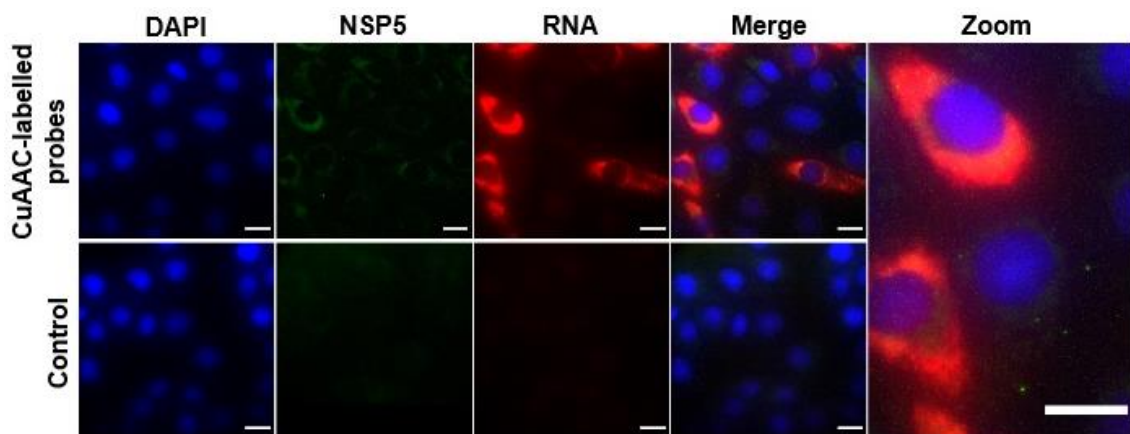


Abbildung IV: Rotavirus-Gen-Segment-7-RNA-Transkripte, die mit CuAAC-Sonden aufgenommen wurden. Oben: RNA-Transkripte (rot) in virusinfizierten Zellen, die das Rotavirus-Nichtstrukturprotein NSP5, das an eGFP (grün) fusioniert ist, stabil exprimieren, nachgewiesen 4 Stunden nach der Infektion. Unten: Mock-infizierte MA104-Zellen, die NSP5-eGFP stabil exprimieren. Skalenbalken: 20 µm.

Im zweiten Teil dieser Arbeit war es Ziel, die Intensität des Fluoreszenzsignals im Ethinyldesoxyuridin (EdU)-Assay^[22] (**Abbildung V**) so zu verbessern, dass mehr proliferierende Zellen detektiert werden können. Zellen, die nach einer bestimmten Kulturzeit in Anwesenheit von EdU, fixiert werden, aber gerade in die S-Phase eingetreten sind, haben noch keine ausreichende Menge an EdU in der neu-synthetisierten DNA eingebaut, und dadurch ist die Anzahl der Farbstoffazide, die daran nach einer CuAAC-Reaktion gebunden werden können, sehr begrenzt. Diese fluoreszenten Farbstoffe bzw. die Zellen, die sich am Anfang der S-Phase befinden, können unter dem Mikroskop nicht detektiert werden. In einer Anti-Krebs-Behandlung können diese Zellen ein entsprechendes Medikament überleben, aber dennoch der Detektion entgehen, was zu fatalen falschen negativen Ergebnissen führt.

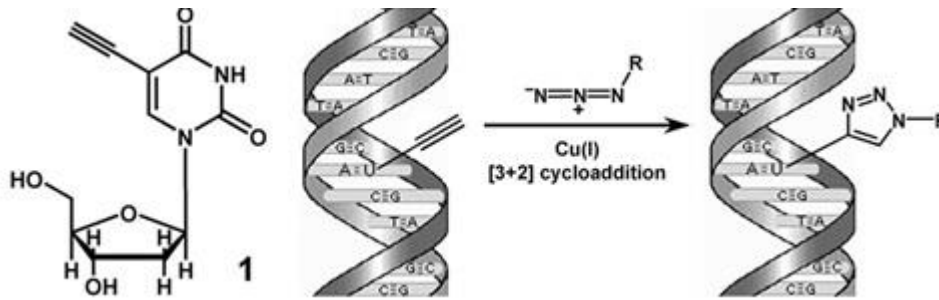


Abbildung V: Der konventionelle Proliferationsassay basiert auf 5-Ethynyl-2'-desoxyuridin (EdU). EdU ist ein Thymidin-Derivat, das eine endständige Alkin-Gruppe trägt. Das Kulturmedium der Zellen kann mit EdU ergänzt werden, das von den Zellen aufgenommen und während der S-Phase in die DNA eingebaut werden kann. Nach dem Fixieren und Permeabilisieren der Zellen können die Alkin-Gruppen über eine CuAAC-Reaktion mit einem Azid reagieren.^[22]

Durch die Erhöhung der Signalintensität bzw. Minderung des Signal-zu-Hintergrund-Verhältnisses können im Prinzip sehr wichtige Informationen über das Proliferationsverhalten der Zellen unter geschilderten negativen Bedingungen erhalten werden. Eine höhere Empfindlichkeit kann durch eine Erhöhung der Alkindichte erreicht werden.

Mittels einer Reihe von Click-Reaktionen konnten in Dendrimern enthaltene Alkin- oder Azidgruppen an die DNA stufenweise angebracht werden. Diese Dendrimere wurden nachfolgend mit fluoreszenten Farbstoffaziden bzw. -alkinen *via* CuAAC markiert. Damit wirken sie somit als Verstärker. Nach zwei Stunden Inkubation mit EdU wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert und mit einem Detergens permeabilisiert. In einem ersten Ansatz wurden Dendrimere mit vier Azidgruppen (Tetraazid-Dendrimer) an die DNA *via* CuAAC angebracht. Nach der Click-Reaktion sollten drei freie Azidgruppen vorhanden sein. Diese sollten in der folgenden CuAAC mit einem fluoreszenten Farbstoff markiert wurden. Durch diesen Ansatz (Doppel-Click) konnten je Alkin drei Farbstoffe binden (**Abbildung VI**).

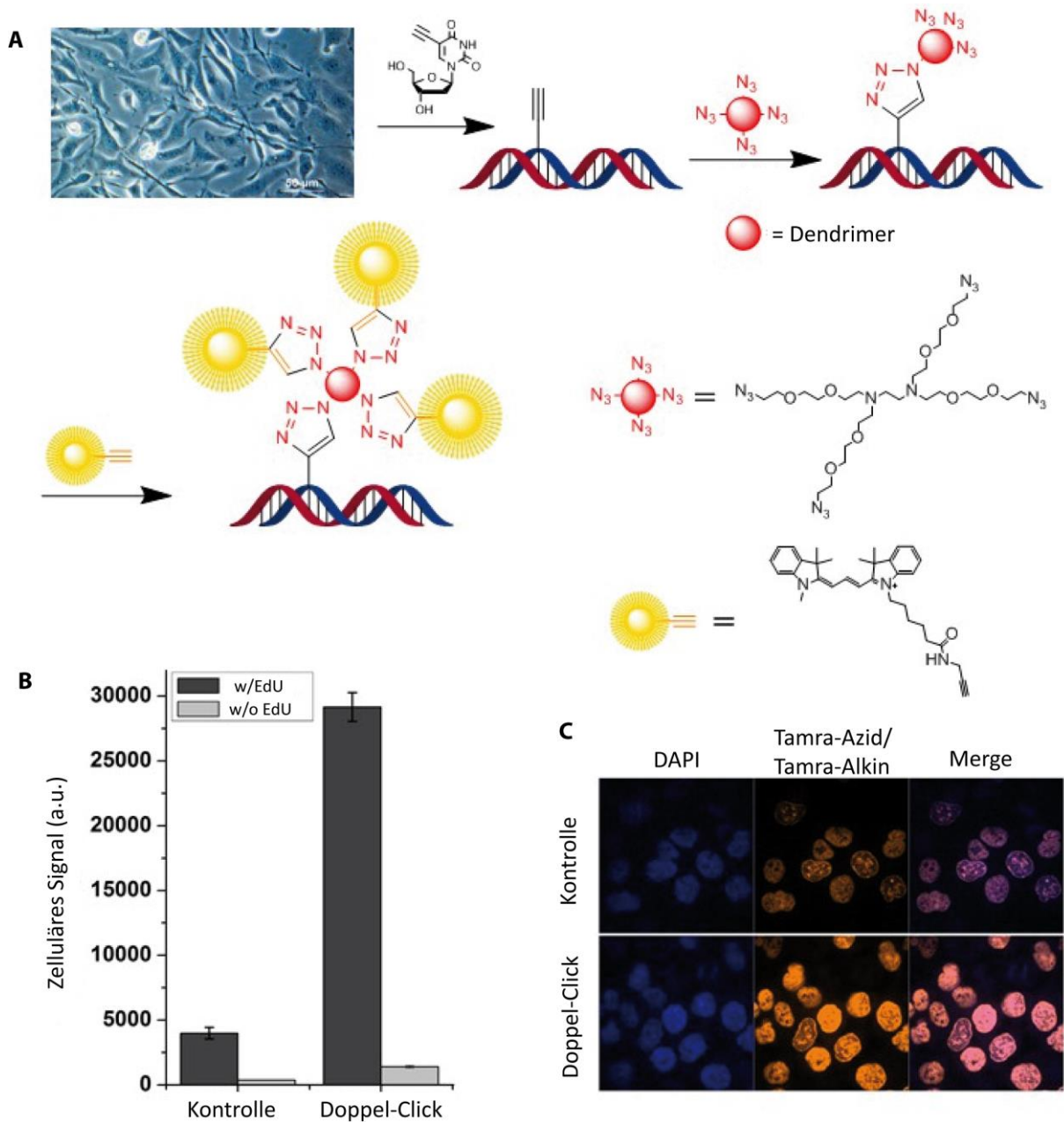


Abbildung VI: **A:** Darstellung des Zellproliferations-Assays mittels der „Doppel-Click“-Reaktion. Die Zellen wurden in Gegenwart von EdU gezüchtet. Nach dem Fixieren und permeabilisieren der Zellen, reagierten die vorhandenen Alkine mit einem Tetraazid-Dendrimer in Gegenwart von Cu(I) (Doppel-Click). Die freien Azidgruppen wurden dann *in situ* via CuAAC-Reaktion mit einem Alkin-modifizierten Farbstoff konjugiert. **B:** Der Kontrollversuch wurde mit dem dendrimerfreien Standard-Proliferationsassay durchgeführt. Das „Doppel-Click“ zeigt eine mehr als vierfache Verstärkung der Signalintensität. **C:** Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen von Zellen, die mit dem Standard-Assay als Kontrolle (oben) und nach der Dendrimer-Amplifikation (unten) nachgewiesen wurden. Maßstäbe: 20 μm .

Im zweiten Ansatz wurden die Tetraazide an die vorhandenen Alkine gebunden, gefolgt von einer zweiten Click-Reaktion, bei der jede der drei freien Azidgruppen mit

je einem zweiten Dendrimer markiert wurde (Dreifach-Click). Das zweite Dendrimer besaß vier Alkingruppen (Tetraalkin). Diese Reaktion ist gefolgt von einer dritten Reaktion, bei der die drei freien Alkingruppen eines Dendrimers mit je einem Farbstoffazid *via* CuAAC reagieren. Dadurch kann jedes Alkin mit neun Farbstoffaziden derivatisiert werden (**Abbildung VII**).

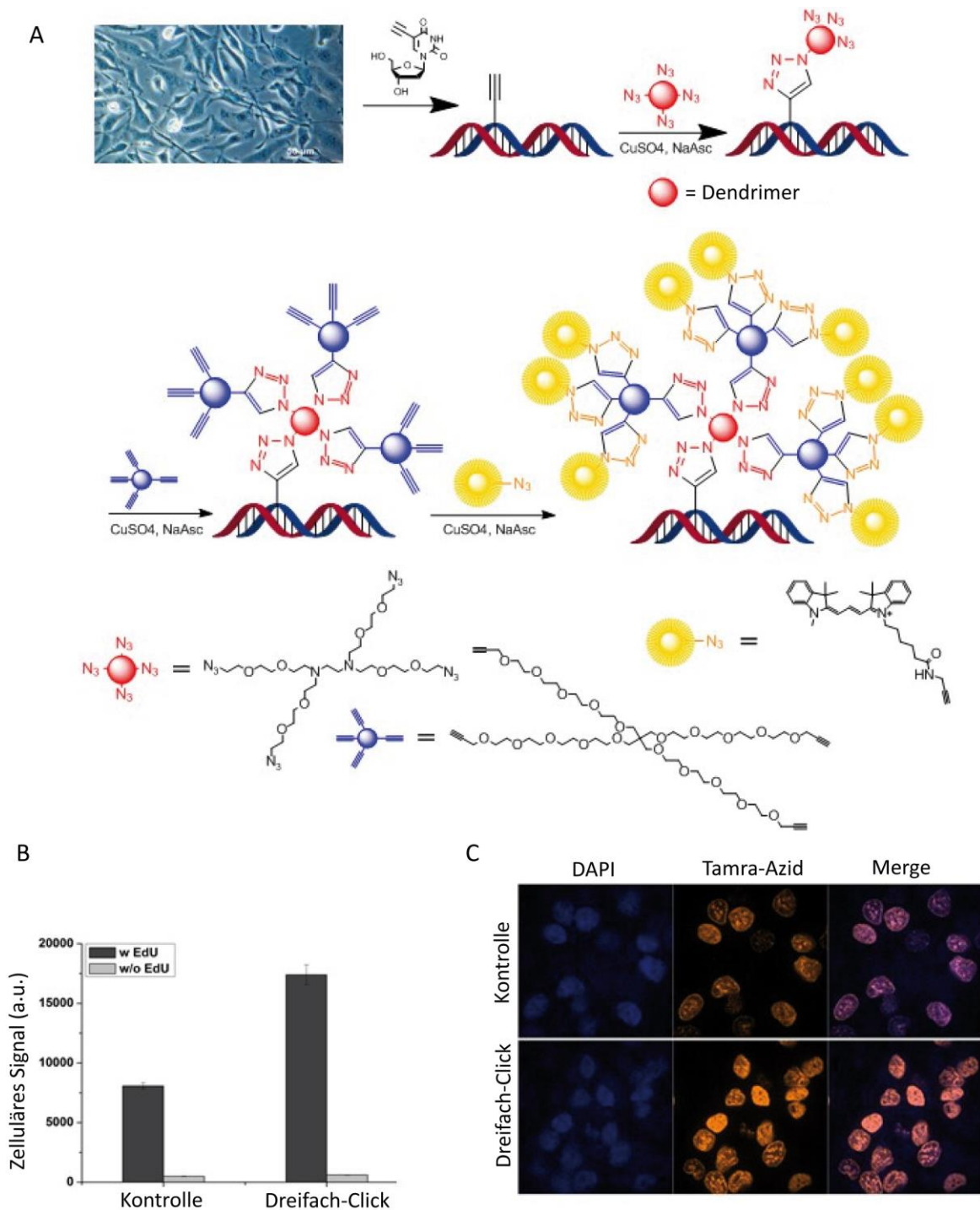


Abbildung VII: **A:** Darstellung des Zellproliferations-Assays mittels der „Dreifach-Click“-Reaktion. Die Zellen wurden in Gegenwart von EdU gezüchtet. Nach der Fixierung und Permeabilisierung wurden die vorhandenen Alkine zunächst mit dem Tetraazid-Dendrimer in Gegenwart von Cu(I) konjugiert. Die

restlichen freien Azidgruppen haben danach mit einem Tetraalkin reagiert. Die doppelt modifizierte DNA (Dreifach-Click) reagierte schließlich mit einem azidmodifizierten Farbstoff unter erneuter Verwendung der CuAAC. **B:** Der Kontrollversuch wurde mit dem Dendrimer-freien Standard-Proliferationsassay durchgeführt. Der Dreifach-Click zeigte eine Verdoppelung der Signalverstärkung. **C:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Zellen, die mit dem Standard-EdU-Assay als Kontrolle (oben) und nach Doppel-Dendrimer-Amplifikation mit Dreifach-Click-Reaktion (unten) nachgewiesen wurden. Maßstäbe: 20 μm .

Die erste Verstärkungsmethode mit Hilfe von Tetraazid und dem Farbstoffalkin lieferte eine Steigerung der Signalintensität im Vergleich zum Kontrollexperiment, bei dem nur einfache Farbstoffazide an die eingebauten Alkine gebunden waren. Die Signalintensität war fast sechsmal höher als die der Kontrolle. Die zweite Verstärkungsmethode, die Dreifach-Click-Reaktion, lieferte ebenfalls eine hohe Signalsteigerung im Vergleich zum Kontrollexperiment. Allerdings war bei der Dreifach-Click-Methode die Intensität geringer als bei der Doppel-Click-Methode. Ein Grund dafür könnte sein, dass die hohe Anzahl fluoreszenter Farbstoffe in einer dichten Umgebung zu einem Ausblenden/Auslöschen des Farbstoffs führt. Je nach gewünschter Vorgehensweise können aber beide Dendrimer-basierten Methoden angewendet werden. Somit wurde das Ziel des zweiten Teils dieser Arbeit ebenfalls erreicht und der erste Dendrimer-basierte EdU-Zellproliferationsassay entwickelt (**Abbildung VIII**).

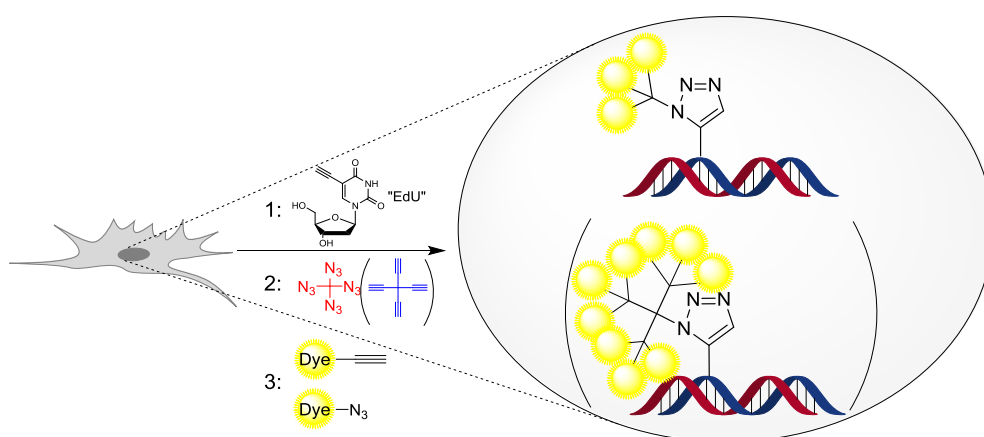


Abbildung VIII: Zusammenfassung des zweiten Teils dieser Arbeit: Die ersten EdU-Proliferationsassays, die auf Dendrimeren basiert sind, wurden entwickelt. Eine zwei- oder dreifache CuAAC-Reaktion kann durchgeführt werden, woraus eine höhere Signalverstärkung resultiert.

Summary

Any disease can be traced back to a genetic disorder.^[1] The methods for the detection of chromosome aberrations are therefore of great importance for diagnostics and therapy purposes.^[2-5] Nowadays, the diagnosis of genetic diseases is based on the detection of the corresponding defective gene or on the measurement of either the corresponding transcript by quantitative real-time PCR (RT-qPCR)^[6, 7] or the corresponding protein *via* mass spectrometry^[8, 9]. Flow cytometry is also used as standard method to detect, measure and quantify surface proteins specific for cancer cells. Flow cytometry is mainly used in diagnosis for analysis of the cell cycle. One advantage of this is the simultaneous analysis of a large number of cells (e.g. blood cells). A deviation in the cell proliferation rate or an anomaly in cell proliferation indicates a genetic disorder of the cells.^[10] Although these methods are well established and used in almost every diagnostic laboratory, they remain indirect gene detection methods. Direct information is obtained using fluorescence *in situ* hybridisation (FISH), which makes it possible to visualise the relevant genes *in situ*.^[11] Thus, a target gene (sample) is marked with a fluorescent probe and detected in its original position within the cell.^[12] Important information that can be lost by breaking down the cells and isolating the DNA or RNA is retained with FISH. It makes it possible to obtain information at the level of individual cells.^[13] In addition, expression activity can be differentiated from one cell to another. Expression pattern of active cells are differentiated from those that are silent. Fluorescence microscopy is used to visualize these probes.^[14, 15] This detection limit of mutated cells is a serious problem, because cancer patients must be medically checked regularly despite the first signs of success after therapy. Only after five years without relapse of the disease (remission) can the physicians and the concerned patients speak about therapeutic success.^[16] Despite the development of new dyes and numerous methods for fluorimetric microscopy, which offer an improved signal-to-background ratio, detection is still limited. These methods are based on the production of samples, which are randomly and unquantitatively labelled. The inaccurate limited labelling gives inconsistent probe preparations which provides differences in results. Another problem is the cell itself, which could contain a genetic mutation but do not express it.

In this work the Cu(I)-catalysed alkyne-azide cycloaddition (CuAAC) on nucleic acids and on DNA, which was developed in the group of Thomas Carell, was used to develop

new fluorescence labelled probes, that offer better sensitivity and a lower signal-to-background ratio.^[17-20] In the first part of this thesis, a proof of concept for the CuAAC based RNA-FISH method was developed. The aim of developing this method was to focus at the transcripts, since their number in the cell is always higher than the number of the corresponding genes. If DNA segments of mutated cells are to be detected, the number of these cells in the blood, for example, is very low, and then they escape the detection. When switching on the mRNA level, this problem could be solved because there are more mRNA molecules present. For the development of the new method, the 720-mer long mRNA of the enhanced green fluorescent protein (eGFP) was defined as a target and 10 anti-sense oligonucleotides (complementary to the target) were designed (a probe set). Each oligonucleotide had 22 nucleotides and three alkyne groups, each coupled to a dye-azide by a CuAAC-reaction. The success of the click reaction was determined using HPLC and MALDI-TOF. Both eGFP-stable and human cells transfected with an eGFP-vector were used for the experiments (**Figure I**).

In a first approach, the prepared probes containing dye-azides were transfected into fixed and permeabilized cells were hybridised *in situ* with the target mRNA molecules (click *pre*-hybridisation). In a second approach, the set of free alkynes was first introduced into the cells and then hybridized with the mRNA. Subsequently, an *in situ*

CuAAC reaction was followed to provide each of the free alkynes with a dye azide (click *post*-hybridisation).

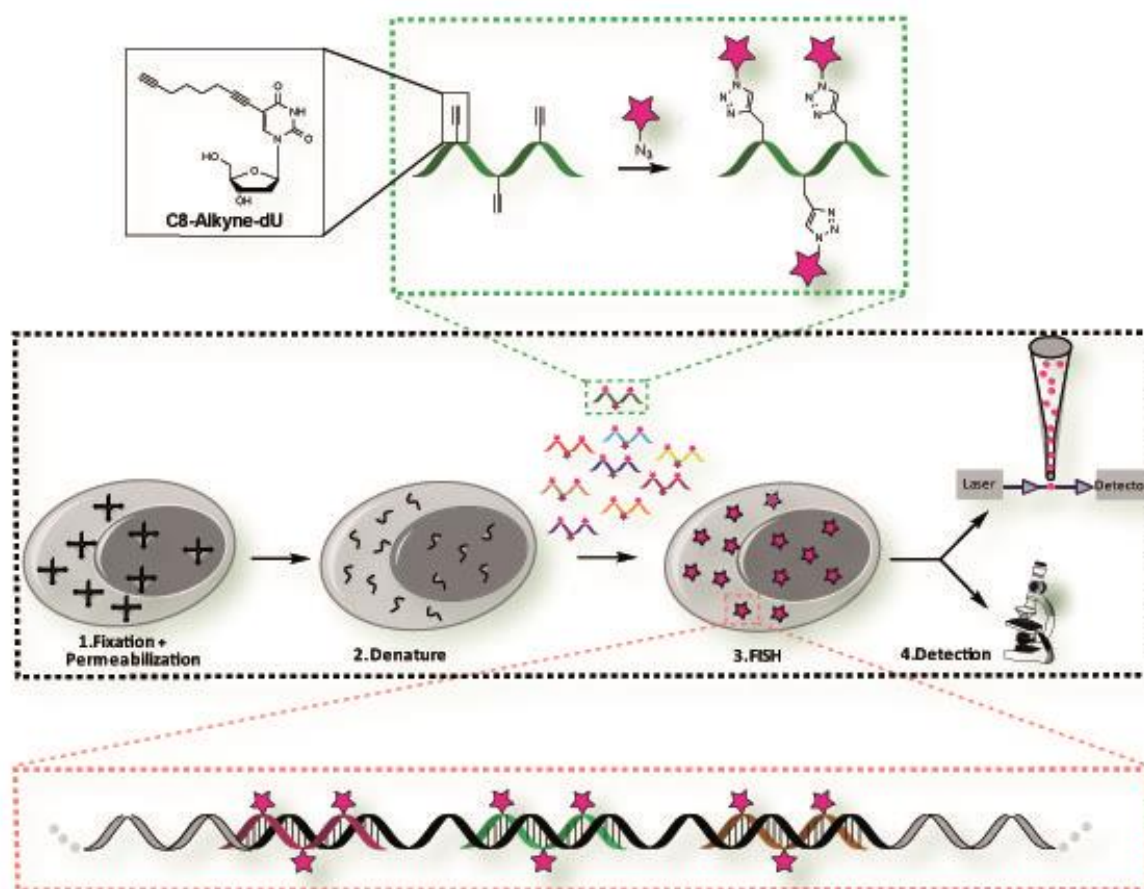


Figure I: The protocol for mRNA-FISH with CuAAC-labelled Probes. Ten oligonucleotides with each three alkyne modifications were individually conjugated with a fluorescent dye azide *via* a CuAAC-reaction. The oligonucleotides were purified by ethanol precipitation and mixed to get a probe set. After the cells were fixed and permeabilised, the mRNA molecules were denatured. The probe set is added to the cells in the hybridisation buffer. *In situ* hybridisation lasts from four to several hours. After washing the excess of unbound probes, the mRNA molecules can be detected by flow cytometry and/or microscopy.

The commercially available mRNA-FISH probe set from market leader Stellaris® based on a work by Raj *et al.*^[21] was used as a positive control. All steps in the mRNA-FISH protocol were tested and optimized for the samples generated by the CuAAC-reaction. A number of screening tests were performed. 1. the optimal concentration of the probe set and the optimal duration and temperature of hybridisation were developed. 2. The number of oligonucleotides that were needed and washing steps as well as washing solutions after hybridisation or CuAAC *in situ* were optimized. **Figure II** shows the results of the two CuAAC-based mRNA-FISH concepts using eGFP-

mRNA as a target. **Figure II-A** shows the results of click-*pre*-hybridisation. A direct comparison between the CuAAC-probes and the commercially available ones shows that an increase in signal intensity was achieved with the new samples. The signal of the CuAAC-probes is almost three times higher than the signal of the commercial one. The background caused by the non-specific bonds of the CuAAC-probes is higher than the control, but the general signal-to-background ratio is strongly increased and the detection of the individual molecules and their quantification are possible without complicated deconvolution software. The individual eGFP-mRNA molecules are visible in the microscope images. The cells that do not express eGFP (no green signal) also showed no red signal and therefore no mRNA molecules. **Figure II-B** shows the results of click-*post* hybridisation. The best amount of the dye for the click reaction was determined. This method has also enabled us to obtain a good signal intensity of mRNA molecules *in situ*.

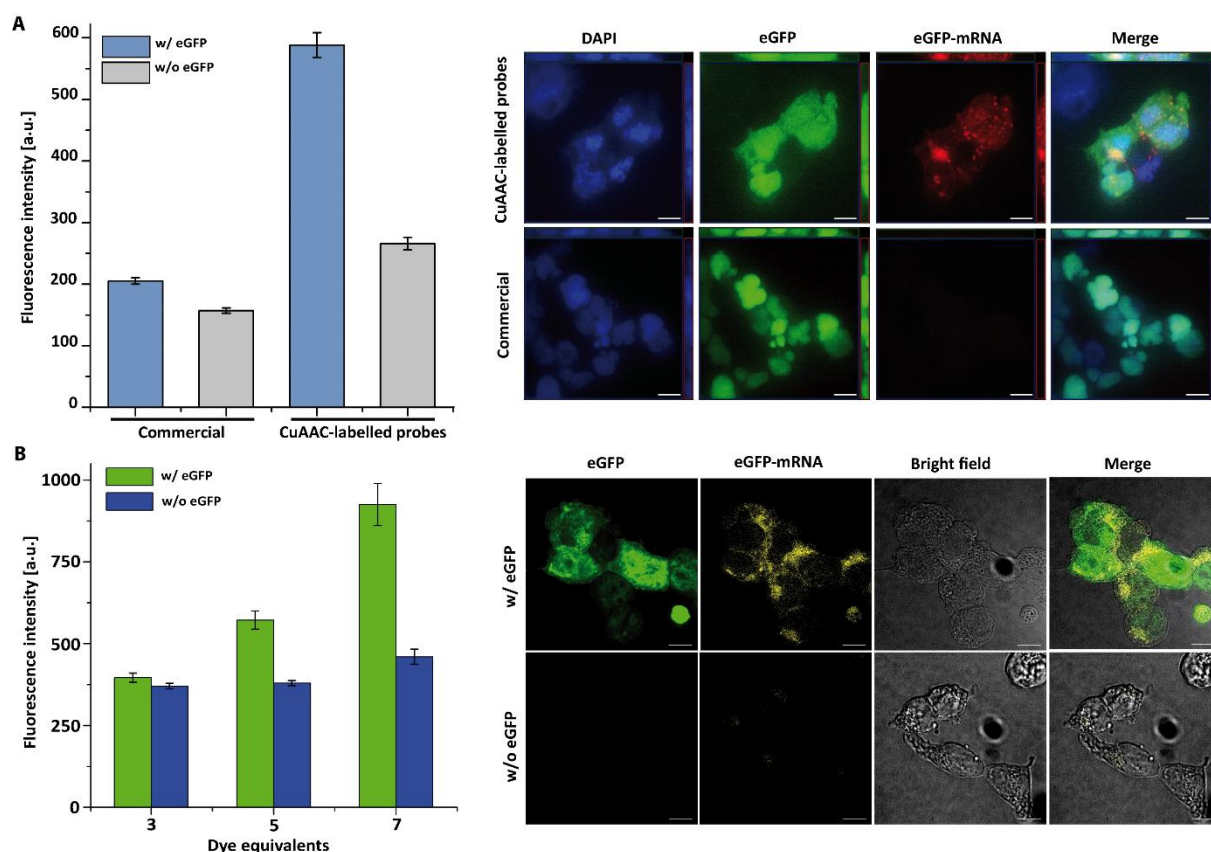


Figure II: Comparison of CuAAC with commercial probes for mRNA-FISH. **A:** HEK-293T cells were transfected with an eGFP-expressing plasmid. Cells without eGFP were used as controls. After fixation and permeabilisation, hybridisation was performed with either red-marked CuAAC or commercial probes against eGFP-mRNA. Cells without eGFP were also treated with the probes to determine their background (unspecific binding). The signal intensity of both samples was measured. The microscopic

images are a projection of ten z-stacks of the cells. The CuAAC probes can be detected as small red diffraction-limited spots after the background has been subtracted. Negative control shows no significant specific signal. **B:** HEK-293T cells were hybridised with the alkine modified oligonucleotides against eGFP-mRNA. This was followed by a CuAAC reaction *in situ*. Based on the number of dye equivalents, it was also possible to achieve a good signal-to-background ratio with this method.

In addition to the analyses using fluorescence microscopy, the compatibility of the newly developed protocol with flow cytometry was tested. It was shown that the CuAAC-based probes are not only compatible for flow cytometry, but also provide a good signal. This signal could even be achieved with 75% less probe amount than with the standard protocol (**Figure III**).

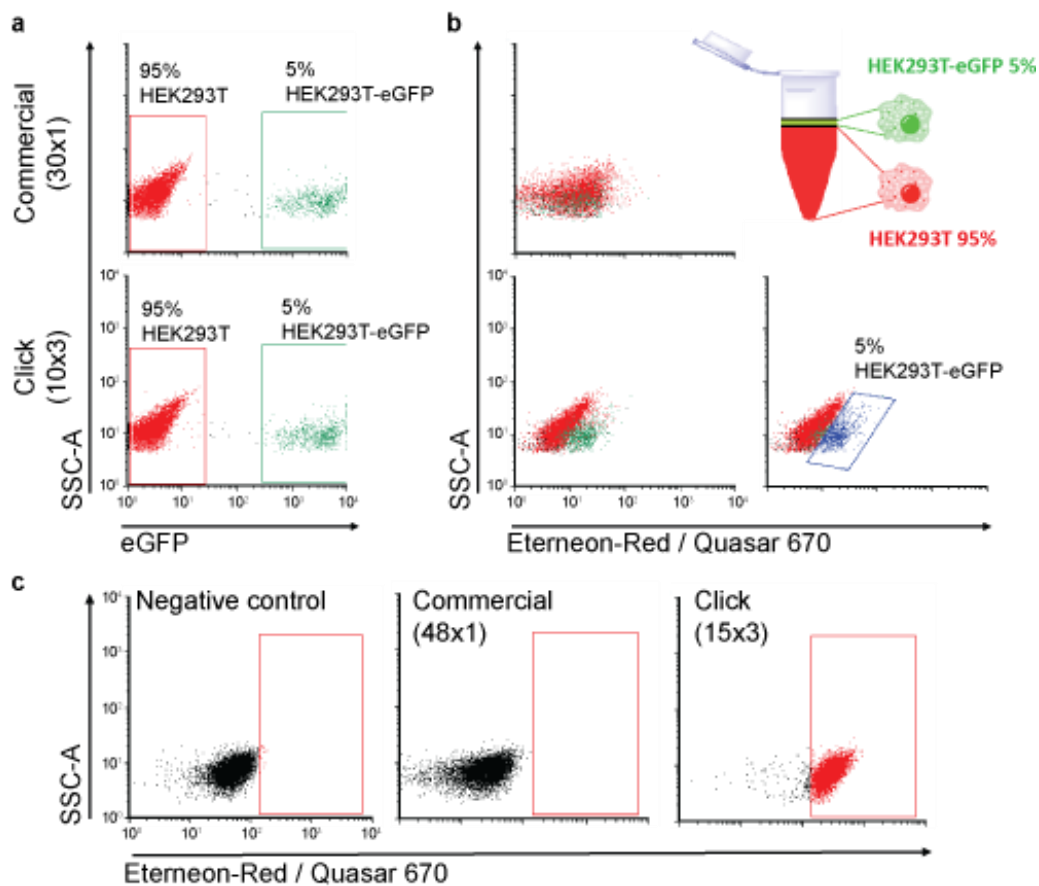


Figure III: Flow cytometry analysis. **a:** 5% HEK293T-eGFP and 95% HEK293T were mixed in a suspension in which hybridisation with the commercial and CuAAC-labelled samples against eGFP-mRNA was performed. The flow cytometry analysis showed that the CuAAC-labelled samples give a remarkable shift of the signal. **b:** Using the commercial probes, this shift is only possible, if the fourfold amount of the probes is used. **c:** Flow-FISH was also used to detect endogeneous ABL transcript. In the negative controls, cells were treated only with hybridisation buffer to determine the autofluorescence of the cells.

The next question was, if the new probe design enables imaging of challenging RNA targets which can not be easily imaged using conventional FISH probe designs, for example highly structures RNA carrying only limited stranded regions for probe binding. Using conventional FISH probe design, such RNAs can not detectable. We investigated this question by targeting a ~1 kb RNA viral transcript, produced from the rotavirus A (RVA) gene segment-7. We planned to detect this transcript shortly after virus infection, when the concentration of the transcript is expected to be very low. This specific target has additionally extensive secondary structure that provided only few probe strand binding sites. For the experiment, we fixed rotavirus-infected cells, 4 hours post infection and incubated them with the CuAAC-probe set. To facilitate the detection of virus-infected cells, we took advantage of a stable cell line that expresses the rotavirus non-structural protein (NSP5) fused to eGFP and a mock-infected MA104 cell line. We were able to detect the RVA transcripts 4 hours post infection (**Figure IV**). The negative controle did not show any corresponding signal.

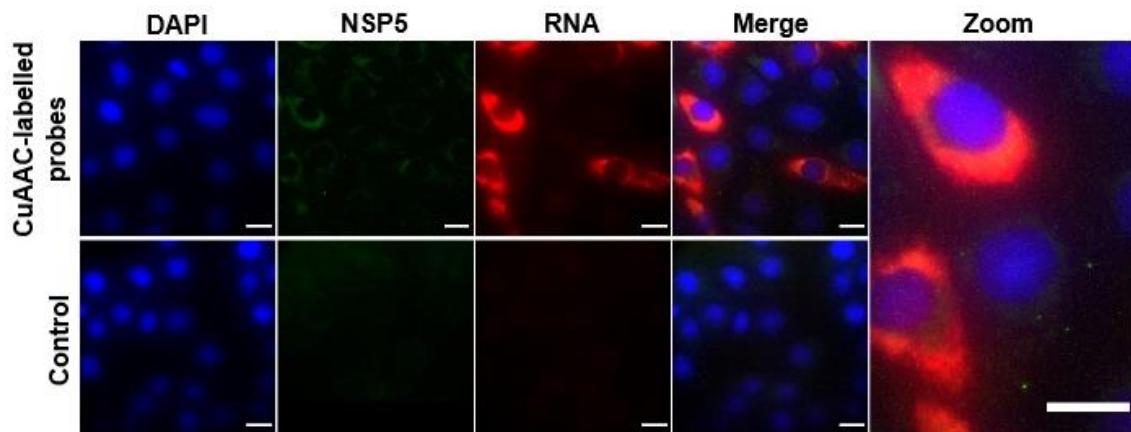


Figure IV: Rotavirus gene segment-7 RNA transcripts imaged with CuAAC-probes. Upper panel: RNA transcripts (red) in virus-infected cells stably expressing rotavirus non-structural protein NSP5 fused to eGFP (green) detected 4 hours post infection. Lower panel: Mock-infected MA104 cells stably expressing NSP5-eGFP. Scale bars: 20 μ m.

In the second part of this work, the aim was to improve the intensity of the fluorescence signal in the ethynyldeoxyuridine (EdU) assay^[22] (**Figure V**) so that more proliferating cells could be detected.

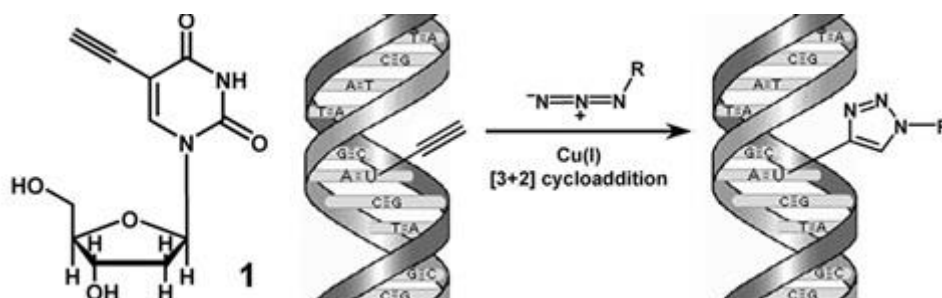


Figure V: The conventional proliferation assay based on EdU, which is a thymidine analogue carrying a terminal alkyne group. The culture medium of cells can be supplemented with EdU, which can be uptaken by cells and incorporated into DNA during its synthesis (S-phase). After fixation and permeabilization of cells, the alkyne groups can react with an azide *via* a CuAAC-reaction.^[22]

Cells that are fixed after a certain culturing time in the presence of EdU but have just entered the S-phase do not yet have a sufficient amount of EdU built into the newly synthesised DNA. Therefore, the number of alkynes and the number of dye azides that reacted after a click reaction is very low. These fluorescent dyes or rather the cells cannot be detected under the microscope at the beginning of the S-phase. In the case of an anti-cancer treatment, these cells can still survive but they escape detection, which leads to false positive results. By increasing the signal intensity or reducing the signal-to-background ratio, important information about the proliferation behaviour of the cells can be determined. This could be done by increasing the number of alkynes. By means of a sequence of click reactions, dendrimers containing alkyne or azide groups were developed and bound to the DNA in different stages. These dendrimers were in turn labelled with fluorescent dye-azides or -alkynes *via* CuAAC and thus they acted as amplifiers. After two hours incubation with EdU, the cells are fixed with paraformaldehyde and permeabilised with a detergent. In a first approach, dendrimers with four azide groups (tetraazide dendrimers) were reacted to the alkynes built into

the DNA *via* CuAAC. After the click reaction, free azides were labelled with a fluorescent dye in a subsequent CuAAC. This approach (double click) indeed allowed the conjugation of an alkyne group with three dyes (**Figure VI**).

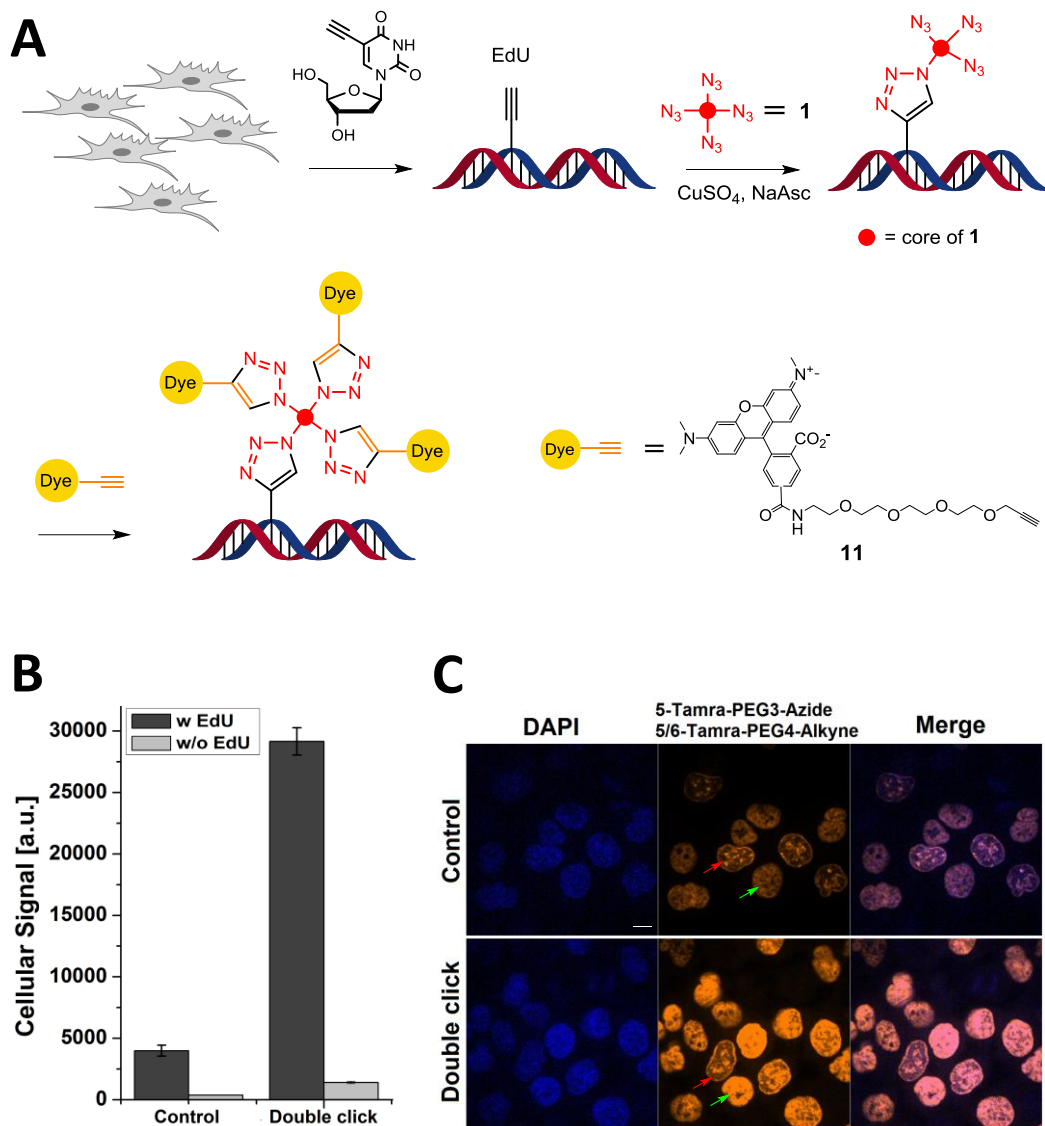


Figure VI: **A:** Representation of the cell proliferation assay using the "double click" reaction. The cells were cultured in the presence of EdU. The cells were fixed and the alkyne groups present reacted with a tetraazide dendrimer in the presence of Cu(I) (double click). The DNA, which has several azide groups, is then detected *in situ* with an alkyne-modified dye using the CuAAC reaction again. **B:** The control experiment is performed with the dendrimer-free standard proliferation assay. The "Double Click" shows more than four times the amplification of the signal intensity. **C:** Fluorescence microscopic images of cells detected with the standard assay as a control (above) and after dendrimer amplification (below). Red arrows show cells in the early S-phase with partial EdU incorporation. Green arrows show cells in the late S-phase, in which DNA synthesis is almost complete and EdU is built into the entire genome. Scales: 20 μ m

In a second approach, the tetraazides were bound to the alkynes present, followed by a second click reaction, in which each of the three free azide groups were labelled with a second dendrimer (triple click). The second dendrimer had four alkyne groups (tetraalkyne). This reaction is then followed by a third reaction in which the three free alkyne groups of a dendrimer react with one dye azide each *via* CuAAC. As a result, nine dye azides can be bound to each alkyne (**Figure VII**).

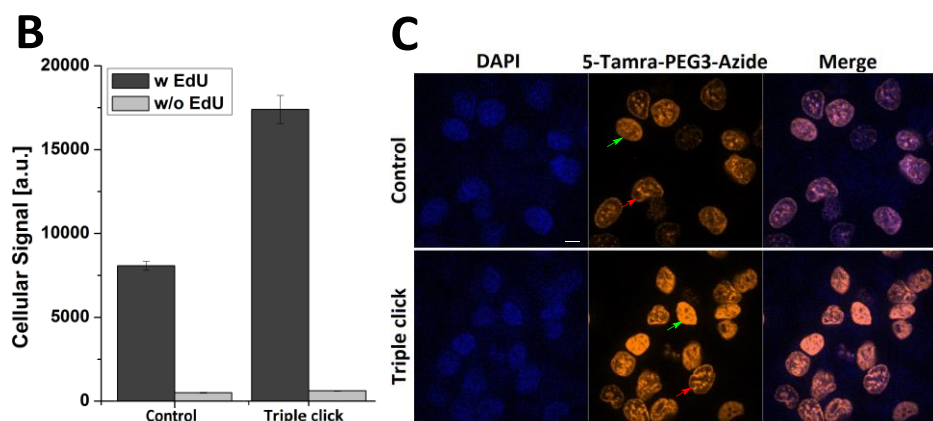
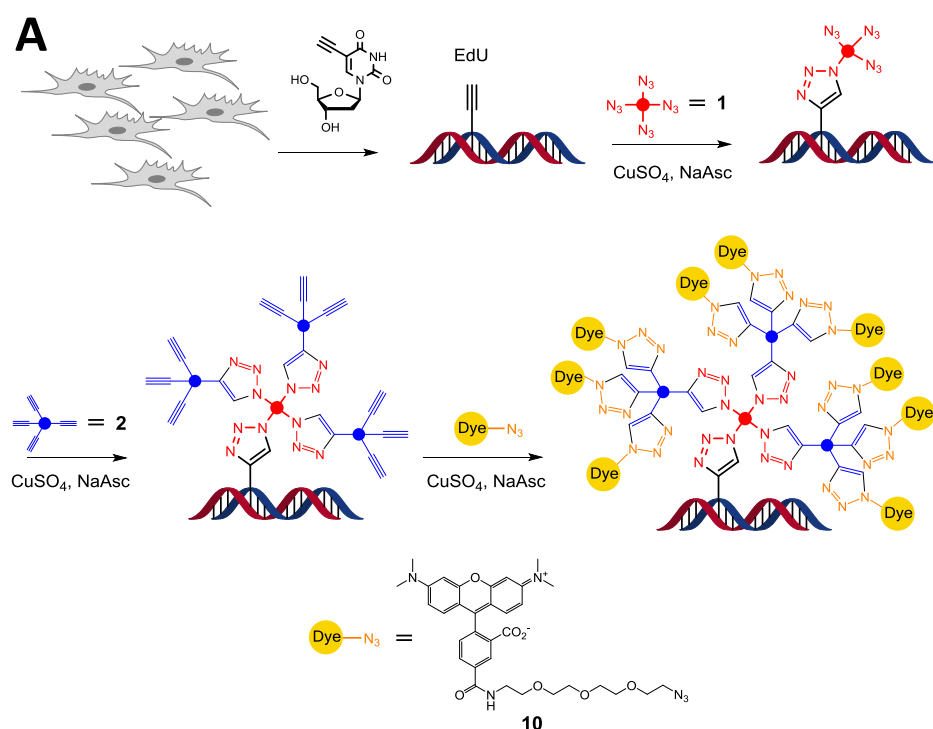


Figure VII: Representation of the cell proliferation assay using the "Triple Click" reaction. **A:** The cells were cultured in the presence of EdU. After fixation and permeabilisation of cells, the alkynes present are first reacted with the tetraazide dendrimer in the presence of Cu(I). The remaining free azide groups are then reacted with a tetraalkyne. The double modified DNA (Triple Click) is finally detected with an azide-modified dye using CuAAC again. **B:** The control experiment is performed with the dendrimer-free standard proliferation assay. The triple click shows a doubling of the signal amplification. **C:**

Fluorescence microscopic images of cells detected with the standard EdU assay as control (above) and after double dendrimer amplification with triple click reaction (below). Red arrows show cells in the early S-phase. Green arrows show cells in the late S-phase. Scales: 20 μm

The first amplification method using a tetraazide and dye alkyne provided an increase in signal intensity compared to the control experiment, in which only simple dye azides were bound to the built-in alkynes. The signal intensity was almost six times higher than the control. The second amplification method, the triple click reaction, also delivered a higher signal compared to the control experiment. However, with the triple click method the intensity was lower than with the double click method. One reason for this could be the high number of fluorescent dyes, which results in self-quenching of the dye in a dense environment. Nonetheless, both dendrimer-based methods can be used, depending on the desired procedure. Thus, the objective of the second part of this thesis was achieved and the first dendrimer-based EdU cell proliferation assay was developed (**Figure VIII**).

