Darstellung von Konjugaten aus hexahistidinmodifizierter Bakterieller Alkalischer Phosphatase und NTA-funktionalisierten Oligonukleotiden

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Chemie
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Sven Feyerabend

Hamburg 1999

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie des Fachbereichs Chemie der Universität Hamburg durchgeführt.

Ich danke Herrn Professor Dr. Hubert Köster für die Überlassung des interessanten Themas, für seine stetige Diskussionsbereitschaft und seine wertvollen Anregungen.

Gutachter: Prof. Dr. H. Köster

Mitgutachter: Prof. Dr. J. Voß

Datum der letzten Prüfung: 18.5.1999

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung **1**

2. Problemstellung **9**

3. Bakterielle Alkalische Phosphatase **11**
3.1 BAP als Reporterenzym 11
3.2 Eigenschaften der Bakteriellen Alkalischen Phosphatase 11
3.3 Isolierung des Gens der alkalischen Phosphatase aus E. coli 12
3.4 Klonierung von phoA in einen Expressionsvektor 14
3.5 Expression von BAP in E. coli 16
3.6 Einfügung eines Hexahistidinrestes in BAP 18
3.7 Expression von hexahistidinmodifizierter BAP in E. coli 25
3.8 Qualitative Überprüfung der enzymatischen Aktivität von BAP und BAPHis6 im Zellysat 26
3.9 Isolierung von BAPHis6 28
3.9.1 Anbindung an Ni-NTA-Harz 28
3.9.2 Waschen und Elution 29
3.10 Qualitative Analyse der enzymatischen Aktivität von durch IMAC aufgereinigtem BAPHis6 31
3.11 Quantifizierung von BAPHis6 32
3.12 Bestimmung der spezifischen Aktivität von BAPHis6 33
3.13 Untersuchung von BAPHis6 mit MALDI-TOF MS 34

4. Strategien zur Funktionalisierung von Oligonukleotiden mit NTA **37**
4.1 Cystein-N,N-diessigsäure (CDA) 38
4.2 Serin-N,N-diessigsäure (SDA) 40
4.3 Lysin-N^{α},N^{α}-diessigsäure (LDA) 43
4.3.1 Synthese von LDA 43
4.3.2 Charakterisierung von LDA und Z-LDA 45

5. Markierung von Oligonukleotiden mit LDA **54**
5.1 Verknüpfung von LDA mit Oligonukleotiden durch heterobifunktionelle Tritylreagenzien 54
5.1.1 Synthese der Tritylester 57
5.1.2 Umsetzung von Tritylestercarbinolen mit LDA 58
5.1.3 Retritylierung von USP 59
5.1.4 Umsetzung von retrityliertem USP mit 1,6-Diaminohexan 63
5.1.5 Umsetzung von retrityliertem USP mit LDA 63
5.2 Versuche zur Verknüpfung von LDA mit aminofunktionalisierten Oligonukleotiden 68
5.2.1 Versuche mit EGS 69
5.2.2 Versuche mit DSS 70
5.3 Verknüpfung von LDA mit phosphorylierten Oligonukleotiden 70
5.3.1 Versuche mit Imidazol 74
5.3.2 Versuche mit HOBT 76
5.3.3 Versuche mit immobilisiertem USP 77

6. Versuche zur Darstellung von Konjugaten mit BAPHis6 **79**
6.1 Immobilisierung von BAPHis6 an mit NTA-funktionalisierten Oligonukleotiden beladenem CPG 79
6.2 Versuche zur Darstellung von Konjugaten aus BAPHis6 und Oligonukleotiden in Lösung 80
6.3 Versuche zur indirekten Markierung von DNA mit BAPHis6 im Southern-Blot 81
6.4 Versuche zur Immobilisierung von LDA mit DITC an Silicon Wafers 81

7. Synthesen von 5´-histidinmodifizierten Oligonukleotiden **83**
7.1 Synthesen mit Pentafluorophenylester 85
7.2 Synthesen mit PyBOP 85
7.3 Aufreinigung der modifizierten Oligonukleotide an Ni-NTA-Harz 86
7.4 Syntheseversuche mit Hexahistidin 86

8. Diskussion **87**

9. Zusammenfassung/Summary **91**

10. Experimenteller Teil **94**
10.1 Chemikalien, Geräte und Methoden 94
10.1.1 Quantifizierung und Reinheitsbestimmung von DNA 96
10.1.2 Massenspektrometrie von Phosphatasen und Oligonukleotiden 96
10.2. Molekularbiologischer Teil 97
10.3 Organisch-chemischer Teil 107

11. Literaturverzeichnis **117**

12. Anhang **124**
12.1 Nukleinsäuresequenz von phoAHis6 und Aminosäuresequenz von BAPHis6 124
12.2 Expressionsvektor p7BAP 127
12.3 Expressionsvektor pBAPHIS6 128
12.4 Gefahrenmerkmale von verwendeten Gefahrstoffen und Sicherheitsratschläge 129

Abkürzungsverzeichnis

A	2´-Desoxyadenosin
amp	Ampicillin (D[-]-α-Aminobenzylpenicillin)
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5´-triphosphat
BAP	Bakterielle Alkalische Phosphatase
BAPHis6	rekombinante BAP mit His6-tail
BCA	Bicinchoninsäure
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin, Rinderserumalbumin
C	2´-Desoxycytidin
Ci	Curie, Einheit der Radioaktivität
CIP	Calf Intestine Phosphatase, alkalische Phosphatase aus Kälberdarm
CPG	Controlled Pore Glass
Da	Dalton, Einheit des Molekulargewichts
dATP	2´-Desoxyadenosin-5´-triphosphat
DCA	Dichloressigsäure
DCC	N,N´-Dicyclohexylcarbodiimid
dCTP	2´-Desoxycytidin-5´-triphosphat
ddNTP	2´,3´-Didesoxyribonukleosid-5´-triphosphat
dGTP	2´-Desoxyguanosin-5´-triphosphat
DIG	Digoxigenin
DIPEA	N,N-Diisopropylethylamin
DITC	1,4-Phenylendiisothiocyanat
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMT	Dimethoxytrityl (4,4´-Dimethoxytriphenylmethyl)
dNTP	2´-Desoxyribonukleosid-5´-triphosphat
DSS	Disuccinimidylsuberat
dTTP	2´-Desoxythymidin-5´-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDC	N-Ethyl-N´-(3-dimethylamino-propyl)-carbodiimid Hydrochlorid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGS	Ethylenglycol-bis(succinsäure-N-hydroxysuccinimidester)
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
G	2´-Desoxyguanosin
His	L-Histidin
HOBT	1-Hydroxybenzotriazol Hydrat
3-HPA	3-Hydroxypicolinsäure
IMAC	Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactosid
kbp	Kilobasenpaare
LB Medium	Luria-Bertani Medium
LDA	Lysine-N^{α},N^{α}-diacetic acid

Lys	Lysin
MALDI-TOF MS	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization - Time Of Flight Massenspektrometrie
MWCO	Molecular Weight cut-off, Molekulargewichtausschlußgrenze
MOPS	3-(N-Morpholin)-propansulfonsäure
NBT	4-Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NCO	Nucleotide cut-off, Nukleotidausschlußgrenze
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD	Optische Dichte, Extinktion bei einer Schichtdicke von 1 cm
OPC	Oligonucleotide Purification Cartridges
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
Pfp	Pentafluorophenyl
phoA	Gen der Alkalischen Phosphatase von *E. coli*
PNK	Polynukleotidkinase
pNP	p-Nitrophenyl
pNPP	p-Nitrophenylphosphat
PyBOP®	Benzotriazol-1-yl-oxy-tris-pyrrolidino-phosphonium-hexafluorophosphat
RP	Reversed Phase, Umkehrphase
RT	Raumtemperatur, 21 °C
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	2´-Desoxythymidin
TAE	Tris-HCl-Acetat-EDTA Puffer
TBE	Tris-HCl-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-HCl-EDTA-Puffer
TEA	Triethylammoniumacetatpuffer
TEMED	N,N,N´,N´-Tetramethylethylendiamin
Tris-HCl	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan Hydrochlorid
U	Unit, Einheit der Enzymaktivität
USP	Universal Sequencing Primer
Z	Benzyloxycarbonyl

Anmerkungen:
Alle in dieser Arbeit angegebenen Anteile von in Flüssigkeiten gelösten Feststoffen sind in Gewichtsprozent angegeben, alle Anteile von Flüssigkeitsmischungen in Volumenprozent.
Ist bei einer Lösung kein Lösungsmittel angegeben, so war das verwendete Lösungsmittel Wasser.

1. Einleitung

Konjugate aus Oligonukleotiden und Enzymen sind von großer Bedeutung als Sonden bei der nichtradioaktiven Detektion von Desoxyribonukleinsäuren in der Molekularbiologie. Sie finden vor allem Verwendung zum Nachweis spezifischer DNA-Sequenzen im Southern-Blotting und DNA Fingerprinting [10] sowie in der DNA-Sequenzierung [4,27,29].

Die Autoradiographie mit Isotopen wie ^{35}S und ^{32}P hat gegenüber der enzymatischen Detektion von DNA eine Reihe von Nachteilen. Zum einen macht die potentielle Gefährlichkeit der radioaktiven Strahlung beim Umgang mit den entsprechenden Isotopen gewisse Sicherheitsvorkehrungen notwendig, zum anderen können manche Isotope aufgrund ihrer geringen Halbwertzeit (z. B. 14 d im Fall von ^{32}P) nicht über längere Zeit aufbewahrt werden. Die erforderlichen Detektionszeiten bei der enzymatischen Methode sind überdies geringer als bei der radioaktiven Methode. Im Vergleich mit radioaktiv oder fluoreszensmarkierten Sonden besitzen enzymatisch markierte Sonden zudem eine höhere Sensitivität.

Bei der enzymatischen Markierung von DNA werden vor allem drei Enzyme verwendet, alkalische Phosphatase (AP) aus Kälberdarm (Calf Intestine Phosphatase, CIP), β-Galactosidase (β-Gal) aus *E. coli* und Meerrettichperoxidase (Horseradish Peroxidase, HRP), wobei die Empfindlichkeit von Markierungen mit HRP um das 5-40fache geringer ist als bei solchen mit CIP [1,2]. AP kann aufgrund seiner geringeren Hitzeempfindlichkeit bei höheren Hybridisierungstemperaturen eingesetzt werden als HRP [31]. Beide Enzyme können auch gemeinsam in einem Assay verwendet werden, wobei sich durch die zweifache enzymatische Amplifikation eine Erhöhung der Sensitivität um das 30fache ergibt [23]. Ebenfalls von Interesse für die nichtradioaktive Detektion ist das Enzym Luciferase, welches jedoch aufgrund seiner chemischen Sensitivität schwer in Bioassays zu implementieren ist [4]. Ein neuerer Assay verwendet daher ein DNA-Fragment als Markierung, das für Luciferase kodiert und während der Detektion exprimiert wird [20].

Die alkalische Phosphatase (EC 3.1.3.1) ist eine Hydrolase, welche die Hydrolyse von Esterbindungen in Phosphomonoestern katalysiert [54,66]. Das Enzym ist relativ unspezifisch und wird in der Molekularbiologie zur Dephosphorylierung von Nukleinsäuretermini sowie bei der nichtradioaktiven Detektion von Proteinen und Nukleinsäuren verwendet. Alkalische Phosphatase kann, in Abhängigkeit vom Substrat, durch Dephosphorylierungen bewirkte Farb- und Chemilumineszensreaktionen katalysieren. Bei einer Farbreaktion können lösliche Farbstoffe (z. B. mit pNPP als Substrat), unlösliche Farbstoffe (mit BCIP/NBT) oder Fluoreszensfarbstoffe (mit 4-Methylumbelliferonphosphat, MUP) entstehen. Bei Verwendung des fluorogenischen Substrates AttoPhos (JBL Scientific) können durch Kapillarelektrophorese mit Laser-induzierter Fluoreszensdetektion (CE-LIF) attomolare Konzentrationen von AP nachgewiesen werden [3]. Lumineszensreaktionen werden üblicherweise mittels eines lichtempfindlichen Films detektiert. Als Substrate dienen hierbei vor allem Dioxetanderivate [4], wie z. B. CDP-Star (Tropix Inc., Bedford, USA) oder 3-(2´-Spiroadamantan)-4-methoxy-4-(3´´-phosphoryloxy)phenyl-1,2-dioxetan (AMPPD). Der enzymatische Nachweis mit diesen Substraten ist bis zu 150fach empfindlicher als die Autoradiographie mit ^{32}P, bei einem Zehntel der erforderlichen Zeit [1]. Genomische Southern-Analysen mit AP-Oligonukleotid-Sonden und AMPPD als Substrat ergaben bereits nach 4 h Signale, welche mit ^{32}P-markierten Sonden

erst nach sieben Tagen erhalten wurden [21]. Bei Verwendung einer Charge-Coupled Device (CCD) Kamera liegt die Detektionsgrenze für DNA-Sequenzierungsfragmente im Subattomolbereich [26].
Die Chemilumineszensdetektion mit AP und AMPPD ist geeignet zur Anwendung in der DNA-Sequenzierung und hat verschiedene Vorteile gegenüber anderen Detektionsmethoden [27]. Wird bei einer DNA-Sequenzierung eine enzymatische Markierung zur Sichtbarmachung der Sequenzbanden verwendet, so muß die DNA anders als bei der Verwendung von radioaktiv oder fluoreszensmarkierten Primern vor der Detektion erst auf eine Membran geblottet werden. Dieser Schritt ist bei der Multiplex-Sequenzierung von DNA [28] ohnehin notwendig, weshalb die enzymatische Detektion sich mit dieser Art der Sequenzierung ergänzt. Das Blotting erfolgt bei der Multiplex-Sequenzierung üblicherweise mittels direkter Transfer-Elektrophorese [29], was die Lesbarkeit der Sequenz erhöht.
Bei der Uniplex-Sequenzierung werden normalerweise entsprechend funktionalisierte Primer in die Sequenzierungsreaktion eingesetzt, so daß nach dem Blotting eine indirekte Markierung der DNA mit Enzym möglich ist.

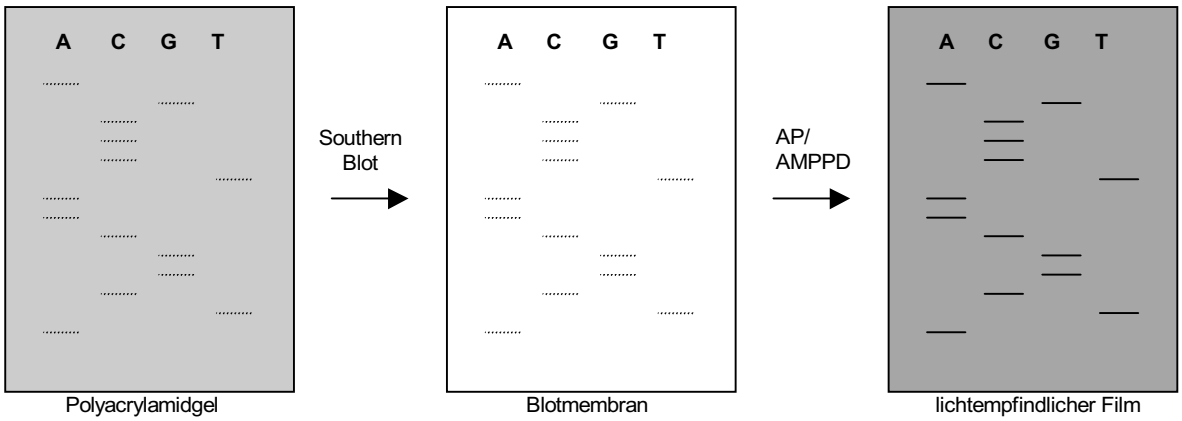


Abbildung 1. Schema der Uniplex-DNA-Sequenzierung mittels Chemilumineszensdetektion. Nach der Gelelektrophorese werden die Banden aus dem Sequenzgel auf eine Membran übertragen und dort immobilisiert. Die Sichtbarmachung der Banden erfolgt durch eine Chemilumineszensreaktion, welche von AP katalysiert wird.

Bei der Multiplex-Sequenzierung werden demgegenüber Oligonukleotid-Enzym-Konjugate als Sonden zur Detektion eingesetzt.
Grundsätzlich kann eine Sonde zur DNA-Detektion ein einzelsträngiges synthetisches Oligonukleotid oder ein doppelsträngiges geklontes DNA-Fragment enthalten. Geklonte Fragmente können aufgrund ihrer Größe sehr viele Markierungen aufweisen. Einzelsträngige Oligonukleotide besitzen normalerweise eine einzige Markierung, welche das Hybridisierungvermögen der DNA im allgemeinen nicht oder nur geringfügig beeinträchtigt [1,31]. Der Vorteil der einzelsträngigen Sonden besteht bei enzymatischen Markierungen darin, daß die Hybridisierungsbedingungen milder gewählt werden können als bei doppelsträngigen Sonden. AP-Oligonukleotid-Konjugate haben als Sonden in der forensischen DNA-Analytik eine vergleichbare Empfindlichkeit wie ^{32}P-markierte, geklonte Sonden [19].

Enzym und Oligonukleotid einer Sonde können direkt oder indirekt miteinander verknüpft werden.
Bei der direkten Markierung werden DNA und Protein mittels homo- oder heterobifunktionalen Linkern kovalent miteinander verbunden. Eine Methode ist beispielsweise die Verknüpfung von 5´-thiolierten Oligonukleotiden mit AP durch 6-Maleimidohexansäuresuccinimidester [2]. Die dabei erhaltenen Konjugate sind in Sandwich-Hybridisierungsexperimenten von vergleichbarer Sensitivität wie ^{32}P-markierte Sonden [5]. Umgekehrt kann auch ein 3´-aminoalkyliertes Oligonukleotid mit Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexan-1-carboxylat umgesetzt und dann mit einer thiolierten AP zur Reaktion gebracht werden. Dieses Konjugat eignet sich zur Detektion von Punktmutationen [6]. Bei einem anderen Verfahren wird die AP zunächst bromacetyliert und anschließend mit 3´-thioliertem Oligonukleotid umgesetzt [7]. Das entstandene Konjugat besitzt bei der Diagnose von enterotoxigenischen *E. coli* eine vergleichbare Empfindlichkeit wie ^{32}P-markierte Sonden. Bei der am häufigsten verwendeten Verknüpfungsmethode wird ein Oligonukleotid, in welches eine aminofunktionalisierte Base eingebaut wurde, zuerst mit Disuccinimidylsuberat (DSS) und dann mit AP umgesetzt [8,9], wobei das Enzym seine volle Aktivität behält [31]. Die dadurch erhaltenen Konjugate besitzen eine Haltbarkeit von bis zu zwei Jahren [10], bei einer 20-80fachen Sensitivität wie vergleichbare ^{32}P-markierte Sonden [1]. Eine andere Methode, welche zu Konjugaten mit vergleichbarer Sensitivität führt, verknüpft 5´-aminylierte Oligonukleotiden mit AP durch Ethylenglycol-bis(succinsäure-N-hydroxysuccinimidester) (EGS) [11]. Fertige Konjugate von kovalent miteinander verknüpften Oligonukleotiden und AP sind heutzutage kommerziell erhältlich, haben jedoch z. T. eine begrenzte Qualität [1]. Fertigkits für die direkte Markierung sind ebenfalls im Handel (ACES Labeling Kit, Life Technologies GmbH).
Zwar wird bei der direkten Markierung das vollständige Konjugat in die Hybridisierungsreaktion eingesetzt, jedoch ist die AP stabil genug, um die Bedingungen bei der Hybridisierung von Oligonukleotiden an geblottete DNA ohne relevante Verringerung ihrer spezifischen Aktivität zu überstehen [1].

Bei der indirekten Markierung sind Oligonukleotid und Enzym mit Gruppen modifiziert, welche zueinander affin sind. Üblicherweise wird das Enzym dabei erst an das Oligonukleotid gebunden, nachdem dieses hybridisiert wurde. Bekannte Beispiele sind die Systeme Biotin/Streptavidin und Digoxigenin (DIG)/Antidigoxigenin (Anti-DIG) (Abb. 2).

Abbildung 2. a) Konjugat aus 5´-biotinyliertem Oligonukleotid, Streptavidin und biotinylierter AP. b) Konjugat aus 5´-digoxigeniertem Oligonukleotid und an Anti-Digoxigenin gebundener AP.

Biotin besitzt eine sehr große Affinität zum Protein Streptavidin. Da Streptavidin vier Biotin-Bindungsstellen besitzt, kann eine biotinylierte AP über Streptavidin mit einem biotinylierten Oligonukleotid verknüpft werden [13]. Das Oligonukleotid kann auch direkt kovalent an Streptavidin gebunden sein [14]. Ebenso kann ein Protein eine Biotin-bindende Streptavidin-Untereinheit als Fusion Tail aufweisen [15], anstatt über Biotin mit Streptavidin markiert zu sein. Ein mit DIG markiertes Oligonukleotid kann ein Konjugat mit AP bilden, welche mit einem DIG-Antikörper verknüpft ist [16]. Antikörper können mit AP chemisch über Linker verknüpft werden. Es ist ebenfalls möglich, Fusionsproteine aus Antikörpern und AP darzustellen [17].
Ein Problem bei der indirekten Markierung ist der verhältnismäßig hohe Hintergrund, der sich durch unspezifische Wechselwirkungen des funktionalisierten Enzymes mit der Blotmembran ergibt. Tatsächlich sind Sonden mit direkt markierten Oligonukleotiden sensitiver als Sonden, bei denen das Oligonukleotid indirekt mit AP markiert ist [1,18]. Zudem sind bei der indirekten Markierung zusätzliche Wasch- und Inkubationsschritte notwendig, weshalb die Detektion mit direkt markierten Sonden schneller ist als mit indirekt markierten.
Der Vorteil der indirekten Markierung besteht in der vielfältigen Kombinationsmöglichkeit der verschiedenen, größtenteils kommerziell erhältlichen funktionalisierten Oligonukleotide und Enzyme. Außerdem ist die indirekte Markierung zur Anwendung in bestimmten Verfahren geeigneter, z. B. bei der DNA-Sequenzierung mittels Multiplex-Markierung [22] oder bei der schnellen Detektion von PCR-Produkten [25].
Sowohl die direkte als auch die indirekte Markierung mit AP sind bei der DNA-Sequenzierung der Markierung mit ^{32}P überlegen, wenn die Detektion durch Chemilumineszens und mit AMPPD als Substrat erfolgt [24]. Beide Markierungsarten können auch in der Multiplex-Sequenzierung verwendet werden [4,30].

Ein Nachteil der direkten Markierung mit bifunktionellen Linkern ist die unspezifische Verknüpfung des Enzyms. Die Bindung an das Oligonukleotid erfolgt dabei im Falle der AP vornehmlich über einen Lysinrest des Enzyms [1], sofern es sich bei dem Linkermolekül um einen aktivierten Ester handelt. Auch wenn die spezifische Aktivität des Enzyms nicht durch die Bindung beeinträchtigt wird und das Bindungsverhältnis von Oligonukleotid zu Enzym 1:1 beträgt, erfolgt die Bindung des Linkers an das Enzym an einer nicht exakt definierten Position, so daß ein inhomogenes Produktgemisch ensteht. Die Güte des Konjugates hängt dabei stark von den Reaktionsbedingungen der Synthese ab, sowie von der Herkunft der verwendeten AP [1]. Eine chromatographische Aufreinigung des zunächst hergestellten aktivierten Oligonukleotides und normalerweise auch des anschließend aus der Umsetzung mit AP erhaltenen Konjugates ist überdies normalerweise unerläßlich. Die einmal erzeugte kovalente Bindung zwischen Oligonukleotid und Enzym kann außerdem nicht mehr selektiv gespalten werden. Dies ist für manche Anwendungen ein Nachteil, so ist beispielsweise ein markiertes Oligonukleotid unter Umständen kein Substrat mehr für Polymerasen und kann in diesem Fall nicht in DNA eingebaut werden.
Auch im Falle von indirekt markierten Konjugaten muß das Enzym nach seiner Funktionalisierung zunächst chromatographisch aufgereinigt werden. Die Verknüpfung des Enzyms mit der Reportergruppe erfolgt wiederum an einer nicht definierten Position, sofern es sich bei der Gruppe nicht um einen Fusion Tail handelt. Bei den Systemen Streptavidin/Biotin und DIG/Anti-DIG ist eine Spaltung der Bindung zwischen Oligonukleotid und Enzym nur unter stringenten Bedingungen möglich.

Die selektive Modifikation von Proteinen ist durch chemische, enzymatische oder rekombinante Methoden möglich. Ein rekombinant an ein Protein angefügtes Peptid kann dazu verwendet werden, um das Protein an dieser Stelle selektiv chemisch zu modifizieren, z. B. kann in eine Streptavidindomäne ein Pentacysteinrest eingefügt werden, dessen Thiolgruppen nukleophil reagieren [33]. Rekombinant angefügte Peptide, „Fusion Tails“, dienen vor allem auch der Aufreinigung von Proteinen [32]. Manche Peptide fungieren dabei als Epitope, so daß die jeweiligen Fusionsproteine durch Immunoaffinitätchromatographie aufgereinigt werden können. Ein Beispiel ist das Flag-Epitop, ein Peptid aus acht Aminosäuren, welches z. B. mit AP fusioniert werden kann [34]. Auf diese Weise mit Epitopen versehene Fusionsproteine können auch in Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISAs) verwendet werden [35].
Die am häufigsten vorgenommene rekombinante Modifikation zur Isolierung und Aufreinigung von Proteinen ist das Einfügen eines Oligohistidinpeptids an das jeweilige Protein. Ein mit einem solchen Peptid versehenes Fusionsprotein kann mittels Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography (IMAC) [36] aufgereinigt werden. Die Trennwirkung dieser Methode beruht hierbei auf der Affinität der Imidazolreste benachbarter Histidine zu immobilisierte Metallionen mit freien Koordinationsstellen. Die Metallionen sind durch Chelatgruppen gebunden, welche sich an einer festen Phase befinden. Der Fusionstail kann ein bis neun Histidine enthalten [32], im allgemeinen werden die besten Trennergebnisse mit einem Hexahistidinpeptidrest (His_6) erzielt. Der His_6-Rest kann sich an einer beliebigen, frei zugänglichen Stelle in einem Fusionsprotein befinden, normalerweise an amino- oder carboxyterminaler Position. Für IMAC werden vor allem die Metallionen Ni^{2+}, Co^{2+}, Cu^{2+} und Zn^{2+} verwendet [36]. Üblicherweise werden kommerziell erhältliche Phasen mit Ni^{2+} (Ni-NTA Resin, Qiagen GmbH) oder Cu^{2+} (TALON Metal Affinity Resin, CLONTECH Laboratories, Inc.) zur Aufreinigung benutzt, wobei das Trägerharz ein Agarosederivat ist. Das jeweilige Metallion ist durch einen mehrzähnigen Liganden an den Träger gebunden. Im Falle von Ni^{2+} handelt es sich dabei meistens um ein Derivat der Nitrilotriessigsäure (Nitrilotriacetic Acid, NTA), welche ein vierzähniger Chelatbildner ist. Die Aufreinigung von His_6-Fusionsproteinen durch IMAC mittels Ni-NTA-Harz wurde erstmals von *Hochuli* et al. 1987 vorgenommen [37,38]. Abb. 3 zeigt das schematische Bindungsprinzip.

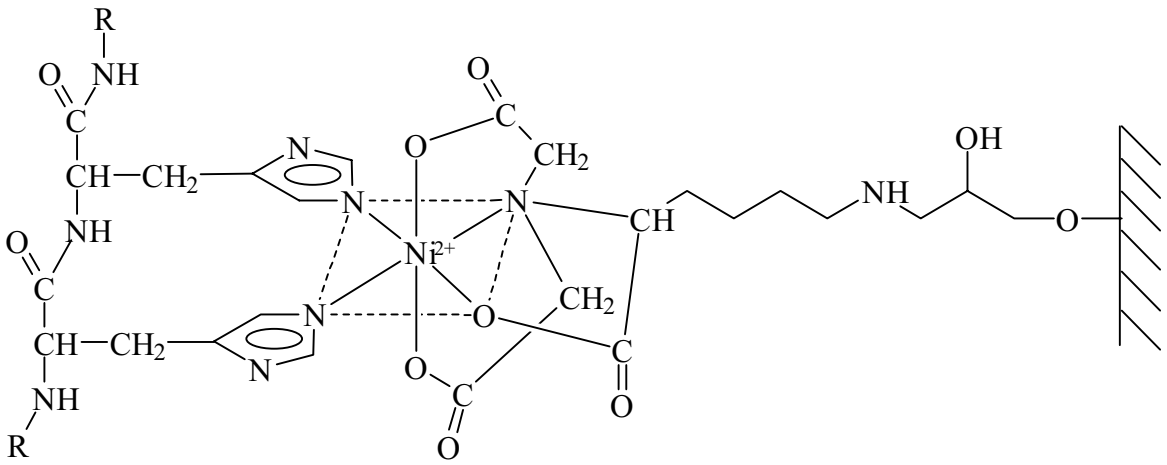


Abbildung 3. Bindung eines His_6-Restes an Ni-NTA-Harz (nach QIAGEN [75]). Die Imidazolreste von zwei benachbarten Histidinen belegen die zwei am chelatgebundenen Ni^{2+}-Kation verbliebenen Koordinationstellen.

Vier der sechs Positionen in der oktaedrischen Koordinationssphäre des Ni^{2+}-Ions werden durch die NTA-Gruppe belegt, die zwei verbleibenden Koordinationsstellen können durch die Imidazolreste von zwei benachbarten Histidinen besetzt werden. Dabei können die Histidine benachbart bezüglich der Primärstruktur des Proteins sein, oder sie sind zufällig benachbart aufgrund der räumlichen Anordnung der Peptidkette. Die Histidine müssen sich an einer für die Ni-NTA-Gruppe frei zugänglichen Stelle an der Oberfläche des Proteins befinden, damit es zur Bildung des Konjugates kommen kann.
Der Protein-Ni-NTA-Komplex hat eine Dissoziationskonstante von ungefähr 10^{-13} M und ist damit stabiler als die meisten Konjugate zwischen Antikörpern und Antigenen [42]. Allerdings sind auch Beispiele für eher instabile Hexahistidin-Ni-NTA-Konjugate mit Dissoziationskonstanten von lediglich 10^{-6} M bekannt [85].
Hexahistidin-Fusionsproteine können von Ni-NTA-Harz durch Verringerung des pH oder durch Zugabe eines komplexierenden Liganden, etwa Imidazol, eluiert werden. Dabei wird nur die Bindung des Proteins zum Ni^{2+}-Ion gelöst, während das Metallion selbst weiterhin an die NTA-Gruppe gebunden bleibt. In geringem Umfang wird allerdings auch Ni^{2+} durch Imidazol von NTA-Harz eluiert, so daß nach wiederholter Chromatographie das Ni-NTA-Harz durch Zugabe von Ni^{2+} regeneriert werden muß. Starke Komplexbildner wie EDTA lösen die Bindung zwischen Ni^{2+} und NTA quantitativ und führen zur Freisetzung des Nickels und damit auch zur Elution von gebundenem Enzym [75]. Die Bindung zwischen hexahistidinmarkiertem Protein und Ni-NTA ist stabil gegenüber hohen Salzkonzentrationen und gegenüber vielen Detergentien und denaturierenden Reagenzien.

Ein rekombinant eingefügter His_6-Rest kann die Eigenschaften eines Proteins verändern, beispielsweise kann die spezifische Aktivität eines Enzyms beeinträchtigt werden. Voraussagen, ob eine Hexahistidinmodifizierung zu einer wie auch immer gearteten Beeinträchtigung der Eigenschaften eines Proteins führt, können nicht gemacht werden. So gibt es beispielsweise sowohl DNA-bindende Proteine, deren Bindungsvermögen für DNA durch das Einfügen eines His_6-Restes verringert wird [12], als auch solche, bei denen dies nicht der Fall ist [44].
Bei einer unerwünschten Veränderung der Eigenschaften eines Proteins durch die Hexahistidinmodifikation, oder wenn generell unmodifiziertes Protein gewonnen werden soll, besteht die Möglichkeit, den His_6-Rest vom exprimierten Protein nach dessen Aufreinigung mittels Proteasen wieder abzuspalten, sofern ein proteaselabiler Linker rekombinant zwischen Protein und His_6-Rest eingefügt wurde. In vielen Fällen wird die spezifische Aktivität eines Enzyms durch das Anfügen eines His_6-Restes jedoch nicht oder kaum beeinflußt, so daß kein Grund besteht, den His_6-Rest nach erfolgter Aufreinigung des Proteins zu entfernen.
An hexahistidinmarkierte Proteine gebundene Ni^{2+}-Ionen können die physiologischen Eigenschaften dieser Proteine verändern, z. B. kann die Sekretion eines His_6-Fusionsproteins in *E. coli* durch Ni^{2+} inhibiert werden [46].
Ein His_6-Rest in einem Protein kann dazu benutzt werden, um das Protein mittels $^{63}Ni^{2+}$ zu quantifizieren [45], doch ist diese Methode unüblich.

Das rekombinante Einfügen von His_6-Resten in zu isolierende Proteine und deren Aufreinigung mit Ni-NTA-Harz ist zu einer einfachen und verbreiteten Technik geworden. Die jeweiligen modifizierten Proteine können auf diese Weise rasch und in hoher Reinheit gewonnen werden. Ein Beispiel ist die schnelle Isolierung von DNA-Polymerase aus *Thermus Aquaticus* mit dieser

Methode [39]. Aber auch für andere Anwendungen ist diese Technik geeignet. So kann eine mit einem His_6-Rest versehene Proteinkinase nach vollzogener Phosphorylierung schnell und einfach mit Ni-NTA-Harz wieder aus dem Reaktionsansatz entfernt werden [41]. Komplexe aus DNA und DNA-bindenden Proteinen können leicht mit Ni-NTA-Harz isoliert und immobilisiert werden, wenn das Protein hexahistidinmodifiziert ist [40]. Ferner können rekombinante hexahistidinmarkierte Antikörper, die auf einer Ni-NTA-Säule immobilisiert sind, direkt in Immunoaffinitätschromatographien eingesetzt werden [42]. Enzyme können ebenfalls auf diese Weise mit Ni-NTA-Harz immobilisiert werden und behalten dabei, wie z. B. im Falle von His_6-markierter RNA-Polymerase, ihre Aktivität [43]. Eine besonders schnelle Isolierung oder Immobilisierung von hexahistidinmarkierten Proteinen ist mit magnetischen Ni-NTA Agarose Beads möglich (Qiagen GmbH).
Bei einigen Anwendungen ist die Ni-NTA-Gruppe nicht an Agaroseharz gebunden, sondern an andere Trägermaterialien. Zum Beispiel finden mit Ni-NTA funktionalisierte Sensor Chips Verwendung zur Immobilisierung von Liganden in der Surface Plasmon Resonance Detection [85].
Wird ein Molekül mit der Ni-NTA-Gruppe funktionalisiert, so kann es einen stabilen Komplex mit hexahistidinmarkierten Proteinen bilden. So gibt es beispielsweise Ni-NTA-funktionalisierte Lipide, welche His_6-Proteine binden können [49,109,110]. Ebenfalls bekannt sind Ni-NTA-funktionalisierte Enzyme wie alkalische Phosphatase und HRP. Diese Enzyme können zur Detektion von His_6-Proteinen verwendet werden (QIAexpress Ni-NTA AP und HRP Konjugate, Qiagen GmbH) [48].

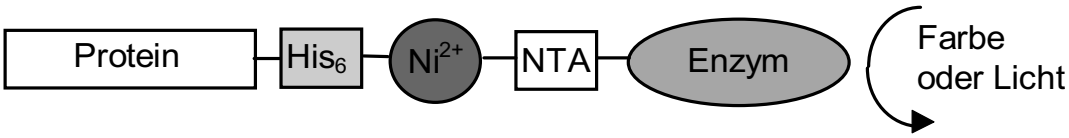


Abbildung 4. Schematischer Aufbau eines Konjugates aus His_6-markiertem Protein und NTA-funktionalisiertem Enzym.

Hexahistidin-Fusionsproteine lassen sich auch durch monoklonale Antikörper, die spezifisch für das His_6-Epitop sind, detektieren (QIAexpress monoclonal Anti-His Antibodies, Qiagen GmbH) [47].

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß das His_6-Ni-NTA-Bindungssystem leistungsfähig und vielseitig ist. Trotzdem wurde es bislang nicht für die indirekte Markierung von DNA und zur Darstellung von DNA-Enzym-Konjugaten verwendet. Konjugate dieser Art würden aus einem NTA-funktionalisiertem Oligonukleotid bestehen, welches über Ni^{2+} mit einem Hexahistidin-Fusionsprotein verbunden wäre. Ein solches Konjugat hätte gegenüber den bestehenden Konjugaten verschiedene Vorteile. Die Reportergruppe des Enzyms, His_6, wäre auf rekombinantem Wege leicht einführbar und ließe sich zur Isolierung des exprimierten Proteins verwenden. Die Funktionalisierung des Enzyms würde, im Gegensatz zur Funktionalisierung mit z. B. Biotin oder mit bifunktionellen Linkern, an einer definierten Stelle im Protein erfolgen, so daß man ein homogenes Konjugat erhalten würde, dessen Darstellung leicht reproduzierbar wäre. Im Gegensatz zu Antikörper- oder Streptavidin-Fusionstails wäre der

eingefügte His_6-Rest klein und würde die Eigenschaften des Proteins nur wenig beeinflussen. Obwohl das His_6-Epitop nur schwache Immunreaktionen provoziert, ließe es sich dennoch mit monoklonalen Antikörpern detektieren. Die Bindung zwischen Fusionsprotein und mit Ni-NTA funktionalisiertem Oligonukleotid wäre so stark wie eine Antigen-Antikörper-Bindung und weitgehend unempfindlich gegenüber denaturierenden Bedingungen. Trotzdem könnte sie bei Bedarf leicht durch Verringerung des pH oder mit Imidazol gespalten werden.
Bislang wurden allerdings lediglich Proteine und Lipide, jedoch keine Oligonukleotide mit Ni-NTA-Gruppen funktionalisiert. Oligonukleotide wurden aber zu verschiedenen Zwecken bereits mit anderen Chelatgruppen versehen, so können z. B. durch die Einführung einer entsprechenden Chelatgruppe Oligonukleotide mit Lanthanidionen fluoreszensmarkiert werden [94]. Beschrieben wurden auch die Funktionalisierungen von Oligonukleotiden mit EDTA und Diethylentriaminpentaessigsäure [99]. Alle diese Chelatgruppen sind aber aufgrund ihrer zu hohen Zähnigkeit für die Bildung von Konjugaten aus Oligonukleotiden und hexahistidinmodifizierten Proteinen ungeeignet.

Denkbar ist eine Verwirklichung des His_6-Ni-NTA-Bindungsprinzips auch durch eine umgekehrte Funktionalisierung, d. h. durch Bindung eines His_6-markierten Oligonukleotides an ein Ni-NTA-funktionalisiertes Enzym (Abb. 5).

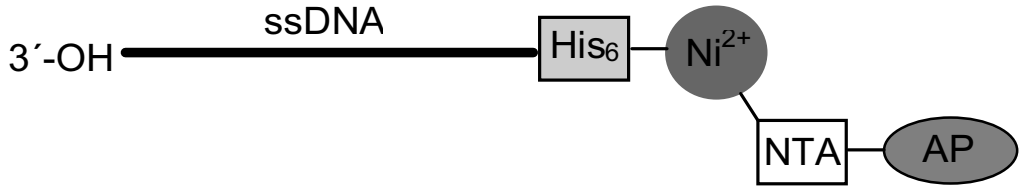


Abbildung 5. Schematische Darstellung der Bindung von NTA-funktionalisierter AP an ein 5´-hexahistidinfunktionalisiertes Ol igonukleotid.

Diese Variante hätte den Nachteil, daß die Verküpfung des Enzyms mit Ni-NTA über bifunktionelle Linker und somit wiederum unspezifisch erfolgen würde. Trotzdem könnten solche Konjugate für die nichtradioaktive DNA-Detektion geeignet sein. Die Hexahistidin-Funktionalisierung von Oligonukleotiden kann auf verschiedene Weisen erfolgen. Peptid-Oligonukleotid-Hybride können z. B. an DBU-stabilem CPG unter Verwendung von allylgeschützten Phosphoamiditen mit Standardsyntheseverfahren hergestellt werden [50]. Eine andere Methode ist die bidirektionale Festphasensynthese von Oligonukleotiden und Peptiden an einem gemeinsamen Linker [51]. Ebenfalls möglich ist die Synthese von Oligohistidin/Peptide Nucleic Acid (PNA) Chimären, welche mit DNA hybridisiert und mit Ni-NTA aufgereinigt werden können [52]. Da auch Chimären aus PNA und DNA hergestellt werden können [53], lassen sich über diesen Umweg theoretisch ebenso His_6-markierte Oligonukleotide synthetisieren. Außerdem bekannt ist die Darstellung von Oligonukleotiden mit sechs benachbarten 6-Histaminylpurinresten und deren Aufreinigung mit Ni-NTA [84].
Hexahistidin-funktionalisierte Oligonukleotide und His_6-Fusionsproteine könnten schließlich auch über einen bis-NTA-funktionalisierten Linker zu einem Konjugat verknüpft werden.

2. Problemstellung

Im Rahmen dieser Arbeit soll untersucht werden, ob das His_6-Ni-NTA-Bindungssystem geeignet ist zur Darstellung von Konjugaten aus Oligonukleotiden und Enzymen, welche in der nichtradioaktiven Detektion von DNA Verwendung finden können.
Konjugate dieser Art wären Alternativen zu den bislang standardmäßig verwendeten Biotin/Streptavidin- und DIG/Anti-DIG-Systemen zur indirekten Markierung von DNA.
Diese neue Art der indirekten DNA-Markierung könnte beispielsweise in der nichtradioaktiven Sequenzierung von DNA eingesetzt werden. Insbesondere in der Multiplex-Sequenzierung könnten solche Konjugate von Nutzen sein, da sie möglicherweise einen geringeren Detektionshintergrund verursachen als herkömmliche Konjugate.
Zu diesem Zweck soll zunächst ein geeignetes Reporterenzym rekombinant mit einem His_6-Fusionsrest versehen werden, damit es an Ni-NTA-Gruppen binden kann. Nach erfolgter Klonierung soll das Enzym exprimiert, isoliert und charakterisiert werden. Insbesondere muß sichergestellt werden, daß die spezifische Aktivität des Enzyms nicht durch das Anfügen eines His_6-Restes beeinträchtigt wurde.
Weiterhin muß ein Oligonukleotid mit der NTA-Gruppe funktionalisiert werden, um das dargestellte Reporterenzym über Ni^{2+}-Kationen binden zu können. Die Funktionalisierung soll auf möglichst einfache Art und Weise mit Standardverfahren zur Markierung von DNA erfolgen, am besten unter Verwendung kommerziell erhältlicher Edukte, damit die ausgearbeitete Methode eine Alternative zu herkömmlichen Verfahrensweisen sein kann.
Das NTA-funktionalisierte Oligonukleotid soll anschließend auf seine Bindungsfähigkeit für das Reporterenzym getestet werden. Das erhaltene Konjugat hätte folgende schematische Struktur (Abb. 6):

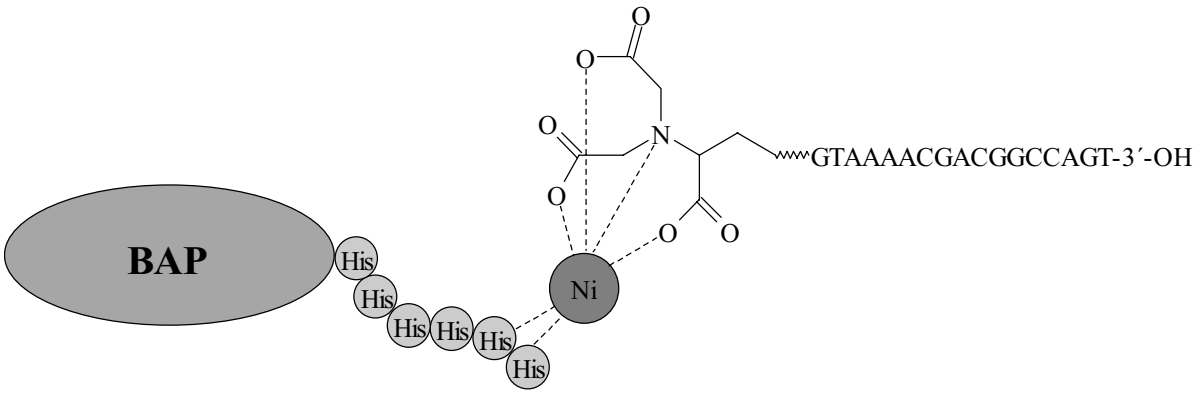


Abbildung 6. Konjugat aus Bakterieller Alkalischer Phosphatase (BAP) und Universal Sequencing Primer (USP). Das Oligonukleotid ist am 5´-Terminus NTA-funktionalisiert, das Enzym ist rekombinant hexahistidinmarkiert. Die beiden Komponenten sind über ein Ni^{2+}-Kation miteinander verknüpft.

Oligonukleotide, welche mit einem His_6-Rest versehen sind, könnten mit NTA-funktionalisierten Enzymen Konjugate bilden. Ebenso ist eine Verknüpfung von Hexahistidin-Oligonukleotiden mit His_6-Fusionsproteinen über Ni^{2+}-Kationen mittels eines Linkers denkbar, welcher über zwei NTA-Funktionen verfügt (Abb. 7).

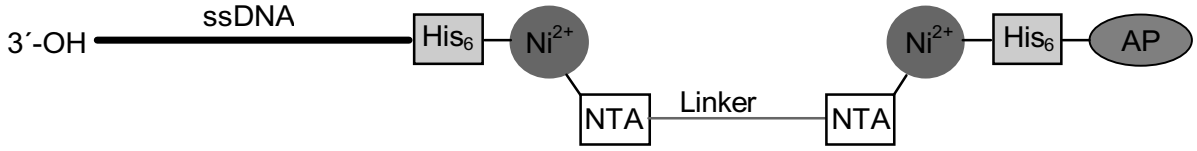


Abbildung 7. Hexahistidinmarkiertes Oligonukleotid und hexahistidinmarkierte AP, verknüpft über einen bis-NTA-funktionalisierten Linker.

Bei den bisherigen Synthesemethoden zur His-Funktionalisierung von Oligonukleotiden werden zwar teilweise Standardverfahren der Oligonukleotid- und Peptidchemie angewendet, jedoch werden dabei nicht allgemein übliche Ausgangsverbindungen eingesetzt, wie z. B. sarcosylmodifiziertes CPG oder allylgeschützte Phosphoamidite. Es soll daher untersucht werden, ob die Darstellung von Histidin-modifizierten Oligonukleotiden auch mit Standardsynthesechemikalien möglich ist, unter Verwendung verschiedener Methoden der Peptidchemie. Die dargestellten funktionalisierten Oligonukleotide sollen schließlich auf ihr Bindungsvermögen an Ni-NTA getestet werden.

3. Bakterielle Alkalische Phosphatase

3.1 BAP als Reporterenzym

Alkalische Phosphatase ist das Enzym, welches für die nichtradioaktive Detektion von DNA mittels Enzym-Oligonukleotidkonjugaten am besten geeignet ist [1]. Man unterscheidet zwischen AP aus Säugetieren, wie z. B. CIP aus Kälberdarm, und AP aus Bakterien, wie beispielsweise BAP aus *E. coli*. Die alkalischen Phosphatasen aus Säugetieren besitzen eine spezifische Aktivität, die 20-30fach größer ist als die von alkalischen Phosphatasen aus Bakterien [55]. Als Grund hierfür wird ein Unterschied in den Sequenzen der aktiven Zentren der Enzyme angesehen. Die Aminosäuren Asp und Lys in den Positionen 153 und 328 im aktiven Zentrum von BAP aus *E. coli* sind bei den alkalischen Phosphatasen aus Säugetieren jeweils gegen His susbtituiert. Eine Substitution von Asp gegen His an der Position 153 in BAP von *E. coli* durch site-directed Mutagenese führte zu einem Enzym, welches auf dieselbe Weise durch Mg^{2+} aktiviert wird wie alkalische Phosphatase aus Säugetieren [56].
Bei der Synthese von Konjugaten aus AP und Oligonukleotiden verwendet man üblicherweise CIP anstelle von BAP, da Konjugate mit CIP die höhere Sensitivität aufweisen [1].
Für diese Arbeit wurde jedoch die Bakterielle Alkalische Phosphatase als Reporterenzym gewählt, da auf diese Weise die Expressionsklonierung unter Verwendung von *E. coli* als Wirtsorganismus vorgenommen werden konnte. Klonierungen sind mit *E. coli* in der Regel einfach zu bewerkstelligen, und exprimierte Proteine können vielfach schnell und in hohen Ausbeuten gewonnen werden. Klonierungen von rekombinanter BAP sind in der Literatur häufig beschrieben worden [17,61,67,68].
Die geringere spezifische Aktivität von BAP im Vergleich zu CIP ist demgegenüber von untergeordneter Bedeutung, da das His_6-Ni-NTA-Bindungssystem auch mit BAP als Reporterenzym untersucht werden kann. Außerdem verfügen Konjugate aus BAP und Oligonukleotiden als Sonden theoretisch ungefähr über die gleiche Sensitivität wie Konjugate, welche HRP enthalten und wären somit zur Detektion von DNA geeignet.

3.2 Eigenschaften der Bakteriellen Alkalischen Phosphatase

BAP aus *E. coli* ist ein Protein, das aus zwei identischen Untereinheiten besteht. Das Monomer wird an der inneren Seite der Zellmembran von Polysomen synthetisiert und dann durch die Membran in den periplasmatischen Raum sekretiert [58]. Das am N-terminalen Ende befindliche Signalpeptid mit einer Länge von 21 Aminosäuren wird nach der Sekretion durch Peptidasen abgespalten. Das prozessierte Monomer besitzt eine Länge von 450 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 47.2 kDa. Jede Untereinheit weist zwei intracatenare Disulfidbrücken auf [67]. Die Röntgenstruktur des Enzyms ist bekannt [59] (Abb. 8).