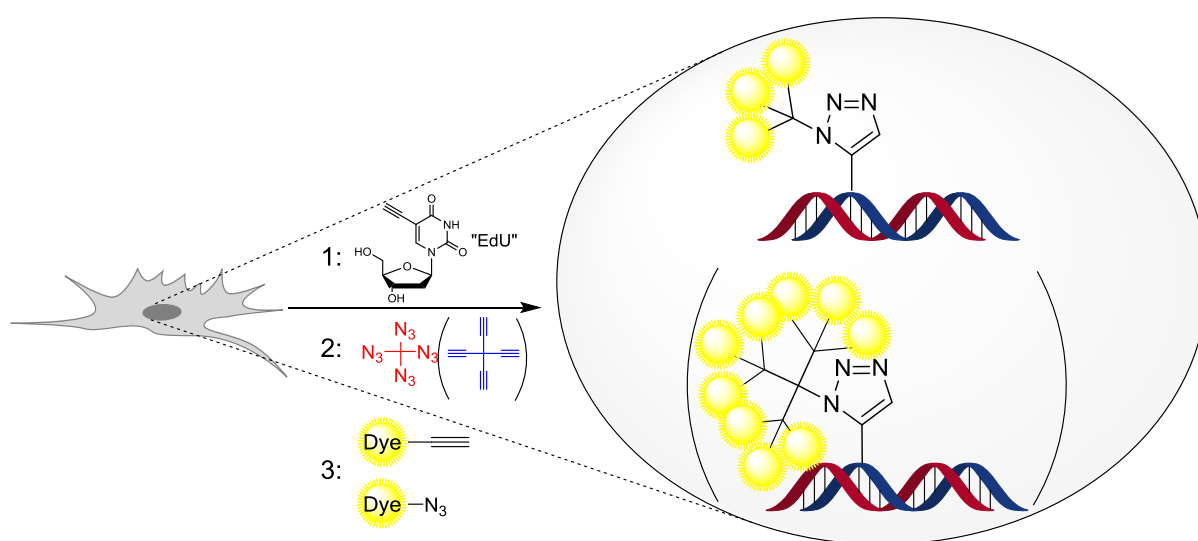


Figure VIII: Summary of the second part of this work: The first EdU-proliferation assays based on dendrimers have been developed. A single or double CuAAC-reaction can be performed resulting in higher signal amplification.

1. Einführung

1.1 Molekulare Einsicht in genetischbedingte Krankheiten am Beispiel von Leukämie

1.1.1. Die Anatomie der Chromosomen und ihre Aberrationen

Auch wenn für jede Erkrankung ein anderer Grund existiert, ist der Ursprung fast aller Krankheiten auf genetische Fehlsteuerungen zurückzuführen, die u.U. umweltbedingt sind. Auch Krebs ist eine genetische Krankheit. Gene sind Teilabschnitte der Desoxyribonukleinsäure (DNA), die abgelesen d.h. transkribiert werden können, um funktionelle Proteine zu synthetisieren. Diese Proteine haben eine essentielle Rolle bei der planmäßigen Tätigkeit der Zelle wie z.B. dem korrekten Ablauf des Zellzyklus. Sie sind essentiell für die regelgerechte Funktionalität des Körpers. Manche Proteine entscheiden über Leben und Tod der Zelle, indem sie das genetische Material und die Vererbung an die Tochterzellen exakt kontrollieren. Tritt ein Fehler bei der DNA-Synthese auf, müssen manche Proteine der Zelle den Befehl geben, ihn zu reparieren. Wenn die Zelle dazu nicht fähig ist, muss sie in die Apoptose geleitet werden, so dass die Weitergabe falscher Informationen an die Tochterzelle mit den damit verbundenen fatalen Konsequenzen in Form von z.B. Krebs oder Polyploidie vermieden wird.^[23-31]

Jedes von insgesamt ca. 22.000 menschlichen Genen liegt auf einem definierten Abschnitt der DNA und hat einen bestimmten Ort auf einem der 23 Chromosomen^[32] einer Zelle. Jede Abweichung von diesem programmierten Rahmen hat gravierende Folgen für die Stabilität des Genoms und die Funktion der Zelle. Im Rahmen der Zytogenetik werden die Struktur, Anzahl und Funktionen von Chromosomen studiert und Anomalien definiert, damit resultierende Krankheiten diagnostiziert werden können. Die Nomenklatur der Chromosomen obliegt dem Internationalen System für humane zytogenetische Nomenklatur ISCN (*International System for Human Cytogenetic Nomenclature*), das 1960 etabliert wurde.^[33] Chromosomen können unter normalen Bedingungen unter dem Lichtmikroskop nicht gesichtet werden, da sie nicht genug kondensiert sind. Nur während der Metaphase oder späten Prophase erscheinen charakteristische Strukturen. Daher werden Zellen speziell behandelt, damit sie in diese bestimmten Phasen kommen und dort gestoppt werden.^[34] Eine normale somatische menschliche Zelle besitzt 22 autosomale Chromosomenpaare und zwei Geschlechtschromosomen XX bei Frauen und XY bei Männern, insgesamt also 46 Chromosomen (**Abbildung 1**).^[35]

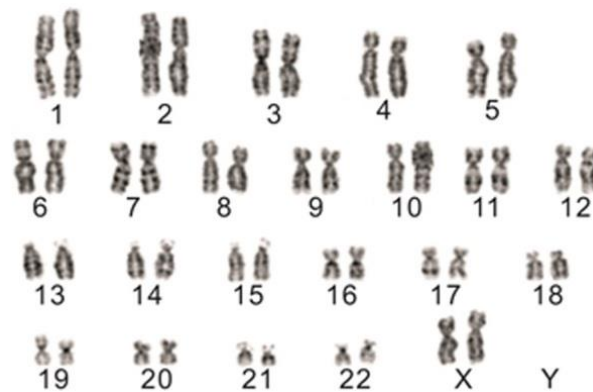


Abbildung 1: Der Karyotyp einer menschlichen somatischen und gesunden Zelle. Die 22 autosomalen Paare und 2 X-Chromosomen einer weiblichen Person sind abgebildet. Anhand des Karyotypes können Aberrationen und Mutationen erkannt werden.^[35]

Die in **Abbildung 1** gezeigten Chromosomen wurden mittels des sogenannten Giemsa-Banding (G-Banding) zugeordnet, was es mithilfe des Farbstoffes Giemsa ermöglicht, Chromosomen anhand der Anzahl und Helligkeit ihrer Banden zu identifizieren. Jedes Chromosom besitzt ein definiertes und charakteristisches Bandenmuster.^[36] Die Zellen werden dafür in Kultur gehalten und synchronisiert, so dass alle gleichzeitig in die Mitose eintreten. Anschließend werden sie mit Colchicin behandelt, um sie in der Metaphase zu blockieren, indem die Mikrotubuli zerstört werden. Somit werden die Zellen in einer Phase gehalten, in der die Chromosomen kondensiert und sichtbar sind. Nach einer Behandlung mit einer hypotonischen Lösung zur Permeabilisierung der Membranen und einer Fixierung mittels eines Essigsäure-Methanol-Gemisches zur Erhaltung der Strukturen der Biomoleküle werden die Zellen auf einem Mikroskopieglas angehaftet. Anschließend erfolgt eine Behandlung mit Natriumhydroxid (NaOH) und Natriumcitrat mit steigender Konzentration, was dann diese spezifischen Chromosomenmuster ergibt.^[37] Bevor diese G-Banding-Methode entwickelt wurde, waren die Chromosomen nur anhand ihrer äußeren Struktur charakterisierbar.

Tatsächlich besteht jedes Chromosom aus zwei Armen: einem kurzen, dem sogenannten p-Arm, und einem langen, dem sogenannten q-Arm. Beide Arme sind am Zentromer miteinander verbunden. Die Länge beider Arme ist von einem Chromosom zum anderen unterschiedlich. Jeder Arm besteht aus einem oder mehreren Segmenten, die wiederum aus einer oder mehreren Banden bestehen.

Durch all diese Informationen kann man ein Chromosomenband anhand der Nummer des entsprechenden Chromosoms, des Arms, der Region und des Platzes in dieser Region benennen.^[34, 38, 39] Ein Beispiel dafür ist 4q85. Diese Zahl bedeutet Chromosom 4, langer Arm, Region 8 und Band 5.

Jede Abweichung in der Struktur oder Anzahl eines Chromosomensets kann fatale Konsequenzen haben. Chromosomenaberrationen sind der Ursprung von Genderegulierungen und haben die Destabilisierung des Genoms sowie das Eintreten von Krankheiten zur Folge.^[40-45] Im Katalog von Felix Mittelman für Chromosomenaberrationen bei Krebs befinden sich mehr als 7.100 Referenzen mit ca. 100.000 Aberrationen, die mit Krebs verbunden sind.^[36] Chromosomen können zwei Arten von Aberrationen aufweisen: Strukturelle Umgestaltung (englisch *rearrangement*) und numerische Veränderung (**Abbildung 2**).^[40, 46]

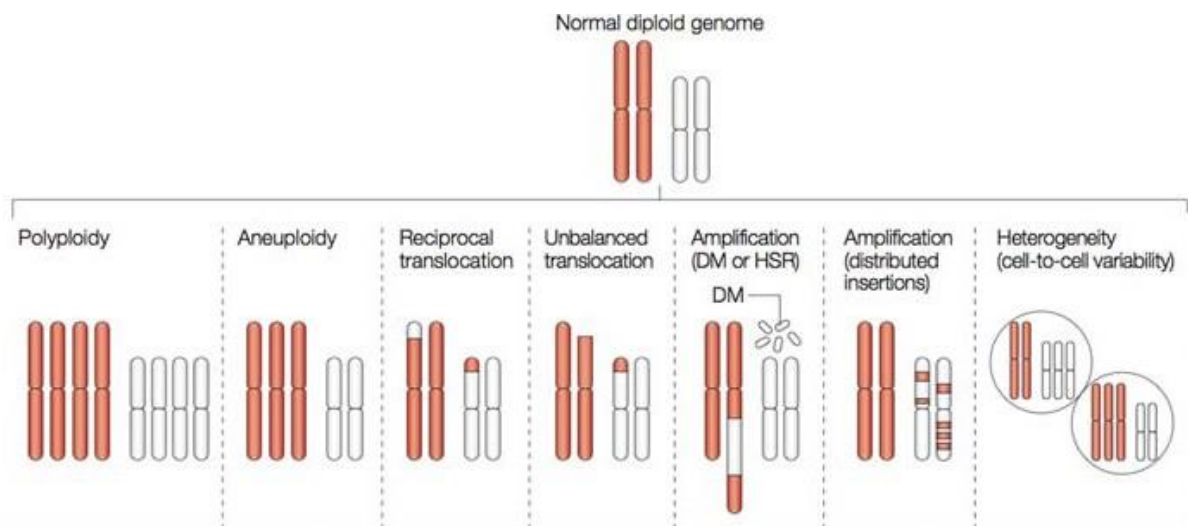


Abbildung 2: Chromosomenaberrationen. Chromosomen können zwei Haupt-Aberrationen aufweisen: Strukturelle z.B. die Translokation oder Amplifikation und numerische Veränderungen z.B. Polyploidie oder Aneuploidie. Zu Vergleich sind in der oberen Ebene gesunde diploide Chromosomen zu sehen.^[40]

Bei der strukturellen Umgestaltung, auch balancierte Aberration genannt, handelt es sich entweder um einen Gewinn oder einen Verlust vom DNA-Material innerhalb eines Chromosoms. Zu diesen Aberrationen gehören z.B. Deletionen (del), Inversionen (inv), Translokationen (trans) und Insertionen (ins). Bei der Deletion handelt es sich darum, dass ein Teil des Chromosoms abbricht und verloren geht. Wenn dabei z.B. ein Tumorsuppressorgen entfernt wird, kann daraus Krebs in letzter Konsequenz entstehen.^[47] Inversion heißt, dass eine Rotation eines Chromosomenabschnitts um 180° stattfindet. Wenn ein Teil von einem Chromosom A abgespalten wird und am selben Chromosom A oder am Chromosom B inseriert wird, spricht man von einer Insertion. Translokation heißt, dass das Material zwischen zwei oder mehreren Chromosomen ausgetauscht wird. Ein Beispiel dafür ist das berühmte Philadelphia-Chromosom (Ph), das das Ergebnis einer Translokation zwischen den Chromosomen Nummer 9 und Nummer 22 darstellt.^[48] Das resultierende Fusionsgen befindet sich zwischen der „*break cluster region*“ (BCR) und dem „*avian blastica leukemia*“ Protein (ABL) und heißt BCR-ABL.^[39] Das Fusionsgen kodiert für eine deregulierte Tyrosinkinase, die ständig aktiviert ist und mit Tyrosinkinase-Inhibitoren z.B. Imatinib behandelt werden kann. Dieses aberrante Protein ist für die chronische myeloische Leukämie (CML) verantwortlich. Das Fusionsprotein kann Proteine aktivieren, die für die Kontrolle des Zellzyklus zuständig sind. Somit können Zellen ohne jegliche Kontrolle kontinuierlich proliferieren, was die Basis für die Entstehung von Krebs ist.^[49]

Bei der numerischen Veränderung, auch unbalancierte Veränderung genannt, handelt es sich um den Verlust oder Gewinn eines oder mehrerer Chromosomen. Dabei verändert sich das gesamte zelluläre genetische Material. Numerische Aberrationen repräsentieren 15% der Chromosomenanomalien aller hämatologischen Krankheiten.^[38] Eine numerische Aberration ergibt einen Verlust der Heterozygotie (Anwesenheit zweier Chromosomensätze oder Diploidie).^[50] Beispiele für die Genamplifikation sind Duplikationen oder Triplikationen eines oder mehrerer Chromosomen. Charakteristisch für hämatologische Krankheiten ist z.B. die Trisomie (Zellen mit einem zusätzlichen Chromosom).^[51-53] Trisomie ist nicht nur verantwortlich für das *Down*-Syndrom (Trisomie 21), sondern ist der zweithäufigste Gendefekt in der akuten myeloischen Leukämie (AML) (Trisomie 8).^[51, 52, 54]

Der Verlust des Chromosomenmaterials tritt bei Monosomie (Verlust eines Chromosoms) auf.^[55, 56] Dies kann während der Zellteilung in der Metaphase

passieren, wo eine Missegregation der Schwesterchromatiden eines Chromosoms stattfindet, so dass eine ungleiche Chromosomenaufteilung auftritt.^[41]

1.1.2. Zytogenetik in hämatologischen Krankheiten: Spezial-fall Leukämie

Wie viele Chromosomenaberrationen es gibt, die für die Krebsentstehung verantwortlich sind, weiß man noch nicht genau. Bekannt sind bis heute ca. 350 Genaberrationen.^[57] Neben dem berühmten obengenannten Philadelphia-Chromosom, das für CML verantwortlich ist und als „Markenzeichen“ von CML gesehen wird^[58, 59], existieren eine Reihe weiterer Chromosomenaberrationen, die zu hämatologischen Krankheiten führen.^[40, 60-70] Aus vielen dieser Aberrationen kann man vorhersagen, wie die Krankheit sowie die Therapie ablaufen wird. Manche Anomalien sind tödlich und nicht therapierbar.^[71-78]

Im Gegensatz zu den für AML charakteristischen Aberrationen z.B. $t(8;21)(q22;q22)$, $t(15;17)(q22;q12)$, $inv(16)(p13.1q22)$, $t(16;16)(p13.1q22)$,^[3] die eine günstige Prognose haben, gibt es Anomalien wie z.B. $t(1;22)(p13;q13)$, $inv(3)(q21q26.2)$, $t(3;3)(q21;q26.2)$ oder $t(6;9)(p23;q34)$, die eine schlechte Zukunftsprognose mit sich bringen.^[3, 79] Für die akute lymphatische Leukämie (ALL), die meistens im Alter zwischen einem und fünf Jahren eintritt, sind folgende Aberrationen charakteristisch: $t(9;22)(p120)$ bei Erwachsenen und $t(12;21)$ bei Kindern. Eine charakteristische numerische Veränderung bei ALL ist die Hyperdiploidie mit einer gesamten Chromosomenzahl zwischen 51 und 63. Dabei weisen die Chromosomen X, 4, 6, 10, 14, 17 und 18 eine Trisomie auf, Chromosom 21 existiert hingegen sogar in vier Kopien.^[80, 81]

Bei der chronischen lymphatischen Leukämie (CLL) können ebenfalls mehrere Aberrationen auftreten, die diese Krankheit aggressiv werden lassen. Die am meisten auftretenden Aberrationen bei der CLL sind Trisomie 12, $del(13q)$, $del(11q)$, $del(17p)$ und $del(6q)$.^[63, 82, 83]

1.2. Diagnostik der genetischen Krankheiten *via* Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung

Die *in-situ*-Detektion von DNA und RNA eröffnet neue Wege für die Entwicklung neuer Therapie- und Diagnostikmethoden. [2, 84] [5, 85-93] Die Lokalisierung eines Gens in einem bestimmten Abschnitt eines Chromosoms liefert Erkenntnisse über die Morphologie der genomischen DNA in einer bestimmten Zelle und erlaubt Diagnose sowie Therapieprognose im Falle einer Krankheit. [11, 94-101] In den letzten Jahrzehnten haben wir gelernt, dass das Expressionsmuster eines Gens einzeln betrachtet und analysiert werden muss. [102] Expressionsverhalten sollten nicht mehr pauschal für eine ganze Zellpopulation bzw. ein Gewebe ermittelt werden, da sogar Zellen aus derselben Population oder desselben Gewebes unterschiedliche Expressionsprofile aufzeigen. [103] Wie in Abschnitt 1 erklärt wurde, könnte die Abweichung eines Gens von der ursprünglichen Position oder die Deletion eines Gen- oder gar Chromosomenabschnitts erhebliche Konsequenzen in Form von eventuell sogar tödlichen Krankheiten nach sich ziehen. Heutzutage nimmt die separate Analyse jeder Zelle auf der Ebene der Genmutationen und/oder Expressionsstruktur für die Ermittlung von Krankheitsursachen eine wichtigere Position.

1.2.1. Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung: Geschichte einer 40 Jahre alten Methode

1.2.1.1. Detektion genomischer DNA-Abschnitte *in situ*: DNA-FISH

Wenn man das englische Akronym „FISH“ liest, dann denkt man an seine deutsche Übersetzung, nämlich an das maskuline Substantiv „FISCH“. In der ganzen vorliegenden Arbeit ist FISH feminin und wird als „*die*“ FISH bezeichnet: die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung: Die Fluoreszenz-basierte Detektion der Nukleinsäuren in der Zelle ist die zweite Generation der *in-situ*-Detektion. Die erste Generation, die sogenannte ISH (*in-situ*-Hybridisierung), basierte auf radioaktiver Markierung von Nukleinsäuren mit Hilfe des radioaktiven Isotops Tritium. Die ersten Versuche wurden bereits 1969 von Mary-Lou Pardue und Joseph G. Gall durchgeführt. Sie haben damals ein DNA-RNA-Hybrid mit einer radioaktiv-markierten ribosomalen RNA und der dazu komplementären ribosomalen DNA von *Xenopus* Oocyten hergestellt (**Abbildung 3**). [104, 105]

Weitere Versuche wurden an Mäusen und *Drosophila melanogaster* durchgeführt, in denen „Satelliten-DNA“ am Heterochromatin des Zentromers lokalisiert wurden.^[104] Eine andere Forschungsgruppe hatte fast im selben Zeitraum mit rRNA-³H-Sonden ähnliche Versuche mit in Paraffin-eingebetteten Gewebeabschnitten vom chinesischen Hamster erfolgreich durchgeführt.^[106] Diese neue molekularbiologische Technologie war mit mehreren Nachteilen verbunden. Die Belichtungszeit betrug mehrere (!) Wochen^[107], die räumliche Auflösung der Moleküle war beschränkt, die radioaktiven Sonden haben sich während der Aufbewahrung wegen Instabilität zersetzt und für Gesundheit und Umwelt war die radiologische Markierung eine immense Gefahr. So mussten die Sonden gemäß der strengen Transport-, Aufbewahrungs- und Entsorgungsvorschriften behandelt werden. Außerdem war die Auflösung bzw. Spezifität trotz hoher Sensitivität der Radiographie sehr begrenzt, und der Hintergrund war sehr groß.^[108]

Gall berichtete, dass er oft gefragt wurde, warum diese umständliche und teure Methode angewendet werde. Seine Antwort war sehr einfach: Es gab zu diesem Zeitpunkt weder andere verfügbare, bessere Sonden noch andere nützliche Geräte (z.B. weiter entwickelte Mikroskope).^[107] Trotz der etlichen Nachteilen der ISH hat es einige Jahre gedauert, bis eine verbesserte Methode ohne Einsatz von Isotopenmarkierung entwickelt wurde.

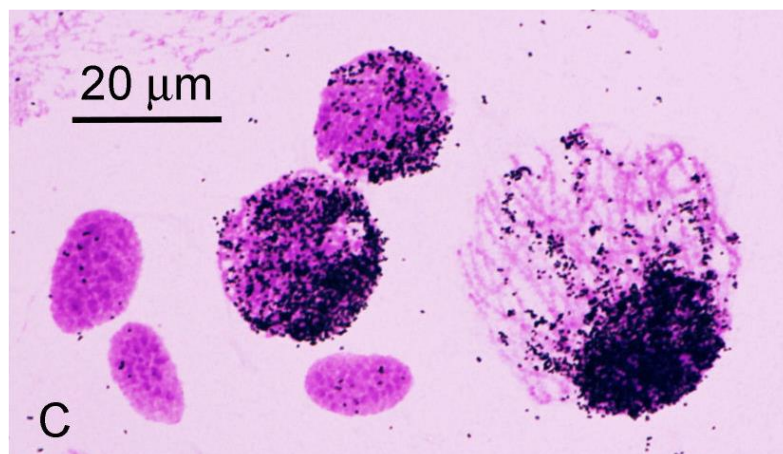


Abbildung 3: Der erste ISH-Versuch. Drei unmarkierte Nuklei und drei markierte Pachyten-Nuklei von *Xenopus* Ovarialfollikeln, die den Zusammenhang zwischen dem Anstieg der extrachromosomalen ribosomalen rDNA und der Größe des Nukleus darstellen. Diese *in-situ*-Detektion basiert auf der Bildung eines Hybrids zwischen rRNA-³H, die mit Tritium markiert ist, und der extrachromosomalen rDNA.^[105]

Gegen Ende der siebziger Jahre wurde die Fluoreszenz-Messung in der *in-situ*-Hybridisierung eingeführt. Der erste Versuch wurde durch Rudkin *et al.* in der Zeitschrift *Nature* veröffentlicht, wo 5S-rRNA mit dem Polytäanchromosom von *Drosophila* hybridisiert wurde und anschließend mit einem Anti-Poly(rA)-Poly(dT)-Antikörper reagiert wurde. Mit Hilfe eines sekundären Antikörpers, der mit Rhodamin markiert war, war die Detektion von den DNA-Abschnitten im Polytäanchromosom möglich.^[12] Wenige Jahre später wurden neue Sonden hergestellt, die organisch-chemisch markiert waren. Diese neuen Sonden enthielten Basen, die mit kleinen organischen Molekülen, den sogenannten Haptenen, modifiziert waren. Die Detektion der Haptene war entweder direkt oder mit Hilfe eines weiteren Moleküls ausführbar. Die indirekte Detektion war durch das Anwenden von z.B. Digoxigenin, Biotin oder Dinitrophenol möglich, die mit anderen Antikörpern stark interagierten. Ein Beispiel hierfür ist die starke, nicht-kovalente Bindung zwischen Biotin und Avidin bzw. Streptavidin.^[109] Die direkte Detektion beruht auf fluoreszenten Molekülen wie z.B. Fluorescein.^[12] So fing die Ära der Fluoreszenz-ISH an, in welcher die Schwarz-Weiß Detektion durch Farben und Fluoreszenz ersetzt wurde.

Die erste FISH wurde durch Baumann *et al.* in 1980 durchgeführt. Dabei wurden RNA-Sonden am 3'-Ende mit einem Fluorophor markiert und mit passenden DNA-Sequenzen hybridisiert. 1981 wurden zur Einführung der Fluorophore Amino-Allyl-modifizierte Basen durch Langer *et al.* benutzt.^[13] Mit dieser Methode kann jegliche Art von Molekülen flexibel und einfach an die Basen und somit an die Sonden gebracht werden.^[13, 109, 110] 1982 wurde die im Jahr 1977 durch Rigby *et al.*^[111] eingeführte *Nick*-Translation benutzt, um Biotin-dUTP in eine DNA-Sonde zu inkorporieren. Bei der *Nick*-Translation wird die enzymatische Eigenschaft der DNase I benutzt, Brüche in einer dsDNA-Sequenz zu verursachen. Die DNA-Polymerase I erkennt das freie 3'-OH als Substrat (*Nick*) und inkorporiert in einer Primer-Verlängerung nun die z.B. Biotin-markierten Nukleotide, wobei die vorausliegenden Nukleotide durch seine 5'-3' Exonukleaseaktivität abgebaut und ersetzt werden (**Abbildung 4**).^[110]

Aufgrund der breiten Anwendungsmöglichkeit in diversen zellbiologischen Studien wurde diese Methode in den nachfolgenden Jahren rasch weiterentwickelt. Zahlreiche Verbesserungen geschahen in den letzten 40 Jahren auf der Ebene der SONDENSENSITIVITÄT bzw. -SPEZIFITÄT, der digitalen und automatisierten Datensammlung und -analyse sowie der Mikroskopie. So wurden Zwei-^[112] und Multi-farben-FISH^[14, 15, 113-115] für die DNA-Diagnostik entwickelt.

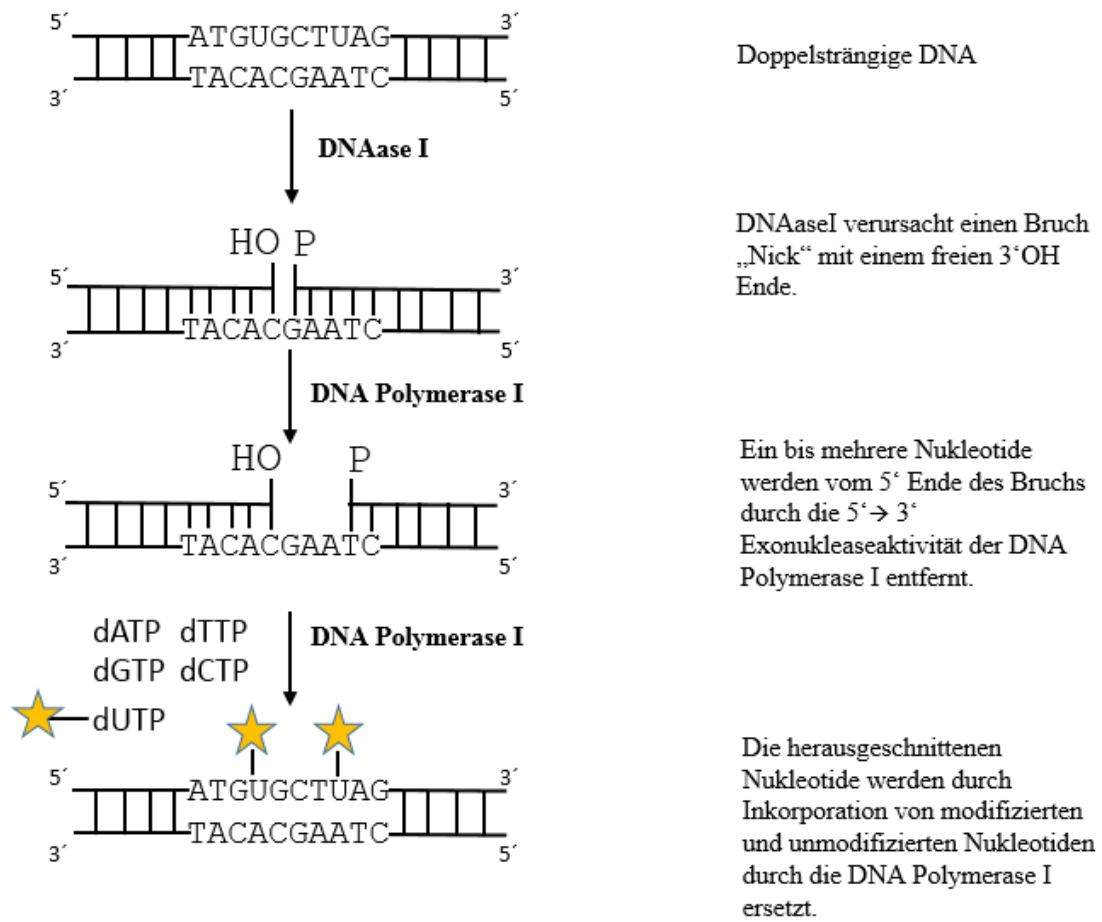


Abbildung 4: Darstellung der *Nick*-Translation. (Bachelor-Arbeit von Tobias Heins).

Die FISH-Sonden für DNA wurden nicht nur durch *Nick*-Translation generiert, sondern auch durch andere Methoden wie z.B.: Random-primed-DNA-Amplifikation, Klonierung in einem Vektor/Plasmid oder durch *in-vitro*-Transkription.

Das Potenzial der FISH bei der Ermittlung der Stellen bestimmter DNA-Sequenzen im Genom bzw. bestimmter RNA-Sequenzen im Zellkern und Zytosol sowie der Vermessung von Expressionsmustern bestimmter Genen gewann ab Ende der achtziger Jahre des zwanzigsten Jahrhunderts an Bedeutung und wurde stark verbreitet. Ein bedeutender Meilenstein war die ganz Chromosomen *in-situ*-Hybridisierung bzw. das „*Whole-Chromosome-Painting*“^[115, 116], bei der fluoreszierende Sonden für jedes Gen eines Chromosomes an ihre komplementären Sequenzen in der Metaphase hybridisieren. So werden ganze Chromosomen detailliert kartiert und mögliche Aberrationen, Deletionen und Translokationen festgestellt.^[113, 117, 118] Diese Technik wurde später für die Diagnostik als Multiplex-FISH oder M-FISH weiterentwickelt und als molekularzytogenetische Methode für die

Krebs- und pränatale Diagnostik etabliert.^[119, 120] Alle 24 Chromosomen einer menschlichen Zelle wurden mit Sonden angefärbt, die durch eine spezielle Kombination von fünf fluoreszenten Farbstoffen markiert waren.

FISH stellt somit eine unverzichtbare Methode für die Analyse genetischer^[121], pädiatrischer^[122] und pränataler^[123, 124] Krankheiten dar. Da die Detektionsgrenze der FISH in Interphasen sehr limitiert ist und nur 190 kb- oder längere Sequenzen detektiert werden können^[125], werden FISH-Analysen an Metaphasenchromosomen bevorzugt, was die Anzahl der analysierten Zellen drastisch eingrenzt.

1.2.1.2. Detektion von mRNA-Molekülen *in situ*: mRNA-FISH

Im Jahr 1982 ist es Singer und Ward zum ersten Mal gelungen, *messenger*-RNA (mRNA) mit fluoreszierenden Sonden *in situ* zu detektieren.^[126] Die mRNA-Detektion *in situ* wurde von Dirks *et al.* auf zwei und drei Farben erweitert.^[127, 128]

Ein paar Jahre später hat das Team um Femino eine sensitive Methode entwickelt, mit der einzelne RNA-Transkripte *in situ* visualisiert werden konnten. Sie haben eine Mischung von 32 Oligonukleotiden mit je 45 bp, ein sogenanntes „Sondenset“, verwendet, die zu verschiedenen Stellen in der mRNA von β -Actin komplementär waren. Jedes Oligonukleotid enthielt fünf Aminogruppen, die mit einem Ester-Fluorophor reagiert wurden.^[129] Die einzelnen RNA-Transkripte erschienen dann als einzelne helle diffraktionslimitierte Spots, die mit Hilfe einer bestimmten Software quantifiziert werden konnten (**Abbildung 5a-rechts**).

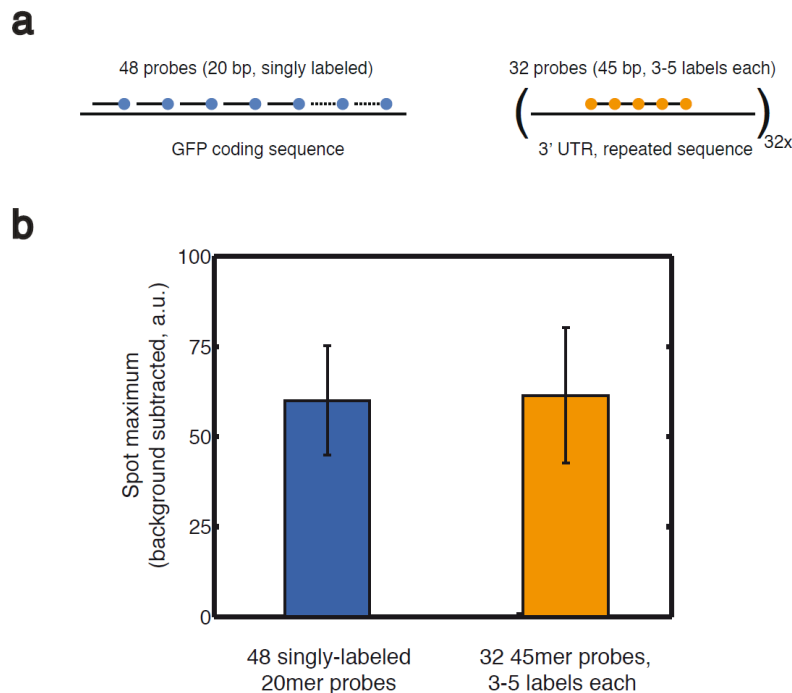


Abbildung 5: Vergleich zwischen der mRNA-FISH-Methode von Femino *et al.*^[129] mit der von Raj *et al.*^[21]. Femino *et al.* haben 32 x 45-mer lange Oligonukleotide, die drei bis fünf Mal markiert waren, eingesetzt. Auf der anderen Seite waren die 48 Sonden von Raj *et al.* 20-mer lang und jedes Oligonukleotid enthielt einen einzelnen Farbstoff. Beide Methoden zeigen eine vergleichbare Signalintensität.^[21]

Es wurde gezeigt, dass jeder helle Spot einem einzelnen mRNA-Molekül (*single molecule sm-mRNA-FISH*) und nicht einer Aggregation mehrerer mRNAs entspricht. Für das Experiment wurden zwei verschiedene mRNAs synthetisiert. Eine mRNA wurde mit einem roten Fluorophor, die andere mit einem grünen prä-hybridisiert. Diese Mischung aus den mRNAs wurde in die Zellen injiziert. Die Überlagerung der Fluoreszenz der beiden unterschiedlich markierten mRNA Sequenzen an einem Ort würde zu einem gelben Signal führen. Unter dem Mikroskop wurden jedoch keine einzelnen gelben Spots detektiert. Da die Spots entweder rot oder grün waren, ging man davon aus, dass jeder detektierte Spot einem einzelnen Molekül und keiner mRNA-Anhäufung entspricht.^[129] Ein anderer Beweis dafür war die homogene Größe aller Signale. Ein Nukleotid sollte 0,3 nm lang sein. Deshalb kann man für jede Sequenz die Länge berechnen und mit den *in situ* gemessenen Größen der Spots vergleichen.^[129] Diese innovative Methode war sicherlich sensitiv und einfach, hatte aber ein massives Problem: Die Hybridisierungseffizienz der Oligonukleotide. 5% der gesamten

Transkripte zeigten keine Hybridisierung mit dem Ziel-Oligonukleotid. 25% der Transkripte wurden mit nur einem einzigen Oligonukleotid hybridisiert. Diese Transkripte lieferten also keine Signale und somit falsche negative Ergebnisse in der Quantifizierung der Transkriptenmenge einer Zelle. Außerdem können unspezifisch gebundene Oligonukleotide ein positives aber falsches Signal geben, da eine einzelne Sonde ein helles analysierbares Signal liefert.^[130] Eine andere Schwierigkeit bestand darin, dass die fünffach markierten Oligonukleotide separat und einzeln synthetisiert und aufgereinigt werden mussten. Es ist außerdem schwierig, total- von partiell-markierter Oligonukleotide zu trennen. Die hohe Anzahl an Fluorophoren per Oligonukleotid stellt ebenfalls ein Problem dar, da es zu einer Fluoreszenz-Löschung kommen kann.^[131]

Raj *et al.* haben 2008 eine verbesserte Methode für die Detektion mRNA-Moleküle entwickelt, indem sie eine höhere Anzahl an einfach gelabelten Oligonukleotiden pro mRNA benutzt haben.^[21] Jedes Oligonukleotid ist in der Methode ein 22-mer und besitzt eine Aminogruppe am 3'-Ende. Die für diese Methode benutzten Fluorophore besitzen eine Succinimidylestergruppe und können somit an die Aminogruppen der Oligonukleotide gekoppelt werden. Ein Konstrukt von einem Doxycycline-kontrollierten Gen, das für eGFP-mRNA kodiert, wurde hergestellt und in Zellen injiziert. Die mRNA besaßen an ihren 3'-UTR-Termini 32 repetitive Sequenzen mit je 80 Nukleotiden. Nach der *in-situ*-Hybridisierung mit 48 einfach gelabelten Oligonukleotiden gegen eGFP-mRNA wurden die mRNA-Moleküle quantifiziert. Die Quantifizierungsergebnisse der Mikroskopie stimmten mit denen aus der quantitativen RT-PCR überein. Außerdem haben die *in-situ*-Hybridisierungen mit weniger Oligonukleotiden, nämlich 12, 24 und 36, quantifizierbare Signale ergeben, wenn auch mit schlechter Intensität (**Abbildung 5a-links**). Es wurde ebenfalls gezeigt, dass jedem Spot ein einziges mRNA-Molekül entspricht. Die direkte Gegenüberstellung der Raj- und der Femino-Methode zeigt eine vergleichbare Intensität (**Abbildung 5b**).

Die von Raj *et al.* entwickelte Methode wurde in einer einfachen Version unter den Namen „*Stellaris® RNA FISH probes*“ kommerzialisiert. Neben den prä-*designed* Sonden existiert eine Software, die eine beliebige mRNA-Sequenz analysiert und für FISH geeignete Anti-Sense Oligonukleotidsequenz bestimmt.

Obwohl die obengenannten Methoden etabliert und in der Grundlagenforschung sowie in der Diagnostik benutzt werden (für Anwendungsbeispiele siehe oben), hat die

Mikroskopie-basierte Detektion von Sonden zwei gravierende Nachteile. Erstens müssen die Zellen in der Metaphase sein, damit die Chromosomen sichtbar sind. Zweitens ist die Anzahl der analysierbaren Zellen sowohl für DNA-FISH als auch für mRNA-FISH sehr begrenzt (ca. 100 Zellen/Objekträger). Außerdem ist die Metaphasen-FISH zeitaufwendig und teuer. Das Zellzahl-Problem wurde mit einer neuen Methode überwunden, nämlich mit der Durchflusszytometrie, mit der sehr viele Interphasen-Zellen analysiert werden können.

1.2.1.3. FISH gekoppelt mit Durchflusszytometrie: Flow-FISH

Die Durchflusszytometrie ist ein laserbasiertes, biophysikalisches Verfahren für das Zählen und Sortieren von Zellen, für die Immunphänotypisierung sowie für die Analyse des Ploidiegrads (Anzahl des Chromosomensatzes) oder zur Bestimmung der Expression von Markerproteinen z.B. GFP. Zellen werden in einer Kapillare einzeln eingeschleust, wo sie einem Laserstrahl ausgesetzt werden. Die Detektion der Zellen kann dann optisch erfolgen (**Abbildung 6**). Je nach Form, Struktur und/oder Färbung der Zellen werden unterschiedliche Effekte erzeugt. Daraus können spezifische Eigenschaften der Zelle abgeleitet werden.

Das Analyseverfahren des Zellzyklus beruht auf der Quantifizierung der zellulären DNA. Es wird gemessen, wie die Menge an DNA während der verschiedenen Phasen des Zellzyklus variiert. Die Intensität der Fluoreszenz ist proportional zum DNA-Gehalt. Vor der Replikation (Phase G_1 und G_0) ist die Menge an DNA in einem diploiden Organismus gleich $2n$. Während der Replikationsphase (S-Phase) erfolgt die Duplikation der DNA. Die DNA-Menge entspricht $>2n$. Die Zellen in der darauffolgenden G_2 -Phase sowie am Anfang der Mitose (M-Phase) enthalten $4n$ an der DNA. Das bedeutet, dass die Fluoreszenzintensität der Zellen in der G_2 -Phase ungefähr doppelt so stark ist wie die der Zellen in einer G_1 -Phase.^[132-134]

Die Durchfluss-zytometrische Messung hat auch eine klinische Bedeutung. Da Störungen des Zellzyklus eine pathologische Ursache haben, kann die Methode bei der Krebsdiagnostik verwendet werden. Eine unkontrollierte Proliferation kann in einem Histogramm leicht gezeigt werden. Auf diese Weise können auch Genmutationen, wie Aneuploidie, entdeckt werden.^[135]

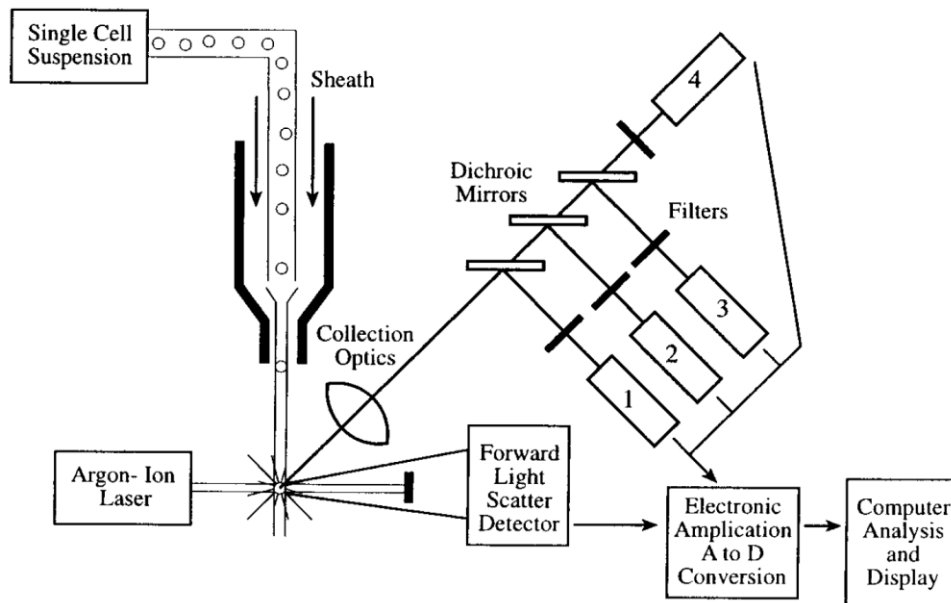


Abbildung 6: Prinzip der Durchflusszytometrie. Die Zellen in Suspension werden in einem dünnen Strahl in die Mikrokanalküvette geleitet. Sie werden dann einzeln einem Laserstrahl mit der entsprechenden Wellenlänge ausgesetzt. Dadurch emittieren die Zellen ein Fluoreszenzsignal, das durch Verstärkung ausgewertet werden kann.^[136]

Anfang der neunziger Jahre wurde eine FISH-basierte Methode für die Durchflusszytometrie, die sogenannte Flow-FISH, entwickelt, in der Nuklei aus Lymphozyten isoliert waren und eine Hybridisierung von Biotin- und DIG-markierten Sonden mit Zentromer-spezifischen repetitiven DNA-Sequenzen in gesunden^[137] und in Blutzellen^[138] durchgeführt wurde. Später wurden Peptid-Nukleinsäuren (*peptid nucleic acid PNA*) als FISH-Sonden für die Ermittlung der Telomerenlänge in Lymphozyten benutzt.^[139] Eine weitere bedeutende Entwicklung der flow-FISH war die Hybridisierung der Sonden direkt an isolierte Chromosomen.^[140]

Die flow-FISH wurde ebenfalls für die Detektion von mRNA-Molekülen angewendet. Arrigucci *et al.* haben ein Protokoll entwickelt, bei dem 50 mRNA-Antisense-Oligonukleotide mit 22 nt Länge an die Ziel mRNA *in situ* hybridisiert und entsprechend behandelten Zellen durch Durchflusszytometrie analysiert wurden^[141] (**Abbildung 8**). Diese Methode basiert auf der Arbeit von Femino *et al.*^[129] bzw. von Raj *et al.* (siehe Abschnitt 3.1.1).^[21]

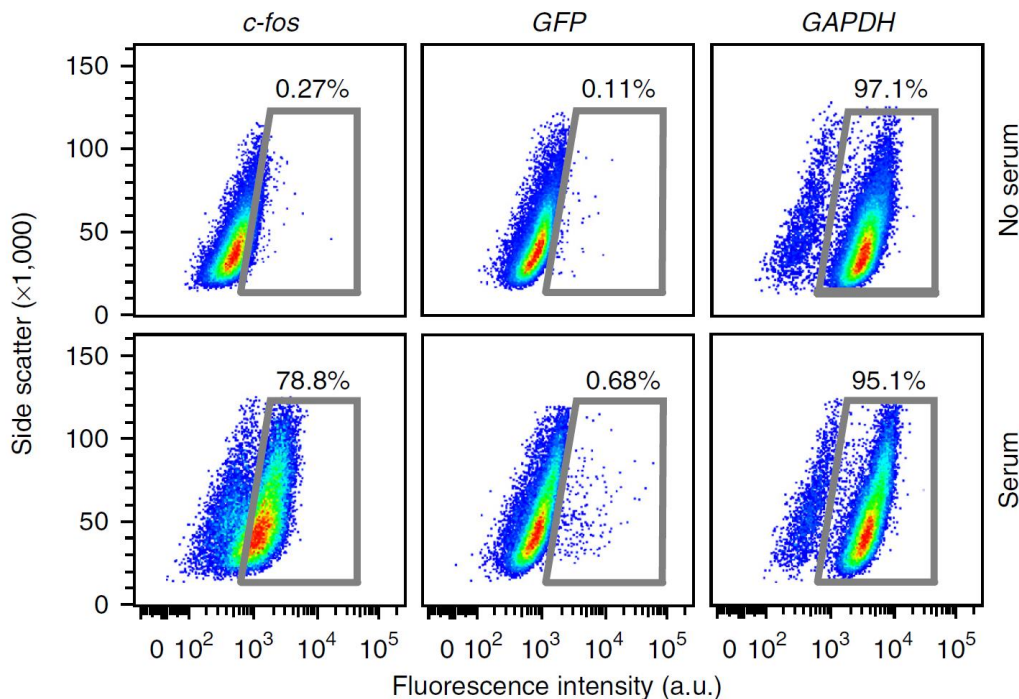


Abbildung 7: Flow-FISH laut Arrigucci *et al.* HeLa-Zellen wurden mit Sonden für die mRNAs von c-fos, GFP als negative Kontrolle und GAPDH als positive Kontrolle detektiert. Nur wenn die Zellen mit Serum kultiviert wurden, waren mRNA von c-fos sichtbar. Das kann man anhand der Verschiebung der Fluoreszenzintensität beobachten.^[141]

1.2.2. FISH versus quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion RT-PCR

„Reverse-transcription quantitative polymerase chain reaction“ (RT-qPCR) ist eine Methode, mit der Transkripte charakterisiert und quantifiziert werden können. Sie besteht aus zwei Schritten: Der reversen Transkription und der Quantifizierung. Da RNA-Moleküle durch PCR nicht amplifizierbar sind, werden stabile Komplementär-DNA (cDNA) mit Hilfe der reversen Transkriptase hergestellt. Diese enzymatische Reaktion kann nur gelingen, wenn die Qualität der isolierten RNA hochwertig ist. Die reverse Transkriptase benutzt die RNA-Moleküle als Vorlage und stellt ein DNA-RNA-Hybrid her. Nachdem die cDNA hergestellt ist, erfolgen mehrere Zyklen der Polymerase-Kettenreaktion zur Vervielfältigung der Stränge. Bei einem Zyklus wird die Sequenz durch Hitze denaturiert. Anschließend erfolgt eine Temperaturänderung, die es den Primern ermöglicht, an die ssDNA zu binden. Dadurch kann die Elongation der Sequenz stattfinden. Der Unterschied zur normalen PCR ist, dass ein fluoreszenter Farbstoff, z.B. „Cyber Green“, an die dsDNA bei jedem Zyklus bindet. Eine Steigerung der Fluoreszenzintensität ist proportional zur Anzahl der dsDNA. Anhand der

gemessenen Fluoreszenz kann die neu synthetisierte DNA quantifiziert werden. Somit bekommt man eine Echtzeit („*real-time*“) Quantifizierung der cDNA bzw. der Transkripte.

Die RT-qPCR wird heute in vielen Diagnostiklaboren verwendet und viele Kits zur Detektion viraler RNA und bestimmte Krebsmarker sind kommerziell erhältlich. Nichtsdestotrotz hat diese Methode in der Diagnostik diverse Nachteile. Erstens sind die Ergebnisse sehr von der Nukleotid-Isolierungsmethode abhängig. Es wurde gezeigt, dass die Isolierungsmethoden der Nukleotide einen Einfluss auf die Qualität der Ergebnisse haben. Überdies gehen Informationen über die Transkriptionsmuster einzelner Zellen verloren, da die RNA der gesamten Population, z.B. Gewebe, Blut etc., ohne Unterscheidungsvermögen isoliert und analysiert wird. Daraus wiederum ergibt sich ein anderer Nachteil: Die Analyse der Transkripte erfolgt nicht *in situ*, sondern *in vitro*. Daher ist die RT-qPCR eine indirekte Methode, die nicht nur keine Informationen über die Lokalisation der Transkripte in der Zelle liefert, sondern auch mehrere Komponenten beinhaltet, die die Analyse beeinträchtigen. Ein Beispiel dafür ist die Instabilität von ssRNA, die zur Degradation durch die RNase während ihrer Isolierung und Bearbeitung tendiert. Außerdem kann nur ein Transkript pro Assay analysiert werden, da der fluoreszente Farbstoff ohne Diskriminierung an DNA bindet.

1.3. Einschränkungen der verwendeten Diagnostikmethoden:

Muss die Probe länger oder dichter gelabelt sein?

1.3.1. DNA-FISH

4% der Basen werden im Durchschnitt während der enzymbasierten Sondenherstellung z.B. durch *Nick*-Translation oder *in-vivo*-Inkorporation, durch modifizierte Basen ersetzt.^[142] Eine vollständige Substitution der dTTPs durch markierte dUTPs ergäbe aber eine 25%-ige Markierungsrate (250d/kb). Bei der Markierung mit modifizierten dUTPs kann es vorkommen, dass AT-reiche Stellen der DNA eine dichte Markierung bis zu 25% bekommen wobei andere GC-reiche Stellen gar keine Markierungen aufweisen. Die Markierungsrate hängt vor allem von zwei wesentlichen Faktoren ab: Der Leistung der DNase I und der DNA-Polymerase I. Die Markierungsrate ist umgekehrt proportional zur Länge der geschnittenen Sequenzen durch die DNase I während der *Nick*-Translation. Die ideale Länge der Sonden sollte unter 200 Nukleotiden sein. Das ist oft zu kurz für die DNase I.^[143] Wenn lange Sonden

benutzt werden, können sie in einer unspezifischen Weise an die Probe binden und entsprechen ein sensitiv falsches und unspezifisches Signal zeigen. Die DNA-Polymerase I hat zusätzlich eine geringe Inkorporationsrate für die modifizierten dUTPs im Vergleich zu den natürlichen dNTPs. Als Resultat dieser zwei unkontrollierbaren Komponenten entstehen so Sonden mit unterschiedlichen Markierungsraten, die unregelmäßige und auch falsche positive Ergebnisse bringen.

Die Herstellung von markierten Sonden *via* PCR resultiert in einer geringen Ausbeute des PCR-Produkts und liefert eine geringe Markierungsrate, die bei 3,3 Farbstoffe pro kb liegt. Grund dafür ist die schwache Toleranz der Polymerase für modifizierte Nukleotidtriphosphate.^[142] Um das Problem zu lösen, müssten die Markierungen dichter erfolgen. Allerdings ist eine Steigerung der Markierungsrate nicht unbedingt mit einer Steigerung der Sensitivität gekoppelt^[144], da die fluoreszenten Farbstoffe sich gegenseitig quenchen können und die gebildeten Sonden-Target-Duplexe eine geringe Stabilität bzw. niedrige Schmelztemperatur zeigen könnten.^[131] Es muss darauf geachtet werden, dass ein Ausgleich zwischen der Anzahl der inkorporierten Farbstoffe und der physikalischen Stabilität des Sonden-Target-Duplex gefunden wird. Die Optimierung ist vor allem ein Problem für die Detektion von „*single copy genes*“ ohne repetitive Sequenzen, da die Markierungsrate der Sonden, die enzymatisch hergestellt sind, für ein sensitives und spezifisches Signal oft nicht ausreichend ist.

1.3.2. mRNA-FISH

Auch die FISH für mRNA-Moleküle ist nicht optimal und braucht verschiedene Verbesserungen sowohl bei den Mikroskopie- als auch den Durchflusszytometrie-basierten Abläufen. Obwohl die sm-mRNA-FISH eine solide quantitative Analyse für mRNA-Moleküle ist und die Flow-FISH das Problem der begrenzten Zellenanzahl gelöst hat, bleiben schwerwiegende Hindernisse. Eines davon ist das Problem der hohen Anzahl der als Sonde benutzten Oligonukleotide (zwischen 30 und 96 Oligonukleotide à 17-22 nt). Dies beschränkt die Länge der zu detektierenden mRNA auf 500 nt. Kleinere mRNA-Moleküle können nicht detektiert werden.^[141] Raj berichtete, dass Signale mit einem Sondenset auch von nur 30 Oligonukleotiden detektiert werden konnten, die Signale aber meistens schwach waren. Daher wurde empfohlen, ein Set von mindestens 48 Oligonukleotiden zu benutzen und den GC-Gehalt der individuellen Oligonukleotide gleich zu halten, damit sie homogen hybridisieren.^[130] Die Empfehlung, den GC-Gehalt gleich zu halten, wird oft nicht

erreicht. In den Veröffentlichungen als auch bei den kommerziellen Sondensets von Stellaris® werden darüberhinaus im Durchschnitt 48 Oligonukleotide benutzt bzw. angeboten. Damit können die meisten Transkripte in der Zelle nicht detektiert werden, da sie in einer nur geringen Zahl in der Zelle vorliegen (weniger als 50 Kopien).^[145]

Bestimmte Transkripte wie z.B. die long-non-coding-RNA (lncRNA)^[146], die meistens kleine Sequenzlängen^[147, 148] aufweisen und als Marker für bestimmte Krebsarten auftreten^[149-154], können gar nicht detektiert werden. Da die long-non-coding-RNAs (lncRNAs) immer mehr Bedeutung in der Krebsdiagnostik gewinnen^[155-162], müssen die Sonden speziell für diesen Zweck verbessert werden.

1.3.3. Lösungsversuche für die mit FISH verbundenen Probleme

Die oben beschriebenen Einschränkungen der FISH-Diagnostik sind trotz verschiedener Versuche noch nicht behoben.^[163]

Einer dieser Versuche war die Entwicklung der High-Definition (HD) für DNA-FISH. Diese Methode stellte eine Datenbank von Primerpaaren für die Polymerasekettenreaktion dar, die hochspezifische dsDNA-Sonden generieren. Im Vergleich zur klassischen enzymatischen Sondenherstellung mit Hilfe von BAC-Plasmiden oder Fosmiden, die Produkte in einer Länge von 100-250 kb bzw 40-50 kb ergeben, können 200-220 nt-lange Sonden hergestellt werden. Durch die besseren thermodynamischen Eigenschaften können die kürzeren PCR-Produkte besser mit der DNA hybridisieren. Universal Linkage System (ULS) wurde zum Markieren der Sonden verwendet. Allerdings bleibt das Problem der geringen Intensität aufgrund der langen Sonden und der geringen Markierungsrate ungelöst.^[163]

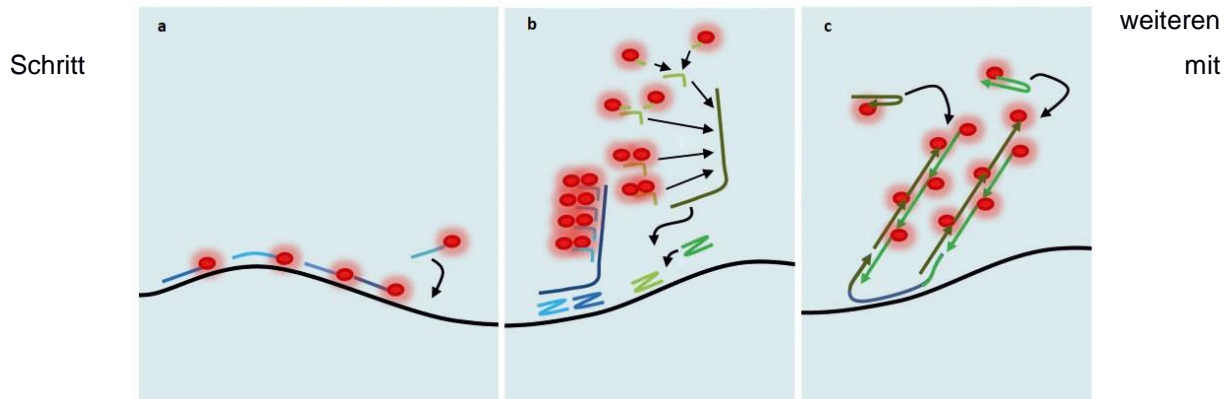
Die Markierungsrate, die vor allem bei smRNA-FISH (**Abbildung 8-a**) eine große Einschränkung darstellt, wurde auf zwei Ebenen verbessert: Die Sonden selbst und die Bearbeitungsprogramme der Mikroskopiebilder. Neue Computeralgorithmen für die Detektion und Analyse von Sonden, die gegen kleine Targetsequenzen gerichtet sind, wurden entwickelt. Somit war es möglich, trotz geringer Fluoreszenzintensität der Sonden, kleine Moleküle zu detektieren.^[164] Diese Entwicklung war, vor allem bezüglich der RNA-FISH, sehr hilfreich. Die speziellen Computeralgorithmen müssen aber von Fachleuten eingesetzt werden. Labore, die auf FISH nicht spezialisiert sind, besitzen weder das Know-how noch die entsprechenden kommerziellen Programme für die Auswertung.

Ein Versuch der Verbesserung der Sonden bzw. der Erhöhung der Signalintensität wurde durch die Z-förmige-Sonden unternommen (**Abbildung 8-b**). Diese Methode basiert auf verzweigten oder „*branched*“ DNA (bDNA), die von Player *et al.* in 2001 entwickelt wurde.^[165] Zwei DNA-Oligonukleotide werden in einer Z-Form so hergestellt, dass sie unmittelbar nebeneinander auf der Ziel-mRNA hybridisieren. Der untere Teil vom Z besteht aus 18 bis 25 Basen, ist komplementär zur Zielsequenz und somit sequenzspezifisch. Der mittlere Teil dient ausschließlich als Linker und verbindet den oberen mit dem unteren Teil. Die oberen Teile zweier nebeneinander hybridisierten Zs stellen eine Plattform und Bindestelle mit jeweils 14 Basen für den sogenannten prä-Verstärker dar. Diese Plattform soll eine spezifische Bindung des prä-Verstärkers gewährleisten, da er nur binden kann, wenn genau zwei Zs vorhanden sind. Nachdem zwanzig Verstärker an jedem prä-Verstärker gebunden haben, werden sie mit je 20 Fluorophoren konjugiert. Dadurch wird das Signal amplifiziert. Auf eine 1 kb lange mRNA binden dann 20 Z-Paare bzw. 20 prä-Verstärker. An jedem prä-Verstärker binden 20 Verstärker, die wiederum 20 Farbstoffmarkierungen enthalten können. Insgesamt kann eine mRNA im Detektionskomplex 8.000 Farbstoffmarkierungen aufweisen, was mit der smRNA-FISH unmöglich ist. Die Farbstoffmarkierung kann ein normaler fluoreszierender Farbstoff sein oder die Alkaline-Phosphatase, was in beiden Fällen eine empfindliche Detektion erlaubt. Die Detektion ist auch durch ein standard Licht-Mikroskop ermöglicht. Eine Detektion von bis zu drei verschiedenen Transkripten pro Zelle ist möglich. Diese Methode wurde zu einem Kit weiterentwickelt und ist kommerziell erhältlich unter den Namen RNAscope®-Sonden. Da die Herstellung der Z-Oligonukleotide sowie der prä-Verstärker, der Verstärker und der Farbstoffe sehr aufwändig ist, können die Kosten eines Kits mehr als 8.000 Euro (!) erreichen (*Cat.No: 322800. Multiplex reagent kit for 60 slides ohne Angabe der Konzentrationen 8.090 Euro*).^[166]

Ein weiterer Versuch optimaler FISH wurde mit der sogenannten Hybridisierungskettenreaktion oder „*Hybridization chain reaction*“ HCR ausgeführt. Dabei bindet ein Initiator-Oligonukleotid, das zwei Überhänge besitzt, an der Zielsequenz und aktiviert die Hybridisierungskettenreaktion. An jedem freien Überhang bindet ein markiertes Oligonukleotid, das wiederum eine Bindestelle für ein weiteres Oligonukleotid bietet (**Abbildung 8-c**). Die Kettenreaktion wird fortgesetzt und eine Signalverstärkung entsteht. Die Signalintensität kann bis zu 200-mal höher sein als die

einzelmarkierten Sonden und ermöglicht so die Detektion in herausfordernden Geweben sowie in Embryonen vom Zebrafisch.^[167]

Abbildung 8: Alternative Methoden für mRNA-FISH. a) Die von Raj *et al.* entwickelten sm-mRNA-FISH, die auf mehreren einzeln markierten Oligonukleotide basiert ist. b) Z-förmige-Sonden oder „*branched*“ DNA. Die Oligonukleotide in Z-Form dienen als Plattform für weitere Oligonukleotide, die in einem

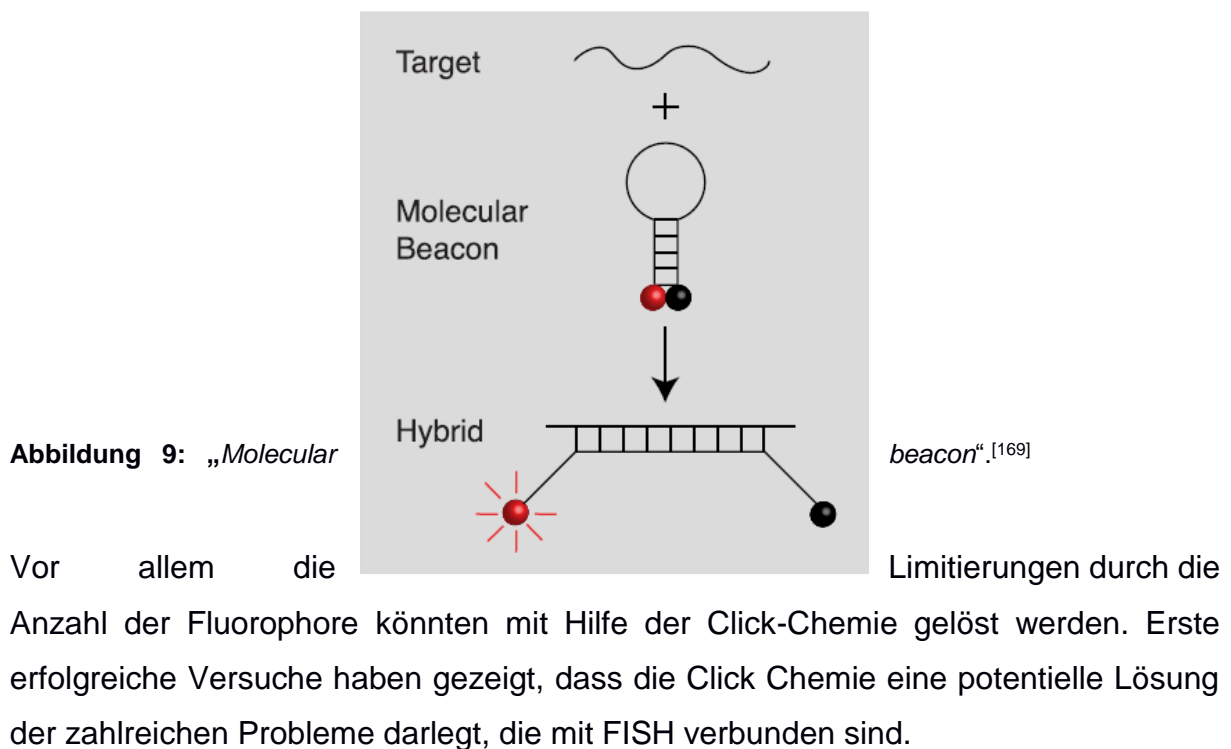


fluoreszierten Farbstoffen markiert werden. c) „*Hybridization Chain Reaction*“ HCR. Ein Initiator-Oligonukleotid mit zwei Überhängen, bindet an die Ziel-mRNA. Eine Kettenhybridisierungsreaktion wird an den Überhängen initiiert, bei der einzeln markierten Oligonukleotide nach und nach hybridisiert werden.^[168]

Um kurze Transkripte z.B. microRNA (miRNA) oder lncRNA detektieren zu können, wurden LNA™-Sonden (*locked nucleic acid-based RNA detection*) entwickelt. LNA-Sonden enthalten RNA-Nukleotid-Analoga, die eine Brücke zwischen dem 2'-Sauerstoff und dem 4'-Kohlenstoff der Ribose aufweisen und somit in ihrer optimalen Konformation für die Watson-Crick-Bindung „*locked*“ (verriegelt) sind. Diese Verriegelung hat Einfluss auf die physikalischen Eigenschaften der Base, denn die Schmelztemperatur bei Bildung von einem Duplex erhöht sich um bis zu 8°C was die Hybridisierungseigenschaft dramatisch verbessert. Dadurch werden falsch-positive Signale quasi ausgeschlossen. Die Farbstoffmarkierung erfolgt hier ebenfalls mit Hilfe der Alkalinen-Phosphatase-Reaktion.

„*Molecular beacons*“ wurden verwendet, um das Problem mit den unspezifischen Bindungen der Sonden zu lösen. Ein „*molecular beacon*“ ist eine ssDNA, die die Form einer Haarnadel hat (**Abbildung 9**). Am 3'- und 5'-Ende stehen ein fluoreszenter Farbstoff und ein Quencher, der die Fluoreszenz auslöscht. Die ersten acht Basen an den beiden Enden sind komplementär und hybridisieren miteinander, so dass die Schleifenstruktur entsteht. Die zwischen beiden Enden vorliegende Schleife besteht aus einer Sequenz, die zur Zielsequenz komplementär ist. *In situ* hybridisieren die

„*molecular beacons*“ mit der Komplementärsequenz. Dadurch wird die tertiäre Struktur aufgehoben, der Quencher entfernt sich vom Farbstoff und ein fluoreszentes Signal entsteht^[169]. Die „*molecular beacons*“ haben das Problem der Unspezifität gelöst, aber das Problem der niedrigen Signalintensität, weil nur ein Fluorophor pro Sonde vorhanden ist, ist weiterhin offen und kleine Transkripte können nicht detektiert werden.



1.4. Die Kupfer-katalysierte Alkin-Azid-Cycloaddition CuAAC: die „*Click-Reaktion*“

Das Konzept der Click-Chemie wurde im Jahr 2001 von Kolb *et al.*, Finn *et al.* und Sharpless *et al.*^[170] erklärt. Es beschreibt den Ansatz, schnell und selektiv Heteroatomverbindungen zwischen kleineren Einheiten herzustellen. Als Vorbild dienen laut Kolb *et al.* Prozesse der Natur, die sich hochwirksamer Katalysatoren z.B. in Form von Enzymen bedienen. In Anlehnung an solche natürlich-chemischen Transformationen müssen einige Anforderungen erfüllt werden. Zu diesen gehören unter anderem hohe Ausbeuten, stabile Produkte, einfache Durchführungen, ein breiter

Anwendungsbereich, Stereospezifität, keine störenden Nebenprodukte und die Verwendung gut verträglicher oder leicht entfernbarer Lösungsmittel. In der Natur wird beispielsweise Wasser als „das“ Lösungsmittel für Reaktionen verwendet, weswegen Click-Reaktionen im Idealfall wasser- und sauerstoffunempfindlich sein sollen. Die Click-Chemie wurde im Hinblick auf die obengenannten Anforderungen entwickelt und sollte die meisten Anforderungen erfüllen. Die prominenteste Click-Reaktion basiert auf der 1,3-dipolaren Cycloaddition zwischen Aziden und Alkinen, deren Mechanismus 1963 durch Huisgen an der Ludwig-Maximilians-Universität aufgeklärt wurde.^[171, 172] Diese Reaktion, die unkatalysiert ausschließlich bei hohen Temperaturen unter langen Reaktionszeiten abläuft, bildet eine Mischung aus zwei Isomeren: 1,4- und 1,5-substituierten Triazolen (**Abbildung 10**).^[173]

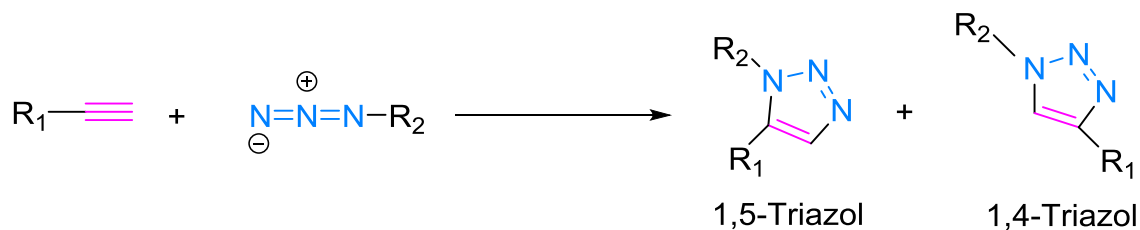


Abbildung 10: Huisgen-Reaktion. Die Reaktion zwischen dem Azid und dem Alkin resultiert in einer Zusammensetzung von 1,5- und 1,4-substituierten Triazole.^[173]

Durch den Einsatz von Kupfer(I)-Verbindungen als Katalysator, beschrieben 2002 durch Meldal^[174] und Sharpless^[175] wurden diese Probleme behoben. Der Cu(I)-Katalysator kann dabei entweder aus Cu(I)-Salzen wie CuBr oder CuI^[174, 176] oder durch eine *in-situ*-Reduktion von Cu(II)-Verbindungen (z.B. durch Reduktion von CuSO₄ durch Natriumascorbat) oder durch Oxidation von elementarem Kupfer hergestellt werden.^[175, 177-184] Der Einsatz des Cu-Katalysators bewirkt neben einer beträchtlichen Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit auch die regioselektive Bildung des 1,4-substituierten Reaktionsprodukts. Darüberhinaus ermöglicht der Katalysator eine Durchführung der Reaktion bei Raumtemperatur. Die Kupfer(I)-katalysierte Alkin-Azid-Cycloaddition (CuAAC) wird als die „Elite-Reaktion“ der Click-Chemie bezeichnet und zur Vereinfachung „Click-Reaktion“ genannt (**Abbildung 11**), da sie hohe Ausbeuten liefert und in der Regel einfache Möglichkeiten zur Aufreinigung des Reaktionsprodukts erlaubt. Nicht nur die Reaktionsbedingungen der CuAAC sind vorteilhaft, sondern auch die Eigenschaften der Ausgangsmaterialien. Diese (Alkine und Azide) sind unter physiologischen Bedingungen pH-neutral. Die durch die

Reaktionspartner bedingte Bioorthogonalität ist ein weiterer großer Vorteil der Reaktion. Die CuAAC-Reaktion wird *in vitro* zur Modifikation von Biomolekülen, z.B. Proteinen^[185], Peptide^[186] verwendet oder *in vivo* eingesetzt z.B. zur Modifikation von in Zelloberflächen^[187] sowie zur Derivatisierung von Biomolekülen an lebenden Zellen und Viren^[188].

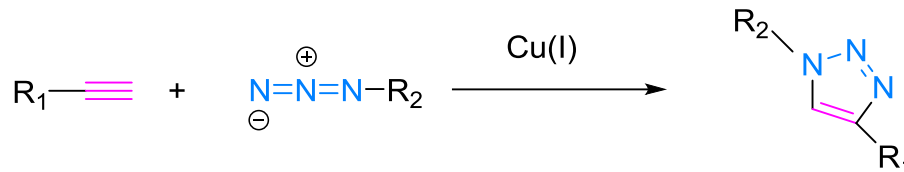


Abbildung 11: Click-Reaktion. Ein Kupfer(I)-Spezies katalysiert die Cycloaddition zwischen dem Azid und dem Alkin. Die Kupfer(I)-katalysierte Alkin-Azid-Cycloaddition (CuAAC) ist das prominenteste Beispiel für eine Click-Reaktion.^[174, 175]

Die CuAAC wurde zur Markierung und Modifizierung von Biomolekülen mittels Biokonjugation verwendet. Die Anwendungen reichen dabei von der Herstellung neuartiger Nanostrukturen bishin zur Entwicklung neuer effizienter Wirkstoffe. Ein wichtiges Beispiel dafür ist die Anwendung der CuAAC für die Modifikation von Nukleinsäuren. Dieses erfolgte in der Gruppe von Prof. Thomas Carell, in der zahlreiche CuAAC-basierte Methoden im Rahmen der Nukleinsäurechemie entwickelt wurden, die weitere Möglichkeiten für die Diagnostik genetischer Erkrankungen bieten.^[189] Eine offensichtliche Schwierigkeit liegt dabei in der Notwendigkeit zur raschen Reduktion von Cu(II)-Ionen zu Cu(I) und dessen Komplexierung. Unter nicht komplexierenden Bedingungen kann Cu(I) DNA-Schäden verursachen und somit toxisch auf die Zelle wirken.^[190] Mit der Verwendung von Liganden^[191, 192] wie Tris[(1-benzyl-1H-1,2,3,-triazol-4-yl)methyl]amin (TBTA)^[188, 193] oder dem wasserlöslichen Tris(3-hydroxypropyltriazolylmethyl)amin (THPTA)^[193] wird die Komplexierung effizient ermöglicht. Die Liganden stabilisieren die Cu(I)-Ionen und beugen deren Oxidation zu Cu(II) vor.

Im Jahr 2006 gelang es der Gruppe um Prof. Carell, verschiedene Alkin-modifizierte Phosphoramidite (Alkin-PAs) bzw. Alkin-modifizierte Desoxynukleotidtriphosphate (Alkin-dNTPs) zu synthetisieren und in Oligonukleotide^[17] bzw. in Doppelstrang-DNA (dsDNA)^[194, 195] zu inkorporieren. Die Modifikation der Alkin-dNTPs erfolgte entweder an Position 5 der Pyrimidine oder Position 7 von Desazapurinen. Der Einfluss dieser Basenmodifikationen auf die physikalischen Eigenschaften der damit synthetisierten

DNA wurde als gering eingestuft. Die Struktur und Stabilität der DNA-Duplex sowie deren Hybridisierungseigenschaft blieben fast unverändert. Es wurde lediglich eine unbeträchtliche Abweichung des Schmelzpunkts festgestellt, der einen geringen Anstieg zeigte. Je nach Bedarf können die Basen entweder mit Ethinyl- oder Octadiinyleinheiten modifiziert werden. Ist eine mehrfache Markierung der DNA oder der Oligonukleotide erwünscht, so sind Octadiinyl-Basen bzw. Octadiinyl-triphosphate besser geeignet als Ethinyl-Basen bzw. Ethinyl-Triphosphate. Grund dafür ist, dass durch die langen Seitenketten der Octadiinyleinheiten eine geringere sterische Hinderung der CuAAC auftritt.

Die Herstellung dieser Oligonukleotide erfolgte mittels Standard-DNA-Festphasensynthese, bei der auch Alkin-modifizierte Phosphoramidite (PAs) eingebaut werden können. Der Click-reaktive Marker kann ein beliebiges Azid sein, z.B. ein Fluorophor-Azid ^{[196][197]}. Markierte Oligonukleotide können grundsätzlich auf zwei verschiedenen Wegen hergestellt werden: Durch prä-synthetische oder post-synthetische Markierung (**Abbildung 12**).^[19] Bei der post-synthetischen Markierung werden Alkin-Phosphoramidite während der Festphasensynthese verwendet. Anschließend werden Markerazide durch CuAAC mit den Alkinen zur Reaktion gebracht. Bei der prä-synthetischen Markierung hingegen werden die mit einem Marker versetzten Phosphoramidite direkt in der Festphasensynthese in das Oligonukleotid eingebaut. Somit entstehen fertige „*ready-to-use*“-Oligonukleotide. Um CuAAC-geeignete Oligonukleotide herzustellen werden in der Regel Alkin-modifizierte und nicht die Azid-modifizierten PAs verwendet. Der Einbau Azid-modifizierter PAs stellt ein Problem dar, da das Phosphor(III)-Zentrum des Phosphoramidites die Azidgruppe reduzieren kann.^[18]

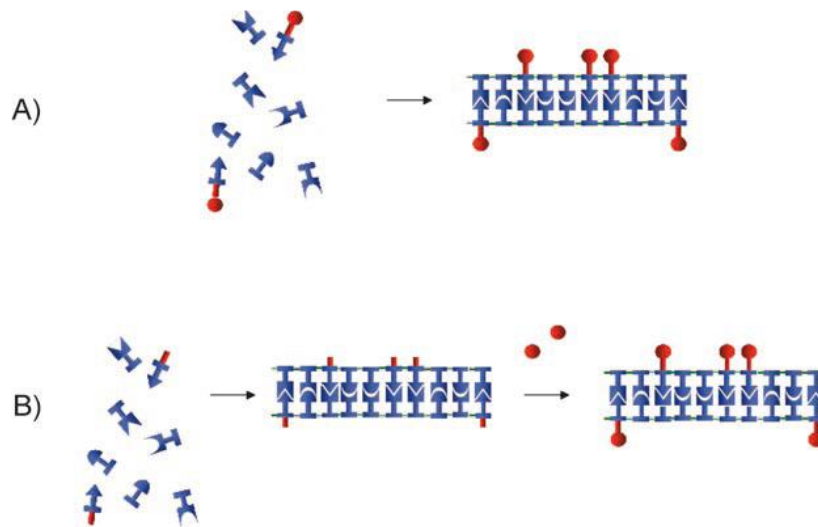


Abbildung 12: prä- und post-Synthese. **A)** Die bereits markierten Nucleotide werden entweder enzymatisch oder durch Festphasensynthese in die neu-synthetisierte DNA inkorporiert. **B)** Die Nucleotide, die entweder mit einem Alkin oder mit einem Azid modifiziert sind, werden in die DNA inkorporiert und anschließend mit einem Farbstoff durch CuAAC-Reaktion markiert.^[19]

Die Herstellung von mit Alkingruppen (Alkin-DNA) modifizierten dsDNA-Sequenzen, kann enzymatisch *via* PCR durchgeführt werden. Für den Einbau von Alkin-dNTPs wurden drei verschiedene thermostabile „Typ B“ Polymerasen identifiziert: Die *Thermococcus litoralis* (Deep-Vent-exo-), *Pyrococcus woesei* (Pwo-) und *Thermococcus kodakaraensis* (KOD-XL)-Polymerasen^[194]. Carell *et al.* konnten DNA-Sequenzen bis zu einem 2000-mer mit vollständigem Ersatz der natürlichen Desoxycytidintriphosphate (dCTPs) durch Alkin-Desoxycytidintriphosphate *via* PCR herstellen. Diese Sequenz konnte anschließend mit 887 Galaktoseaziden durch CuAAC markiert werden.^[195]

Es wurde auch untersucht, ob eine Alkin-modifizierte DNA-Sequenz mit drei unterschiedlichen Azid-modifizierten Molekülen *via* CuAAC markiert werden kann. Eine sequenzielle Markierung durch Verwendung unterschiedlich geschützter Alkine ermöglichte dabei die gewünschte Selektivität. Dabei wurden ein Trimethylsilyl- (TMS), sowie ein Triisopropylsilyl- (TIPS) geschütztes 5-Alkin-2'-desoxycytidin und auch ein ungeschütztes Alkin-Uridin synthetisch in einen DNA-Strang inkorporiert. Die erste CuAAC erfolgte an dem ungeschützten Uridinderivat. Nach dem Entschützen der zweiten Alkinfunktionalität durch Entfernen der TMS-Gruppe konnte die nächste CuAAC durchgeführt werden. Die dritte CuAAC war möglich, nachdem die TIPS-

Schutzgruppe entfernt wurde. Somit konnte eine sequenzielle Markierung einer DNA-Sequenz mit drei unterschiedlichen Markern realisiert werden.^[18]

Die Markierung von Oligonukleotiden und dsDNA durch die CuAAC-Reaktion war ein Meilenstein in der Oligonukleotid-Synthese. Eine hohe Flexibilität in der Herstellung mehrfach- und unterschiedlich-markierter DNA war damit gewährleistet. Diese hochmarkierten Sequenzen waren nicht nur unkompliziert herstellbar, auch deren Aufreinigung war äußerst einfach. Eine Ausbeute von bis zu 90% konnte durch eine einfache EtOH-Fällung erreicht werden. Die gesamte Reihe an Vorteilen der CuAAC an DNA sprach dafür, dass diese Methode bestens für DNA-basierte molekulare Diagnostik geeignet ist.

1.4.1. CuAAC für den Proliferationsassay

Der Zellzyklus findet zwischen zwei Zellteilungen statt und beinhaltet die Replikation der DNA und deren Teilung an die Tochterzellen. Er besteht aus zwei Phasen: Der Interphase, die die G₁-, S-, G₂-Phasen beinhaltet, und der M-Phase, die in Mitose (nukleare Zellteilung) und Zytokinese (Zellteilung) unterteilt ist. In der G₁-Phase wird die Zelle für die Replikation durch Synthese der notwendigen Enzyme vorbereitet. Die DNA kann nur in der nachfolgenden S-Phase (Synthesephase) synthetisiert werden. Dabei werden die Chromosomen repliziert und verdoppelt. In der G₂-Phase wird die Zelle auf die Mitose vorbereitet. Die M-Phase schließt den Zellzyklus ab. Nachdem die Kernteilung beendet ist, erfolgt die Zytokinese (**Abbildung 13**).^[198]

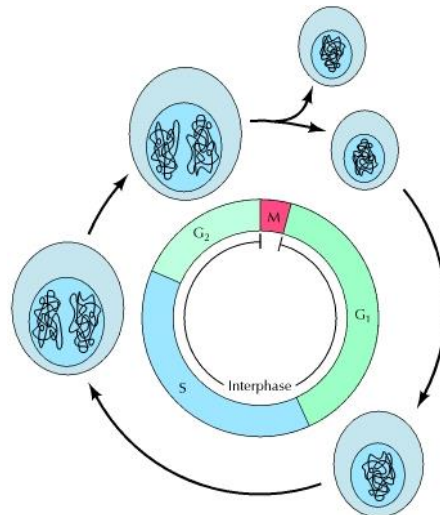


Abbildung 13: Schema des Zellzyklus. Die Interphase beinhaltet drei verschiedenen Phase: die G₁-, G₂-und S-Phasen (Synthese-Phase). Die G₂ ist von der M-Phase (Mitose) gefolgt, am dessen Ende die Zelle sich teilt.^[198]

Im Zellzyklus gibt es außerdem zwei Hauptkontrollmechanismen zur Feststellung von DNA-Schäden: Eine Kaskade von Protein-Phosphorylierung durch hoch regulierten Enzyme aus der Kinase-Familie und ein Satz von „*Check points*“.^[199] Wird die DNA in der G₁-Phase z.B. durch ein Mutagen, Oxidation, Alkylierung, Hydrolyse, UV-Licht oder ionisierende Strahlung beschädigt oder fehlen ihr Nukleotide, so verzögert das Protein p53 den Eintritt in die S-Phase.

Gelingt es den DNA-Reparatursystemen nicht, die Schäden zu beseitigen, kommt es zum genetisch programmierten Zelltod, der sog. Apoptose. Nicht jede Reparatur kann allerdings den ursprünglichen Zustand unverändert wiederherstellen. Es besteht auch die Möglichkeit, dass Mutationen erhalten bleiben, die in bestimmten Kombinationen sogar Krebs -also eine unkontrollierte Zellproliferation- verursachen können.^[200]

Die Analyse des Zellzyklus ermöglicht es, Zellpopulationen anhand ihrer Phasen zu unterscheiden und sogar Defekte im Zellzyklus zu entdecken. Heutzutage werden als Hauptanalysemethoden, die Fluoreszenzmikroskopie oder die Durchflusszytometrie verwendet. Mittels der Fluoreszenzmikroskopie kann nur zwischen Interphase und M-Phase unterschieden werden, wohingegen der Durchflusszytometrie die Unterscheidung zwischen den G₁-, S- und G₂+M-Phasen möglich ist.^[132]

Für die Detektion der Zellproliferation wird zunächst die DNA modifiziert. Dies erfolgt traditionell durch die Zugabe von Nukleosid-Analoga, wie z.B. tritiumhaltiges [³H]-Thymidin oder 5-Bromo-2'-desoxyuridin (BrdU)^[201] (**Abbildung 14a und 14b**) während der Replikation der Zellen. Anschließend wird deren Inkorporation in die DNA

detektiert. Das geschieht entweder autoradiographisch oder unter Verwendung von anti-BrdU-Antikörpern.

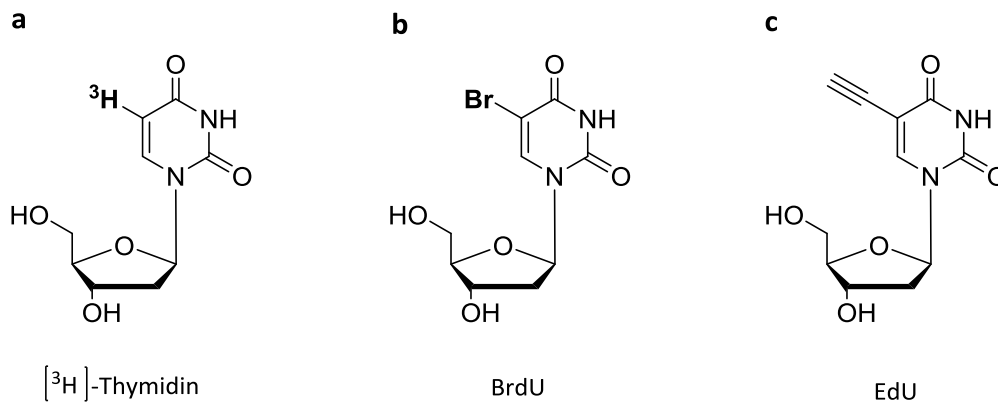


Abbildung 14: Thymidin-Derivat zur Detektion der Zellproliferation. a) Tritiumhaltiges [³H]-Thymidin. b) 5-Bromo-2'-desoxyuridin (BrdU). c) 5'-Ethynyl-2'-Desoxyuridine.

Diese Analysemethoden haben allerdings einige Nachteile. Zum einen sind Autoradiographieverfahren langsam und daher nicht für eine Detektion mit hohem Durchsatz geeignet, zum anderen wirkt die radioaktive Strahlung des Tritiumsubstituenten potentiell gesundheitsschädlich. Der größte Nachteil beim Markieren mit BrdU ist, dass die bromierten Nukleosid-Einheiten durch doppelsträngige DNA maskiert werden. Daher muss die DNA zunächst denaturiert werden, um einen Zugang für die anti-BrdU-Antikörper zu ermöglichen.

Eine gute Alternative für die Markierung stellt der 5'-Ethynyl-2'-desoxyuridin (EdU)-Proliferationsassay dar, da mit dieser Vorgehensweise die Schwächen der anderen Methoden vermieden werden können. Das Thymidin-Analogon EdU (**Abbildung 14c**) wird während der DNA-Synthese in die neu entstehende DNA inkorporiert, allerdings beruht der EdU-Assay im Vergleich zum BrdU-Assay nicht auf Antikörpern, weswegen keine DNA-Denaturierung erforderlich ist. Die Detektion und Quantifizierung der neu-synthetisierten DNA beruht auf der Markierung der inkorporierten Alkin-Modifikationen in fixierten und permeabilisierten Zellen mit einem Farbstoffazid durch CuAAC-Reaktionen (**Abbildung 15**).^[22]

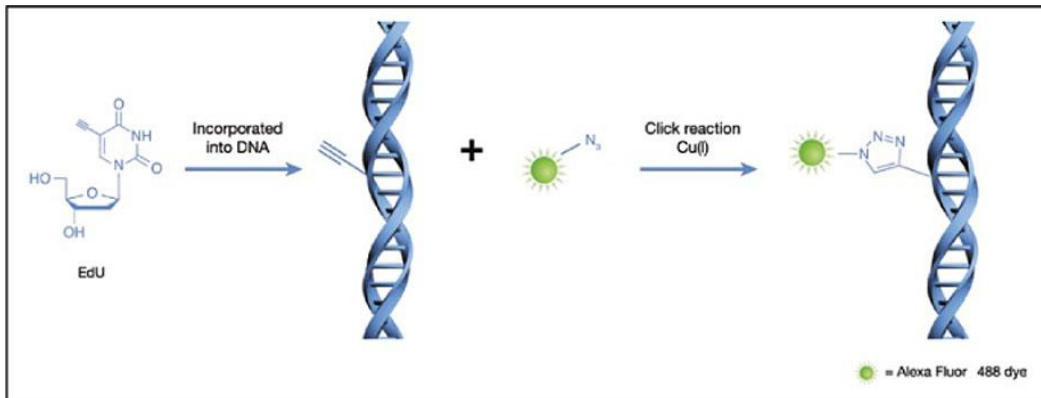


Abbildung 15: Das Prinzip des EdU-Proliferationsassays. EdU wird während der DNA-Synthese in die neu-gebildete DNA inkorporiert. Nach dem Fixieren der Zellen erfolgt eine CuAAC mit einem Farbstoffazid, das unter dem Mikroskop mit der charakteristischen Wellenlänge visualisiert wird. Zellen, die nicht proliferiert haben, weisen keine Fluoreszenz auf und können somit von proliferierenden Zellen unterschieden werden.^[22]

Der EdU-Proliferationsassay wurde etabliert und an vielen verschiedenen Modellorganismen (z.B. an Mäusen^[22], Ratten^[202], Fadenwurm (*Caenorhabditis elegans*)^[203], Zebrafischen^[204], Hühnern^[205]) getestet.^[206] Außerdem ist er ein wichtiger Bestandteil der neurobiologischen Entwicklungsforschung, für die Entwicklung neuer anti-Krebsmedikamente oder der Messung der Wirkung und Toxizität pharmakologischer Substanzen. Jedoch limitiert die Anzahl der zu untersuchenden Zellen diese Methode der Proliferationsbestimmung.

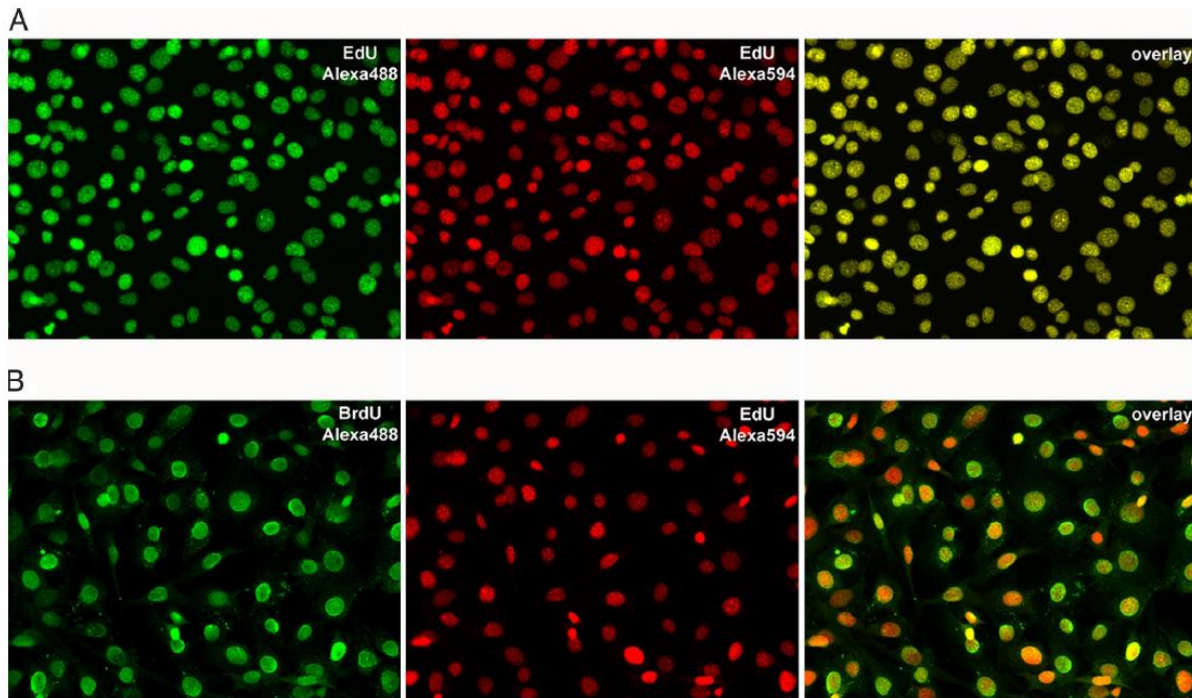


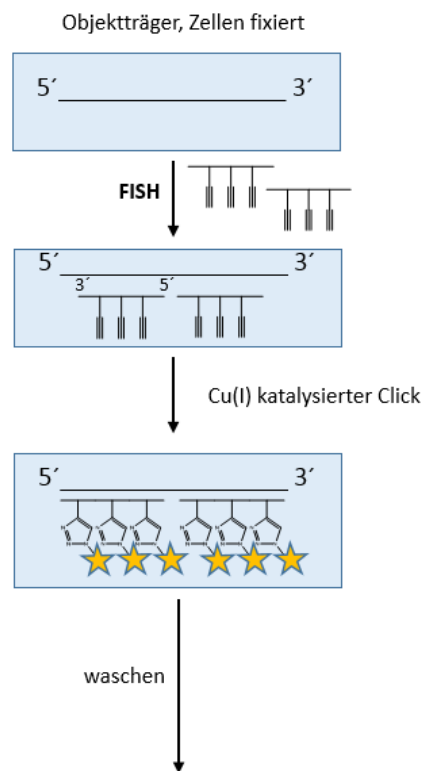
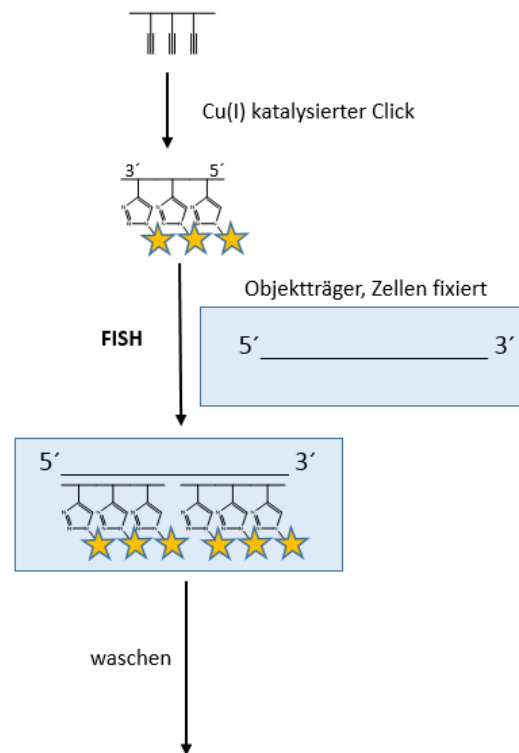
Abbildung 16: Nachweis der Zellproliferation durch Mikroskopie. Die proliferierenden Zellen, die EdU in der genomischen DNA inkorporiert haben, werden mittels CuAAC mit einem Farbstoffazid versehen. Somit können sie detektiert, quantifiziert und von den nicht proliferierenden Zellen unterschieden werden. **A:** Die Co-Lokalisation beider Farben (grün + rot) zeigt, dass benachbarte Ethinylgruppen mit der gleichen Verteilung im Zellkern durch aufeinanderfolgenden Click-Reaktionen mit zwei unterschiedlichen Farbstoffen markiert werden können. **B:** Ein Vergleich zwischen den BrdU- und EdU-basierten Methoden. Während für die Detektion des EdU nur 100 ms Belichtungszeit verwendet wurden, wurden für die Detektion des BrdU-Antikörpers 500 ms benutzt.^[22]

1.4.2. CuAAC für DNA- und mRNA-FISH

Obwohl die Click-Chemie aufgrund ihrer oben beschriebenen Vorteile im Zusammenhang verschiedenster Verfahren untersucht und etabliert worden ist und auch eine potentielle Lösung für die Probleme der klassischen FISH darstellen könnte, wurde sie im Bezug dazu bis *dato* nicht intensiv verwendet. Eine ihrer bekannten Anwendungen ist die sogenannte Mil-FISH oder „*multi-labelled oligonucleotides for FISH*“. Diese Methode basiert auf der Verwendung eines „*Pools*“ multimarkierter Oligonukleotide als Sonde. Allerdings wurde diese Methode bisher nur an Bakterien getestet.^[207]

Die Anwendung der Click-Chemie an dsDNA-FISH-Sonden wurde in der Masterarbeit der Autorin im Arbeitskreis von Prof. Andreas Houben etabliert.^[208] Die Arbeit basiert darauf, dass Alkin-dNTPs (entweder C8-Alkin-dCTP oder C8-Alkin-dTTP) über eine

Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)^[209-211] in neu-synthetisierte dsDNA-Stränge eingebaut werden (siehe **3.4**). Somit werden die natürlichen Nukleotide durch ihre Alkin-modifizierten Derivate ersetzt, da die DNA-Polymerase nicht zwischen den natürlichen und den modifizierten dNTPs unterscheiden kann. Je nach Verhältnis der C8-Alkin-dCTP oder C8-Alkin-dTTP im PCR-Master-Mix werden in den neuen Strängen entweder die dCTPs vollständig durch 5-Octadienyl-dCTP (bzw. alle dTTPs durch C8-Alkin-dTTP) oder nur zur Hälfte ersetzt. Der mit Alkin-Gruppen modifizierte DNA-Strang, der einen bestimmten Genabschnitt in der genomischen DNA repräsentiert, wird dann durch eine einfache Ethanol-Fällung gereinigt. Diese dadurch zugänglichen, neuen CuAAC-geeigneten Sonden, die sogenannten Click-FISH-Sonden, wurden im Rahmen dieser Arbeit erstmals an pflanzlichen Chromosomen und Nuklei, speziell an Roggen (*Secale cereale*), getestet. Das Zentromer-Gen *Bilby*, das für Roggen spezifisch ist, wurde als Ziel für die FISH festgelegt. Das *Bilby*-Gen enthält mehrere repetitive Sequenzen mit einer Länge von ca. 582 bp. Dies stellt natürlich einen großen Vorteil dar, da diese Sequenzen relativ klein im Vergleich zu anderen Genen sind. Das Markieren der Sonde mit einem Farbstoff *via* CuAAC erfolgte auf zwei unterschiedlichen Wegen: Entweder durch Click der Sonde vor der Hybridisierung (Click prä-Hybridisierung) oder durch Click nach der Hybridisierung (Click post-Hybridisierung) (**Abbildung 17**).