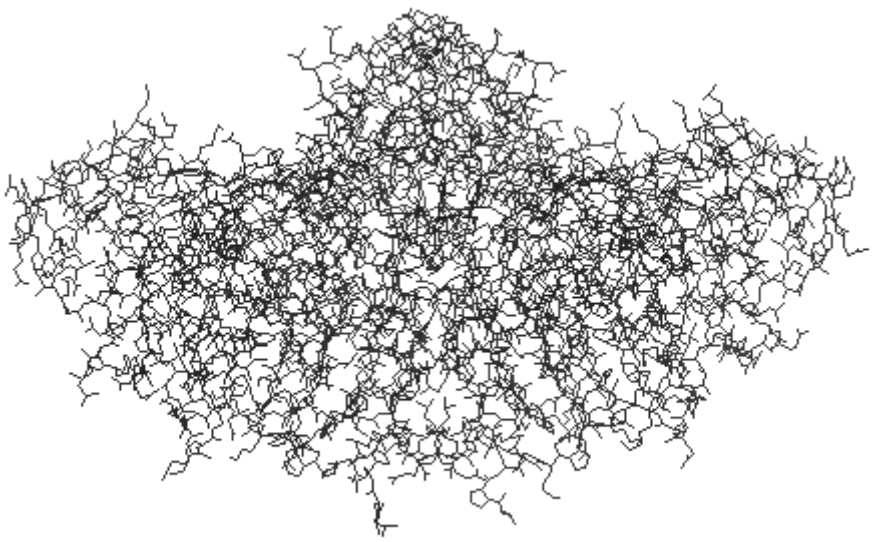


Abbildung 8. Dreidimensionale Struktur des Dimeres der Bakteriellen Alkalischen Phosphatase (Quelle: *Brookhaven*-Datenbank).

BAP ist ein Metalloenzym, das zwei Zinkionen und ein Magnesiumion je Untereinheit enthält. Die Metallionen befinden sich in den beiden aktiven Zentren des Enzyms [60]. Die Magnesiumionen sind wichtig sowohl für die Struktur als auch für die katalytische Aktivität des Enzyms [61]. Nur das aus beiden Untereinheiten bestehende Dimer ist katalytisch aktiv. BAP bildet im Cytoplasma keine aktiven Dimere [63]. Dies ist jedoch vermutlich nicht auf das Vorhandensein des noch unprozessierten Signalpeptids zurückzuführen [64].
Es gibt drei Isoenzyme von BAP. Isoenzym 1 besteht aus zwei unmodifizierten Untereinheiten. Bei den beiden anderen Isoenzymen 2 und 3, die aus Isoenzym 1 hervorgehen, fehlt in einer bzw. in beiden Untereinheiten die aminoterminale Aminosäure Arginin [62].
Die Sequenz des Gens der alkalischen Phosphatase aus *E. coli*, phoA, ist ebenfalls bekannt [65]. Das Gen besitzt eine Größe von 1415 bp.

3.3 Isolierung des Gens der alkalischen Phosphatase aus E. coli

Vor seiner rekombinanten Modifikation wurde das Gen phoA aus dem Genom von *E. coli* isoliert. Verwendet wurde dabei der *E. coli* Stamm HB101. Zur Gewinnung der genomischen DNA wurden die Zellen einer Bakterienkultur zunächst mit SDS lysiert. Das Lysat wurde mit Proteinase inkubiert und dann mit Phenol/Chloroform extrahiert. Die durch Zentrifugation abgetrennte genomische DNA wurde anschließend dialysiert.
Das Gen phoA befindet sich zusammen mit zwei Open Reading Frames zwischen einer *Hin*d III und einer *Xho* I Restriktionsenzymschnittstelle (Abb. 9), auf einem Fragment mit einer Größe von 2715 bp [65].

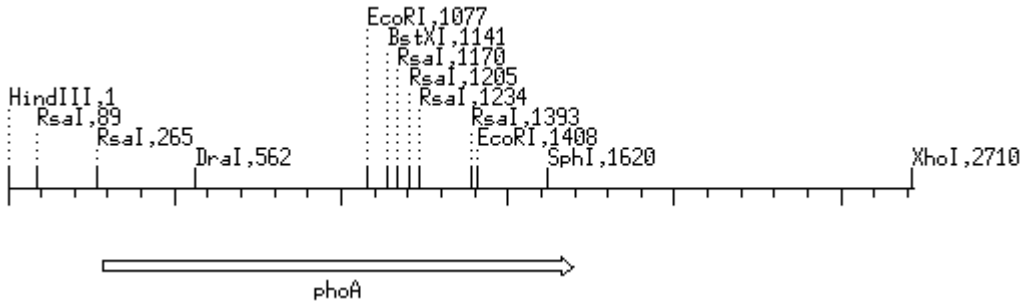


Abbildung 9. *Hin*d III/*Xho* I-Fragment mit dem Gen von phoA (nach *Chang* et al. [65]) aus dem Genom von *E. coli*. Die bei den Klonierungen und Kontrollspaltungen verwendeten Restriktionsenzymschnittstellen sind angegeben.

Die genomische DNA wurde daher zunächst mit *Hin*d III und dann mit *Xho* I geschnitten. Die Isolierung des gewünschten Fragments erfolgte durch präparative Agarosegelelektrophorese. Hierbei wurde ein Gelstück im Größenbereich von 2.7 kbp ausgeschnitten und die darin befindliche DNA mit Glasmilch extrahiert. Die DNA wurde in den Vektor pOM8 kloniert, wobei die Schnittstellen *Hin*d III und *Sal* I im Vektor verwendet wurden (Abb. 10). Die von *Xho* I und *Sal* I erzeugten Sticky Ends sind zueinander kompatibel.

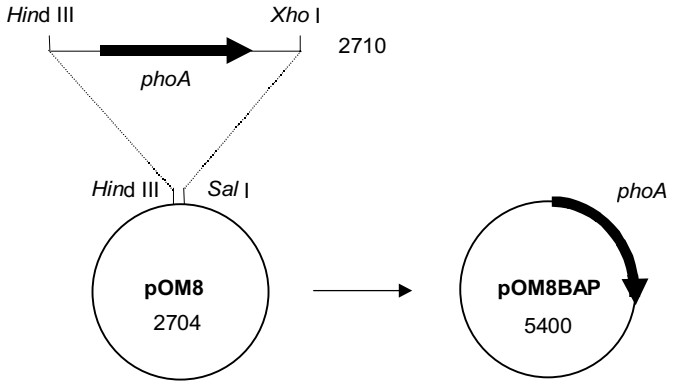


Abbildung 10. Das aus dem Genom von *E. coli* gewonnene *Hin*d III/*Xho* I-Fragment mit dem Gen phoA kann über *Hin*d III und *Sal* I-Schnittstellen in die Multiple Cloning Site des Vektors pOM8 kloniert werden, wodurch der Vektor pOM8BAP entsteht. Angegeben sind die jeweiligen Größen der Vektoren und des insertierten Fragmentes in Da.

pOM8 [72] ist ein pUC-abgeleitetes multi-copy Plasmid mit einer Größe von 2704 bp, welches das β-Lactamase-Gen (bla) für die Ampicillinresistenz trägt. Der mit dem Insert ligierte Vektor pOM8BAP (5400 bp) wurde in *E. coli* transformiert. Die aus den erhaltenen Klonen gewonnenen Plasmide wurden mit *Hin*d III geschnitten und mittels Agarosegelelektrophorese auf ihre Größe hin untersucht. Erwartungsgemäß wurden viele Plasmide mit unerwünschten Inserts unterschiedlicher Größe gewonnen. Plasmide mit dem gewünschten Insert konnten durch Spaltung mit *Eco* RI identifiziert werden, da der Vektor eine und das Insert zwei dieser Schnittstellen aufwiesen. Dabei wurden jeweils Fragmente mit den Größen 331, 1120 und 3949 bp erhalten. Zur Kontrolle wurde außerdem mit *Hin*d III und *Pst* I geschnitten, wobei

erwartungsgemäß zwei Fragmente ähnlicher Größe (2719 und 2681 bp) entstanden. Durch Spaltung des Plasmids mit *Dra* I (drei Schnittstellen im Vektor, eine Schnittstelle im Insert) wurden im Übereinstimmung mit der erwarteten Sequenz drei Banden erhalten (2971, 1718 und 692 bp), ein Fragment war zu klein (19 bp), um es durch Agarosegelelektrophorese nachzuweisen.
Von den entsprechenden Klonen wurden Glycerinpräparationen angefertigt. Plasmid-DNA für die weitere Klonierung wurde durch Plasmid-Aufreinigungskits (Qiagen GmbH) gewonnen.

3.4 Klonierung von phoA in einen Expressionsvektor

Um festzustellen, ob unmodifizierte BAP einwandfrei exprimiert werden kann, wurde phoA ausgehend vom Vektor pOM8BAP zunächst gemäß nachfolgendem Schema in einen Expressionsvektor kloniert (Abb. 11).

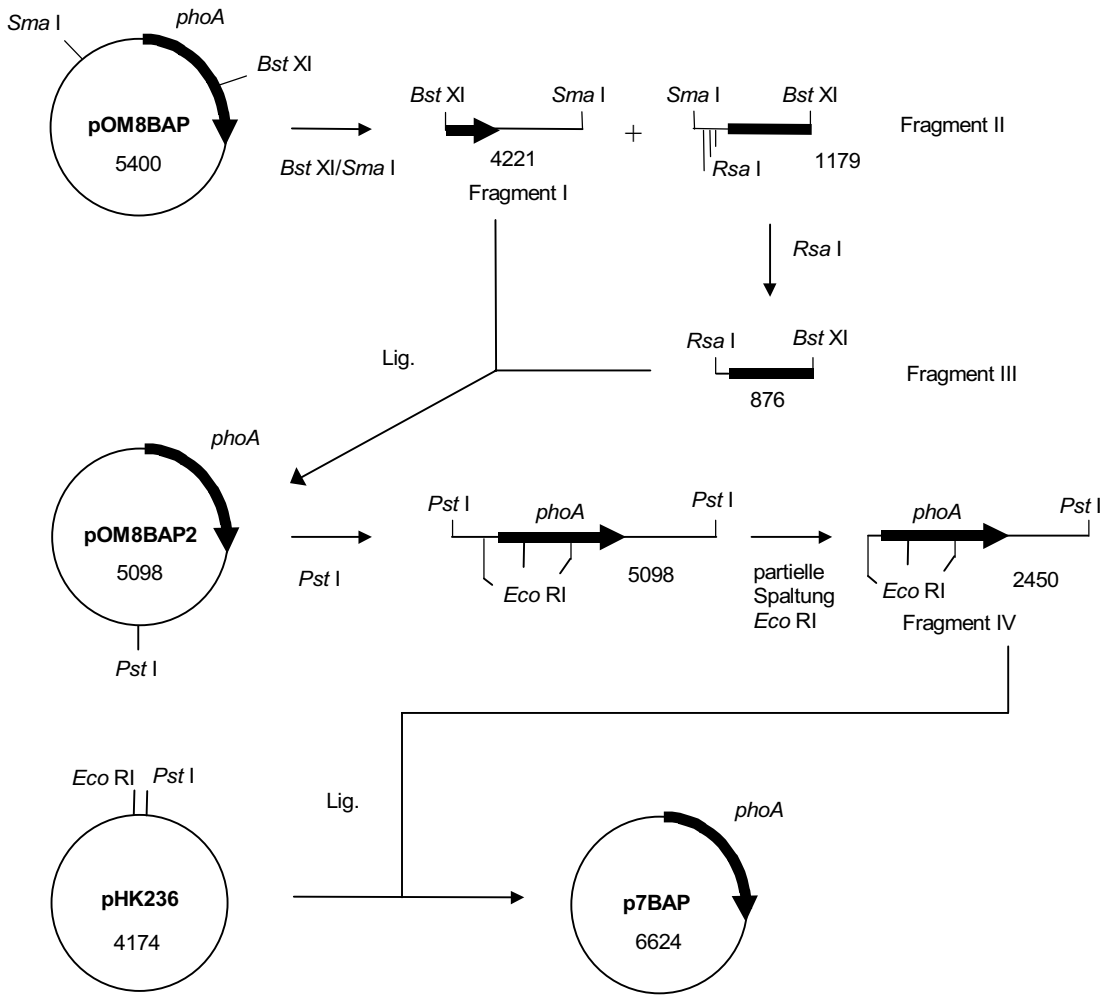


Abbildung 11. Klonierungsschema von p7BAP. Erläuterungen siehe Text.

Bei der Klonierung wurden die *E. coli* Stämme HB101, DH10B und JM83 verwendet. Die korrekte Spaltung und Ligation der Plasmid-DNA wurde jeweils durch Agarosegelelektrophorese überprüft. Die Anfärbung der Gele geschah mit Ethidiumbromid. Transformationen von Plasmid-DNA erfolgten entweder unter Verwendung kompetenter Zellen nach der $CaCl_2$-Methode, oder durch Elektroporation [79], wobei im allgemeinen bessere Ergebnisse mit letzterer Methode erzielt wurden. Alle in der Klonierung verwendeten Vektoren besaßen das bla-Gen, so daß das Bakterienwachstum in ampicillinhaltigem LB-Medium erfolgen konnte. Transformierte Zellen wurden auf ampicillinhaltigen Agarplatten ausgestrichen und von den gebildeten Kolonien wurden einzelne Klone ausgewählt. Zur Untersuchung der Klone wurde die Plasmid-DNA der Zellen nach der Methode von *Birnboim* und *Doly* [70] gewonnen. In Fällen, bei denen die Anzahl der zu untersuchenden Klone sehr groß war, wurde die Plasmid-DNA mit der Filtrationsmethode von *Ruppert* et al. [83] isoliert. Die Analyse der erhaltenen Plasmide geschah durch geeignete Restriktionsenzymspaltungen in Checkpots, welche jeweils die Plasmid-DNA von fünf unterschiedlichen Klonen enthielten. Plasmid-DNA zur weiteren Verwendung in der Klonierung wurde durch Plasmidaufreinigungs-Kits (Qiagen GmbH) isoliert, da die Reinheit der auf diese Weise erhaltenen DNA größer ist als die der nach anderen Methoden gewonnenen DNA. Die aus einer Restriktionsenzymspaltung entstandenen DNA-Fragmente, die in eine Ligation eingesetzt werden sollten, wurden durch präparative Agarosegelelektrophorese gewonnen. Die DNA wurde mittels Glasmilch aus den entnommenen Gelstücken extrahiert. Zur Umpufferung wurde die in die Restriktionsenzymspaltungen eingesetzte Plasmid-DNA jeweils ethanolisch gefällt.

Die Shine-Dalgarno(SD)-Sequenz von phoA (-9 bis -12) sollte bei der Klonierung erhalten bleiben. Eine für diesen Zweck günstige Schnittposition war eine *Rsa* I Schnittstelle, welche sich 4 bp vor der SD-Sequenz befand. Da phoA jedoch selbst vier weitere Schnittstellen für *Rsa* I aufwies, wurde ein 5´-terminales Teilstück von phoA (866 bp), welches keine *Rsa* I Schnittstellen besaß, zusammen mit der davor befindlichen SD-Sequenz zunächst durch einen *Bst* XI/*Sma* I Schnitt aus pOM8BAP entfernt, wodurch ein Fragment mit einer Größe von 4221 bp übrigblieb (Fragment I). Das herausgeschnittene Fragment mit einer Größe von 1179 bp (Fragment II) enthielt drei *Rsa* I Schnittstellen jenseits des phoA-Teilbereiches, eine davon unmittelbar vor der SD-Sequenz. Das nach dem Schneiden mit *Rsa* I erhaltene Fragment mit dem phoA-Teilbereich und der SD-Sequenz besaß eine Größe von 876 bp (Fragment III). Da *Sma* I und *Rsa* I beide Blunt Ends erzeugen, konnte das Fragment wieder mit dem 4221 bp Fragment I über die *Bst* XI und *Sma* I/*Rsa* I Schnittpositionen ligiert werden. Weil der *Sma* I Schnitt im Polylinker des Vektors gelegen hatte, befand sich die SD-Sequenz von phoA damit direkt hinter der multiplen Klonierungsstelle. Der entstandene Vektor pOM8BAP2 hat eine Größe von 5098 bp. Die aus den erhaltenen Klonen gewonnenen Plasmide wurden zur Kontrolle mit *Eco* RI gespalten, wobei sich die drei erwarteten Fragmente mit den Größen 3949, 818 und 331 bp ergaben.

Der für die Klonierung verwendete Expressionsvektor war der Vektor pHK236, ein multi-copy Plasmid und Derivat von pJF118U [80]. Der Vektor verfügt über einen mit Isopropyl- β-D-thiogalactosid (IPTG) induzierbaren *tac*-Promotor [81]. phoA wurde unterhalb des Promotors über *Pst* I/*Eco* RI Schnittstellen in die multiple Klonierungsstelle des Vektors kloniert. Dies erfolgte durch partielle Spaltung von mit *Pst* I linearisiertem pOM8BAP2 mit *Eco* RI, da phoA über zwei Schnittstellen für *Eco* RI verfügt. Bereits nach einer Inkubationszeit von 30 s bis

2 min wurde ein Fragment der gewünschten Größe (2450 bp, Fragment IV) in ausreichender Menge erhalten. Das Fragment IV wurde mit *Pst* I/*Eco* RI geschnittenem pHK236 ligiert. Der entstandene Expressionsvektor p7BAP hat eine Größe von 6624 bp. Kontrollspaltungen mit *Eco* RI, *Pst* I und *Sca* I führten zu den erwarteten Fragmenten.
Da bei der Klonierung von p7BAP keine PCR durchgeführt worden war, wurde auf die Verifizierung der klonierten Sequenz von phoA durch *Sanger*-Sequenzierung verzichtet.

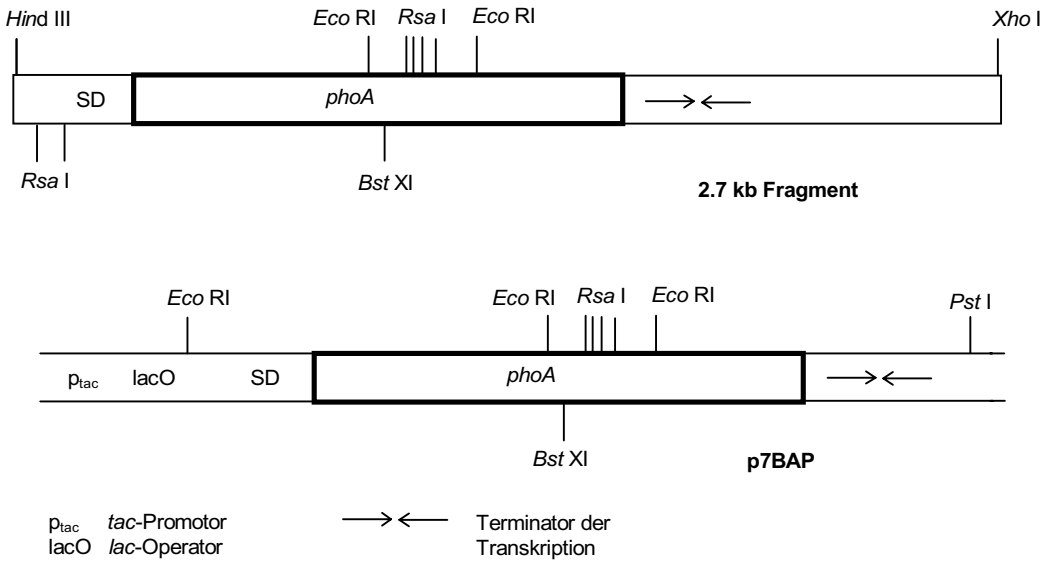


Abbildung 12. SD-Sequenz und Terminator von phoA bleiben bei der Klonierung in pHK236 erhalten.

3.5 Expression von BAP in E. coli

Über die physiologische Funktion von BAP in *E. coli* ist nur wenig bekannt. Die Expression von BAP findet verstärkt bei Phosphatmangel statt, um die Phosphatversorgung der Zelle sicherzustellen [66]. BAP ist ein relativ unspezifisches Enzym und kann z. B. Phosphoenzyme dephosphorylieren [57] und auf diese Weise Stoffwechselprozesse beeinflussen. Die Induktion der Expression von BAP mit IPTG in mit entsprechenden Expressionsvektoren transformierten *E. coli* kann sich daher theoretisch negativ auf den Zellmetabolismus auswirken. Um zu vermeiden, daß während der Proteinexpression eine das Zellwachstum inhibierende oder gar toxische Wirkung zu früh eintritt, gibt es zwei verschiedene Strategien. Zum einen kann die Induktion mit einer niedrigen Konzentration an IPTG während der logarithmischen Wachstumsphase erfolgen, so daß die Konzentration an produziertem Enzym in den Zellen noch nicht groß genug ist, um das Zellwachstum merklich zu beeinträchtigen. Zum anderen kann die Induktion am Ende der logarithmischen Phase, wo eine Inhibierung des Wachstums nicht mehr ins Gewicht fallen würde, mit einer hohen Konzentration an IPTG bewirkt werden. Beide Methoden wurden getestet.
Die Produktion von BAP in mit p7BAP transformierten *E. coli* HB101 wurde mit IPTG induziert. Zum Aufschluß wurden die Zellen mit SDS- und mercaptoethanolhaltigem Lysepuffer versetzt und 5 min bei 95 °C inkubiert. Die Lysate wurden mittels SDS-

Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) analysiert. Die Anfärbung der Gele geschah mit Coomassie Brilliant Blue. Auf den denaturierenden Gelen war das Monomer von BAP mit einer Größe von 43.9 kDa (erwartet: 47.2 kDa) erkennbar. Die Abweichung der gemessenen von der tatsächlichen Größe ist nicht weiter überraschend, da diese Methode der Molekulargewichtsbestimmung relativ ungenau ist. Das tatsächliche Molekulargewicht des Dimers von BAP ließ sich erst durch Kenntnis der Sequenz von phoA berechnen und beträgt 94.4 kDa. Direkte Methoden der Größenbestimmung von BAP ergaben hingegen Werte zwischen 67 und 110 kDa [66].

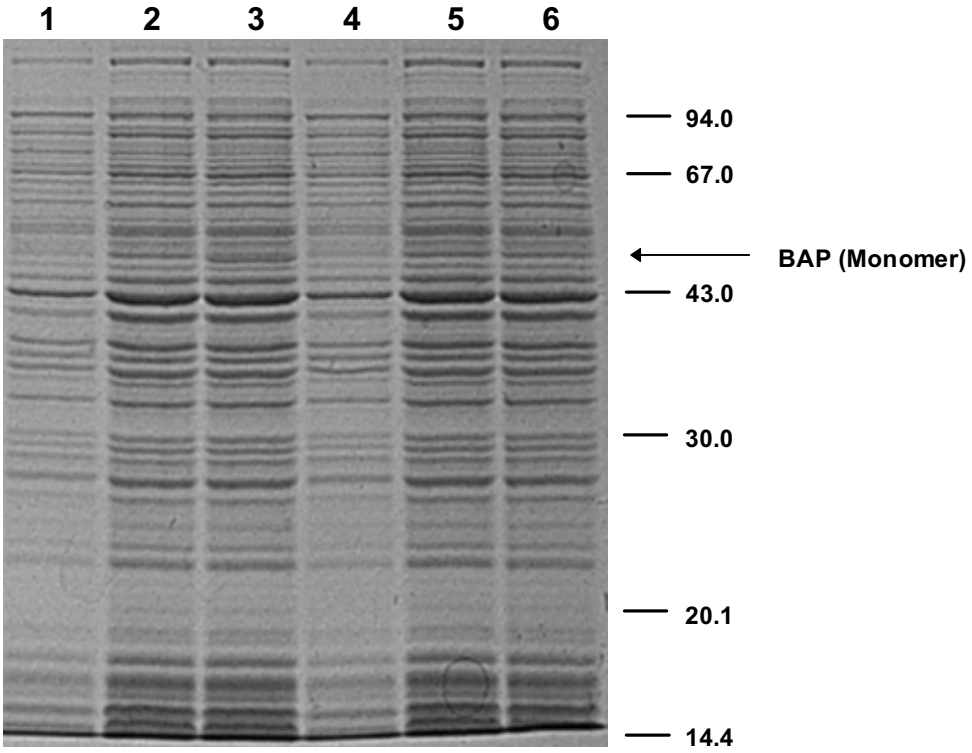


Abbildung 13. SDS-PAGE von Zellysaten (HB101). (1,4) untransformierte Zellen, (2,6) mit p7BAP transformiert, nicht-induziert, (3) mit p7BAP transformiert, nach 2 h Wachstum 1 h mit 1 mM IPTG induziert, (5) mit p7BAP transformiert, nach 1 h Wachstum 2 h mit 0.01 mM IPTG induziert. Größenangaben in kDa.

Wie aus Abb. 13 ersichtlich ist, erfolgte bereits im Falle der mit p7BAP transformierten, nicht-induzierten Zellen (2, 6) eine im Vergleich mit untransformierten Zellen (1, 4) deutlich verstärkte Expression von BAP. Dies ist auf eine gewisse Induktion des *tac*-Promotors unter physiologischen Bedingungen zurückzuführen. Eine im Vergleich zu den transformierten, nicht-induzierten Zellen verstärkte Expression ergab sich bei einer Induktion mit 1 mM IPTG nach 2 h Zellwachstum und anschließendem weiteren einstündigem Wachstum (3). Hingegen war bei einer Induktion mit 0.01 mM IPTG nach einstündigem Zellwachstum und anschließendem weiteren Wachstum für 2 h (5) kein Unterschied zu den transformierten, nicht-induzierten Zellen (2, 6) zu erkennen.

Aus dieser Untersuchung folgt, daß eine Induktion mit vergleichsweise hohen Konzentrationen am Ende der logarithmischen Wachstumsphase zu einer stärkeren Proteinexpression führt als die Induktion mit relativ geringen Konzentrationen während der logarithmischen Phase.

3.6 Einfügung eines Hexahistidinrestes in BAP

Nachdem sich gezeigt hatte, daß die Expression von BAP in *E. coli* ohne Schwierigkeiten mit dem vorliegenden Expressionssystem erfolgen kann, wurde phoA rekombinant modifiziert, um BAP mit einem His_6-Tail zu versehen.
Grundsätzlich kann ein Protein mit einem amino- oder mit einem carboxyterminalen His_6-Rest versehen werden. Bei Proteinen, welche wie die alkalische Phosphatase ein Signalpeptid am aminoterminalen Ende besitzen, das nach der Translokation abgespalten wird, erfolgt die Modifikation normalerweise am Carboxyterminus. Der Hexahistidinrest kann in solchen Fällen allerdings auch zwischen Signalpeptid und Aminoterminus des Proteins eingeführt werden. Das Protein OmpA wird beispielsweise mit einem His_6-Rest an dieser Position problemlos exportiert und prozessiert [46]. Im Falle von BAP können bis zu 13 Aminosäuren vom Aminoterminus des prozessierten Enzyms rekombinant entfernt werden, ohne das die spezifische Aktivität in Mitleidenschaft gezogen wird [68]. Aufgrund der offenbar geringen Bedeutung der Sequenz des Aminoterminus für die enzymatische Aktivität wäre vermutlich eine Hexahistidinmodifikation von BAP am Aminoterminus möglich, ohne die katalytische Aktivität des Enzyms zu beeinträchtigen. Die Einführung eines Hexahistidin-Tails zwischen Aminoterminus und Signalpeptid wird aber im allgemeinen nur dann vorgenommen, wenn die Positionierung am Carboxyterminus zu einer Konformationsänderung des Proteins führt, wie zum Beispiel beim sogenannten 33 kDa-Protein, einer Untereinheit im Photosystem II der höheren Pflanzen [69].
In manchen Fällen wird ein Hexahistidinrest sowohl an den Amino- als auch an den Carboxyterminus eines Proteins angefügt, um eine ausreichend starke Bindung an Ni-NTA zu gewährleisten [85].
In der vorliegenden Arbeit wurde die alkalische Phosphatase aus *E. coli* mit einem His_6-Rest am carboxyterminalen Ende versehen, d. h., die für den Hexahistidinrest codierende Sequenz wurde an den 3´-Terminus des phoA-Gens angefügt. Das Dimer des Enzyms besaß somit zwei Hexahistidinreste. Die Bindung eines dimeren Proteins an Ni-NTA ist meistens besonders stark, wenn sich beide rekombinant eingefügte Histidinreste auf derselben Seite des Proteins befinden [85]. Wie aus der schematischen dreidimensionalen Struktur von BAP [55,59] zu erkennen ist, sind die Carboxytermini der beiden Untereineinheiten zwar nicht benachbart zueinander, befinden sich aber auch nicht auf direkt entgegengesetzten Seiten des Dimeres (Abb. 14).

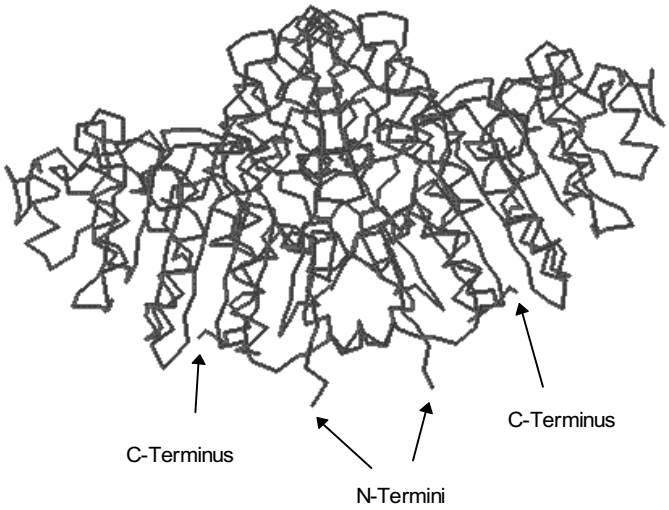


Abbildung 14. Darstellung des Aminosäurerückrades von BAP mit der Lage der Carboxy- und Aminotermini.

Um rekombinant einen His_6-Tail in ein Protein einzuführen, muß an das jeweilige Gen eine Sequenz angefügt werden, welche für sechs Histidin-Reste kodiert. Das Gen kann z. B. in einen Vektor kloniert werden, der über eine entsprechende Sequenz verfügt. Expressionsvektoren dieser Art sind kommerziell erhältlich (z. B. QIAExpress pQE Vektoren, Qiagen GmbH). Umgekehrt können natürlich auch Histidincodons in einen Expressionsvektor kloniert werden, der das jeweilige Gen als Insert trägt. Bei Anwendung dieser Methode weist das exprimierte Protein notwendigerweise einen Spacer aus Aminosäuren zwischen dem His_6-Tail und dem ursprünglichen Protein auf, weil sich im rekombinanten Gen eine Restriktionsenzymschnittstelle befinden muß. Eine andere Methode zur His_6-Funktionalisierung von Proteinen ist die direkte Einfügung von Histidincodons in das Gen durch PCR mit entsprechenden Primern. In dieser Arbeit wurde die für His_6 kodierende Sequenz mittels einer alternativen Methode von *Blum* et al. [73] in phoA eingefügt. Bei dieser Methode wird das betreffende Gen in einen Vektor kloniert, der über eine für His_6 kodierende Sequenz verfügt. Der zwischen dem Gen und den sechs Histidincodons liegende Abschnitt des Vektors wird dann durch eine inverse PCR deletiert, bei welcher der gesamte Vektor amplifiziert wird. Die Blunt Ends werden anschließend ligiert. Das Gen wird auf diese Weise unmittelbar mit den Histidincodons fusioniert, ohne daß sich eine Sequenz dazwischen befindet. Das erhaltene rekombinante Gen kann schließlich in einen Expressionsvektor kloniert werden. Das exprimierte Protein verfügt dann über einen Hexahistidin-Tail ohne weitere Aminosäuren als Spacer. Da die Fehlerrate bei der Amplifikation mittels PCR jedoch relativ groß ist [82], sollte nur ein möglichst kleines Teilstück des betreffenden Gens in die inverse PCR eingesetzt werden. Das mit den Histidincodons versehene Fragment kann dann in das ursprüngliche Gen kloniert werden, und nur die Sequenz des Teilstücks muß verifiziert werden.

Die Klonierung erfolgte gemäß dem Schema in Abb. 15, unter Verwendung der in 3.4 beschriebenen Methoden. Die Analyse und Präparation von DNA-Fragmenten mit einer Größe von weniger als 100 bp geschah durch PAGE.

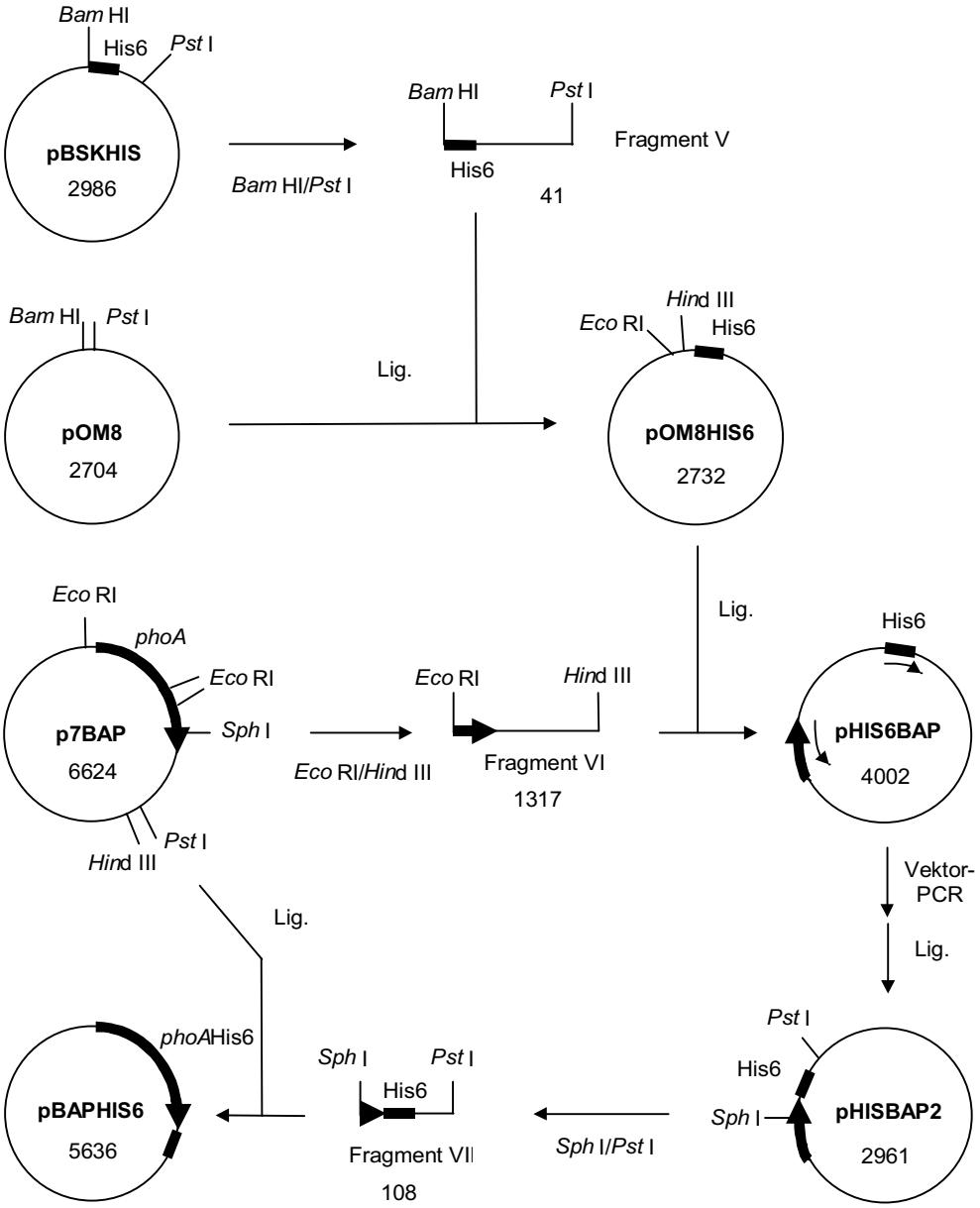


Abbildung 15. Klonierungsschema von pBAPHIS6. Erläuterungen siehe Text.

Verwendet wurde der von *Blum* et al. zu diesem Zweck konstruierte Vektor pBSKHIS (pHIS1), ein Derivat von pBIISK(+) (Stratagene GmbH, Heidelberg) [73]. Ein 41 bp großes Fragment (Fragment V), das die sechs Histidincodons und zwei Stopcodons mit der Sequenz CAC CAC CAT CAC CAT CAC TAA TAA enthielt, wurde über eine *Bam* H1 und eine *Pst* I Schnittstelle aus pBSKHIS (2986 bp) in pOM8 kloniert, unter Bildung des Vektors pOM8HIS6 (2732 bp). Die Charakterisierung der Klone erfolgte über eine Spaltung mit *Eco* RI und *Pst* I. Ein erwartetes Fragment mit einer Größe von 92 bp war im Gel erkennbar (Abb. 16).

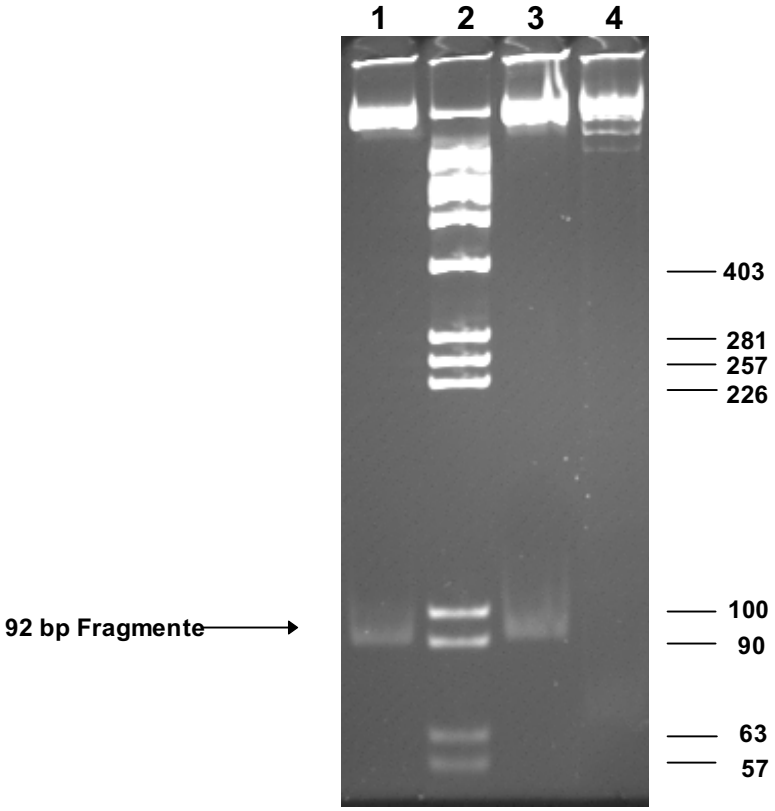


Abbildung 16. Polyacrylamidgelbild zur Charakterisierung von pOM8HIS6. (1,3) pOM8HIS6 Ø *Eco* RI/*Pst* I, (2) Marker (pBR322 Ø *Alu* I), (4) pOM8 Ø *Eco* RI/*Pst* I. Größenangaben in bp.

Spaltungen mit *Mph* 11031 führten zu der erwarteten Linearisierung.
Ein Fragment mit einer Größe von 1317 bp (Fragment VI), welches ein 3´-terminalem Teilstück von phoA (290 bp) enthielt, wurde über *Eco* RI und *Hin*d III Schnittstellen aus p7BAP in pOM8HIS6 kloniert, wobei der Vektor pHIS6BAP (4002 bp) entstand. Der Vektor wurde durch Spaltung mit *Eco* RI und *Hin*d III charakterisiert. Es waren die erwarteten Fragmente mit den Größen 1317 und 2685 bp zu erkennen (Abb. 17).

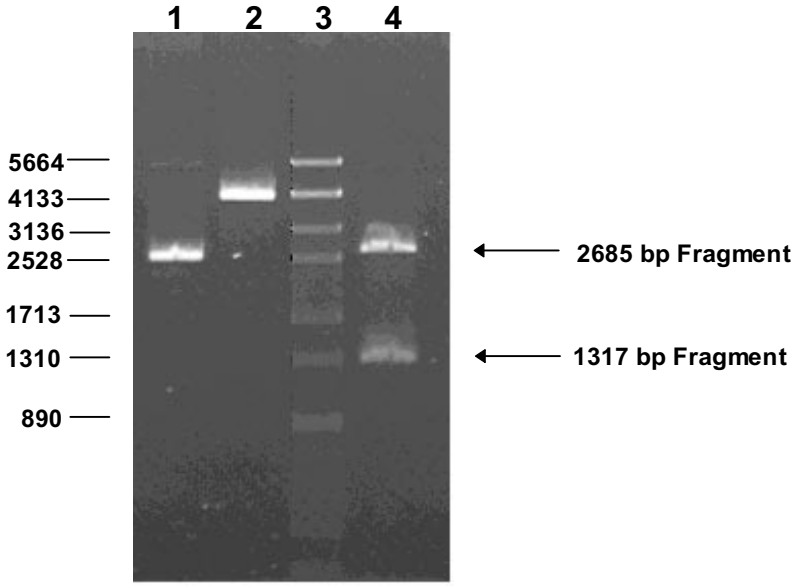


Abbildung 17. Agarosegelbild zur Charakterisierung von pHIS6BAP. (1) pHIS6BAP, (2) pHIS6BAP Ø *Hin*d III, (3) Marker, (4) pHIS6BAP Ø *Hin*d III/*Eco* RI.

pHIS6BAP wies unterhalb des 3´-terminalen Teilstücks von phoA in einem Abstand von 1039 bp die sechs Histidincodons auf. Der Vektor wurde zur Deletion der dazwischenliegenden Sequenz in die inverse PCR eingesetzt.
Die Vektor-PCR erfolgte mit zwei Primern der Sequenz TTT CAG CCC CAG AGC GG (Primer I, 3´-Terminus von phoA) und CAC CAC CAT CAC CAT CAC (Primer II, Histidincodons). Die Primer wurden nach der Phosphoamiditmethode am DNA-Synthesizer erzeugt und DMT-on mit RP-HPLC aufgereinigt. Die bei der PCR verwendete DNA-Polymerase war Exo$^-$*Pfu*. Eingesetzt wurden jeweils 10 ng Plasmid, 100 pmol Primer und 6 U Enzym. Zur Begünstigung der Polymerisation wurde pHIS6BAP vor der PCR mit *Hin*d III linearisiert. Die Schnittstelle für *Hin*d III befand sich in der zu deletierenden Sequenz zwischen 3´-Terminus von phoA und den Histidincodons. Die DNA wurde über eine Länge von 2944 bp amplifiziert. Um eine vollständige Extension zu gewährleisten, wurde das PCR-Produkt nach Umpufferung mit Klenow-Fragment und dNTPs versetzt. Die Aufreinigung erfolgte mit einem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen). Vor der Ligation der Blunt Ends wurde die DNA durch Polynukleotidkinase (PNK) 5´-phosphoryliert.

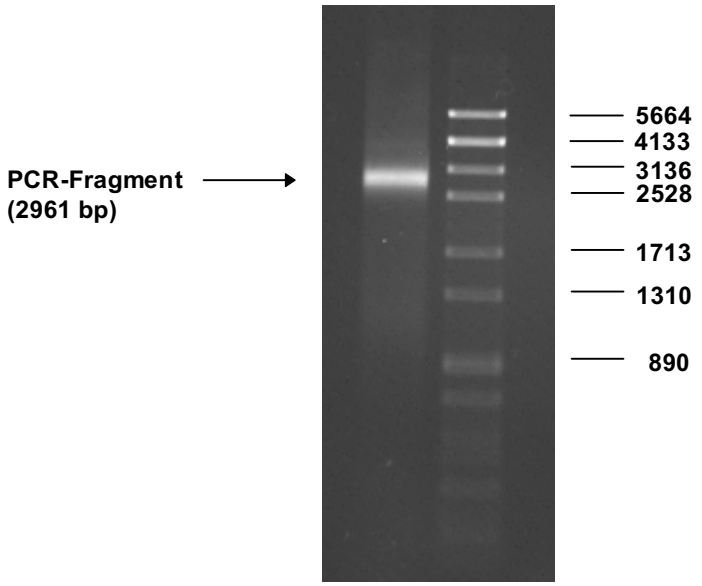


Abbildung 18. Gelbild zur Charakterisierung des Amplifikates der Vektor-PCR. Das gewünschte Fragment mit einer Größe von 2961 bp wurde gebildet. Durch Ligation der Blunt Ends des Fragments entsteht der Vektor pHISBAP2.

Der erhaltene Vektor pHISBAP2 (2961 bp) wurde durch Spaltung mit *Eco* RI und *Sca* I charakterisiert, wobei die erwarteten Fragmente mit einer Größe von 1725 und 1236 bp entstanden.
Die amplifizierte Teilsequenz von phoA wurde durch Sequenzierung nach dem Verfahren von *Sanger* überprüft. pHISBAP2 besitzt als Derivat von pOM8 eine -40 Priming Site, so daß die Sequenzierung mit dem entsprechenden Standardprimer vorgenommen werden konnte. Die Klonierung des mit den Histidincodons fusionierten 3´-terminalen Teilstücks von phoA in p7BAP sollte über einen *Sph* I Schnitt im Teilstück erfolgen. Die Sequenz mußte daher bis zu dieser Position überprüft werden. Die Gesamtlänge der zu sequenzierenden DNA betrug 142 bp.
Die Sequenzierungen ergaben, daß bei der Mehrzahl der Klone eine Deletion von 147 bp im phoA-Teilstück während der PCR erfolgt sein mußte. Dieses überraschende Ergebnis ist auf eine Basenhomologie des Primers II mit einer Sequenz im Gegenstrang zurückzuführen. Eine Sequenz von 12 Basen (von insgesamt 18) im Primer II war mit einer Sequenz im phoA-Teilstück identisch. Die PCR erfolgte somit hauptsächlich unter ausschließlicher Beteiligung des Primers II, wodurch sich die beobachtete Deletion ergab. Da sich der *Sph* I Schnitt mit im deletierten Bereich befand, konnten solche Klone, bei denen die PCR in der gewünschten Weise verlief, durch Spaltung mit *Sph* I identifiziert werden. Eine Erhöhung der Hybridisierungstemperatur von 45 auf 50 °C bei der PCR führte ausschließlich zu Klonen mit Plasmid-DNA, die durch *Sph* I linearisiert werden konnte. Ein Klon, dessen Plasmidsequenz der erwarteten Sequenz entsprach, wurde in die weitere Klonierung eingesetzt.

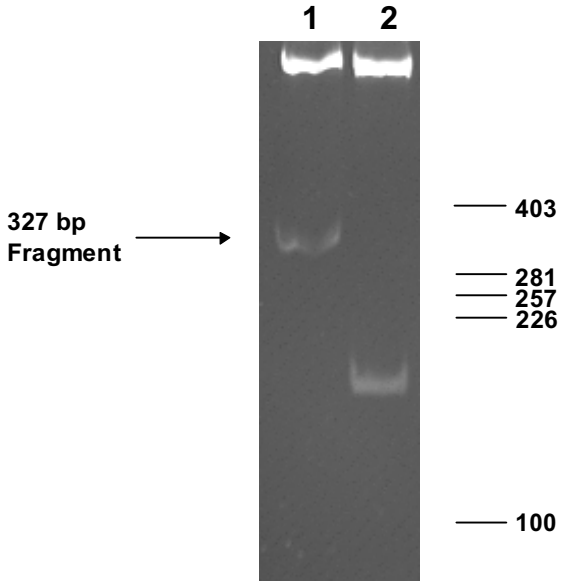


Abbildung 19. Polyacrylamidgelbild zur Charakerisierung von pHISBAP2. Es wurde mit *Eco* RI und *Pst* I geschnitten. Nur der Klon in Lane 1 zeigt das erwartete Fragment von 327 bp.

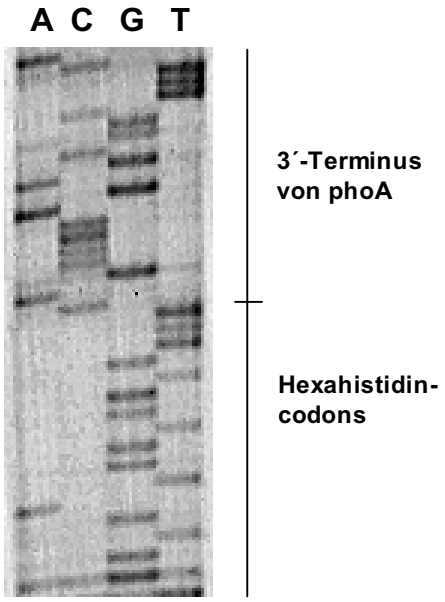


Abbildung 20. Ausschnitt aus dem Autoradiogramm der *Sanger*-Sequenzierung von pHISBAP2. Die Hexahistidincodons schließen nahtlos an den 3´-Terminus von phoA an und liegen somit in-frame. Die amplifizierte Sequenz des 3´-Terminus von phoA konnte bis zur *Sph* I-Schnittstelle verifiziert werden.

Das mit den Histidincodons fusionierte 3´-terminale Teilstück von phoA wurde über *Sph* I/*Pst* I Schnittstellen aus pHISBAP2 in p7BAP kloniert, wodurch das Gen phoAHis6 und der Vektor pBAPHIS6 (5636 bp) entstand. Zur Charakterisierung wurde der Vektor mit *Eco* RI und *Pst* I gespalten, wobei die gewünschten Fragmente mit der Größe 4167, 818 und 331 und 320 bp entstanden.
pBAPHIS6 wurde in HB101 und JM83 kloniert.

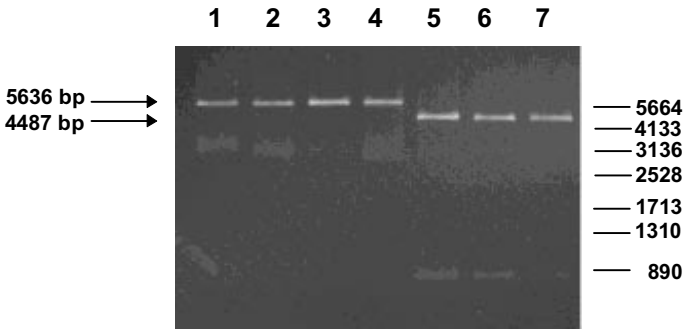


Abbildung 21. Gelbild zur Charakterisierung von pBAPHIS6-Klonen. (1-4) pBAPHIS6 Ø *Hin*d III, (5-7) pBAPHIS6 Ø *Eco* RI.