Click nach Hybridisierung:Click vor Hybridisierung:

Fluoreszenz Mikroskop

Abbildung 17: Click-FISH: Click post- und prä-Hybridisierung. Links: Bei der Click post-Hybridisierung werden die mit Alkin versetzten dsDNA-Sequenzen mit der komplementär genomischen DNA hybridisiert. Anschließend erfolgt die Click-Reaktion mit einem Farbstoffazid. Rechts: Bei der Click prä-Hybridisierung werden die Sonden erst *in vitro* mit einem Farbstoffazid versetzt. Danach erfolgt die *in-situ*-Hybridisierung (Abbildung aus der Bachelor-Arbeit von Tobias Heins).

Das Prinzip der sogenannten Click prä-Hybridisierung beruht darauf, dass die Sonde erst mit einem Farbstoffazid *in vitro* markiert und danach mit der Ziel-DNA hybridisiert wird (**Abbildung 18**). Obwohl diese Methode gut detektierbare spezifische Signale liefert, sind noch immer vereinzelte Signale der Farbstoffpräzipitate zu sehen, was das Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis dramatisch verschlechtert. Die Limitierung dieser Variante liegt darin, dass die Sonden durch die starke Markierung mit den Farbstoffen veränderte physikalische Eigenschaften aufweisen können. Die Sonden verhalten sich eher wie ein Farbstoffpolymer, das einen hohen Schmelzpunkt besitzt. Das führt manchmal dazu, dass diese Sonden nicht denaturiert werden und demnach nicht mit der komplementär genomischen Ziel-DNA hybridisieren können. Wir hofften, dies

lösen zu können, indem die markierte Sonde vor der Hybridisierung bei der entsprechenden Schmelztemperatur denaturiert wird. Ein weiterer Nachteil dieser Vorgehensweise, der in einem aufwendigeren Waschvorgang zur Entfernung der ungebundenen Sonden liegt, könnte ebenfalls durch Erhöhung der Denaturierungstemperatur überwunden werden.

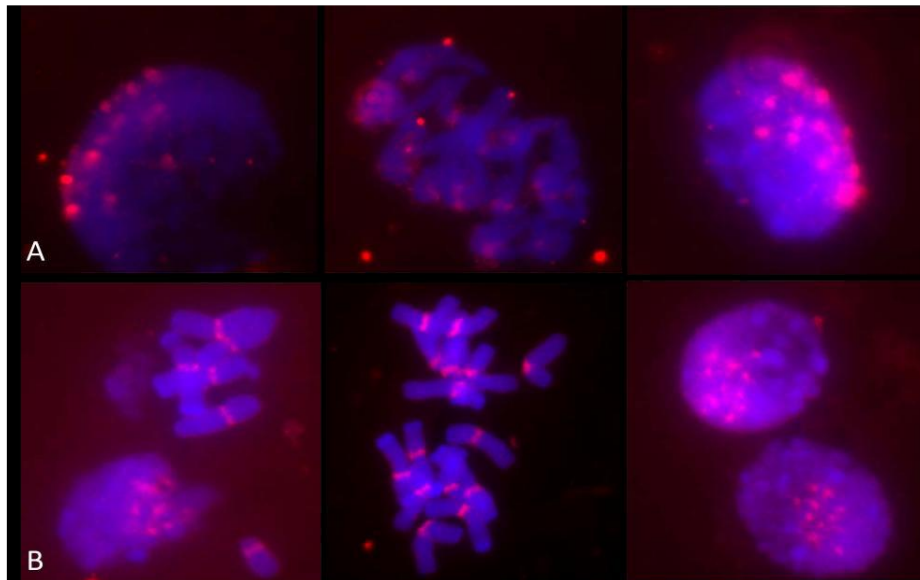


Abbildung 18: Click prä-Hybridisierung zur Visualisierung des *Bilby*-Gens (rot), das für das Zentromer von Roggen charakteristisch ist. **A:** *Bilby*-Sonden mit 50% Alkin-modifizierten dCTPs. **B:** *Bilby*-Sonden mit 100% Alkin-modifizierten dCTPs.

Alternativ wird die Sonde bei der Click post-Hybridisierung, erst hybridisiert und anschließend *in situ* mit einem Farbstoffazid durch CuAAC markiert (**Abbildung 19**). Das „*Proof of concept*“ dieser Methode zeigte eine vergleichbare Signalintensität mit der Kontrolle, in der Sonden durch *Nick*-Translation hergestellt werden.

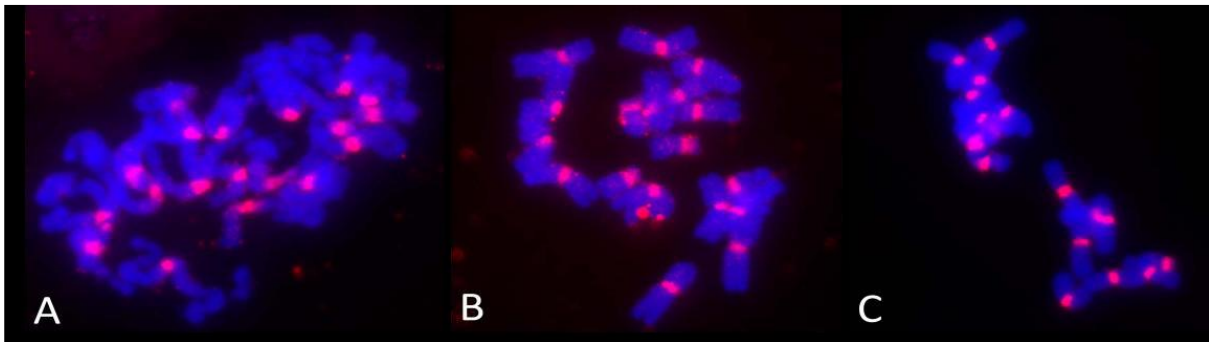


Abbildung 19: Click post-Hybridisierung zur Visualisierung des *Bilby*-Gens (rot). **A+B:** *Bilby*-Sonden mit 100% Alkin-modifizierten dCTPs. **C:** Kontrolle: *Bilby*-Sonden generiert *via* traditionelle *Nick*-Translation.

Beide Methoden wurden an verschiedenen Ziel-Genen in derselben Arbeitsgruppe weiter getestet. Um das Problem der Präzipitation zu lösen, wurden Alkin-modifizierte Oligonukleotide verwendet, die durch CuAAC mit zwei, drei oder vier Farbstoffaziden markiert worden sind (s. Abschnitt 3.3). Das führte zu einer Verbesserung des Signal-zu-Hintergrund-Verhältnisses. Allerdings können Oligonukleotide nur bei Genen mit repetitiven Sequenzen verwendet werden, da sonst eine übergroße Menge von Oligonukleotide benötigt wird.

Auch die Kompatibilität der Click prä-Hybridisierungsmethode mit dem EdU-Proliferationsassay und dem immunhistologischen Assay wurde erfolgreich untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass die sogenannte Click-FISH eine verlässliche Methode zur Detektion repetitiver Sequenzen pflanzlicher Gene darstellt. Diese auf CuAAC-basierenden Methode wurde bisher allerdings weder an menschlichen noch an tierischen Zellen getestet. Auch Gen-Loci ohne repetitive Sequenzen wurden bisher noch nicht untersucht. Nichtsdestotrotz bietet die CuAAC-basierte DNA-FISH Sonden große Vorteile da sie nicht nur vergleichsweise einfach herstellbar sind, sondern in die Menge der eingebauten Farbstoffe exact eingestellt werden kann. Im Gegensatz dazu liefert die traditionelle enzymatische Markierungs-Methode (*Nick*-Translation) nur unkontrollierten zufallsbedingten Einbau der Farbstoffe in der Sonde.

2. Aufgabenstellung

Ziel dieser Doktorarbeit war, die sehr gut etablierte Kupfer(I)-katalysierte Alkin-Azid-Cykloaddition (CuAAC) an Nukleinsäuren, die sogenannte Click-Chemie, zu verwenden, um dicht markierte fluoreszierende Sonden herzustellen und sie für die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung bzw. für den Proliferationsassay zu benützen. Dadurch sollte die Fluoreszenzsignalintensität unter dem Mikroskop und am Durchflusszytometer erhöht werden. Das Detektionslimit sollte auf diese Weise reduziert und das Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis verbessert werden.

Im ersten Abschnitt war zunächst Ziel, neue CuAAC-basierte FISH-Sonden für die Detektion von mRNA *in situ* zu entwickeln. Dazu sollten Sonden aus DNA-Oligonukleotiden, die mit einem bestimmten Target-mRNA hybridisieren können, entworfen werden. Diese Sonden sollten mit einem fluoreszierenden Farbstoffazid durch eine CuAAC-Reaktion markiert und in fixierten Zellen mit dem Target hybridisiert werden. Zunächst sollte die Signalintensität der Fluoreszenz unter dem Mikroskop analysiert und optimiert werden. Schließlich sollte die Methode am Durchflusszytometer angewendet werden. Zum Vergleichsnachweis der Intensität sollten die kommerziell erhältlichen Sonden vom Marktführer benutzt werden.

Die zweite Aufgabe in dieser Arbeit war, den kommerziell erhältlichen Zellproliferationsassay so zu verbessern, dass eine größere Menge an proliferierenden Zellen detektiert werden kann, als bisher möglich war. Darunter fallen Zellen, die erst die S-Phase zum Zeitpunkt der Fixierung begonnen haben. Dazu sollten neue Dendrimere synthetisiert werden, die entweder Alkyne oder Azide aufweisen. Diese neuartigen Dendrimere sollten durch die CuAAC-Reaktion eine Art Sandwich zusammen mit der DNA und dem Farbstoff bilden, um eine mehrfache Bindung des Farbstoffs und somit eine Verstärkung der Signalintensität zu realisieren. Als Vergleichsnachweis sollte das kommerziell erhältliche EdU-Proliferationskit benutzt werden.

3. Veröffentlichte Arbeiten

3.1. “Supersensitive Multifluorophore RNA-FISH for Early Virus Detection and Flow-FISH Using Click Chemistry”

N. Raddaoui[#], S. Croce[#], F. Geiger, A. Borodavka, L. Möckl, S. Stazzoni, B. Viverge, C. Bräuchle, T. Frischmuth, H. Engelke, T. Carell, *ChemBioChem* **2020**, *21*, 1–6.

[#] geteilte Erstautorenschaft

Prolog

Genexpression variiert stark zwischen den einzelnen Zellen.^[212, 213] Die Analyse des Transkriptionszustandes einzelner Zellen in komplexen Zusammenhängen kann am besten mit der RNA-Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (RNA-FISH) durchgeführt werden.^[214] Diese Technologie ermöglicht nicht nur die Quantifizierung von Transkriptionsereignissen in einzelnen Zellen, sondern auch die Untersuchung des Lokalisationsmusters der einzelnen RNA-Moleküle innerhalb der Zelle.^[21, 130, 215, 216] Die Lokalisierung der Transkripte wird durch weitgehend nicht vollständig verstandene Mechanismen erreicht^[94-96, 217], aber es ist ein Prozess, der es den Zellen erlaubt, die Übersetzung der Transkripte und damit die Proteinherstellung zu regulieren.^[218-221] Heute ist die RNA-FISH eine gefragte Technologie, die mit verschiedenen Methoden durchgeführt werden kann (siehe Abschnitt **1.3.3**). Die prominente Variante basiert auf der Verwendung mehrerer Anti-Sense-DNA-Stränge, die etwa 22 nt lang sind. Jeder Strang trägt ein fluoreszierendes Fluorophor.^[21] Typischerweise sind etwa 48 dieser Einzelstrang-DNA (ssDNA)-Sonden (Sondenset), die am 3'-Ende eine Aminogruppe tragen, mit dem fluoreszierenden Fluorophor gekoppelt, der einen NHS-Ester trägt. Nach der Aufreinigung mittels HPLC werden die gemischten ssDNA-Sonden zur Hybridisierung mit der komplementären *messenger*-RNA (mRNA) in fixierten und permeabilisierten Zellen gegeben. Die benötigte große Anzahl von DNA-Strängen führt zu einer signifikanten Off-Target-Färbung und das erhaltene Signal-Rausch-Verhältnis ist daher gering. Um aussagekräftige Daten zu erhalten, ist eine spezielle Dekonvolutionssoftware erforderlich, die die Analyse der behandelten Zellen mittels Durchflusszytometrie erschwert. Darüber hinaus werden die vielen DNA-Sonden umständlich einzeln hergestellt. Ihre Kopplung mit dem Farbstoff sollte so schnell wie möglich erfolgen, um die Zersetzung der aktivierten Estergruppen vom Farbstoff zu

verhindern. Die gekoppelten Oligonukleotide müssen darüberhinaus mittels HPLC gereinigt werden, um die markierten von den unmarkierten Oligonukleotide zu trennen. In diesem Abschnitt der Doktorarbeit berichten wir, dass ein FISH-Sondenset für mRNA, bei dem jede Sonde drei Fluorophore statt nur einem enthält, mit der CuAAC-Reaktion leicht hergestellt werden kann. Die neue Technik könnte viele der mit der modernen RNA-FISH verbundenen Probleme lösen. Wir konnten Transkripte mit nur 10 CuAAC-markierten Sonden visualisieren. Die neuen Sonden ermöglichen die Quantifizierung der Transkripte und deren Lokalisierung mittels Mikroskopie und sogar deren Quantifizierung mittels Durchflusszytometrie.

Autorenbeitrag

Für dieses Projekt habe ich die Zellkulturexperimente für die Mikroskopie und teilweise für die Durchflusszytometrie durchgeführt. Das Designen der Sonden, die Clickreaktionen sowie das Fixieren, Permeabilisieren und FISH, teilweise die Bearbeitung der Mikroskopiebilder wurden von mir ausgeführt. Stefano Croce hat die FACS-Experimente durchgeführt. Leonhard Möckl und Florian Geiger haben das Mikroskopieren und die Auswertung der Mikroskopiedaten übernommen. Die Interpretation der erhaltenen Daten wurde von den Erstautoren, zusammen mit *Prof. Thomas Carell* gemeinsam vorgenommen. Alexander Borodavka hat die Virusexperimente durchgeführt.

Supersensitive Multifluorophore RNA-FISH for Early Virus Detection and Flow-FISH by Using Click Chemistry

Nada Raddaoui⁺,^[a] Stefano Croce⁺,^[a, b] Florian Geiger,^[a] Alexander Borodavka,^[c, d] Leonhard Möckl,^[a] Samuele Stazzoni,^[a] Bastien Viverge,^[a] Christoph Bräuchle,^[a] Thomas Frischmuth,^[b] Hanna Engelke,^[a] and Thomas Carell^{*[a]}

The reliable detection of transcription events through the quantification of the corresponding mRNA is of paramount importance for the diagnostics of infections and diseases. The quantification and localization analysis of the transcripts of a particular gene allows disease states to be characterized more directly compared to an analysis on the transcriptome wide level. This is particularly needed for the early detection of virus infections as now required for emergent viral diseases, e. g. Covid-19. *In situ* mRNA analysis, however, is a formidable challenge and currently performed with sets of single-fluorophore-containing oligonucleotide probes that hybridize to the

mRNA in question. Often a large number of probe strands (> 30) are required to get a reliable signal. The more oligonucleotide probes are used, however, the higher the potential off-target binding effects that create background noise. Here, we used click chemistry and alkyne-modified DNA oligonucleotides to prepare multiple-fluorophore-containing probes. We found that these multiple-dye probes allow reliable detection and direct visualization of mRNA with only a very small number (5–10) of probe strands. The new method enabled the *in situ* detection of viral transcripts as early as 4 hours after infection.

Introduction

Gene expression varies significantly between individual cells and it is strongly altered in disease states. Viral infections for example lead to early transcription of virus-specific genes that could be exploited for an early diagnosis and characterization of the infection. In general, basically all malfunctioning processes in cells induce transcriptional changes.^[1,2] These go in hand with altered levels of messenger RNAs (mRNAs). In extreme cases disease related mRNA may not be present at all in the normal state. In most cases however, the levels of specific mRNA will be changed, which requires reliable methods to quantify mRNA transcripts. Detection and quantification of a

specific mRNA is thus highly desirable from a diagnostic point of view. Particularly informative are methods that allow the quantification of mRNA levels with spatial resolution. Currently, however, intracellular localization and quantification of mRNA faces a number of challenges that hinder routine use. The most common way to detect mRNA (or other RNAs) in cells is fluorescence *in situ* hybridization (RNA-FISH).^[3] The method reveals localization patterns of individual RNA transcripts in cells or tissues and as such, RNA-FISH is the method of choice for quantitative single-cell transcriptomic studies.^[4–8] The currently available technology behind RNA-FISH technologies is based on multiple (up to 50) individual anti-sense single-stranded (ss) DNA probes, which are approximately 22 nucleotides long. Each probe oligonucleotide carries a single fluorophore, which is typically introduced as its activated NHS ester to an amino group present at the 3'-end of the probe.^[4,5] The pooled fluorescent ssDNA probes are finally added to fixed and permeabilized cells for hybridization with the target RNA. The large number of probe strands in such experiments is needed to create a sufficiently strong fluorescence signal. However, generally the larger the number of probe oligonucleotides that are used, the larger is often also off-target staining, which obscures the signal-to-noise ratio. A solution to the problem is deconvolution software that is able to increase the specific signal.^[9] From a chemical point of view reduction of the number of probe strands is desirable and this has led to efforts to modify the probe oligonucleotides with, for example, LNA to increase binding. Importantly, mRNA analysis based on flow-cytometry is so far very challenging with contemporary RNA-FISH.

Here we report a small FISH-probe set for mRNA, where every probe contains three fluorophores instead of just one. These multichromophore probes were conveniently prepared

[a] N. Raddaoui,⁺ S. Croce,⁺ F. Geiger, L. Möckl, S. Stazzoni, B. Viverge, C. Bräuchle, H. Engelke, T. Carell
Department of Chemistry
Ludwig-Maximilians-Universität München
Butenandtstraße 5–13, 81377 Munich (Germany)
E-mail: Thomas.carell@lmu.de

[b] S. Croce,⁺ T. Frischmuth
Baseclick GmbH
Floriensbogen 2–4, 82061 Neuried (München) (Germany)

[c] A. Borodavka
Astbury Centre for Structural Molecular Biology
School of Molecular and Cellular Biology, University of Leeds
Leeds, LS2 9JT (UK)

[d] A. Borodavka
Department of Biochemistry
University of Cambridge,
Cambridge, CB2 1QW (UK)

[*] These authors contributed equally to this manuscript

Supporting information for this article is available on the WWW under <https://doi.org/10.1002/cbic.202000081>

© 2020 The Authors. Published by Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

using the Cu^I-catalyzed azide-alkyne click reaction.^[10–19] In order to avoid stacking of the fluorophores on top of each other, which might induce self-quenching, we chose a fluorophores with two additional sulfonate groups, which provide two negative charges per fluorophore. This is supposed to minimize the interaction with the fluorophores with each other and with the negatively charged DNA. Indeed, with this design a small number of probe strands (5–10) was found to be sufficient for the visualization of RNA transcripts. The new probes design allowed not only transcript quantification and localization by microscopy, but it also enabled transcript analysis using flow-cytometry.

Results and Discussion

The new procedure based on click chemistry is illustrated in Figure 1. As a test-system for the mRNA-FISH we used a HEK293T cell line transfected with a plasmid containing the gene coding for the enhanced green fluorescent protein (eGFP). We synthesized ten DNA probe oligonucleotides targeting specific areas of the eGFP-mRNA transcript, with each one containing 22 nucleotides (Figure S1 in the Supporting Information). Into each of the ten DNA probe strands we inserted three C8-alkyne-dU building blocks at former dT positions (Figure 1 and Table S1) using phosphoramidites that we had developed previously.^[20] The ten triple-alkyne DNA probes were finally purified by HPLC and individually subjected to a click reaction with Eterneon-Red 645 azide (cyanine-5 analogue). The so obtained three Eterneon containing DNA probes (10×3) were finally purified by a simple ethanol precipitation. Due to the high efficiency of the click reaction, no further HPLC purification of the probes was required. For the probes prepared for the

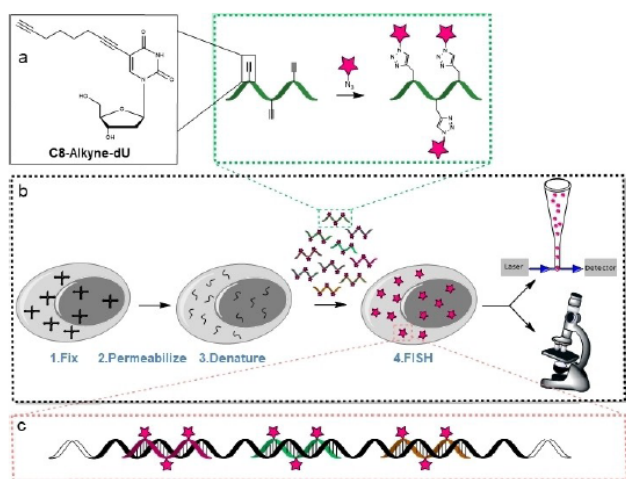


Figure 1. Depiction of RNA-FISH and schematic representation of the probe synthesis. a) Synthetic oligonucleotides with C8-alkyne-dU modifications in various positions were individually conjugated with a fluorescent dye azide. After reaction, the oligonucleotides were mixed to a probe set. b) The probe set was hybridized to the mRNA. After *in situ* hybridization, the mRNA molecules can be detected by flow-cytometry and/or microscopy. c) Depiction of the probes labeled with click chemistry hybridized to the target mRNA.

virus experiment (*vide infra*) we also confirmed the purity of the obtained probe strand by HPLC chromatography (example shown in Figure S2). HPLC chromatographic analysis of our 10×3 probe set proved good absorption and fluorescence properties (Figures S3 and S4).

In order to compare the obtained data with the state-of-the-art we performed in parallel studies with a commercially available RNA-FISH probe set. The provider suggested for the requested detection a set of 30 probe oligonucleotides (Table S2) each one carrying one Quasar 670 fluorophore. The purchased oligonucleotide probes are shown in Figure S1.

In order to investigate the ability to detect RNA, we first performed *in vitro* experiments with isolated total-RNA obtained from wild-type HEK293T and HEK293T-eGFP, stably expressing the eGFP gene. The data are depicted in Figure S5, we obtained clearly visible spots with the (10×3) triple modified probes. Importantly, the 10×3 set provided bright spots even without the use of the special deconvolution software. In order to exclude that the high spot density obtained with the new probes is caused by unspecific binding, we performed a negative control with total RNA isolated from HEK293T cells not expressing the eGFP-protein (control probes). Here, as expected far fewer spots were obtained, which rules out this possibility.

After these *in vitro* experiments, we next investigated the properties of the 10×3 probe set in fixed cells (Figure 2). To this end, the HEK293T cells were grown on 8-well μ -Slide (ibidi) and transfected with a plasmid DNA containing a gene coding for eGFP. The cells were fixed and permeabilized using the standard protocols (see Materials in the Supporting Information). We next added the mixture containing our 10×3 probe set and as a positive control, we also performed an experiment with the 30×1 set. Both probe sets were incubated over night at 37 °C. After washing, we analyzed the cells by fluorescence microscopy. The result of the study is shown in Figure 2a. In order to quantify the background fluorescence signal, we calculated the signal intensity obtained after *in situ* hybridization of the probe sets lacking the eGFP-locus. This background signals for the 10×3 and 30×1 experiment were

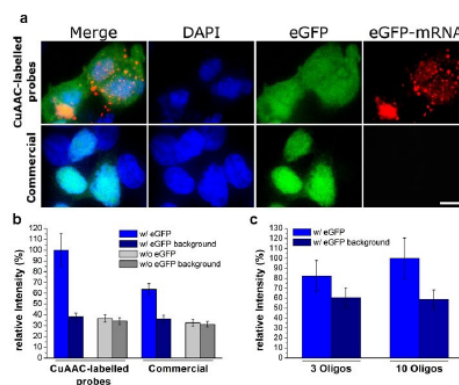


Figure 2. mRNA of eGFP-expressing HEK cells labeled with 10×3 and with 30×1 probe sets. a) FISH microscopy images of the 10×3 and 30×1 set of probes (scale bar: 10 μ m) b) Comparison of the signal and background intensities. c) Signal and background obtained with CuAAC-labeled probes when using 3 and 10 oligos.

subtracted from 10×3 and 30×1 data sets obtained with the eGFP expressing cells (Figure 2b). As depicted in Figure 2a we saw for the 10×3 probe set diffraction-limited spots were detected showing clearly the presence of the complementary mRNAs (Figure 2a, red channel). The signal-to-noise ratio was strongly increased. A small caveat is that we noted a slightly increased background signal with the 10×3 probe set (Figure 2b, dark gray bar) likely because the oligonucleotide containing three dyes are more hydrophobic, which may give slightly increased unspecific binding, which increases the background. This effect is obviously overcompensated by the strong increase of the fluorescence signal obtained from specific binding events.

We next experimented with different number of probe strands and dye loading and found that the most reproducible data were indeed obtained with ten oligonucleotide probe strands containing each three fluorophores. In our hands this probe design provided in all investigated cases the best signal-to-noise ratios (Figures 2c and S6).

We next investigated if we could further reduce the background signal when we performed the click reaction after *in situ* hybridization as shown in (Figure S7). For this study, we used a set of 10 probe strands with 3 alkyne units, hybridized them with the cellular mRNA and performed the CuAAC-reaction subsequently *in situ* with a TAMRA azide. While the signal-to-noise ratio indeed improved, we noted that we had to perform extensive washing in order to remove additional dye, which is typically used in large excess. This makes this procedure a little more accurate but cumbersome to perform.

We next investigated if the performance of the 10×3 probe design allows to detect mRNA even using flow-cytometry in a mixed cell population. For the experiment, we mixed HEK293T cells with and without eGFP-expression in a ratio 20:1 (95% HEK293T + 5% HEK293T-eGFP). Then, flow-cytometric measurements of the mixed cell populations were performed at $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm} / \lambda_{\text{em}} = 530 \text{ nm}$ for the detection of the eGFP protein. The correct ratio of the mixed cell population was nicely reproduced (Figure 3a). We then used the flow-FISH protocol described by Arrigucci et al.,^[21] which involves trypsinization and resuspension of cells. The cells in suspension were permeabilized, fixed and subsequently incubated with the probe sets. Again, we performed the study with the new 10×3 set in comparison to a classical 30×1 design. When we measured at $\lambda_{\text{ex}} = 633 \text{ nm} / \lambda_{\text{em}} = 660 \text{ nm}$, which is suitable for both the Eterneon-Red 645 azide and the Quasar 670 dye, in the absence of hybridized probes, a single population was observed (Figure S8i). The upper plot of Figure 3b shows the hybridization experiment using the classical probe set at $0.05 \text{ ng}/\mu\text{L}$. Here, only a single population containing both GFP-positive and GFP-negative cells was detected at 660 nm . When the 10×3 probe set was used however at the same concentration (lower plot), the GFP-positive population nicely separated from the GFP-negative cells. When the separated population was gated (in blue), the exact proportion of cells expressing the eGFP was observed for the two different detection wavelengths. The same result with the classical 30×1 probe set was only obtained, when the concentration was

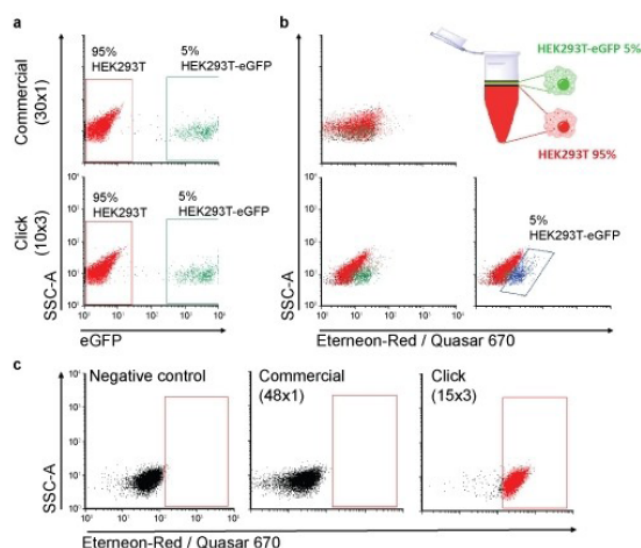


Figure 3. Flow cytometry analysis of mixed HEK293T and HEK293T expressing eGFP in a ratio 20:1. a) Mixing ratio determined on the basis of eGFP fluorescence. b) Mixing ratio determined by flow-FISH. At $0.05 \text{ ng}/\mu\text{L}$ of probe, separation was only possible for the 10×3 set and establishes the same ratio when gated, in blue (5%). c) Flow-FISH for the detection of the endogenous ABL transcript.

increased fourfold to $0.2 \text{ ng DNA}/\mu\text{L}$ (Figure S8ii). These flow-FISH data show again that the 10×3 probe allows to perform flow-FISH. Although an exact comparison between the 10×3 and the 30×1 probe sets is not possible, because of the differences in the fluorophore, the connectivity of the fluorophore to the probe and the quality of the strands, we believe that the data support the idea that flow-FISH is possible with our new probe design that has a limited number of probe oligonucleotides each one carrying three fluorophores.

In order to show that the new probe oligonucleotides are able to report transcription of a relevant endogenous gene by flow-cytometry, we next tested if the above method would be suitable for the detection of the ABL1-transcript. This time, we used a slightly larger 15×3 probe set. In order to again obtain comparative information we compared our design with a reported detection that used in this case 48 single labelled oligonucleotides (Semrau et al.).^[5] The results are depicted in Figure 3c. While the 15×3 probe set with only $0.05 \text{ ng DNA}/\mu\text{L}$ provides a clear shift in fluorescence compared to the negative control, the 48×1 probe set was under these conditions unable to provide a specific signal separation at this concentration.

We finally explored if the new (10×3) probe design enables imaging of RNA targets that are hard to image with conventional FISH probes. Such targets are characterized by extensive secondary structures that provides only few accessible sites for probe hybridization. We tested our probes by targeting a $\sim 1 \text{ kb}$ RNA viral transcript of the rotavirus A (RVA) gene segment-7. The idea was to test whether our set of probes detects these transcripts shortly after virus infection when the concentration of the transcript is expected to be very low. This specific target was chosen because of its extensive secondary structure that precludes hybridization of multiple probes, posing additional

challenges for conventional FISH.^[22] We fixed rotavirus-infected cells, 4 hours post infection and incubated them with the (10×3) DNA probe set targeting the RNA regions that were predicted to have less pronounced secondary structures.^[23] To facilitate the detection of virus-infected cells, we took advantage of a stable cell line that expresses the rotavirus non-structural protein (NSP5)^[24] fused to eGFP (see Methods in the Supporting Information).

After 4 hours post infection RVA, transcripts could be readily detected (Figure 4, top panel, red signal). No transcript specific signal was observed in mock-infected cells (Figure 4, bottom panel).

In parallel, we also analyzed eGFP-NSP5-marked foci in RVA-infected cells to identify cells at a more advanced stage of infection (Figure 4, top panel, green signal). As expected, these cells showed higher levels of the RNA transcript fully consistent with an increase of the amount of viral RNA transcripts over the course of the viral infection.

Importantly, the increased sensitivity of the new 10×3 detection approach uncovered a number of interesting insights. First, the data show a large variation in the amount of transcripts in different cells at the onset of infection. These variations likely reflect differences in the transcriptional activities of different rotavirus particles.^[25] Furthermore, the transcripts do not seem to accumulate in a particular cellular compartment or in virus-induced organelles during early infection. These results thus show that the new 10×3 probe design is a significant step forward because it provides new biological insights.

Conclusions

We show here that by decreasing the number of probes and increasing the number of fluorophores on oligonucleotide probes using click chemistry provides fluorescent probe strands that allow efficient detection of RNA transcripts in live cells. The probes have a superb sensitivity and allow detection of transcripts that due to high secondary structure content provide only a limited number of binding sites. Self-quenching seems to play only a minor role, possibly because we used fluorophores that carry two negative charges each. The new probe design is

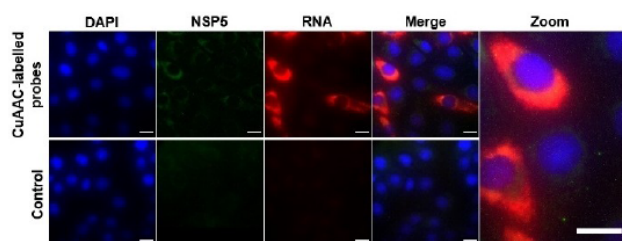


Figure 4. Rotavirus gene segment-7 RNA transcripts imaged with 10×3 probes. Upper panel: RNA transcripts (red) in virus-infected cells stably expressing rotavirus non-structural protein NSP5 fused to eGFP (green) detected 4 hours post infection. Lower panel: Mock-infected MA104 cells stably expressing NSP5-eGFP. Scale bars: 20 μm.

so sensitive that it even allows flow RNA-FISH to be established for demanding flow cytometry applications. These results pave the way for the detection of small highly structure RNA transcripts and transcripts with low abundance. A potential application could be the monitoring of leukemia therapy by flow-FISH to prevent dangerous relapse cases or the very early detection of virus infections now needed for the detection of the Corona virus to reduce the diagnostic gap and prevent uncontrolled propagation of the disease.

Acknowledgements

Funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation) – Project-ID 201269156 – SFB 1032. This project has received further funding from the European Research Council (ERC) under the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No 741912 and from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under the Marie Skłodowska-Curie grant agreements no. 861381 and 765266. A. B. was supported by the Wellcome Trust (grants 103038/Z/3/Z and 213437/Z/18/Z)

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Keywords: click chemistry · fluorescence probes · mRNA detection · RNA-FISH · viral infection

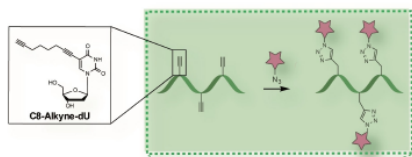
- [1] A. Raj, A. Van Oudenaarden, *Cell* 2008, 135, 216–226.
- [2] A. Eldar, M. B. Elowitz, *Nature* 2010, 467, 167–173.
- [3] S. Itzkovitz, A. van Oudenaarden, *Nat. Methods* 2011, 8, 12–19.
- [4] A. Raj, P. van den Bogaard, S. A. Rifkin, A. van Oudenaarden, S. Tyagi, *Nat. Methods* 2008, 5, 877–879.
- [5] A. Raj, S. Tyagi. Detection of individual endogenous RNA transcripts in situ using multiple singly labeled probes. In: *Single molecule Tools: Chapter 17, Fluorescence based approaches, Part A*; Walter, N. G. B. T.-M. in E., Ed.; Academic Press, 2010, 472, 365–368.
- [6] S. Semrau, N. Crosetto, M. Bienko, M. Boni, P. Bernasconi, *Cell Rep.* 2011, 6, 18–23.
- [7] T. Muramoto, D. Cannon, M. Gierliński, A. Corrigan, G. J. Barton, J. R. Chubb, *Proc. Mont. Acad. Sci.* 2012, 109, 7350–7355.
- [8] A. M. Femino, F. S. Fay, K. Fogarty, R. H. Singer, *Science* 1998, 280, 585–590.
- [9] C. Larsson, I. Grundberg, O. Söderberg, M. Nilsson, *Nat. Methods* 2010, 7, 395–397.
- [10] T. Trcek, T. Lionnet, H. Shroff, R. Lehmann, *Nat. Protoc.* 2017, 12, 1326–1348.
- [11] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2001, 40, 2004–2021; *Angew. Chem.* 2001, 113, 2056–2075.
- [12] K. V. Gothelf, K. A. Jørgensen, *Chem. Rev.* 1998, 98, 863–910.
- [13] S. Bräse, C. Gil, K. Knepper, V. Zimmermann, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2005, 44, 5188–5240.
- [14] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* 2002, 67, 3057–3064.
- [15] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2002, 41, 2596–2599.
- [16] K. Gutmiedl, D. Fazio, T. Carell, *Chem. Eur. J.* 2010, 16, 6877–6883.
- [17] J. Gierlich, G. A. Burley, P. M. E. Gramlich, D. M. Hammond, T. Carell, *Org. Lett.* 2006, 8, 3639–3642.

- [18] P. M. E. Gramlich, S. Warncke, J. Gierlich, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8350–8358.
- [19] P. M. E. Gramlich, C. T. Wirges, A. Manetto, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8350–8358.
- [20] S. Hesse, A. Manetto, V. Cassinelli, J. Fuchs, L. Ma, N. Raddaoui, A. Houben, *Chromosom. Res.* **2016**, *24*, 299–307.
- [21] J. Gierlich, G. A. Burley, P. M. E. Gramlich, D. M. Hammond, T. Carell, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3639–3642.
- [22] R. Arrigucci, Y. Bushkin, F. Radford, K. Lakehal, P. Vir, R. Pine, D. Martin, J. Sugarman, Y. Zhao, G. S. Yap, *Nat. Protoc.* **2017**, *12*, 1245–1260.
- [23] A. Borodavka, E. C. Dykeman, W. Schrimpf, D. C. Lamb, *elife* **2017**, *6*, e27453.
- [24] F. Rodriguez, O. R. Burrone, C. Eichwald, *J. Gen. Virol.* **2004**, *85*, 625–634.
- [25] E. N. Salgado, S. Upadhyayula, S. C. Harrison, *J. Virol.* **2017**, *91*, e00651–17.
- [26] A. Borodavka, U. Desselberger, J. T. Patton, *Curr. Opin. Virol.* **2018**, *33*, 106–112.

Manuscript received: February 10, 2020
Revised manuscript received: March 11, 2020
Accepted manuscript online: March 18, 2020
Version of record online: April 20, 2020

FULL PAPERS

More is less! Increasing the number of fluorophores per oligonucleotide probe allows superb sensitivity, as the fewer the number of probes needed, the lower the background noise. With just a small number of triply labeled strands, RNA-FISH-based detection of RNA transcripts was possible in live cells, and a virus could be detected after only 4 hours.



*N. Raddaoui, S. Croce, F. Geiger, A. Borodavka, L. Möckl, S. Stazzoni, B. Viverge, C. Bräuchle, T. Frischmuth, H. Engelke, T. Carell**

1 – 6

Supersensitive Multifluorophore RNA-FISH for Early Virus Detection and Flow-FISH by Using Click Chemistry



ChemBioChem

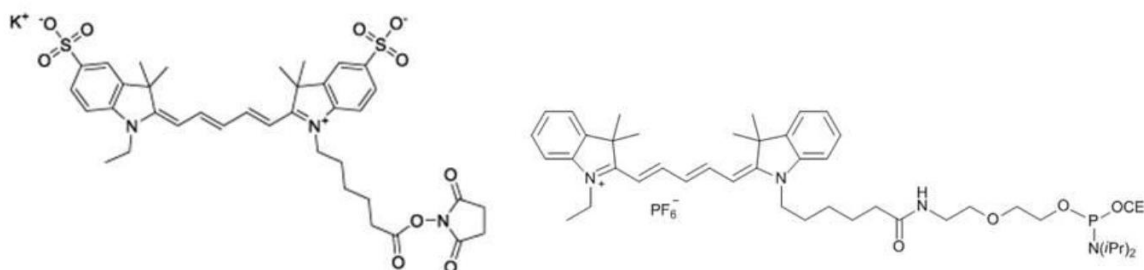
Supporting Information

Supersensitive Multifluorophore RNA-FISH for Early Virus Detection and Flow-FISH by Using Click Chemistry

Nada Raddaoui⁺, Stefano Croce⁺, Florian Geiger, Alexander Borodavka, Leonhard Möckl, Samuele Stazzoni, Bastien Viverge, Christoph Bräuchle, Thomas Frischmuth, Hanna Engelke, and Thomas Carell*[©] 2020 The Authors. Published by Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Eternion Red 645

Quasar 670



Probe design and sequences for eGFP mRNA

5'-ATGGTGAGCA AGGGCGAGGA GCTGTTACC GGGGTGGTG CCATCTGGTCGAGCTGGAC GGCACGTAA ACGCCACAA GTTCAGCGTG TCCGGCGAGG GCGAGGGCGA TGC
3'-TACCACTCGT TCCCGCTCCT CGACAAGTGG CCCACCACG GGTAGGACCA GCTCGACCTG CCGTGCATT TGCCGGTGT CAAGTCGCAC AGGCCGCTCC CGTCCCGCT ACG
1 TCGT TCCCGCTCCT CGACAAGT **2** CTG CCGTGCATT TGCCGGTGT

CACCTAC GGCAAGCTGA CCTGAAGTT CATCTGCACC ACCGGCAAGC TGCCCGTGCC CTGGCCACC CTCGTGACCA CCCTGACCTA CGGCGTGAC TGCTTCAGCC GCTACCCC
GTGGATGCCGTTCCGACT GGGACTTCAA GTAGACGTGG TGGCCGTTCC ACGGGCACGG GACCCGGTGG GAGCACTGGT GGGACTGGAT GCCGCACGTC ACGAAGTCGGCGATGGGG
3 TTCAA GTAGACGTGG TGGCCGT

GA CCACATGAAG CAGCAGACT TCTTCAAGTC CGCCATGCCGGAAGGCTACG TCCAGGAGCG CACCATCTTC TTCAAGGACG ACGGCAACTA CAAGACCCGC GCCGAGGTGA AGTT
CTGGTACTTC GTCGTGCTGA AGAAGTTCAG GCGGTACGGGCTTCCGATGC AGTCTCCGCTGTTGATAAG AAGTTCCTGC TGCCGTTGAT GTTCTGGGCG CGGCTCCACT TCAA
4 AGAAGTTCAG GCGGTACGGGCT **5** TTCTGC TGCCGTTGAT GTTCT **6** CTCCACT TCAA

CGAGGG CGACACCCCTG GTGAACCGCA TCGAGCTGAA GGGCATCGAC TTCAAGGAGGACGGCAACAT CCTGGGGCAC AAGCTGGAGT ACAACTACAA CAGCCACAACGTCTATAT
GCTCCC GCTGTGGGACCACTTGGCGT AGCTCGACTT CCCGTAGCTG AAGTTCCTCC TGCCGTTGTA GGACCCCGTG TTCGACCTCA TGTGTATGTT GTCGGTGTG CAGATATA
GCTCCC GCTGT **7** CTG AAGTTCCTCC TGCCGTTGT

CA TGGCCGACAA GCAGAAGAAC GGCATCAAGG TGAACCTCAA GATCCGCCAC AACATCGAGG ACGGCAGCGT GCAGCTGCC GACCACTACC AGCAGAACAC CCCCATCGG
GT ACCGGCTGTT CGTCTTCTG CCGTAGTTC ACTTGAAGTT CTAGGCGGTG TTGTAGCTCC TGCCGTCGCA CGTCGAGCGG CTGGTGATGG TCGTCTTGTG GGGGTAGCCG
8 TGTAGCTCC TGCCGTCGCA CGT

GACGGCCCCG TGCTGTGCC CGACAACCAC TACCTGAGCA CCCAGTCCG CTTGAGC AAA GACCCCAACG AGAAGCGCGA TCACATGGTC CTGCTGGAGT TCGTGACCCG CGCC
CTGCCGGGGC ACGACGACGG GCTGTTGGTG ATGGACTCGT GGGTCAGGCG GGACTC GTTT CTGGGGTTGC TCTTCGCT AGTGTACCAG GACGACCTCA AGCACTGGCG GCGG
9 GACGG GCTGTTGGTG ATGGACT

GGGATC ACTCTCGCA TGGACGAGCTGTACAAGTAA-3'
CCCTAG TGAGAGCCGT ACCTGCTCGA CATGTTCAAT-5'
10 GAGCCGT ACCTGCTCGA CATGT

Sense sequence of eGFP-mRNA

Control anti-sense oligonucleotides

CuAAA-labelled anti-sense oligonucleotides

Figure S1. Sequence of the eGFP transcript in grey, together with the sequence of the antisense 10x3 probes in red. The comparison 30x1 probes are shown in green / light green.

Oligonucleotide synthesis

Into each of the DNA strands, three C8-alkyne-dU building blocks were inserted at former dT positions using phosphoramidites developed before[1].

Table S1. Sequences of the 10 oligonucleotide RNA FISH probes and the positions of the C8-alkyne-dU building blocks. The Oligonucleotides listed below were generated for eGFP mRNA using the Stellaris RNA FISH probe designer (<https://www.biosearchtech.com/stellaris-designer>). The positions of the modifications are highlighted in blue.

Number	Sequence 5' -> 3'
1	TGA ACA GCT CCT CGC CCT TGC T
2	TGT GGC CGT TTA CGT CGC CGT C
3	TGC CGG TGG TGC AGA TGA ACT T
4	TCG GGC ATG GCG GAC TTG AAG A
5	TCT TGT AGT TGC CGT CGT CCT T
6	TGT CGC CCT CGA ACT TCA CCT C
7	TGT TGC CGT CCT CCT TGA AGT C
8	TGC ACG CTG CCG TCC TCG ATG T
9	TCA GGT AGT GGT TGT CGG GCA G
10	TGT ACA GCT CGT CCA TGC CGA G

Click reaction

Each probe was prepared separately. The Cu(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC) was performed combining 5 nmole of DNA oligo and 45 nmol dye azide: TAMRA-azide (baseclick GmbH) or Eterneon Red 647-azide (baseclick GmbH) in 20 μ L reaction volume in the presence of the catalyst CuBr 6.25 mM, tris-hydroxypropyltriazolymethylamine (THPTA) 12.5 mM, and 2.5 % DMSO. The solution is then incubated for 1 h at 45 °C at 700 RPM protected from light and then cleaned by standard EtOH precipitation before the application in FISH experiments. Further purification was not needed.

HPLC example

For RP-HPLC analysis of labelled probes, a Waters system (Waters e2695 Separation Modul and Waters 2998 PDA) equipped with the XBridge™ OST C18 column (2.5 µm, 4.6 mm x 50 mm) was used. Linear gradients of buffer A (0.1 M triethylammonium acetate, pH 7.5) to buffer B (0.1 M triethylammonium acetate in 80 % acetonitrile, pH 7.5) were run at a flow rate of 1.5 mL/min at 40 °C column temperature. For detection of oligonucleotide mixtures 260 nm absorbance was chosen.

Method:

Buffer A: 100 % to 70 % in 8 min, 70 % to 15 % in 2 min, 15 % to 0 % in 1 min.