3.7 Expression von hexahistidinmodifizierter BAP in E. coli

Mit pBAPHIS6 transformierte *E. coli* HB101 wurden nach 2 h Wachstum jeweils 2 h mit 1 mM IPTG induziert und untersucht wie in 3.4 beschrieben. Das Monomer des rekombinanten Proteins BAPHis6 hat eine theoretische Größe von 48.0 kDa (ohne Signalpeptid).

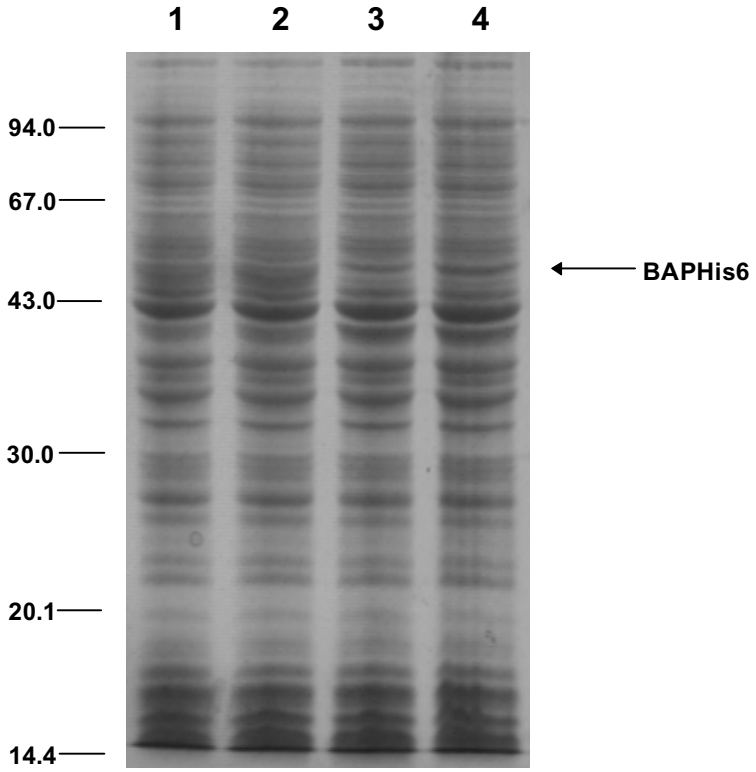


Abbildung 22. PAGE von Zellysaten (HB101). (1) untransformiert, 4 h Wachstum, (2) untransformiert, 2 h Induktion mit 1 mM IPTG, (3) mit pBAPHIS6 transformiert, nicht induziert, (4) mit pBAPHIS6 transformiert, 2 h Induktion mit 1 mM IPTG. Anfärbung mit Coomassie.

Im Falle der mit pBAPHIS6 transformierten und induzierten Zellen (4) ist im Vergleich zu den nicht transformierten Zellen (1) eine zusätzliche Bande im Größenbereich von 44.9 kDa erkennbar. Auch diese Abweichung von der erwarteten Größe ist, wie bereits im Fall von BAP in 3.5, darauf zurückzuführen, daß die SDS-PAGE nur eine relativ ungenaue Bestimmung von Proteingrößen zuläßt. Das Molekulargewicht des aufgereinigten Proteins BAPHis6 wurde daher durch MALDI-TOF MS ermittelt (siehe 3.13). Als weitere negativ-Kontrolle ist in Abb. 9 das Lysat von untransformierten, aber mit 1 mM IPTG inkubierten Zellen zu sehen (2). Die Inkubation mit IPTG hatte erwartungsgemäß keinen Einfluß auf die Proteinexpression der untransformierten Zellen. Schon bei den transformierten, aber nicht induzierten Zellen (3) ist eine zusätzliche Expression zu beobachten, wie es bereits bei p7BAP der Fall war, allerdings weniger stark als bei den induzierten Zellen. Das exprimierte Protein scheint homogen zu sein, auch wenn sich nicht sagen läßt, ob es in prozessierter oder unprozessierter Form vorliegt.

3.8 Qualitative Überprüfung der enzymatischen Aktivität von BAP und BAPHis6 im Zellysat

Um festzustellen, ob die exprimierten Enzyme über katalytische Aktivität verfügen, wurden die Zellysate der mit p7BAP und pBAPHIS6 transformierten und induzierten *E. coli* HB101 auf ein natives Proteingel aufgetragen. Um eine Denaturierung und somit eine Inaktivierung der Enzyme zu vermeiden, wurden die Zellen nicht durch einen Lysepuffer wie in 3.5 beschrieben aufgeschlossen, sondern durch Ultraschalleinwirkung unter Eiskühlung in einem Sonificator. Das native Proteingel enthielt im Gegensatz zu einem denaturierenden Proteingel kein SDS. Die Laufweite der Proteine im Gel war daher nicht, wie sonst üblich, umgekehrt proportional zu ihrer Größe, weshalb auch kein Molekulargewichtsmarker mit auf das Gel aufgetragen wurde. Da BAP ein Metalloenzym ist, wurde zum Probenpuffer kein EDTA gegeben.

Zum Nachweis ihrer Aktivität wurden die Enzyme direkt im Gel durch Inkubation mit BCIP und NBT sichtbar gemacht (Abb. 23). Die Durchführung eines Western-Blots war somit nicht notwendig. Bei der durch alkalische Phosphatase katalysierten Reaktion von BCIP und NBT entsteht ein unlöslicher tiefblauer bzw. purpurfarbener Niederschlag von Indigo und Diformazan [86]. Es zeigte sich, daß aus 25 µl Zellsuspension gewonnenes BAPHis6 (etwa 120 pg Protein) auf diese Weise noch gut im Gel sichtbar gemacht werden konnte.

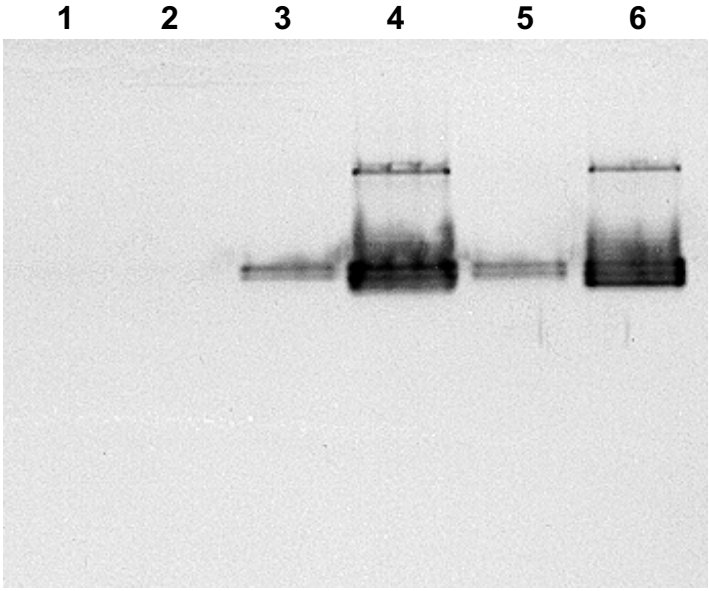


Abbildung 23. Natives Polyacrylamidgel von Zellysaten von HB101, angefärbt mit BCIP/NBT. (1) untransformiert, (2) untransformiert, induziert, (3) mit p7BAP transformiert, (4) mit p7BAP transformiert, induziert, (5) mit pBAPHIS6 transformiert, (6) mit pBAPHIS6 transformiert, induziert. Erläuterungen siehe Text.

Die Farbreaktion erfolgte innerhalb weniger Minuten. Bei den Lysaten der mit p7BAP (4) bzw. pBAPHIS6 (6) transformierten und induzierten Zellen bildeten sich jeweils deutlich sichtbare Banden. Sowohl BAP als auch BAPHis6 verfügten über katalytische Aktivität. Eine wesentlich schwächere, aber immer noch eindeutig erkennbare Aktivität war auch im Fall der mit p7BAP (3) und pBAPHIS6 (5) transformierten, aber nicht induzierten Zellen zu sehen. Keinerlei Aktivität hingegen war bei den untransformierten Zellen zu erkennen, gleichgültig ob mit IPTG inkubiert wurde (2) oder nicht (1).
Die Abwesenheit von Banden bei den untransformierten Zellen läßt darauf schließen, daß die genomische BAP nur in solch einem geringen Maße exprimiert wird, daß sie mit dieser Methode nicht nachweisbar ist. Der Größenunterschied zwischen BAP und BAPHis6 von etwa 800 Da ist zu klein, um sich im Gel bemerkbar zu machen, weshalb die Banden der beiden Proteine auf derselben Höhe liegen. Deutlich zu sehen ist, daß die Banden von BAP und BAPHis6 sich aus jeweils drei diskreten Banden zusammensetzen, welche alle enzymatische Aktivität aufweisen. Weshalb es zur Bildung dieser Banden kommt, ist nicht bekannt. Ebenfalls auf dem Gel erkennbar ist eine weitere Bande mit enzymatischer Aktivität, die sich oberhalb von BAP und BAPHis6 befindet. Die Natur dieser Bande ist unbekannt.
Bei der Analyse von kommerziell erhältlicher nativer BAP (MBI) mit dieser Methode wurde eine enzymatisch aktive Doppelbande im Gel erhalten, welche auf derselben Höhe lief wie BAPHis6. Weitere Banden konnten nicht detektiert werden.

3.9 Isolierung von BAPHis6

Zur Gewinnung von BAPHis6 aus *E. coli* wurden mit pBAPHIS6 transformierte Zellen der Stämme HB101 und JM83 verwendet. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte mit IPTG. Eine Konzentration von 1 mM IPTG und eine Inkubationszeit von 2 h erwiesen sich dabei als optimal.
Zu analytischen Zwecken wurde BAPHis6 durch Aufschluß der Zellen mit einem Harnstoffpuffer gewonnen. Hingegen wurden die Zellen bei präparativen Aufarbeitungen durch möglichst schonende Methoden aufgeschlossen, um die enzymatische Aktivität von BAPHis6 nicht zu beeinträchtigen. Der Aufschluß durch Ultraschall im Sonificator erwies sich als zu diesem Zweck geeignet. Höhere Ausbeuten an Enzym wurden jedoch durch ein Aufschlußverfahren gewonnen, bei dem die Zellen in Triton-X100-haltigem Puffer wiederholt eingefroren und aufgetaut wurden.

3.9.1 Anbindung an Ni-NTA-Harz

Die Isolierung von BAPHis6 aus dem Zellysat mit Ni-NTA-Harz erfolgte weitgehend nach den Angaben des Herstellers [75]. Die Aufreinigung wurde unter Benutzung von Zentrifugenfiltern im Batch-Verfahren vorgenommen. Diese Methode ist schneller und apparativ weniger aufwendig als die Aufreinigung durch Säulenchromatographie und lieferte gute Ausbeuten an BAPHis6 bei vollständiger Reinheit des Proteins. Durch die Zentrifugenfilter wurden Verluste an Ni-NTA-Harz während der Aufreinigung vermieden. Standardmäßig wurden zur Isolierung von BAPHis6 in large-scale Ansätzen etwa 4 µl equilibrierte Ni-NTA-Harz-Suspension je ml Zellsuspension verwendet. Eine Steigerung der verwendeten Menge auf bis zu 50 µl Ni-NTA-Harz-Suspension je ml Zellsuspension führte zu keinen Verunreinigungen durch unspezifische Bindung von Proteinen an das Harz, jedoch kam es auch zu keiner nennenswerten Erhöhung der absoluten Ausbeute an BAPHis6.
Die Anwesenheit von $NiCl_2$ bei der Bindung von His_6-Protein an Ni-NTA kann den Hintergrund an unspezifisch gebundenem Protein verringern [85], führt jedoch auch zu Ausbeuteverlusten, weshalb diese Methode nicht angewendet wurde.
Es zeigte sich, daß eine Aktivierung des Ni-NTA-Harzes durch Behandlung mit $NiCl_2$ vor der Aufreinigung zu einer verbesserten Ausbeute führte. Das in eine Aufreinigung eingesetzte Ni-NTA-Harz wurde üblicherweise nicht wiederverwendet.
Die Bindung des Proteins an das Harz wurde bei unterschiedlichen Temperaturen vorgenommen. Inkubationen bei 0 °C, 4 °C und bei RT führten zu keinen nennenswert unterschiedlichen Ausbeuten. Standardmäßig erfolgte die Bindung bei large-scale Aufarbeitungen bei einer Temperatur von 4 °C und pH 8.0. Die Inkubationszeit betrug üblicherweise 1 h.
Die Untersuchung des Überstandes durch SDS-PAGE zeigte, daß sich kein ungebundenes rekombinantes Protein mehr in Lösung befand und die Anbindung an Ni-NTA-Harz somit quantitativ erfolgt war.

3.9.2 Waschen und Elution

Da IMAC-Phasen auch als Ionenaustauscher wirken [36], kommt es bei der Beladung von Ni-NTA-Harz mit rekombinanten histidinmodifizierten Proteinen zu unspezifischen Bindungen von anderen im Zellysat vorhandenen Proteinen an das Harz. Vor der Elution des rekombinanten Proteins wird das Ni-NTA-Harz daher gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Durch eine Verringerung des pH können verunreinigende Proteine protoniert und somit eluiert werden. Der pH des Waschpuffers darf aber nicht so niedrig sein, daß auch rekombinantes Protein entfernt wird. Das an Ni-NTA-Harz gebundene BAPHis6 wurde mit saurem Natriumphosphatpuffer gewaschen, wobei sich zeigte, daß der pH des Waschpuffers bis auf 5.5 verringert werden konnte, ohne daß es zu einer nennenswerten Elution von BAPHis6 kam. Alle Verunreinigungen konnten auf diese Weise vom Harz entfernt werden.
Alternativ können an das Harz gebundene Verunreinigungen auch durch Waschen mit imidazolhaltigem Puffer eluiert werden. Imidazol ist ein potentieller Ligand für Ni^{2+}-Ionen und kann daher an Ni-NTA-Gruppen gebundene Proteine verdrängen. Wiederum darf die Imidazol-Konzentration nicht so groß sein, daß rekombinantes Protein eluiert wird. Imidazolhaltiger Waschpuffer wurde in dieser Arbeit jedoch nicht verwendet.

An Ni-NTA-Harz immobilisiertes BAPHis6 wurde durch Versetzen mit pNPP in Assaypuffer auf seine katalytische Aktivität hin getestet. Eine sofort auftretende Gelbfärbung von Harz und Lösung durch gebildetes p-Nitrophenolat wies auf eine starke Aktivität des Enzyms hin. Dieses Ergebnis war nicht überraschend, da BAP bereits auf vielfache Weise unter Wahrung seiner katalytischen Aktivität immobilisiert werden konnte. Die spezifische Aktivität von immobilisierter BAP ist dabei sogar generell höher als die von nicht immobilisiertem Enzym [54]. Ein anderes Beispiel von einem an Ni-NTA-Harz immobilisierten katalytisch aktiven Enzym, hexahistidinmarkierte RNA-Polymerase, ist in der Literatur beschrieben worden [43].

Die Elution hexahistidinmarkierter Proteine von Ni-NTA-Harz kann durch Verringerung des pH erfolgen, wobei die Histidinreste protoniert werden und nicht mehr als Liganden für Ni^{2+} fungieren können. Diese Methode kann nur angewendet werden, wenn das jeweilige Protein nicht säureempfindlich ist. Zur Elution von BAPHis6 wurde, wie im Waschschritt, ein saurer Natriumphosphatpuffer verwendet. Das Protein konnte bei einem pH von 4.5 zum größten Teil eluiert werden. Die Analyse durch SDS-PAGE zeigte eine Bande im erwarteten Größenbereich. Eine Inkubation des Harzes mit EDTA nach der Eluation mit saurem Natriumphosphatpuffer setzte nur geringe Mengen noch nicht eluierten Proteins frei, wobei im Gel eine zusätzliche Bande unbekannter Herkunft zu beobachten war (Abb. 24).

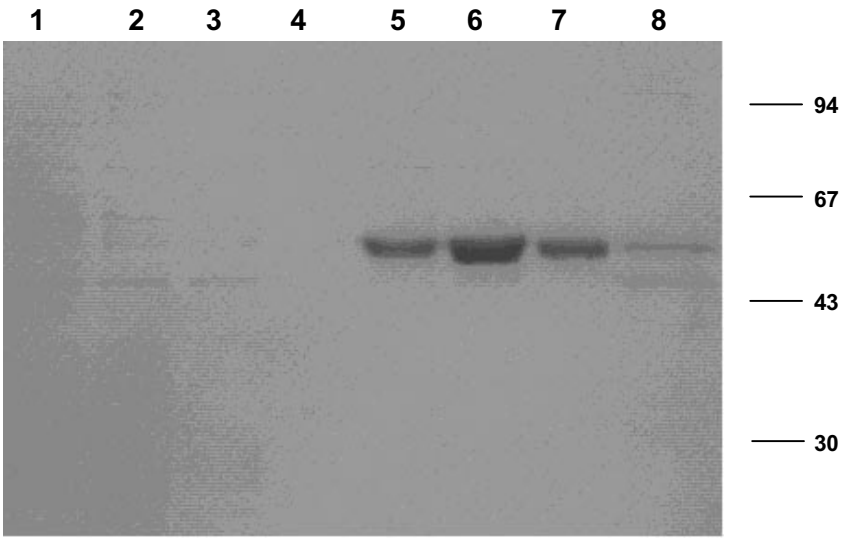


Abbildung 24. PAGE von mittels IMAC aufgereinigtem BAPHis6. (1-4) Eluate von Waschschritten (Waschpuffer pH 5.5), (5-7) Elutionsschritte (Elutionspuff er pH 4.5), (8) Abschließende Elution mit 100 mM EDTA. So gut wie kein BAPHis6 wurde bei pH 5.5 eluiert, wohingegen die Elution bei pH 4.5 fast quantitativ war. Die Anfärbung des Geles erfolgte mit Coomassie.

Das durch Elution bei pH 4.5 gewonnene Protein war frei von Verunreinigungen und wurde bei 4 °C in Lagerpuffer aufbewahrt.
Die Elution von an Ni-NTA-Harz gebundenen hexahistidinmarkierten Proteinen kann auch mit Substanzen vorgenommen werden, die potentielle Liganden für Ni^{2+} sind, wie Imidazol. Dieses Verfahren ist schonender als die Elution durch niedrigen pH, hat aber im vorliegenden Fall den Nachteil, daß das Imidazol erst wieder entfernt werden muß, bevor BAPHis6 mit NTA-funktionalisierten Oligonukleotiden Konjugate bilden kann. Imidazol kann auch zur Elution von Ni^{2+} aus dem Ni-NTA-Harz führen [85]. Eine größtenteils quantitative Elution von BAPHis6 war möglich mit 500 mM Imidazol. Das Imidazol wurde nach der Elution durch Dialfiltration aus dem Eluat entfernt. Das Enzym wurde in Lagerpuffer oder Wasser aufgenommen und bei 4 °C aufbewahrt. Auch nach mehreren Tagen war bei in Wasser aufgenommenem BAPHis6 keine Verringerung der spezifischen Aktivität zu beobachten.
Vielfach wurde bei der Elution von BAPHis6 bei pH 4.5 oder mit Imidazol eine enzymatisch aktive Doppelbande im Polyacrylamidgel beobachtet. Die Natur dieser Bande ist nicht bekannt.

Komplexbildner wie EDTA können Ni^{2+} aus dem NTA-Harz lösen und so zur Freisetzung des jeweiligen Proteins führen. Die Elution von Proteinen mit EDTA ist zwar quantitativ, da BAPHis6 jedoch ein Metalloenzym ist, würde es durch EDTA inaktiviert werden. In solch einem Fall muß die katalytische Aktivität durch Umsetzung des Apoenzyms mit Magnesium- und Zinkionen wiederhergestellt werden [66]. EDTA in einer Konzentration von 50 µM kann auch im Wasch- und Bindungspuffer verwendet werden, um störende Schwermetallionen aus der Lösung zu entfernen, wobei die Bindung der rekombinanten Proteine an Ni-NTA nicht beeinträchtigt wird [85]. Elutionen von BAPHis6 durch EDTA wurden nur zu analytischen Zwecken vorgenommen.

Die Bildung von Einschlußkörpern mit unlöslichem Protein im Cytosol, die bei der induzierten Überexpression von Proteinen gelegentlich zu beobachten ist, erfolgte im Fall von BAPHis6

nicht. Versuche zur Lokalisierung des Proteins nach [75] deuteten darauf hin, daß das exprimiertes BAPHis6 sich in löslicher Form im Periplasma befand.

3.10 Qualitative Analyse der enzymatischen Aktivität von durch IMAC aufgereinigtem BAPHis6

Zur Analyse der enzymatischen Aktivität wurde durch IMAC aufgereinigtes BAPHis6 mittels SDS-PAGE untersucht. Die Anfärbung des Proteins erfolgte durch Umsetzung mit BCIP und NBT im Gel wie unter 3.7, mit dem Unterschied, daß diesmal kein natives, sondern ein normales, SDS-haltiges denaturierendes Gel verwendet wurde. Die Probenvorbereitung geschah auf zwei unterschiedliche Weisen. Eine Probe BAPHis6 wurde zur vollständigen Denaturierung unmittelbar vor dem Auftragen auf das Gel 5 min mit EDTA- und mercaptoethanolhaltigem Puffer bei 95 °C inkubiert. Eine andere Probe wurde mit demselben Puffer versetzt, aber ohne Inkubation sofort auf das Gel aufgetragen. Jede Probe wurde zweimal aufgetragen. Nach dem Gellauf wurde das Gel halbiert und die eine Hälfte normal mit Coomassie Brilliant Blue (B), die andere Hälfte durch BCIP und NBT angefärbt (A) (Abb. 25).

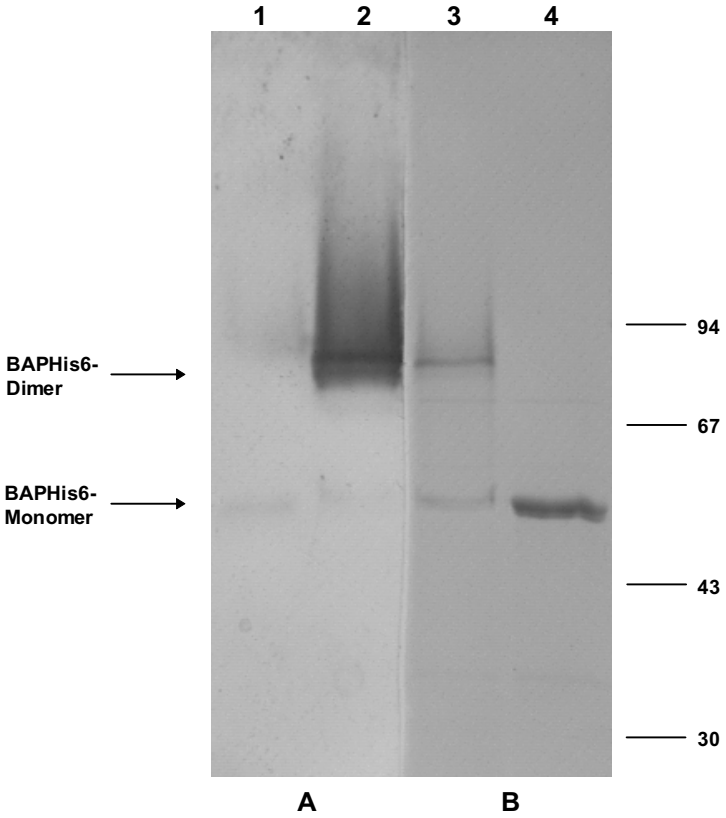


Abbildung 25. SDS-PAGE von mittels IMAC aufgereinigtem BAPHis6. (A) Anfärbung mit BCIP/NBT, (B) Anfärbung mit Coomassie. (1,4) 5 min Denaturierung bei 95 °C, (2,3) keine Denaturierung vor dem Auftragen. Erläuterungen siehe Text.

Die Anfärbung mit Coomassie zeigt bei der bei 95 °C denaturierten Probe wie erwartet eine Bande für das Monomer von BAPHis6 (4). Es handelt sich um eine Doppelbande, wie sie bei der Präparation häufig auftrat. Daneben ist eine nicht-denaturierte Probe aufgetragen (3). Schwächer, aber noch deutlich zu erkennen, ist auch hier die Doppelbande des Monomers. Der Großteil des Proteins liegt aber noch in der dimeren Form vor, wie aus der höher laufenden Bande zu erkennen ist. Von Interesse ist die nicht-denaturierte, mit BCIP/NBT angefärbte Probe (2). Deutlich zu sehen ist, daß wie erwartet nur das Dimer von BAPHis6 über katalytische Aktivität verfügt. Die ebenfalls zu sehende schwache Bande für das Monomer ist auf die Reassoziation der Monomere zu aktiven Dimeren im Gel zurückzuführen. Sogar bei der denaturierten Probe ist sowohl im Bereich des Dimers als auch des Monomers eine, wenn auch sehr schwache, katalytische Aktivität festzustellen (1). BAPHis6 verfügt somit über eine große Stabilität und kann sich auch nach stringenter Denaturierung in gewissem Maße renaturieren.
Eine vollständige und permanente Inaktivierung des Enzyms gelang durch Inkubation mit 32% NH_3 bei RT für 24 h.

3.11 Quantifizierung von BAPHis6

Die Mengenbestimmung von BAPHis6 geschah mit dem Bicinchoninsäure Assay (Pierce). Diese Methode ist eine Modifikation der Biuret-Reaktion, bei welcher Cu^{2+} durch Proteine in alkalischer wäßriger Lösung zu Cu^{+} reduziert wird. BCA ist ein zweizähniger Ligand, der in der Lage ist, das gebildete Cu^{+} zu komplexieren. Je zwei BCA-Moleküle bilden mit einem Cu^{+}-Ion einen violett gefärbten, löslichen Komplex. Die Reaktion kann daher photometrisch quantifiziert werden. Zur Eichung wird eine Meßreihe mit BSA-Lösungen bekannter Konzentration erstellt (Abb. 26).

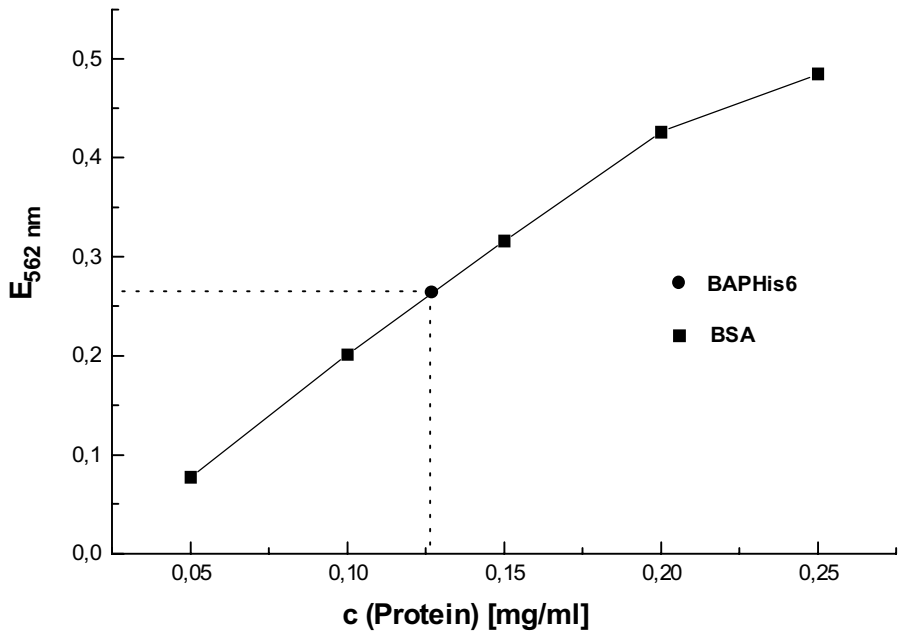


Abbildung 26. Eichgerade zur photometrischen Bestimmung der Konzentration von isoliertem BAPHis6 nach der Bicinchoninmethode unter Verwendung von BSA.

Mit diesem Verfahren konnten die Ausbeuten an aus *E. coli* isoliertem BAPHis6 bestimmt werden. Typischerweise wurden aus 200 ml Zellsuspension etwa 0.7 bis 1 mg Enzym gewonnen. Die Ausbeuten waren bei Verwendung von Kulturen des Stammes JM83 im allgemeinen etwas höher als bei Kulturen des Stammes HB101.
Nach Ermittlung der spezifischen Aktivität von BAPHis6 einer Charge (siehe 3.12) konnte Enzym aus jeweils derselben Charge durch Bestimmung der enzymatischen Aktivität quantifiziert werden.

3.12 Bestimmung der spezifischen Aktivität von BAPHis6

Die Aktivitätsbestimmung von alkalischer Phosphatase wird durch Umsetzung mit Substraten vorgenommen, welche durch das Enzym zu löslichen farbigen Produkten dephosphoryliert werden. Die Konzentration der entstandenen Produkte wird photometrisch ermittelt. Aufgrund der geringen Spezifität der alkalischen Phosphatase können bei dieser Umsetzung verschiedene Substanzen Verwendung finden, wie z. B. 4-Nitrophenylphosphat (pNPP), Phenylphosphat, β-Glycerophosphat, Indoxylphosphat, β-Naphtylphosphat, Phenolphtaleinphosphat und Tymolphtaleinphosphat [54]. Üblicherweise erfolgt die Aktivitätsbestimmung mit pNPP. Bei dessen Dephosphorylierung in alkalischer wäßriger Lösung bildet sich das gelbgefärbte 4-Nitrophenolat-Anion. Diese Reaktion kann bei λ=405 oder 410 nm photometrisch quantifiziert werden. Eine enzymatische Einheit (U) der alkalischen Phosphatase ist definiert als die Menge Enzym, die 1 µmol pNPP in einer Minute hydrolysiert [87]. Die spezifische Aktivität von BAP beträgt dabei 30-40 U/mg [66]. Die Assaybedingungen sind jedoch nicht einheitlich definiert und können daher stark variieren. Der Assaypuffer enthält üblicherweise 10 mM pNPP und 0.25 mM $MgCl_2$. Häufig ist außerdem 1 M Diethanolamin enthalten. Die Gegenwart von 1 M Diethanolamin verdoppelt die beobachtete Reaktionsrate [66] und führt somit zu einer Erhöhung der Empfindlichkeit des Assays. Die Bestimmung kann bei pH 8.0, 8.2 [88], 9.6, 9.8 [76] oder 10.5 und bei einer Temperatur von 37 °C oder 25 °C durchgeführt werden [66]. Die bei unterschiedlichen Bedingungen gemessenen spezifischen Aktivitäten können sich dabei um den Faktor fünf voneinander unterscheiden.
Die spezifische Aktivität von BAPHis6 wurde in dieser Arbeit nach der Methode von *Mössner* et al. [76] und nach der Vorschrift von Fermentas (MBI Fermentas GmbH) [89] bestimmt.
Die Bestimmung nach Fermentas erfolgte in Tris-HCl-Puffer mit 1 mM pNPP und 1 mM $MgCl_2$ bei pH 8.0 und 37 °C. Zum Vergleich wurde käuflich erhältliche BAP verwendet. Für BAPHis6 ergab sich unter diesen Bedingungen eine spezifische Aktivität von 18 U/mg. Die spezifische Aktivität von BAP (Fermentas) beträgt gemäß Herstellerangaben 20-50 U/mg [89].
Die Methode nach *Mössner* war ursprünglich zur Aktivitätsbestimmung von AP aus Säugetieren gedacht, sie eignet sich jedoch auch zur Bestimmung der Aktivität von BAP. Bei dieser Methode wurde Puffer mit 1 M Diethanolamin verwendet, der pH betrug 9.8. Die Konzentration an pNPP war um das Hundertfache größer ist als bei der Methode nach Fermentas. Im Gegensatz zur Vorschrift nach Fermentas wurde bei der Methode nach *Mössner* bei Raumtemperatur inkubiert, was die Bestimmung vereinfachte. Wie erwartet wurde im diethanolaminhaltigem Puffer für BAPHis6 eine im Vergleich zur Methode nach Fermentas annähernd doppelt so große spezifische Aktivität von 35 U/mg bestimmt (Abb. 27).

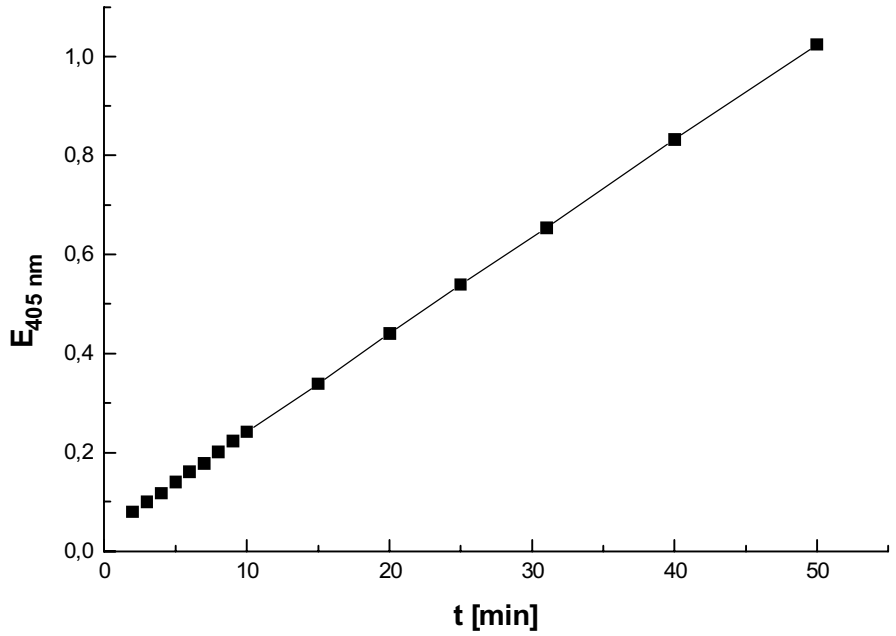


Abbildung 27. Photometrische Aktivitätsbestimmung von BAPHis6 nach der Methode von *Mössner* in diethanolaminhaltigem Puffer. Das Substrat war 4-Nitrophenylphosphat.

Für kommerziell erhältliche BAP (Fermentas) wurde mit dieser Methode im Gegensatz zu den Angaben des Herstellers (s.o.) eine spezifische Aktivität von lediglich 6 U/mg ermittelt. Es ist jedoch davon auszugehen, daß dieser relativ geringe Wert chargenbedingt war. BAPHis6 konnte mehrere Tage lang in Assaypuffer nach *Mössner* bei 4 °C aufbewahrt werden, ohne daß sich die spezifische Aktivität des Enzyms verringerte.
Aus allen Bestimmungen ließ sich ableiten, daß das isolierte rekombinante Enzym BAPHis6 über eine spezifische Aktivität von ungefähr derselben Größe verfügt wie das native Enzym BAP. Der angefügte Hexahistidinrest führte somit nicht zu einer Beeinträchtigung der katalytischen Aktivität.
Bei Aufbewahrung in reinem Waser bei 4 °C verringerte sich die spezifische Aktivität von BAPHis6 in 100 Tagen um rund ein Drittel.

3.13 Untersuchung von BAPHis6 mit MALDI-TOF MS

Das Molekulargewicht von BAPHis6 wurde durch MALDI-TOF Massenspektrometrie ermittelt. Bei diesem Verfahren muß gewährleistet sein, daß die jeweiligen Proben frei von Salzen oder anderen störenden Verbindungen sind. Der Puffer, mit dem BAPHis6 vom Ni-NTA-Harz eluiert wurde, enthielt 300 mM NaCl und 10% Glycerin, was für die Vermessung mit MALDI-TOF MS ungünstig ist. Das Protein wurde daher vor der Messung mit Ultrafree-MC Filtern (Millipore) mit einem MWCO von 30 kDa diafiltriert. Die Probe wurde bei dieser Prozedur abzentrifugiert und mehrfach mit Reinstwasser gewaschen.

Als Matrixsubstanzen wurden trans-3,5-Dimethoxy-4-hydroxy-zimtsäure und 3-Hydroxypicolinsäure (3-HPA) verwendet. Alle Messungen wurden im positiven Ionenmodus durchgeführt, d. h., die beobachteten Massen sind die der einfach protonierten Moleküle.

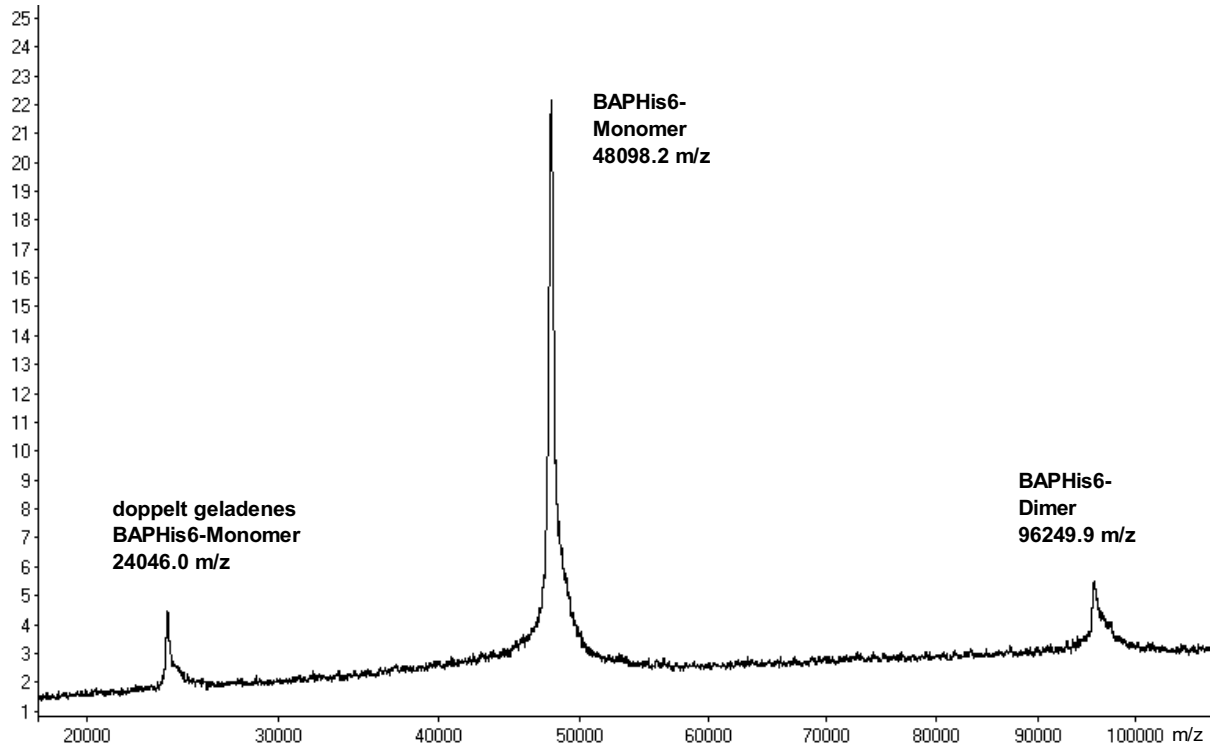


Abbildung 28. MALDI-TOF Massenspektrum von mit IMAC aufgereinigtem BAPHis6. Die verwendete Matrix war 3-HPA.

Im Spektrum in Abb. 28 ist ein Signal bei 48098 m/z zu sehen. Dieser Wert stimmt im Rahmen der Meßungenauigkeit sehr gut mit der theoretischen Größe des prozessierten Monomers von 48020 Da überein. Das Signal des Monomers besitzt die stärkste Intensität, was darauf zurückzuführen ist, daß die Untereinheiten von BAPHis6 nicht kovalent aneinander gebunden sind und deshalb während der Messung unter der Einwirkung der Laserenergie voneinander getrennt wurden. Die Auftrennung in die Monomere war jedoch nicht ganz vollständig, wie das relativ schwache Signal bei 96249 m/z zeigt. Es ist das Signal des Dimers, dessen theoretische Größe die doppelte des Monomeres, also 96040 Da beträgt. Ebenfalls zu sehen ist ein Signal für das zweifach positiv geladene Monomer bei 24046 m/z.
Die Masse des Signalpeptides von BAPHis6 beträgt 2.2 kDa. Protein, welches noch über das Signalpeptid verfügen würde, müßte sich um diesen Wert vom prozessierten Protein unterscheiden. Da jedoch keine entsprechenden Signale zu sehen sind, kann angenommen werden, daß das exprimierte BAPHis6 vollständig von seinem Signalpeptid befreit und in den periplasmatischen Raum sekretiert wurde.
Dem Spektrum ist zu entnehmen, daß das Protein in sehr hoher Reinheit isoliert werden konnte und völlig homogen vorlag. Die bei der PAGE gelegentlich auftretenden zusätzlichen Banden sind vermutlich auf unterschiedliche Tertiärstrukturen des Proteins im Gel zurückzuführen, welche ein unterschiedliches Laufverhalten zur Folge haben.

Auszuschließen ist eine Kontamination von BAPHis6 mit chromosomaler BAP, wie sie durch Bildung von entsprechenden chimären Dimeren hätte auftreten können. BAP und BAPHis6 unterscheiden sich um 823 Da voneinander, so daß eventuell vorhandene BAP im Spektrum zu sehen gewesen wäre. Der Anteil an chromosomaler BAP ist jedoch offenbar zu gering, um sich bemerkbar zu machen.
Die Auflösung des Spektrums ist nicht hoch genug, um sagen zu können, in welchen Anteilen die Isoenzyme von BAPHis6 vorliegen, da sich die Monomere der Isoenzyme nur um lediglich eine Aminosäure voneinander unterscheiden.

Die Charakterisierung von BAPHis6 mit MALDI-TOF MS ergab somit, daß das isolierte Protein über das korrekte Molekulargewicht verfügt sowie homogen und in völliger Reinheit vorliegt. Das Enzym kann ferner an Ni-NTA gebunden werden und besitzt die spezifische Aktivität der nativen BAP. BAPHis6 verfügt daher über alle Voraussetzungen, um als Reporterenzym für NTA-funktionalisierte Oligonukleotide Verwendung zu finden. Oligonukleotide mit NTA-Funktionen wurden bislang noch nicht dargestellt. Im Folgenden werden verschiedene mögliche Methoden zur NTA-Funktionalisierung von Oligonukleotiden erläutert.

4. Strategien zur Funktionalisierung von Oligonukleotiden mit NTA

Die Verwendung von NTA in der IMAC ist weit verbreitet, weil NTA dazu in der Lage ist, Schwermetallionen wie Ni^{2+} mit ausreichender Festigkeit zu binden [36]. Da sich das Ni-NTA-Bindungssystem bei der Aufreinigung von Hexahistidinproteinen bewährt hat, ist es naheliegend, die NTA-Gruppe auch bei der indirekten Markierung von Oligonukleotiden mit rekombinanten His_6-Enzymen einzusetzen. Das jeweilige Oligonukleotid muß zu diesem Zweck mit der NTA-Gruppe funktionalisiert werden.

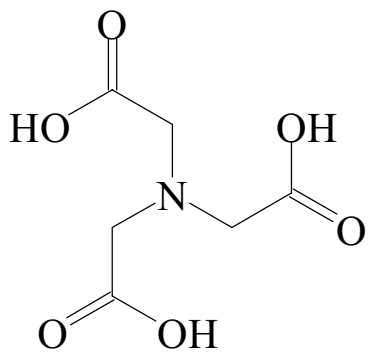


Abbildung 29. Struktur von Nitrilotriessigsäure.

In der IMAC ist die NTA-Gruppe über eine ihrer Methylengruppen an die jeweilige feste Phase, wie z. B. Sepharose, gebunden. Betrachtet man die Grundstruktur des Moleküls, so kann die NTA-Gruppe als eine Aminosäure gedacht werden, deren Aminoprotonen durch Essigsäurereste substituiert wurden. Der jeweilige Aminosäurerest ist dann der Linker, über welchen die NTA-Gruppe an die feste Phase gebunden ist. Ni-NTA-Harz wurde von *Hochuli* et al. hergestellt, indem epoxidierte Sepharose mit N^{α},N^{α}-Bis(carboxymethyl)-Lysin (Lysine-N^{α},N^{α}-diacetic acid, LDA) umgesetzt wurde. LDA wurde durch die zweifache Funktionalisierung der α-Aminogruppe von L-Lysin mit Essigsäuregruppen synthetisiert [37]. Die Verknüpfung von NTA mit dem Trägermaterial erfolgt in diesem Fall also über die primäre Aminogruppe des Aminosäurerestes von Lysin. Auch andere Aminosäuren als Lysin können theoretisch auf entsprechende Weise NTA-funktionalisiert werden. Der jeweilige Aminosäurerest muß lediglich eine funktionelle Gruppe aufweisen, über die nach der NTA-Funktionalisierung eine Verknüpfung mit dem Substrat, z. B. einem Oligonukleotid, erfolgen kann. Insbesondere die Aminosäuren Serin und Cystein sind zu diesem Zweck geeignet, Serin aufgrund seiner Hydroxylgruppe, Cystein wegen seiner Thiolgruppe.

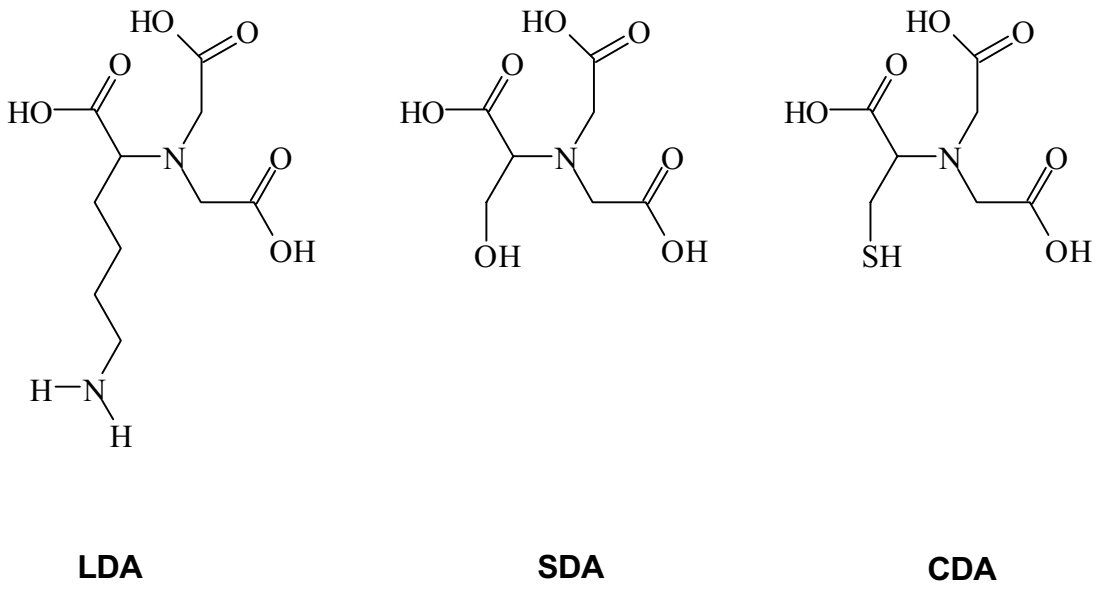


Abbildung 30. Die Strukturen von LDA, SDA und CDA. Die Verbindungen können formal von den Aminosäuren Lysin, Serin und Cystein abgeleitet werden. Der jeweilige Aminosäurerest bietet sich als Linker zur Verknüpfung mit einem Oligonukleotid an.

4.1 Cystein-N,N-diessigsäure (CDA)

Thiolierte Oligonukleotide können unter Bildung eines Disulfides mit cysteinhaltigen Proteinen verknüpft werden. Es sind verschiedene mögliche Synthesewege bekannt.
So kann z. B. ein 5´-phosphoryliertes Oligonukleotid nach Aktivierung mit EDC mit Cystamin zum Disulfid umgesetzt werden. Nach Reduktion mit DTT wird das entstandene Thiol mit 2,2´-Dithiopyridin in das reaktive 2´-Pyridyldisulfid überführt. Dieses kann mit cysteinhaltigem Protein zu einem Konjugat reagieren [100].
Bei einer alternativen Methode wird bei der Phosphoamiditsynthese von Oligonukleotiden ein Disulfidlinker zwischen CPG und dem ersten Nukleosid eingefügt. Durch Reduktion des erhaltenen Disulfides entsteht ein 3´-thioliertes Oligonukleotid, welches in die Pyridyldisulfidkopplung mit dem jeweiligen Protein eingesetzt werden kann [98].
Denkbar wäre bei beiden Methoden der Einsatz von CDA anstelle des Proteins als Thiol-Kopplungspartner (Abb. 31).

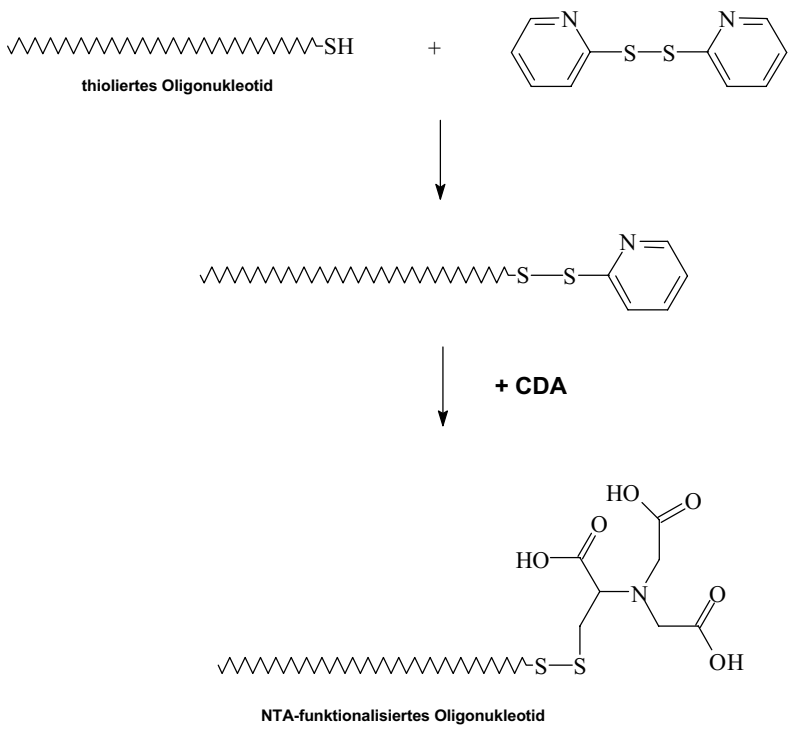


Abbildung 31. Gedachte Verknüpfung eines 3´- oder 5´-thiolierten Oligonukleotides mit CDA durch die Pyridyldisulfidkopplung unter Verwendung von 2, 2´-Dithiopyridin.

Die Synthese von CDA wurde zwar bislang nicht in der Literatur beschrieben, bekannt ist jedoch die Darstellung von N,N,N´,N´-Tetracarboxymethylcystin aus Cystin und Iodessigsäure in KOH [101] (Abb. 32).

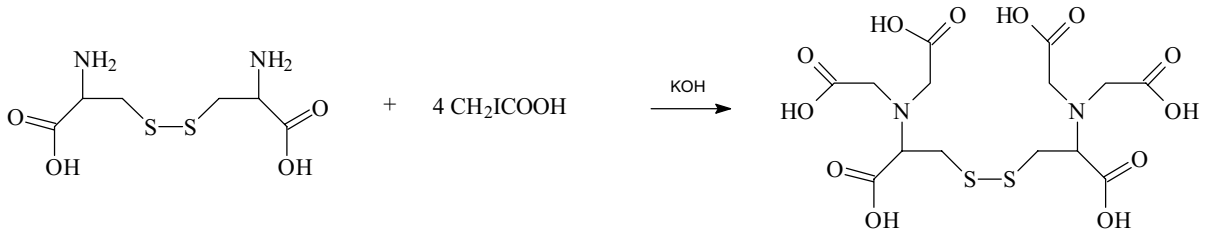


Abbildung 32. Synthese von N,N,N´,N´-Tetracarboxymethylcystin aus Cystin nach *Michaelis* et al.

Tetracarboxymethylcystin sollte unter denselben Bedingungen zu CDA reduzierbar sein, unter denen Cystin zu Cystein reduziert werden kann. Die Reduktion von Cystin zu Cystein ist eine seit langem bekannte Reaktion und kann z. B. mit Na in flüssigem NH_3 [102], mit Pd/H_2 [103] oder durch kathodische Reduktion [104] erfolgen. Auch mit organischen Reagenzien, die zur selektiven Reduktion von Disulfiden geeignet sind, wie DTT oder Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) [105], sollte eine Umsetzung von Tetracarboxymethylcystin zu CDA möglich sein.
Versuche zur Darstellung von CDA wurden in dieser Arbeit nicht unternommen.

4.2 Serin-N,N-diessigsäure (SDA)

SDA wurde in der Literatur beschrieben und ist als guter Komplexbildner für Erdalkali- und Schwermetallionen bekannt [96].
Um SDA in ein Oligonukleotid einzubauen, gibt es theoretisch verschiedene Möglichkeiten. 5´- oder 3´-phosphorylierte Oligonukleotide können beispielsweise nach Aktivierung der Phosphatgruppe mit 1-Ethyl-3-[3-(dimethylamino)propyl]carbodiimid (EDC) direkt oder über den jeweiligen HOBT-Phosphodiester mit Hydroxylkomponenten zum Phosphodiester umgesetzt werden [90] (Abb. 33).

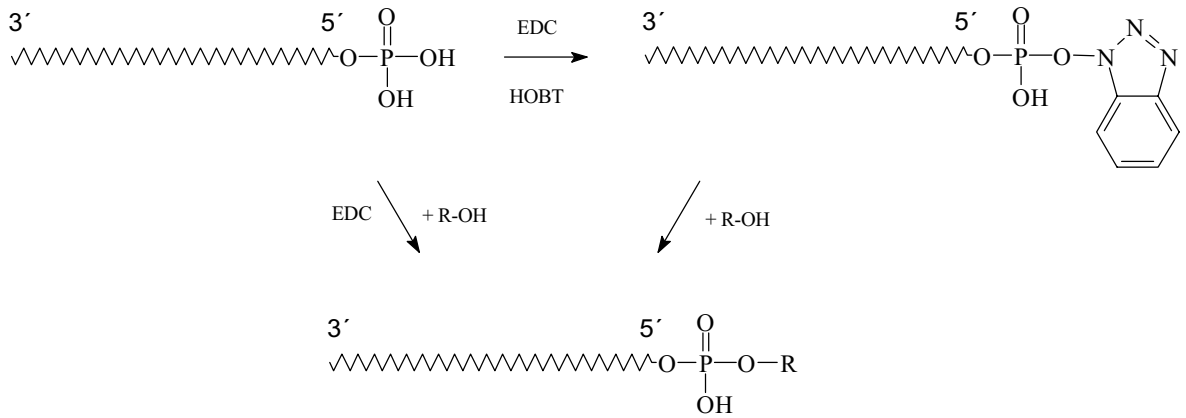


Abbildung 33. Umsetzung von 5´-phosphorylierten Oligonukleotiden mit Hydroxylkomponenten zu Phosphodiestern nach *Shabarova* et al.

Bislang wurden jedoch noch keine Aminosäuren als Hydroxylkomponenten bei dieser Art Reaktion eingesetzt.

Eine elegantere Methode wäre der direkte Einbau von SDA als Phosphoamidit noch wärend der Oligonukleotidsynthese. Das beispielsweise mit Methanol dreifach veresterte SDA könnte mit Chlor-2-cyanoethoxydiisopropylaminophosphan, einem Standardreagenz der Phosphoamiditsynthese [91a], zum entsprechenden 2-Cyanoethylphosphoamidit umgesetzt werden (Abb. 34).

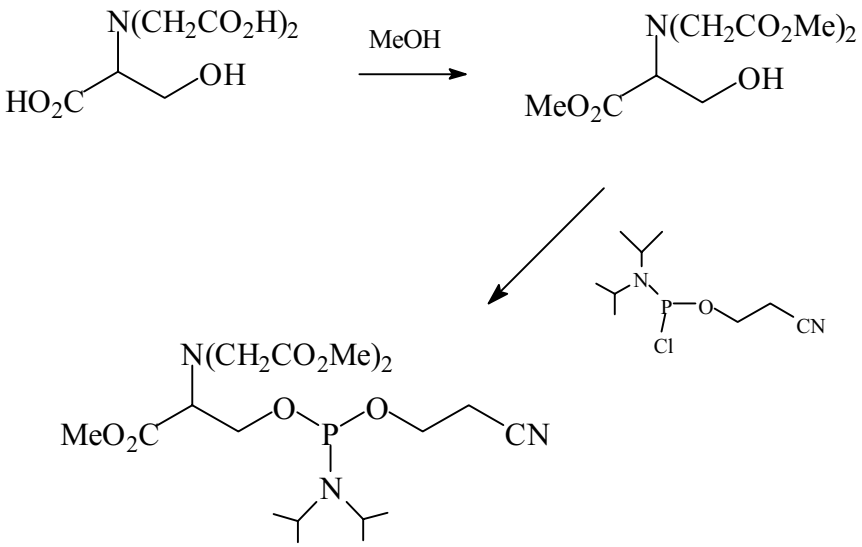


Abbildung 34. Gedachte Synthese eines geschützten NTA-Phosphoamidites aus Serin bzw. SDA.

Dieses Amidit könnte anschließend in eine DNA-Synthese nach der Phosphoamiditmethode [92,93] im letzten Schritt der Synthese eingesetzt werden (Abb. 35).

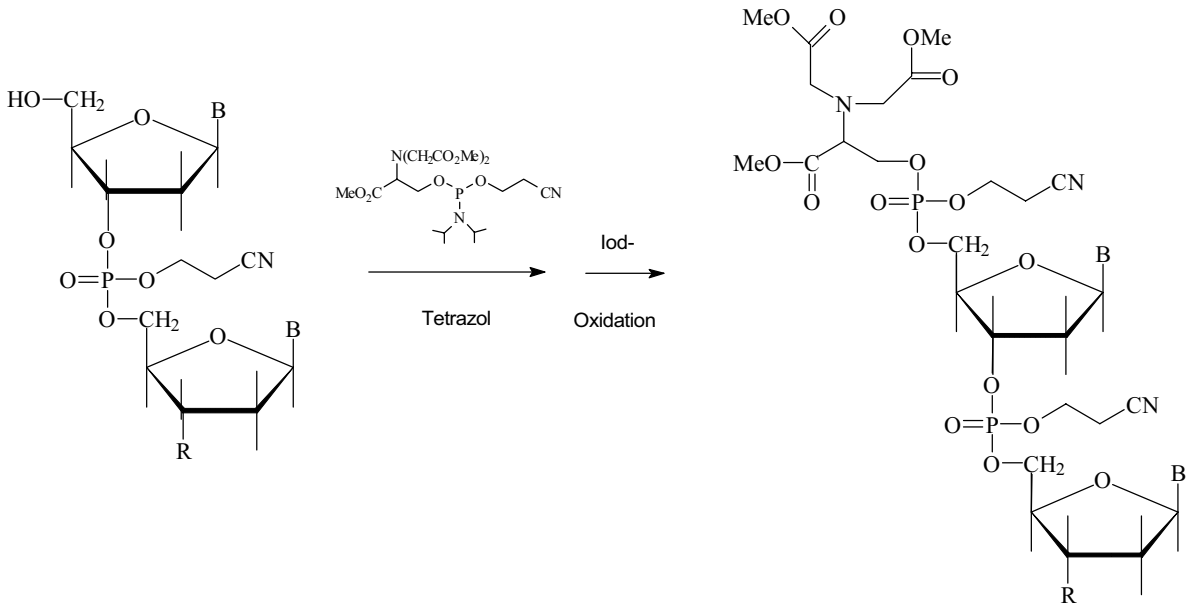


Abbildung 35. Gedachte Oligonukleotidsynthese nach der Phosphoamiditmethode unter Verwendung eines geschützten NTA-Phosphoamidites.

In Oligonukleotiden befindliche Carbonsäuremethylesterfunktionen können mit 0.1 M Natronlauge verseift werden, ohne das Oligonukleotid zu beeinträchtigen [94].
Auf diese Weise würde man ein 5´-NTA-funktionalisiertes Oligonukleotid erhalten.

Bedauerlicherweise ist jedoch bereits die Synthese von Serin-N,N-diessigsäure mit Schwierigkeiten verbunden. Bislang sind zwei verschiedene Wege zur Darstellung von SDA in der Literatur beschrieben worden. Nach einer älteren Vorschrift von *Erdey* et al. [95] wird dabei Serin mit dem Natriumsalz von Chloressigsäure in Natronlauge umgesetzt (Abb. 36).

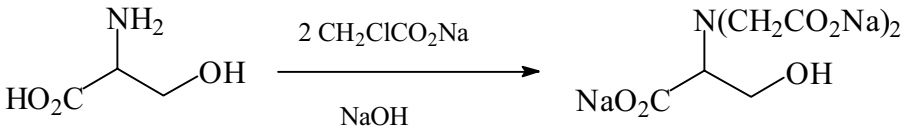


Abbildung 36. Synthese von SDA-Natriumsalz nach *Erdey* et al.

Um das Produkt aus dem Reaktionsansatz zu fällen, wird die Lösung mit Essigsäure angesäuert und anschließend mit Methanol versetzt. Der gebildete Niederschlag wird zur Aufreinigung mehrfach in Wasser gelöst und mit Methanol gefällt. Erhalten wird das Dinatriumsalz von SDA.
In der Originalvorschrift erfolgte die Charakterisierung des Produkts durch Elementaranalyse, wobei sich jedoch eine gewisse Abweichung der gefundenen von den berechneten Werten zeigte.
Beim Versuch der Darstellung von SDA nach dieser Vorschrift wurde auch nach wiederholter Präzipitation mit Methanol nur stark verunreinigtes Produkt erhalten. Eine chromatographische Aufreinigung mit Kieselgel war aufgrund des sehr polaren Charakters der Produkte nicht möglich. Die Natur der Verunreinigung konnte durch NMR-Spektroskopie nicht ermittelt werden. Dünnschichtchromatographische Untersuchungen mit Ninhydrin als Färbereagenz zeigten, daß sich keine primären Amine unter den Produkten befanden, was auf eine quantitative Umsetzung des Serins schließen ließ. Auch eine mehrfache Modifikation der Versuchsvorschrift und die Verwendung des Natriumsalzes von Bromessigsäure anstelle von Chloressigsäure führten zu keinen brauchbaren Resultaten. Daraufhin wurden Versuche zur Darstellung von SDA nach einer alternativen Methode unternommen.

Bei der Vorschrift nach dem Patent von *Baur* et al. [96] wird Serin im Rahmen einer *Strecker*-Synthese [97] mit Formaldehyd und Blausäure zu Serin-N,N-diacetonitril umgesetzt. Das Nitril wird ohne weitere Aufarbeitung unmittelbar mit NaOH zur Diessigsäure verseift (Abb. 37).

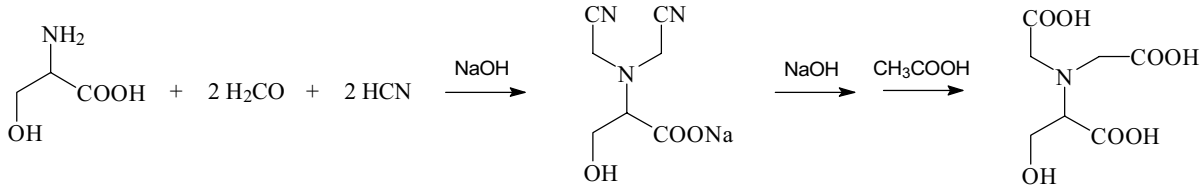


Abbildung 37. *Strecker*-Synthese von SDA aus Serin nach *Baur* et al.

Versuche zur Darstellung von SDA wurden auch nach dieser Vorschrift vorgenommen. Die Umsetzung des Serins zum Nitril wurde verfolgt, indem auf Serin mit Ninhydrin und auf Cyanid mit $FeSO_4$ getestet wurde. Nach 2 h Reaktionsdauer waren keine Edukte mehr im Ansatz nachweisbar. Daraufhin wurde das Serin-N,N-diacetonitril gemäß der Vorschrift zur Hydrolyse mit NaOH versetzt. Trotz wiederholter Versuche unter peinlich genauer Berücksichtigung der Versuchsvorschrift nach *Baur* bildete sich jedoch an dieser Stelle der Reaktionsführung oder kurze Zeit danach ein in Wasser und organischen Lösungsmitteln unlöslicher dunkelbrauner Niederschlag. Eine Darstellung von SDA nach dieser Vorschrift gelang nicht.

4.3 Lysin-N^{α},N^{α}-diessigsäure (LDA)

Lysine-N^{α},N^{α}-diacetic acid (LDA, N^{α},N^{α}-Bis(carboxymethyl)-Lysin) wurde von *Hochuli* et al. zur Synthese von Ni-NTA-Harz für die IMAC von hexahistidinmarkierten Proteinen dargestellt [37,38]. LDA kann über seine primäre ε-Aminofunktion an Sepharose gebunden werden, welche zuvor mit Epibromhydrin umgesetzt wurde, wobei das entsprechende NTA-Harz entsteht (Abb. 38).

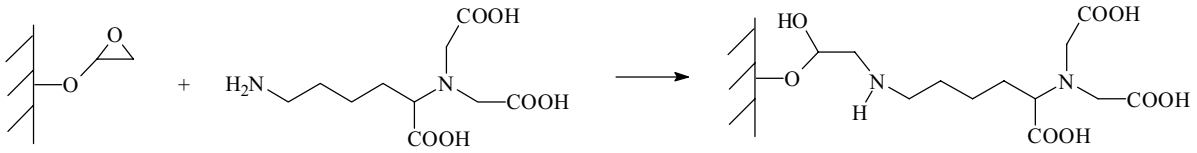


Abbildung 38. Synthese von NTA-Harz aus epoxyfunktionalisierter Sepharose und LDA nach *Hochuli* et al.

Die ε-Aminogruppe von LDA reagiert hierbei nukleophil mit einer Epoxyfunktion. Das entstandene funktionalisierte Harz muß lediglich noch mit Ni^{2+}-Kationen beladen werden und kann dann direkt in die IMAC eingesetzt werden.
Kommerziell erhältliche Ni-NTA-Harze, welche nach dem Verfahren von *Hochuli* hergestellt worden sind, finden allgemein Verwendung zur Isolierung von rekombinanten His_6-Proteinen.

Verbindungen mit Aminofunktionen können auf verschiedene Weisen mit Oligonukleotiden verknüpft werden (siehe 5.). Um herauszufinden, ob mit diesen Verfahren auch LDA mit seiner primären Aminogruppe an Oligonukleotide gebunden werden kann, wurde im Rahmen dieser Arbeit das nicht kommerziell erhältliche LDA nach den Vorschriften von *Hochuli* [37] und *Schmitt* et al. [49] dargestellt.

4.3.1 Synthese von LDA

Bei der Synthese von LDA 2 wird zunächst ein Teil L-Lysin, welches mit der Benzyloxycarbonylschutzgruppe N^{ε}-geschützt ist (H-Lys(Z)-OH), mit zwei Teilen

Bromessigsäure in Natronlauge zu N^{α},N^{α}-Bis(carboxy-methyl)-N^{ε}-benzyloxycarbonyl-Lysin (Z-LDA, 1) umgesetzt. Die Z-Schutzgruppe wird anschließend durch katalytische Hydrierung entfernt (Abb. 39).

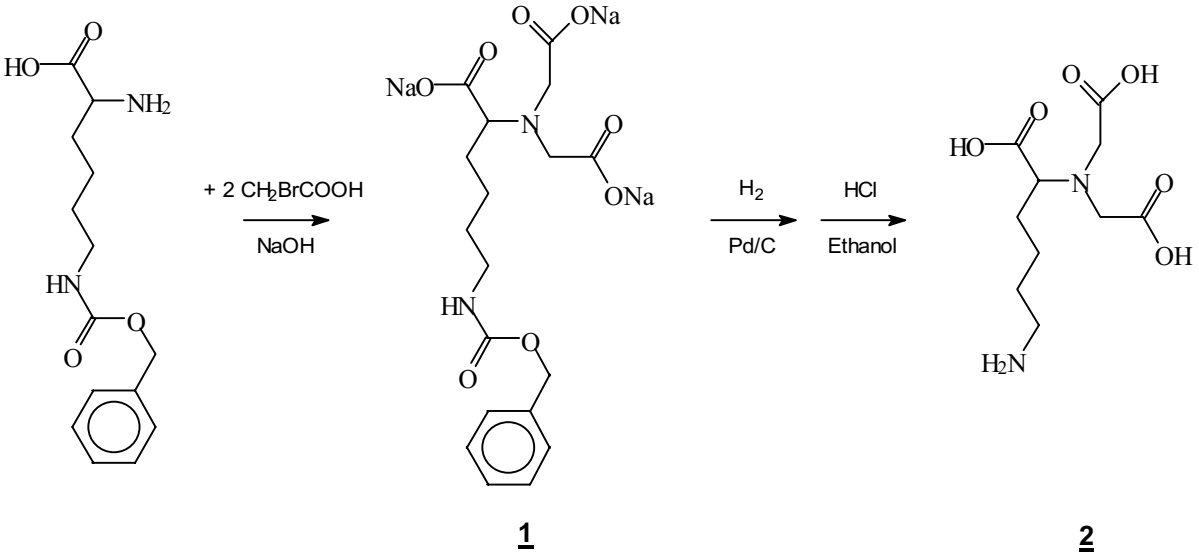


Abbildung 39. Synthese von LDA aus H-Lys(Z)-OH und Bromessigsäure nach *Hochuli* et al.

Das Edukt H-Lys(Z)-OH ist kommerziell erhältlich (Novabiochem).
Die Z-Gruppe ist generell gegenüber nicht zu stark alkalischen Reagenzien und Nukleophilen inert. Eine Abspaltung dieser Schutzgruppe gelingt unter stark sauren Bedingungen, wobei eine Z-Gruppe an der ε-Aminofunktion von Lysin eine etwas höhere Säureempfindlichkeit besitzt als eine Z-Gruppe an der α-Aminofunktion [106]. Ein Verlust der ε-Schutzgruppe unter den stark alkalischen Substitutionsbedingungen und den relativ stark sauren Fällungsbedingungen während der Präparation wurde jedoch nicht beobachtet.
Die Substitutionsreaktion erfolgte in 1.5-2 M NaOH. Die Reaktionstemperatur wurde nach 2 h von Anfangs 0 °C auf 25 °C erhöht. Nach etwa 16 h wurde die Temperatur auf 50 °C gesteigert. Nach weitern 2 h wurde die Reaktion beendet. Der Verlauf der Reaktion konnte durch DC mit stark polaren Laufmitteln (n-Butanol/Essigsäure/Wasser 8:2:2) verfolgt werden. Mit Ninhydrin als Färbereagenz zur Detektion von primären Aminofunktionen konnte am Ende der Reaktion kein Edukt mehr nachgewiesen werden.
Die Aufreinigung des gebildeten Z-LDA erfolgte gemäß Vorschrift durch wiederholte Fällung mit HCl. Die Bedingungen der Fällung, insbesondere die Menge an hinzugegebener Salzsäure, waren hierbei entscheidend. Es wurde gefunden, daß die Verwendung von equimolaren Mengen an HCl bezüglich der Menge der eingesetzten Natronlauge zu einer im Vergleich mit den Literaturvorschriften höheren Ausbeute an Z-LDA führte. Das Produkt wurde durch NMR-Spektroskopie charakterisiert.

Die Abspaltung der Z-Schutzgruppe durch katalytische Hydrierung mit Palladium als Katalysator gelang problemlos unter den bei *Hochuli* angegebenen Bedingungen mit 0.5 M NaOH als Lösungsmittel. Hingegen konnte die Hydrierung nach *Schmitt* unter Verwendung

von Methanol/Wasser 20:1 oder Methanol/Essigsäure 95:5 [107] nicht durchgeführt werden, da Z-LDA unter diesen Bedingungen nicht in Lösung ging.
Da bei der Abspaltung der Z-Schutzgruppe CO_2 entsteht, konnte der Reaktionsverlauf nicht über den Verbrauch an H_2 verfolgt werden. Der Fortschritt der Hydrierung wurde deshalb durch RP-DC mit Acetonitril/Wasser 3:1 als Laufmittel überprüft. Die Detektion des Produkts erfolgte durch Ninhydrin. Aufgrund der sehr hohen Polarität von Edukt und Produkt waren Kieselgelfolien nicht für die DC geeignet. Da LDA über drei Carboxylfunktionen verfügt, war eine Fluoreszensanfärbung mit DCC-Sprühreagenz nach *Chen* [108] möglich. Die Carboxylgruppen konnten außerdem mit Dichlorphenolindophenol detektiert werden, wobei eine deutliche rote Färbung entstand. Eine Anfärbung von LDA mit Anisaldehyd/Schwefelsäure gelang erst, nachdem das Chromatogramm mit DCC behandelt wurde, wobei eine gelbe Färbung zu beobachten war.
In den Originalvorschriften von *Hochuli* wird das Produkt LDA nach Abfiltrieren des Katalysators ohne weitere Aufreinigung durch Fällung mit HCl/Ethanol aus der Lösung gewonnen, oder sogar durch bloße Evaporation des Lösungsmittels ohne vorherige Fällung. Wie sich herausstellte, konnte einwandfrei reines LDA jedoch nur gewonnen werden, indem das gefällte Produkt nochmals in 0.5 M NaOH gelöst und wiederum mit HCl/Ethanol gefällt wurde. Es wurden stets equimolare Mengen an NaOH und HCl verwendet. Eine chromatographische Aufreinigung mit Kieselgel kam wegen des sehr stark polaren Charakters von LDA nicht in Frage. Es wurde reines LDA in Ausbeuten erhalten, welche den Literaturangaben entsprachen. Die Charakterisierung des Produktes erfolgte durch NMR-Spektroskopie.

Nach *Schmitt* et al. [49] verläuft die Synthese von Z-LDA bzw. LDA aus L-Serin unter Erhalt der Konfiguration am asymetrischen Kohlenstoffatom, wohingegen *Hochuli* keine Angaben zur Konfiguration des Produktes macht. Untersuchungen zur Konfiguration von Z-LDA und LDA wurden in dieser Arbeit nicht vorgenommen. Das Ausmaß der Racemisierung einer Aminosäure in wäßriger Lösung hängt von der Art der Aminosäure und den näheren Reaktionsbedingungen ab, wie Temperatur, pH und Ionenstärke der Lösung [113]. Die Racemisierunggeschwindigkeit von natürlichen Aminosäuren unter neutralen Bedingungen bei Raumtemperatur ist sehr klein, mit einer Halbwertzeit von vielen Jahren. In 2 M NaOH verzehnfacht sich die Umsatzrate ungefähr. Temperaturerhöhungen beschleunigen die Racemisierung erheblich, Acetylierungen an der α-Aminogruppe können die Umsatzrate ebenfalls erhöhen. Unter den Bedingungen der Synthese von LDA und Z-LDA ist schätzungsweise jedoch nur von einer allenfalls sehr geringen Racemisierung von Lysin, LDA und Z-LDA auszugehen. Zudem sollte für das Ni-NTA-Bindungssystem die Konfiguration von LDA unerheblich sein.

4.3.2 Charakterisierung von LDA und Z-LDA

Die Charakterisierung von LDA und Z-LDA erfolgte durch ^{1}H- und ^{13}C-NMR-Spektroskopie. Die seinerzeit von *Schmitt* et al. [49] angegebenen spektroskopischen Daten konnten jedoch nicht einwandfrei bestätigt werden. Da es sich bei LDA um eine Schlüsselverbindung in der IMAC von hexahistidinmarkierten Proteinen handelt, werden die Spektren von LDA und Z-LDA im Folgenden deshalb näher diskutiert.

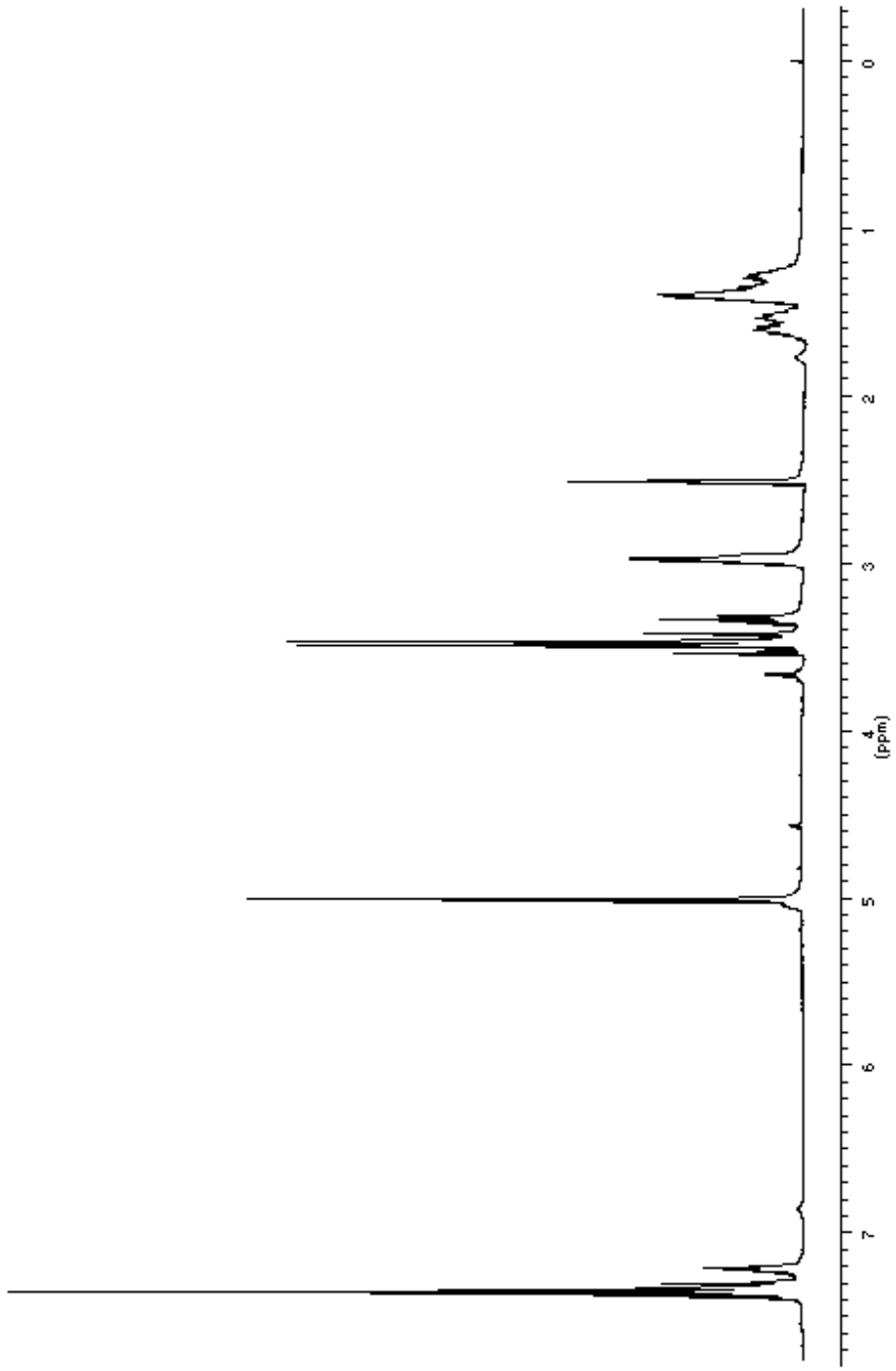


Abbildung 40. ^{1}H-NMR-Spektrum von Z-LDA 1.

Im ^{1}H-NMR-Spektrum von Z-LDA (Abb. 40), aufgenommen in DMSO, ist im Bereich von 1.19-1.77 ppm ein Multiplett erkennbar, welches von den Protonen der Methylengruppen des Lysinrestes stammt. Die Integration der Signale ergibt eine Zahl von sechs Protonen anstelle der acht von *Schmitt* angegebenen. Die beiden fehlenden Protonen gehören zur ε-Methylengruppe und besitzen eine chemische Verschiebung von 2.92-3.02 ppm. In diesem

Bereich wurde von *Schmitt* kein Signal angegeben. Diese Methylenprotonen sind Teil eines A_2M_2X-Systems und zeigen ebenfalls ein Multiplett. Bei 3.31 ppm ist ein Triplett erkennbar, welches dem tertiären H zuzuordnen ist. Die Methylenprotonen der beiden Essigsäurereste gehen eine geminale Kopplung ein, weshalb im Bereich von 3.42-3.49 ppm zwei Dubletts zu sehen sind, die von insgesamt 4 Protonen stammen. *Schmitt* beobachtete diese Kopplung nicht. Bei 5.00 ppm liegt das Singulettsignal für die Methylenprotonen der Benzylgruppe. Von *Schmitt* nicht angegeben wurde das Triplettsignal für das Aminoproton bei 7.20 ppm. Im Bereich von 7.26-7.40 ppm zeigen sich schließlich die Signale der fünf Arylprotonen in Form eines Multipletts.

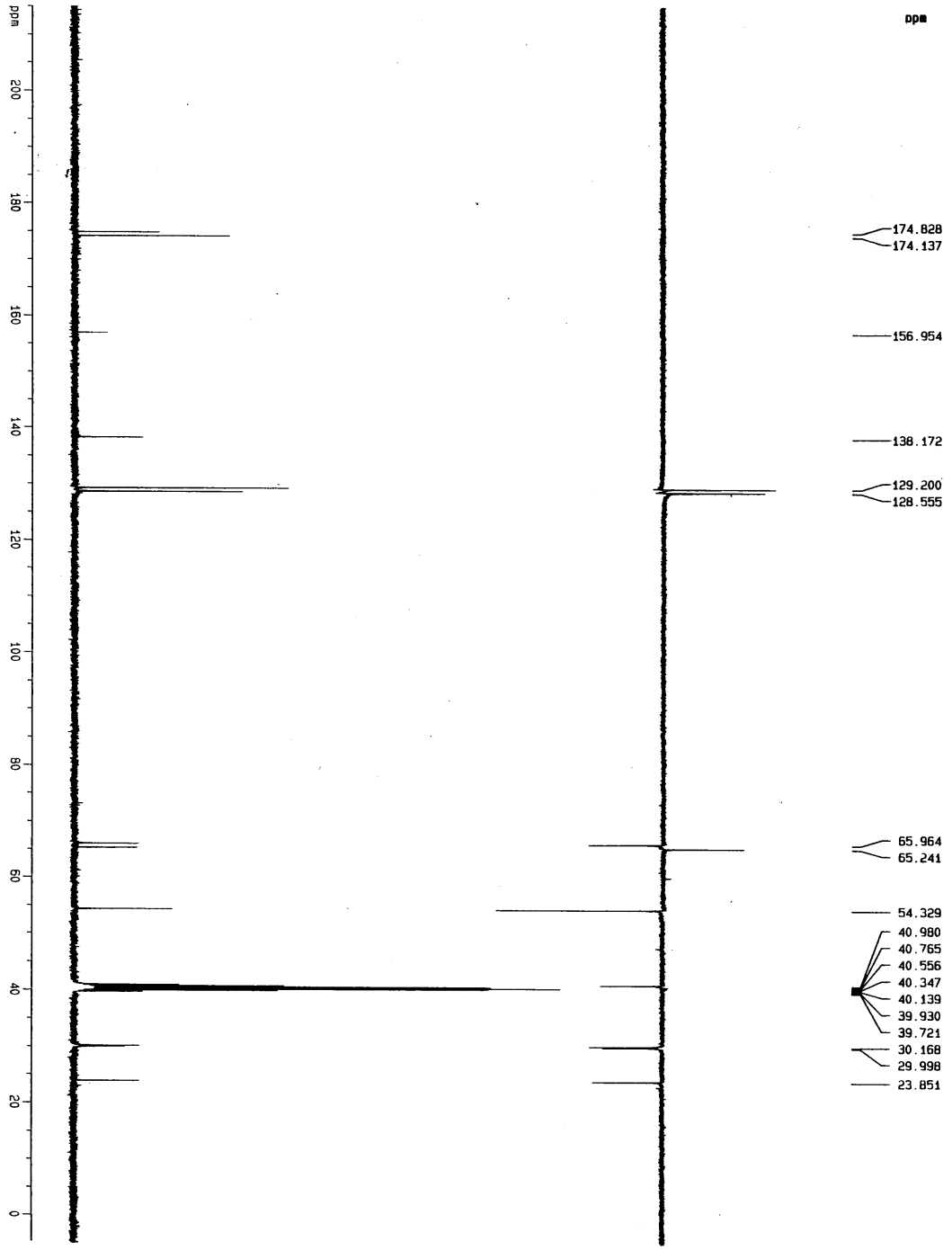


Abbildung 41. ^{13}C-NMR-Spektrum von Z-LDA 1 mit DEPT-Messung.

Auch beim ^{13}C-NMR-Spektrum von Z-LDA (Abb. 41), ebenfalls in DMSO aufgenommen, ergaben sich teilweise Abweichungen von den von *Schmitt* gemessenen Werten. Einige Signale mußten überdies anders zugeordnet werden. Durch DEPT-Messungen ergab sich beispielsweise, daß das Signal der ε-Methylengruppe von Z-LDA, für das von *Schmitt* ein Wert von 53.56 ppm angegeben wurde, in Wirklichkeit unter dem DMSO-Signal bei 40.87 ppm lag.

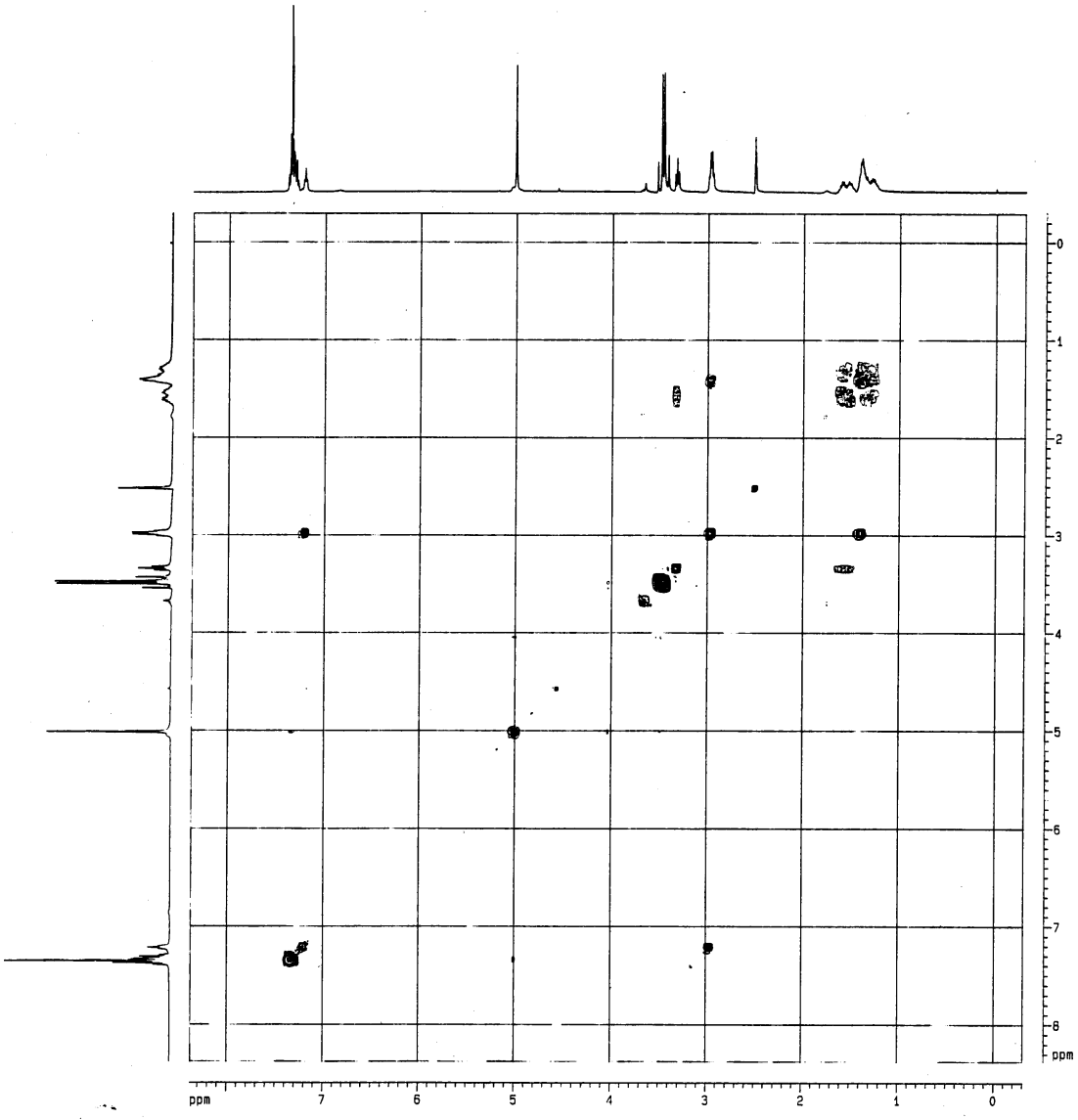


Abbildung 42. ^{1}H,^{1}H-COSY von Z-LDA 1.

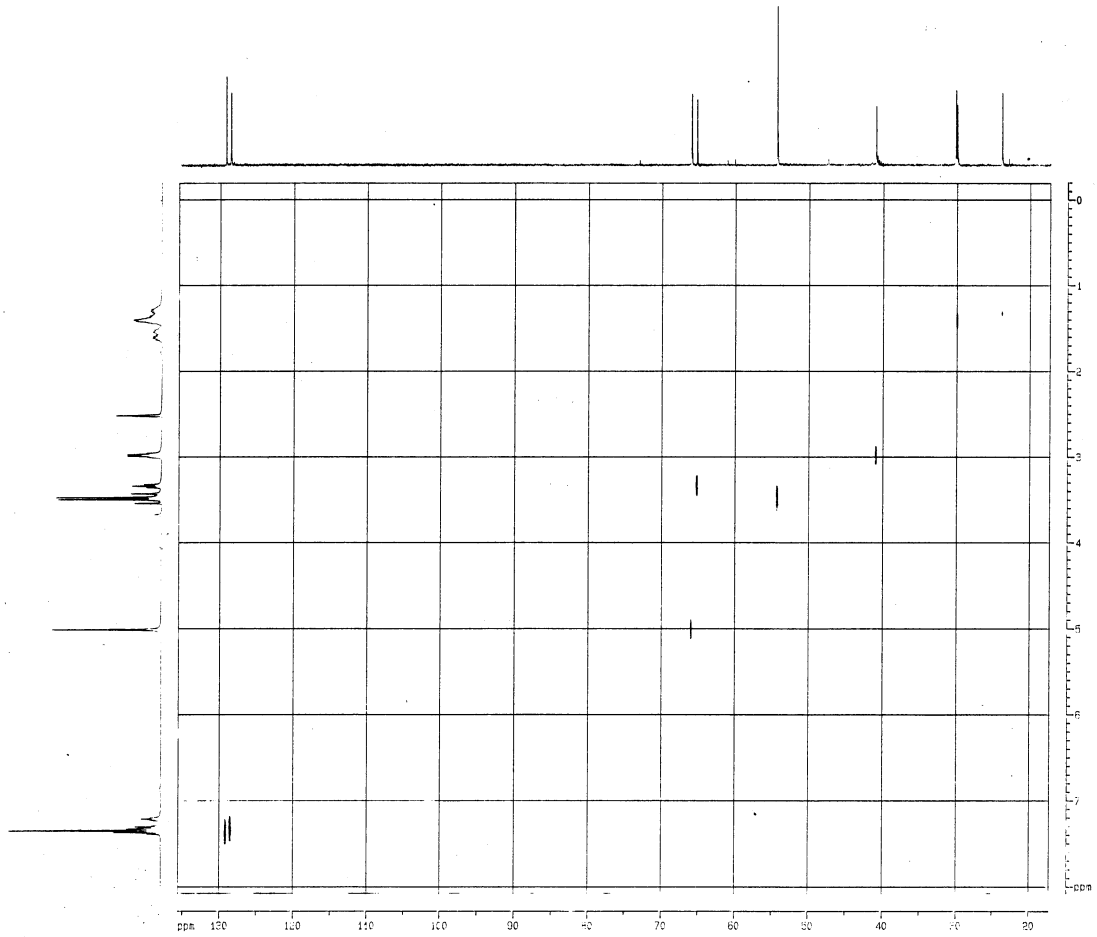


Abbildung 43. $^{1}H,^{13}C$-COSY von Z-LDA 1.

Die Interpretation der gemessenen NMR-Daten von Z-LDA im Experimentellen Teil (siehe 10.3) wurde gestützt durch $^{1}H,^{1}H$- und $^{1}H,^{13}C$-Shift-Korrelationen (COSY) (Abb. 42, 43). ^{13}C-NMR- Daten, die nicht durch COSY-Messungen zugeordnet werden konnten, wurden durch Inkrementbetrachtungen [114] zugeordnet.

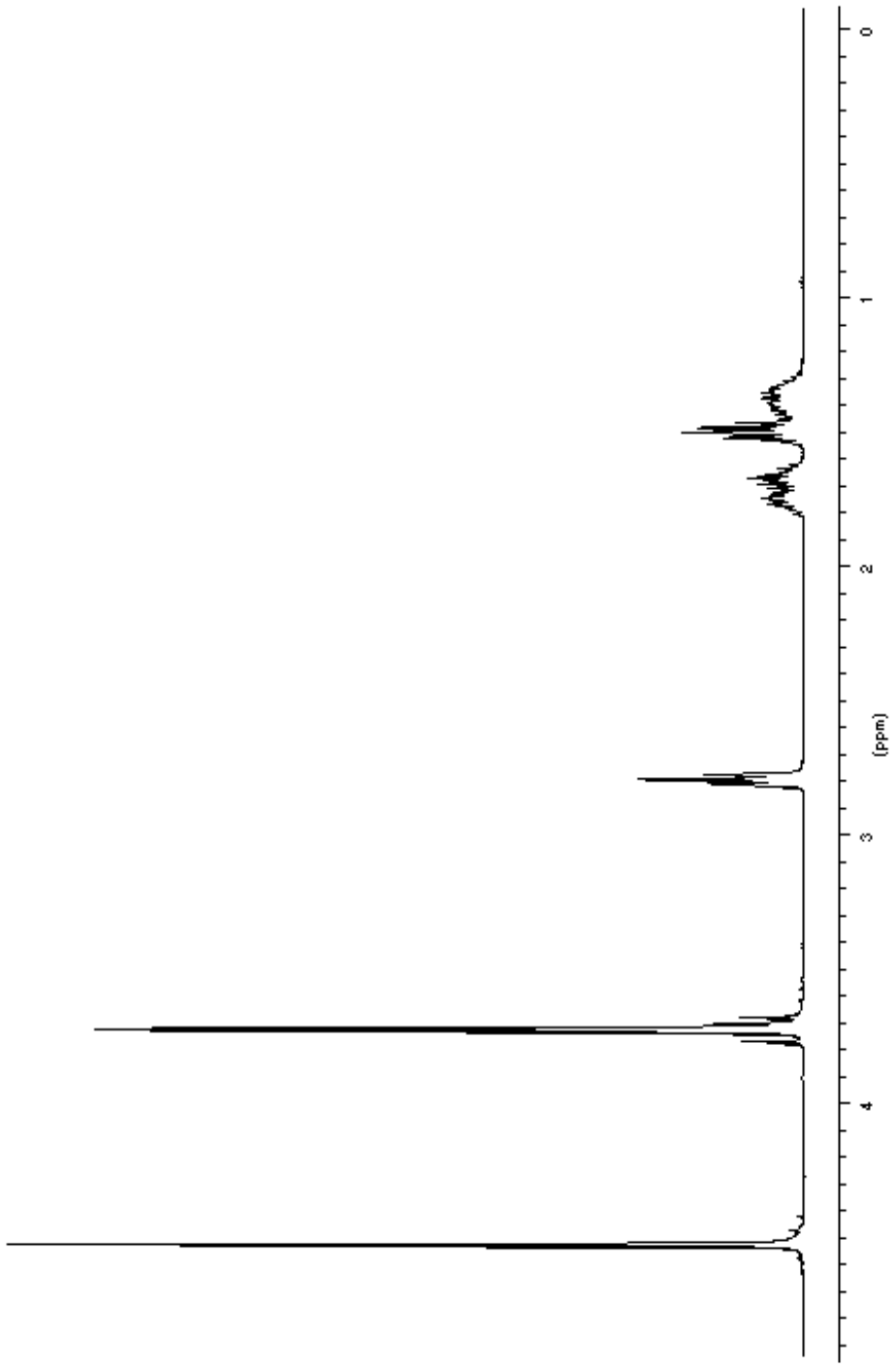


Abbildung 44. ^{1}H-NMR-Spektrum von LDA 2.

Das ^{1}H-NMR-Spektrum von LDA (Abb. 44) wurde in D_2O aufgenommen, da LDA in DMSO nicht löslich ist. Der starke Wasserpeak im Spektrum rührt von der Deprotonierung der LDA her. Durch die Deuterierung der nunmehr primären Aminofunktion ist die ε-Methylengruppe Teil eines A_2M_2-Systems geworden, so daß bei 2.87 ppm ein Triplett zu erkennen ist. Obwohl diesem Signal eindeutig zwei Protonen zugrundeliegen, wurde es von *Schmitt* dem einzelnen

tertiären Proton zugeordnet. Das Signal des tertiären Protons ist jedoch in den Bereich der Signale der Methylenprotonen der Essigsäurereste verschoben worden und bildet mit diesen ein Multiplett bei 3.72-3.90 ppm.

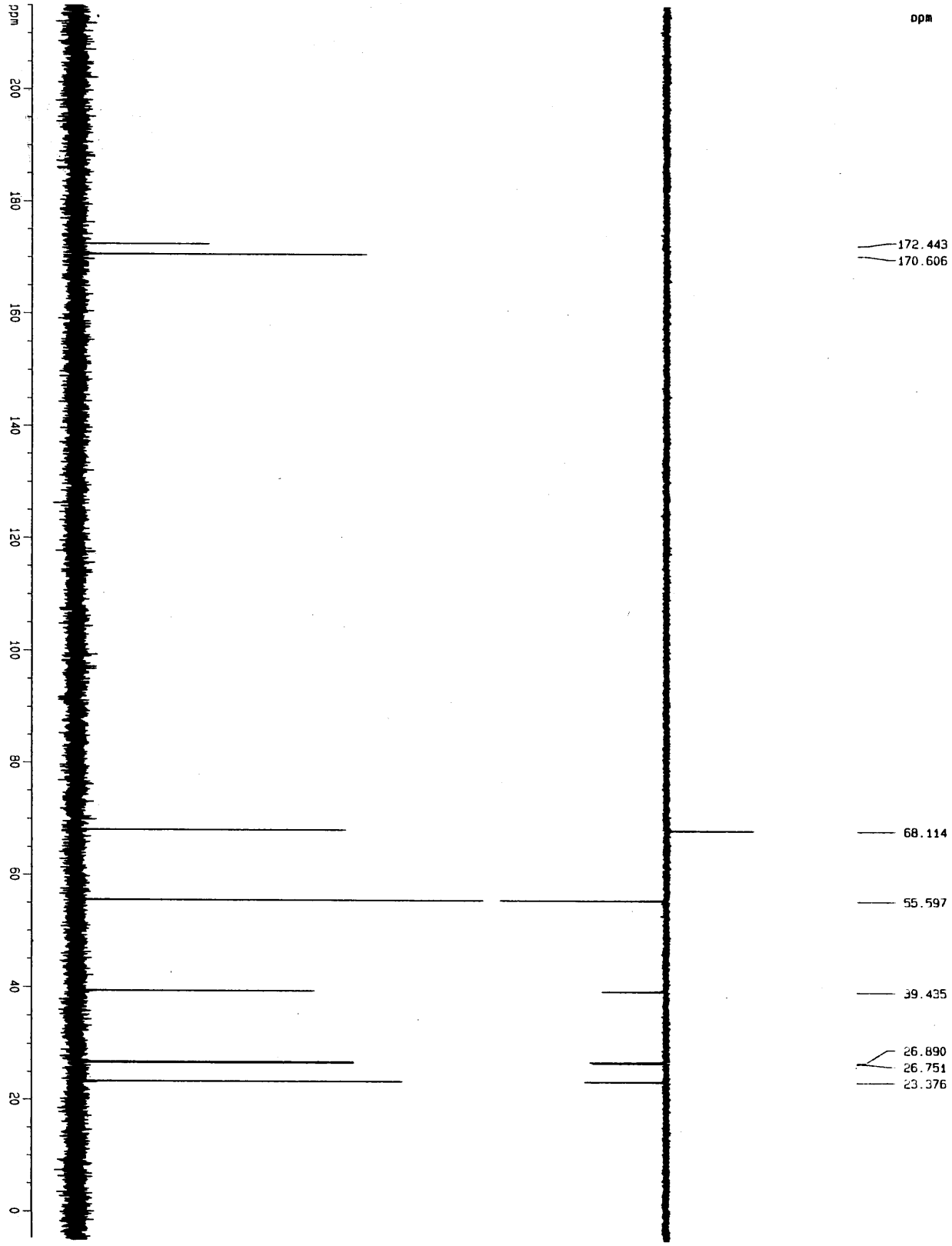


Abbildung 45. ^{13}C-NMR-Spektrum von LDA 2 mit DEPT-Messung.