Buffer B: 0 % to 30 % in 8 min, 30 % to 85 % in 2 min, 85 % to 100 % in 1 min

HPL chromatogram example of the oligo before (i) and after click reaction (ii)

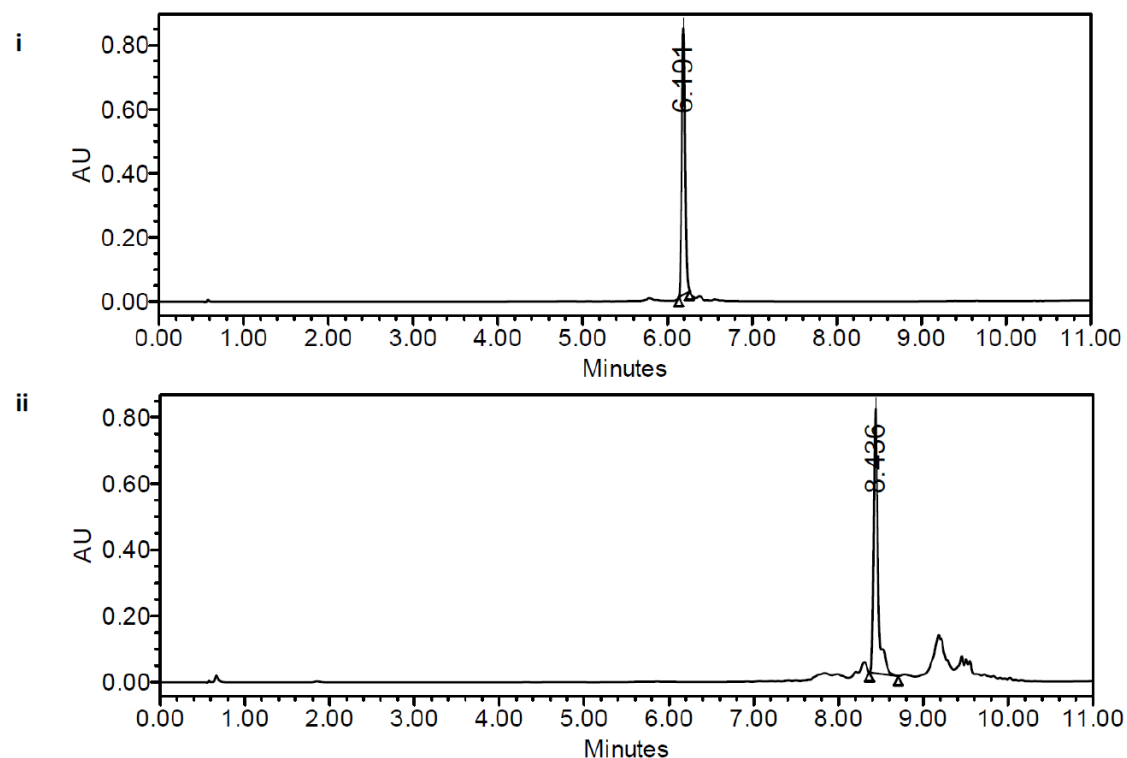


Figure S2. HPLC chromatogram of the probe before (i) and after the click reaction (ii)

Comparison of commercial set of probes and click probes

Analytical RP-HPLC was performed using a Macherey-Nagel Nucleodur 100-3 C18ec column on a Waters Alliance 2695 Separation Module coupled with a 2996 Photodiode Array Detector and a 2475 Multi wavelength Fluorescence Detector, using a flow of 0.5 mL/min. Linear gradients of buffer A (0.1 M triethylammonium acetate, pH 7.0) to buffer B (0.1 M triethylammonium acetate in 80 % acetonitrile, pH 7.0) were run at a flow rate of 0.5 mL/min. For detection of oligonucleotide mixture 260 nm absorbance was chosen, while 647 nm absorbance was used to detect the fluorophore. Method: 0-60 % B in 20 min, 60 to 100 % B in 1 min, 100 % B for 4 min

Table S2. Sequence of the commercial FISH probes, consisting of 30 oligonucleotides with one dye each (30x1)

Number	Sequence 5'-> 3'
1	GCT CCT CGC CCT TGC TCA CCA T
2	ATG GGC ACC ACC CCG GTG AAC A
3	GTC GCC GTC CAG CTC GAC CAG G
4	CGC TGA ACT TGT GGC CGT TTA C
5	TCG CCC TCG CCC TCG CCG GAC A
6	GGT CAG CTT GCC GTA GGT GGC A
7	CGG TGG TGC AGA TGA ACT TCA G
8	GGC CAG GGC ACG GGC AGC TTG C
9	GGT CAG GGT GGT CAC GAG GGT G
10	GGC TGA AGC ACT GCA CGC CGT A
11	TGC TTC ATG TGG TCG GGG TAG C
12	GGC GGA CTT GAA GAA GTC GTG C
13	CCT GGA CGT AGC CTT CGG GCA T
14	TCC TTG AAG AAG ATG GTG CGC T
15	GCG GGT CTT GTA GTT GCC GTC G
16	TCG ATG CGG TTC ACC AGG GTG T
17	CCT TGA AGT CGA TGC CCT TCA G
18	TGC CCC AGG ATG TTG CCG TCC T
19	GTT GTA GTT GTA CTC CAG CTT G
20	GCC ATG ATA TAG ACG TTG TGG C
21	GAT GCC GTT CTT CTG CTT GTC G
22	GGC GGA TCT TGA AGT TCA CCT T
23	ACG CTG CCG TCC TCG ATG TTG T
24	GCT GGT AGT GGT CGG CGA GCT G
25	CCG TCG CCG ATG GGG GTG TTC T
26	GGT TGT CGG GCA GCA GCA CGG G
27	GCG GAC TGG GTG CTC AGG TAG T
28	CTC GTT GGG GTC TTT GCT CAG G
29	GCA GGA CCA TGT GAT CGC GCT T
30	GCT CGT CCA TGC CGA GAG TGA T

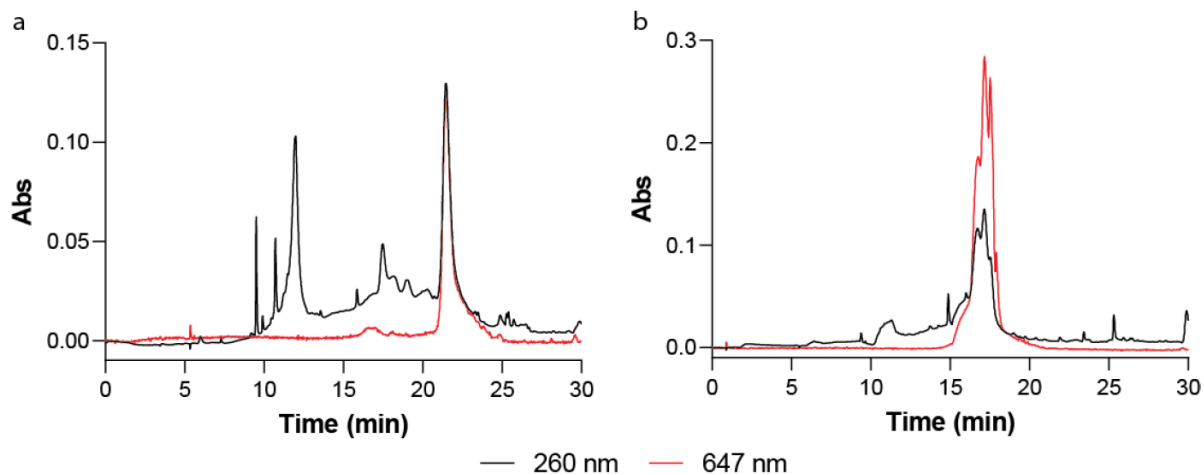


Figure S3. Comparison of (a) a commercial probe set (30x1 Quasar 670 dye) and (b) a clicked probe set (10x3 Eterneon-Red dye). Both sets were loaded in equal amounts, based on 260 nm absorption. Both dyes are very similar cyanine-5 fluorophores.

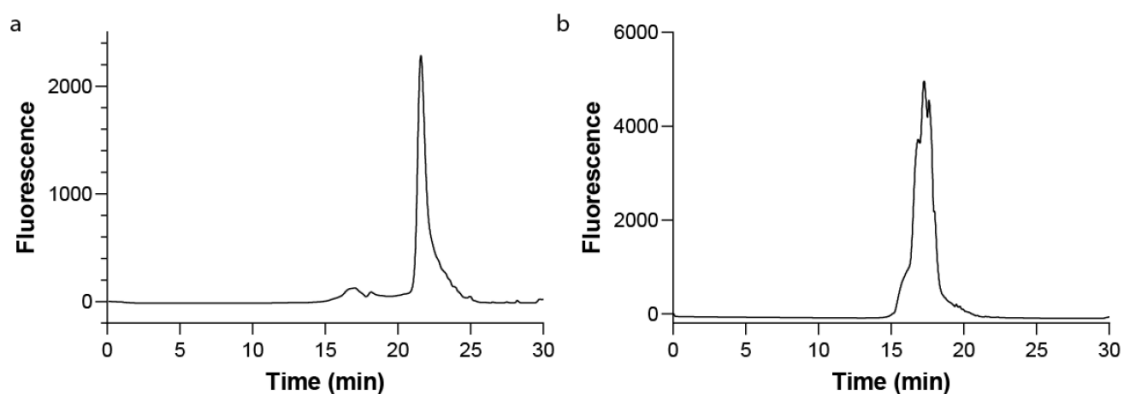


Figure S4. Fluorescence analysis: The fluorescence analysis of the two sets of probes confirm what described previously following the absorbance at 647 nm. Using the same amount of DNA, the commercial probes (a) show an overall lower fluorescence value than the click probes (b). Detection parameters: λ_{exc} : 647 nm, λ_{em} : 665 nm.

In-vitro-FISH with total RNA from eGFP- HEK293T cell line

Total RNA was extracted from eGFP-HEK293T cells using Total-RNA-kit, peqGOLD, catalogue number 732-2868 (VWR). FISH in total RNA was performed as reported in Semrau *et. al.* with minor changes. After DNase digestion, 0.5 μ l of total RNA was spotted in the center of an RNase-free cover slips, which was attached to a microscope slide. The total RNA spotted on cover slips were dried for 20 min at 80 °C. After fixation of the spots for 5 min at RT, a washing step with 2x saline sodium citrate (SSC) followed. Either the commercial (30x1, labelled with Quasar 670) or the CuAAC-labelled probes (10x3, Eterneon-Red 647 azide) were added to the spotted RNA in hybridization buffer (300 mM NaCl, 30 mM trisodium citrate, pH 7.0 in nuclease-free water, 10 % (v/v) formamide) and incubated for 5 min at 80 °C. The hybridization buffer including the FISH probes was washed with washing buffer (300 mM NaCl, 30 mM trisodium citrate, pH 7.0, 10 % (v/v) formamide in RNase-free water). The samples were imaged in presence of 2xSSC.

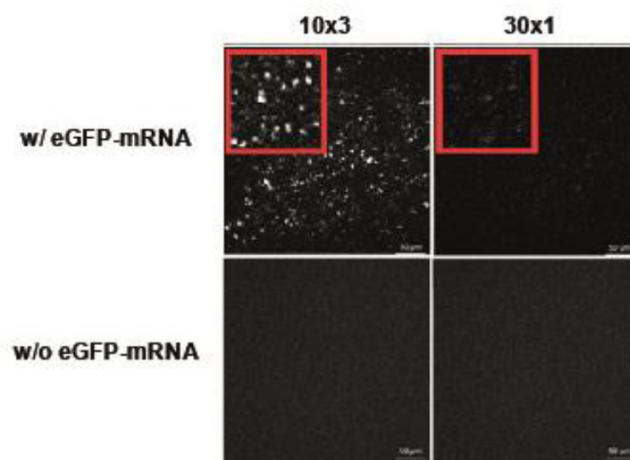


Figure S5. In vitro FISH experiment of total RNA extracted from eGFP-HEK293T cells. Total RNA from eGFP-HEK293T cells hybridized with the CuAAC-labelled probes (10x3) showed a very high signal of diffraction limited spots. In the control experiment, total RNA from eGFP-HEK293T cells was hybridized with the commercial probe set (30x1). Only a very weak specific signal was detected. Scale bars: 50 μ m

Titration for different numbers of triple labelled oligonucleotides

Since the oligonucleotides were labelled separately via click chemistry, a setting of different numbers of oligonucleotides to a probe set was possible. Four probe sets were prepared: 3x3, 5x3, 7x3 and 10x3 with 10 ng total amount of the oligonucleotides in each set. The sets were hybridized with fixed and permeabilized eGFP-HEK293T and with HEK293T for the negative control without eGFP expression.

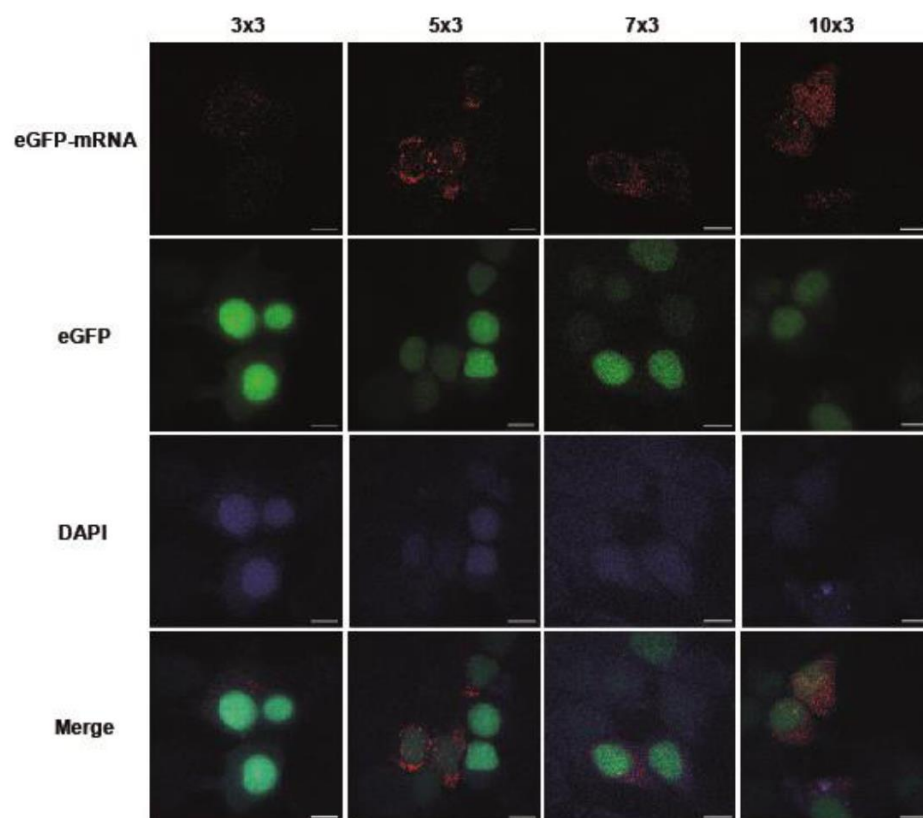


Figure S6. Differences in the signal intensities of eGFP-mRNA using different numbers of triple labelled probes (3x3, 5x3, 7x3 and 10x3) in eGFP-expressing HEK293T cells. Scale bar: 50 μ m

Click post hybridization

eGFP-HEK293T were grown in 8 chamber μ -slides cell culture plates (ibidi) until 80 % cell density is reached. After removing the culture medium, cells were washed with 1x RNase-free phosphate saline buffer (PBS) and fixed 15 minutes at RT with the fixation buffer (4 % paraformaldehyde (v/v) in nuclease-free PBS). Cells were then washed twice with 3 % bovine serum albumin (BSA) in 1x PBS and permeabilized with 100 % EtOH for at least 1 h at 4 °C. After permeabilization and removing of the EtOH, cells were washed twice with 3 % BSA in 1x PBS. 5 pmol of each oligonucleotide in 150 μ L hybridization buffer (300 mM NaCl, 30 mM trisodium citrate, pH 7.0 in nuclease-free water, 10 % (v/v) formamide) was added to each chamber. The hybridization occurred for 3 h at 37 °C. The unbound oligonucleotides and the hybridization buffer were washed using 10 % washing buffer (300 mM NaCl, 30 mM trisodium citrate, pH 7.0, 10 % (v/v) formamide in RNase-free water) followed by two washing steps with 3 % BSA in 1x PBS. 250 μ L of click cocktail (CuSO₄ 50 μ M, THPTA 250 μ M, 7 equivalents 5-TAMRA-PEG3-azide to a final concentration of 25 μ M and NaAscorbate to final concentration of 2.5 mM) was added to the cells, which were then incubated 30 minutes at RT protected from light. After hybridization, cells were washed three times either with 3 % BSA (w/v) or DMSO (5, 10, 20, 30, 40 and 50 % in 1x PBS (v/v)). Afterwards, 2x SSC was added to the cells and analysis via microscopy was performed. The signal to noise ratio is reduced when the concentration of DMSO is increased. Scale bar: 50 μ m.

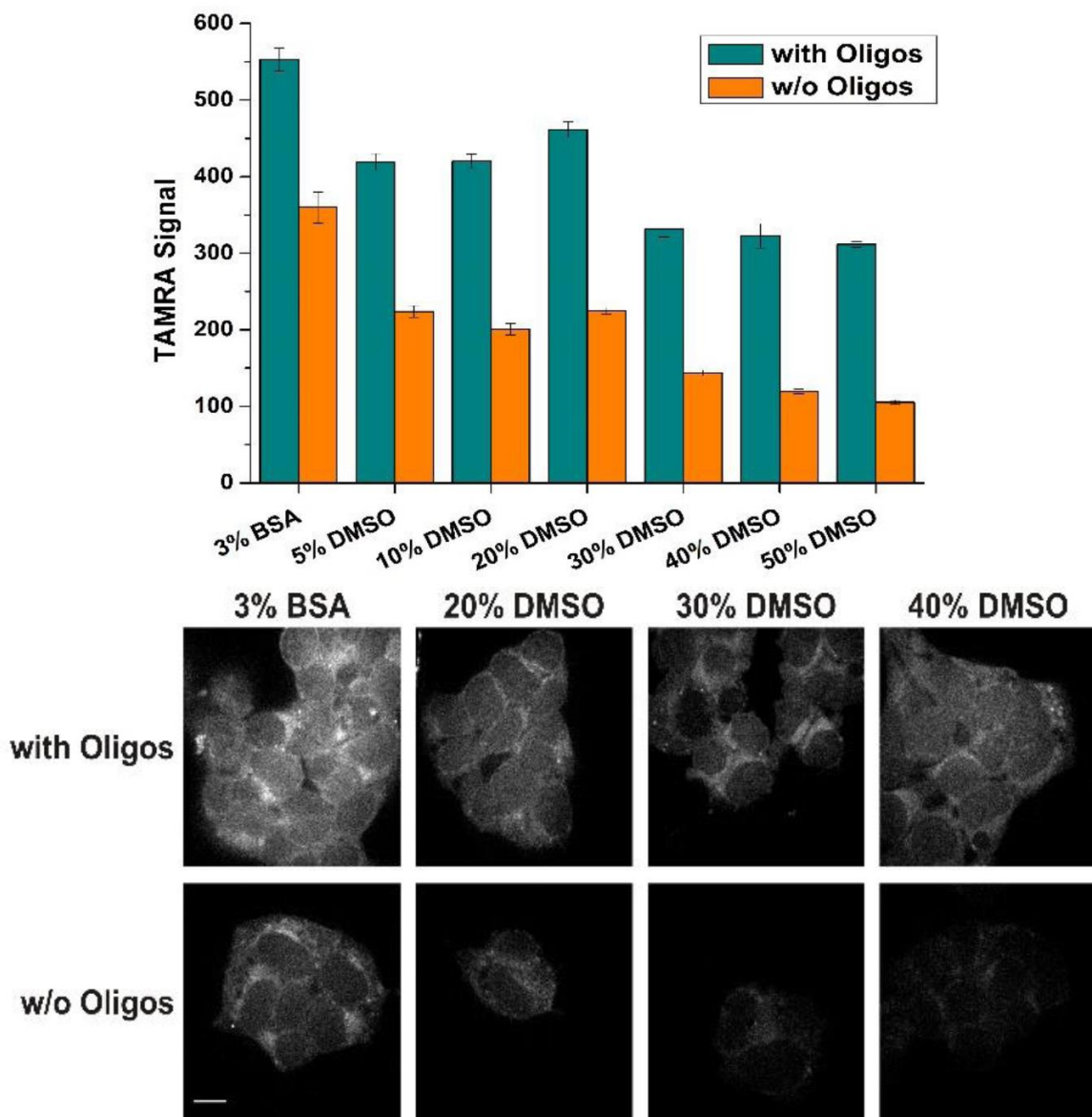


Figure S7. Click reaction of the FISH probes after hybridization.

Cell culture of human cell strains

HEK293T and HEK293T-eGFP cells were cultivated at 37 °C with CO₂-enriched (5 %) atmosphere. Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10 % fetal bovine serum (FBS), 1 % penicillin and streptomycin, was used as growing medium. When reaching a confluence of 70 % to 80 %, the cells were passaged in a new culture flask. For staining experiments, 1.5x10⁴ cells were seeded in each well of a μ -Slide 8 Well from ibidi (ibiTreat, #1.5 polymer coverslip, catalog No. 80826) and cultured for two days or until a density of 80 % is reached.

FISH protocol for HEK293T cells

HEK293T cells were fixed with 4 % (v/v) paraformaldehyde in nuclease-free phosphate saline buffer (PBS) for 10 min at room temperature. Samples were then washed twice with PBS, and the fixed cells were permeabilized with 70 % (v/v) ethanol (200 proof) in RNase-free water and stored in ethanol at +4 °C for at least 12 hours prior to hybridization. Permeabilized cells were then re-hydrated for 5 min in a pre-hybridization buffer (300 mM NaCl, 30 mM trisodium citrate, pH 7.0 in nuclease-free water, 10 % v/v formamide, supplemented with 2 mM vanadyl ribonucleoside complex). Re-hydrated samples were hybridized with an equimolar mixture of 10 RNA FISH DNA probes specific to bovine rotavirus strain RF gene segment 7 (62.5 nM final concentration, see Table S4) in a total volume of 200 μ l of the hybridization buffer (Stellaris RNA FISH hybridization buffer, SMF-HB1-10, Biosearch Technologies, supplemented with 10 % v/v deionized formamide). After 4 hours of incubation at 37 °C in a humidified chamber, samples were briefly rinsed with the wash buffer (300 mM NaCl, 30 mM trisodium citrate, pH 7.0, 10 % v/v formamide in nuclease-free water) after which a fresh aliquot of 300 μ l of the wash buffer was applied to each well and incubated twice at 37 °C for 30 min. After washes, nuclei were briefly stained with 300 nM 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) solution in 300 mM NaCl, 30 mM trisodium citrate, pH 7.0) and the samples were finally rinsed with and stored in the same buffer without DAPI prior to imaging.

Flow cytometry

FISH experiments for flow cytometry analysis were performed as described previously by Arrigucci et al[2].

Table S3. Sequences of the BCR and ABL FISH probes labelled with click chemistry. The sequences were generated using the Stellaris RNA FISH probe designer (<https://www.biosearchtech.com/stellaris-designer>). The positions of the C8-Alkyne-dU building blocks are highlighted with blue

Number	Sequence 5'-> 3'
BCR#1	TAG CTC TTC TTT TCC TTG GC
BCR#2	A TC CGC TCG AAG TTG GAC CT
BCR#3	AAC TCG ACG TTC ACG TAG AA
BCR#4	TTT TTG CGC TCC ATC TGC AT
BCR#5	TTC AAC TCG GCG TCC TCG TA
BCR#6	A TG CTC TGG TAG GGC TGG TA
BCR#7	TCC GCA A TC CTC AAA ACT CC
BCR#8	TTC TCA TTG GAG CTG CAG TC
BCR#9	TTG TCC CGG AAC A TG CGG TA
BCR#10	A TC TGC G TC TCC A TG GAA GG
BCR#11	ACT CGC T NT AGT GGA CTC CA
BCR#12	A TC TGC TGA CTC G TC AGC AC
BCR#13	TTG TGG A TC TCG TAG AGC TC
BCR#14	TCA G GT TCT CGG AGA TTT CT
BCR#15	TGG CAT CTT TGT TGC TTC TG
ABL1#1	GCC A TT TTT G GT TTG GGC TT
ABL1#2	TTG ACT GGC G TG ATG TAG TT
ABL1#3	G TA ATG G TA CAC C CT CCC TT
ABL1#4	A TG ATG A TG AAC CAA CTC GG
ABL1#5	A TA ATG GAG C GT GGT GAT GA
ABL1#6	A TA GAC AG T GGG C TT GTT GC
ABL1#7	A TC TCC CAC TT GTCG TAG TT
ABL1#8	TTG TGC TTC ATG G TG ATG TC
ABL1#9	TCC TCC TTC AAG GTC TTC AC
ABL1#10	C TT TCA TGA C TG CAG C TT CT
ABL1#11	AGG TTC CCG TAG GTC A TG AA
ABL1#12	A TC TGA G TG GCC ATG TAC AG
ABL1#13	TAC C TT CAC CAA G TG GTT CT
ABL1#14	A TT TGA TGG GGA A CT TGG CT
ABL1#15	A TG GAG AAC TTG TTG TAG GC

Cells flow cytometer data were obtained using the BD FACS Canto II equipped with air cooled green (488 nm solid state; 20 mW laser output) and red (633 nm HeNe; 17 W output) lasers, and the data were analyzed with the FCS Express 6 (De Novo Software). The fluorescent detectors/filters relevant for this study were FITC (530 +/- 30 nm) and APC (660 +/- 30 nm), respectively. Acquisition was done with a flow rate of 10 μ L/min. FSC and SSC were used for detection of forward light scatter parameter and side light scatter parameter. The machine was cleaned before and after each measurement. The photomultiplier tube (PMT) voltage for each parameter was adjusted in order to have the cells displayed in the centre of the investigating plot.

After hybridization and wash, HEK293T or HEK293T-eGFP were immediately analysed by flow cytometer, the samples were maintained in buffer during acquisition.

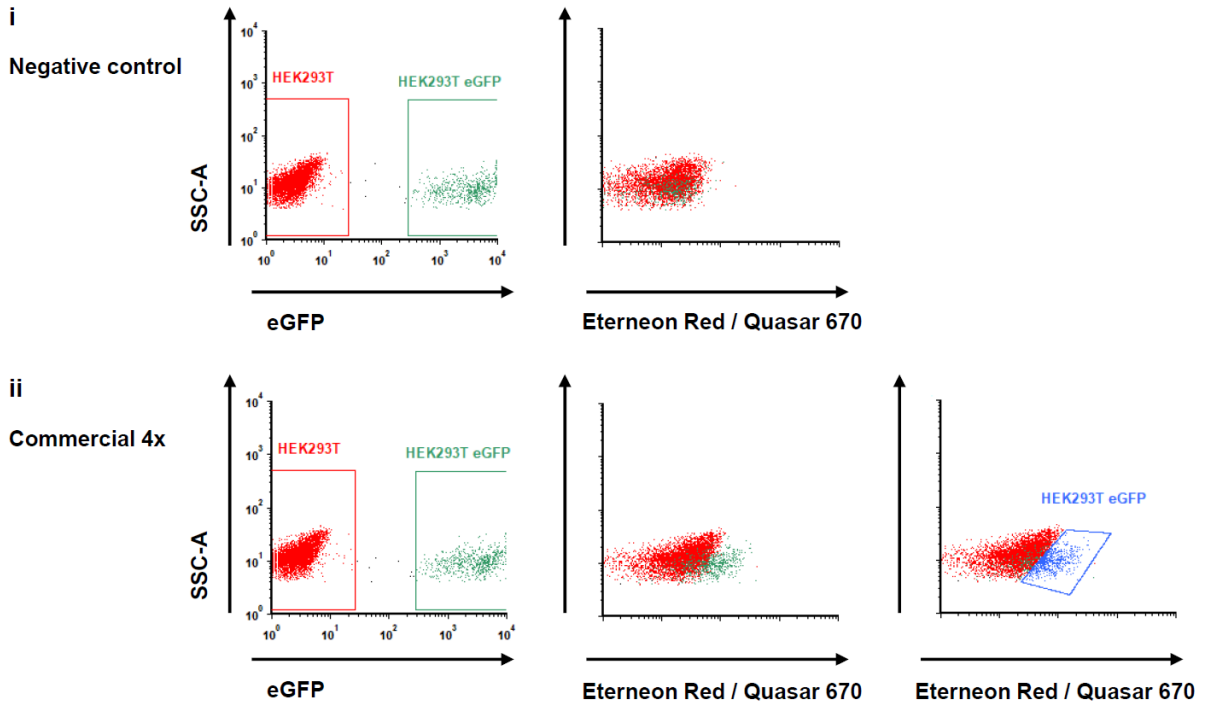


Figure S8. FACS Dot plot comparison of 30x1 and 10x3 probes. (i) The negative control of the experiment, where FISH was performed replacing the set of probes with the same volume of H₂O. A population of HEK293T and HEK293TeGFP was mixed in a ratio 20:1, and analyzed by FACS. The eGFP dot-plot reports the correct separation of the HEK293T and HEK293-eGFP. The Eterneon Red dot plot shows a mix of the two populations, as expected. (ii) Same result as the 10x3 probes was obtained with the 30x1 probes set by increasing the concentration four fold to 0.2 ng DNA/ μ l.

Cells and viruses

The rhesus monkey epithelial cell line MA104 stably expressing NSP5-EGFP [3] was cultured in DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium, GlutaMax-I, 4.5 g/L glucose, ThermoFisher), supplemented with 10 % fetal bovine serum (FBS), 1x MEM non-essential amino acids solution (Sigma), 1 mM sodium pyruvate (Sigma) and 500 µg/ml G418 (Roche).

Bovine rotavirus A strain RF (G6P6[1]) was a generous gift from Dr. Ulrich Desselberger (University of Cambridge, UK). It was grown in MA104 Clone 1 cell line (ATCC CRL-2378.1), as described previously [4].

For RNA imaging experiments, MA104 cells expressing NSP5-EGFP were seeded into Ibidi 8-well µ-slides and allowed to reach 90 % confluency prior to the infection. Confluent MA104 cell monolayers were rinsed twice with DMEM medium without FBS for 10 minutes to remove any residual FBS, and were subsequently infected with trypsin-activated bovine rotavirus at multiplicity of infection, MOI = 20.

Rotavirus RNA imaging using RNA FISH

Rotavirus-infected and mock-infected MA104 controls were fixed with 4 % (v/v) paraformaldehyde in nuclease-free phosphate saline buffer (PBS) for 10 min at room temperature. Samples were then washed twice with PBS, and the fixed cells were permeabilized with 70 % (v/v) ethanol (200 proof) in RNase-free water and stored in ethanol at +4 °C for at least 12 hours prior to hybridization. Permeabilized cells were then re-hydrated for 5 min in a pre-hybridization buffer (300 mM NaCl, 30 mM trisodium citrate, pH 7.0 in nuclease-free water, 10 % v/v formamide, supplemented with 2 mM vanadyl ribonucleoside complex). Re-hydrated samples were hybridized with an equimolar mixture of 10 RNA FISH DNA probes specific to bovine rotavirus strain RF gene segment 7 (62.5 nM final concentration, see SI Table 1) in a total volume of 200 µl of the hybridization buffer (Stellaris RNA FISH hybridization buffer, SMF-HB1-10, Biosearch Technologies, supplemented with 10 % v/v deionized formamide). After 4 hours of incubation at 37 °C in a humidified chamber, samples were briefly rinsed with the wash buffer (300 mM NaCl, 30 mM trisodium citrate, pH 7.0, 10 % v/v formamide in nuclease-free water, after which a fresh aliquot of 300 µl of the wash buffer was applied to each well and incubated twice at 37 °C for 30 min. After washes, nuclei were briefly stained with 300 nM 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) solution in 300 mM NaCl, 30 mM trisodium citrate, pH 7.0) and the samples were finally rinsed with and stored in the same buffer without DAPI prior to imaging.

Fluorescent microscopy imaging

HEK cells were imaged on a Zeiss Cell Observer SD microscope equipped with a Yokogawa spinning disk unit CSU-X1 using a 1.40 NA 100x Plan-apochromat oil immersion objective (Zeiss). RNA FISH probes were imaged using 532/561 nm and a BP 690 filter, and eGFP signal was imaged with 488 nm laser excitation and a BP 525/50 filter, respectively. DAPI staining was visualized with 405 nm excitation using a BP 525/50 filter. Data analysis yielding the labeling efficiency was performed using ImageJ.

Rotavirus RNA FISH probes imaging was carried out using a Nikon Ti-E widefield microscope equipped with a 100x 1.40 NA Plan Apochromat oil immersion objective, a CoolLED pE 4000 light source, a Zyla camera and a Quad DAPI/FITC/CY3/CY5 HC filter set.

Z-series spanning the full cell volume with a step size of 0.5 µm at 30 % power with 55 ms exposure times at 385 nm for DAPI, 58 % power with 500-ms exposure times at 470 nm for eGFP and at 35 % power with 500-ms exposures at 550-nm for TAMRA were acquired and the final images represent maximum intensity projections calculated using ImageJ.

Table S4. Into each of the DNA strands designed, three C8-alkyne-dU building blocks were inserted at former dT positions using phosphoramidites developed before[1]. Sequences of the 10 oligonucleotide RNA FISH probes listed below were generated for the rotavirus A gene segment 7 (gene accession no. KF729693.1) using the Stellaris RNA FISH probe designer (<https://www.biosearchtech.com/stellaris-designer>). The position of the modifications is highlighted in blue.

Number	Sequence 5' -> 3'
1	A TT GTG GTA TAT TCA ATA CCA
2	AG T CCA TTA TTC TCG TTA TTG
3	GT T TTG CGC ATT TAT TAT T GGT
4	AAG G TA TCT TTC CAT TCA G TA
5	GT T CTT GTG TAG AGT CAT T ATT
6	A TA GCG TTA TGT CCA TTG GAT
7	ACC AAG TGT TTG TGT ATT TAA
8	TG T AAT CAC TAA CTT C TC CGT
9	CTG TAT GAC TGC TAC GTT C TC
10	G TG GTG TAG TTG TTG GAT T CAG

References:

1. Gierlich J, Burley GA, Gramlich PME, Hammond DM, Carell T: **Click Chemistry as a Reliable Method for the High-Density Postsynthetic Functionalization of Alkyne-Modified DNA.** *Org Lett* 2006, **8**:3639–3642.
2. Arrigucci R, Bushkin Y, Radford F, Lakehal K, Vir P, Pine R, Martin D, Sugarman J, Zhao Y, Yap GS, et al.: **FISH-Flow, a protocol for the concurrent detection of mRNA and protein in single cells using fluorescence in situ hybridization and flow cytometry.** *Nat Protoc* 2017, **12**:1245–1260.
3. Eichwald C, Rodriguez JF, Burrone OR: **Characterization of rotavirus NSP2/NSP5 interactions and the dynamics of viroplasm formation.** *J Gen Virol* 2004, **85**:625–634.
4. Cheung W, Gill M, Esposito A, Kaminski CF, Courousse N, Trugnan G, Keshavan N, Desselberger U, Chwetzoff S, Lever A: **Rotaviruses associate with cellular lipid droplet components to replicate in viroplasms, and compounds disrupting or blocking lipid droplets inhibit viroplasm formation and viral replication.** *J Virol* 2010, **84**:6782–6798.

3.2. “Dendrimer-based Signal Amplification of Click-Labelled DNA *in situ*”

N. Raddaoui[#], S. Stazzoni[#], L. Möckel, F. Geiger, H. Engelke, C. Bräuchle, T. Carell, *ChemBioChem* **2017**, 18 (17), 1716–1720.

[#] geteilte Erstautorenschaft

Prolog

Das EdU-Proliferationsassay, das bereits etabliert ist und an vielen verschiedenen Modellorganismen getestet wurde, ist unabdingbar für die Forschung und Entwicklung sowie für die molekulare Diagnostik. Er wird zum Beispiel für das Testen von Wachstumsfaktoren, Krebsmedikamenten oder für die Messung toxikologischer Wirkung eines bestimmten Stoffs verwendet. Dabei wird das Ethinyl-dU (EdU) in das Wachstumsmedium der Zellkultur zugegeben. Während der Zellteilung bzw. DNA-Synthese, wird das EdU in die neu-synthetisierten DNA inkorporiert. Je nach Zelllinie, werden die Zellen nach zwei Stunden mit Paraformaldehyd fixiert, damit Ihre Morphologie bleibt. Nach der Permeabilisation der Zellmembrane mittels eines Detergenz erfolgt eine CuAAC zwischen dem EdU und einem fluoreszent Farbstoffazid. Die markierten EdU und dadurch die neu synthetisierte DNA können unter einem Fluoreszenz-Mikroskop detektiert werden. Das Detektionslimit des Assays weist allerdings eine große Schwäche: langsam proliferierende Zellen und Zellen, die sich noch nicht ausreichend in der S-Phase befinden, können nicht detektiert werden. Grund dafür ist die Limitierung der Markierung mit dem Farbstoff, die wiederum an der Anzahl der EdU limitiert ist. Dies hat gravierende Konsequenzen auf die Auswertung der Daten. Es können falsche positive Ergebnisse entstehen, was für die Weiterentwicklung der Wirkstoffe schwerwiegende Ausgängen mit sich bringt. In diesem Projekt wurde die Sensitivität des EdU-Assays mittels Click-reaktive Dendrimere auf zwei Wege erhöht: der doppel-Click und der dreifach-Click Ansatz. Die inkorporierten EdUs können im ersten Schritt mit einem Dendrimerazid via CuAAC gekoppelt werden gefolgt von einer zweiten CuAAC mit einem Farbstoffalkin. Bei dem triple-Click Ansatz wird erst ein Dendrimerazid an das EdU gekoppelt. Nach einer zweiten CuAAC mit einem weiteren Dendrimeralkin erfolgt die dritte CuAAC mit einem Farbstoffazid. Somit stehen pro inkorporiertes EdU drei bzw. neuen potentielle

Bindungsstellen für den Farbstoff. Mit Beiden Ansätzen konnte die Sensitivität des EdU-Assays erhöht werden und das Signal zu Hintergrund Verhältnis gemindert werden.

Autorenbeitrag

Für dieses Projekt habe ich alle Zellkulturexperimente durchgeführt. Die Fütterungsexperimente mit EdU sowie das Fixieren und Permeabilisieren wurden von mir ausgeführt. Die bereits entwickelte in-situ-Click-Reaktion wurde für diese Experimente von mir wie folgt weiterentwickelt: Zum einen wurden die optimalen Konzentrationen der Dendrimere sowie der Farbstoffalkine für die CuAAC in situ durch screeningstests bei beiden Ansätzen festgelegt. Zum anderen wurden die Waschschrte optimiert, so dass die Hintergrundfluoreszenz sinkt. Die Mikroskopiebilder wurden von mir bearbeitet. Die High-Throughput-Screeningsexperimente habe ich durchgeführt und die dazu gehörigen Ergebnisse ausgewertet. Die Interpretation der erhaltenen Daten wurde von den Erstautoren, zusammen mit *Thomas Carell* gemeinsam vorgenommen. Eine weitere Auflistung des Beitrags der anderen Autoren ist im folgenden Manuskript zu finden.

Lizenz

Kopie der Publikation mit Erlaubnis des Verlags; Copyright 2017 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

Dendrimer-Based Signal Amplification of Click-Labelled DNA in Situ

Nada Raddaoui⁺, Samuele Stazzoni⁺, Leonhard Möckl, Bastien Viverge, Florian Geiger, Hanna Engelke, Christoph Bräuchle, and Thomas Carell^{*[a]}

The *in vivo* incorporation of alkyne-modified bases into the genome of cells is today the basis for the efficient detection of cell proliferation. Cells are grown in the presence of ethynyl-dU (EdU), fixed and permeabilised. The incorporated alkynes are then efficiently detected by using azide-containing fluorophores and the Cu^I-catalysed alkyne-azide click reaction. For a world in which constant improvement in the sensitivity of a given method is driving diagnostic advancement, we developed azide- and alkyne-modified dendrimers that allow the establishment of sandwich-type detection assays that show significantly improved signal intensities and signal-to-noise ratios far beyond that which is currently possible.

The proliferation rate of cells is a key parameter that in many contexts requires precise determination.^[1] Cell-proliferation assays routinely help, for example, to evaluate the toxicity of compounds in the framework of the development of new pharmaceuticals.^[2] Also, in cancer diagnostics, it is required to measure the proliferation of cells with high precision.^[3] In this field in particular, the highest sensitivity possible is desired to detect, at best, even single cancer cells in a patient sample. Today, the most precise way to measure cell proliferation is to culture the cells in the presence of C5-ethynyl-dU (EdU), which is incorporated into the genome of proliferating cells as a typical antimetabolite.^[4] The amount of incorporated EdU is subsequently measured by treating the alkynes within the DNA with azido-modified fluorescent dyes by using the Cu^I-catalysed alkyne-azide click reaction^[5] and by detecting with fluorescent microscopy.^[6] These reactions proceed on DNA with extreme efficiency, likely because Cu^I is loosely pre-coordinated to the electron-rich centres at the nucleobases.^[6] This technology is used in established commercially available kits (e.g., EdU-Click kit from baseclick and Click-iT from Thermo Fisher). However, in all of the available methods, the sensitivity is limited by the number of alkynes that is incorporated during the culturing phase of the experiment in the presence of EdU (one alkyne). This creates the problem that slowly proliferating, but still

carcinogenic, cells often escape detection.^[7] We report herein a sandwich-type approach with alkyne- and azide-containing dendrimers **1** and **2** (Scheme 1) that allows significant chemical-signal amplification. The method was shown to provide unprecedented detection sensitivities for proliferating cells. The synthesis of needed amplifying tetraazide/alkyne molecules **1** and **2** is depicted in Scheme 1 (see also Schemes S1 and S2 in the Supporting Information). In both cases, the principle design idea was to stay as close as possible to poly(ethylene glycol)-based structures, because of the needed high solubility in water. The starting point towards **1** was ethylene glycol derivative **3**, which we first converted into azide **4**. The hydroxy group was subsequently tosylated by using 4-toluenesulfonyl chloride (TsCl) to give **5** to enable the fourfold substitution reaction with ethylenediamine ultimately to give desired tetraazide compound **1**.

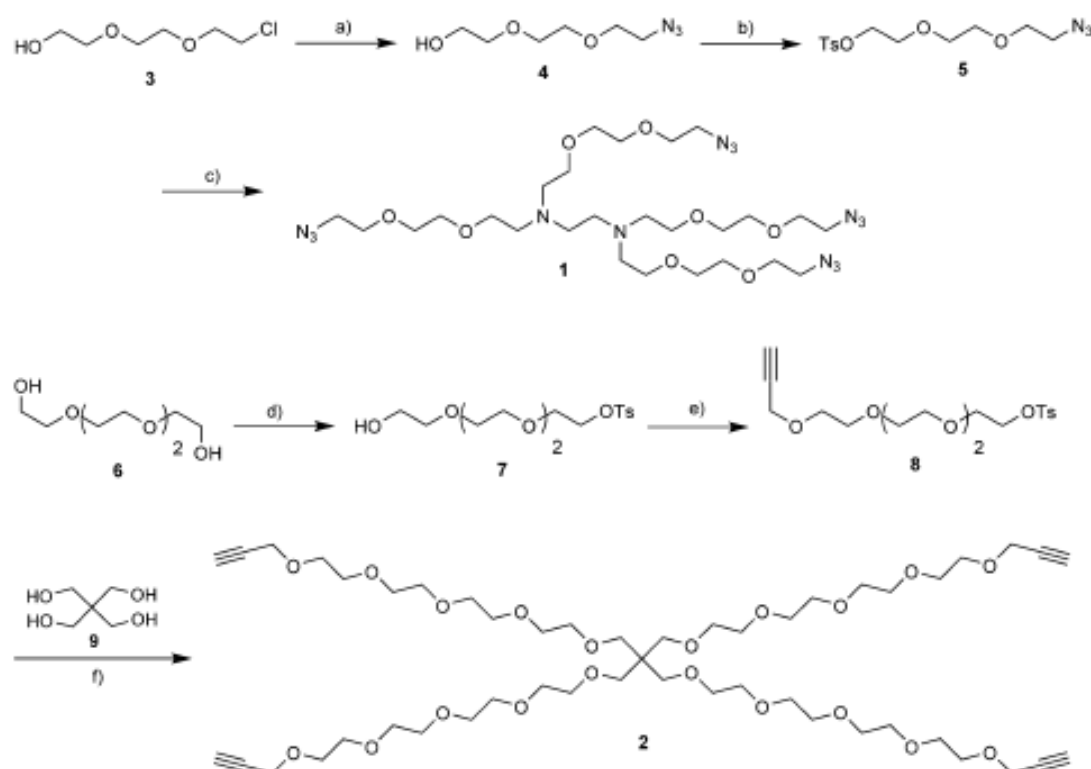
The synthesis of tetraalkyne **2** started with ethylene glycol derivative **6**, which was monotosylated in excellent yield to provide **7**. Reaction with propargyl bromide furnished compound **8**, which was used for a fourfold substitution reaction with pentaerythritol (**9**) to give dendrimer **2**. Both compounds **1** and **2** were subsequently purified by flash column chromatography.

In a first approach to amplify the cell-proliferation signal, we used poly(ethylene glycol)-based tetraazide molecule **1** (Figures 1A and S3). For the experiments, we grew HeLa cells in μ -slides in the presence of 10 μ M EdU for 2 h. The medium was removed and 3.7% formaldehyde in phosphate-buffered saline supplemented with 0.02% Tween (1 \times PBS-T) buffer was added to fix the cells. After being washed twice with 1 \times PBS-T, the cells were permeabilised with 0.5% Triton X-100 in 1 \times PBS-T for 20 min at room temperature (RT). We then added the click cocktails successively. In one experiment, we just added TAMRA-azide **10** (20 μ M) as a positive control. In the other experiment, we performed a first reaction with dendrimer **1** (20 μ M) for 1 h followed by a second click reaction with TAMRA-alkyne **11** (5 μ M) for 30 min. (For more detailed characterisation of the reaction products, determined with a simplified model by using synthetic oligonucleotides, see the Supporting Information.) In both experiments, we washed the fixed cells twice with 3% bovine serum albumin (BSA) in PBS buffer. In the dendrimer-amplified experiment with TAMRA-alkyne **11**, we noted an unusually high background, even after the intensive washing steps. Screening for appropriate washing conditions showed that best results were obtained if we washed with a solution of guanidinium isocyanate (Figure S4). We then determined the TAMRA fluorescence by using a fluorescence

[a] N. Raddaoui,⁺ S. Stazzoni,⁺ Dr. L. Möckl, B. Viverge, F. Geiger, Dr. H. Engelke, Prof. Dr. C. Bräuchle, Prof. Dr. T. Carell
Center for Integrated Protein Science (CIPSM)
Department of Chemistry, LMU München
Butenandstrasse 5–13, 81377 München (Germany)
E-mail: thomas.carell@lmu.de

[⁺] These authors contributed equally to this work.

Supporting Information and the ORCID identification numbers for the authors of this article can be found under <https://doi.org/10.1002/cbic.201700209>.



Scheme 1. Synthesis of ethylene glycol based tetraazide **1** and tetraalkyne **2** needed for the study. Reagents and conditions: a) NaN_3 , DMF, 90°C , overnight, 96%; b) TsCl , Et_3N , CH_2Cl_2 , overnight, 90%; c) ethylenediamine, **5**, KOH , LiBr , DMF, 60°C , overnight, 63%; d) TsCl , Et_3N , THF, RT, overnight, 92%; e) propargyl bromide, NaH , THF, 0°C to RT, 82%; f) **8**, K_2CO_3 , acetone, 80°C , overnight, 31%.

microscope. The data are depicted in Figure 1 B. Clearly visible is that the first click reaction with dendrimer-azide **1** furnished a sixfold increase in the fluorescence signal. This is particularly visible in the fluorescence microscopic evaluation of the click-modified cells (Figure 1 C).

We noted that after extensive washing with guanidinium isocyanate, the background was reduced but was steadily higher than that in the non-dendrimer experiments. We speculated that this background problem may have been caused by dye-alkyne **11**, possibly because alkynes are known to react to some extent with nucleophiles. Thiol-containing nucleophiles are abundantly present in cells. Control experiments performed without the addition of tetraazide **1** confirmed this hypothesis and showed a still-high background signal even without the use of our dendrimers (Figure S4).

In order to solve the background problem and to increase the sensitivity (signal-to-noise ratio) of detection further, we next experimented with a double-dendrimer approach (Figure 2), by which we first treated the fixed DNA with tetraazide **1**, and this was followed by an additional click reaction with tetraalkyne-dendrimer **2**. Then, we performed a final click reaction with TAMRA-azide **10** (Figure S5). In this way, we planned to circumvent the use of the problematic dye-alkynes.

For this experiment, we again cultured HeLa cells in μ -slides in the presence of $10\ \mu\text{M}$ EdU for 2 h. The medium was removed, and 3.7% formaldehyde in $1\times$ PBS-T was again added to fix the cells. We washed the cells two times with $1\times$ PBS-T and permeabilised the cells with 0.5% Triton in $1\times$ PBS-T for

20 min at RT. We then added the click cocktails successively: First, we added Cu^I and tetraazide **1**. We washed the cells twice with a 0.2 M acetate buffer pH 4.7, which was followed by two washing steps with $1\times$ PBS-T, and we subsequently performed the second click reaction with tetraalkyne **2** and Cu^I for 1 h. The cells were again washed twice with $1\times$ PBS-T. Finally, we added Cu^I and TAMRA-azide **10** to the cells and allowed the final click cocktail to penetrate the cells for 30 min. After the cells had again been washed twice with guanidinium isocyanate, we studied them by fluorescence microscopy. This time the experiment was a full success. We detected a strongly reduced background, not higher than that in the control experiment with just EdU (Figure 2 B, C). The obtained fluorescence signal was highly improved by a factor of 2.5. Most importantly, direct inspection of the cells by fluorescence microscopy showed a strongly improved signal-to-noise ratio (Figures 2 C and S5).