Auch aus dem ebenfalls in D_2O aufgenommenem ^{13}C-NMR-Spektrum von LDA (Abb. 45) ergeben sich andere Zuordnungen als in der Literatur angegeben. So ist z. B. das Signal bei 55.60 ppm eindeutig auf eine Methylenfunktion zurückzuführen, wie die DEPT-Messung zeigt, und nicht auf ein tertiäres Kohlenstoffatom gemäß *Schmitt*.

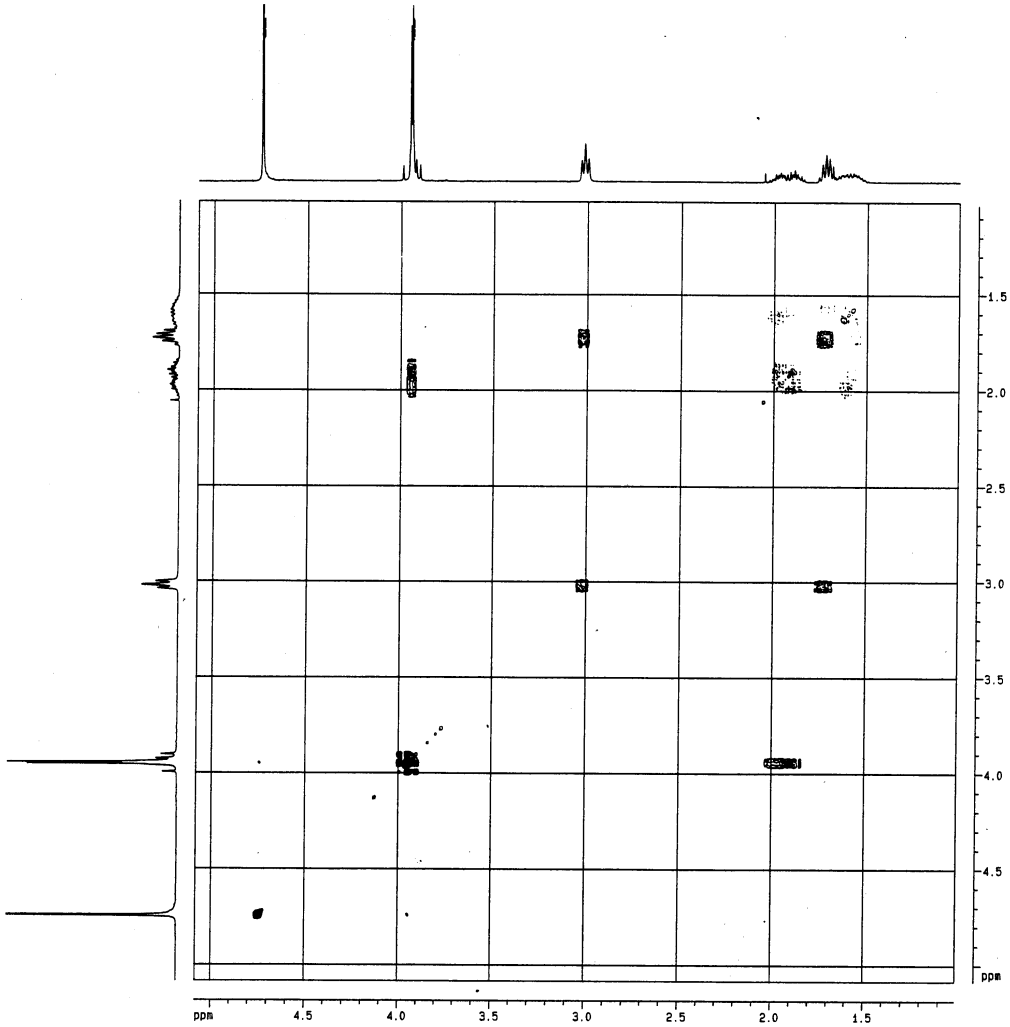


Abbildung 46. $^1H,^1H$-COSY von LDA 2.

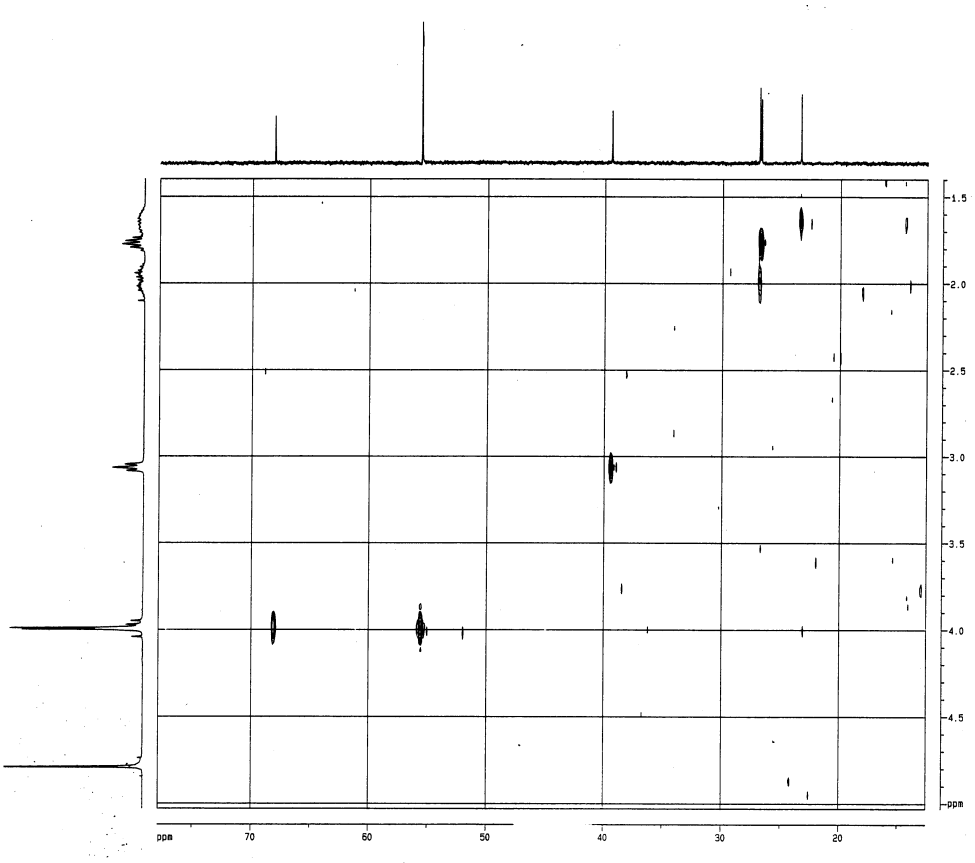


Abbildung 47. $^{1}H,^{13}C$-COSY von LDA 2.

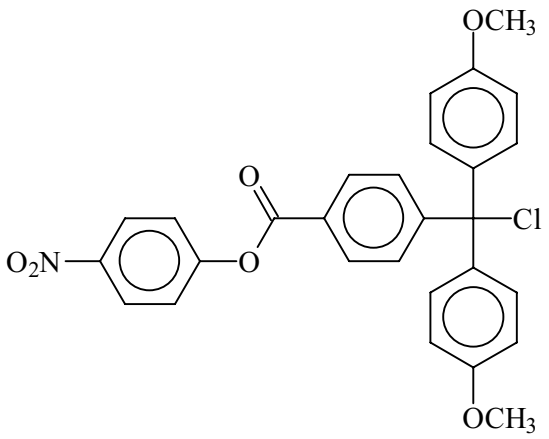
Auch die Zuordnungen der gemessenen NMR-Signale von LDA wurden durch Shift-Korrelationen abgesichert (Abb. 46, 47). Wiederum wurden Signale, die nicht eindeutig durch Messungen zugeordnet werden konnten, durch Inkrementbetrachtungen zugeordnet.

5. Markierung von Oligonukleotiden mit LDA

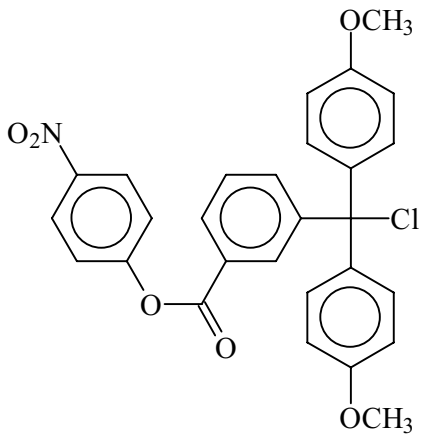
Zur Verknüpfung von Oligonukleotiden mit Verbindungen, die über primäre Aminofunktionen verfügen, gibt es verschiedene Standardverfahren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob diese Methoden dazu geeignet sind, LDA, das aufgrund seiner drei Carboxylfunktionen ein sehr schwaches Nukleophil ist, über dessen primäre Aminogruppe kovalent an Oligonukleotide zu binden.
Als Position für die NTA-Funktionalisierung wurde der 5´-Terminus gewählt. Eine Markierung an dieser Stelle gestattet im Gegensatz zu einer 3´-Funktionalisierung nach wie vor eine 5´-3´-Verlängerung, so daß das betreffende Oligonukleotid beispielsweise als markierter Primer in eine PCR oder eine Sequenzierungsreaktion eingesetzt werden kann. Allerdings kann bei einer Markierung am 5´-Terminus keine Ligation mehr an dieser Position erfolgen. Sowohl 3´-Verlängerung als auch 5´-Ligation wären möglich, wenn die Markierung sich mitten im Oligonukleotid an einer Base befinden würde. Dies hätte jedoch unter Umständen Auswirkungen auf das Hybridisierungsvermögen des Oligonukleotides.
Als Oligonukleotidkomponente wurde bei den Funktionalisierungsexperimenten der Universal Sequencing Primer (USP) verwendet, ein einzelsträngiges 17mer mit einem Molekulargewicht von 5227 Da. Der USP findet Verwendung in der DNA-Sequenzierung mit Standardsequenzierungsvektoren und bietet sich daher für die Markierung mit LDA bzw. BAPHis6 an.
Das Oligonukleotid wurde an einem DNA-Synthesizer nach dem Phosphoamiditverfahren hergestellt und DMT-on durch RP-HPLC aufgereinigt. DNA-Mengenbestimmungen geschahen mittels UV/VIS-Photometrie, unter Verwendung eines durch Inkremente (siehe 10.1.1) bestimmten Extinktionskoeffizienten für USP.
Die Analyse der bei den jeweiligen Markierungsversuchen erhaltenen Reaktionsprodukte erfolgte durch HPLC, PAGE oder MALDI-TOF MS.
Die verschiedenen Versuche werden im Folgenden beschrieben.

5.1 Verknüpfung von LDA mit Oligonukleotiden durch heterobifunktionelle Tritylreagenzien

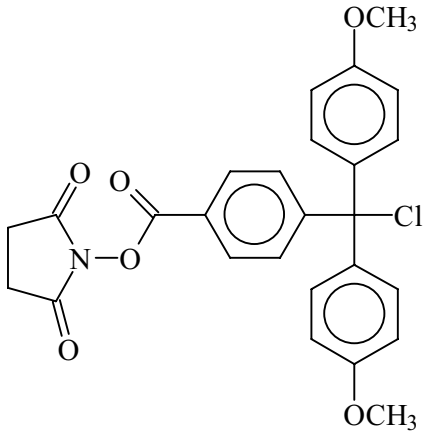
Nukleoside und Oligonukleotide mit freien 5´-OH-Gruppen können mit Tritylchloriden verethert werden, welche über reaktive Carbonsäureesterfunktionen verfügen [77,78,128]. Bei den Estergruppen kann es sich um NHS- oder um p-Nitrophenyl-(pNP)-Ester handeln (Abb. 48).



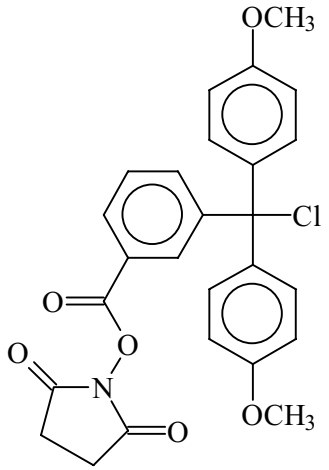
15



14



16



6

Abbildung 48. Die Strukturen der Verbindungen p-pNP-DMT-Cl 15, m-pNP-DMT-Cl 14, p-NHS-DMT-Cl 16 und m-NHS-DMT-Cl 6.

Die Retritylierung erfolgt an 3′-CPG-gebundenen, vollgeschützten Oligonukleotiden. Die Reaktion wird an fester Phase vorgenommen, weil auf diese Weise die im hohen Überschuß eingesetzten Retritylierungsreagenzien nach der Reaktion einfach und vollständig wieder entfernt werden können.

Die reaktive Esterfunktion der eingeführten Tritylgruppe kann mit primären Diaminen wie 1,6-Diaminohexan unter Bildung eines Amides umgesetzt werden. Anschließend wird das Oligonukleotid auf die übliche Weise mit konzentriertem Ammoniak vom Träger abgespalten und entschützt (Abb. 49).

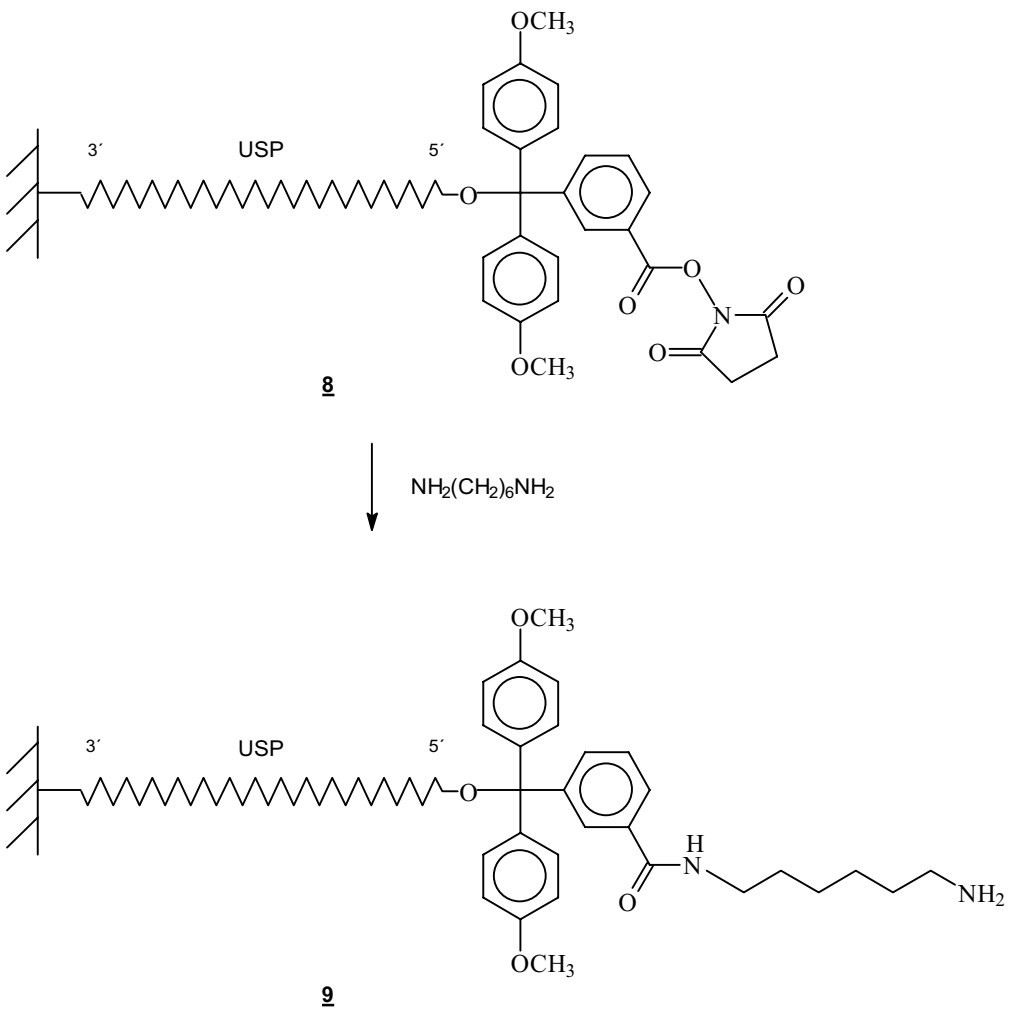


Abbildung 49. Umsetzung von mit m-NHS-DMT-Cl 6 5´-retrityliertem und 3´ an CPG gebundenem USP mit 1,6-Diaminohexan zum Amid 9.

Die mit diesem Verfahren hergestellten 5´-aminylierten Oligonukleotide können an Membranen immobilisiert [78] oder mit NHS-Biotin biotinyliert werden [30,128].
Der Vorteil dieser Methode besteht darin, daß die Bindung zwischen Tritylfunktion und Oligonukleotid säurelabil ist und durch beispielsweise 80% Essigsäure wieder gespalten werden kann. Dadurch ist es möglich, das markierte Oligonukleotid unter vergleichsweise milden Bedingungen wieder zu defunktionalisieren. Die intensive Rot- bzw. Orangefärbung des Tritylkations in nichtprotischen Lösungsmitteln erlaubt außerdem eine photometrische Quantifizierung der Retritylierung oder Detritylierung.
In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die heterobifunktionellen Tritylderivate dazu geeignet sind, LDA mit Oligonukleotiden zu verknüpfen.

Die pNP-Ester sind weniger reaktiv als die NHS-Ester, haben jedoch den Vorteil, daß bei ihrer Umsetzung intensiv gelb gefärbtes p-Nitrophenolat entsteht. Nicht umgesetzter pNP-Ester kann deshalb bei dünnschichtchromatographischen Untersuchungen durch Behandlung des Chromatogramms mit Ammoniakdämpfen leicht sichtbar gemacht werden. Die Reaktion kann außerdem mittels Photometrie quantifiziert werden.

Oligonukleotide, welche mit meta-NHS- oder pNP-Tritylchloriden retrityliert wurden, neigen stärker zur Detritylierung als solche Oligonukleotide, die mit den entsprechenden para-Estern retrityliert wurden. Umgekehrt gilt, daß eine Tritylierung mit den meta-Ester-Tritylchloriden weniger leicht vorgenommen werden kann als mit den para-Verbindungen.
Es kann jedoch trotzdem vorteilhafter sein, meta-Ester zur Retritylierung zu verwenden, da deren Esterfunktionen eine höhere Reaktivität gegenüber Nukleophilen aufweisen als die Esterfunktionen der para-Ester derselben Spezies.

5.1.1 Synthese der Tritylester

Die Verbindungen N-Succinimidyl-3-[bis(4-methoxyphenyl)]-chlormethylbenzoat (m-NHS-DMT-Cl) 6 und p-Nitrophenyl-3-[bis(4-methoxyphenyl)-chlormethyl]-benzoat (m-pNP-DMT-Cl) 14 wurden nach *Leikauf* et al. [77] dargestellt (Abb. 50).

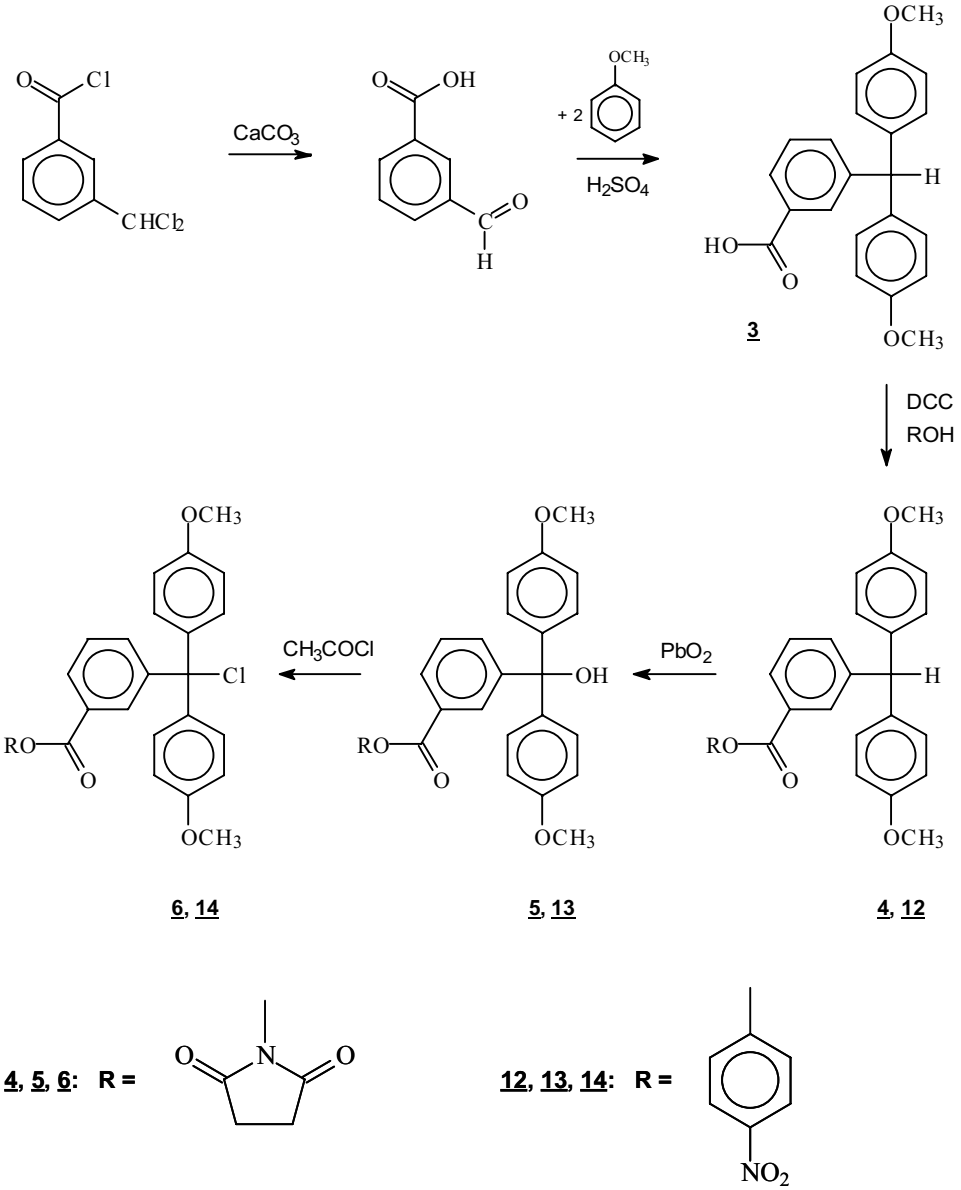
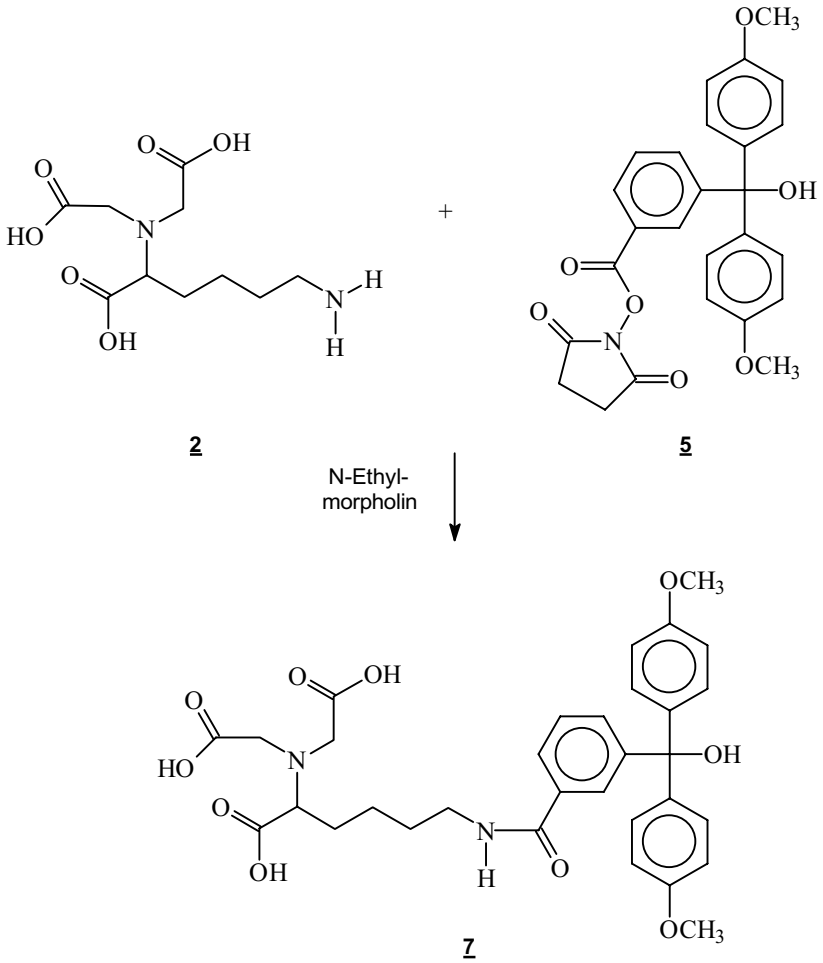


Abbildung 50. Synthese von m-NHS-DMT-Cl 6 und m-pNP-DMT-Cl 14.

Die Tritylverbindungen zeigten in den dünnschichtchromatographischen Untersuchungen mit Schwefelsäurereagenz eine intensive Orangefärbung.
Bei der säulenchromatographischen Aufreinigung der Carbinole enthielt das Laufmittel 0.03% Pyridin, um der Bildung von Tritylkationen vorzubeugen.
Die Identität aller synthetisierten Substanzen wurde durch NMR-Spektroskopie überprüft, mit Ausnahme der Chloride m-NHS-DMT-Cl 6 und m-pNP-DMT-Cl 14 selbst, da diese hierfür nicht stabil genug waren. Die Reaktivität von 6 wurde nach [78] durch Umsetzung mit 2´-Desoxythymidin in Gegenwart von Pyridin getestet, wobei die Güte der Tritylierung der 5´-OH-Gruppe des Thymidins mittels DC verfolgt wurde. Auch m-pNP-DMT-Cl 14 konnte erstmalig erfolgreich mit 2´-Desoxythymidin umgesetzt werden.

5.1.2 Umsetzung von Tritylestercarbinolen mit LDA

Die Carbinole der meta-NHS- bzw. meta-(pNP)-ester 5 und 13 wurden auf ihre Reaktivität gegenüber LDA getestet. 5 und 13 sind gut in eher unpolaren organischen Lösungsmitteln wie Chloroform oder Dichlormethan löslich, verfügen jedoch nur über wenig Löslichkeit in polaren Lösungsmitteln wie Methanol oder Wasser. LDA zeigt ein dazu genau entgegengesetztes Lösungsverhalten. Bei Umsetzungsversuchen in Dioxan/Wasser-Gemischen kam es zur Bildung von Zweiphasensystemen, wobei das Carbinol in der organischen und LDA in der wäßrigen Phase vorlag. Die Verwendung von Tetrabutylammoniumhydrogensulfat als PTC führte zu keinen Ergebnissen. Wie sich aber herausstellte, waren sowohl die Tritylverbindungen als auch LDA in einer homogenen Lösung aus Methanol/Chloroform 2:1 löslich, wenn dieses Gemisch einen Anteil von 3% N-Ethylmorpholin enthielt. Jedes Carbinol wurde daraufhin mit der jeweils doppelten Menge LDA bei RT in Methanol/Chloroform 2:1 mit 3% N-Ethylmorpholin versetzt. Die Reaktionen wurden mittels DC verfolgt. Im Falle von m-pNP-DMT-OH 13 erfolgte auch nach 20 h kein Umsatz der Edukte. Wurde 13 jedoch mit 1,6-Diaminohexan anstelle von LDA versetzt, so kam es zu einer nahezu quantitativen Umsetzung. m-NHS-DMT-OH 5 reagierte innerhalb von 16 h vollständig sowohl mit 1,6-Diaminohexan als auch mit LDA.



Abildung 51. Umsetzung von LDA 2 mit m-NHS-DMT-OH 5 zur Überprüfung der Reaktivität des NHS-Esters.

Die Aufreinigung des Produktes der Umsetzung von LDA mit m-NHS-DMT-OH 5, N-{5-[3´-Bis(p-methoxyphenyl)hydroxymethyl]benzoylamino-1-carboxypentyl}-iminodiessigsäure 7, erwies sich zunächst als schwierig. Die Substanz konnte weder durch präparative RP-HPLC noch durch RP-Säulenchromatographie mit Amberlite XAD-4 [112] in reiner Form gewonnen werden. Schließlich gelang die Aufreinigung durch präparative Dünnschichtchromatographie mit Kieselgel.

5.1.3 Retritylierung von USP

Am 3´-Terminus an CPG gebundene Oligonukleotide wurden mit den Chloriden der meta- und para-NHS-Ester 6 und 16 5´-retrityliert. Da sich die Reaktivität des p-Nitrophenylesters 13 als zu gering gegenüber LDA herausgestellt hatte, wurden keine Retritylierungsversuche mit dessen Chlorid durchgeführt. Das para-Nitrophenylestertritylchlorid 15 wurde nicht hergestellt, weil wie bereits erwähnt die Reaktivität der para-Ester gegenüber Nukleophilen geringer ist als die der meta-Ester.

Die an CPG immobilisierten Oligonukleotide wurden am DNA-Synthesizer nach der Phosphoamiditmethode hergestellt. Die Oligonukleotide verfügten über die Cyanoethoxy- und Basenschutzgruppen und zunächst noch über eine Dimethoxytrityl-(DMT-)-Schutzgruppe am 5′-Terminus. Die Sequenz der synthetisierten Oligonukleotide war die des USP.
Aliquote der gebundenen Oligonukleotide wurden durch konz. NH_3 abgespalten und entschützt und mittels HPLC vermessen. Etwa 90-95% der Oligonukleotide waren demzufolge dimethoxytrityliert, bei den restlichen Oligonukleotiden handelte es sich um Rumpfsequenzen, welche während der Phosphoamiditsynthese mit Capping-Reagenz 5′-acetyliert worden sind und daher keine DMT-Gruppen aufwiesen. Somit konnten etwa 5-10% des Ausgangsmaterials von vornherein nicht retrityliert werden.
Die DMT-Gruppen der immobilisierten Oligonukleotide wurden mit DCA abgespalten und die Extinktion des Eluats wurde photometrisch vermessen. Auf diese Weise konnte die Beladung des CPG mit trityliertem Oligonukleotid bestimmt werden, durchschnittlich etwa 20 nmol/mg. Von einem Aliquot CPG wurde das Oligonukleotid durch konz. NH_3 abgespalten und entschützt. Nach Fällung mit n-Butanol wurde in Wasser aufgenommen. Der Oligonukleotidgehalt der erhaltenen Lösung wurde photometrisch ermittelt. Die Ausbeute an Oligonukleotid bezogen auf die ermittelte Beladung des CPG betrug etwa 60-75%. Die Ausbeuteverluste sind auf die alkoholische Fällung zurückzuführen.

Sowohl die Retritylierungen als auch die anschließenden Umsetzungen mit LDA und 1,6-Diaminohexan wurden in PerSeptive Reaktionssäulen vorgenommen, wie sie auch für die Phosphoamiditsynthese verwendet werden. Die Zugabe von Reaktionslösungen zum CPG erfolgte durch Einwegspritzen (Abb. 52).

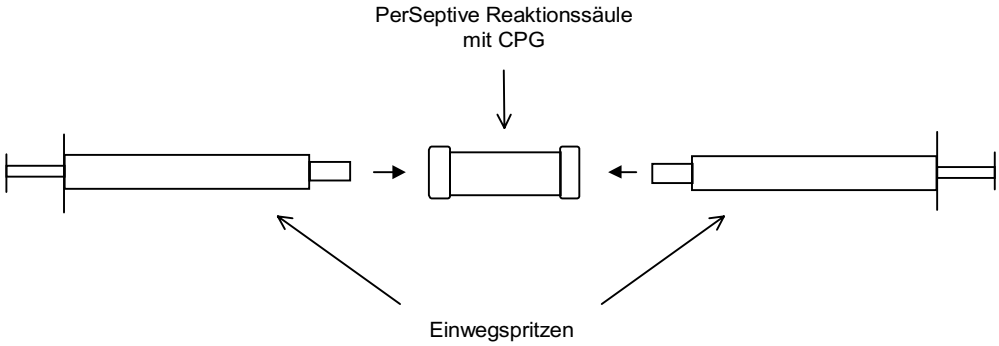


Abbildung 52. Umsetzung von beladenem CPG mit Reaktionslösungen.

Zur Retritylierung wurde das an CPG gebundene, 5′-entschützte Oligonukleotid mit einer Lösung des Tritylchlorides in Dichlormethan in Gegenwart von sym-Collidin und Tetrabutylammoniumperchlorat inkubiert. Anschließend wurde mit Dichlormethan gewaschen, bis im Eluat keine Tritylkationen mehr nachweisbar waren.
Die Güte der Retritylierung mit m-NHS-DMT-Cl 6 wurde untersucht, indem die Tritylgruppe eines Aliquotes mit DCA abgespalten wurde. Die erhaltene Lösung wurde photometrisch vermessen. Um aus den Meßwerten die Tritylkonzentration der Lösung berechnen zu können, wurde der Extinktionskoeffizient des Tritylkations durch Eichreihen mit m-NHS-DMT-OH 5

in DCA/Dichlormethan photometrisch bestimmt (Abb. 53). Die Messungen wurden bei einer Wellenlänge vorgenommen, bei der die Lichtabsorption der Lösung ein Maximum aufwies. Die Größe dieser Wellenlänge (λ=517 nm) wurde vorher durch UV/VIS-Spektroskopie ermittelt.

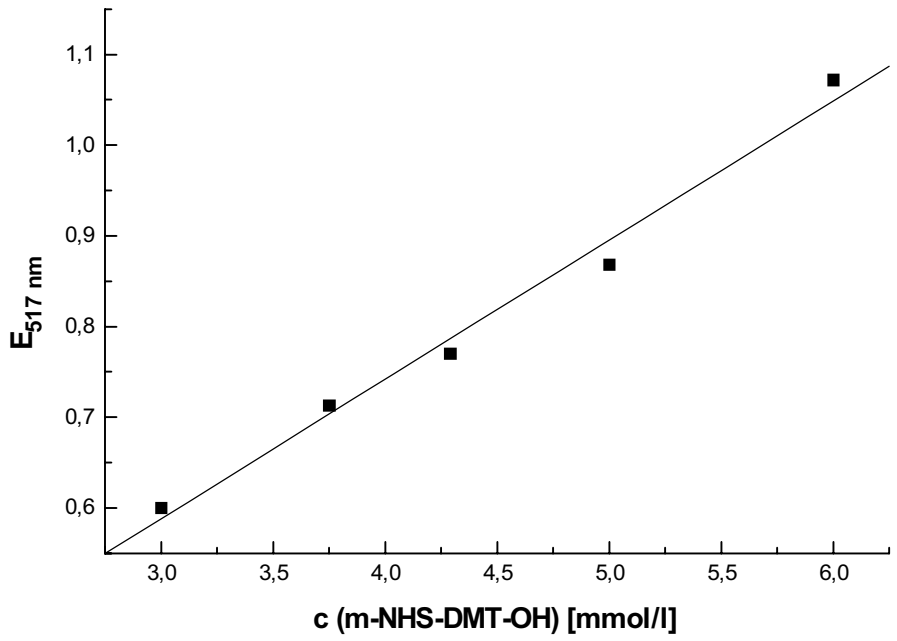


Abbildung 53. Bestimmung des Extinktionskoeffizienten ε von m-NHS-DMT-OH 5 durch photometrische Vermessung einer Verdünnungsreihe.

Der auf diese Weise ermittelte Retritylierungsgrad der an CPG gebundenen Oligonukleotide betrug etwa 75%. Die Porengröße des dabei verwendeten CPG war 50 nm. Bei Retritylierungsversuchen mit CPG mit einer Porengröße von 100 nm wurden deutlich schlechtere Ergebnisse erzielt.

Aliquote von retritylierten Oligonukleotiden wurden nach Abspaltung vom Träger mittels MALDI-TOF MS vermessen. Erwartungsgemäß hydrolysierte die NHS-Estergruppe unter den stark alkalischen Bedingungen der Abspaltung zu der entsprechenden Carboxylfunktion. Es zeigte sich ferner, daß es unter den Bedingungen der Messung zu einer erheblichen Detritylierung des Oligonukleotides kam. Sowohl untritylierter USP als auch abgespaltene Tritylgruppen konnten im Spektrum beobachtet werden. Diese Detritylierung ist auf den sauren Charakter der verwendeten Matrix, 3-HPA, sowie auf die bei der Messung auf die Probe einwirkende Laserenergie zurückzuführen.

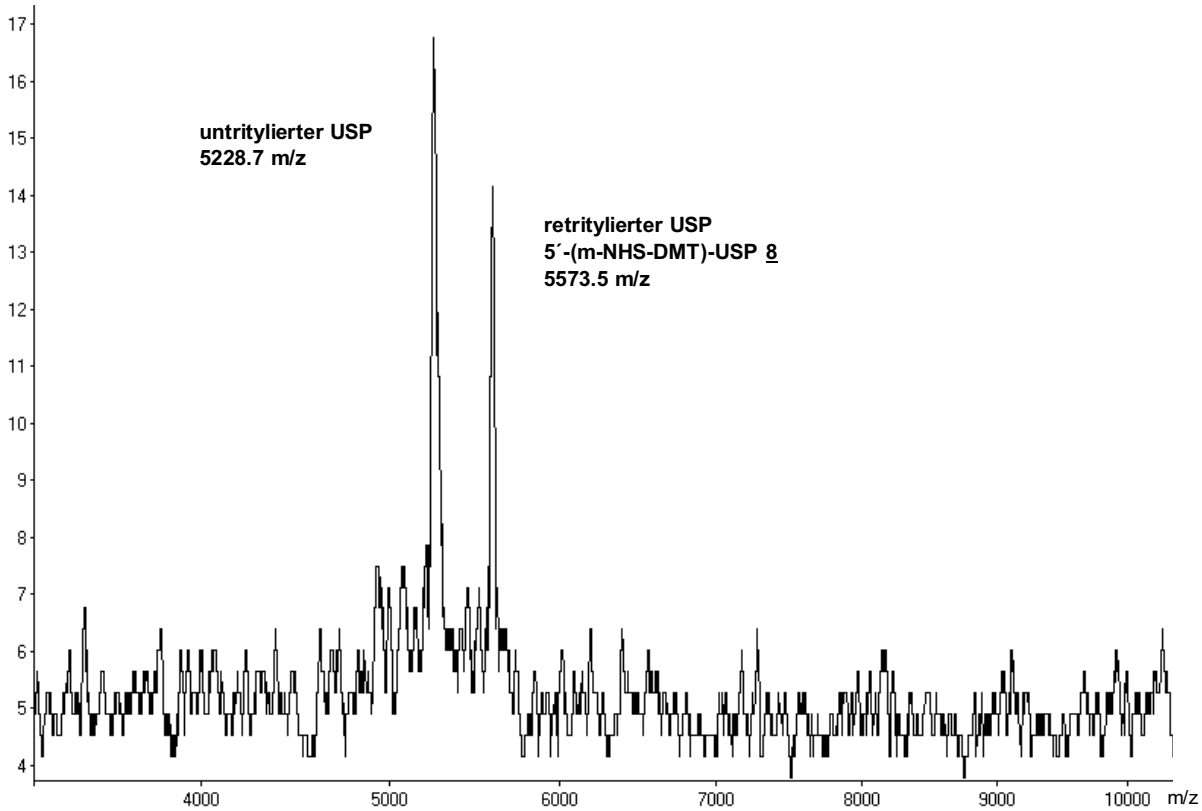


Abbildung 54. MALDI-TOF-Massenspektrum von mit m-NHS-DMT-Cl 6 5´-retrityliertem USP. Der verhältnismäßig hohe Anteil an untrityliertem USP ist teilweise auf Detritylierungsreaktionen während der Messung zurückzuführen.

Der retritylierte und abgespaltene USP wurde außerdem nach [78] mittels PAGE untersucht. Im Gel war sowohl trityliertes als auch untrityliertes Oligonukleotid erkennbar (Abb. 55).

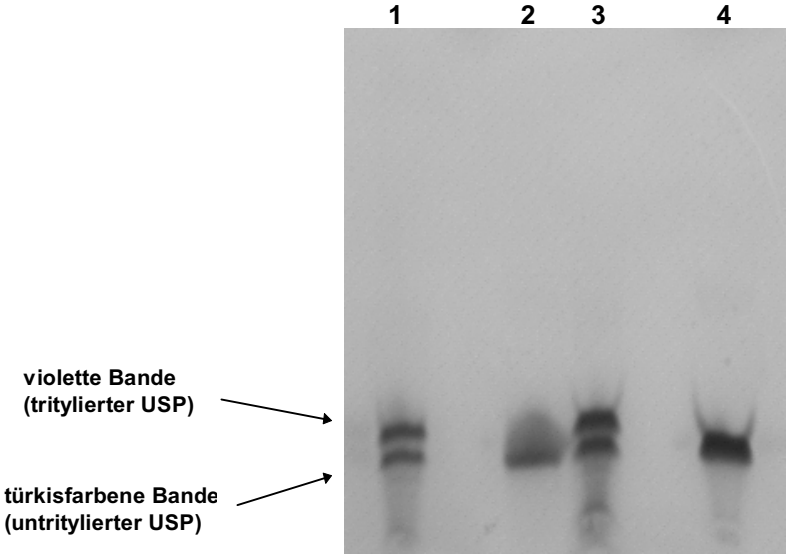


Abbildung 55. 20%iges denaturierendes Polyacrylamidgel. (1,3) mit m-NHS-DMT-Cl 6 5´-retritylierter USP, (2,4) untritylierter USP. Anfärbung mit stains-all. Ein relativ hoher Anteil an untrityliertem USP ist in (1,3) erkennbar.

5.1.4 Umsetzung von retrityliertem USP mit 1,6-Diaminohexan

Zur Kontrolle der Reaktivität der Esterfunktion wurde mit m-NHS-DMT-Cl 6 5´-retrityliertes und 3´-CPG-gebundenes Oligonukleotid 8 nach [78] mit 1,6-Diaminohexan zu 9 umgesetzt (Abb. 49). Nach Abspaltung und Entschützung wurde das Oligonukleotid mittels MALDI-TOF MS vermessen. Die Abwesenheit von durch Hydrolyse des Esters entstandener Carbonsäure läßt auf eine quantitativen Verlauf der Reaktion schließen (Abb. 56).

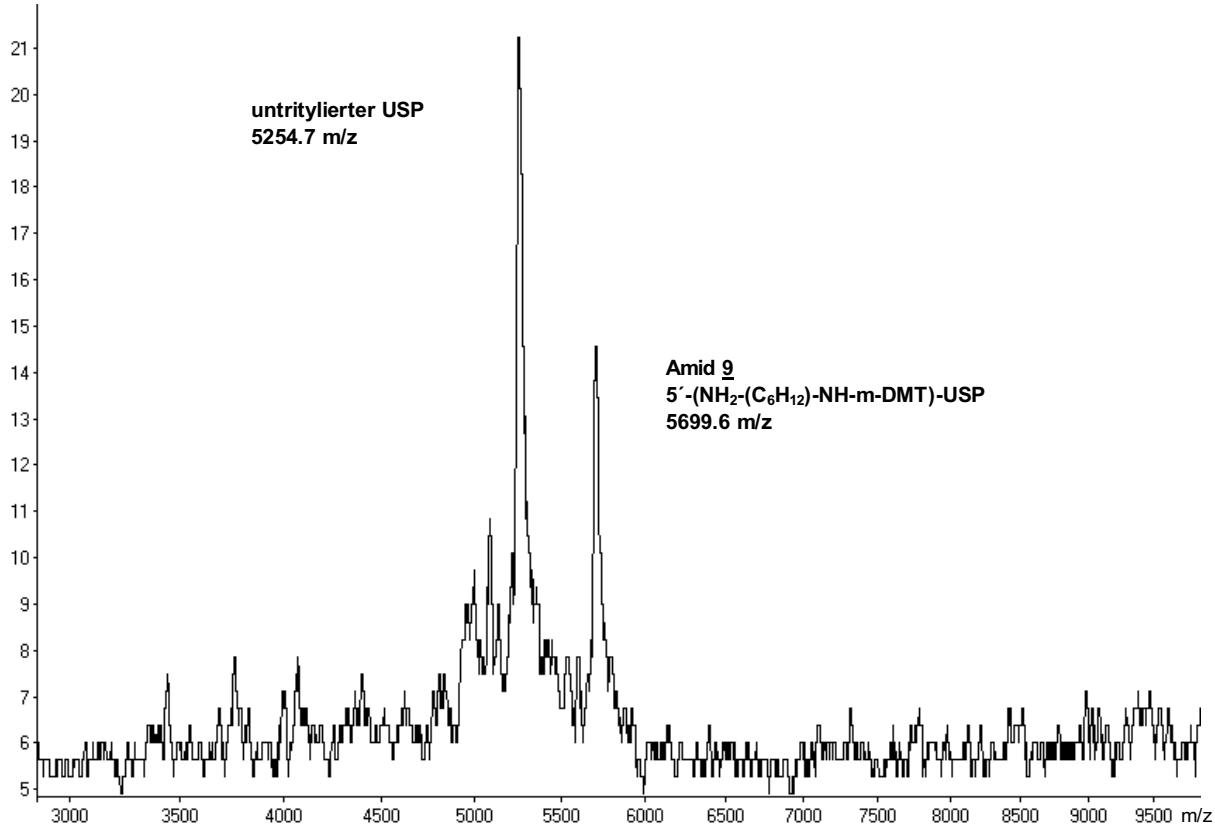


Abbildung 56. MALDI-TOF-Massenspektrum des Amides 9. Ein Carbonsäurepeak ist nicht zu beobachten.

Der Anteil an untrityliertem Oligonukleotid war wie erwartet aufgrund der noch während der Messung erfolgten Detritylierung hoch. Untersuchungen mit RP-HPLC zeigten allerdings, daß tatsächlich lediglich etwa ein Drittel der Oligonukleotide in tritylierter Form vorlagen. Dies ist auf die relativ hohe Instabilität der meta-Trityletherbindung zurückzuführen, wodurch es sehr leicht zur Abspaltung der Tritylgruppe in Lösung kommt.

5.1.5 Umsetzung von retrityliertem USP mit LDA

Mit m-NHS-DMT-Cl 6 retrityliertem USP 8 wurde mit LDA zum Konjugat 5´-(m-LDA-DMT)-USP 10 umgesetzt (Abb. 57). Hauptproblem bei diesen Umsetzungen war die geringe Löslichkeit von LDA in organischen Lösungsmitteln. Da die Versuche an fester Phase

vorgenommen wurden, mußte zudem ein Lösungsmittel gefunden werden, welches dazu imstande war, das CPG in ausreichendem Maße zu benetzen. Das bei der Phosphoamiditsynthese als Lösungsmittel verwendete Acetonitril oder Gemische aus Acetonitril und Wasser konnten zu diesem Zweck nicht verwendet werden, da LDA eine zu geringe Löslichkeit in diesen Lösungsmitteln besaß.

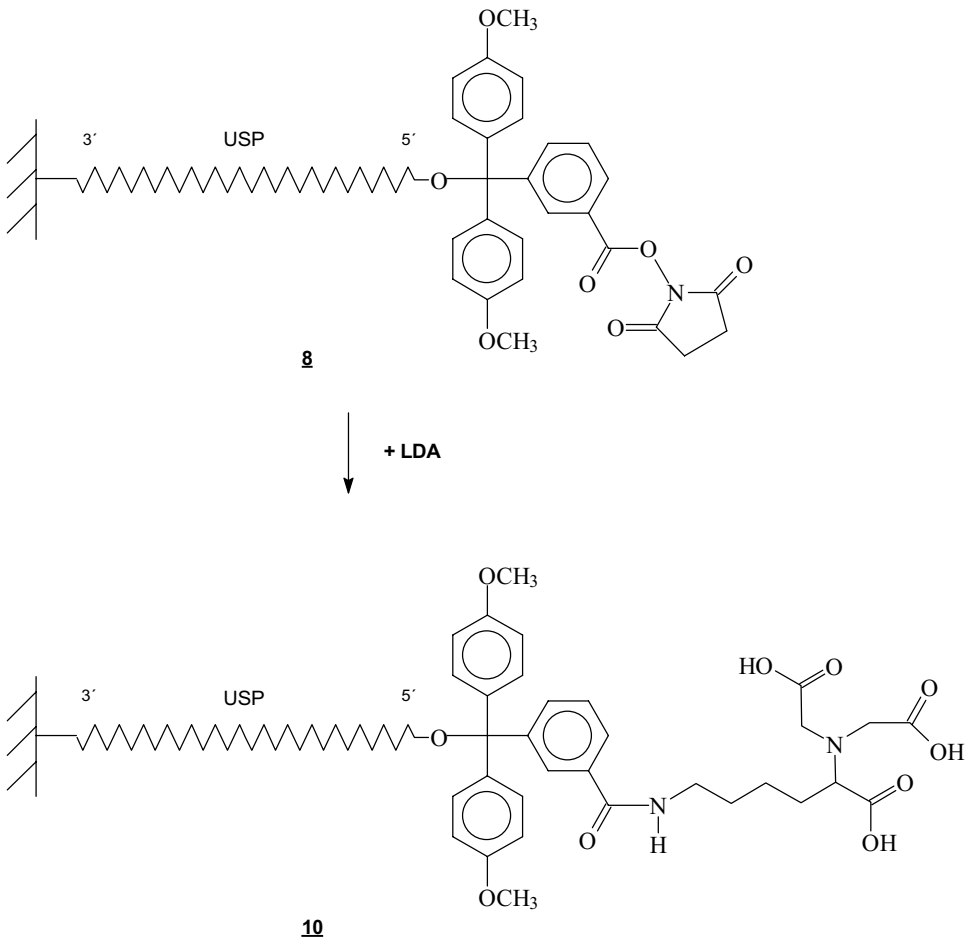


Abbildung 57. Umsetzung von 5´-retrityliertem USP 8 mit LDA 2 zum NTA-funktionalisierten Oligonukleotid 10.

Die ersten Versuche zur Umsetzung von retrityliertem und an CPG gebundenem USP 8 mit LDA wurden mit Methanol/Chloroform 2:1 und 3% N-Ethylmorpholin als Lösungsmittel vorgenommen, da unter diesen Bedingungen das Carbinol 5 bereits erfolgreich mit LDA zur Reaktion gebracht werden konnte. Das Oligonukleotid wurde mit konz. NH_3 vom Träger abgespalten und entschützt. Die Analyse mit MALDI-TOF MS ergab jedoch, daß nur ein geringer Teil von 8 zum gewünschten Amid 10 reagierte. Zum überwiegenden Teil kam es stattdessen zur Hydrolyse des NHS-Esters unter Bildung des Carboxylat-Ions 17, wahrscheinlich während der Abspaltungs- und Entschützungsreaktion (siehe Abb. 58).

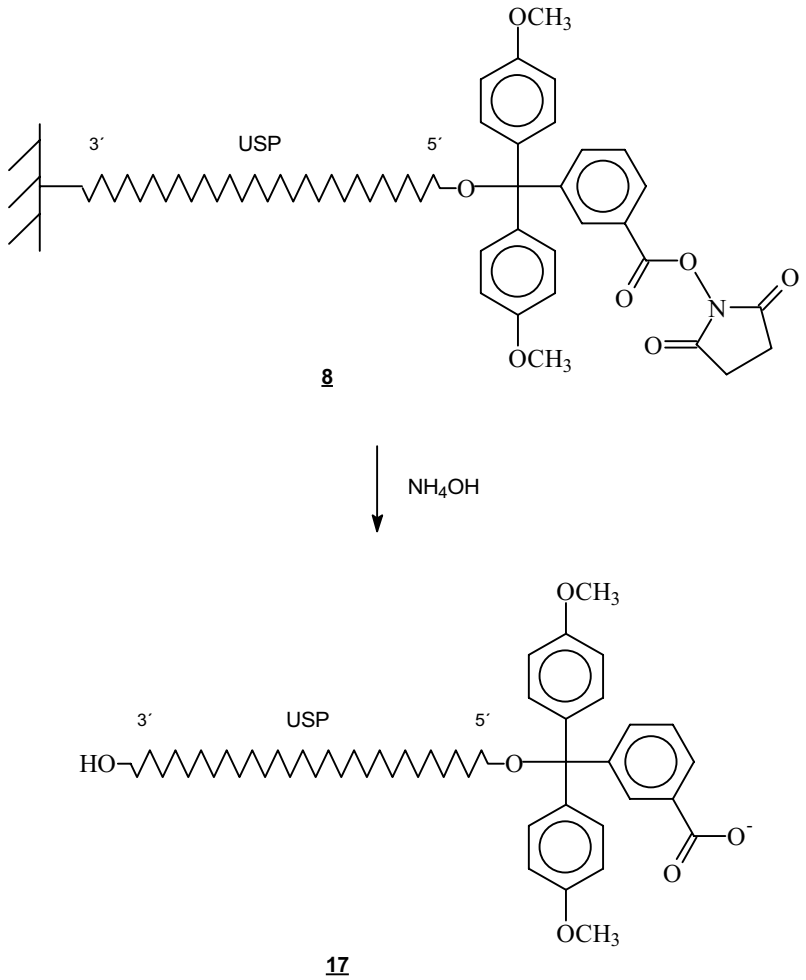


Abbildung 58. Hydrolyse des NHS-Esters 8 in wäßriger ammoniakalischer Lösung. Dieser Reaktion erfolgt mit nicht umgesetztem Ester während der Abspaltung des Oligonukleotides von CPG.

Wie aus der massenspektroskopischen Untersuchung ferner hervorging, lag im Produktgemisch ein großer Anteil an untrityliertem USP vor.
Es wurden daraufhin Umsetzungsversuche mit wäßrigem LDA/Triethylamin-Puffer durchgeführt. Diese Versuche führten zu besseren Ausbeuten an gewünschtem Konjugat, doch lag auch in diesen Fällen ein großer Anteil an hydrolysiertem Ester im Reaktionsgemisch vor. Da eine Amidbindung im allgemeinen über eine hohe Stabilität verfügt, ist nicht davon auszugehen, daß die freie Carbonsäure durch die Spaltung von bereits gebildetem Amid während der MALDI-TOF MS-Messung entstand. Der Anteil an detrityliertem USP im Produktgemisch blieb erwartungsgemäß hoch. Abb. 59 zeigt ein typisches Spektrum.

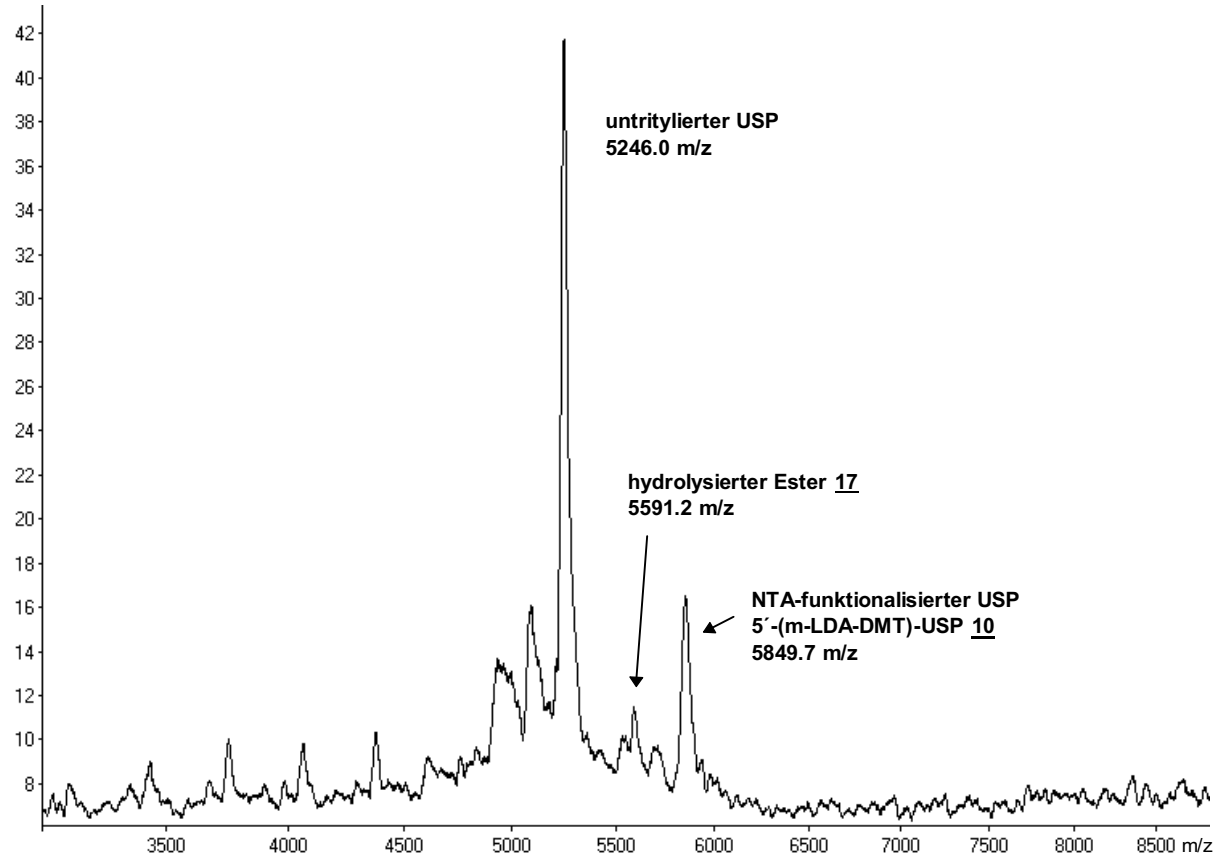


Abbildung 59. MALDI-TOF-Spektrum von NTA-funktionalisiertem USP 10. Deutlich zu erkennen ist das Signal für das durch die Hydrolyse des NHS-Esters 8 entstandenen Carboxylat-Ion 17.

In den verschiedenen aufgenommenen Spektren waren abgespaltene Tritylgruppen erkennbar, die sich mit LDA zum entsprechenden Amid umgesetzt hatten, sowie freie Tritylgruppen, deren Esterfunktionen hydrolysiert worden waren.
Verschiedene Versuche wurden vorgenommen unter Variation der LDA-Konzentration, der Inkubationszeit und des pH. Wie sich herausstellte, kam es dabei jedoch nur zu geringfügigen Unterschieden in den Ausbeuten, soweit dies aus den Spektren geschlossen werden konnte. Quantitative Betrachtungen sind mit MALDI-TOF MS nicht möglich. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die erhaltenen Ergebnisse.

Konzentration an LDA [mol/l]	Inkubationszeit [h]	pH	rel. Intensität von 10 [%] (USP=100)	Verhältnis Amid 10/ Carboxylat-Ion 17
0.5	3	9.0	39	1.45
0.5	3	10.0	53	1.15
1.0	3	9.0	45	1.36
0.5	24	9.0	35	1.10

Tabelle 1. Versuche mit LDA/Triethylamin. Alle Inkubationen wurden bei RT vorgenommen. Eingesetzt wurden jeweils 1 mg CPG mit 20 nmol retrityliertem USP. LDA lag im 10^4fachen Überschuß zum Oligonukleotid vor.

Wie aus den angegebenen Werten zu entnehmen ist, führte die Verlängerung der Inkubationszeit nicht zu einer höheren Ausbeute. Hingegen wurde die Reaktion durch einen höheren pH und durch eine höhere Konzentration an LDA in gewissem Maße begünstigt. In Tabelle 1 ist die relative Intensität der Signale für das Amid 10 angegeben, wobei die Intensität des Signals für den USP gleich 100% gesetzt wurde.
In allen Fällen war jeweils ein Signal für das durch Hydrolyse des Esters entstandene Carboxylat-Ion 17 zu beobachten, woraus folgt, daß keine der Reaktionen quantitativ verlaufen ist. Das Signal für das Amid 10 war jedoch immer stärker als das für das Carboxylat-Ion 17 beobachtete Signal. In der letzten Spalte von Tabelle 1 ist zum Vergleich das Verhältnis der Intensität des Signales des Amides 10 zur Intensität des Signales des Carboxylat-Ions 17 angegeben, ohne Berücksichtigung der abgespaltenen Tritylgruppen.
Die Reaktionsprodukte wurden ferner mittels RP-HPLC untersucht. Wie sich zeigte, war demzufolge jeweils etwa ein Drittel der Oligonukleotide trityliert. Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit den für die Umsetzung mit 1,6-Diaminohexan (siehe 5.1.4) gefundenen Werten. Da der Tritylierungsgrad des Eduktes 5´-(m-NHS-DMT)-USP 8 vor der Reaktion ungefähr 75% betrug, muß davon ausgegangen werden, daß es nicht nur bei der Vermessung mit MALDI-TOF MS, sondern bereits während der Reaktion mit LDA bzw. bei der Abspaltung/Entschützung zu einer starken Detritylierung des Oligonukleotides gekommen war.
Auf Messungen mit MALDI-TOF MS und RP-HPLC beruhende Schätzungen ergaben, daß der Anteil des Amides 10 am Gemisch der tritylierten Oligonukleotide (Amid 10 und Carboxylat-Ion 17) etwa 60% betrug, was einem Anteil von etwa 20% am gesamten Produktgemisch (tritylierte und untritylierte Oligonukleotide) entspricht. Die erzielte Ausbeute an Amid 10 ist damit in etwa so groß wie die von *Schmitt* et al. bei der Synthese von NTA-funktionalisierten Lipiden aus Carbonsäure-NHS-Estern und LDA erhaltene Ausbeute von 18% [49]. Die verhältnismäßig geringen Ausbeuten bei der Umsetzung von LDA mit NHS-Estern sind auf die große Reaktionsträgheit von LDA zurückzuführen. Im Falle von 10 wird die Ausbeute zusätzlich durch die Detritylierung der Oligonukleotide vermindert.

Es konnte gezeigt werden, daß CPG-gebundene Oligonukleotide, die auf die beschriebene Weise NTA-funktionalisiert worden waren, eine Affinität gegenüber BAPHis6 besaßen (siehe 6.1).

Verschiedene Versuche wurden unternommen, um 5´-(m-LDA-DMT)-USP 10 aus dem erhaltenen Produktgemisch zu isolieren. Vielfach gelingt die Trennung von modifizierten Oligonukleotiden durch präparative RP-HPLC unter Verwendung einer C18-Säule und von TEA/Acetonitril als Laufmittel. Standardmäßig können mit dieser Methode Oligonukleotide, welche mit der DMT-Gruppe geschützt sind, von den bei der Oligonukleotidsynthese entstandenen ungeschützten Rumpfsequenzen getrennt werden. Bei Aufreinigungsversuchen mit dieser Methode konnten zwar tritylierter USP 10 und 17 von untrityliertem USP und den Rumpfsequenzen getrennt werden, jedoch kam es noch während der Aufarbeitung zu erneuter Detritylierung des USP. Somit konnten keine Fraktionen erhalten werden, die völlig frei von untrityliertem Oligonukleotid waren. In keinem Fall gelang die Trennung des Gemisches aus den tritylierten Oligonukleotiden 10 und 17.
Als ebenfalls nicht möglich erwies sich die Trennung von 10 und 17 mittels HPLC unter Verwendung einer Anionenaustauschersäule und eines Natriumchloridgradienten.

Der Anteil an untrityliertem USP im Produktgemisch konnte durch Aufreinigung mit Oligonucleotide Purification Cartridges (OPC, Applied Biosystems) verringert werden. OPC werden üblicherweise für die Trennung von DMT-on- und DMT-off-Oligonukleotiden verwendet. Untersuchungen mit MALDI-TOF MS ergaben, daß das Signal für den untritylierten USP durch Aufreinigung des Gemisches mit OPC um etwa 30% reduziert werden konnte. Eine vollständige Entfernung des untritylierten Oligonukleotides war mit dieser Methode nicht möglich.

Die Umsetzung von mit p-NHS-DMT-Cl 16 retrityliertem USP mit LDA blieben im Gegensatz zu den Versuchen mit 5´-(m-NHS-DMT)-USP 8 erfolglos. Untersuchungen mit MALDI-TOF MS zeigten im Reaktionsgemisch kein Amid, sondern lediglich detritylierten USP und hydrolysierten Ester.

Es wurden Versuche zur Anbindung von Ni^{2+} an 5´-(m-LDA-DMT)-USP 10 durchgeführt. Diese Experimente konnten nicht mit an CPG gebundenem Oligonukleotid 10 erfolgen, da daß Oligonukleotid zur Analyse mit MALDI-TOF MS mit konz. NH_3 vom Träger gespalten werden muß. Unter diesen Bedingungen ist jedoch mit einer Komplexierung und somit Freisetzung von am Oligonukleotid gebundenem Ni^{2+} durch NH_3 zu rechnen. Die Versuche wurden daher mit 5´-(m-LDA-DMT)-USP 10 in Lösung vorgenommen. Verwendet wurde bei diesen Versuchen das Produktgemisch aus 10 und 17, dessen Gehalt an detrityliertem USP durch Aufreinigung mit OPC verringert worden war. Die Oligonukleotide wurde mit 2 mM bzw. 100 mM NiCl inkubiert und anschließend mit Mikrokonzentratoren mit einem NCO von 10 diafiltriert. Es wurde wiederholt mit TEA gewaschen. Der Salzgehalt der Proben erwiesen sich jedoch als zu hoch für eine Vermessung mit MALDI-TOF MS, so daß das gewünschte Konjugat nicht nachgewiesen werden konnte.

5.2 Versuche zur Verknüpfung von LDA mit aminofunktionalisierten Oligonukleotiden

Aminofunktionalisierte Oligonukleotide können mittels verschiedenen bifunktionellen Reagenzien mit Substanzen verknüpft werden, welche über eine primäre Aminogruppe verfügen. Auf diese Weise lassen sich beispielsweise Konjugate aus Oligonukleotiden und Enzymen herstellen. Die Aminogruppen der Oligonukleotide werden dabei mit den Lysinresten der Proteine verbunden. Bei den bifunktionellen Reagenzien handelt es sich meistens um reaktive N-Hydroxysuccinimid-(NHS)-Diester, welche unter Bildung von Amidbindungen mit Aminogruppen reagieren. Zwei dieser Reagenzien, EGS und DSS, wurden auf ihre Eignung hin überprüft, LDA an aminylierte Oligonukleotide zu binden.
Oligonukleotide werden häufig durch Einbau einer mit einem Aminolinker versehenen Thymidinbase während der Phosphoamiditsynthese aminofunktionalisiert [1]. Da eine Verknüpfung mit LDA an einer solchen Position jedoch möglicherweise zu einer Beeinträchtigung der Basenpaarung führt, wurden für die nachfolgend beschriebenen Versuche jedoch statt dessen 5´-aminofunktionalisierte Oligonukleotide verwendet. Modifizierte Oligonukleotide dieser Art werden nach der Phosphoamiditmethode mit Amiditen hergestellt, welche über eine geschützte Aminogruppe verfügen [126]. Die jeweils mit einer 5´-Aminohexylgruppe versehenen Oligonukleotide wurden kommerziell bezogen (Biometra).

Es wurde getestet, ob eine Umsetzung mit LDA möglich ist, wenn das jeweilige Oligonukleotid noch 3´-terminal an CPG gebunden ist. Eine Umsetzung an fester Phase hat den Vorteil, daß die im hohen Überschuß vorhandenen Edukte am Ende der Reaktion durch einfaches Waschen des Trägers mit geeigneten Lösungsmitteln entfernt werden können.
Die Versuche wurden in PerSeptive Reaktionssäulen wie unter 5.1.3 beschrieben durchgeführt. Die Oligonukleotide waren noch vollständig geschützt, besaßen aber keine 5´-DMT-Gruppe mehr. Nach den Inkubationen wurden die Oligonukleotide auf die übliche Weise vom CPG abgespalten, entschützt und gefällt.

5.2.1 Versuche mit EGS

Das bifunktionelle Reagenz Ethylenglycol-bis(succinsäure-N-hydroxysuccinimidester) (EGS) kann verwendet werden, um AP an 5´-aminylierte Oligonukleotide zu binden [11].

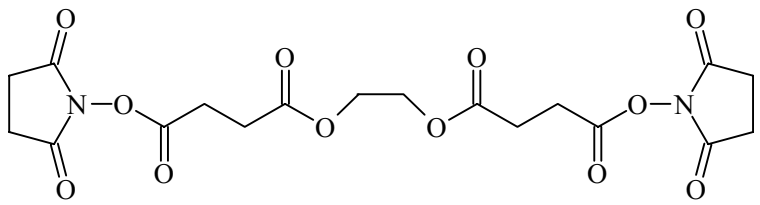


Abbildung 60. Struktur von Ethylenglycol-bis(succinsäure-N-hydroxysuccinimidester) (EGS).

Zur Untersuchung, ob EGS dazu geeignet ist, LDA an Oligonukleotide zu binden, wurde LDA in Gegenwart von EGS mit 5´-aminohexylfunktionalisiertem USP umgesetzt.
Der 3´-CPG-gebundene USP wurde zunächst zur vollständigen Deprotonierung der Aminofunktion mit Pyridin/DMF gewaschen, dann wurde mit einer frisch hergestellten Lösung von EGS (Sigma) in DMF bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit LDA in Natronlauge bei pH 7. Schließlich wurde mit Triethylammoniumacetatpuffer und Wasser gewaschen. Das Oligonukleotid wurde abgespalten und entschützt.
Die Untersuchung mit MALDI-TOF MS zeigte jedoch kein Signal für das gewünschte Konjugat aus USP und LDA, noch war ein Signal für ein Addukt aus USP und hydrolysiertem EGS erkennbar.
Um auszuschließen, daß es während der Entschützung des Oligonukleotides zu einer Spaltung der Amidbindung gekommen ist, wurden die Versuche mit aminofunktionalisiertem Thymidin-25mer (T_{25}) wiederholt. Da das Thymidin über keine Basenschutzgruppe verfügt, entfiel der Entschützungsschritt. Die Decyanoethoxylierung der Phosphatgruppen erfolgte noch während der Abspaltung vom CPG mit Ammoniak.
Auch bei diesen Umsetzungen wurde jedoch nicht das gewünschte Konjugat erhalten.
Zur Überprüfung der Reaktivität von EGS gegenüber LDA wurde daraufhin EGS in DMF mit der zweifachen Menge LDA in NaOH versetzt. Es wurde bei RT inkubiert und anschließend mit Ethanol gefällt. Die NMR-spektroskopische Analyse zeigte kein LDA-Dimer an, sondern lediglich Edukt. Offenbar ist die Reaktivität von LDA für eine erfolgreiche Umsetzung mit EGS zu gering.

5.2.2 Versuche mit DSS

Das am häufigsten für die Synthese von Konjugaten aus aminylierten Oligonukleotiden und AP verwendete bifunktionelle Reagenz ist Disuccinimidylsuberat (DSS) (Abb. 61) [1].

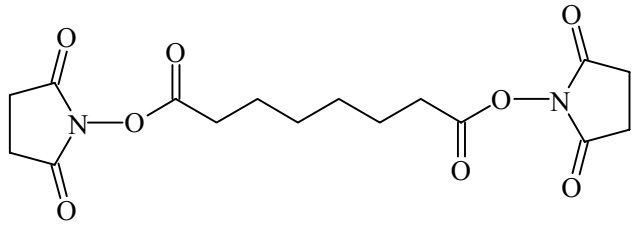


Abbildung 61. Struktur von Disuccinimidylsuberat (DSS).

Die Umsetzung von 5´-aminylierten und an CPG gebundenen Oligonukleotiden mit LDA erfolgte nach der Vorschrift von *Ruth* für die Darstellung von Konjugaten aus gelösten aminylierten Oligonukleotiden und AP mit DSS [1].
In den Versuchen wurden zwei Arten von 5´-aminofunktionalisierten Oligonukleotiden verwendet, zum einen der auch bei den Versuchen mit EGS benutzte 5´-aminohexylierter USP, zum anderen mit NHS-Ester retritylierter und mit 1,6-Diaminohexan umgesetzter USP, 5´-(NH_2-(C_6H_{12})-NH-m-DMT)-USP 9 (siehe 5.1.4). Beide Oligonukleotide waren mit ihrem jeweiligen 3´-Terminus an CPG gebunden.
Die immobilisierten Oligonukleotide wurden mit einer frisch zubereiteten Lösung aus DSS in DMSO und 0.1 M $NaHCO_3$ pH 8.5 versetzt. Unter diesen Bedingungen wird DSS rasch hydrolysiert, so daß lediglich 1 min bei RT inkubiert wurde. Zur Entfernung des überschüssigen DSS wurde mit n-Butanol gewaschen, anschließend erfolgte Inkubation mit LDA bei pH 9.3 bei RT. Nach Waschen mit Wasser wurden die Oligonukleotide bei RT abgespalten, entschützt und gefällt.
Die Untersuchung mit MALDI-TOF MS ergab, daß auch in diesem Fall keine Umsetzung erfolgt war.

Somit konnte LDA weder mit EGS noch mit DSS an 5´-aminylierte Oligonukleotide gebunden werden.

5.3 Verknüpfung von LDA mit phosphorylierten Oligonukleotiden

Oligonukleotide mit primären Phosphatgruppen können mit Carbodiimiden aktiviert und anschließend mit Aminen oder Alkoholen zu Phosphoamidaten bzw. Phosphomonoestern umgesetzt werden [90].
5´-phosphorylierte Oligonukleotide haben gegenüber 3´-phosphorylierten Oligonukleotiden die größere Bedeutung in der Molekularbiologie. Viele Vorschriften für die chemische Modifikation an der Phosphatgruppe gehen von 5´-phosphorylierten Oligonukleotiden aus.
Zur Darstellung von 5´-phosphorylierten Oligonukleotiden gibt es verschiedene Methoden.

Eine Möglichkeit besteht beispielsweise in der direkten Phosphorylierung der 5´-Hydroxylgruppe eines Oligonukleotides mit Phosphorylchlorid in Gegenwart von Wasser, Pyridin und Acetonitril [116].
Eine 5´-terminale Phosphatgruppe kann auch bereits während der chemischen Synthese nach der Phosphoamiditmethode am DNA-Synthesizer durch Umsetzung mit 2 -Cyanoethyl-3-(4,4´-dimethoxytrityloxy)-2,2-di(ethoxycarbonyl)propyl-1-N,N-diisopropylphosphoamidit in ein Oligonukleotid eingeführt werden [115]. Nach der Abspaltung vom Träger wird ein Oligomer erhalten, welches an der 5´-Phosphatgruppe dimethoxytritylgeschützt ist. Die DMT-Gruppe wird nach der Aufreinigung des Oligonukleotides durch RP-HPLC mit Dichlor- oder Trifluoressigsäure entfernt. Versuche zur Darstellung von 5´-phosphoryliertem USP nach dieser Methode am DNA-Synthesizer führten jedoch zu unbefriedigenden Ausbeuten (20-40%), wie die Analyse der Produkte durch HPLC zeigte.
Oligonukleotide können auch enzymatisch mit PNK 5´-phosphoryliert werden. Der synthetisierte USP wurde zu diesem Zweck mit PNK und ATP inkubiert. Die Analyse mit Ionenaustauschchromatographie ergab einen Phosphorylierungsgrad von ca. 70%. Die Synthese wurde mit jeweils 200 pmol USP vorgenommen. Da enzymatische Synthesen in diesem Maßstab jedoch unökonomisch sind, wurde in späteren Experimenten auf die Darstellung von phosphoryliertem USP verzichtet. Statt dessen wurde kommerziell erhältliches 5´-phosphoryliertes Oligonukleotid (Biometra) verwendet.

Khorana et al. benutzten seinerzeit Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) in Wasser/DMF/Butanol zur Aktivierung von terminalen Phosphatgruppen [117]. Mittlerweise wird anstelle von DCC jedoch das wasserlösliche 1-Ethyl-3-[3-(dimethylamino)propyl]carbodiimid (EDC) zu diesem Zweck verwendet (Abb. 62).

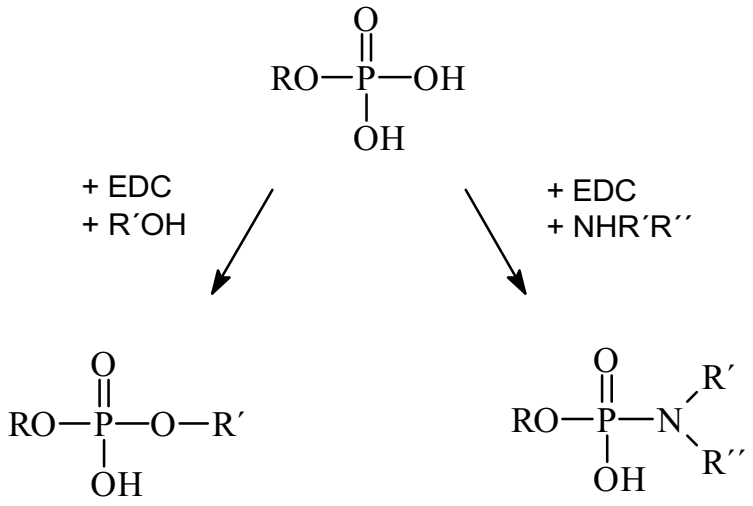


Abbildung 62. Direkte Umsetzung von Phosphomonoestern zu Phosphodiestern bzw. Phosphoamiden unter Verwendung von EDC. R = Oligonukleotidrest.

Die Umsetzung wird mit ungeschützten Oligonukleotiden in wäßriger Lösung vorgenommen, die dabei an den Nukleotidbasen stattfindenden Nebenreaktionen können vernachlässigt

werden. Der intermediär entstehende reaktive Phosphoester wird nicht isoliert, sondern in situ mit dem jeweiligen Nukleophil umgesetzt. Relativ hohe Konzentrationen an Nukleophil, etwa 2-3 mol/l, sind für die Reaktion erforderlich [90,119].
EDC liegt in mehreren tautomeren Formen vor, abhängig vom pH [118] (Abb. 63).

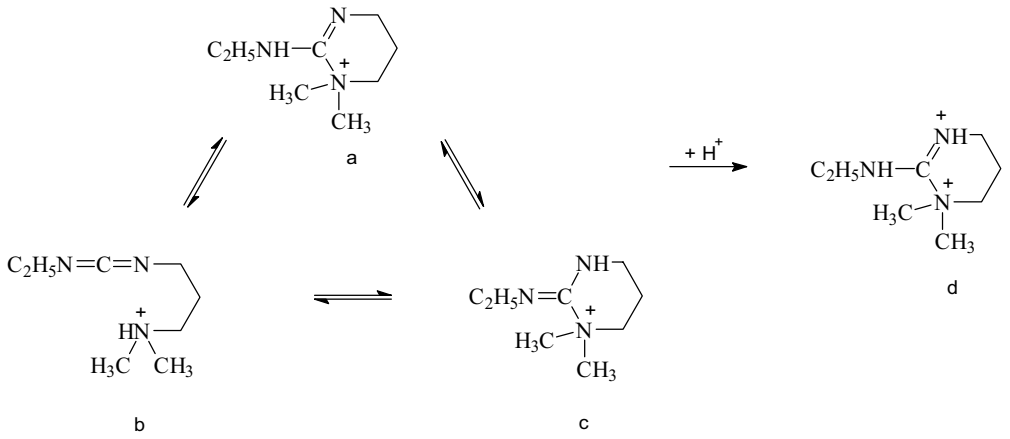


Abbildung 63. (a-c) Tautomere von EDC. (d) Reaktive protonierte Form von EDC bei einem pH von 3-5 (nach *Ivanovskaya* et al.).

Die reaktivste Form ist die protonierte Struktur (d), weshalb die Aktivierung der Phosphatgruppen mit EDC bei saurem pH begünstigt ist. Für Reaktionen mit Nukleophilen, welche bei pH > 6 stattfinden, wurde folgender Reaktionsmechanismus für die Phosphomonoestermodifikation vorgeschlagen [118] (Abb. 64):

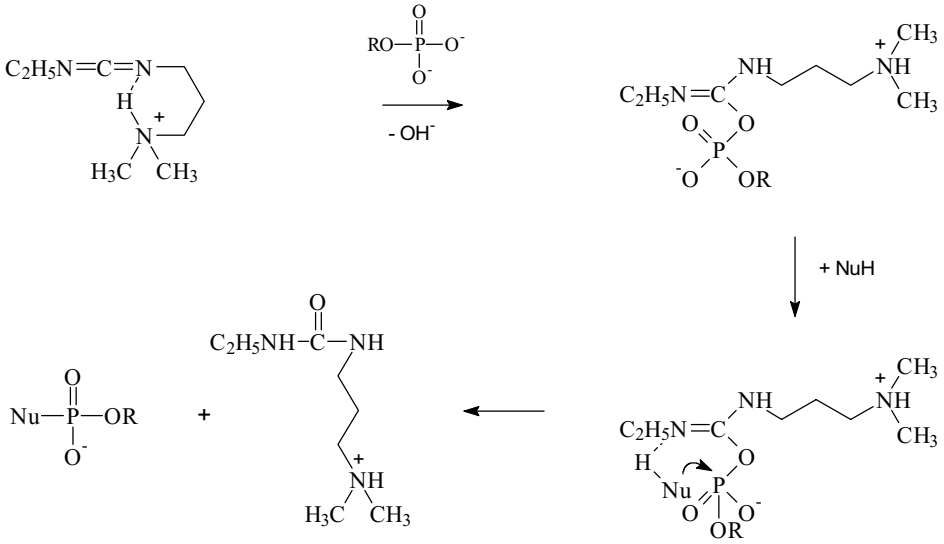


Abbildung 64. Reaktionsmechanismus der Phosphomonoestermodifikation mit EDC bei pH > 6 (nach *Ivanovskaya* et al.). Nu = Nukleophil.

Wird das Nukleophil seinerseits durch EDC aktiviert, so ist eine Umsetzung mit dem Oligonukleotid in situ ungünstig. In diesem Fall kann das phosphorylierte Oligonukleotid aber zunächst mit EDC und Imidazol zum reaktiven Phosphoimidazolid umgesetzt werden. Dieses wird isoliert und anschließend mit dem jeweiligen Nukleophil zur Reaktion gebracht [120] (Abb. 65). Nukleophile können Amine, Aminosäuren, Peptide oder Proteine sein. Die Methode wird verwendet zur Darstellung von Konjugaten aus Oligonukleotiden und Enzymen [2,100], zur Darstellung von Konjugaten aus Oligonukleotiden und RNA [121] oder zur Chelatmodifikation von Oligonukleotiden [99].
Einige Autoren empfehlen die Verwendung von 1-Hydroxybenzotriazol (HOBT) anstelle von Imidazol zur Darstellung von reaktiven Intermediaten [90,119] (Abb. 65). Die dabei erhaltenen HOBT-Phosphodiester dienen zur Immobilisierung von Oligonukleotiden an Nylonmembranen [125] oder zur Herstellung von DNA mit modifiziertem Zucker-Phosphat-Rückrat [122-124]. Nukleophile können Aminosäuren wie Lysin, Serin oder Threonin sein. Wurde ein phosphoryliertes Oligonukleotid mit EDC und HOBT aktiviert, so ist die für eine Kopplung erforderliche Konzentration an Nukleophil etwa zehnmal geringer als bei der direkten Umsetzung von Nukleophil und Oligonukleotid mit EDC [90].
Versuche zur Verknüpfung von 5´-phosphoryliertem USP und LDA mit EDC wurden in dieser Arbeit sowohl unter Verwendung von Imidazol als auch von HOBT durchgeführt.
Abb. 65 zeigt das Reaktionsschema.

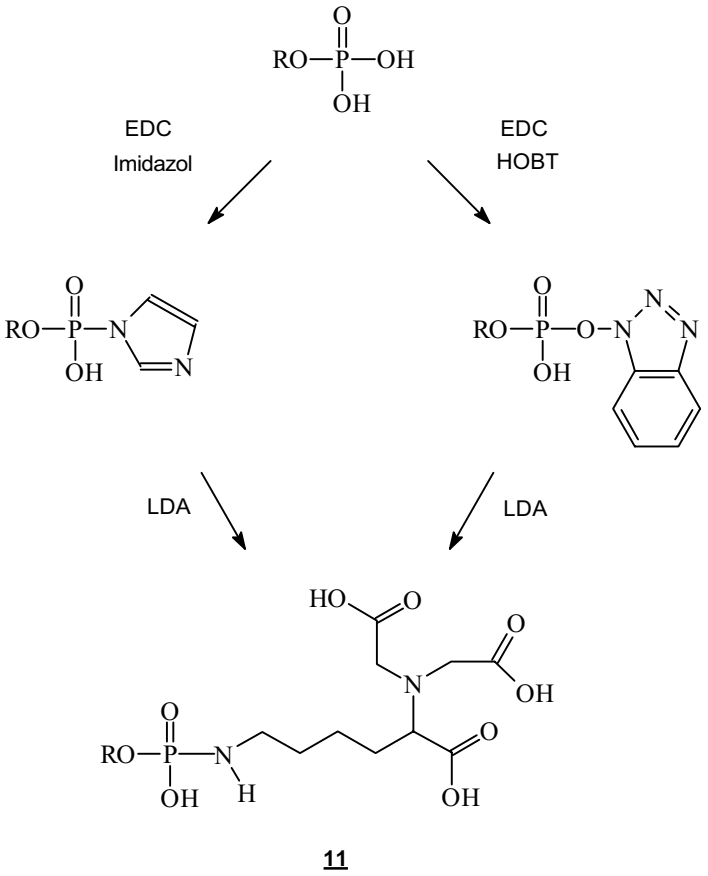


Abbildung 65. NTA-Funktionalisierung eines 5´-phosphorylierten Oligonukleotides mit LDA über das entsprechende Imidazolid bzw. den HOBT-Phosphodiester. R = Oligonukleotidrest (USP).

Eine direkte Umsetzung von Oligonukleotid und LDA mit EDC wurde nicht vorgenommen, da davon auszugehen ist, daß die Carboxylfunktionen des LDA ebenfalls durch EDC aktiviert werden.

5.3.1 Versuche mit Imidazol

Die Standardvorschrift für die Herstellung von Phosphoimidazoliden aus phosphorylierten Oligonukleotiden und deren Umsetzung mit Nukleophilen ist die Vorschrift von *Chu* et al. [120]. Zur Synthese des Imidazolides werden einige µmol 5´-phosphoryliertes Oligonukleotid für etwa eine Stunde in 0.1 M Imidazolpuffer bei pH 6 mit 0.1 M EDC bei RT inkubiert. Nach RP-HPLC mit einem Perchlorsäuregradienten zur Entfernung des überschüssigen EDC wird mit 0.25 M Nukleophil bei pH 7.7 für 1-3 h bei 50 °C inkubiert oder für 3-24 h bei RT.
Als Kontrollreaktion wurde zunächst nach der Vorschrift von *Chu* et al. 5´-phosphorylierter USP mit 1,6-Diaminohexan als Nukleophil umgesetzt. Zunächst wurde 2 h bei RT mit EDC und Imidazol inkubiert. Überschüssiges EDC wurde nach der Aktivierung des Oligonukleotides durch Diafiltration mit einem Mikrokonzentrator abgetrennt. Die anschließende Inkubation mit Diaminohexan erfolgte für 1 h bei 50 °C. Nach erneuter Diafiltration wurde das Oligonukleotid mit Ammomiumacetat gewaschen, um Kationen, welche die massenspektrometrische Messung stören würden, gegen Ammoniumionen auszutauschen. Die Analyse der Produkte erfolgte mit MALDI-TOF MS. Im Spektrum war ein deutliches Signal für das gewünschte Produkt 18 zu erkennen, zum überwiegenden Teil lag jedoch nicht umgesetztes, phosphoryliertes Oligonukleotid vor. Signale für Edukt und Produkt von annähernd gleicher Intensität im Massenspektrum ergaben sich, wenn die Dauer der Inkubation mit EDC und Imidazol auf 3 h verlängert wurde und die anschließende Umsetzung mit Diaminohexan für 18 h bei RT erfolgte. Ähnliche Ergebnisse wurden erzielt, wenn für 14 h bei RT mit EDC und Imidazol und für 3½ h bei 50 °C mit Diaminohexan inkubiert wurde. Bei einer Inkubation mit EDC und Imidazol für 32 h bei RT war hingegen nur ein schwaches massenspektroskopisches Signal für das Phosphoamidat 18 zu beobachten. Möglicherweise kam es vor der Bildung des Phosphoamidates zu einer Zersetzung des entstandenen Phosphoimidazolides. Phosphoimidazolid konnte in keinem Fall massenspektroskopisch detektiert werden. Ursache hierfür war vermutlich die zu geringe Stabilität des Imidazolides. Tabelle 2 faßt die Ergebnisse der vorgenommenen Kontrollversuche zusammen.

Inkubation mit EDC/Imidazol	Inkubation mit 1,6-Diaminohexan	rel. Intensität des Amidates 18 [%] (USP=100)
1 h RT	1 h 50 °C	70
2 h RT	1 h 50 °C	93
3 h RT	18 h RT	102
14 h RT	3½ h 50 °C	97
32 h RT	19½ h RT	60

Tabelle 2. Umsetzung von USP mit 1,2-Diaminohexan. In die Versuche eingesetzt wurden jeweils 400 pmol 5´-phosphorylierter USP. Die Umsetzungen erfolgten mit 0.1 M Imidazol pH 6.1, 0.1 M EDC und 0.25 M 1,6-Diaminohexan pH 7.7. Die verwendeten Lösungen an EDC wurden jeweils frisch angesetzt.

Dabei ist wiederum zu beachten, daß quantitative Betrachtungen mit MALDI-TOF MS nicht möglich sind. Weil aber davon auszugehen ist, daß das gebildete Phosphoamidat 18 gegenüber den Bedingungen der Massenspektrometrie stabil ist, können aus den verschiedenen Spektren zumindest Tendenzen abgelesen werden.
Die Umsetzungen von 5´-phosphoryliertem USP mit LDA wurden auf dieselbe Weise vorgenommen wie die Kontrollreaktionen mit 1,6-Diaminohexan. Inkubation mit EDC und Imidazol für 1 h bei RT und anschließende Inkubation mit LDA für 2 h bei 50 °C führten zu keinem erkennbaren Signal für das gewünschte Phosphoamidat 11 im Massenspektrum. Durch eine Erhöhung der Inkubationszeiten wurden sehr schwache Signale für das Produkt im Spektrum sichtbar. Beste Ergebnisse wurden erzielt durch Inkubation mit EDC und Imidazol für 3.6 h bei RT und anschließender Inkubation mit LDA für 3 h bei 50 °C (siehe Tabelle 3 und Abb. 65).

Inkubation mit EDC/Imidazol	Inkubation mit LDA	rel. Intensität des Amidates 11 [%] (USP=100)
3.3 h RT	20 h RT	32
3 h RT	11½ h 50 °C	23
3.6 h RT	3 h 50 °C	42

Tabelle 3. Umsetzung von USP mit LDA. Die Versuche wurden durchgeführt wie in Tabelle 2 angegeben. Es wurde mit 0.25 M LDA pH 7.7 inkubiert. Imidazol, EDC und LDA lagen jeweils im 10^4fachen Überschuß zum Oligonukleotid vor.

Abbildung 66. MALDI-TOF-Spektrum von NTA-funktionalisiertem, 5´-phosphoryliertem USP 11 im Gemisch mit nicht umgesetztem USP.

Wegen der nur geringen Umsetzungen wurden die Versuche mit Imidazol nicht weiter fortgeführt.

5.3.2 Versuche mit HOBT

Die Versuche mit HOBT wurden nach der Vorschrift von *Ivanovskaya* et al. [125] durchgeführt. Nach dieser Vorschrift wurden jeweils 400 pmol 5´-phosphorylierter USP mit 2 M HOBT und 0.5 M EDC in 70% DMF 3 h bei 4 °C inkubiert. Der Zusatz von DMF war notwendig, da HOBT im Gegensatz zu Imidazol nur eine geringe Löslichkeit in reinem Wasser besitzt. Eine Entfernung des überschüssigen EDC durch Diafiltration wie bei den Umsetzungen mit Imidazol war nicht möglich, da sich die Mikrokonzentrator-Membranen als undurchlässig für das DMF/Wasser-Gemisch erwiesen. Aus diesem Grunde wurde das Oligonukleotid statt dessen mit LiCl und Aceton gefällt. Eine Fällung mit n-Butanol oder anderen Alkoholen kam nicht in Frage, weil der gebildete HOBT-Ester mit diesen sofort zu den entsprechenden Phosphodiestern reagiert hätte [119]. Ebenso konnte nicht Ammoniumacetat anstelle von LiCl verwendet werden. Nach der Fällung wurde 12 h mit 0.33 M LDA bei pH 9.3 und 4 °C inkubiert. Das Nukleophil lag im 10^4fachen Überschuß zum Oligonukleotid vor.
Ein Problem bei der anschließenden Aufarbeitung für die Vermessung mit MALDI-TOF MS war der hohe Salzgehalt der Proben, bewirkt durch die Zugabe von LiCl im Fällungsschritt. Bei der Aufreinigung durch Diafiltration wurden mehrfach trotz intensiven Waschens mit Ammoniumacetat und Wasser Proben gewonnen, welche nur bedingt für eine Vermessung geeignet waren. Alternativ zur Aufreinigung durch Diafiltration wurden einige Proben daher durch HPLC mittels einer Fast Desalting Column aufgearbeitet.
Die Umsetzungen mit HOBT führten generell zu besseren Ergebnissen als die Versuche mit Imidazol, wie die massenspektroskopischen Untersuchungen zeigten, auch wenn die Umsetzungen nach wie vor nicht quantitativ abliefen. Abb. 67 zeigt ein Massenspektrum, in dem deutlich das gewünschte Phosphoamidat 11 , aber ebenfalls noch Edukt zu erkennen sind.

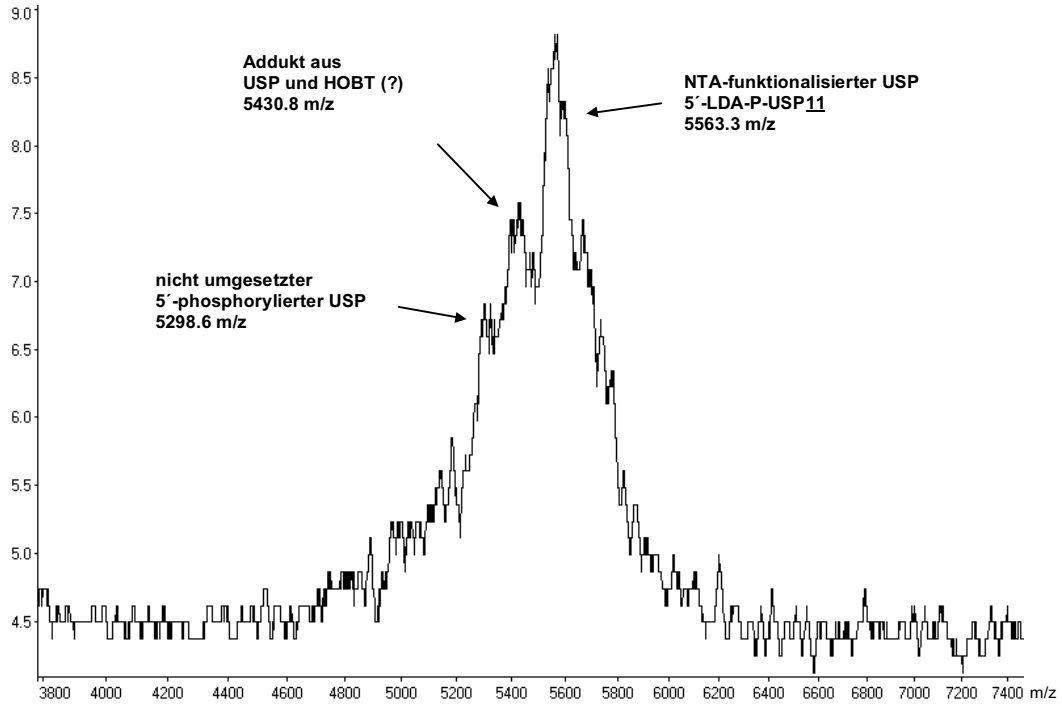


Abbildung 67. MALDI-TOF-Spektrum von 5´-NTA-funktionalisiertem USP 11, hergestellt über das Tetrazolid.

Zu sehen ist in diesem Spektrum außerdem ein Signal für ein Produkt mit einer Masse, welche identisch ist mit der eines USP-HOBT-Adduktes. Dieses Signal war in allen aufgenommen Spektren zu beobachten, auch nach 36 h Inkubation mit LDA. Es ist deshalb davon auszugehen, daß es sich bei der betreffenden Verbindung nicht um den intermediär entstehenden, reaktiven HOBT-Phosphodiester handelt, sondern um ein anders geartetes Addukt.

5.3.3 Versuche mit immobilisiertem USP

Bei der Umsetzung mit HOBT führt die Zugabe von LiCl im Fällungsschritt zu einem hohen Salzgehalt der Probe, was ungünstig für die Vermessung mit MALDI-TOF ist. Zur Vermeidung des Fällungsschrittes wurden daher Versuche mit festphasengebundenen Oligonukleotiden unternommen, die durch einfaches Waschen aufgereinigt werden können.
Die Versuche mit an CPG gebundenem, 5´-phosphoryliertem USP wurden in PerSeptive Reaktionssäulen wie unter 5.1.3 beschrieben durchgeführt. Das immobilisierte Oligonukleotid wurde kommerziell bezogen (Biometra). Das Oligonukleotid war auf die übliche Weise an seinem 3´-Ende über einen basenlabilen Succinatlinker an das CPG gebunden. Die 5´-Phosphatgruppe war noch mit der bei der Phosphoamiditsynthese verwendeten 2-Cyanoethoxygruppe geschützt und mußte vor der Aktivierung mit EDC und HOBT zunächst entschützt werden. Die Entschützung konnte nicht auf die übliche Weise mit konzentrierter Ammoniaklösung erfolgen, da unter diesen Bedingungen auch der am Oligonukleotid befindliche Succinatlinker gespalten worden wäre. Die Entschützung wurde statt dessen mit tert-Butylamin/Pyridin 1:9 vorgenommen. Dieses Reagenz führt zwar zu einer Decyanoethoxylierung, spaltet jedoch nicht das Oligonukleotid vom Träger [91b]. Die

Reaktion muß wasserfrei geführt werden, damit es nicht zu einer Spaltung des Succinatlinkers durch Hydroxidionen kommt. Nach der Entschützung wurde das an CPG gebundene Oligonukleotid gründlich mit Dichlormethan gewaschen und dann mit einer frisch zubereiteten Lösung von 1.6 M HOBT und 0.35 M EDC in 70% DMF inkubiert. Anschließend wurde mit 1 M LDA bei pH 4.9 inkubiert. Es wurde gründlich mit Wasser gewaschen. Abspaltung, Entschützung und Fällung des Oligonukleotides wurden so vorgenommen wie unter 5.1.3 beschrieben.
Die Untersuchung mit MALDI-TOF MS ergab jedoch, daß eine Umsetzung des phosphorylierten USP nicht erfolgt war. Möglicherweise unterlag der nukleophile Angriff auf das immobilisierte Oligonukleotid einer zu starken sterischen Hinderung, so daß es nicht zur Bildung des gewünschten Produktes kommen konnte.