Next, the new single- and double-dendrimer-based methods were applied for high-throughput screening (HTS). This method is the most widely used tool not only for the development of new pharmaceutical compounds but also for the measurement of the response of cells to different nutrients, mitogens, cytokines, growth factors and toxic agents.^[8] With the signal amplification provided by our dendrimers, we were able to detect a strong, specific signal even if only a very small number of cells, such as just 100 cells, was present per well (Figure 3). This is a significant improvement over contemporary methods that need 500 to 1000 cells per well, and thus, we

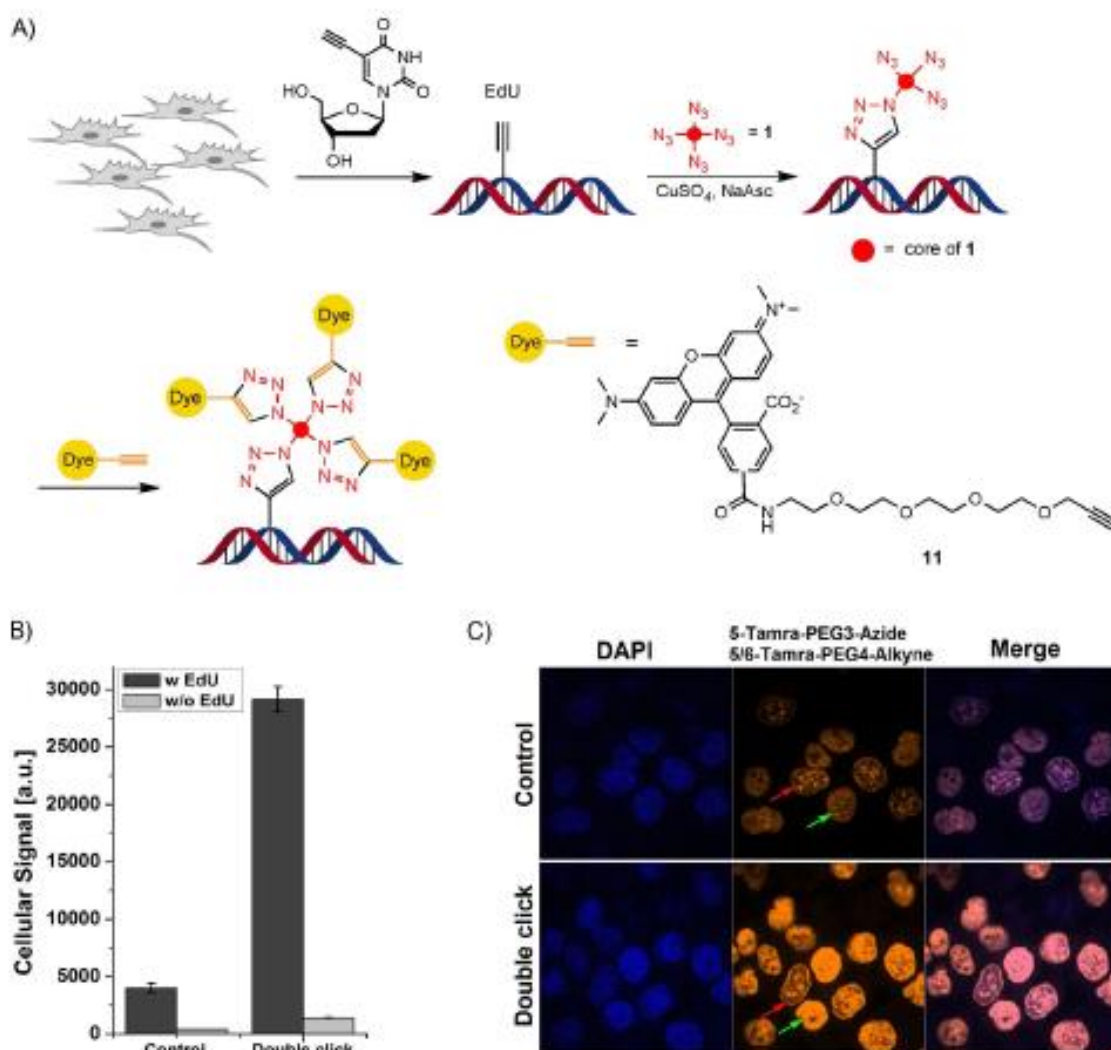


Figure 1. A) Depiction of the single dendrimer (double click) amplified cell-proliferation assay. Cells were grown in the presence of 5-ethynyl-dU. The cells were fixed, and the present alkynes were treated with tetraazide-dendrimer **1** in the presence of Cu^I (double click). The multiple-azide-containing DNA was then detected in situ with alkyne-modified dye **11** by again using the Cu^I -catalysed click reaction. **B)** The control experiment was performed by using the dendrimer-free standard proliferation assay with **10**. Double click shows data after dendrimer amplification. **C)** Fluorescence microscopy pictures of cells detected with the standard assay as control (top) and after dendrimer amplification (bottom). Red arrows show cells in the early S-phase with partial EdU incorporation. Green arrows show cells in late S-phase, for which the DNA synthesis is almost finished and EdU is incorporated into the whole genome. Scale bars: 20 μm .

can now reliably detect a small number of proliferating cells that would otherwise escape staining and detection. What we noted, however, was a reduction in the signal intensity in the double-dendrimer approach, which was likely due to self-quenching of the then densely packed fluorophores. To solve this, optimisation of the dendrimers is now required.

In summary, click-based detection of cell proliferation is today state-of-art technology. We showed herein that by using a dendrimer-type tetraazide (i.e., compound **1**) and a dendrimer-type tetraalkyne (i.e., compound **2**), sandwich-type detection assays could be established that yielded strongly improved signal intensities with low background and that gave higher signal-to-noise ratios for imaging and high-throughput-content assays. We expect that the so-improved cell-proliferation assay will be able to detect either slowly or even single proliferating cancer cells with unprecedented sensitivity.

Acknowledgements

We thank the Deutsche Forschungsgemeinschaft for financial support through SFB1032 (TP-A5), GRK2062 and CA275 and the Excellence Cluster CiPS^M. Further support from the European Union through the Marie Curie International Training and Mobility Network "Clickgene" (grant No. 642023) is acknowledged.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Keywords: cell proliferation · click chemistry · dendrimers · fluorescence microscopy · high-throughput screening

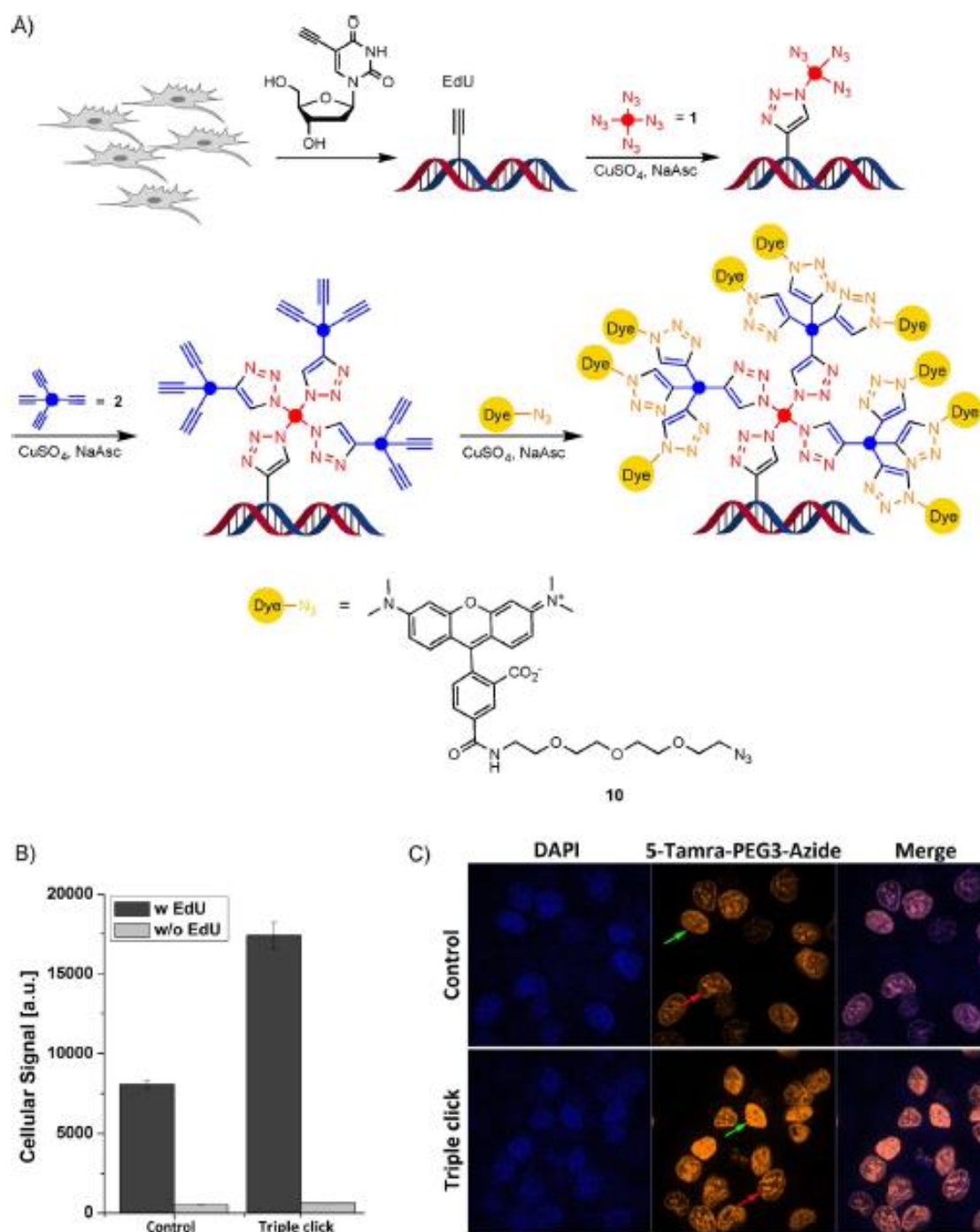


Figure 2. A) Depiction of the double dendrimer (triple click) amplified cell-proliferation assay. Cells were grown in the presence of 5-ethynyl-dU. After fixation and permeabilisation, the present alkynes are first treated with tetraazide-dendrimer **1** in the presence Cu^I . The multiple-azide-containing DNA was then treated with tetraalkyne **2**. The so-double-modified DNA (triple click) was finally detected with azide-modified dye **10** again by using the Cu^I -catalysed click reaction. B) The control experiment was performed by using the dendrimer-free standard proliferation assay. Triple click shows data after double dendrimer amplification. C) Fluorescence microscopy pictures of cells detected with the standard EdU assay as control (top) and after double dendrimer amplification with triple click (bottom). Red arrows show cells in the early S-phase. Green arrows show cells in late S-phase. Scale bars: 20 μm .

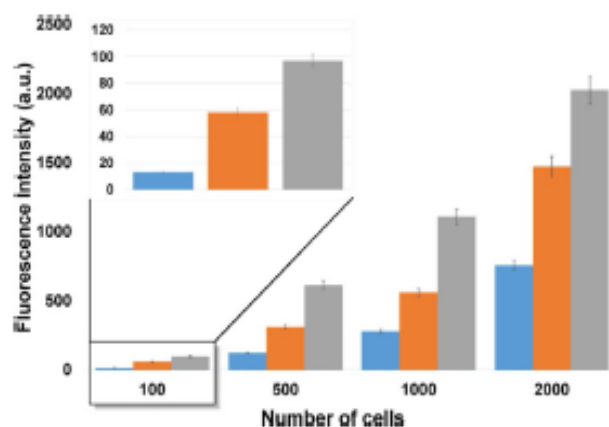


Figure 3. Application of the single and double dendrimer amplified assay in high-throughput screening. Cells were grown on a microplate with different densities (100, 500, 1000 and 2000 cells per well) and were incubated for 2 h with 5-ethynyl-dU at 37 °C. Negative control cells were grown without EdU labelling. The cells were fixed and permeabilised, and the present alkynes were treated with tetraazide dendrimer 1 and TAMRA-alkyne (double click, grey bars) or with tetraazide 1, tetraalkyne 2 and TAMRA-azide (triple click, orange bars) in the presence of Cu^I in situ. Positive control cells were treated with TAMRA-azide in the presence of Cu^I (control, blue bars). The cellular signal of duplicate samples was measured with a Tecan microplate reader. After subtraction of the background fluorescence, it was possible to detect a stronger signal even with only 100 cells. Blue: standard click protocol; grey: single-dendrimer approach with dendrimer 1; orange: double-dendrimer approach with dendrimers 1 and 2.

[1] a) M. G. Daidone, R. Silvestrini, *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.* **2001**, 27–35; b) S. H. Torp, C. F. Lindboe, U. S. Granli, T. M. Moen, T. Nordtømme, *Clin. Neuropathol.* **2001**, 20, 190–195; c) M. A. Aleskandarany, A. R. Green, A. A. Benhasouna, F. F. Barros, K. Neal, J. S. Reis-Filho, I. O. Ellis, E. A. Rakha, *Breast Cancer Res.* **2012**, 14, R3; d) M. Wang, J. Wu, Y. Guo, X. Chang, T. Cheng, *Mol. Med. Rep.* **2017**, 15, 1607–1612; e) T. Wieder, E. Brenner, H. Braumüller, O. Bischof, M. Rocken, *Cancer Metastasis Rev.* **2017**, DOI: 10.1007/s10555-017-9667-z; f) A. S. Thorat, N. A. Sonone, V. V. Choudhari, R. M. Devarumath, K. H. Babu, *3 Biotech* **2017**, 7, 16; g) H. Chen, X. Gu, Y. Liu, J. Wang, S. E. Wirt, R. Bottino, H. Schorle, J. Sage, S. K.

Kim, *Nature* **2011**, 478, 349–355; h) K. D. Poss, L. G. Wilson, M. T. Keating, *Science* **2002**, 298, 2188–2190.

- [2] a) X. Lu, J. W. Horner, E. Paul, X. Shang, P. Troncoso, P. Deng, S. Jiang, Q. Chang, D. J. Spring, P. Sharma, J. A. Zebala, D. Y. Maeda, Y. A. Wang, R. A. DePinho, *Nature* **2017**, 543, 728–732; b) N. V. Jordan, A. Bardia, B. S. Wittner, C. Benes, M. Ligorio, Y. Zheng, M. Yu, T. K. Sundaresan, J. A. Licausi, R. Desai, R. M. O’Keefe, R. Y. Ebricht, M. Boukhali, S. Sil, M. L. Onozato, A. J. Iafrate, R. Kapur, D. Sgroi, D. T. Ting, M. Toner, S. Ramaswamy, W. Haas, S. Maheswaran, D. A. Haber, *Nature* **2016**, 537, 102–106; c) M. A. Erb, T. G. Scott, B. E. Li, H. Xie, J. Paulk, H. S. Seo, A. Souza, J. M. Roberts, S. Dastjerdi, D. L. Buckley, N. E. Sanjana, O. Shalem, B. Nabet, R. Zeid, N. K. Offei-Addo, S. Dhe-Paganon, F. Zhang, S. H. Orkin, G. E. Winter, J. E. Bradner, *Nature* **2017**, 543, 270–274.
- [3] a) G. I. Evan, K. H. Vousden, *Nature* **2001**, 411, 342–348; b) G. Evan, T. Littlewood, *Science* **1998**, 281, 1317–1322.
- [4] a) A. Salic, T. J. Mitchison, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, 105, 2415–2420; b) M. Ababou, V. Dumaire, Y. Lecluse, M. Amor-Gueret, *Oncogene* **2002**, 21, 2079–2088; c) B. L. Cavanagh, T. Walker, A. Norazit, A. C. Meedeniya, *Molecules* **2011**, 16, 7980–7993.
- [5] a) H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 2004–2021; *Angew. Chem.* **2001**, 113, 2056–2075; b) P. M. Gramlich, C. T. Wirges, A. Manetto, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 8350–8358; *Angew. Chem.* **2008**, 120, 8478–8487.
- [6] J. Gierlich, G. A. Burley, P. M. Gramlich, D. M. Hammond, T. Carell, *Org. Lett.* **2006**, 8, 3639–3642.
- [7] S. Nik-Zainal, P. Van Loo, D. C. Wedge, L. B. Alexandrov, C. D. Greenman, K. W. Lau, K. Raine, D. Jones, J. Marshall, M. Ramakrishna, A. Shlien, S. L. Cooke, J. Hinton, A. Menzies, L. A. Stebbings, C. Leroy, M. Jia, R. Rance, L. J. Mudie, S. J. Gamble, P. J. Stephens, S. McLaren, P. S. Tarpey, E. Papaemmanuil, H. R. Davies, I. Varela, D. J. McBride, G. R. Bignell, K. Leung, A. P. Butler, J. W. Teague, S. Martin, G. Jonsson, O. Mariani, S. Boyault, P. Miron, A. Fatima, A. Langerod, S. A. Aparicio, A. Tutt, A. M. Sleuwerds, A. Borg, G. Thomas, A. V. Salomon, A. L. Richardson, A. L. Borresen-Dale, P. A. Futreal, M. R. Stratton, P. J. Campbell, C. Breast Cancer Working Group of the International Cancer Genome, *Cell* **2012**, 149, 994–1007.
- [8] F. Zanella, J. B. Lorenz, W. Link, *Trends Biotechnol.* **2010**, 28, 237–245.

Manuscript received: April 13, 2017

Accepted manuscript online: June 22, 2017

Version of record online: July 24, 2017

Supporting information

Supplementary figures and text:

Supplementary figure S1	Synthesis of Tetraazide 1
Supplementary figure S2	Synthesis of Tetraalkyne 2
Supplementary figure S3	Reaction between oligonucleotides and the tetraazide dendrimer and possible products
Supplementary figure S4	Development of the double click assay (simple dendrimer)
Supplementary figure S5	Improvement of the signal to background ratio of the double click assay
Supplementary figure S6	Development of the triple click assay (double dendrimer)
Supplementary figure S7	Direct comparison between the non-dendrimer, the double and triple click dendrimer approaches

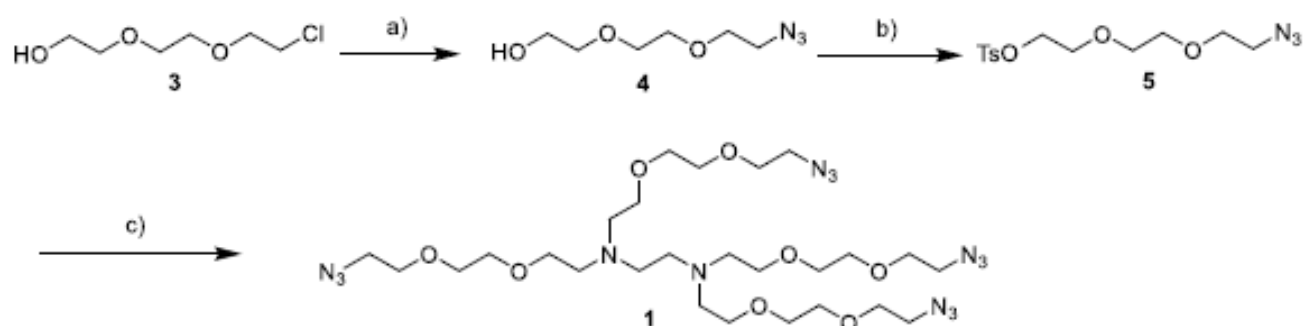
General methods

Chemicals were purchased from Sigma-Aldrich, Alfa Aesar, TCI Chemicals or Acros Organics and used without further purification. Solutions were concentrated *in vacuo* on a Heidolph rotary evaporator. The solvents were of reagent grade and purified by distillation. Dry solvents were bought from Acros Organics or Sigma-Aldrich. Water was purified by a Milli-Q Plus system from Merck Millipore. Chromatographic purification of products was accomplished using flash column chromatography on Merck Geduran Si 60 (40-63 μM) silica gel (normal phase). Thin layer chromatography (TLC) was performed on Merck 60 (silica gel F254) plates. ^1H and ^{13}C -NMR spectra were recorded in deuterated solvents on a *Bruker ARX 400* spectrometer and calibrated to the residual solvent peak. Multiplicities are abbreviated as follows: s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, m = multiplet, brs = broad signal. For assignment of the structures, additional 2D NMR spectra (COSY, HSQC, HMBC) were measured. High resolution electrospray ionization mass spectra (HRMS-ESI) were recorded on a *Thermo Finnigan LTQ-FT* (ESI-FTICR).

DNA Oligonucleotide synthesis was performed on an Applied Biosystems Incorporated 394 automated synthesizer. Phosphoramidites and solid supports columns were purchased from Glen Research, Link Technology or Baseclick.

Analytical RP-HPLC was performed using a *Macherey-Nagel Nucleodur 100-3 C18ec* column on *Waters Alliance 2996 Photodiode Array Detector, 2695 Separation Module* using a flow of 0.5 mL/min. Conditions: Buffer A = 0.1 M TEAA (triethylammonium acetate) in water; buffer B = 0.1 M TEAA in 80% acetonitrile. When needed, the product peaks were collected, concentrated and characterized by Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight (MALDI-TOF) on *Bruker Daltonics Autoflex II*.

Chemical synthesis



Supplementary figure S1: Synthesis of **1**. Reagents and conditions: a) NaN_3 , DMF, 90°C o/n, 96%; b) TsCl, NEt_3 , CH_2Cl_2 , o/n, 90%; c) **5**, ethylenediamine, KOH, LiBr, DMF, 60°C , o/n, 63%.

2-[2-(2-Azidoethoxy)ethoxy]ethanol (**4**)

2-[2-(2-Chloroethoxy)ethoxy]ethanol (**3**) (4.31 mL, 29.65 mmol) was dissolved in 200 mL of dry DMF under N_2 . NaN_3 (3.86 g, 59.3 mmol) was added, and the mixture was heated at 90°C overnight. After 18 h, the solvent was removed under reduced pressure and the residue was partitioned between H_2O (50 mL) and EtOAc (150 mL). The aqueous phase was extracted again with 150 mL of EtOAc and the combined organic phases were combined, washed with brine, dried over Na_2SO_4 , filtered and evaporated. The crude product was purified by column chromatography (isohexane/EtOAc 1:4 \rightarrow 1:10) to afford **4** as a colorless oil (5.0 g, 96%).

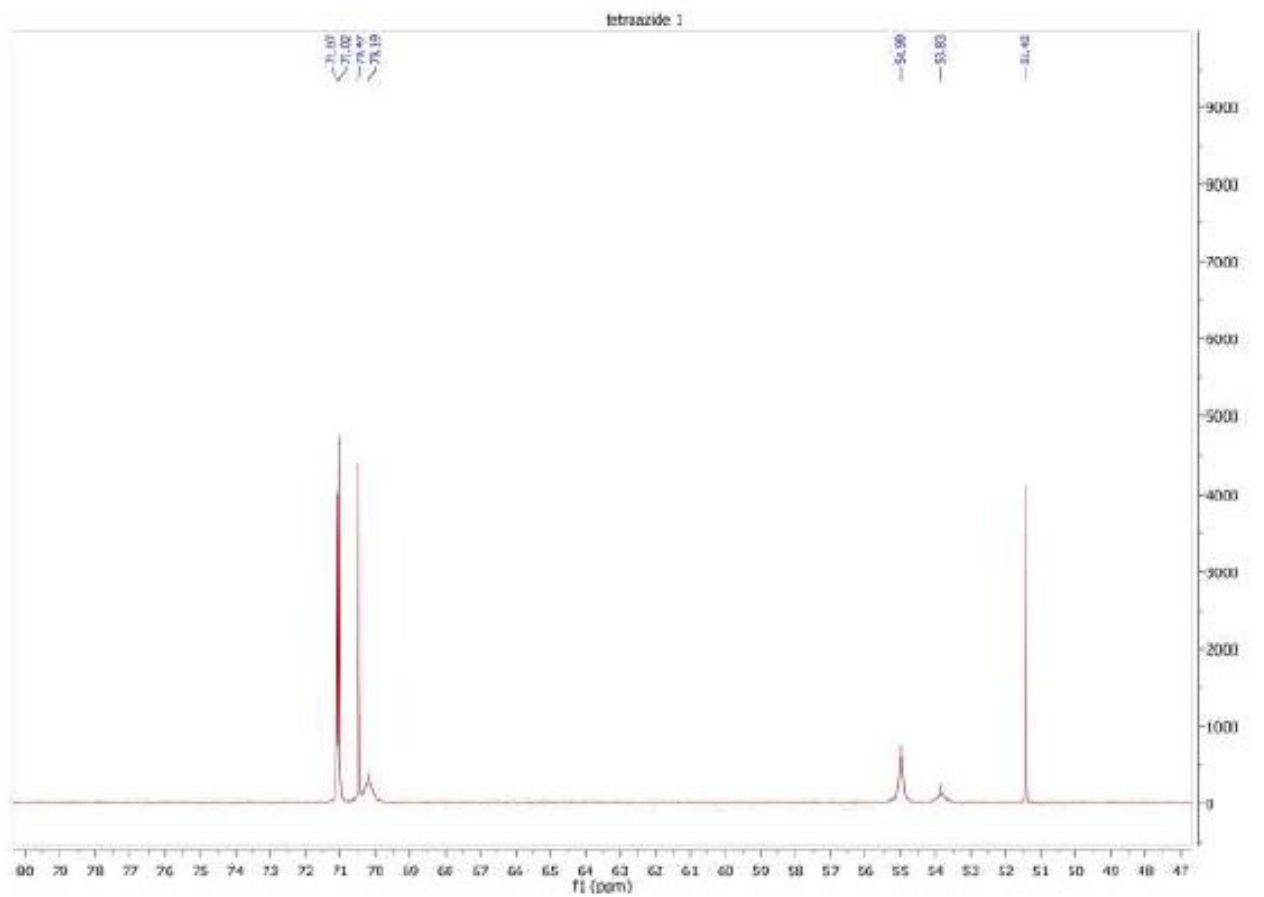
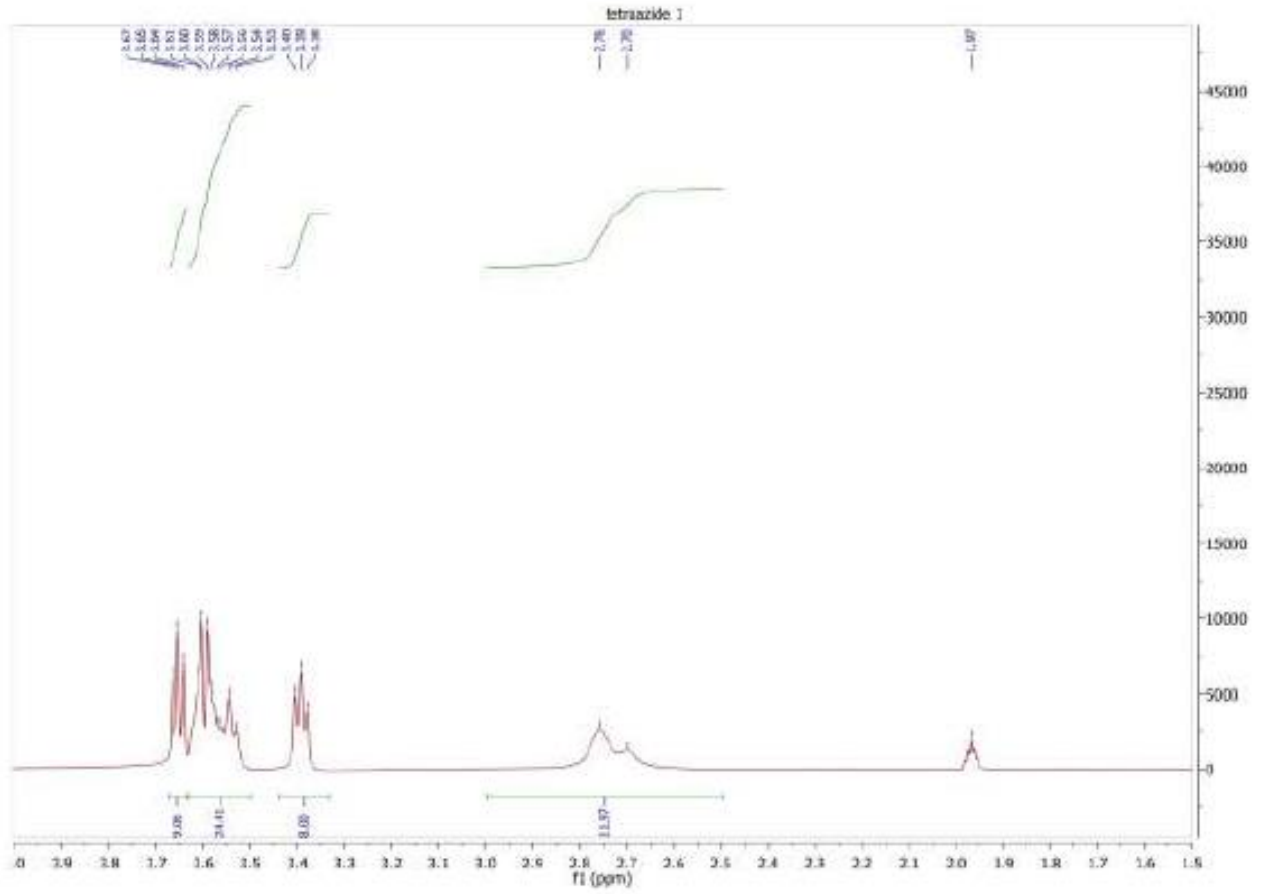
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 3.77-3.71 (m, 2H), 3.68 (s, 6H), 3.62-3.58 (m, 2H), 3.43-3.37 (m, 2H) ppm.

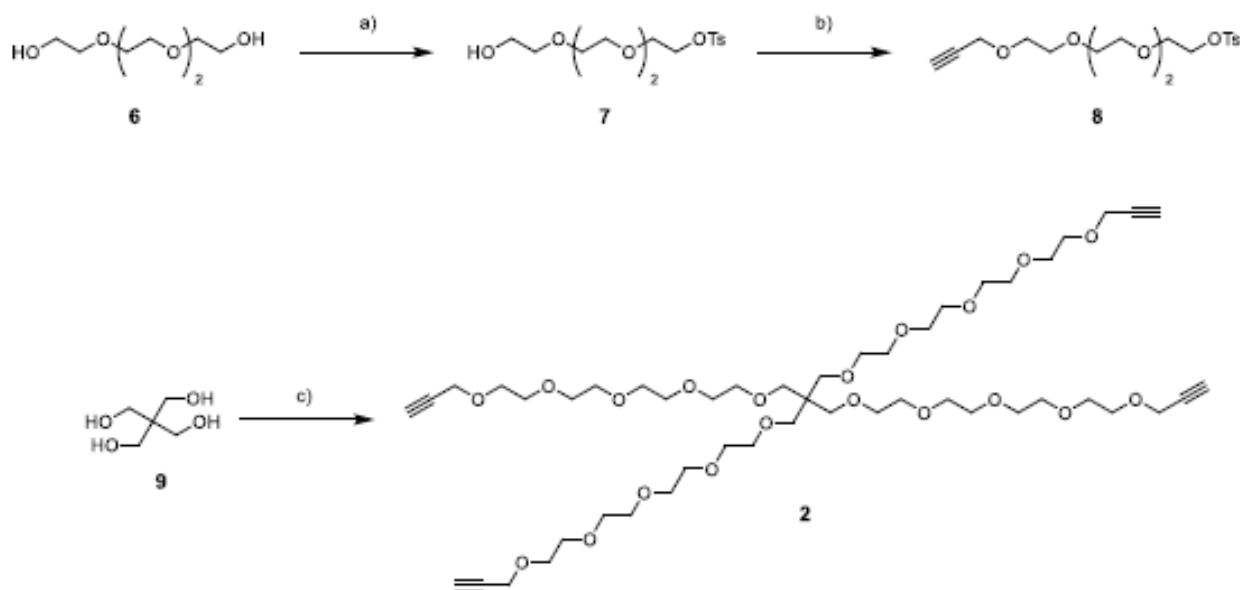
$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, DMSO-d_6) δ 72.4, 69.88, 69.82, 69.37, 60.31, 50.09 ppm.

2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethyl 4-methylbenzenesulfonate (**5**)

Compound **4** (5 g, 28.54 mmol) was dissolved in 100 mL of DCM at room temperature. The solution was then cooled to 0°C and NEt_3 and TsCl were added. The mixture was then stirred overnight allowing to warm up to room temperature. After 18 hours, the reaction mixture was washed with 1 M HCl, H_2O , brine, dried over MgSO_4 and filtered. The solvent was removed under reduced pressure and the crude product was purified by column chromatography (isohexane/EtOAc 10:1) to yield **5** as a colourless oil (8.5 g, 90%).

NMR spectra of 1





Supplementary figure S2: Synthesis of **2**. Reagents and conditions: a) TsCl, Et₃N, THF, RT, 48 h, 92 %; b) Propargyl bromide, NaH, THF, 0°C to RT, 82 %; c) **1**, K₂CO₃, acetone, 60°C, 48 h, 30%.

2-(2-(2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl 4-methylbenzenesulfonate (**7**)

Tetraethylene glycol (29.25 g, 150.6 mmol) was dissolved in dry THF (100 mL) and triethylamine (122 g, 1.2 mol, 8.0 eq.) was added. The reaction was cooled down to 0°C and a solution of tosyl chloride (28.71 g, 150.6 mmol, 1.0 eq.) in dry THF (50 mL) was added over a period of 1 h. After 48 h stirring at room temperature the solvent was removed *in vacuo*. The mixture was taken up in HCl (2 M, 150 mL) and extracted with DCM (4 × 150 mL). The combined organic layers were dried over MgSO₄ and filtered. After removal of the solvent *in vacuo* the crude product was purified by flash chromatography (Silica, DCM → DCM/MeOH (99 :1 → 0:1)). The product was obtained as a colourless oil (48.27 g, 138.6 mmol, 92%).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.82-7.76 (m, 2H, CH_{arom.}), 7.37-7.30 (m, 2H, CH_{arom.}), 4.20-4.12 (m, 2H, CH₂), 3.73-3.52 (m, 14H, 7×CH₂), 2.42 (s, 3H, CH₃), 2.38-2.31 (s, 1H, OH) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 144.9 (C_{arom.}), 133.2 (C_{arom.}), 130.0 (2×CH_{arom.}), 128.1 (2×CH_{arom.}), 72.6 (CH₂), 70.9 (CH₂), 70.8 (CH₂), 70.6 (CH₂), 70.5 (CH₂), 69.4 (CH₂), 68.9 (CH₂), 61.9 (CH₂), 21.8 (CH₃) ppm.

HR-MS (ESI): C₁₅H₂₅O₇S⁺ [M+H]⁺, calc.: 349.1315, found: 349.1316

3,6,9,12-tetraoxapentadec-14-yn-1-yl 4-methylbenzenesulfonate (8)

2-(2-(2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl 4-methylbenzenesulfonate (10 g, 28.7 mmol) was dissolved in dry THF (50 mL) and added dropwise to a solution of NaH (60%, 1.38 g, 34.44 mmol, 1.2 eq.) in dry THF (50 mL) at 0 °C. Propargylbromide (80% in toluene, 31.85 mL, 287 mmol, 10 eq.) was subsequently added to the mixture and stirred for 2 h at RT. The reaction was carefully quenched by slow addition of MeOH and the solvents were removed *in vacuo*. H₂O was added and extracted with DCM (3 × 200 mL). The combined organic layers were dried over MgSO₄, the solvent removed *in vacuo* and the crude product was purified by column chromatography (Silica, DCM → DCM/MeOH (99 :1 → 0:1)). X was obtained as a colorless oil (9.06 g, 23.4 mmol, 82 %).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.81-7.78 (m, 2H, CH_{arom.}), 7.35-7.33 (m, 2H, CH_{arom.}), 4.21-4.18 (m, 2H, CH₂), 4.17-4.14 (m, 2H, CH₂), 3.70-3.56 (m, 14H, 7×CH₂), 2.44 (s, 3H, CH₃), 2.42 (m, 1H, CH) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 145.0 (C_{arom.}), 133.1 (C_{arom.}), 130.0 (2×CH_{arom.}), 128.1 (2×CH_{arom.}), 78.8 (HC≡C), 75.2 (HC≡C), 70.8 (CH₂), 70.7 (CH₂), 69.4 (CH₂), 68.8 (CH₂), 67.7 (CH₂), 56.6 (CH₂), 55.9 (CH₂), 55.4 (CH₂), 21.8 (CH₃) ppm.

HR-MS (ESI): C₁₈H₃₀O₇NS⁺ [M+NH₄]⁺, calc.: 404.1737, found: 404.1739.

18,18-di(2,5,8,11,14-pentaoxaheptadec-16-yn-1-yl)-4,7,10,13,16,20,23,26,29,32-decaoxapentatriaconta-1,34-diyne (2)

Pentaerythritole (15 mg, 110.18 μmol) was dissolved in acetone (3 mL). 3,6,9,12-tetraoxapentadec-14-yn-1-yl 4-methylbenzenesulfonate (213 mg, 550.9 μmol, 5 eq.) and K₂CO₃ (76 mg, 550.9 μmol, 5 eq.) were added. After stirring at 60°C for 48 h the solvent was removed *in vacuo*. H₂O was added and extracted with DCM (4×20 mL). The combined organic layers were dried over MgSO₄, the solvent removed *in vacuo* and the crude product was purified by column chromatography ((Silica, DCM → DCM/MeOH (99 :1 → 0:1)). The product was obtained as a colourless oil (33 mg, 33 μmol, 30%).

¹H-NMR (599 MHz, CDCl₃): δ = 4.22-4.19 (d, ³J = 2.4 Hz, 8H, CH₂), 3.85-3.40 (m, 72H, CH₂), 2.51-2.37 (t, ⁴J = 2.4 Hz, 4H, CH₂) ppm.

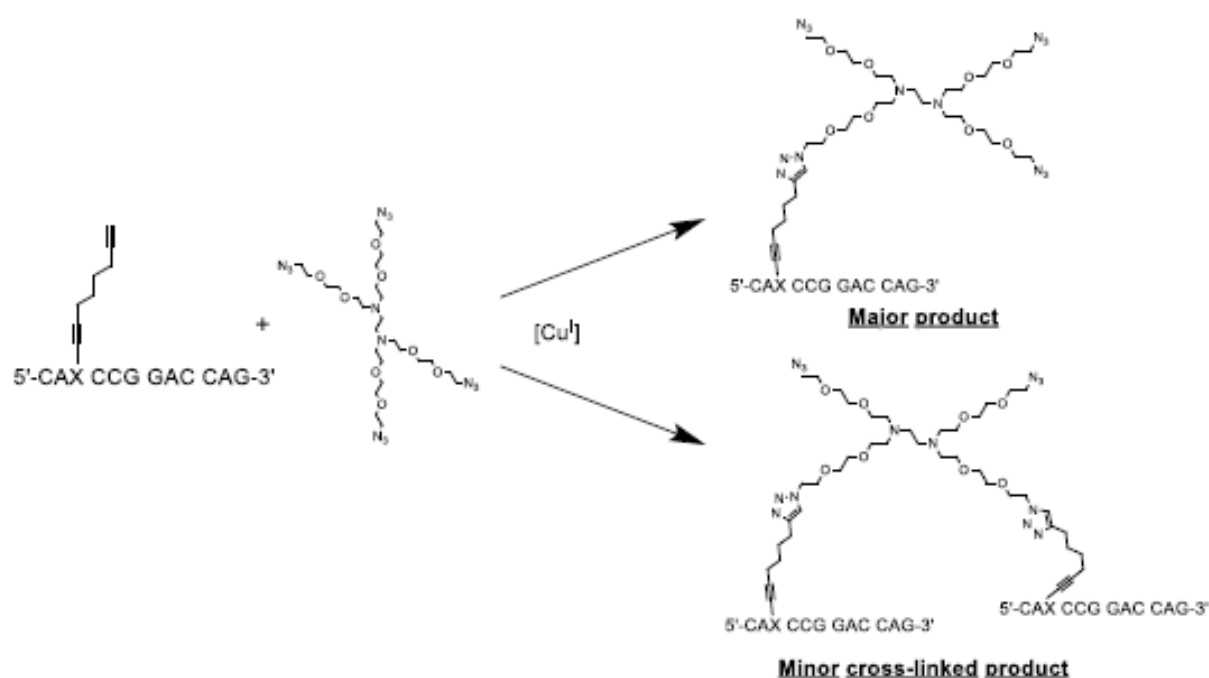
¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): δ = 79.83, 74.62, 72.61, 71.52, 71.48, 70.85, 70.83, 70.81, 70.78, 70.75, 70.71, 70.68, 70.59, 70.58, 70.54, 69.29, 61.95, 58.57, 42.87 ppm.

HR-MS (ESI): C₄₉H₈₅O₂₀Na²⁺ [M+H+Na]²⁺, calc.: 508.2760, found: 508.2755.

Proof of principle of the click reactions on oligonucleotides

In order to prove that the strategy that we planned for the *in situ* detection of cell proliferation using click chemistry is applicable and yields predominantly the products shown in the main text, we performed experiments on synthetic oligonucleotides. We decided to perform the click reactions both in solution, purifying the main intermediates and products *via* HPLC and on solid phase, where we simply removed the excess of reagents with a few washing steps and then proceeded with the following click reaction. This second approach is more similar to the strategy that we ultimately applied for our cell studies and proved that it is possible to obtain the products that we wanted with good selectivity even without chromatographic purification of the intermediates.

Both pathways were successful and yielded the desired products (oligonucleotide conjugated with multiple dyes) with good selectivity as a mixture of 5/6-TAMRA isomers. As expected, especially for the solid phase reactions, we observed a limited amount of cross-linked compound, where the tetraazide binds two different oligonucleotides in the first step, and therefore can react with only two dyes in the second step (fig. S3).



Supplementary figure S3: Reaction between oligonucleotides and the tetraazide-dendrimer and possible products.

Sequence of the oligonucleotides used for the tests:

Oligonucleotide 1: 5'- CAX CCG GAC CAG-3' where X = C8-Alkynyl-dT; [M] = 3705.4

Oligonucleotide 2: 5'- T~~X~~T TTT TTT T -3' where X = EdU; [M] = 2989.9

General procedure A (click in solution): The alkyne-modified oligonucleotide was dissolved in MQ water (concentration = 1 mM) and 3 μ L of this solution (3 nmol of oligonucleotide) were transferred in a vial for the click reaction. To this solution, H₂O (15 μ L), 1 M TEAA buffer (pH 7, 6 μ L), DMSO (27 μ L) and the azide or dye-alkyne solution (20 mM in DMSO, 3 μ L) were added. A CuSO₄/TBTA solution (1 mM in H₂O /DMSO 1:1, 3 μ L) was then added, followed by a freshly prepared solution of sodium ascorbate (2.5 mM, 3 μ L). The mixture was then shaken for 1 hour on a Thermomixer at 25°C, 1200 rpm, and the solvent was then directly evaporated on a SpeedVac at 35°C. All the products were analyzed and purified using RP-HPLC and identified using MALDI-TOF-MS.

Cyanoethyl deprotection: After solid phase oligonucleotide synthesis on a 200 nmol scale, part of the resin (approximately 50 nmol of oligonucleotide), was suspended in 500 μ L of 10% DBU in dry acetonitrile to deprotect the cyanoethyl groups on the phosphates. The suspension was shaken on a Thermomixer at 30°C for 1 h. After centrifugation, the DBU solution was decanted off and the resin was washed 5 times with 1 mL of dry acetonitrile.

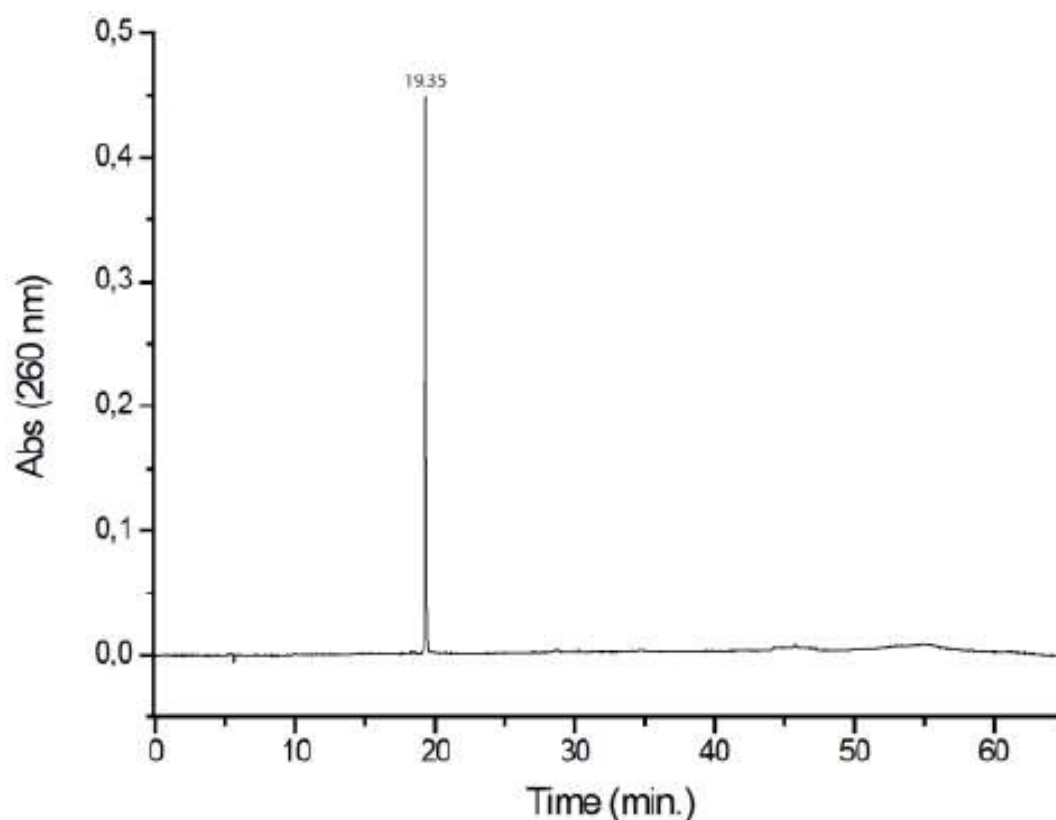
General procedure B (click on solid phase): The dried resin was suspended in 375 μ L of H₂O /DMSO 1:2. To this, 1M TEAA buffer (pH 7, 100 μ L), the azide or dye-alkyne solution (20 mM in DMSO, 50 μ L) and the CuSO₄/TBTA solution (1 mM in H₂O /DMSO 1:1, 25 μ L) were added, followed by a freshly prepared solution of sodium ascorbate (1 mM, 75 μ L). After 1.5 h shaking on a Thermomixer at 25°C, 1200 rpm, the mixture was centrifuged and the supernatant was discarded. The resin was then washed with H₂O (500 μ L), MeCN (500 μ L x 3) and dried.

Standard cleavage procedure: The resin was suspended in 400 μ L of 28-30% aqueous ammonium hydroxide and shaken at 30°C for 1h. After centrifugation, the supernatant was collected and the resin washed again with H₂O (2 x 200 μ L). The solution was then evaporated on a SpeedVac at 35°C to obtain the products that were analyzed by RP-HPLC and MALDI-TOF-MS and then purified.

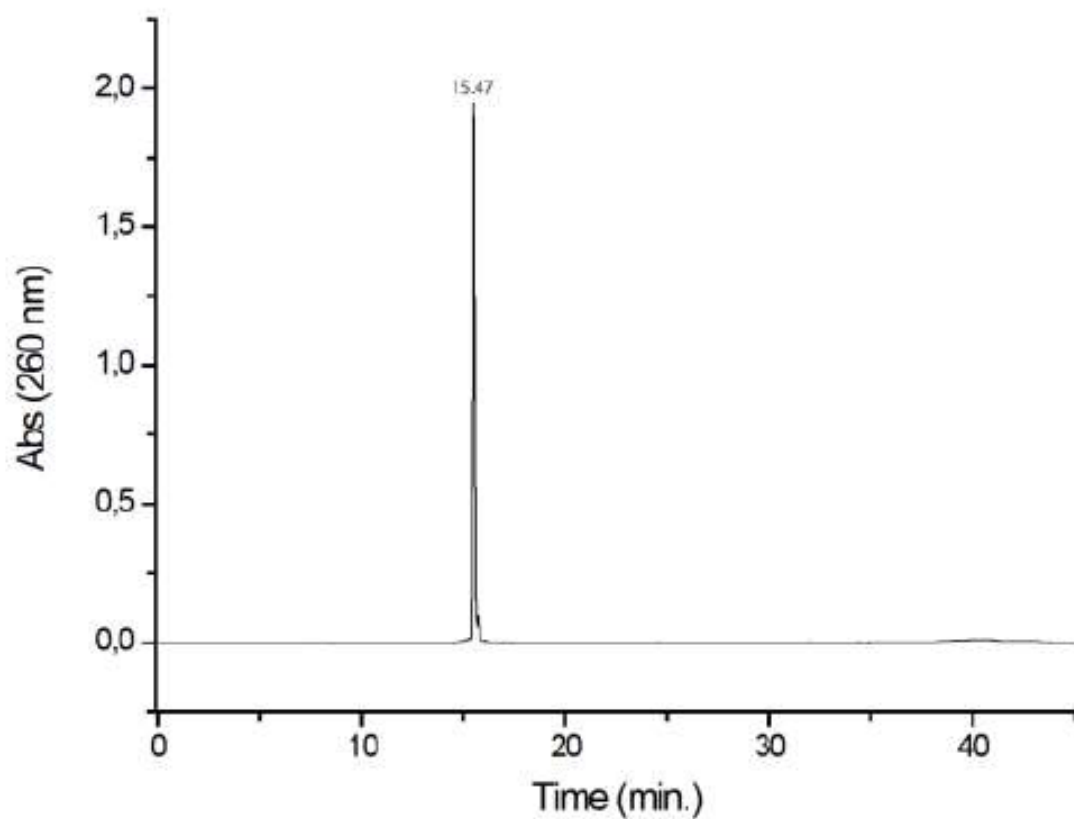
Cleavage procedure for TAMRA-containing oligonucleotides: The resin was suspended in 200 μL of a solution of $\text{tBuNH}_2/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 1:1:3 solution and shaken at 40 $^\circ\text{C}$ for 1 hour. After centrifugation, the resin was washed twice with 200 μL of H_2O and the combined solutions were evaporated on a SpeedVac at 40 $^\circ\text{C}$. The products were analyzed by RP-HPLC and MALDI-TOF-MS.