6. Versuche zur Darstellung von Konjugaten mit BAPHis6

Nach 3.9 aus *E. coli* isoliertes BAPHis6 wurde in einer Reihe von Versuchen zur Darstellung von Konjugaten mit NTA-funktionalisierten Oligonukleotiden eingesetzt.

6.1 Immobilisierung von BAPHis6 an mit NTA-funktionalisierten Oligonukleotiden beladenem CPG

BAPHis6 konnte erfolgreich an mit NTA-funktionalisierten Oligonukleotiden beladenem CPG immobilisiert werden. Die Oligonukleotide wurden wie unter 5.1.5. beschrieben hergestellt durch 5´-Retritylierung von CPG-gebundenem USP mit m-NHS-DMT-Cl 6 und anschließende Umsetzung mit LDA zum Amid 5´-(m-LDA-DMT)-USP 10, wobei jedoch nicht von CPG abgespalten wurde. Die Oligonukleotide mit der Sequenz des USP waren über einen 3´-Succinatlinker an das CPG gebunden und verfügten noch über ihre Basen- und Phosphatschutzgruppen. Die Versuche wurden in PerSeptive Reaktionssäulen durchgeführt. Die Quantifizierung von BAPHis6 in den verschiedenen Eluaten erfolgte durch Bestimmung der enzymatischen Aktivität mit pNPP- und diethanolaminhaltigem Assaypuffer wie in 3.12 beschrieben. Die Membranen der Reaktionsäulen erwiesen sich in Testversuchen als durchlässig für BAPHis6. Eine unspezifische Absorption des Enzyms an die Membranen wurde nicht beobachtet. In die Versuche wurden jeweils 2-3 mg CPG eingesetzt, wobei die Beladung mit Oligonukleotid etwa 20 nmol/mg betrug. Bei einem geschätzten Anteil an NTA-funktionalisierten Oligonukleotiden von etwa 20% entsprach dies einer Beladung von ungefähr 4 nmol NTA-Gruppen je mg CPG. Das CPG wurde zunächst mit $NiCl_2$-Lösung inkubiert, um die 5´-NTA-Funktionen der Oligonukleotide mit Ni^{2+} zu sättigen. Zur Anbindung des Enzyms wurde anschließend mit 900 pmol BAPHis6 in Natriumphosphatpuffer inkubiert. Es wurde mit Puffer gewaschen und die enzymatische Aktivität der Waschlösung getestet. Wie sich zeigte, wies die Waschlösung auch nach mehreren Waschschritten eine geringfügige Aktivität auf. Dies war offenbar auf die Elution von geringen Mengen an gebundenem Enzym durch den Waschpuffer zurückzuführen. Die quantitative Elution des an die NTA-funktionalisierten Oligonukleotide gebundenen BAPHis6 erfolgte mit neutralem Imidazolpuffer. Die Vermessung des Eluats ergab eine spezifische Bindung von etwa 30 pmol BAPHis6 je mg CPG. Bei der Blindprobe mit nicht-NTA-funktionalisiertem und untrityliertem CPG-gebundenem USP kam es unter den gleichen Bedingungen zu keiner Anbindung von BAPHis6 an CPG.
Überraschenderweise wurde eine spezifische Bindung von BAPHis6 ebenfalls beobachtet, wenn in den Versuchen mit m-NHS-DMT-Cl 6 retrityliertes und anschließend mit 1,6-Diaminohexan zum Amid 9 umgesetztes Oligonukleotid 8 verwendet wurde. Es ergaben sich hierbei spezifische Bindungen von ca. 20 pmol BAPHis6 je mg CPG. Beim Vergleich mit der für das Amid 10 erhaltenen spezifischen Bindung ist allerdings zu berücksichtigen, daß die Beladung von CPG mit Amid 9 um etwa 50% höher ist als die Beladung mit Amid 10 (siehe 5.1.4). Die genaue Natur der Bindung von BAPHis6 an das Amid 9 ist nicht bekannt.

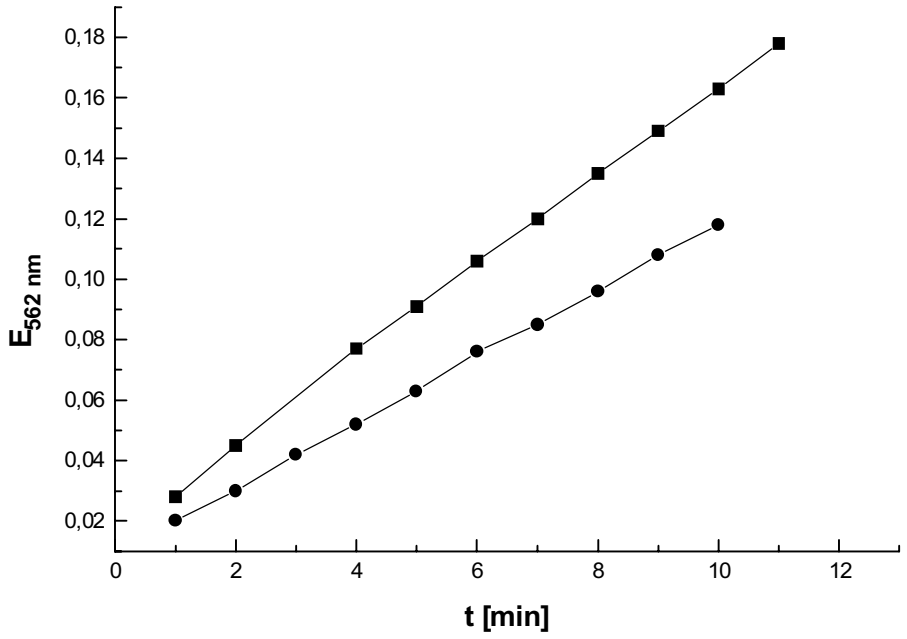


Abbildung 68. Photometrische Vermessung von Säuleneluaten zur Bestimmung der an CPG adsorbierten Mengen an BAPHis6 anhand der spezifischen Aktivität des Enzyms. (■) Eluat von mit 5´-(m-LDA-DMT)-USP 10 beladenem CPG, (●) Eluat von mit 5´-(NH_2-(C_6H_{12})-NH-m-DMT)-USP 9 beladenem CPG.

6.2 Versuche zur Darstellung von Konjugaten aus BAPHis6 und Oligonukleotiden in Lösung

Verschiedene Versuche wurden unternommen zur Darstellung von Konjugaten aus BAPHis6 und NTA-funktionalisierten Oligonukleotiden in Lösung. In die Versuche direkt eingesetzt wurden die Gemische, welche nach den in 5.1.5 und 5.3.2 erläuterten Methoden erhalten wurden. $NiCl_2$-Lösung wurde verwendet, um die NTA-Funktionen der Oligonukleotide mit Ni^{2+} zu sättigen.

Die ersten Experimente wurden mit dem Phosphoamidat 11 durchgeführt. 50 pmol BAPHis6 in Natriumphosphatpuffer pH 8.0 wurden versetzt mit 100 pmol Phosphoamidat 11 und 100 pmol $NiCl_2$. Zur Entfernung von nicht NTA-funktionalisiertem und daher nicht an Enzym gebundenem Oligonukleotid wurde mit einem Ultrafree-MC Filter (MWCO 30 kDa) diafiltriert und mit Ammoniumacetatpuffer pH 7.0 gewaschen. Die Analyse mit MALDI-TOF MS zeigte jedoch, daß lediglich BAPHis6 und kein Oligonukleotid auf der Filtermembran verblieben war. Es war entweder nicht zur Bildung des gewünschten Konjugates gekommen, oder aber das gebildetete Konjugat war während der Diafiltration wieder in seine Bestandteile dissoziiert.

In weiteren Versuchen wurde das Amid 5´-(m-LDA-DMT)-USP 10 verwendet.
1 nmol des Oligonukleotides wurden versetzt mit 100 pmol BAPHis6 und 100 pmol $NiCl_2$. Das Gemisch wurde lyophillisiert und der Rückstand in Wasser aufgenommen. Die Vermessung mit MALDI-TOF MS zeigte jedoch, daß die Lösung kein Konjugat enthielt.

Da nicht bekannt war, ob das Konjugat aus BAPHis6 und Oligonukleotid gegenüber den Bedingungen der MALDI-TOF MS stabil ist, wurde die Analytik auch mittels nativer PAGE vorgenommen. 10 pmol BAPHis6 wurden zu diesem Zweck mit 10 pmol $NiCl_2$ und 200 pmol 5´-(m-LDA-DMT)-USP 10 bei 4 °C inkubiert. Zu erwarten war, daß sich das Oligonukleotid-Enzym-Konjugat durch sein Laufverhalten im Gel vom freien Enzym unterscheiden würde. Um eine Dissoziation des gebildeten Konjugates zu vermeiden, wurde die PAGE mit SDS-freien Puffern vorgenommen. Die Probenpuffer enthielten kein EDTA, und die Proben wurden vor der PAGE nicht zur Denaturierung erhitzt. Die Anfärbung des Geles erfolgte mit BCIP/NBT wie in 3.8 beschrieben. Daher wurden lediglich solche Banden detektiert, welche aktives Enyzm enthielten. Die detektierten Banden unterschieden sich nicht in ihrem Laufverhalten voneinander, so daß davon auszugehen war, daß im Polyacrylamidgel kein Oligonukleotid-Enzym-Konjugat vorlag.

6.3 Versuche zur indirekten Markierung von DNA mit BAPHis6 im Southern-Blot

Es wurden Versuche unternommen, um geblottete DNA mittels NTA-funktionalisiertem USP als Sonde und unter Verwendung von BAPHis6 zur indirekten Markierung zu detektieren. Southern-Blots wurden vorgenommen durch alkalischen Transfer der DNA auf eine QIABRANE Nylon plus Blotmembrane. Bei der verwendeten DNA handelte es sich um mit *Hin*d III geschnittenen pBAPHis6 und um mit *Eco* RI geschnittenen pOM9 [72]. Beide Vektoren enthielten die zum USP komplementäre Sequenz. Es wurde jeweils etwa 1 µg DNA eingesetzt. Zur Hybridisierung wurden 6 nmol des bei der Synthese von 5´-(m-LDA-DMT)-USP 10 erhaltenen Oligonukleotidgemisches verwendet. Der Anteil an Amid 10 im Gemisch betrug dabei etwa 30%. Die Sättigung der NTA-Chelatfunktionen mit Ni^{2+} geschah durch Inkubation mit 100 mM $NiCl_2$. 2 nmol BAPHis6 wurden zur indirekten Markierung eingesetzt. Die geblottete DNA konnte jedoch nicht durch Zugabe von BCIP/NBT angefärbt werden.
Daraufhin wurden 2 nmol des Oligonukleotidgemisches mit 5´-(m-LDA-DMT)-USP 10 direkt auf die Membran geblottet. Nach Inkubation mit $NiCl_2$ wurde versetzt mit 2 nmol BAPHis6. Auch bei diesem Versuch gelang keine Anfärbung der DNA durch Zugabe von BCIP/NBT.

6.4 Versuche zur Immobilisierung von LDA mit DITC an Silicon Wafers

BAPHis6 kann mittels 1,4-Phenylendiisothiocyanat (DITC) an aminopropylierte Silicon Wafers immobilisiert werden [127]. Die Aminofunktionen der Silicon Wafers und des Enzyms reagieren hierbei mit den Isothiocyanatgruppen des DITC unter Bildung von Thioharnstoffgruppen.
Es wurde untersucht, ob BAPHis6 auch über Ni-NTA-Gruppen an Silicon Wafers immobilisiert werden kann. Zu diesem Zweck wurde versucht, nach 4.3.1 hergestelltes LDA über dessen ε-Aminofunktion an Silicon Wafers zu binden. Aminopropylierte Wafers mit einer Oberfläche von ca. 0.25 cm^2 wurden mit einer frisch hergestellten Lösung von 9 mM DITC in DMF/Pyridin 9:1 inkubiert und anschließend mit DMF und Methanol gewaschen. Dann wurde mit 40 mM LDA in Methanol mit 4% N-Ethylmorpholin inkubiert. Zur Blockierung noch vorhandener Aminofunktionen wurden die Wafers mit 10% Hydroxylamin in Methanol behandelt. Nach Waschen mit Methanol und Wasser wurde zur Beladung der NTA-Gruppen

mit Ni^{2+} mit 0.1 M $NiCl_2$ inkubiert. Es wurde mit Natriumphosphatpuffer gewaschen und versetzt mit 1 nmol BAPHis6 in Phosphatpuffer mit 1% Tween 20. Nach angemessener Inkubationszeit wurden die Wafers mit Phosphatpuffer gewaschen. Eine Anfärbung mit BCIP und NBT gelang jedoch nicht. BAPHis6 konnte somit nicht auf diese Weise an Silicon Wafers immobilisiert werden.

7. Synthesen von 5´-histidinmodifizierten Oligonukleotiden

Es zu vermuten, daß die zunehmende Bedeutung des Ni-NTA-Bindungssystems in der Biochemie und Molekularbiologie zu einem steigenden Bedarf an oligohistidin- bzw. oligoimidazolmarkierten Naturstoffen führen wird. Während jedoch Proteine rekombinant histidinmodifiziert werden können, müssen andere Naturstoffe wie beispielsweise Nukleinsäuren auf chemischen Wege entsprechend funktionalisiert werden. In der Literatur wurde bereits die Synthese von hexahistaminyl-basenmarkierten Oligonukleotiden beschrieben, welche eine Affinität gegenüber Ni-NTA-Harz aufweisen [84]. Ferner gibt es verschiedene Methoden für die Darstellung von Oligonukleotid-Peptid-Hybriden [50,51], mit denen theoretisch auch die Herstellung von histidinmarkierten Nukleinsäuren möglich ist. Mit solchen oder anderen Methoden synthetisierte imidazolmodifizierte Oligonukleotide könnten mit NTA-funktionalisierten Proteinen [48] zu entsprechenden DNA-Protein-Konjugaten umgesetzt werden (siehe Abb. 5). Ebenso ist die Darstellung von Konjugaten aus imidazolmodifizierten Oligonukleotiden und Proteinen mittels eines bis-NTA-funktionellen Linkers denkbar. Ein Linker dieser Art wurde bisher jedoch noch nicht hergestellt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, einen bifunktionellen Linker durch Umsetzung von LDA mit EGS in Gegenwart von NaOH zu synthetisieren, jedoch kam es aufgrund der Reaktionsträgheit von LDA nicht zur Bildung des gewünschten Produktes.
Bei den bislang existierenden Methoden zur Darstellung von Oligonukleotiden mit Aminosäureresten oder von Hybriden aus Nukleinsäuren und Aminosäuren kommen auf verschiedene Weise modifizierte Verfahren der Oligonukleotid- bzw. Peptidsynthesechemie zum Einsatz. So werden beispielsweise bei der Synthese von hexahistaminylpurinmarkierten Oligonukleotiden O^6-Phenyl-2´-deoxyinosinphosphoramidit und PAC-geschützte Phosphoamidite verwendet [84]. In dieser Arbeit wurde untersucht, inwieweit herkömmliche, d. h. nach der Phosphoamiditmethode aus üblicherweise verwendeten Amiditen hergestellte Oligonukleotide mit unmodifizierten Standardverfahren der Peptidsynthesechemie histidinmarkiert werden können. Zu diesem Zweck wurden Versuche mit an CPG immobilisierten Oligonukleotiden vorgenommen. Die Oligonukleotide waren nach der Phosphoamiditmethode hergestellt, aber nach beendeter Synthese nicht vom CPG abgespalten worden. Die Basen- und Phosphatschutzgruppen der Oligonukleotide waren intakt. Der 5´-Terminus war aminomodifiziert, und zwar entweder mit einer Aminohexylphosphatgruppe (Biometra) oder durch Retritylierung der 5´-Hydroxyfunktion mit m-NHS-DMT-Cl 6 und anschließender Umsetzung mit 1,6-Diaminohexan zum Amid 9 (siehe 5.1.4). Die Histidinmodifikation der Oligonukleotide erfolgte am 5´-Aminoterminus (Abb. 69).

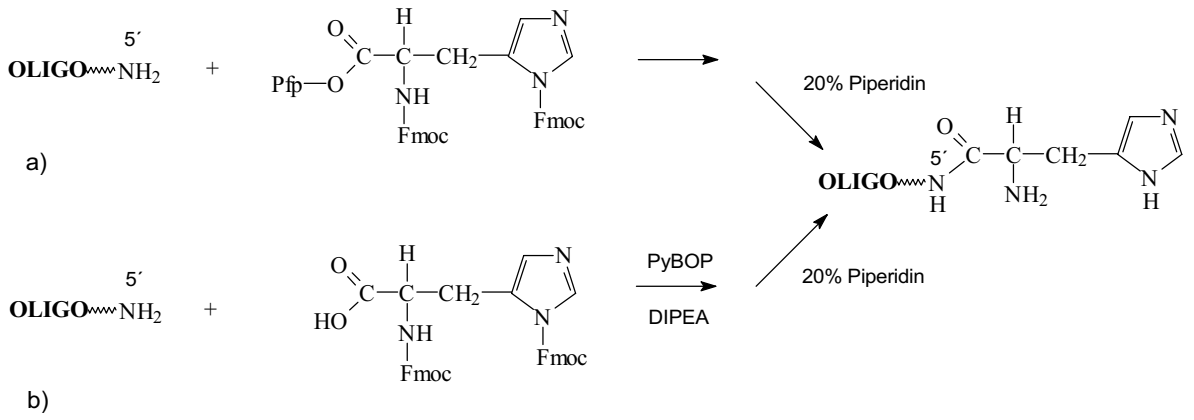


Abbildung 69. Histidinmodifikation von 5´-aminofunktionalisierten Oligonukleotiden unter Verwendung von a) Fmoc-His(Fmoc)-OPfp bzw. b) Fmoc-His(Fmoc)-OH und PyBOP.

Es wurden zwei verschiedene zur Synthese von Peptiden übliche Methoden angewendet, zum einen die Umsetzung mit Histidin-Pentafluorophenylester, zum anderen die Umsetzung mit Histidin und PyBOP als aktivierendes Reagenz. Sowohl die α-Aminofunktion als auch der Imidazolring des Histidins bzw. des Histidinesters waren Fmoc-geschützt.
Die Synthesen wurden in PerSeptive Reaktionssäulen vorgenommen mit jeweils 1-2 mg beladenem CPG. Die Sequenz der verwendeten Oligonukleotide war die des USP. Die Versuche erfolgten unter Feuchtigkeitsausschluß unter Argonatmosphäre, als Lösungsmittel diente DMF. Jeder Versuch wurde in sich wiederholenden Zyklen durchgeführt. In jedem Zyklus sollte ein Histidinmolekül an das Oligonukleotid angefügt werden. Zur Hexahistidinmodifikation der Oligonukleotide wurden jeweils sechs Zyklen je Versuch vorgenommen.
Der jeweils erste Schritt in einem Zyklus war die Kopplungsreaktion mit Fmoc-geschütztem Histidin-Pentafluorophenylester (Fmoc-His(Fmoc)-OPfp) oder Fmoc-geschütztem Histidin (Fmoc-His(Fmoc)-OH) und PyBOP. Anschließend wurde mit DMF gewaschen. Es folgte die Entschützungsreaktion mit 20% Piperidin/DMF. Unter den Bedingungen der Entschützungsreaktion kam es nicht zu einer Abspaltung des Oligonukleotides vom CPG. Letzter Schritt im Zyklus war ein Waschschritt. Der nächste Zyklus begann wiederum mit einem Kopplungsschritt usw. Beim Entschützungsschritt wurde sowohl die Fmoc-Schutzgruppe an der α-Aminofunktion als auch die Fmoc-Schutzgruppe an der Imidazolseitenkette des Histidins abgespalten. Bei der darauffolgenden Kopplungsreaktion kam es infolgedessen auch zu Kopplungen an die Imidazolreste. Das dabei gebildete Aminoacylimidazol wurde jedoch im nächsten Reaktionszyklus wieder gespalten [129]. Der entstandene Verlust an Kopplungsreagenzien war zu vernachlässigen, da die Reagenzien im 10^3fachen Überschuß zum Oligonukleotid vorlagen.
Nach der Umsetzung wurden die Oligonukleotide mit konzentriertem NH_3 vom CPG abgespalten und entschützt. Die Analyse der Reaktionsprodukte erfolgte durch MALDI-TOF MS.

7.1 Synthesen mit Pentafluorophenylester

Fmoc-geschützte Pentafluorophenylester von Aminosäuren werden bereits seit geraumer Zeit bei der Festphasensynthese von Peptiden eingesetzt [130]. Die Kopplungsreaktion erfolgt dabei ohne den Zusatz von Basen. In den Versuchen mit Histidin-Pentafluorophenylester wurden Lösungen mit einer Konzentration von 70 mM Fmoc-His(Fmoc)-OPfp bei den Kopplungsreaktionen eingesetzt, die Kopplungszeiten betrugen jeweils 20 min. Die Dauer der Entschützungsreaktion betrug 5 min. Sowohl bei Umsetzungen mit 5´-aminohexylmodifiziertem Oligonukleotid als auch bei Verwendung des Amides 9 kam es jedoch lediglich zur Bildung von Monohistidinaddukten.

7.2 Synthesen mit PyBOP

Versuche mit PyBOP [132] erfolgten nach einem Protokoll für manuelle Festphasenpeptidsynthesen [131] mit DIPEA als Katalysator. Bei der Umsetzung von BOP-Reagenzien mit Aminosäuren kommt es zur intermediären Bildung von Acyloxyphosphoniumsalzen, welche mit weiteren Aminosäuren zu den jeweiligen symmetrischen Anhydriden reagieren [133]. Die Anhydride reagieren ihrerseits mit Aminogruppen unter Bildung der Peptidbindungen.
Als Kopplungspartner bei den Synthesen mit PyBOP wurde Fmoc-His(Fmoc)-OH verwendet. Die Konzentrationen an PyBOP und Fmoc-His(Fmoc)-OH bei den verschiedenen Versuchen betrugen 80 mM bis 0.16 M, die Kopplungszeiten betrugen 20 min bis 1 h. Mit dieser Methode wurden Gemische aus mono- bis pentahistidinmarkierten Oligonukleotiden erhalten. His_6-Addukte konnten jedoch nicht dargestellt werden. Bei Verwendung von aminohexylphosphatmodifizierten Oligonukleotiden wurden generell größere Addukte erhalten als mit dem Amid 9.

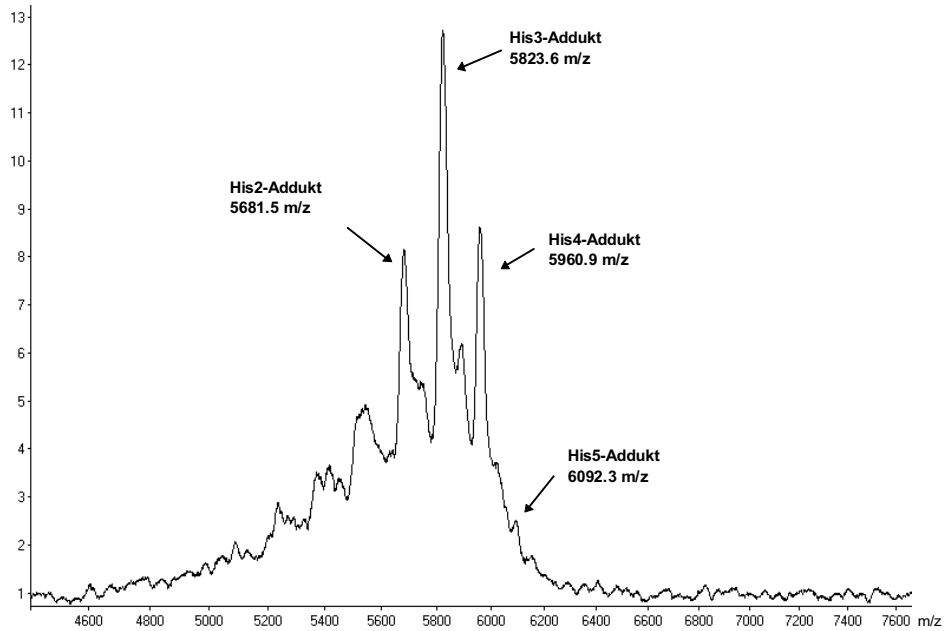


Abbildung 70. MALDI-TOF-Spektrum eines Gemisches aus Histidin-Oligonukleotid-Addukten, gewonnen aus 5´-aminohexylphosphatmodifiziertem USP und Fmoc-His(Fmoc) -OH unter Verwendung von PyBOP.

Um sicherzustellen, daß es zu keiner Degradation des histidinmodifizierten Oligonukleotides unter den Bedingungen der Entschützungsreaktion (32% NH_3, 24 h, RT) kam, wurden Versuche unter Verwendung von CPG-gebundenem 5´-aminohexylphosphatmodifiziertem 2´-Desoxythymidin-25mer (T_{25}) vorgenommen, welches über keine Basenschutzgruppen verfügte. Doch auch bei diesen Experimenten kam es lediglich zur Bildung von Produktgemischen, welche identisch waren mit denen, die bei den Versuchen mit USP erhalten worden waren.

7.3 Aufreinigung der modifizierten Oligonukleotide an Ni-NTA-Harz

Nach 7.2 aus 5´-aminohexylphosphatmodifiziertem USP gewonnene histidinmarkierte Oligonukleotide wurden auf ihre Affinität bezüglich Ni-NTA-Harz untersucht. Bekanntermaßen besitzen di- bis pentahistidinmodifizierte Proteine eine gewisse Affinität für Ni-NTA-Harz [32].
Zu diesem Zweck wurde jeweils 1 nmol aus di- bis pentahistidinmarkierten Oligonukleotiden bestehendes Produktgemisch mit 800 µl Ni-NTA-Harz inkubiert. Das Harz wurde mit Natriumphosphatpuffer gewaschen und die Oligonukleotide wurden mit Imidazolpuffer eluiert. Die in Waschlösung, Elutionslösung und in der abgereicherten Ausgangslösung enthaltenen Oligonukleotide wurden mittels MALDI-TOF MS untersucht. Wie sich zeigte, war es zu einer quantitativen Bindung der tetra- und pentahistidinmarkierten Oligonukleotide an das Harz gekommen. Das Eluat war außerdem mit His_3-Addukt an- und mit His_2-Addukt abgereichert. Eine vollständige Trennung der Produktgemische durch IMAC war auf diese Weise allerdings nicht möglich.

7.4 Syntheseversuche mit Hexahistidin

Versuche wurden unternommen zur direkten Hexahistidinmarkierung von an CPG gebundenem USP mit dem Peptid Hexahistidin (His_6). Das Peptid, dessen Reindarstellung schwierig ist, wurde zu diesem Zweck von der Firma Genosys Biotechnologies Inc. bezogen.
40 nmol Oligonukleotid 8 (mit m-NHS-DMT-Cl 6 retritylierter USP) an CPG wurden 4 h mit 10 µmol His_6 bei RT und pH 8.0 umgesetzt. Die Analyse mit MALDI-TOF MS zeigte jedoch nicht das gewünschte Produkt.
Es wurde ferner versucht, an CPG gebundenen USP nach *Clifford* et al. [111] mit p-Toluolsulfonylchlorid in Acetonitril zu aktivieren, um His_6 an den 5´-OH-Terminus des Oligonukleotides binden zu können, doch konnte auch in diesem Fall kein entsprechendes Produkt mit MALDI-TOF MS nachgewiesen werden.

8. Diskussion

Bei der Klonierung des Gens von BAPHis6 wurde lediglich eine einzige PCR vorgenommen. Der bei diesem Schritt amplifizierte Teilbereich des Gens wurde durch Sanger-Sequenzierung überprüft. Die Sequenz des Gens von BAPHis6 und somit die Primärstruktur des Enzyms sind daher bekannt.
Das rekombinante Enzym BAPHis6 kann schnell und einfach und in vollständiger Reinheit durch IMAC mit Ni-NTA-Harz aus transfizierten *E. coli* gewonnen werden. Die erhaltenen Mengen an BAPHis6 sind zwar etwas geringer als die vom Hersteller des Ni-NTA-Harzes angegebenen durchschnittlich zu erwartenden Mengen an Protein [75], doch sind die jeweiligen Ausbeuten an rekombinantem Protein generell stets abhängig von der Art des Proteins, des Expressionsvektors und des verwendeten Zelltyps.
Das Aufschließen von induzierten Zellen durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Zellsuspension ist bei der Gewinnung von BAPHis6 eine wirkungsvolle Alternative zum Zellaufschluß durch Sonifizierung. Ein schonender Aufschluß der Zellen unter nativen Bedingungen ist nicht notwendig. Bei der Expression werden keinerlei Einschlußkörper im Cytoplasma gebildet, wie es bei der Induktion von multi-copy Plasmiden häufiger vorkommt. Da ferner in keinem Fall unprozessiertes Enzym gefunden wurde, welches noch über das Signalpeptid verfügte, ist davon auszugehen, daß das exprimierte BAPHis6 vollständig in das Periplasma sekretiert wird. Das gewonnene Enzym ist, soweit sich dies durch MALDI-TOF MS feststellen ließ, völlig homogen. Andere Aufreinigungsmethoden als IMAC sind, wie Untersuchungen mit MALDI-TOF MS und PAGE belegen, zur Gewinnung von reinem BAPHis6 nicht notwendig. Die Aufreinigung des Enzyms muß nicht unter Verwendung von Chromatographiesäulen erfolgen, sondern kann im Batch-Verfahren geschehen. Hierbei bewährt sich der Einsatz von Mikro-Spin Zentrifugenfiltern, wodurch die beim konventionellen Abzentrifugieren zwangsläufig auftretenden Verluste an Ni-NTA-Harz und damit auch an rekombinantem Protein während der IMAC vermieden werden können.
Wie sich gezeigt hat, war MALDI-TOF MS eine nützliche Methode zur Untersuchung von exprimiertem BAPHis6, mittels derer das Enzym einwandfrei charakterisiert werden konnte. Die Abwesenheit der Signalsequenz und die Anwesenheit des Histidin-Tails konnten eindeutig durch MALDI-TOF MS festgestellt werden. Als Matrix bei den Messungen konnte sowohl trans-3,5-Dimethoxy-4-hydroxy-zimtsäure als auch 3-HPA verwendet werden.
Bemerkenswert ist die hohe Stabilität von BAPHis6 gegenüber Detergentien und Temperaturerhöhungen. Sogar nach Inkubation mit Mercaptoethanol und SDS kommt es in gewissem Maße zu einer Renaturierung des Proteins. Diese Stabilität steht im Gegensatz zur Empfindlichkeit von Phosphatasen wie CIP gegenüber denaturierenden Bedingungen. Anstatt zu versuchen, BAPHis6 in einem Reaktionsansatz zu inaktivieren, ist es daher ratsam, das Enzym durch Adsorption an Ni-NTA-Harz vollständig aus dem Ansatz zu entfernen.
BAPHis6 kann aufgrund seiner enzymatischen Aktivität mittels BCIP/NBT direkt im Polyacrylamidgel detektiert werden, ohne daß ein Western-Blot durchgeführt werden muß. Somit ist eine schnelle und effiziente Analyse von Enzym-Konjugaten durch PAGE möglich. Ungeklärt ist allerdings, ob die Hexahistidin-Ni-NTA-Bindung gegenüber den Bedingungen einer denaturierenden oder nativen PAGE stabil ist.
Die Hexahistidinmarkierung führte zu keiner nachweisbaren Behinderung der Dimerenbildung oder zu einer Beeinträchtigung der enzymatischen Aktivität des Proteins. Die spezifische Aktivität von BAPHis6 scheint sich von der Aktivität des nativen Enzyms nicht zu

unterscheiden. Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität von Phosphatasen nach *Mössner* [76] mit pNPP in diethanolaminhaltigem Puffer erwies sich als brauchbare Methode zur Ermittlung der Aktivität von BAPHis6, ungeachtet dessen, daß diese Vorschrift ursprünglich für eukaryotische Phosphatasen gedacht war.
Wie aus verschiedenen Experimenten hervorging, verfügt BAPHis6 über eine hohe Affinität gegenüber Ni-NTA-Funktionen. BAPHis6 konnte ferner in einer Vielzahl von Versuchen aufgrund seiner Aktivität problemlos detektiert und quantifiziert werden. Somit verfügt das Enzym über alle Eigenschaften, die notwendig sind, um zur indirekten Markierung von NTA-funktionalisierten Naturstoffen verwendet werden zu können. Es konnte gezeigt werden, daß das Enzym in Versuche zur Markierung von Ni-NTA-funktionalisierten Oligonukleotiden eingesetzt werden kann. Noch ungeklärt ist, ob BAPHis6 auch zur nichtradioaktiven Detektion von DNA im Southern-Blot geeignet ist, da seine spezifische Aktivität um ein Vielfaches geringer ist als die von CIP. Ideal für die nichtradioaktive Markierung von Ni-NTA-funktionalisierter DNA wäre hexahistidinmarkiertes CIP. Modifiziertes Enzym dieser Art könnte durch die Expression von entsprechender rekombinanter cDNA erhalten werden.

Die Verbindung LDA läßt sich ohne Schwierigkeiten nach der Vorschrift von *Hochuli* et. al. darstellen, wobei die Ausbeute durch gewisse Modifikation der Reaktions- und Aufarbeitungsbedingungen gesteigert werden kann. Die Vorschriften von *Erdey* et al. und *Baur* et al. zur Synthese von SDA bedürfen hingegen der Optimierung. Die aus den Aminosäuren Serin und Cystein abgeleiteten NTA-Linker SDA und CDA bieten sich als mögliche Alternativen zur Verbindung LDA an. Anstatt wie LDA durch nukleophile Substitution mit DNA verknüpft zu werden, könnte CDA durch oxidative Kopplung an ein thioliertes Oligonukleotid gebunden werden. Ein von SDA abgeleitetes Amidit könnte dazu dienen, um eine NTA-Funktion noch während der Phosphoamiditsynthese in ein Oligonukleotid einzubauen. Auf diese Weise würden die Probleme umgangen werden, welche sich aus der verhältnismäßig geringen Nukleophilie von LDA ergeben.

Die Bindung von LDA an Oligonukleotide mit bekannten Verfahren erwies sich als schwierig. Zwar gibt es verschiedene Methoden zur Verknüpfung von Aminen oder Aminosäuren mit Oligonukleotiden, jedoch ist der nukleophile Charakter der primären Aminofunktion von LDA nur sehr schwach ausgeprägt, da eine intramolekularen Salzbildung mit den drei Carboxylfunktionen der Verbindung erfolgt.
Die in den Experimenten erhaltenen modifizierten Oligonukleotide konnten mit MALDI-TOF MS schnell und eindeutig identifiziert werden. Die Verwendung von 3-HPA als Matrix führte dabei zu guten Meßergebnissen. MALDI-TOF MS erwies sich häufig bei der Analyse von Oligonukleotiden gegenüber anderen Verfahren wie RP-HPLC oder PAGE als überlegen.

5´-Phosphorylierte Oligonukleotide, standardmäßig durch die Phosphoamiditsynthese hergestellt, können mittels EDC und Imidazol mit LDA verknüpft werden, jedoch sind die dabei erhaltenen Ausbeuten unbefriedigend. Bessere Ergebnisse lassen sich erhalten, wenn HOBT anstelle von Imidazol verwendet wird, wenngleich bei dieser Methode in gewissem Maße Nebenprodukte entstehen. Bei den Nebenprodukten scheint es sich um aus Oligonukleotid und HOBT gebildete Addukte zu handeln. Nebenprodukte dieser Art sind in der Literatur bislang nicht erwähnt worden. Die Bildung der Nebenprodukte kann möglicherweise durch eine weitergehende Optimierung der Reaktionsbedingungen unterdrückt

werden. Generell scheint die Aktivierung von 5´-phosphorylierten Oligonukleotiden mit EDC und HOBT und die anschließende Umsetzung mit LDA eine geeignete Methode zur Darstellung von NTA-funktionalisierten Oligonukleotiden zu sein.
Die Aufreinigung der bei den Umsetzungen entstandenen Reaktionsprodukte mit Mikrokonzentratoren und die anschließende Vermessung mit MALDI-TOF MS führt zu schnellen Ergebnissen. Um NTA-funktionalisierte Oligonukleotide in reiner Form zu erhalten, ist eine Aufreinigung der Reaktionsprodukte durch HPLC jedoch unerläßlich.
Die Bedingungen für die NTA-Funktionalisierung von phosphorylierten Oligonukleotiden in Lösung lassen sich nicht auf Festphasensynthesen an CPG übertragen. Fänden sich geeignete Bedingungen für die Umsetzung von CPG-gebundenen 5´-phosphorylierten Oligonukleotiden mit LDA, so könnten mit dieser Methode vielleicht höhere Ausbeuten an NTA-funktionalisiertem Oligonukleotid erhalten werden als bei den Umsetzungen in Lösung.

Wie verschiedene Versuche zeigten, sind offenbar nur sehr reaktive NHS-Ester dazu in der Lage, mit LDA zu reagieren. DSS und EGS erwiesen sich im Experiment als zu unreaktiv. Auch mit p-NHS-DMT-Cl 16 retritylierte Oligonukleotide konnten nicht erfolgreich mit LDA umgesetzt werden.
Der einzige Ester, welcher gegenüber LDA reaktiv genug war, war die Verbindung m-NHS-DMT-OH 5. Mit m-NHS-DMT-Cl 6 retritylierte Oligonukleotide können erfolgreich mit LDA verknüpft werden, auch wenn sich hierbei keine quantitative Umsetzung ergibt. Sowohl Retritylierung als auch NTA-Funktionalisierung erfolgen mit CPG-gebundenen Oligonukleotiden, weshalb die Reaktionsprodukte schnell und einfach von den im Überschuß eingesetzten Edukten getrennt werden können. Die NTA-Funktion kann vom Oligonukleotid durch Säureeinwirkung wieder abgespalten werden. Leider sind mit m-NHS-DMT-Cl 6 retritylierte Oligonukleotide relativ instabil und detritylieren unerwünschtermaßen sehr leicht, was sie für eine Verwendung in Konjugaten mit hexahistidinmarkierten Proteinen als eher ungeeignet erscheinen läßt. Infolge der sauren Matrix 3-HPA, aber vermutlich auch aufgrund der einwirkenden Laserenergie kam es bei Messungen mit MALDI-TOF MS zu massiven Detritylierungen von 5´-(m-LDA-DMT)-USP 10, wodurch die Analytik erschwert wurde.
Die p-Nitrophenylester von carboxyfunktionalisierten Tritylgruppen zeigten sich als zu unreaktiv, um mit LDA zu reagieren.

Aus 5´-phosphorylierten Oligonukleotiden mittels EDC/HOBT und LDA hergestellte Phosphoamidate sind im Gegensatz zu mit m-NHS-DMT-Cl 6 5´-retritylierten und anschließend mit LDA zum Amid umgesetzten Oligonukleotiden stabil. Aus diesem Grunde scheint es nach den vorliegenden Ergebnissen vorteilhafter zu sein, NTA-funktionalisierte Oligonukleotide aus 5´-phosphorylierten Oligonukleotiden herzustellen, auch wenn die bei diesem Syntheseweg eingeführte NTA-Funktion vom Oligonukleotid nicht mehr abgespalten werden kann.
Um NTA-funktionalisierte Oligonukleotide als Sonden zur indirekten Markierung mit hexahistidinmarkierten Enzymen verwenden zu können, ist auf jeden Fall eine weitere Optimierung der NTA-Funktionalisierung erforderlich. Eine Möglichkeit dazu wäre beispielsweise die Erhöhung der Reaktivität von LDA durch Veresterung der Carboxylfunktionen mit Methanol oder Ethanol, um eine intramolekulare Salzbildung zu vermeiden. In dieser Art geschütztes LDA könnte auch direkt durch Umsetzung von Lysinester und Halogenessigsäureestern hergestellt werden. Einmal in ein Oligonukleotid eingeführt,

könnten die Carbonsäureestergruppen mit NaOH verseift werden, ohne das Oligonukleotid zu beeinträchtigen [94]. Alternativ ist auch die Einführung von LDA in epoxifunktionalisierte Oligonukleotide denkbar, analog zur Synthese von NTA-Harz aus epoxidierter Sepharose [37]. Allerdings gibt es bislang keine Standardmethoden zur Epoxidierung von Oligonukleotiden.
Die Aufreinigung der bei der NTA-Funktionalisierung von Oligonukleotiden entstehenden Produkte scheint durch RP-HPLC nicht möglich zu sein, sondern muß stattdessen durch Anionenaustauschchromatographie erfolgen.

Es konnte gezeigt werden, daß BAPHis6 über eine Affinität zu CPG-gebundenem 5´-(m-LDA-DMT)-USP 10 verfügt und die Darstellung von Konjugaten aus NTA-funktionalisierten Oligonukleotiden und hexahistidinmarkierten Proteinen somit grundsätzlich möglich ist. Allerdings wurde das rekombinante Enzym nur von einigen Prozent der NTA-funktionalisierten Oligonukleotide gebunden. Dies ist möglicherweise auf sterische Hinderungen seitens der festen Phase zurückzuführen.
Der Nachweis von Konjugaten aus Oligonukleotid und Enzym in Lösung gelang nicht. Es ist jedoch ungewiß, ob ein Konjugat aus hexahistidinmarkiertem Protein und NTA-funktionalisiertem Oligonukleotid unter den Bedingungen der MALDI-TOF MS oder PAGE stabil ist und detektiert werden kann.
Erfolglos blieb ferner die indirekte Markierung von auf Nylonmembran geblottetem NTA-funktionalisiertem Oligonukleotid mit BAPHis6. Möglicherweise kam es zu Wechselwirkungen zwischen der positiv geladenen Membran und den NTA-Gruppen der Oligonukleotide, so daß die NTA-Funktionen nicht mehr für die Bindung von rekombinantem Protein zur Verfügung standen. In diesem Fall ließen sich bessere Ergebnisse durch Modifikationen der Anbindungsbedingungen und bei Verwendung von anderen Blotmembranen erzielen.

5´-hexahistidinmodifizierte Oligonukleotide lassen sich durch Festphasensynthese an CPG unter Verwendung von Fmoc-His(Fmoc)-OPfp oder PyBOP nicht herstellen. Vermutlich aufgrund sterischer Hinderungen am CPG kommt es stattdessen zur Bildung eines Gemisches aus di- bis pentahistidinmodifizierten Oligonukleotiden. Insbesondere die Tetra- und Pentahistidinoligonukleotide zeigen zwar eine hohe Affinität für Ni-NTA-Harz, doch lassen sich die Reaktionsprodukte durch IMAC nicht voneinander trennen. Die Oligonukleotide sind aber möglicherweise ausreichend modifiziert, um mittels eines Bis-NTA-Linkers stabile Konjugate mit hexahistidinmarkierten Proteinen zu ergeben.

9. Zusammenfassung

Das Gen der Bakteriellen Alkalischen Phosphatase, phoA, wurde aus dem Genom von *E. coli* in einen Expressionsvektor kloniert. Der Expressionsvektor wurde in *E. coli* transfiziert und die Expression von BAP wurde durch IPTG induziert. Die Expression von BAP konnte durch PAGE nachgewiesen werden.
Das klonierte Gen phoA wurde rekombinant am 3´-Terminus mit einer für einen Hexahistidinrest codierenden Sequenz versehen. Durch inverse PCR und anschließende Ligation der erhaltenen Blunt Ends konnte die hexahistidincodierende Sequenz direkt an das Gen angefügt werden, ohne daß der Einbau von zusätzlichen Nukleotiden zwischen Gen und hexahistidincodierender Sequenz erforderlich war. Der dabei durch die PCR amplifizierte Teilbereich von phoA wurde durch Sanger-Sequenzierung auf seine Sequenz hin überprüft.
Das rekombinante Gen wurde in einen Expressionsvektor kloniert. Die Expression des am Carboxyterminus hexahistidinmarkierten Enzyms BAPHis6 gelang durch Induktion mit IPTG in transformierten *E. coli*. Das exprimierte Protein wurde quantitativ prozessiert und in den periplasmatischen Raum sekretiert. Aufgrund der gewählten Klonierungsstrategie befanden sich zwischen der ursprünglichen Proteinsequenz und dem angefügten Hexahistidinrest keine weiteren Aminosäuren als Spacer im Protein. Wie das native Protein BAP bildete auch das rekombinante Protein BAPHis6 enzymatisch aktive Dimere. BAPHis6 konnte durch IMAC mittels Ni-NTA-Harz in reiner Form aus dem Zellysat gewonnen werden. Das Molekulargewicht des Enzyms wurde durch MALDI-TOF MS ermittelt. Durch PAGE erhaltene Banden des Enzyms konnten im Gel durch ihre katalytische Aktivität sichtbar gemacht werden. Die spezifische Aktivität von BAPHis6 entsprach der Aktivität des nativen Enzyms.

Lysin-N^{α},N^{α}-diessigsäure (LDA) wurde verwendet, um 2´-Desoxyribonukleotide auf zwei unterschiedliche Weisen am 5´-Terminus mit der Nitrilotriessigsäure (NTA)-Gruppe zu funktionalisieren.
Bei der einen Methode wurden 5´-phosphorylierte Oligonukleotide in Lösung mit EDC und HOBT aktiviert und anschließend mit LDA umgesetzt. Die erfolgreiche NTA-Funktionalisierung der Oligonukleotide wurde mittels MALDI-TOF MS nachgewiesen. Die standardmäßige Aktivierung von 5´-phosphorylierten Oligonukleotiden mit EDC und Imidazol anstelle von HOBT erwies sich als weniger geeignet zur NTA-Funktionalisierung mit LDA.
Nach einem anderen Verfahren wurden an CPG 3´-gebundene Oligonukleotide mit einem NHS-Ester am 5´-Terminus retrityliert und dann mit LDA umgesetzt. Auch das Produkt dieser Reaktion konnte mit MALDI-TOF MS nachgewiesen werden. Der verwendete Trityllinker erwies sich als relativ instabil und konnte sehr leicht durch Säureeinwirkung abgespalten werden. Üblicherweise für die Derivatisierung von Oligonukleotiden verwendete Bis-NHS-Ester zeigten sich als ungeeignet für die NTA-Funktionalisierung mit LDA.

Es konnte gezeigt werden, daß über einen Trityllinker NTA-funktionalisierte, an CPG gebundene Oligonukleotide im Gegensatz zu unfunktionalisierten Oligonukleotiden eine Affinität gegenüber dem Enzym BAPHis6 aufwiesen. Somit konnte zum ersten Mal ein Konjugat aus NTA-funktionalisiertem Oligonukleotid und hexahistidinmarkiertem Protein hergestellt werden.

An CPG 3´-gebundene Oligonukleotide wurden mittels Histidin-Pentafluorophenylester oder PyBOP 5´-histidinmodifiziert. Die auf diese Weise entstandenen Tetra- und Pentahistidinoligonukleotide zeichnen sich durch eine hohe Affinität gegenüber Ni-NTA-Harz aus.

Summary

The gene of Bacterial Alkaline Phosphatase phoA was cloned from the genome of *E. coli* into an expression vector. The expression vector was transfected into *E. coli* and expression of BAP was induced by IPTG. The expression of BAP was proven by PAGE.
The cloned gene phoA was attached recombinantly with a hexahistidine tail coding sequence at the 3´-terminus. The hexahistidine coding sequence could be directly attached to the gene by inverse PCR and ligation of the received blunt ends. No additional nucleotides needed to be inserted between the gene and the hexahistidine coding sequence. The partial sequence of phoA which had been amplified by PCR was verified by Sanger sequencing.
The recombinant gene was cloned into an expression vector. The expression of the carboxyterminal hexahistidine marked enzyme BAPHis6 was possible by induction with IPTG in transformed *E. coli.* The expressed protein was quantitatively processed and secreted into the periplasmatic space. As a result of the chosen cloning strategy there were no additional amino acids in between the original protein sequence and the attached hexahistidine chain. Like the native protein BAP, the recombinant protein BAPHis6 formed enzymatic active dimers. BAPHis6 could be isolated in pure form from cell lysate by IMAC with Ni-NTA resin. The molecular weight of the enzyme was determinated by MALDI-TOF MS. PAGE of BAPHis6 showed bands of the enzyme that could be made visible by their catalytic activity in the gel. The specific activity of BAPHis6 was equal to the activity of the native enzyme.

Lysine-N^{α},N^{α}-diacetic acid (LDA) was used in two different ways to functionalize 2´-desoxyribonucleotides at the 5´-terminus with the nitrilotriacetic acid (NTA)-group.
One way was to activate 5´-phosphorylated oligonucleotides in solution by EDC and HOBT and following treatment with LDA. The successful functionalization of the oligonucleotides with NTA was proved by MALDI-TOF MS. The common method of activating 5´-phosphorylated oligonucleotides by EDC and imidazole instead of HOBT was found to be less useful for the functionalization of oligonucleotides with NTA by LDA.
In another method CPG 3´-attached oligonucleotides were retritylated with a NHS-ester at the 5´-terminus and treated with LDA. The product of this reaction could be detected by MALDI-TOF MS. The used trityl linker was instable and could be cleaved easily by acid treatment. Bis-NHS-esters that normaly were used for derivatisation of oligonucleotides were found not to be useful for functionalizing oligonucleotides with NTA by LDA.

It could be shown that oligonucleotides attached to CPG containing a trityl linker and functionalized with a NTA group have an affinity to the enzyme BAPHis6, contrary to oligonucleotides not functionalized. For the first time a conjugate containing an oligonucleotide functionalized with a NTA group and a hexahistidine marked protein was obtained.

Oligonucleotides 3´-bounded to CPG were marked with histidine at the 5´-terminus using histidine pentafluorophenyle ester or PyBOP. In such way created tetra- or penta-histidine oligonucleotides have a high affinity to Ni-NTA resin.

10. Experimenteller Teil

10.1 Chemikalien, Geräte und Methoden

Sofern nicht anders erwähnt, wurden die verwendeten Chemikalien von den Firmen Merck (Darmstadt), Fluka (Deisenhofen) und Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim) bezogen.

Alle Chemikalien wurden im Reinheitsgrad p.A. bzw. im molekularbiologischen Reinheitsgrad verwendet.