RP-HPLC chromatograms of the starting materials

Oligonucleotide 1 (0-70% B in 45 min)

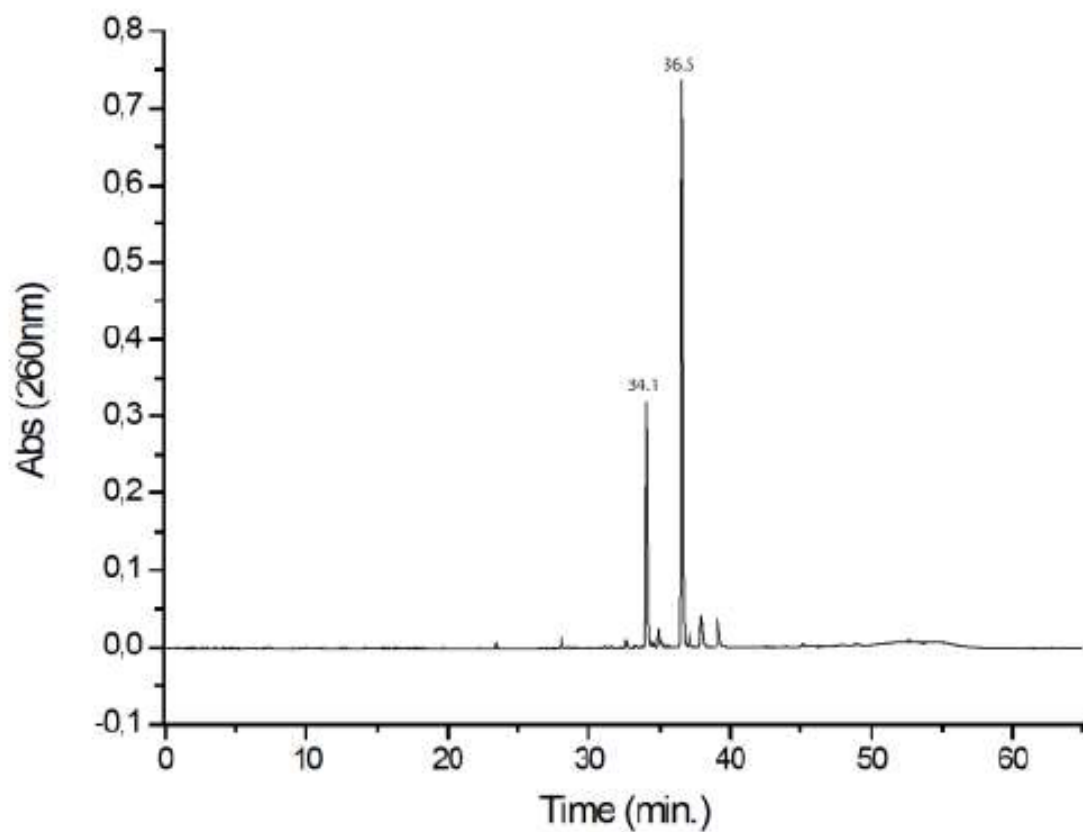


Oligonucleotide 2 (0-70% B in 33 min)

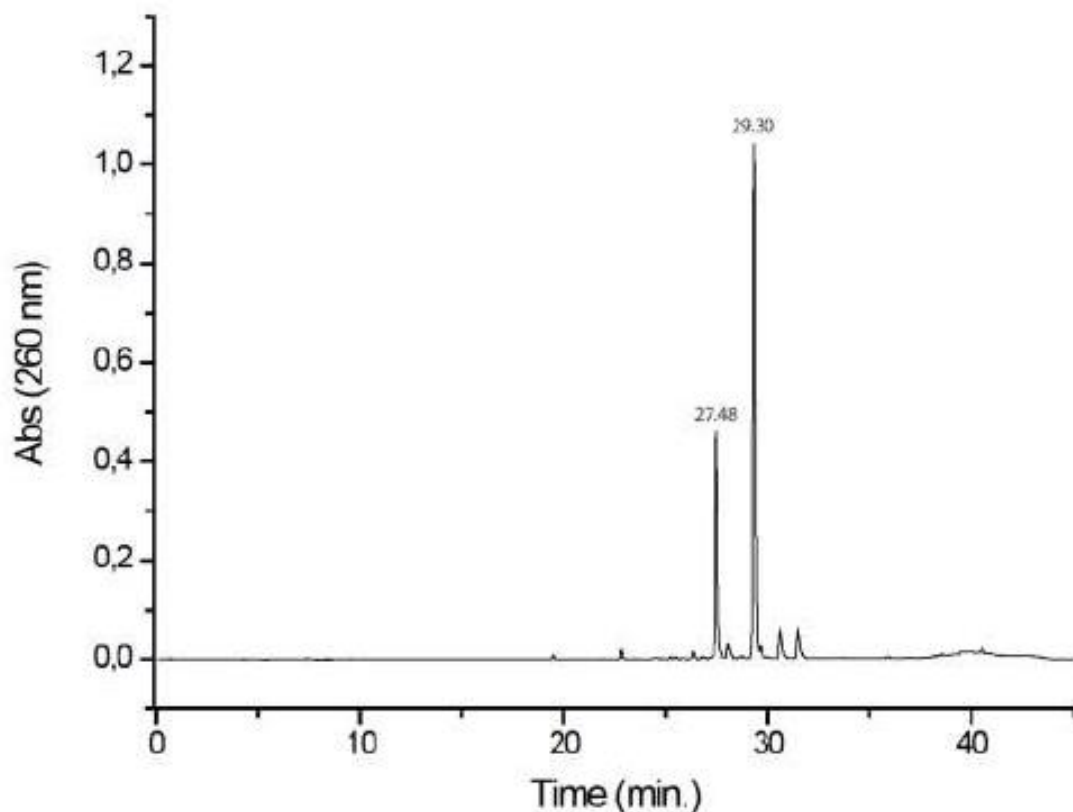


5/6-TAMRA-PEG4-alkyne

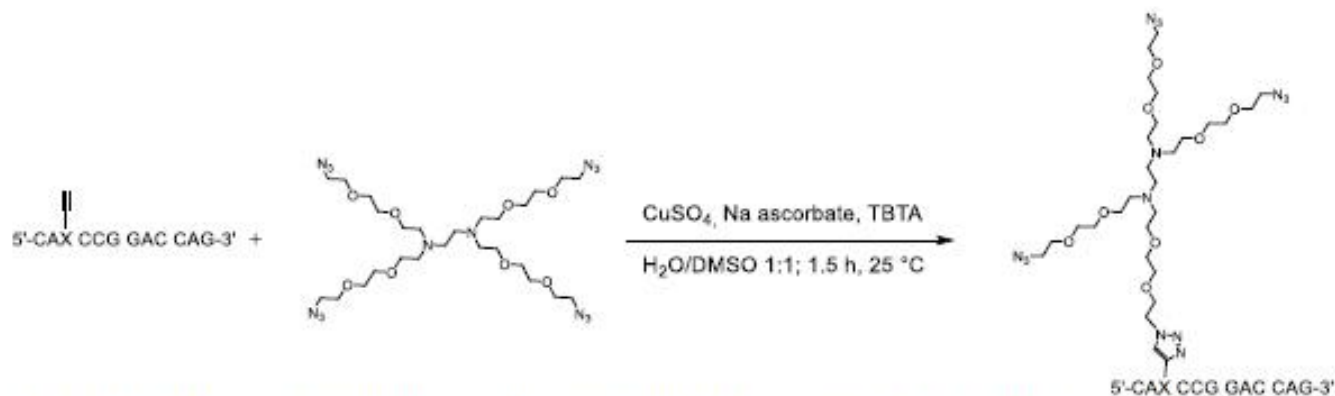
Method 0-70% B in 45 min (for click reactions in solution)



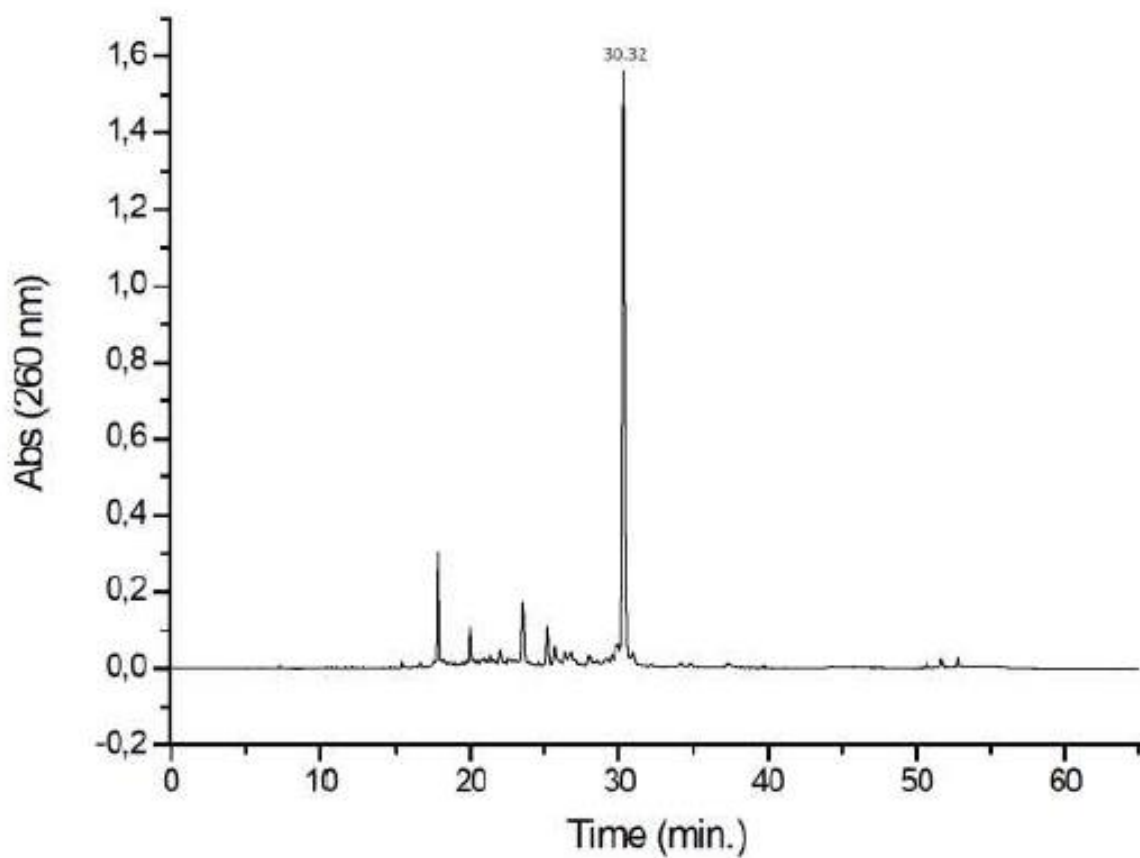
Method 0-70% B in 33 min (for click reactions on solid phase)



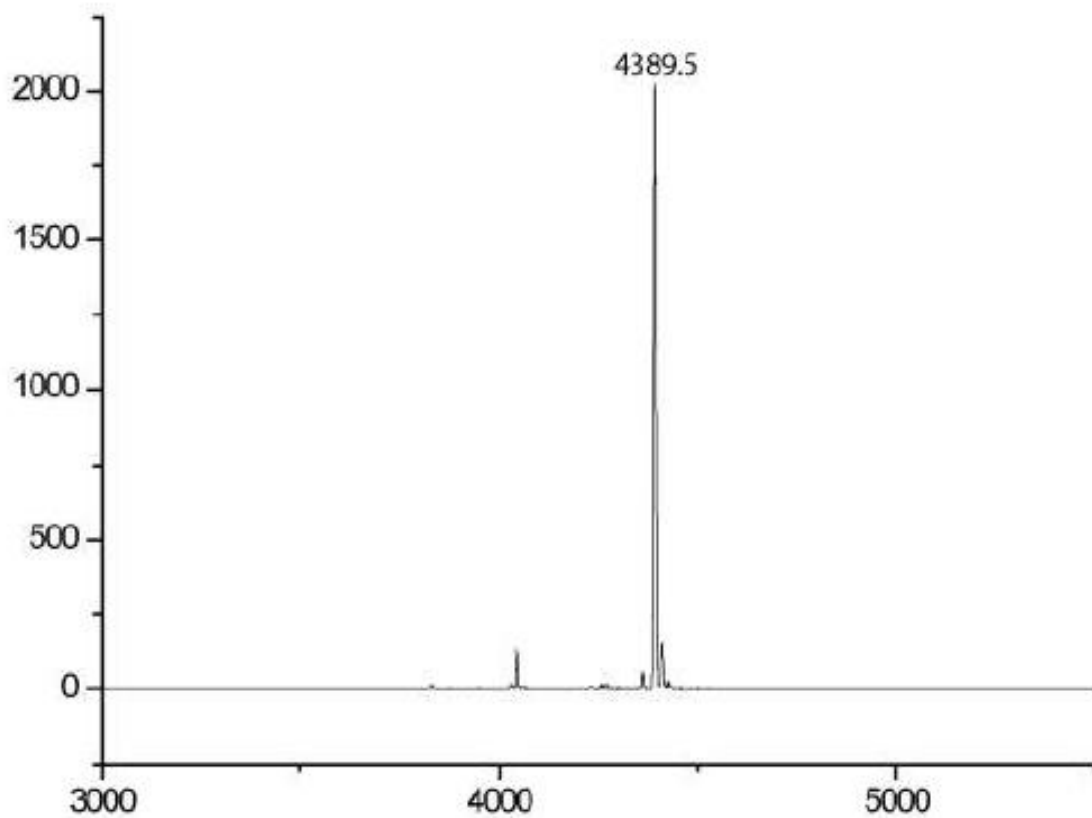
Click 1: Oligonucleotide 1 + tetraazide dendrimer



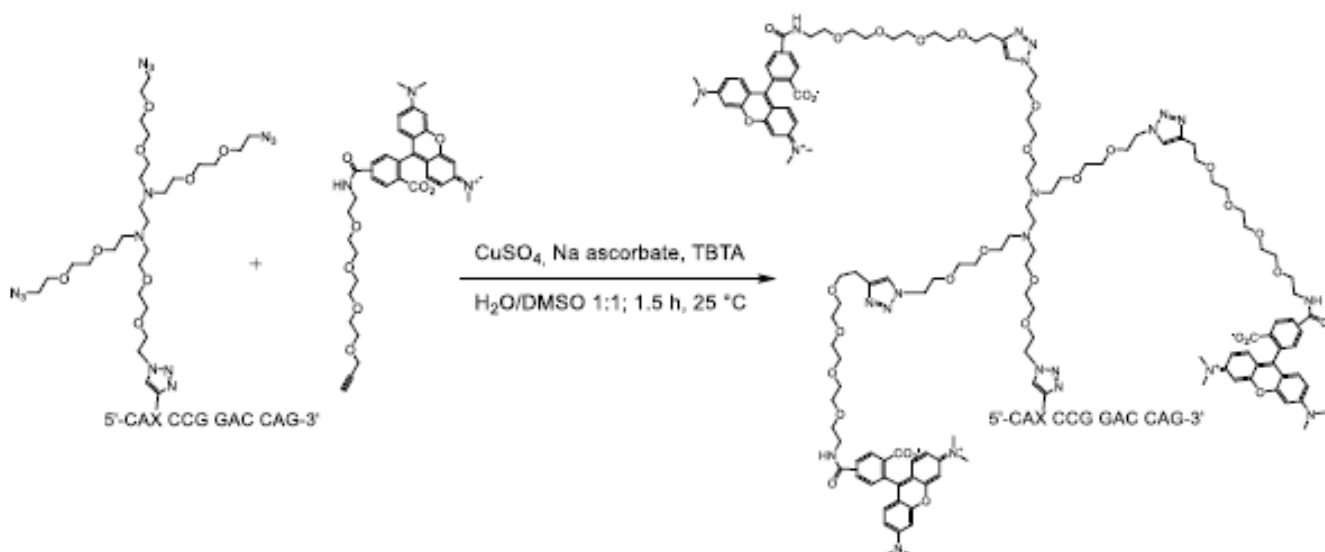
After the click reaction with the oligonucleotide **1** using the **general procedure A**, analysis via RP-HPLC showed a quantitative conversion of the starting material to the clicked products.



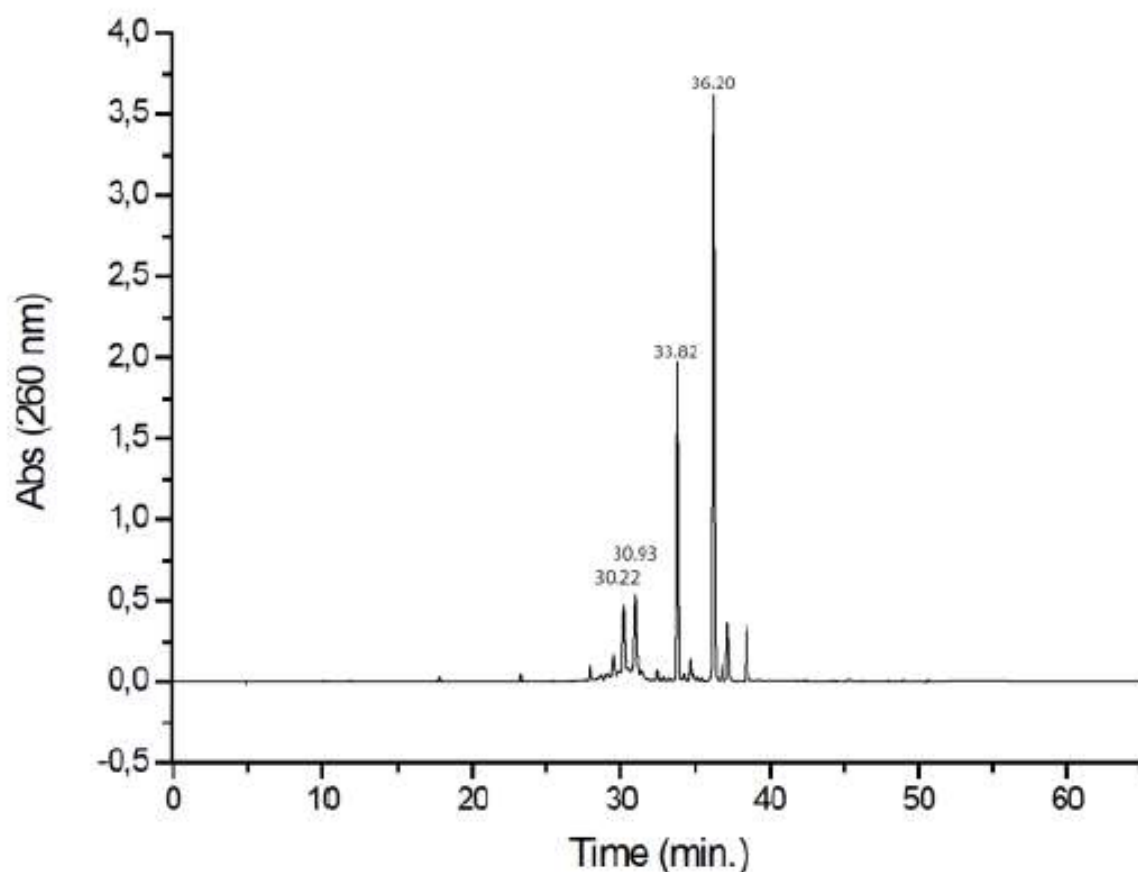
MALDI-TOF-MS: [M] calc. for oligonucleotide 1 + dendrimer = 4393.8 ; found = 4389.5.



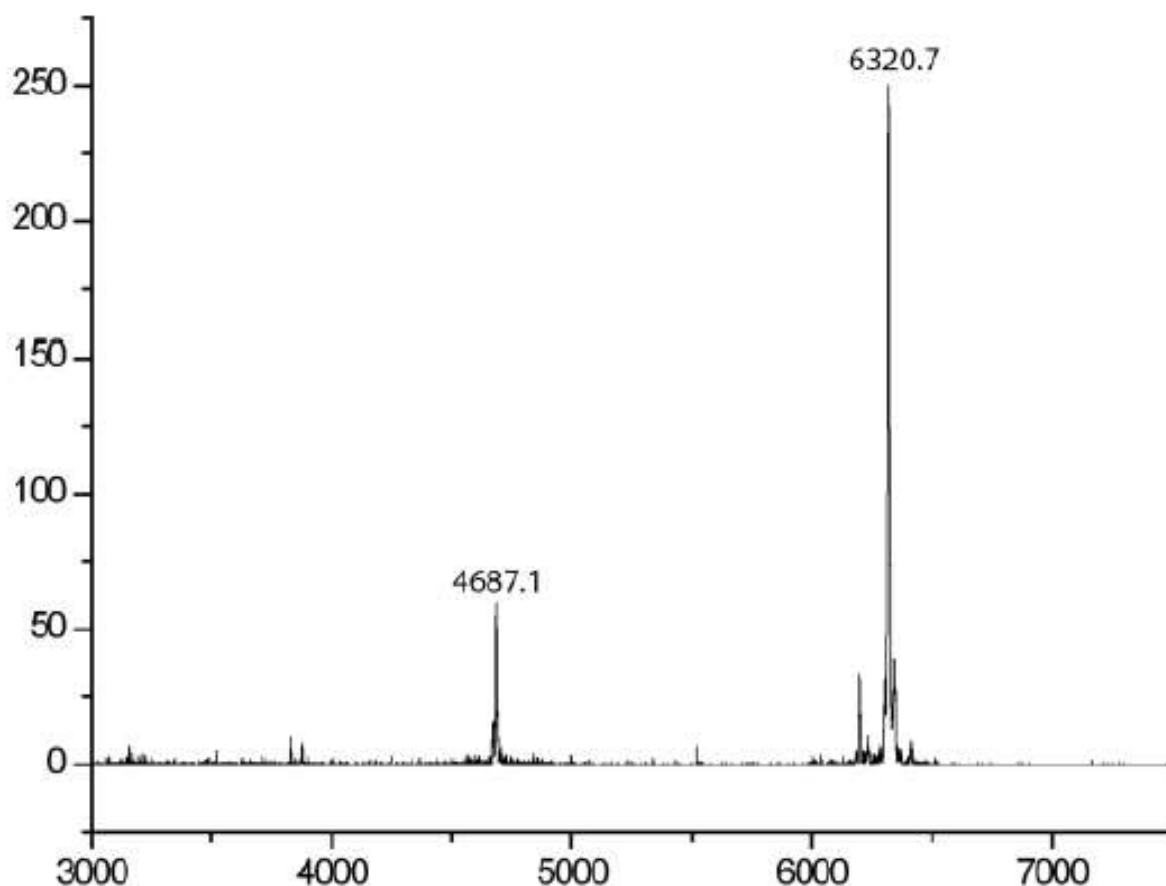
Click 2: Oligonucleotide from Click 1 + 5/6-TAMRA-PEG4-Alkyne



After the click reaction using the **general procedure A**, analysis via RP-HPLC and MALDI-TOF-MS showed a quantitative conversion of the starting material to the clicked products. For the HPLC analysis and purification, the TAMRA maximum absorption wavelength (546 nm) was also monitored to identify the clicked products. The two intense peaks at 33.8 and 36.2 min can be assigned to the unreacted dye, while the product peaks have t_R of 30.22 and 30.93 min (5/6-TAMRA isomers).

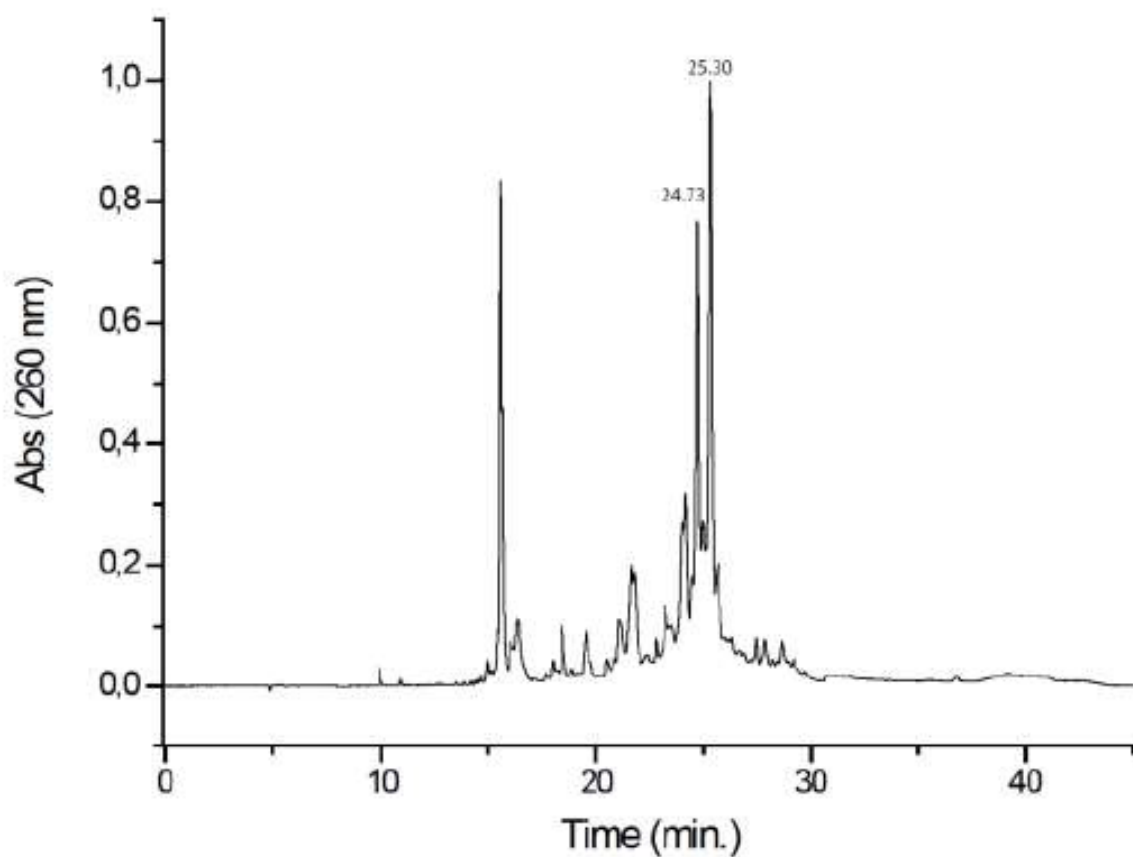
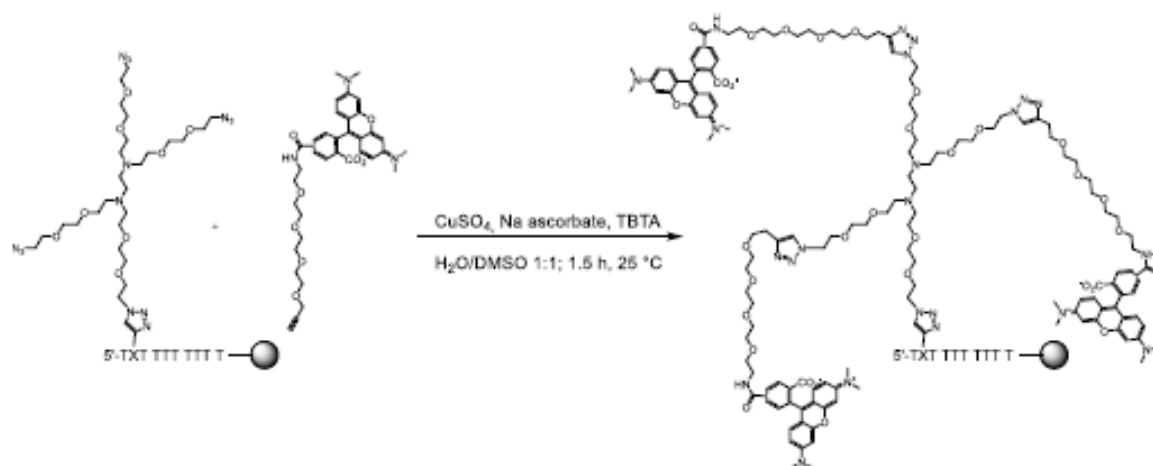
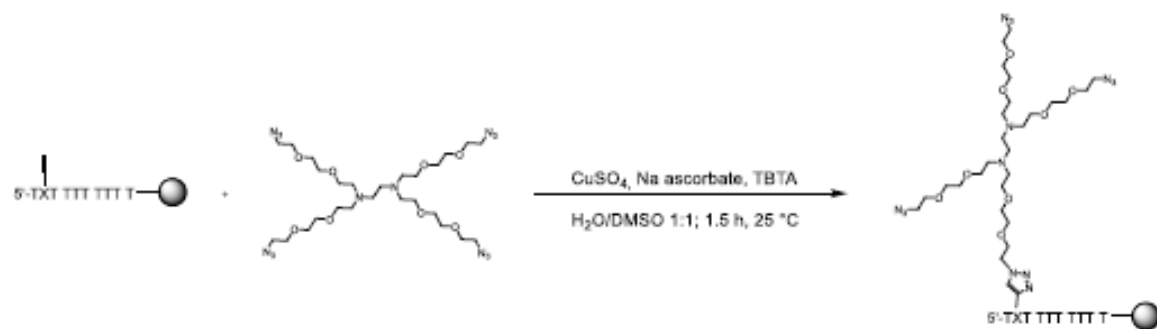


MALDI-TOF-MS: [M] calc. for oligonucleotide **1** + dendrimer + 3 dyes = 3705.4;
found = 6320.7, 4687.1 ([2 oligonucleotides **2** + dendrimer + 2 dyes]²⁻).

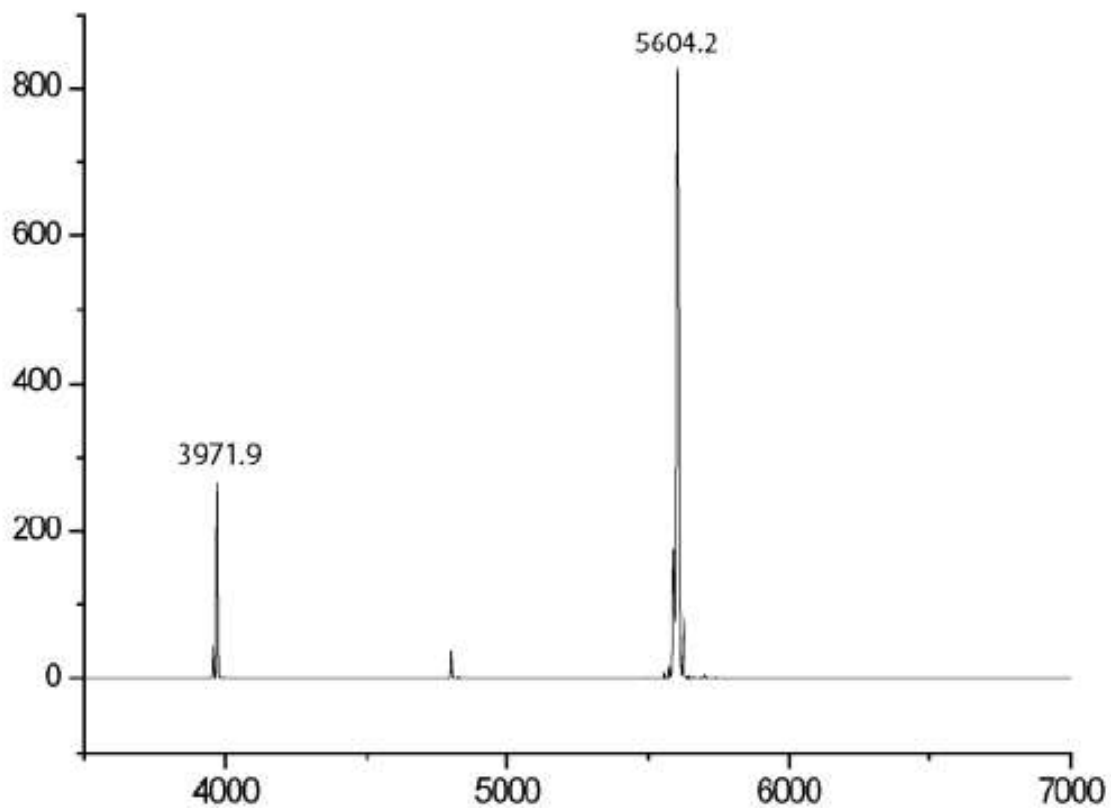


Click reactions on solid phase

After solid phase synthesis of the **oligonucleotide 2** and DBU deprotection of the cyanoethyl groups of the phosphates, 2 click reactions were performed following the **procedure B** and the final product was analyzed by RP-HPLC and MALDI-TOF-MS.



MALDI-TOF-MS: $[M]$ calc. for oligonucleotide **2** + dendrimer + 3 dyes = 5612.4;
 found = 5604.2, 3971.2 (2 oligonucleotides **2** + dendrimer + 2 dyes)²⁻.



Cell culture cell strains and EdU labelling *in vivo*

HeLa, HEK293T and HEK293-GFP (GFP-stable cell line from Amsbio Catalog No. SC001) cells were cultivated at 37°C in water saturated, CO₂-enriched (5%) atmosphere. DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen #10500-064), 1% penicillin and streptomycin (Sigma Aldrich # P0781), was used as growing medium. When reaching a confluence of 70% to 80%, the cells were passaged in a new culture flask. For staining experiments, 1.5×10^4 cells were seeded in each well of a μ -Slide 8 Well from ibidi (ibiTreat, #1.5 polymer coverslip, catalog No. 80826) and cultured for two days or until a density of 80% is reached.

EdU dissolved in DMSO was added to the culture medium to a final concentration of 10 μ M for 1 h (HEK-GFP) and 2 h (HEK and HeLa). The control cells without EdU feeding were exposed to the same volume of DMSO biological grade for the same period.

EdU staining *in situ* for the control experiments

All control experiments were accomplished using the EdU-Click kit from Baseclick GmbH containing the correspondent fluorescent dye and following the user manual.

EdU staining *in situ* with the double click approach

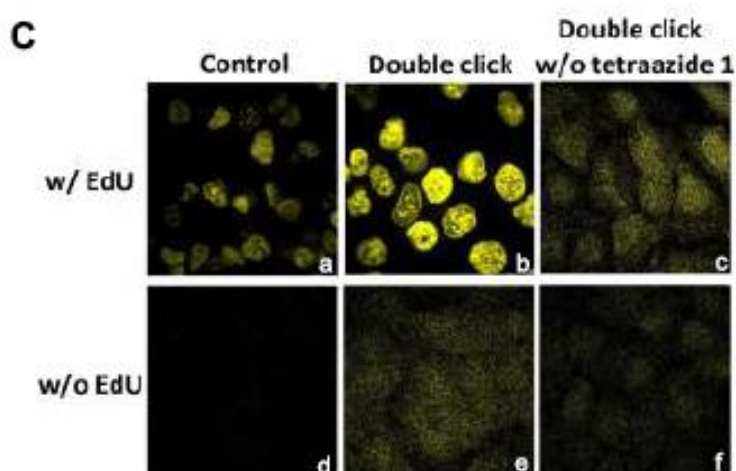
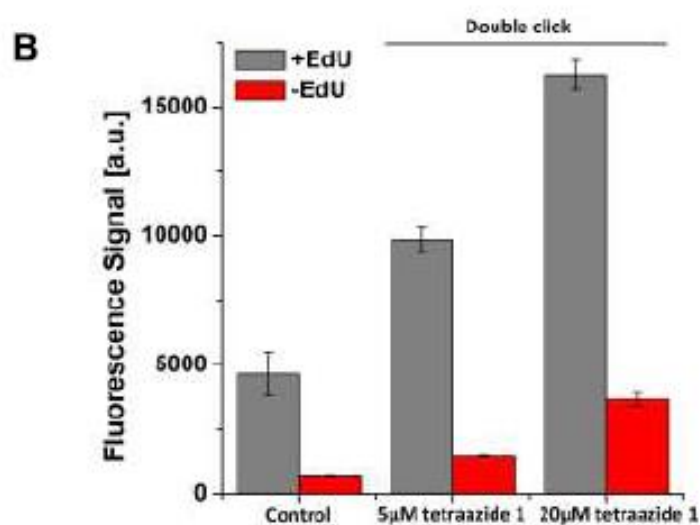
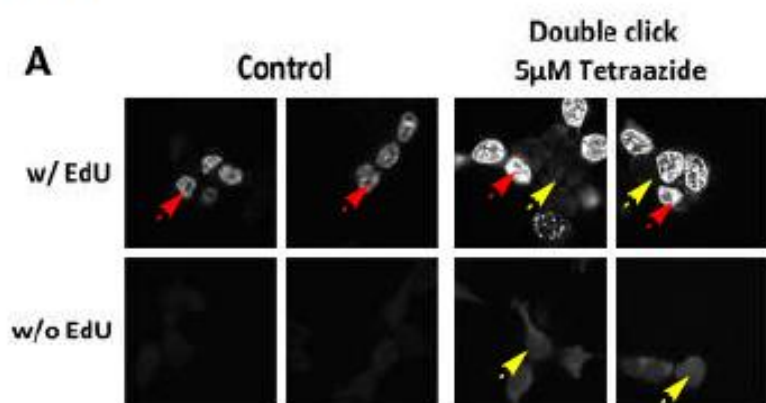
After EdU labelling, the cells were washed with phosphate buffered saline (137 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, 2.7 mM KCl), supplemented with 0,02% Tween (PBS-T) and fixed with 3,7% Formaldehyde in PBS for 15 minutes at RT. All following steps could be done outside the sterile bench. After two washing steps with PBS-T, the first click cocktail containing 20 µM tetraazide **1** was added to the cells. For this cocktail, the same buffers from the EdU-Click kit from Baseclick were used with the same final concentrations to prove, that any signal enhancement is caused by our dendrimer system. After 1 h incubation, the cells were washed twice with an acetic buffer pH 4.7 for 10 minutes each followed by two short washing steps with PBS-T.

The second click cocktail containing the dye-alkyne to a final concentration of 5 µM was then prepared and added to the cells and incubated for 30 minutes at RT. For the positive control, 20 µM of dye-azide were used. Light was avoided to prevent bleaching of the dyes. After staining, the cells were washed twice with a saturated solution of guanidinium isocyanate for 10 minutes respectively followed by two washing steps with PBS-T. When preparing the click cocktails, all buffers have to be fresh. If precipitation or changes of the colors happen, use another bench of the buffers or solutions. Cells were then stained with 200 ng/µl DAPI for 10 minutes at RT and washed twice with PBS-T.

EdU staining *in situ* with the triple click approach

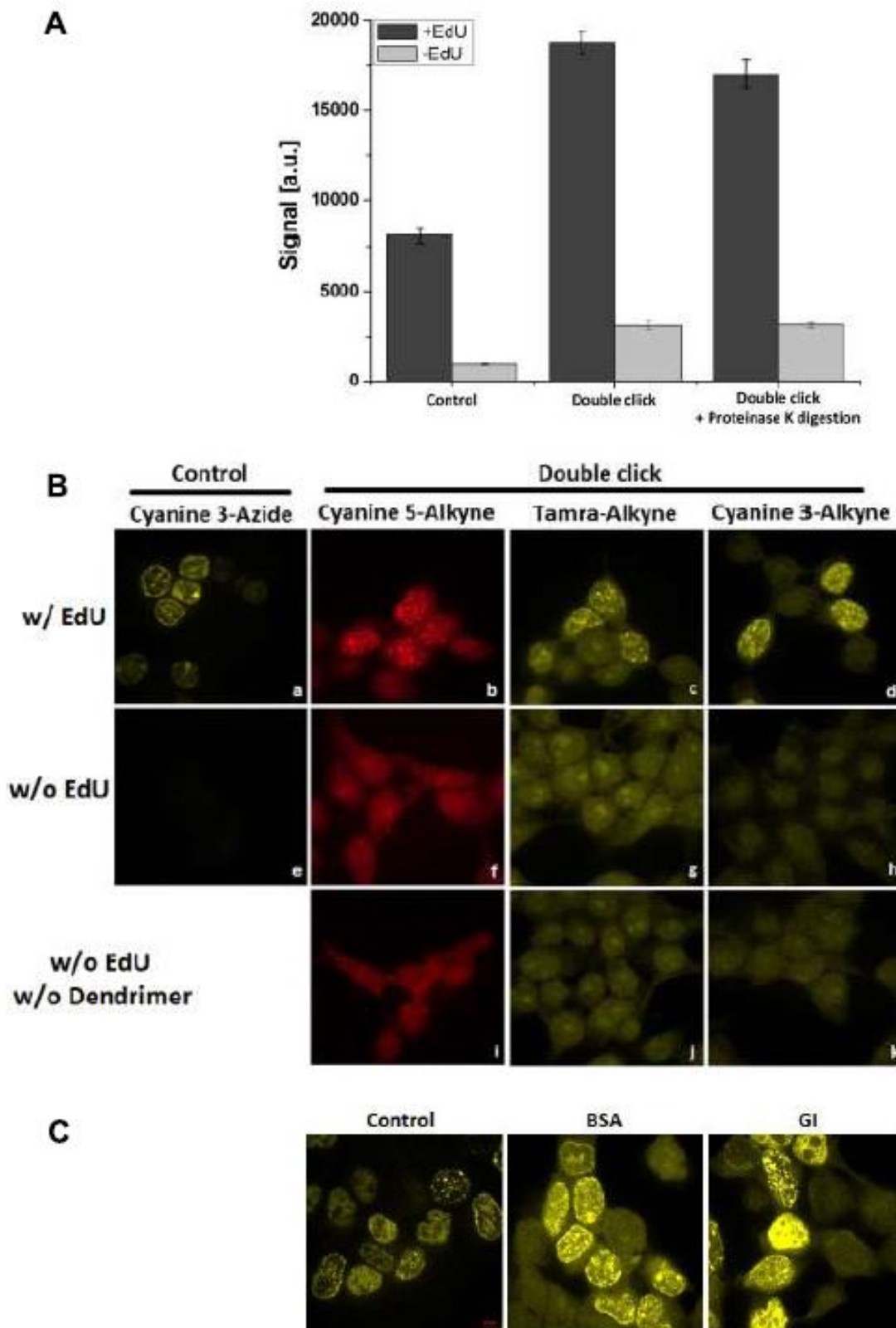
The same procedure, as described above, was used. After the first click reaction with 20 µM tetraazide **1** and the washing steps with acetic buffer and PBS-T, the second click cocktail containing 5 µM tetraalkyne **2** was added and incubated for 1 h at RT. After two washing steps with PBS-T, the click cocktail containing 20 µM dye-azide was then prepared and added to the cells and incubated for 30 minutes at RT. After staining, the cells were washed twice with a saturated solution of guanidinium isocyanate for each 10 minutes followed by two washing steps with PBS-T. Cells

were then stained with 200 ng/μl DAPI for 10 minutes at RT and washed twice with PBS-T.



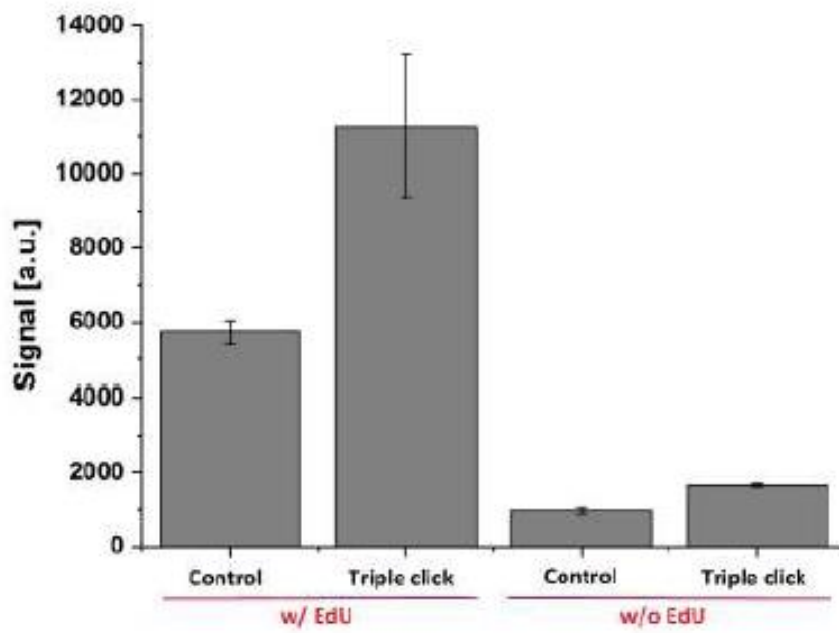
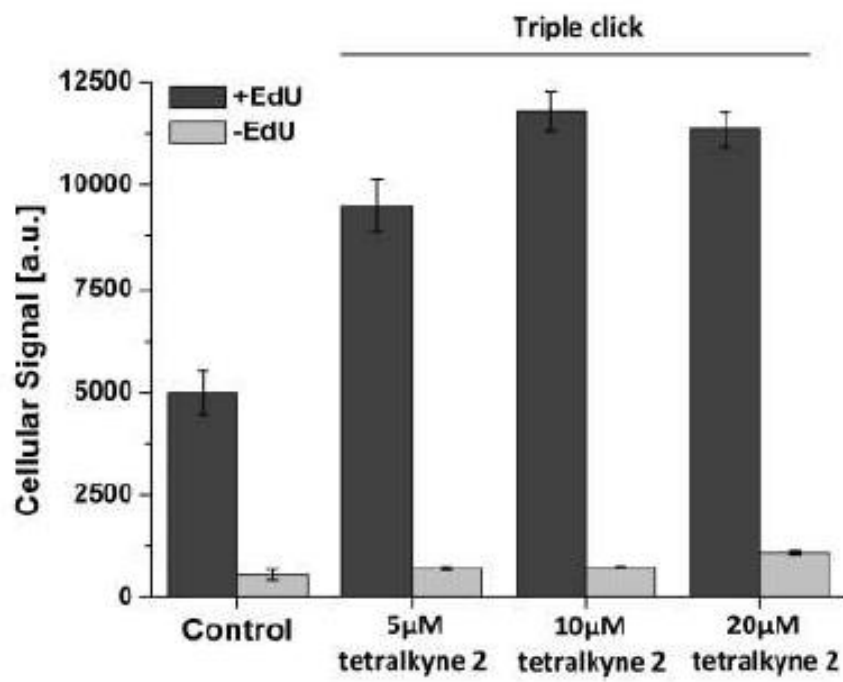
Supplementary figure S4: Development of the double click assay (simple dendrimer). A) A strong increase of the specific signal intensity (red arrows) was achieved with 5 μM tetraazide 1 and 5 μM Cyanine 3-alkyne. This enhancement was coupled with an increase of background fluorescence (yellow arrows), which was not seen in the control cells stained using the standard *in situ* click assay with 5 μM dye

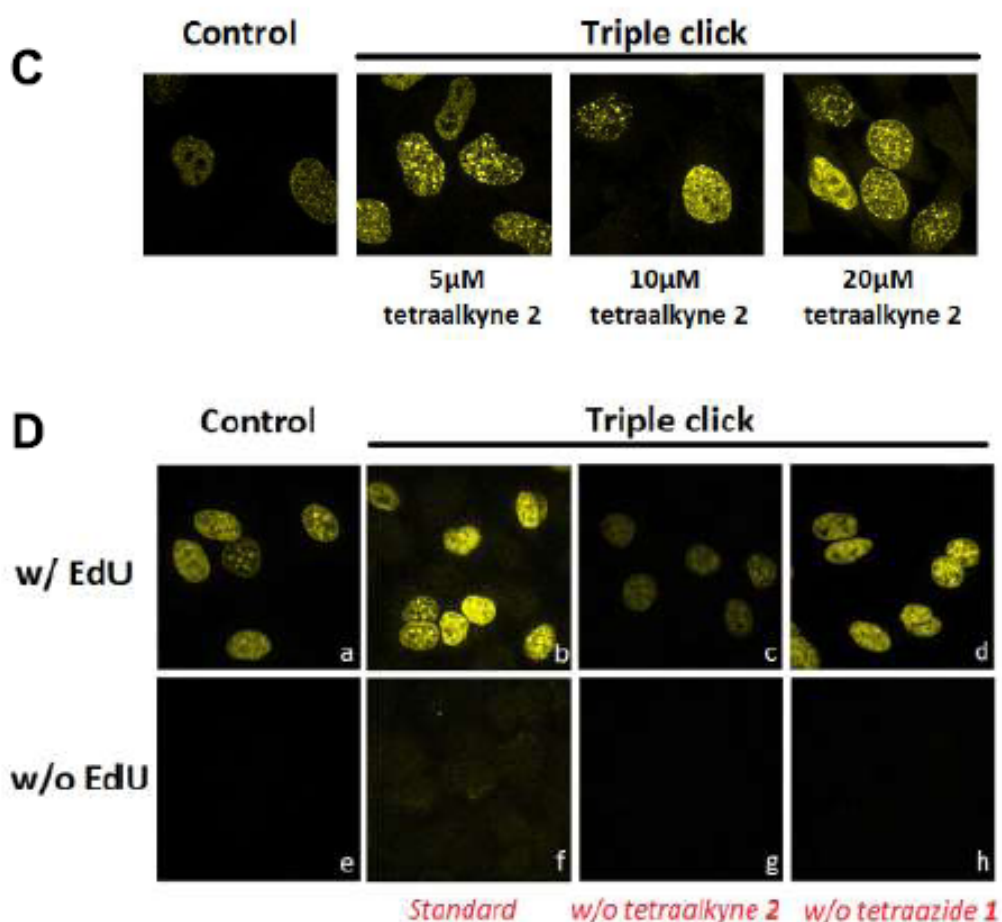
azide. **B)** Using 20 μM tetraazide **1**, an enhancement of the signal intensity and the background were measured. **C)** To prove, that the signal intensity was generated by the combination of the tetraazide and the Cyanine 3-alkyne system, control experiments were done with EdU and Cyanine 3-alkyne (5 μM) (**c**), without EdU, with tetraazide and Cyanine 3-alkyne (5 μM) (**e**) and without EdU, without tetraazide and with Cyanine 3-alkyne (5 μM) (**f**). Positive control was performed with EdU, tetraazide and Cyanine 3-alkyne (5 μM). The negative controls **c**, **e** and **f** show only background fluorescence without any kind of specific signal. Controls **a** and **d** were stained with 20 μM Cyanine 3-azide.



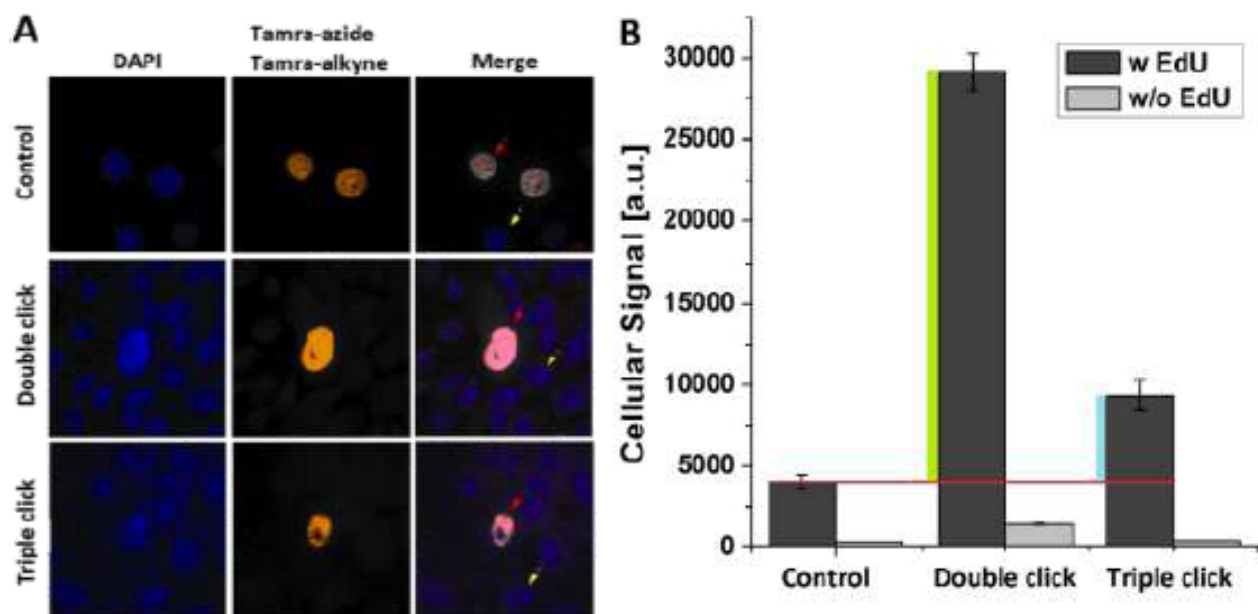
Supplementary figure S5: Improvement of the signal to background ratio of the double click assay. A) Digestion of proteins in order to reduce cross linkers, which could be binding sides for the alkyne-dye. Fixed and permeabilized cells were digested with 50 $\mu\text{g/ml}$ Proteinase K at 37°C for 1 h before performing double click assay with dendrimer 1 (20 μM) and Cyanine 3-alkyne (5 μM). Control cells were stained using the double click assay without Proteinase K digestion and with 20 μM

Cyanine 3-azide. Positive control was the standard *in situ* click assay with cyanine 3-azide (20 μ M). The specific signal intensity is after digestion slightly decreased. Negative controls without EdU labelling show no decrease in background signal intensity. **B**) Screening for dye alkyne. Positive control cells (**a**) labeled with EdU were stained with Cyanine 3-azide (20 μ M). For the double click assay, cells were labeled with EdU and stained using dendrimer **1** (5 μ M) followed by click reactions using either Cyanine 5-alkyne (**b**), Tamra-alkyne (**c**) or Cyanine 3-alkyne (**d**) (each 5 μ M). The double click assay was successful using the different dye-alkynes. For the negative controls, cells were not labeled with EdU but either stained with the dendrimer **1** (20 μ M) and the corresponding dye-alkyne (5 μ M) (**e-h**) or only with the dye-alkyne (5 μ M) (**i-k**). **i-k** were washed additionally over night with 3% BSA in PBS. They show how the dye-alkynes stuck strongly to the cells in an unspecific way. **C**) Screening for wash buffers. To decrease the unspecific bound dye-alkyne, a screening for organic (DMSO, DMF, Acetonitril, MeOH, EtOH) and inorganic washing solvents (H₂O, Urea, guanidinium isocyanate, BSA) was performed with different incubation times and temperatures (data not shown). The best washing buffer was guanidinium isocyanate (GI), which reduces the background signal of Tamra-alkyne by about 50% in comparison to 3% BSA in PBS, when used twice after the click reaction of the dye-alkyne and before DAPI staining for 10 minutes at RT.

A**B**



Supplementary figure S6: Development of the triple click assay (double dendrimer). **A)** An increase of the signal intensity and a reduced background signal were achieved using the double dendrimer approach. **B)** and **C)** Screening for the appropriate concentration of tetraalkyne **2**. A titration for the concentration was done using 5, 10 and 20 μ M of the tetraalkyne **2**. The background intensity was dramatically reduced compared to the simple dendrimer assay. Furthermore, it was as low as the background in the control cells. The specific signal was doubled already with 5 μ M tetraalkyne **2**. **D)** In order to test, if the increase of the specific signal intensity is a result of the combination of **1**, **2** and Tamra-azide, we performed control experiments either with **1** and without **2** (**d**, **g**) or with **2** and without **1** (**d**, **h**) respectively in presence or absence of EdU. Positive controls were the non-dendrimer assay with (**a**) and without (**e**) EdU. **c)** shows that after the first click reaction, most of the genomic alkynes reacted with tetraazide **1** resulting in a very weak specific signal. **d)** shows almost the same signal intensity as the positive control (**a**), because **1** cannot react with the genomic alkynes and is washed away before the click reaction with Tamra-azide.



Supplementary figure S7: Direct comparison between the non-dendrimer, the double and triple click dendrimer approaches. **A)** Comparison of microscope images. The strongest signal of proliferating cells (red arrows) is achieved using the double click (20 μ M tetraazide **1** followed by 5 μ M Tamra-alkyne). The triple click (20 μ M tetraazide **1** followed by 5 μ M tetraalkyne **2** and 20 μ M Tamra-azide) showed a doubling of the specific signal intensity. Yellow arrows show non-proliferating cells **B)** Statistical quantifications. These quantifications approve the signal enhancement seen under the fluorescent microscope. The signal intensity is at least doubled using the triple click and four times higher than the control using the double click approach. All other results obtained so far were confirmed. Due to the binding of several fluorescent dyes at the dendrimer **2** using the triple click, the cellular signal intensity is reduced compared to double click approach using only dendrimer **1**. The reason for it could be the self-quenching of the fluorescent dyes.

High throughput screening: HeLa cells were seeded with different cell number (100, 500, 1000, 2000, 4000, 8000 cells) in a 96-well black microplate with a flat bottom (VWR) for 48 h. For each cell density, a duplicate was performed. Cells were fed with 10 μ M EdU for 2 h. After fixation with 3.7% PFA in PBS at RT and permeabilization with 0.5% Triton in PBS-T for 15 min at RT, cells were incubated with 20 μ M tetraazide **1** followed by incubation with 5 μ M Tamra-alkyne for the double click assay. Cells were incubated with 20 μ M tetraazide **1** followed by 5 μ M

tetraalkyne **2** than 20 μM Tamra-azide for the triple click assay. All incubations were done in presence of Cu(I). The control cells were reacted only with 20 μM Tamra-azide in presence of Cu(I). Negative control cells without EdU labeling were reacted with the same corresponding reagents. The cellular intensities were measured with a microplate reader from Tecan for the positive and negative controls. Background intensity was measured and subtracted in order to calculate the specific signal intensity.

Microscopy and image analysis: Confocal fluorescence images were acquired by the commercially available Zeiss Cell Observer SD equipped with a Yokogawa spinning disk unit. Single slices of multiple nuclei within one field of view were acquired. The laser power and exposure settings were equal for throughout the image acquisition. Using ImageJ, a rolling ball background subtraction was performed, followed by determination of the gray value of the brightest pixel (GVBP). Then, a threshold at $0.25 \times \text{GVBP}$ was applied and the mean signal of the pixels above this threshold was measured. The mean of ten fields of view was taken and defined as signal for the respective condition.

4. Ausblick

Das Konzept der Verwendung der Dendrimere für das EdU-Proliferationsassay hat sich für die mikroskopische Untersuchung der Zellteilung als wegweisend herausgestellt. Dennoch muss die Dendrimer-basierte Untersuchung der Zellproliferation in weiteren Arbeiten überdacht und optimiert werden. Gerade die Anwendung dieser Methode für die Durchflusszytometrie bietet ein großes Potential für die schnelle und effiziente Analyse der Zellzyklen. Auch andere Modellorganismen sowie z.B. Pflanzen oder *e. coli* oder gar ganze Mäuse können getestet werden. Ein weiterer Punkt ist die Synthese effizienter Farbstoffe, die erst nach der Click-Reaktion mit dem Alkin fluoreszieren. Somit wird sichergestellt, dass die Hintergrund-Fluoreszenz gering bleibt oder gar verschwindet. Das könnte dazu führen, dass nur noch spezifische Signale detektiert werden.

Die neue auf CuAAC-basierte mRNA-FISH-Methode sollten in der Zukunft nicht nur das Detektionslimit heruntersetzen, sondern auch weitere zahlreiche Probleme lösen. Ein Problem ist z. B. die diagnostische Lücke, die die Zeit zwischen einer viralen Infektion und Ihrer Diagnose darstellt, zu minimieren oder gar zu schließen. Somit könnte z. B. eine HIV-Infektion aus einer Blutprobe in kurzer Zeit nachgewiesen und die Therapie in einem früheren Stadium angefangen werden. Ein weiterer Einsatz wäre die Diagnose der Minimalresterkrankungen, die die restmutierten Krebszellen darstellen. Diese Zellen haben die Fähigkeit, eine Therapie zu überleben, da sie durch die existierenden Nachweismethoden nicht detektiert werden können. Durch das Verbessern der Detektion könnten sehr geringe Mengen an kranken Zellen detektiert, Therapien rasch angepasst und die 5-Jahre-Überlebensrate verkürzt werden. Ebenfalls könnten hier verbesserte Farbstoffazide das Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis erhöhen, sodass falsch-positive Ergebnisse ausgeschlossen werden.

5. Abkürzungen

%	Prozent; 10 ⁻²
°C	Grad <i>Celsius</i>
Abs.	<u>A</u> bsorption
äq.	<u>Ä</u> quivalent(e)
a.u.	Absorptionseinheit (engl.: <u>a</u> bsorption <u>u</u> nit)
BSA	<u>B</u> ovines <u>S</u> erum <u>a</u> lbumin
bp	<u>B</u> asen <u>p</u> aar
BrdU	5- <u>b</u> romo-2'- <u>d</u> eoxy <u>u</u> ridine
bzw.	<u>B</u> e <u>z</u> iehu <u>ng</u> s <u>w</u> eise
ca.	<u>c</u> ir <u>a</u>
CuAAC	<u>Cu</u> (I)-Katalysierte <u>A</u> lkin- <u>A</u> zid- <u>Cy</u> koaddition
dd.	<u>d</u> oppel <u>d</u> estilliert
<i>d</i>	Tage
D	Farbstoff (engl.: <u>D</u> yes)
DMEM	<u>D</u> ul <u>b</u> ecco's <u>m</u> odified <u>E</u> agle <u>M</u> edium
DMSO	<u>D</u> imethyl <u>s</u> ulfo <u>x</u> id
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: <u>D</u> eoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid)
DNase	<u>D</u> eoxyribo <u>n</u> ukle <u>a</u> se
dNTP	<u>D</u> eoxy <u>n</u> ucleosid <u>t</u> riphosphat
dsDNA	<u>d</u> oppel <u>s</u> trang DNA
EdU	<u>E</u> thynyl-2'- <u>d</u> eoxy <u>u</u> ridine
Engl.	<u>E</u> nglisch
eGFP	grün fluoreszierendes Protein (engl.: <u>e</u> nhanced <u>G</u> reen <u>F</u> luorescent <u>P</u> rotein)
EtOH	Ethanol
FACS	<u>f</u> luorescent <u>a</u> ctivated <u>c</u> ell <u>s</u> orting
FISH	<u>F</u> luoreszenz- <u>i</u> n- <u>s</u> itu- <u>H</u> ybridisierung
g	<u>G</u> ramm
h	Stunde
HOAc	Essigsäure
HPLC	<u>h</u> igh <u>p</u> erformance <u>l</u> iquid <u>c</u> hromatography

<i>In vitro</i>	lateinisch: „im Glas“
<i>In vivo</i>	lateinisch: „im Lebendigen“
<i>In situ</i>	lateinisch: „am Ort“
kb	<u>K</u> ilo <u>b</u> asen (1000 Basen)
MALDI-TOF	<u>m</u> atrix <u>a</u> ssisted <u>l</u> aser <u>d</u> esorption <u>i</u> onisation – <u>t</u> ime <u>o</u> f <u>f</u> light
MeCN	Acetonitril
-mer	von griechisch <u>m</u> eros = Teil
MeOH	Methanol
mRNA	<u>m</u> essenger <u>r</u> ibo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid
nm	<u>N</u> ano <u>m</u> eter
nmol	<u>N</u> ano <u>m</u> ol
nt	<u>N</u> ukleotid
ODN	<u>O</u> ligo <u>d</u> esoxy <u>n</u> ukleotid
PBS	<u>P</u> hosphate <u>b</u> uffered <u>s</u> aline
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (engl.: <u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction)
PFA	<u>P</u> ara <u>f</u> ormaldehyde
q-PCR	<u>Q</u> uantitative <u>P</u> CR
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: <u>r</u> ibo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid)
RT	<u>R</u> aum <u>t</u> emperatur
RT-PCR	Echt-Zeit-PCR (engl.: <u>R</u> eal <u>T</u> ime <u>P</u> CR)
s oder sec	<u>S</u> ekunde(n)
SDS	Natrium-Dodecyl-Sulfat (engl.: <u>s</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate)
ssDNA	<u>s</u> ingle <u>s</u> trang DNA
T	<u>T</u> emperatur
<i>t</i> -BuOH	<u>t</u> er <u>t</u> - <u>B</u> utanol
TBTA	<u>T</u> ris[(1- <u>b</u> enzyl-1 <u>H</u> -1,2,3- <u>t</u> riazol-4-yl)methyl] <u>a</u> min)
U	Enzymeinheiten (engl.: <u>U</u> nits)
UV	<u>U</u> ltraviolett
μ	Mikro; 10 ⁻⁶
z.B.	<u>z</u> um <u>B</u> eispiel

7 Literaturverzeichnis

- [1] D. A. Haber, J. Settleman, *Nature* **2007**, *446*, 145-146.
- [2] C. Cesana, C. Klersy, L. Barbarano, A. M. Nosari, M. Crugnola, E. Pungolino, L. Gargantini, S. Granata, M. Valentini, E. Morra, *J. Clin. Oncol.* **2002**, *20*, 1625-1634.
- [3] D. Costa, A. Vidal, A. Carrio, C. Munoz, A. Arias, C. Gomez, D. Berneaga, D. Colomer, M. Rozman, M. Pratcorona, M. Torrebaddell, M. Diaz-Beya, J. Esteve, E. Campo, *Acta Haematol.* **2013**, *129*, 65-71.
- [4] D. Grimwade, R. K. Hills, A. V. Moorman, H. Walker, S. Chatters, A. H. Goldstone, K. Wheatley, C. J. Harrison, A. K. Burnett, G. National Cancer Research Institute Adult Leukaemia Working, *Blood* **2010**, *116*, 354-365.
- [5] T. Ried, M. Liyanage, S. du Manoir, K. Heselmeyer, G. Auer, M. Macville, E. Schrock, *J. Mol. Med. (Berl)* **1997**, *75*, 801-814.
- [6] M. Maurin, *Expert Rev. Mol. Diagn.* **2012**, *12*, 731-754.
- [7] G. Martinelli, N. Testoni, V. Montefusco, M. Amabile, G. Saglio, E. Ottaviani, C. Terragna, F. Bonifazzi, A. de Vivo, F. Pane, G. Rosti, S. Tura, *Haematologica* **1998**, *83*, 593-601.
- [8] J. M. Koomen, H. Zhao, D. Li, J. Abbruzzese, K. Baggerly, R. Kobayashi, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2004**, *18*, 2537-2548.
- [9] P. Nanni, D. Parisi, G. Roda, M. Casale, A. Belluzzi, E. Roda, L. Mayer, A. Roda, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2007**, *21*, 4142-4148.
- [10] M. Doan, I. Vorobjev, P. Rees, A. Filby, O. Wolkenhauer, A. E. Goldfeld, J. Lieberman, N. Barteneva, A. E. Carpenter, H. Hennig, *Trends Biotechnol.* **2018**, *36*, 649-652.
- [11] J. Drach, J. Angerler, J. Schuster, C. Rothermundt, R. Thalhammer, O. A. Haas, U. Jager, M. Fiegl, K. Geissler, H. Ludwig, H. Huber, *Blood* **1995**, *86*, 3915-3921.
- [12] G. T. Rudkin, B. D. Stollar, *Nature* **1977**, *265*, 472-473.
- [13] P. R. Langer, A. A. Waldrop, D. C. Ward, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1981**, *78*, 6633-6637.
- [14] M. R. Speicher, D. C. Ward, *Nat. Med.* **1996**, *2*, 1046-1048.
- [15] M. R. Speicher, S. Gwyn Ballard, D. C. Ward, *Nat. Genet.* **1996**, *12*, 368-375.
- [16] M. Rothenberg-Thurley, S. Amler, D. Goerlich, T. Kohnke, N. P. Konstandin, S. Schneider, M. C. Sauerland, T. Herold, M. Hubmann, B. Ksienzyk, E. Zellmeier, S. K. Bohlander, M. Subklewe, A. Faldum, W. Hiddemann, J. Braess, K. Spiekermann, K. H. Metzeler, *Leukemia* **2018**.
- [17] J. Gierlich, G. A. Burley, P. M. Gramlich, D. M. Hammond, T. Carell, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3639-3642.
- [18] P. M. Gramlich, S. Warncke, J. Gierlich, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2008**, *47*, 3442-3444.
- [19] P. M. Gramlich, C. T. Wirges, A. Manetto, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2008**, *47*, 8350-8358.
- [20] N. Raddaoui, S. Stazzoni, L. Mockl, B. Viverge, F. Geiger, H. Engelke, C. Brauchle, T. Carell, *Chembiochem.* **2017**, *18*, 1716-1720.
- [21] A. Raj, P. van den Bogaard, S. A. Rifkin, A. van Oudenaarden, S. Tyagi, *Nat. Methods* **2008**, *5*, 877-879.
- [22] A. Salic, T. J. Mitchison, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105*, 2415-2420.
- [23] K. J. Barnum, M. J. O'Connell, *Methods Mol. Biol.* **2014**, *1170*, 29-40.
- [24] T. Abbas, M. A. Keaton, A. Dutta, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2013**, *5*, a012914.
- [25] H. Nishitani, Z. Lygerou, *Genes Cells* **2002**, *7*, 523-534.
- [26] M. Fujita, *Front. Biosci.* **1999**, *4*, D816-823.
- [27] T. Otto, P. Sicinski, *Nat. Rev. Cancer* **2017**, *17*, 93-115.
- [28] B. Amulic, S. L. Knackstedt, U. Abu Abed, N. Deigendesch, C. J. Harbort, B. E. Caffrey, V. Brinkmann, F. L. Heppner, P. W. Hinds, A. Zychlinsky, *Dev. Cell* **2017**, *43*, 449-462 e445.
- [29] S. Elmore, *Toxicol. Pathol.* **2007**, *35*, 495-516.
- [30] S. Orrenius, *J. Intern. Med.* **1995**, *237*, 529-536.

- [31] W. Gorczyca, M. R. Melamed, Z. Darzynkiewicz, *Patol. Pol.* **1993**, *44*, 113-119.
- [32] J. H. Tjio, *Am. J. Obstet. Gynecol.* **1978**, *130*, 723-724.
- [33] L. G. Shaffer, P. American College of Medical Genetics Professional, C. Guidelines, *Genet. Med.* **2005**, *7*, 650-654.
- [34] T. Ried, *N. Engl. J. Med.* **2004**, *350*, 1597-1600.
- [35] Q. Tang, Q. Chen, X. Lai, S. Liu, Y. Chen, Z. Zheng, Q. Xie, M. Maldonado, Z. Cai, S. Qin, G. Ho, L. Ma, *PLoS One* **2013**, *8*, e81844.
- [36] A. W. Sudoyo, F. Hardi, *Acta Med. Indones.* **2011**, *43*, 68-73.
- [37] M. E. Drets, M. W. Shaw, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1971**, *68*, 2073-2077.
- [38] S. Heim, F. Mitelman, *Cancer Genet. Cytogenet.* **1986**, *22*, 99-108.
- [39] A. B. Glassman, *Ann. Clin. Lab. Sci.* **1995**, *25*, 389-393.
- [40] D. G. Albertson, C. Collins, F. McCormick, J. W. Gray, *Nat. Genet.* **2003**, *34*, 369-376.
- [41] H. Rajagopalan, C. Lengauer, *Nature* **2004**, *432*, 338-341.
- [42] T. S. Wan, S. K. Ma, W. Y. Au, L. C. Chan, *J. Clin. Pathol.* **2003**, *56*, 471-474.
- [43] C. Meyer, E. Kowarz, S. F. Yip, T. S. Wan, T. K. Chan, T. Dingermann, L. C. Chan, R. Marschalek, *Cancer Genet.* **2011**, *204*, 557-562.
- [44] M. P. Wong, L. F. Fung, E. Wang, W. S. Chow, S. W. Chiu, W. K. Lam, K. K. Ho, E. S. Ma, T. S. Wan, L. P. Chung, *Cancer* **2003**, *97*, 1263-1270.
- [45] G. B. Wertheim, E. Hexner, A. Bagg, *Mol. Diagn. Ther.* **2012**, *16*, 357-369.
- [46] F. Mitelman, F. Mertens, B. Johansson, *Genes Chromosomes Cancer* **2005**, *43*, 350-366.
- [47] A. A. Sandberg, *CA Cancer J. Clin.* **1994**, *44*, 136-159.
- [48] A. de Klein, A. G. van Kessel, G. Grosveld, C. R. Bartram, A. Hagemeijer, D. Bootsma, N. K. Spurr, N. Heisterkamp, J. Groffen, J. R. Stephenson, *Nature* **1982**, *300*, 765-767.
- [49] B. J. Trask, *Nat. Rev. Genet.* **2002**, *3*, 769-778.
- [50] T. S. Wan, *Ann. Lab. Med.* **2014**, *34*, 413-425.
- [51] T. S. Wan, W. Y. Au, J. C. Chan, L. C. Chan, S. K. Ma, *Leuk. Res.* **1999**, *23*, 1079-1083.
- [52] S. K. Ma, T. S. Wan, A. T. Cheuk, L. F. Fung, G. C. Chan, S. Y. Chan, S. Y. Ha, L. C. Chan, *Leukemia* **2001**, *15*, 1442-1447.
- [53] S. K. Ma, T. S. Wan, W. Y. Au, L. C. Chan, *Leuk. Res.* **1998**, *22*, 961-964.
- [54] T. S. Wan, S. K. Ma, W. Y. Au, H. S. Liu, J. C. Chan, L. C. Chan, *Cancer Genet. Cytogenet.* **2003**, *140*, 170-173.
- [55] P. Surapolchai, S. Y. Ha, G. C. Chan, J. B. Lukito, T. S. Wan, C. C. So, A. K. Chiang, *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* **2013**, *35*, e84-87.
- [56] W. Y. Au, S. K. Ma, T. S. Wan, M. H. Jim, Y. L. Kwong, *Leuk. Lymphoma* **2002**, *43*, 1505-1507.
- [57] T. S. Wan, S. K. Ma, G. C. Chan, L. M. Ching, S. Y. Ha, L. C. Chan, *Cancer Genet. Cytogenet.* **2000**, *118*, 24-27.
- [58] S. A. Smoley, S. R. Brockman, S. F. Paternoster, R. G. Meyer, G. W. Dewald, *Cancer Genet. Cytogenet.* **2004**, *148*, 1-6.
- [59] J. D. Rowley, *Nature* **1973**, *243*, 290-293.
- [60] P. Cairns, T. J. Polascik, Y. Eby, K. Tokino, J. Califano, A. Merlo, L. Mao, J. Herath, R. Jenkins, W. Westra, J. L. Rutter, A. Buckler, E. Gabrielson, M. Tockman, K. R. Cho, L. Hedrick, G. S. Bova, W. Isaacs, W. Koch, D. Schwab, D. Sidransky, et al., *Nat. Genet.* **1995**, *11*, 210-212.
- [61] J. R. Pollack, C. M. Perou, A. A. Alizadeh, M. B. Eisen, A. Pergamenschikov, C. F. Williams, S. S. Jeffrey, D. Botstein, P. O. Brown, *Nat. Genet.* **1999**, *23*, 41-46.
- [62] G. Peiro, D. Mayr, P. Hillemanns, U. Lohrs, J. Diebold, *Mod. Pathol.* **2004**, *17*, 227-287.
- [63] H. Dohner, S. Stilgenbauer, A. Benner, E. Leupolt, A. Krober, L. Bullinger, K. Dohner, M. Bentz, P. Lichter, *N. Engl. J. Med.* **2000**, *343*, 1910-1916.
- [64] P. L. Bergsagel, W. M. Kuehl, *Oncogene* **2001**, *20*, 5611-5622.
- [65] R. Fonseca, M. M. Oken, D. Harrington, R. J. Bailey, S. A. Van Wier, K. J. Henderson, N. E. Kay, B. Van Ness, P. R. Greipp, G. W. Dewald, *Leukemia* **2001**, *15*, 981-986.

- [66] K. Anderson, C. Lutz, F. W. van Delft, C. M. Bateman, Y. Guo, S. M. Colman, H. Kempfski, A. V. Moorman, I. Titley, J. Swansbury, L. Kearney, T. Enver, M. Greaves, *Nature* **2011**, *469*, 356-361.
- [67] E. Matutes, W. F. Pickl, M. Van't Veer, R. Morilla, J. Swansbury, H. Strobl, A. Attarbaschi, G. Hopfinger, S. Ashley, M. C. Bene, A. Porwit, A. Orfao, P. Lemez, R. Schabath, W. D. Ludwig, *Blood* **2011**, *117*, 3163-3171.
- [68] M. Zandecki, J. L. Lai, T. Facon, *Br. J. Haematol.* **1996**, *94*, 217-227.
- [69] J. Drach, J. Schuster, H. Nowotny, J. Angerler, F. Rosenthal, M. Fiegl, C. Rothermundt, A. Gsur, U. Jager, R. Heinz, et al., *Cancer Res.* **1995**, *55*, 3854-3859.
- [70] G. Tricot, B. Barlogie, S. Jagannath, D. Bracy, S. Mattox, D. H. Vesole, S. Naucke, J. R. Sawyer, *Blood* **1995**, *86*, 4250-4256.
- [71] E. A. Nigg, *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2*, 815-825.
- [72] J. D. Oliner, K. W. Kinzler, P. S. Meltzer, D. L. George, B. Vogelstein, *Nature* **1992**, *358*, 80-83.
- [73] M. H. Qazilbash, R. M. Saliba, B. Ahmed, G. Parikh, F. Mendoza, N. Ashraf, C. Hosing, T. Flosser, D. M. Weber, M. Wang, D. R. Couriel, U. Popat, P. Kebriaei, A. M. Alousi, P. Anderlini, R. C. Naeem, R. E. Champlin, S. A. Giralt, *Biol. Blood Marrow Transplant.* **2007**, *13*, 1066-1072.
- [74] K. L. Wu, B. Beverloo, H. M. Lokhorst, C. M. Segeren, B. van der Holt, M. M. Steijaert, P. H. Westveer, P. J. Poddighe, G. E. Verhoef, P. Sonneveld, G. Dutch-Belgian Haemato-Oncology Cooperative Study, G. Dutch Working Party on Cancer, Cytogenetics, *Br. J. Haematol.* **2007**, *136*, 615-623.
- [75] R. Itzykson, O. Kosmider, T. Cluzeau, V. Mansat-De Mas, F. Dreyfus, O. Beyne-Rauzy, B. Quesnel, N. Vey, V. Gelsi-Boyer, S. Raynaud, C. Preudhomme, L. Ades, P. Fenaux, M. Fontenay, M. Groupe Francophone des, *Leukemia* **2011**, *25*, 1147-1152.
- [76] J. R. Sawyer, *Cancer Genet.* **2011**, *204*, 3-12.
- [77] C. Seong, K. Delasalle, K. Hayes, D. Weber, M. Dimopoulos, J. Swankowski, Y. Huh, A. Glassman, R. Champlin, R. Alexanian, *Br. J. Haematol.* **1998**, *101*, 189-194.
- [78] C. Cesana, C. Klersy, L. Barbarano, A. M. Nosari, M. Crugnola, E. Pungolino, L. Gargantini, S. Granata, M. Valentini, E. Morra, *J Clin Oncol* **2002**, *20*, 1625-1634.
- [79] M. L. Smith, R. K. Hills, D. Grimwade, *Blood Rev.* **2011**, *25*, 39-51.
- [80] J. Ritterbach, W. Hiddemann, J. D. Beck, M. Schrappe, G. Janka-Schaub, W. D. Ludwig, J. Harbott, F. Lampert, *Leukemia* **1998**, *12*, 427-433.
- [81] F. Lampert, J. Harbott, A. Borkhardt, *Klin. Padiatr.* **2013**, *225 Suppl 1*, S30-33.
- [82] A. E. Rodriguez-Vicente, M. G. Diaz, J. M. Hernandez-Rivas, *Cancer Genet.* **2013**, *206*, 49-62.
- [83] R. Rosenquist, D. Cortese, S. Bhoi, L. Mansouri, R. Gunnarsson, *Leuk. Lymphoma* **2013**, *54*, 2351-2364.
- [84] A. T. Manning, J. T. Garvin, R. I. Shahbazi, N. Miller, R. E. McNeill, M. J. Kerin, *Eur. J. Surg. Oncol.* **2007**, *33*, 255-265.
- [85] G. W. Dewald, R. A. Kyle, G. A. Hicks, P. R. Greipp, *Blood* **1985**, *66*, 380-390.
- [86] D. Taberero, J. F. San Miguel, M. Garcia-Sanz, L. Najera, M. Garcia-Isidoro, J. A. Perez-Simon, M. Gonzalez, J. Wiegant, A. K. Raap, A. Orfao, *Am. J. Pathol.* **1996**, *149*, 153-161.
- [87] N. V. Smadja, C. Fruchart, F. Isnard, C. Louvet, J. L. Dutel, N. Cheron, M. J. Grange, M. Monconduit, C. Bastard, *Leukemia* **1998**, *12*, 960-969.
- [88] R. Fonseca, E. Blood, M. Rue, D. Harrington, M. M. Oken, R. A. Kyle, G. W. Dewald, B. Van Ness, S. A. Van Wier, K. J. Henderson, R. J. Bailey, P. R. Greipp, *Blood* **2003**, *101*, 4569-4575.
- [89] H. Avet-Loiseau, C. Godon, J. Y. Li, A. Daviet, M. P. Mellerin, P. Talmant, J. L. Harousseau, R. Bataille, *Genes Chromosomes Cancer* **1999**, *26*, 166-170.
- [90] J. R. Sawyer, J. L. Lukacs, E. L. Thomas, C. M. Swanson, L. S. Goosen, G. Sammartino, J. C. Gilliland, N. C. Munshi, G. Tricot, J. D. Shaughnessy, Jr., B. Barlogie, *Br. J. Haematol.* **2001**, *112*, 167-174.
- [91] G. J. Ahmann, S. M. Jalal, A. L. Juneau, E. R. Christensen, C. A. Hanson, G. W. Dewald, P. R. Greipp, *Cancer Genet. Cytogenet.* **1998**, *101*, 7-11.

- [92] J. G. Turner, D. C. Marchion, J. L. Dawson, M. F. Emmons, L. A. Hazlehurst, P. Washausen, D. M. Sullivan, *Cancer Res.* **2009**, *69*, 6899-6905.
- [93] T. Funasaka, R. W. Wong, *Cancer Metastasis Rev.* **2011**, *30*, 239-251.
- [94] J. D. Keene, S. A. Tenenbaum, *Mol. Cell* **2002**, *9*, 1161-1167.
- [95] J. D. Keene, *Nat. Rev. Genet.* **2007**, *8*, 533-543.
- [96] S. Assouline, B. Culjkovic, E. Cocolakis, C. Rousseau, N. Beslu, A. Amri, S. Caplan, B. Leber, D. C. Roy, W. H. Miller, Jr., K. L. Borden, *Blood* **2009**, *114*, 257-260.
- [97] N. Siddiqui, K. L. Borden, *Wiley Interdiscip. Rev. R.N.A.* **2012**, *3*, 13-25.
- [98] M. Fiegl, N. Zojer, H. Kaufmann, L. Mullauer, R. Schuster, H. Huber, J. Drach, *Cytometry* **1999**, *38*, 15-23.
- [99] H. F. Mark, *Cancer* **1998**, *83*, 839-843.
- [100] A. A. Sandberg, C. Turc-Carel, *Cancer* **1987**, *59*, 387-395.
- [101] C. Cordon-Cardo, *Mod. Pathol.* **2001**, *14*, 254-257.
- [102] B. B. Kaufmann, A. van Oudenaarden, *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2007**, *17*, 107-112.
- [103] A. R. Morris, N. Mukherjee, J. D. Keene, *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* **2010**, *2*, 162-180.
- [104] J. G. Gall, M. L. Pardue, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1969**, *63*, 378-383.
- [105] M. L. Pardue, J. G. Gall, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1969**, *64*, 600-604.
- [106] M. Buongiorno-Nardelli, F. Amaldi, *Nature* **1970**, *225*, 946-948.
- [107] J. G. Gall, *Methods* **2016**, *98*, 4-9.
- [108] J. M. Levsky, R. H. Singer, *J. Cell. Sci.* **2003**, *116*, 2833-2838.
- [109] P. R. Langer-Safer, M. Levine, D. C. Ward, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1982**, *79*, 4381-4385.
- [110] L. Manuelidis, P. R. Langer-Safer, D. C. Ward, *J. Cell. Biol.* **1982**, *95*, 619-625.
- [111] P. W. Rigby, M. Dieckmann, C. Rhodes, P. Berg, *J. Mol. Biol.* **1977**, *113*, 237-251.
- [112] A. H. Hopman, J. Wiegant, A. K. Raap, J. E. Landegent, M. van der Ploeg, P. van Duijn, *Histochemistry* **1986**, *85*, 1-4.
- [113] P. M. Nederlof, D. Robinson, R. Abuknesha, J. Wiegant, A. H. Hopman, H. J. Tanke, A. K. Raap, *Cytometry* **1989**, *10*, 20-27.
- [114] R. Eils, S. Dietzel, E. Bertin, E. Schrock, M. R. Speicher, T. Ried, M. Robert-Nicoud, C. Cremer, T. Cremer, *J. Cell Biol.* **1996**, *135*, 1427-1440.
- [115] E. Schrock, S. du Manoir, T. Veldman, B. Schoell, J. Wienberg, M. A. Ferguson-Smith, Y. Ning, D. H. Ledbetter, I. Bar-Am, D. Soenksen, Y. Garini, T. Ried, *Science* **1996**, *273*, 494-497.
- [116] P. Lichter, T. Cremer, J. Borden, L. Manuelidis, D. C. Ward, *Hum. Genet.* **1988**, *80*, 224-234.
- [117] P. M. Nederlof, S. van der Flier, J. Wiegant, A. K. Raap, H. J. Tanke, J. S. Ploem, M. van der Ploeg, *Cytometry* **1990**, *11*, 126-131.
- [118] P. M. Nederlof, S. van der Flier, J. Vrolijk, H. J. Tanke, A. K. Raap, *Cytometry* **1992**, *13*, 839-845.
- [119] N. P. Carter, *Cytometry* **1994**, *18*, 2-10.
- [120] N. Rives, S. Wust, B. David, V. Duchesne, G. Joly, B. Mace, *J. Assist. Reprod. Genet.* **1999**, *16*, 46-51.
- [121] J. C. Barber, V. K. Maloney, S. Huang, D. J. Bunyan, L. Cresswell, E. Kinning, A. Benson, T. Cheetham, J. Wyllie, S. A. Lynch, S. Zwolinski, L. Prescott, Y. Crow, R. Morgan, E. Hobson, *Eur. J. Hum. Genet.* **2008**, *16*, 18-27.
- [122] S. A. Shurtleff, A. Buijs, F. G. Behm, J. E. Rubnitz, S. C. Raimondi, M. L. Hancock, G. C. Chan, C. H. Pui, G. Grosveld, J. R. Downing, *Leukemia* **1995**, *9*, 1985-1989.
- [123] C. C. Lin, Y. C. Li, P. P. Liu, L. J. Hsieh, Y. M. Cheng, R. H. Teng, S. L. Shi, F. J. Tsai, *Cytogenet. Genome Res.* **2007**, *119*, 291-296.
- [124] B. Mechoso, A. Vaglio, A. Quadrelli, H. F. Mark, X. L. Huang, A. Milunsky, R. Quadrelli, *Fetal Diagn. Ther.* **2007**, *22*, 249-253.
- [125] S. Savola, F. Nardi, K. Scotlandi, P. Picci, S. Knuutila, *Cytogenet. Genome Res.* **2007**, *119*, 21-26.
- [126] R. H. Singer, D. C. Ward, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1982**, *79*, 7331-7335.

- [127] R. W. Dirks, R. P. van Gijlswijk, R. H. Tullis, A. B. Smit, J. van Minnen, M. van der Ploeg, A. K. Raap, *J. Histochem. Cytochem.* **1990**, *38*, 467-473.
- [128] R. W. Dirks, R. P. Van Gijlswijk, M. A. Vooijs, A. B. Smit, J. Bogerd, J. van Minnen, A. K. Raap, M. Van der Ploeg, *Exp. Cell Res.* **1991**, *194*, 310-315.
- [129] A. M. Femino, F. S. Fay, K. Fogarty, R. H. Singer, *Science* **1998**, *280*, 585-590.
- [130] A. Raj, S. Tyagi, *Methods Enzymol.* **2010**, *472*, 365-386.
- [131] J. B. Randolph, A. S. Waggoner, *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 2923-2929.
- [132] R. Nunez, *Curr. Issues Mol. Biol.* **2001**, *3*, 67-70.
- [133] R. Nunez, *Curr. Issues Mol. Biol.* **2001**, *3*, 39-45.
- [134] R. Nunez, *Curr. Issues Mol. Biol.* **2001**, *3*, 37-38.
- [135] G. H. Williams, K. Stoeber, *J. Pathol.* **2012**, *226*, 352-364.
- [136] M. Brown, C. Wittwer, *Clin. Chem.* **2000**, *46*, 1221-1229.
- [137] H. van Dekken, G. J. Arkesteijn, J. W. Visser, J. G. Bauman, *Cytometry* **1990**, *11*, 153-164.
- [138] G. J. Arkesteijn, S. L. Erpelinck, A. C. Martens, A. Hagenbeek, *Cytometry* **1995**, *19*, 353-360.
- [139] N. Rufer, W. Dragowska, G. Thornbury, E. Roosnek, P. M. Lansdorp, *Nat. Biotechnol.* **1998**, *16*, 743-747.
- [140] J. Brind'Amour, P. M. Lansdorp, *Nat. Methods* **2011**, *8*, 484-486.
- [141] R. Arrigucci, Y. Bushkin, F. Radford, K. Lakehal, P. Vir, R. Pine, D. Martin, J. Sugarman, Y. Zhao, G. S. Yap, A. A. Lardizabal, S. Tyagi, M. L. Gennaro, *Nat. Protoc.* **2017**, *12*, 1245-1260.
- [142] H. Yu, J. Chao, D. Patek, R. Mujumdar, S. Mujumdar, A. S. Waggoner, *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 3226-3232.
- [143] J. B. Lawrence, R. H. Singer, *Cell* **1986**, *45*, 407-415.
- [144] G. Wallner, R. Amann, W. Beisker, *Cytometry* **1993**, *14*, 136-143.
- [145] L. Zhang, W. Zhou, V. E. Velculescu, S. E. Kern, R. H. Hruban, S. R. Hamilton, B. Vogelstein, K. W. Kinzler, *Science* **1997**, *276*, 1268-1272.
- [146] S. Quinodoz, M. Guttman, *Trends Cell Biol.* **2014**, *24*, 651-663.
- [147] M. N. Cabili, C. Trapnell, L. Goff, M. Koziol, B. Tazon-Vega, A. Regev, J. L. Rinn, *Genes Dev.* **2011**, *25*, 1915-1927.
- [148] D. Kelley, J. Rinn, *Genome Biol.* **2012**, *13*, R107.
- [149] Y. Wei, B. Niu, *Dis. Markers* **2015**, *2015*, 164635.
- [150] W. J. Cao, H. L. Wu, B. S. He, Y. S. Zhang, Z. Y. Zhang, *World J. Gastroenterol.* **2013**, *19*, 3658-3664.
- [151] J. Li, X. Wang, J. Tang, R. Jiang, W. Zhang, J. Ji, B. Sun, *Cell Physiol. Biochem.* **2015**, *37*, 687-696.
- [152] Z. Yang, R. Wang, T. Zhang, X. Dong, *Int. J. Clin. Exp. Med.* **2015**, *8*, 19954-19968.
- [153] G. Botti, L. Marra, M. G. Malzone, A. Anniciello, C. Botti, R. Franco, M. Cantile, *Curr. Drug Targets* **2017**, *18*, 27-34.
- [154] M. Ouimet, S. Drouin, M. Lajoie, M. Caron, P. St-Onge, R. Gioia, C. Richer, D. Sinnett, *Oncotarget* **2017**, *8*, 7477-7488.
- [155] K. W. Vance, C. P. Ponting, *Trends Genet.* **2014**, *30*, 348-355.
- [156] K. W. Vance, S. N. Sansom, S. Lee, V. Chalei, L. Kong, S. E. Cooper, P. L. Oliver, C. P. Ponting, *EMBO J.* **2014**, *33*, 296-311.
- [157] J. Chen, L. Hu, J. Wang, F. Zhang, J. Chen, G. Xu, Y. Wang, Q. Pan, *Pathol. Oncol. Res.* **2017**, *23*, 265-270.
- [158] M. M. Kumar, R. Goyal, *Curr. Top. Med. Chem.* **2017**, *17*, 1750-1757.
- [159] T. Liao, N. Qu, R. L. Shi, K. Guo, B. Ma, Y. M. Cao, J. Xiang, Z. W. Lu, Y. X. Zhu, D. S. Li, Q. H. Ji, *Oncotarget* **2017**, *8*, 238-247.
- [160] Q. Liu, X. Guo, S. Que, X. Yang, H. Fan, M. Liu, X. Li, H. Tang, *Oncotarget* **2017**, *8*, 43768-43781.
- [161] W. Ni, Y. Zhang, Z. Zhan, F. Ye, Y. Liang, J. Huang, K. Chen, L. Chen, Y. Ding, *J. Hematol. Oncol.* **2017**, *10*, 91.

- [162] M. D. Xu, Y. Wang, W. Weng, P. Wei, P. Qi, Q. Zhang, C. Tan, S. J. Ni, L. Dong, Y. Yang, W. Lin, Q. Xu, D. Huang, Z. Huang, Y. Ma, W. Zhang, W. Sheng, X. Du, *Clin. Cancer Res.* **2017**, *23*, 2071-2080.
- [163] M. Bienko, N. Crosetto, L. Teytelman, S. Klemm, S. Itzkovitz, A. van Oudenaarden, *Nat. Methods* **2013**, *10*, 122-124.
- [164] W. Galbraith, M. C. Wagner, J. Chao, M. Abaza, L. A. Ernst, M. A. Nederlof, R. J. Hartsock, D. L. Taylor, A. S. Waggoner, *Cytometry* **1991**, *12*, 579-596.
- [165] A. N. Player, L. P. Shen, D. Kenny, V. P. Antao, J. A. Kolberg, *J. Histochem. Cytochem.* **2001**, *49*, 603-612.
- [166] *Vol. 2018*, **2018**.
- [167] H. M. Choi, V. A. Beck, N. A. Pierce, *A.C.S. Nano* **2014**, *8*, 4284-4294.
- [168] I. Gaspar, A. Ephrussi, *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* **2015**, *4*, 135-150.
- [169] S. Tyagi, F. R. Kramer, *F1000 Med. Rep.* **2012**, *4*, 10.
- [170] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2001**, *40*, 2004-2021.
- [171] R. Huisgen, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1963**, *2*, 565-598.
- [172] K. V. Gothelf, K. A. Jorgensen, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 863-910.
- [173] S. Brase, C. Gil, K. Knepper, V. Zimmermann, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2005**, *44*, 5188-5240.
- [174] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057-3064.
- [175] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2002**, *41*, 2596-2599.
- [176] F. Fazio, M. C. Bryan, O. Blixt, J. C. Paulson, C. H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14397-14402.
- [177] V. O. Rodionov, V. V. Fokin, M. G. Finn, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2005**, *44*, 2210-2215.
- [178] L. V. Lee, M. L. Mitchell, S. J. Huang, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, C. H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9588-9589.
- [179] P. Wu, A. K. Feldman, A. K. Nugent, C. J. Hawker, A. Scheel, B. Voit, J. Pyun, J. M. Frechet, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2004**, *43*, 3928-3932.
- [180] M. S. Taylor, D. N. Zalatan, A. M. Lerchner, E. N. Jacobsen, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 1313-1317.
- [181] K. Sivakumar, F. Xie, B. M. Cash, S. Long, H. N. Barnhill, Q. Wang, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 4603-4606.
- [182] B. Helms, J. L. Mynar, C. J. Hawker, J. M. Frechet, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15020-15021.
- [183] E. H. Ryu, Y. Zhao, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 1035-1037.
- [184] B. H. Kuijpers, S. Groothuys, A. B. Keereweer, P. J. Quaedflieg, R. H. Blaauw, F. L. van Delft, F. P. Rutjes, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 3123-3126.
- [185] A. E. Speers, B. F. Cravatt, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 535-546.
- [186] V. Aucagne, D. A. Leigh, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4505-4507.
- [187] A. J. Link, D. A. Tirrell, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11164-11165.
- [188] Q. Wang, T. R. Chan, R. Hilgraf, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, M. G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3192-3193.
- [189] K. Gutsmedl, D. Fazio, T. Carell, *Chemistry* **2010**, *16*, 6877-6883.
- [190] C. J. Burrows, J. G. Muller, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1109-1152.
- [191] Y. Jin, J. A. Cowan, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 8408-8415.
- [192] S. Thyagarajan, N. N. Murthy, A. A. Narducci Sarjeant, K. D. Karlin, S. E. Rokita, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 7003-7008.
- [193] T. R. Chan, R. Hilgraf, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2853-2855.
- [194] J. Gierlich, K. Gutsmedl, P. M. Gramlich, A. Schmidt, G. A. Burley, T. Carell, *Chemistry* **2007**, *13*, 9486-9494.
- [195] G. A. Burley, J. Gierlich, M. R. Mofid, H. Nir, S. Tal, Y. Eichen, T. Carell, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 1398-1399.

- [196] S. E. Lee, A. Sidorov, T. Goullain, N. Mignet, S. J. Thorpe, J. A. Brazier, M. J. Dickman, D. P. Hornby, J. A. Grasby, D. M. Williams, *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 1565-1573.
- [197] T. Tasara, B. Angerer, M. Damond, H. Winter, S. Dorhofer, U. Hubscher, M. Amacker, *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 2636-2646.
- [198] G. M. Cooper, *The Cell: A Molecular Approach., Vol. 2*, **2000**.
- [199] K. Collins, T. Jacks, N. P. Pavletich, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94*, 2776-2778.
- [200] K. J., *Taschenatlas Biochemie des Menschen, Vol. 4*, Thieme Verlag **2009**.
- [201] N. D. Agnish, D. M. Kochhar, *J. Embryol. Exp. Morphol.* **1976**, *36*, 623-638.
- [202] Z. Guo, R. Zhang, J. Li, G. Xu, *Cardiovasc. Diabetol.* **2012**, *11*, 94.
- [203] M. Dorsett, B. Westlund, T. Schedl, *Genetics* **2009**, *183*, 233-247.
- [204] A. B. Neef, N. W. Luedtke, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108*, 20404-20409.
- [205] C. L. Kaiser, A. J. Kamien, P. A. Shah, B. J. Chapman, D. A. Cotanche, *Laryngoscope* **2009**, *119*, 1770-1775.
- [206] D. J. Ferullo, D. L. Cooper, H. R. Moore, S. T. Lovett, *Methods* **2009**, *48*, 8-13.
- [207] M. P. Schimak, M. Kleiner, S. Wetzell, M. Liebeke, N. Dubilier, B. M. Fuchs, *Appl. Environ. Microbiol.* **2016**, *82*, 62-70.
- [208] S. Hesse, A. Manetto, V. Cassinelli, J. Fuchs, L. Ma, N. Raddaoui, A. Houben, *Chromosome Res.* **2016**, *24*, 299-307.
- [209] R. K. Saiki, S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich, N. Arnheim, *Science* **1985**, *230*, 1350-1354.
- [210] W. Bloch, *Biochemistry* **1991**, *30*, 2735-2747.
- [211] R. A. Gibbs, *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 1202-1214.
- [212] A. Raj, A. van Oudenaarden, *Cell* **2008**, *135*, 216-226.
- [213] A. Eldar, M. B. Elowitz, *Nature* **2010**, *467*, 167-173.
- [214] S. Itzkovitz, A. van Oudenaarden, *Nat. Methods* **2011**, *8*, S12-19.
- [215] S. Semrau, N. Crosetto, M. Bienko, M. Boni, P. Bernasconi, R. Chiarle, A. van Oudenaarden, *Cell Rep.* **2014**, *6*, 18-23.
- [216] T. Muramoto, D. Cannon, M. Gierlinski, A. Corrigan, G. J. Barton, J. R. Chubb, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109*, 7350-7355.
- [217] V. Antolovic, A. Miermont, A. M. Corrigan, J. R. Chubb, *Curr. Biol.* **2017**, *27*, 1811-1817 e1813.
- [218] A. Kohler, E. Hurt, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8*, 761-773.
- [219] B. R. Cullen, *J. Cell Sci.* **2003**, *116*, 587-597.
- [220] B. R. Cullen, *Trends Biochem. Sci.* **2003**, *28*, 419-424.
- [221] C. N. Cole, J. J. Scarcelli, *Curr. Opin. Cell. Biol.* **2006**, *18*, 299-306.