Umsetzungen in nicht-wäßrigen Medien wurden unter Feuchtigkeitsausschluß durchgeführt. Die hierbei verwendeten Lösungsmittel und flüssigen Reagenzien mit dem Reinheitsgrad p.A. wurden zu diesem Zweck einer weitergehenden Trocknung mit Molekularsieb 0.3 bzw. 0.4 nm unterzogen. Im Einzelfall wurde der Wassergehalt der verwendeten Lösungsmittel durch Karl-Fischer-Fertigtests (Merck) überprüft. Verwendete Feststoffe wurden jeweils im Hochvakuum getrocknet.

Das in den Versuchen verwendete Wasser wurde von einer Reinstwasseranlage Milli-Q UF Plus der Firma Millipore (Eschborn) erzeugt. Für molekularbiologische Arbeiten wurde autoklaviertes Reinstwasser verwendet.

Enzyme wurden bezogen von den Firmen Boehringer Mannheim und MBI Fermentas GmbH (St. Leon-Rot).

Chemikalien für die Peptidsynthese wurden bezogen von den Firmen Calbiochem-Novabiochem GmbH (Bad Soden) und BACHEM Biochemica GmbH (Heidelberg).

Radioaktiv markiertes Nukleosidtriphosphat stammte von der Firma DuPont NEN (Dreieich).

5´-Modifizierte CPG-on und CPG-off Oligonukleotide wurden von der Firma Biometra GmbH (Göttingen) bezogen, CPG-off Oligonukleotide im molekularbiologischen Reinheitsgrad.

Unmodifizierte CPG-on und CPG-off Oligonukleotide wurden mit einem 7500 DNA Synthesizer von MiliGen (Burlington, USA) nach Standardsyntheseprotokollen nach der Phosphoamiditmethode hergestellt. DMT-on Oligonukleotide wurden durch RP-HPLC aufgereinigt.

Dünnschichtchromatographien wurden mit Kieselgel 60 GF_{254} auf Aluminiumfolie (Merck) vorgenommen. Die Detektion erfolgte durch UV-Licht und mittels Tauchreagenz (5% Anisaldehyd, 3% H_2SO_4 und 1% Eisessig in Ethanol), wobei die Chromatogramme durch Erhitzung entwickelt wurden.
Für RP-Dünnschichtchromatographien wurden Fertigplatten RP-18 F_{254s} (Merck) verwendet. Die Chromatogramme wurden zur Sichtbarmachung von primären Aminofunktionen mit Ninhydrin-Sprühreagenz (10 mM Ninhydrin in Ethanol) behandelt und erhitzt.

Carboxylfunktionen wurden durch Ansprühen der Chromatogramme mit 0.1% 2,6-Dichlorphenolindophenol Natriumsalz in Ethanol und anschließendes Erhitzen sichtbar gemacht.
Die Sichtbarmachung von NTA-Funktionen im UV-Licht gelang durch Ansprühen mit 0.8 M DCC in n-Butanol und kurze Erhitzung [108]. Auf diese Weise behandelte NTA-Funktionen konnten anschließend auch mit Tauchreagenz detektiert werden.
Präparative Dünnschichtchromatographie erfolgte mit 2 mm Kieselgelplatten 60 F_{254} (Merck).

Säulenchromatographien erfolgten mit Kieselgel 60 (Merck).

^{1}H (400 MHz) und ^{13}C (100 MHz) NMR Spektren wurden erstellt mit dem Gerät AMX400 von Bruker (Ettlingen).

Photometrische Messungen im UV/VIS-Bereich erfolgten an dem Gerät Biochrom 4060 (Pharmacia).

Infrarotspektrometrische Messungen wurden mit dem Gerät Genesis Series FTIR der Firma ATI Mattson (Madison, USA) durchgeführt.

MALDI-TOF Massenspektren wurden erstellt mit dem Gerät Vison 2000 von Finnigan MAT (Bremen).

Hochleistungsflüssigchromatographien wurden folgendermaßen durchgeführt:
RP-Chromatographien erfolgten mit einem Laufmittelgemisch von 0.1 M Triethylammoniumacetat (pH 7.0) und Acetonitril mit unterschiedlichen Gradienten, wobei analytische Trennungen mit einem 625 LC System und einer Säule Nova Pak C18 von Waters (Milford, USA) vorgenommen wurden. Detektor war der Photodiode Array Detector 996 (Waters). Präparative Trennungen erfolgten mit dem Gerät Delta Prep 4000 (Waters) und einer Säule PARTISIL 10 ODS2 M9 der Firma Whatman Inc. (Clifton, USA).
Anionenaustauschchromatographie erfolgte mit einem Laufmittel von 25 mM Tris-HCl und 1 mM EDTA (pH 8.0) und einem Natriumchloridgradienten bis zu einer Konzentration von 1 M NaCl auf einem SMART System und mit einer Säule MonoQ PC 1.6/5 der Firma Pharmacia LKB Biotechnology AB (Uppsala, Schweden). Zur Entsalzung wurde die Fast Desalting Column PC 3.2/10 (Pharmacia) verwendet.

Elektrophoresen von Polyacrylamid- und Agarosegelen wurden mit Gelkammern der Firma Keutz (Gießen) vorgenommen.

Bei dem verwendeten Thermocycler handelte es sich um einen Hybaid OmniGene von MWG-Biotech GmbH (Ebersberg).

Der verwendete Elektroporator war ein *E. coli* Pulser von Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA).

Plasmidpräparationen nach der Filtrationsmethode wurden mit einer EVENT 4160 Absaugkammer (Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg) durchgeführt.

10.1.1 Quantifizierung und Reinheitsbestimmung von DNA

Die Konzentrationen von DNA wurden photometrisch bei einer Wellenlänge von λ=260 nm bestimmt bzw. beim jeweiligen Maximum der Absorption, welches durch UV-Spektroskopie ermittelt wurde. Im Falle von höhermolekularer doppelsträngiger DNA entspricht eine Extinktion von 1 OD einer Konzentration von etwa 50 µg/ml. Die Extinktionskoeffizienten von Oligonukleotiden wurden mit folgenden Inkrementen berechnet: G 11.7, A 15.4, T 8.8 und C 7.3 $cm^2/\mu mol$. Der Extinktionskoeffizient von USP ergab sich hierbei zu ε_{USP}=197.7 $cm^2/\mu mol$, der vom 2´-Desoxythymidin-25mer T_{25} zu ε_{T25}=220 $cm^2/\mu mol$. Bei modifizierten Oligonukleotiden wurde der berechnete Extinktionskoeffizient des unmodifizierten Oligonukleotides als Näherungswert verwendet.
Die Reinheitsbestimmung von DNA erfolgte durch Messung der Extinktionen bei λ=260 und 280 nm. Die DNA wies dann eine genügende Reinheit auf, wenn das Verhältnis von dem bei 260 nm gemessenen Extinktionswert zu dem bei 280 nm gemessenen Wert mindestens 1.8 betrug.

10.1.2 Massenspektrometrie von Phosphatasen und Oligonukleotiden

Optimale Ergebnisse können mit MALDI-TOF MS nur mit Proben erzielt werden, die frei von Salzen und anderen störenden Verunreinigungen (z.B Glycerin) sind.
BAPHis6 wurde daher vor einer Messung mit einem 30000 NMWL Ultrafree-MC Filter mit regenerierter Cellulose (Millipore) diafiltriert. Die Probe wurde dabei abzentrifugiert und mehrmals mit Reinstwasser gewaschen. Oligonukleotide wurden mit einem Microcon-3 Mikrokonzentrator (NCO 10, Amicon GmbH, Königsholz) diafiltriert oder ethanolisch gefällt. Störende Gegenionen wie Alkali- oder Erdalkalikationen wurden durch Waschen der Proben mit Ammoniumacetatlösung gegen Ammoniumionen ausgetauscht, welche keine Störungen bei der Messung bewirken.
Als Matrixsubstanz fand 3-HPA Verwendung, im Falle von BAPHis6 auch trans-3,5-Dimethoxy-4-hydroxy-zimtsäure.
Zur Probenvorbereitung mit 3-HPA wurde eine Lösung von etwa 20 pmol Protein oder Oligonukleotid mit dem gleichen Volumen an Matrixlösung (720 mM 3-HPA, 65 mM Ammoniumcitrat in Acetonitril/Wasser 1:1) versetzt. Das Lösungsmittel ließ man verdunsten und die Proben bei RT kristallisieren.
Alle Messungen erfolgten im positiven Ionenmodus.
Die Prozentangaben bei den MALDI-TOF MS Meßwerten sind Angaben der relativen Intensität.

10.2. Molekularbiologischer Teil

Verwendete Bakterienstämme

Escherichia coli HB101 (Stammsammlung des Arbeitskreises)
Genotyp: F^-Δ(gpt-proA)62 leu supE44 ara14 galK2 lacY1 Δ(mcrC-mrr) rpsL20(Str^r) xyl-5 mtl-1 recA13
Escherichia coli DH10B (Life Technologies GmbH, Eggenstein , # 18290-015)
Genotyp: F^- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80 dlacΔ(lacZ)M15 ΔlacX74 deoR recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu)7697 galU galK λ^- rpsL nupG
Escherichia coli JM83 (Stammsammlung des Arbeitskreises)
Genotyp: F^- ara Δ(lac-proAB) rpsL(Str^r) [Φ80 dlacΔ(lacZ)M15]

Verwendete Vektoren

Für die verschiedenen Klonierungen wurden die Vektoren pOM8 [72], pHK236 (M. Kröger, Institut für Mikro- und Molekularbiologie, Gießen) und pBSKHIS [73] verwendet.
Die Vektoren wurden von Dr. Andreas Ruppert, Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie, Hamburg, zur Verfügung gestellt.

Puffer und Medien

Herstellung von LB Medium
10 g NaCl, 10 g Pepton 140 (Life Technologies) und 5 g Hefeextrakt (Life Technologies) wurden in 1000 ml Wasser gelöst. Nach 30 min Sporigieren bei RT wurde autoklaviert.
Zur Herstellung von ampicillinhaltigem Medium wurde die Lösung nach dem Autoklavieren mit 100 mg Ampicillin versetzt.

Herstellung von SOC Medium
2 g Pepton 140 und 0.5 g Hefeextrakt wurden gelöst in 100 ml Wasser. Die Lösung wurde versetzt mit 0.2 ml 5 M NaCl und 0.25 ml 1 M KCl. Es wurde sporigiert und anschließend autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurde versetzt mit 1 ml 2 M Glucose und 1 ml 2 M $MgCl_2$.

Herstellung von Agarplatten
5 g NaCl, 5 g Pepton 140, 2.5 g Hefeextrakt und 7.5 g Agar (Life Technologies) wurden in 500 ml Wasser gelöst. Es wurde sporigiert, autoklaviert und in Petrischalen überführt.
Zur Herstellung von ampicillinhaltigen Agarplatten wurde das Gemisch nach dem Autoklavieren mit 50 mg Ampicillin versetzt.

Verwendete Standardpuffer
TAE: 40 mM Tris-HCl, 5 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA, pH 7.8
TBE: 100 mM Tris-HCl, 85 mM Borsäure, 1 mM EDTA, pH 8.0
TE: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.3

Bakterienkulturen

Zellwachstum von *E. coli* erfolgte in LB Medium unter aeroben Bedingungen bei 37 °C im Schüttelinkubator. Das Medium wurde dabei jeweils mit einer Übernachtkultur im Verhältnis 1:100 angeimpft. Die Inkubationszeit bis zur Zellernte betrug 2-2½ h, so daß sich die Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase befanden.
Übernachtkulturen wurden gewonnen durch Animpfen von Medium mit Zellen aus der jeweiligen Glycerinpräparation und Inkubation im Schüttelinkubator über Nacht.
Zur Herstellung einer Glycerinpräparation wurden jeweils 820 µl Bakterienkultur in der spätlogarithmischen Phase mit 180 µl Glycerin versetzt. Die Zellen wurden bei -70 °C eingefroren.

Isolierung von DNA

Isolierung von genomischer DNA aus E. coli [71]
30 ml Zellsuspension von *E. coli* in der logarithmischen Phase wurden zentrifugiert (4000 g, 5 min). Das Pellet wurde resuspendiert in 3.5 ml TE und versetzt mit 0.2 ml einer 10%igen Lösung von SDS. Nach vorsichtigem Schwenken wurden 25 µl einer Lösung von Proteinase K (20 ng/ml) zugegeben, anschließend wurde 5 h bei 37 °C inkubiert. Die Proteinextraktion erfolgte durch Versetzen mit 4 ml Phenollösung (150 mM Phenol, 450 mM Tris-HCl, 75 mM NaCl, 5 mM EDTA, 12 mM 8-Hydroxychinolin, 30 mM 2-Mercaptoethanol, pH 8.0) und 10 ml Chloroform/Isoamylalkohol 24:1. Nach vorsichtigem Schwenken bei RT für 30 min wurde zentrifugiert (4000 g, 10 min) und danach die obere, wäßrige Phase mit einer umgekehrten Pipette abgenommen. Nach erneuter Extraktion mit Chloroform und nochmaligem Abzentrifugieren wurde die wäßrige Phase in eine ZelluTrans/Roth 5.0V Schlauchmembran (Roth GmbH+Co, Karlsruhe) gegeben. Der Dialyseschlauch wurde in einen Behälter mit 1 L TE gelegt. Nach 24 h Dialyse bei RT wurde der Dialysepuffer gewechselt, nach weiteren 6 h wurde die Lösung der genomischen DNA dem Dialyseschlauch entnommen.

Isolierung des Gens der Bakteriellen Alkalischen Phosphatase aus E. coli
50 µl einer Lösung genomischer DNA von *E. coli* HB101 wurden versetzt mit 30 µl Wasser, 10 µl *Hin*d III 10x Puffer, 100 U *Hin*d III und 1 µl 500 µg/ml RNase. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C über Nacht. Es wurde mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 25:24:1 ausgeschüttelt und ethanolisch gefällt. Die DNA wurde in 100 µl Wasser aufgenommen und versetzt mit 12 µl *Xho* I 10x Puffer und 100 U *Xho* I. Es wurde bei 37 °C über Nacht inkubiert. Eine präparative Gelelektrophorese wurde durchgeführt, wobei ein Gelfragment im Bereich von etwa 2.7 kbp ausgeschnitten wurde. Die DNA wurde mittels Glasmilch aus dem Agarosegel extrahiert. Diese DNA wurde direkt in eine Ligation mit *Hin*d III und *Sal* I geschnittenem pOM8 eingesetzt.

Plasmidisolierung nach Birnboim *und* Doly [70]
Jeweils 1.5 ml Zellsuspension von *E. coli* in der logarithmischen Phase wurden zentrifugiert (4000 g, 5 min). Das Pellet wurde resuspendiert in 100 µl Lösung I (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8.0). Die Suspension wurde zur alkalischen Lyse der Zellen mit 200 µl Lösung II (200 mM NaOH, 1% SDS) versetzt und vorsichtig geschwenkt. Nach 5 min Inkubation bei RT wurden 150 µl Lösung III (3 M Natriumacetat, pH 4.8) zugegeben, es wurde gut

geschüttelt und 20 min auf Eis stehengelassen. Das Lysat wurde zentrifugiert (20000 g, 10 min), der Überstand wurde abgenommen und mit 1 ml Ethanol versetzt. Es wurde erneut zentrifugiert (20000 g, 15 min), der Überstand wurde abpipettiert und das Pellet mit 0.5 ml 80% Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde 5 min bei RT getrocknet und anschließend in 50-100 µl Wasser gelöst.

Plasmidisolierung nach der Filtrationsmethode [83]
Jeweils 350 µl Zellsuspension von Übernachtkulturen von *E. coli* wurden in 96-Well Mikrotiter Filterplatten (Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg) filtriert und mit 100 µl Lösung I (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 0.1 mg/ml Rnase A, pH 8.0) gewaschen. Zur Lyse der Zellen wurde mit je 100 µl Lösung II (140 mM NaOH, 0.7% SDS) versetzt und 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 75 µl vorgekühlter Lösung III (2.25 M Kaliumacetat, 0.56 M NaCl, pH 4.8) wurde die Filterplatte kräftig geschwenkt und dann 30 min bei -20 °C aufbewahrt. Die Lysate wurden durch Filtration in eine zweite Filterplatte überführt, die 100 µl Isopropanol je Well enthielt. Die Platte wurde geschüttelt und die präzipitierte DNA wurde abfiltriert und mit 350 µl vorgekühltem 70% Ethanol gewaschen. Die DNA wurde 5 min bei RT getrocknet, in jeweils 100 µl Wasser gelöst und in eine Standard-Mikrotiterplatte abgesaugt.

Plasmidisolierung mit Plasmidaufreinigungs-Kit
Die Plasmidisolierung mit QIAGEN tip-100 Säulen (Qiagen GmbH, Hilden) erfolgte nach den Angaben des Herstellers [74]. Zur Verbesserung der Ausbeuten - bei gleichbleibender Qualität der isolierten DNA - wurde jedoch die doppelte bis vierfache der vom Hersteller empfohlene Menge an Bakterienkultur in die Aufarbeitung eingesetzt.
50-100 ml Zellsuspension in der logarithmischen Phase wurden zentrifugiert (400 g, 5 min). Das Pellet wurde resuspendiert in 4 ml Puffer P1 (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A, pH 8.0). Nach Zugabe von 4 ml Puffer P2 (200 mM NaOH, 1% SDS) wurde vorsichtig gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Es wurden 4 ml vorgekühlter Puffer P3 (3.0 M Natriumacetat, pH 5.5) zugegeben. Nach vorsichtigem Mischen wurde für 15 min auf Eis inkubiert. Es wurde zentrifugiert (20000 g, 30 min, 4 °C), das Zentrifugat wurde auf eine mit Puffer QBT (750 mM NaCl, 50 mM MOPS, 15% Ethanol, 0.15% Triton X-100, pH 7.0) equilibrierte QIAGEN-tip 100 Säule gegeben. Die Säule wurde gewaschen mit 2x10 ml Puffer QC (1.0 M NaCl, 50 mM MOPS, 15% Ethanol, pH 7.0). Die Elution erfolgte mit 5 ml Puffer QF (1.25 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, 15% Ethanol, pH 8.5). Das Eluat wurde gemischt mit 3.5 ml Isopropanol, es wurde zentrifugiert (20000 g, 30 min, 4 °C). Der Überstand wurde abpipettiert und das Pellet mit 2 ml 70% Ethanol gewaschen. Die DNA wurde in 200-300 µl Wasser aufgenommen.

Ethanolische Fällung von DNA
Plasmid-DNA und genomische DNA wurden gefällt durch Zugabe von 0.1fachem Volumen 3 M Ammoniumacetatlösung und 2.5-3fachem Volumen Ethanol. Nach 30 min Inkubation bei 4 °C wurde zentrifugiert (20000 g, 15 min), der Überstand wurde abpipettiert und das Pellet gewaschen mit 100 µl 80% Ethanol (-20 °C).

Enzymatische Reaktionen

Restriktionsspaltung
In analytische Restriktionsspaltungen von DNA wurden jeweils 3 U Enzym eingesetzt, unter Verwendung der Puffer des jeweiligen Herstellers. Die Inkubation erfolgte bei der für das Enzym jeweils optimalen Temperatur für einen Zeitraum von etwa 1 h.
Präparative Spaltungen erfolgten mit etwa 100 µg durch Plasmidaufreinigungs-Kit gewonnene DNA und 5-60 U Enzym, abhängig von der Art des Enzyms. Die Inkubationszeit betrug etwa 3 h.

Dephosphorylierung
Dephosphorylierungen wurden mit 4-6 U CIP bei 37 °C vorgenommen, die Inkubation fand über Nacht statt. Nach erfolgter Dephosphorylierung wurde die AP durch 10minütiges Erhitzen bei 65 °C deaktiviert. Es wurde mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 25:24:1 extrahiert, anschließend wurde die DNA ethanolisch gefällt.

Phosphorylierung
Phosphorylierungen von Restriktionsfragmenten zur Klonierung erfolgten mit jeweils 10 U PNK bei einer Konzentration von 10 mM ATP und einer Temperatur von 37 °C. Die Inkubationszeit betrug 30 min.
Zur Synthese von 5´-phosphorylierten Oligonukleotiden wurden jeweils 200 pmol Oligonukleotid mit 30 U PNK und 300 pmol ATP 40 min bei 37 °C inkubiert. Die Analyse durch Ionenaustauschchromatographie ergab einen Phosphorylierungsgrad von etwa 70%.

Ligation
Ligationen wurden mit jeweils 1 U T4 DNA-Ligase bei einer Konzentration von 1 mM ATP und bei RT durchgeführt. Es wurde über Nacht inkubiert.

Gelelektrophoresen von DNA

Agarosegelelektrophorese
DNA-Fragmente mit einer Größe von mehr als 1 kbp wurden durch Elektrophorese mit 1%igen Agarosegelen (1 g Agarose (Life Technologies) in 100 ml TAE) aufgetrennt.
Die DNA-Proben wurden mit Probenpuffer (50% Glycerin, 50 mM EDTA, 5‰ Bromphenolblau) versetzt und aufgetragen. Die verwendeten Größenstandards waren im Arbeitskreis hergestellt worden. Die Gelläufe fanden bei einer Spannung von 120 V statt, Elektrophoresepuffer war TAE.
Das Gel wurde mit Ethidiumbromidlösung (1 mg/l) gefärbt und die DNA wurde im UV (λ=254 nm) detektiert.
Da die durch Minilysat gewonnene DNA generell mit RNA verunreinigt ist, wurde vor jeder Gelelektrophorese mit RNase inkubiert, so daß die DNA-Banden unter UV störungsfrei betrachtet werden konnten.

Präparative Agarosegelelektrophorese
Bei der präparativen Gelelektrophorese wurden die mit Ethidiumbromid eingefärbten DNA-Banden durch Bestrahlung mit längerwelligem UV (λ=366 nm) sichtbar gemacht. Die gewünschten Banden wurden ausgeschnitten und die DNA aus dem Agarosegel mittels Glasmilch (US Bioclean MP Kit, United States Biochemical, Cleveland, USA) extrahiert:
Zum Gelstück wurde das dreifachen Volumen an 6 M NaI-Lösung gegeben. Das Gel löste sich nach fünfminütiger Inkubation bei 55 °C. Die Lösung wurde versetzt mit 5 µl Glasmilch, anschließend wurde 10 min auf Eis inkubiert. Es wurde abzentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Das Glaspulver-Pellet wurde in 250 µl Waschpuffer (50% Ethanol, 10 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.5) resuspendiert. Es wurde erneut abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Der Waschschritt wurde zweimal wiederholt. Die DNA wurde durch Inkubation mit 20 µl Wasser bei 55 °C eluiert, es wurde abzentrifugiert und das die DNA enthaltende Zentrifugat abpipettiert.

Polyacrylamidgelelektrophorese von doppelsträngiger DNA
DNA-Fragmente mit einer Größe von 40 bis 400 bp wurden durch Elektrophorese mit 5%igen Polyacrylamidgelen voneinander getrennt. Zur Herstellung der Gele wurden jeweils 1.3 ml 40% Acrylamid/Bisacrylamidlösung 19:1 (Roth) mit 8.1 ml Wasser, 1.0 ml 10x TAE, 100 µl 10% APS (Riedel-DeHaën AG, Seelze-Hannover) und 10 µl TEMED (SERVA Feinbiochemica, Heidelberg) versetzt. Das Gel wurde im Gelgießstand gegossen und war nach etwa 1 h auspolymerisiert. In jede Geltasche wurden 10 µl Probe und 5 µl Blaumarker (s.o.) pipettiert. Der verwendete Standard war pBR322/*Alu* I (Fermentas). Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 100 V durchgeführt, Elektrophoresepuffer war TAE.
Das Gel wurde mit Ethidiumbromid gefärbt und die DNA-Banden wurden im UV-Licht sichtbar gemacht (s.o.).
Präparative Polyacrylamidgelelektrophoresen wurden wie präparative Agarose gel-elektrophoresen durchgeführt, wobei die DNA jedoch durch Inkubation in einem Elutionspuffer (0.1 M Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 5 mM EDTA, pH 8.9) bei 60 °C aus dem Gelstück eluiert wurde. Anschließend wurde ethanolisch gefällt und die DNA in Wasser aufgenommen.

Polyacrylamidgelelektrophorese von Oligonukleotiden
Einzelsträngige Oligonukleotide mit einer Größe von 10-20 Basen wurden durch Elektrophorese mit 20%igen denaturierenden Polyacrylamidgelen voneinander getrennt. Die Gele wurden wie folgt hergestellt: 5 ml 40% Acrylamid/Bisacrylamid 19:1 wurden versetzt mit 3.5 ml Wasser, 1 ml 10x TBE, 4.2 g Harnstoff, 10 µl TEMED und 0.5 ml 1% APS. Die Polymersiation fand über Nacht statt.
Der Elektrophoresepufer war TBE. Vor dem Auftragen der Proben wurde ein Vorlauf (2 h, 300 V) durchgeführt. Je 10 µl Probe wurde versetzt mit 10 µl Blaumarker (s.o.) und 4 µl Formamid. Unmittelbar vor dem Auftragen wurden die Proben erhitzt (5 min 95 °C) und anschließend gekühlt (5 min 0 °C). Die Elektrophorese fand bei 300 V statt.
Da Ethidiumbromid nicht zur Färbung von einzelsträngiger DNA geeignet ist, wurden die Gele mit stains-all (3,3´-Diethyl-9-methyl-4,5,4´,5´-dibenzothiacarbocyanin) über Nacht gefärbt. Die Färbelösung bestand aus 10 ml Stock-Solution (100 mg stains-all in 100 ml Formamid), 10 ml Formamid, 50 ml Isopropanol und 130 ml Wasser. Tritylierte Oligonukleotide weisen bei

dieser Färbemethode eine violette Farbe auf, untritylierte Oligonukleotide erscheinen hingegen türkis.

Transformation

Transformation nach der $CaCl_2$-Methode [79]
100 ml Zellsuspension von *E. coli* in der logarithmischen Phase wurden zentrifugiert (4000 g, 5 min, 4 °C). Das Pellet wurde resuspendiert in 10 ml 0.1 M $CaCl_2$ (0 °C). Es wurde 20 min bei 0 °C inkubiert. Die Zellen wurden erneut abzentrifugiert und in 0.5 ml 0.1 M $CaCl_2$ resuspendiert, anschließend wurde 1 h bei 0 °C inkubiert. Jeweils 100 µl Suspension wurden mit Plasmid versetzt und wie folgt temperiert: 15 min 0 °C, 5 min 37 °C, 15 min 0 °C, 5 min 37 °C, 15 min 0 °C. Es wurde versetzt mit 2 ml LB Medium und 1 h im Schüttelinkubator geschüttelt. Anschließend wurde auf Agarplatten ausgestrichen.

Transformation durch Elektroporation [79]
200 ml Zellsuspension von *E. coli* in der logarithmischen Phase wurden zentrifugiert (4000 g, 10 min, 4 °C) und in 200 ml auf 0 °C vorgekühltem 10%igem Glycerin resuspendiert. Es wurde drei weitere Male abzentrifugiert und in 10% Glycerin resuspendiert, wobei das Volumen der Suspension schrittweise bis auf 2 ml verringert wurde.
45 µl der Zellsuspension wurden mit vorgekühlter und salzfreier, d. h. vorher ethanolisch gefällter Plasmidlösung versetzt und auf Eis gekühlt. Die Suspension wurde in eine 0.1 cm Elektroporationsküvette (Bio-Rad) gegeben, die Elektroporation erfolgte bei 1.8 kV (5 msec).
Die Zellsuspension wurde in 2 ml SOC Medium gegeben. Nach einstündiger Inkubation im Schüttelinkubator bei 37 °C wurde auf Agarplatten ausgestrichen.

Polymerasekettenreaktion

In die Vektor-PCR wurden 10 ng mit *Hin*d III geschnittenes Plasmid pHIS6BAP und jeweils 100 pmol Primer eingesetzt.

Sequenz von	Primer I:	5´-TTT CAG CCC CAG AGC GG-3´
	Primer II:	5´-CAC CAC CAT CAC CAT CAC-3´

Die Konzentrationen an Desoxyribonukleosidtriphosphaten betrugen 200 µmol/l je dNTP. Die verwendete DNA-Polymerase war Exo$^-$*Pfu* (Stratagene GmbH, Heidelberg), eingesetzt wurden jeweils 6 U Enzym.
Vor der Reaktion wurde 4 min bei 95 °C denaturiert. Es wurden 15 Zyklen durchgeführt (Denaturierung 95 °C 1 min, Hybridisierung 45 bzw. 50 °C 1 min, Polymerisation 72 °C 2 min). Abschließend erfolgte eine Extension bei 72 °C für 5 min.
Die DNA wurde ethanolisch gefällt und zur vollständigen Extension mit 10 U DNA-Polymerase I - großes Fragment (Klenow-Fragment) behandelt, bei einer Konzentration von jeweils 400 nmol dNTP/ml. Es wurde 45 min bei RT inkubiert.
Die DNA wurde mit einem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt, wobei der Ansatz mit dem fünffachen Volumen an Puffer PB versetzt und über eine QIAquick Spinsäule abzentrifugiert wurde. Die Säule wurde mit 0.75 ml Puffer PE gewaschen, anschließend wurde die DNA mit 2x20 µl Wasser eluiert.

Sequenzierung von DNA nach Sanger

Sequenzierungen von DNA erfolgten mit dem Sequenase® 7-deaza-dGTP Sequencing Kit von United States Biochemical gemäß dem Protokoll des Herstellers.
Zur Denaturierung der DNA wurde mit 200 mM NaOH und 0.2 mM EDTA 30 min bei 37 °C inkubiert. Es wurde versetzt mit einem Achtel Volumen 2.5 M Natriumacetat und dem vierfachen Volumen Ethanol. Nach 15 min bei -70 °C wurde zentrifugiert (15800 g, 30 min), das Pellet wurde mit auf -20 °C vorgekühltem 70%igen Ethanol gewaschen und in Wasser aufgenommen.
Die Hybridisierung des Primers erfolgte mit 5 µg denaturiertem Plasmid und 0.5 pmol Primer (-40, 5´-GTT TTC CCA GTC ACG AC-3´) in 10 µl Sequenase Puffer (40 mM Tris-HCl, 20 mM $MgCl_2$, 50 mM NaCl, pH 7.5) für 30 min bei 37 °C und anschließender Kühlung auf Eis.
Zur Markierung wurde versetzt mit 1 µl 0.1 M DTT, 2 µl Labeling Mix (je 1.5 µM 7-deaza-dGTP, dCTP und dTTP), 0.5 µl [^{35}S]-Desoxyadenosin-5´-(α-thio)triphosphat (9 nmol/ml und 12.5 mCi/ml), 3.2 U Sequenase und $2x10^{-4}$ U Pyrophosphatase. Es wurde 5 min bei RT inkubiert.
Je 3.5 µl Reaktionsmix wurden zur Terminierung in jeweils 2.5 µl ddNTP Terminationsmix (je 80 µM 7-deaza-dGTP, dATP, dCTP und dTTP, 50 mM NaCl und 8 µM ddNTP) gegeben. Es wurde 5 min bei 37 °C inkubiert und anschließend versetzt mit je 4 µl Stoplösung (95% Formamid, 20 mM EDTA, 0.05% Bromphenolblau, 0.05% Xylen Cyanol FF).
Zur Herstellung von Polyacrylamidgelen für die Sequenzierung wurden 12 ml rotiphorese Sequenziergel Konzentrat (Roth) versetzt mit 33 ml Sequenziergel Verdünner, 5 ml Puffer Konzentrat, 600 µl 10% APS und 20 µl TEMED. Die Polymerisation dauerte eine Stunde.
Es erfolgte ein 10minütiger Vorlauf des Gels, Elektrophoresepuffer war TBE. Die Proben wurden 2 min bei 80 °C denaturiert, in jede Geltasche wurden etwa 3 µl Probe pipettiert. Die Elektrophorese wurde mit einer Leistung von 60 W vorgenommen.
Das Gel wurde fixiert mit 10% Essigsäure und 10% Methanol, mit Wasser gewaschen und 1 h bei 80 °C getrocknet.
Für die Autoradiographie wurde ein New RX Medical X-Ray Röntgenfilm (Fuji Photo Film GmbH, Düsseldorf) verwendet, die Expositionszeit betrug 1-2 Tage.

Expression von rekombinantem phoA in E. coli

Die Induktion von mit Expressionsvektor transfizierten *E. coli* erfolgte in der logarithmischen Phase mit 1 mM IPTG (AGS GmbH, Heidelberg) über einen Zeitraum von üblicherweise 2 h.
Zur Analyse der Expression wurden jeweils 2 ml induzierte Zellsuspension zentrifugiert (4000 g, 5 min). Das Pellet wurde resuspendiert in 0.5 ml 10 mM Tris-HCl pH 7.0 und die Suspension mit 100 µl Lysepuffer (0.1 M Tris-HCl, 5% SDS, 1 M 2-Mercaptoethanol, 15% Glycerin) versetzt. Nach 5 min Inkubation bei 95 °C wurde abzentrifugiert (20000g, 20 min). Aliquote des Filtrats wurden direkt in die SDS-PAGE eingesetzt.

Gewinnung von BAPHis6 aus E. coli

Präparativer Ansatz
200 ml Zellsuspension von mit pBAPHIS6 transfizierten *E. coli* in der logarithmischen Phase wurden versetzt mit 50 mg IPTG. Es wurde 2 h bei 37 °C im Schüttelinkubator induziert und anschließend abzentrifugiert (4000 g, 10 min). Das Pellet wurde resuspendiert in 10 ml Aufschlußpuffer (50 mM Na_2HPO_4, 300 mM NaCl, pH 8.0) und 2 ml 10% Triton-X100. Die Suspension wurde bei -80 °C eingefroren, aufgetaut und 10 min bei 70 °C inkubiert. Der Vorgang wurde wiederholt, bis eine Ausflockung zu beobachten war. Anschließend wurde abzentrifugiert (4000 g, 10 min).
Das im Zentrifugat befindliche BAPHis6 wurde durch Affinitätschromatographie mit Ni-NTA-Harz (Qiagen) im Batch-Verfahren nach Angaben des Herstellers [75] aufgereinigt. Alle Wasch- und Elutionsschritte wurden dabei in Mikro-Spin Zentrifugenfiltern 0.45 µm (Roth) vorgenommen.
Vor seiner Verwendung wurde das Ni-NTA-Harz folgendermaßen aktiviert: 800 µl der Suspension wurden abzentrifugiert, der Rückstand wurde gewaschen mit 100 mM $NiCl_2$ (pH 5.0), Wasser, Puffer F (6 M Guanidinhydrochlorid, 0.2 M Essigsäure) und Aufschlußpuffer und in 400 µl Aufschlußpuffer resuspendiert.
Das aktivierte Harz wurde zu dem aus 200 ml Kultur gewonnenem Zentrifugat aufgeschlossener Zellen gegeben, anschließend wurde 1 h bei 4 °C unter Rühren inkubiert. Es wurde zentrifugiert (10000 g, 10 min), der Überstand wurde abgesaugt. Der Rückstand von Ni-NTA-Harz wurde gewaschen mit 4 ml Waschpuffer (50 mM Na_2HPO_4, 300 mM NaCl, 10% Glycerin, pH 5.5-7.0), die Elution von BAPHis6 erfolgte mit 800 µl imidazolhaltigem Elutionspuffer (50 mM Na_2HPO_4, 300 mM NaCl, 500 mM Imidazol, 10% Glycerin, pH 6.0), wobei 5 min bei 37 °C inkubiert wurde. Zur Entfernung des Imidazols wurde das gewonnene Protein über einen 30000 NMWL Ultrafree-MC Filter mit regenerierter Cellulose (Millipore) filtriert und mit Wasser gewaschen. Das Enzym wurde anschließend in Waser oder Lagerpuffer (25 mM Tris-HCl, 1 mM $MgCl_2$, 0.1 mM $ZnCl_2$, 50% Glycerin, pH 7.6) aufgenommen und bei 4 °C aufbewahrt. Alternativ konnte BAPHis6 mit saurem Elutionspuffer (50 mM Na_2HPO_4, 300 mM NaCl, 10% Glycerin, pH 4.5) bei 0 °C eluiert werden. Das gewonnene Enzym wurde bei 4 °C in Lagerpuffer aufbewahrt.
Aufkonzentrationen wurden mit Ultrafree-MC Filtern vorgenommen.
Die Reinheit des Proteins wurde durch SDS-PAGE bestimmt. Die Ausbeute an aus 200 ml Bakterienkultur gewonnenem BAPHis6 betrug jeweils etwa 1 mg.
MG BAPHis6 (monomeres, prozessiertes Apoenzym, N-Terminus ist Arg): 48020.0 Da
MALDI-TOF MS (3-HPA): MH^+=48098.2 (Monomer), 96249.9 (Dimer) m/z

Gewinnung in kleinen Mengen zu analytischen Zwecken [75]
Eine Zellsuspension von mit pBAPHIS6 transfizierten *E. coli* in der logarithmischen Phase wurde 2 h bei 37 °C mit 1 mmol/l IPTG induziert. 1 ml davon wurde zentrifugiert (4000 g, 5 min) und das Pellet wurde resuspendiert in 200 ml Aufschlußpuffer (8 M Harnstoff, 0.1 M Na_2HPO_4, 10 µM Tris-HCl, pH 8.0). Nach erneuter Zentrifugation (15800 g, 15 min) wurde der Überstand versetzt mit 40 µl Ni-NTA-Harz-Suspension (Qiagen). Es wurde 30 min bei RT geschwenkt. Das Harz wurde abzentrifugiert (15800 g, 20 s) und mit Waschpuffer (8 M Harnstoff, 0.1 M Na_2HPO_4, 10 µM Tris-HCl, pH 6.25) gewaschen. Zur Elution wurde das Harz mit 20 µl Elutionspuffer (8 M Harnstoff, 0.1 M Na_2HPO_4, 10 µM Tris-HCl, 100 mM

EDTA, pH 6.25) 2 min bei RT inkubiert. Das Produkt wurde durch SDS-PAGE charakterisiert.

Gelelektrophorese von Proteinen

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Proteine wurden in 10-12%igen denaturierenden Polyacrylamidgelen voneinander getrennt. 10%ige bzw. 12%ige Trenngele wurde hergestellt durch Versetzen von 3.3 ml bzw 4.0 ml 30% Acrylamid/0.8% Bisacrylamidlösung (Roth) mit 4.1 ml bzw. 3.4 ml Wasser, 2.5 ml Trenngelpuffer (1.5 M Tris-HCl, 0.4% SDS, pH 8.8), 50 µl 10% APS und 5 µl TEMED.
Zur Herstellung des Ladegels wurden 0.65 ml 30% Acrylamid/0.8% Bisacrylamidlösung versetzt mit 3.0 ml Wasser, 1.25 ml Ladegelpuffer (0.5 M Tris-HCl, 0.4% SDS, pH 6.8), 25 µl APS und 5 µl TEMED. Die Polymersisationen waren nach jeweils 1 h beendet.
Die Proben wurden vor dem Auftragen mit dem halben Volumen an Lysepuffer (0.1 M Tris-HCl, 5% SDS, 1 M 2-Mercaptoethanol, 15% Glycerin, 5‰ Bromphenolblau) versetzt und 5 min bei 95 °C inkubiert. Größenstandards waren der Low Molecular Weight Calibration Kit (Pharmacia) sowie SDS-6H und SDS-7 Proteinmarker (Sigma). Mit Hilfe dieser Standards wurden die Molekulargewichte von Proteinen durch lineare Regressionsanalyse bestimmt. Der Laufpuffer hatte folgende Zusammensetzung: 50 mM Tris-HCl, 200 mM Glycin, 0.2% SDS. Die Elektrophorese wurde bei 150 V durchgeführt.
Das Gel wurde mit Coomassie-Lösung (25% Isopropanol, 10% Eisessig, 20‰ Coomassie Brilliant Blue) über Nacht gefärbt und anschließend mit Entfärberlösung (10% Isopropanol, 10% Eisessig) entfärbt.
Zur selektiven Sichtbarmachung von BAP bzw. BAPHis6 durch deren katalytische Aktivität wurde nicht mit Coomassie gefärbt, stattdessen wurde das Gel 15 min in Assaypuffer (0.1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, 0.05 M $MgCl_2$, pH 9.0) equilibriert. Nach Zugabe von 2 mg BCIP und 3.5 mg NBT (beide von Boehringer Mannheim) wurde 10 min inkubiert. Bei dieser Art der Anfärbung wurden die Proben vor dem Auftragen auf das Gel nicht bei 95 °C, sondern bei RT mit Lysepuffer inkubiert, da ansonsten die enzymatische Aktivität der Phosphatasen stark verringert wird.
Zur Anfärbung durch Silver-staining wurde das Gel 45 min mit Fixierlösung (30% Ethanol, 10% Essigsäure) behandelt. Nach 60 min Inkubation mit Neutralisationslösung (30% Ethanol, 0.4 M Natriumacetat, 0.5% Glutaraldehyd und 0.5% $Na_2S_2O_3$) wurde mit 30% Ethanol gewaschen und 30 min mit Färbelösung (0.1% $AgNO_3$, 0.04% Formaldehyd) behandelt. Anschließend wurde mit Entwicklungslösung (2.5% Na_2CO_3, 0.01% Formaldehyd, pH 11.6) versetzt. Die Entwicklung wurde durch 10minütige Inkubation mit 1%iger Glycinlösung gestoppt.

Native Polyacrylamidgelelektrophorese

Proteine für die native PAGE wurden durch ein schonendes Aufschlußverfahren folgendermaßen aus *E. coli* gewonnen: 1.5 ml Suspension von mit Expressionsvektor transfizierten und induzierten Zellen wurden abzentrifugiert (4000 g, 5 min). Das Pellet wurde resuspendiert in 0.5 ml 10 mM Tris-HCl (pH 7.0). Es wurde erneut abzentrifugiert und aufgenommen in 100 µl 10 mM Tris-HCl. Die Zellen wurden bis zum vollständigen Aufschluß

durch Ultraschall bei 0 °C sonifiziert und die Suspension wurde abzentrifugiert (20000 g, 20 min).
Die bei der Herstellung des nativen Gels verwendeten Puffer und der Laufpuffer unterschieden sich dadurch von den bei einer denaturierenden PAGE verwendeten Puffern, das sie kein SDS enthielten. Die Proben wurden vor dem Auftragen nicht mit Lysepuffer, sondern mit Blaumarker (50% Glycerin, 5‰ Bromphenolblau) versetzt und nicht erhitzt.
Die Anfärbung des Gels geschah wie oben beschrieben mit BCIP und NBT.

Quantifizierung von Proteinen

Proteinmengenbestimmungen erfolgten mit dem BCA Protein Assay Reagent von Pierce (Pierce Chemical Company, Rockford, USA) gemäß den Angaben des Herstellers.
Zur Herstellung des Assaypuffers wurde ein Volumenteil Reagenz B (4% $CuSO_4$) vermischt mit dem 50fachen Volumen Reagenz A (Na_2CO_3, BCA und Natriumtartrat in 0.2 M NaOH). Je 0.1 ml 2-12 µg Protein enthaltende Probenlösung wurde mit 2 ml Assaypuffer versetzt. Es wurde 1 h bei 37 °C oder 30 min bei 60 °C inkubiert. Anschließend wurden die Extinktionen bei RT photometrisch bestimmt (λ=562 nm). Eichreihen wurden mit Verdünnungsreihen von BSA-Lösungen bekannter Konzentration (0.05-0.40 mg BSA/ml) erstellt.

Aktivitätsbestimmung von Phosphatasen

Eine Einheit (U) der Enzymaktivität ist definiert als die Enzymmenge, welche 1 µmol pNPP pro Minute umsetzt.

Aktivitätsbestimmung nach Mössner [76]
Die Aktivitätsbestimmungen erfolgte bei RT unter Verwendung eines diethanolaminhaltigen Substratpuffers (10 mM pNPP, 0.5 mM $MgCl_2$, 1 M Diethanolamin/HCl, pH 9.8). In jeden Assay wurden etwa 30 ng BAPHis6 eingesetzt. Der Umsatz von pNPP wurde photometrisch bestimmt bei einer Wellenlänge von λ=405 nm. Der Extinktionskoeffizient von p-Nitrophenol beträgt bei dieser Wellenlänge ε=18.2 $cm^2/\mu mol$.
Für BAPHis6 ergab sich eine spezifische Aktivität von 35 U/mg.

Aktivitätsbestimmung nach Fermentas [89]
Die Bestimmung der Aktivität von BAPHis6 geschah auf indirekte Weise durch Vergleich mit der Aktivität kommerziell erhältlicher BAP (Fermentas). Es wurde bei 37 °C in diethanolaminfreiem Assaypuffer (50 mM Tris-HCl, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM pNPP, pH 8.0) inkubiert. In den Assay wurden 5 mU käufliche BAP und 300 ng BAPHis6 eingesetzt. Die Extinktion wurde photometrisch bei λ=410 nm gemessen. Die ermittelte spezifische Aktiviät von BAPHis6 betrug 18 U/mg.

10.3 Organisch-chemischer Teil

Synthese von Serin-N,N-diessigsäure (SDA)

Synthese des Dinatriumsalzes von SDA nach Erdey [95]
10.5 g (0.1 mol) DL-Serin in 40 ml 10%iger Natronlauge werden mit 23.3 g (0.2 mol) Chloressigsäure Natriumsalz in 45 ml Wasser versetzt. Bei 50 °C werden tropfenweise 20 ml 40%ige Natronlauge zugegeben, so daß der pH nicht über 10 steigt. Nach 3 h Rühren unter Rückfluß und Stehenlassen über Nacht bei RT wird mit Eisessig auf pH 4 eingestellt und tropfenweise mit 150 ml Methanol versetzt. Der gebildete weiße Niederschlag wird mehrfach in Wasser gelöst und mit Methanol gefällt und gewaschen.
Ausbeute (Lit.) 13.5 g (61%), M=265.14 g/mol ($C_7H_9NO_7Na_2$)
Syntheseversuche nach dieser Vorschrift führten lediglich zu sehr geringen Ausbeuten an stark verunreinigtem Produkt (siehe 4.2).

Strecker-Synthese von SDA nach Baur [96]
Man legt 100 g (1 mol) 30%ige Formaldehydlösung vor und tropft innerhalb von 1.25 h bei 20 bis 25 °C eine Lösung von 52 g (0.5 mol) Serin in 250 g Wasser zu, bei welcher zuvor mit 37 g 40%iger NaOH ein pH von 8.5 eingestellt wurde. Nach 30minütigem Weiterrühren bei 25 °C werden bei 15 bis 20 °C 27 g (1 mol) Blausäure innerhalb von 1.5 h zugetropft. Anschließend wird bei 20 °C 30 min weitergerührt, bis eine vollständige Umsetzung erreicht ist. Die erhaltene Lösung von Serin-N,N-diacetonitril wird zu 102 g (1.02 mol) 40%iger NaOH innerhalb von 1 h bei 95 bis 11 °C zugetropft. Nach dreistündigem Weiterrühren bei 100 °C wird keine Ammoniakentwicklung mehr festgestellt. Die klare, gelbe Lösung von Serin-N,N-diessigsäure-trinatriumsalz wird unter vermindertem Druck auf ca. 50 Gew.-% aufkonzentriert. Mit Eisessig wird ein pH von 2 eingestellt. Die Lösung tropft man anschließend auf das vierfache Volumen Methanol. Der ausgefallene weiße Niederschlag wird abfiltriert und nochmals mit Methanol gewaschen.
Ausbeute (Lit.) 98 g (86%), M=221.17 g/mol ($C_7H_{11}NO_7$)
Syntheseversuche nach dieser Vorschrift führten zu einem nicht näher charakterisiertem Produktgemisch (siehe 4.2).

Synthese von N-(5-Amino-1-carboxypentyl)-iminodiessigsäure (N^{α},N^{α}-Bis(carboxymethyl)-Lysin), LDA 2 [49]

N-(5-Benzyloxycarbonylamino-1-carboxypentyl)-iminodiessigsäure (N^{α},N^{α}-Bis(carboxy-methyl)-N^{ε}-benzyloxycarbonyl-Lysin), Z-LDA 1
6.73 g (48 mmol) aus Hexan umkristallisierter Bromessigsäure wurden bei 0 °C in 32 ml 1.5 M NaOH gelöst. 6.79 g (24 mmol) N^{ε}-Benzyloxycarbonyl-L-Lysin (H-Lys(Z)-OH) (Novabiochem) wurden bei 0 °C in 48 ml 1.5 M NaOH gelöst, die Lösung wurde unter Rühren bei 0 °C zur Lösung der Bromessigsäure getropft. Es wurde 2 h bei 0 °C und anschließend über Nacht bei RT gerührt. Nach 2 h Rühren bei 50 °C wurden 60 ml 2 M HCl zugetropft. Der gebildete weiße Niederschlag wurde abgesaugt und in 64 ml 1 M NaOH gelöst. 64 ml 1 M HCl wurden zur Lösung getropft, der entstandene weiße Niederschlag wurde abgesaugt und im Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute 6.77 g (17 mmol) weißer Feststoff (71%, Lit. 56%), M=396.39 g/mol ($C_{18}H_{24}N_2O_8$)
DC n-Butanol/Essigsäure/Wasser 8:2:2
IR (KBr): 1536 (m, C=C-Val. in -Aryl), 1698 (s, C=O-Val. in -COO^-), 2531 (w, N-H-Val. in -NR_2H^+) cm^{-1}
^{1}H-NMR (DMSO): δ=1.19-1.77 (m, 6H, βγδ-C$\underline{H}_2$), 2.92-3.02 (m, 2H, ε-C$\underline{H}_2$), 3.31 (t, 1H, α-C$\underline{H}$), 3.42 (d, 2H, C$\underline{H}_{A1,B1}CO_2H$), 3.49 (d, 2H, C$\underline{H}_{A2,B2}CO_2H$), 5.00 (s, 2H, Ar-C$\underline{H}_2$), 7.20 (t, 1H, N$\underline{H}$), 7.26-7.40 (m, 5H, Ar-$\underline{H}$) ppm
^{13}C-NMR (DMSO): δ=23.85 (γ-$\underline{C}H_2$), 30.00 (β-$\underline{C}H_2$), 30.17 (δ-$\underline{C}H_2$), 40.87 (ε-$\underline{C}H_2$), 54.33 ($\underline{C}H_2CO_2H$), 65.24 (α-$\underline{C}H$), 65.96 (Ar-$\underline{C}H_2$), 128.56 ($\underline{C}_{Ar2,4}$), 129.20 ($\underline{C}_{Ar3}$), 138.17 ($\underline{C}_{Ar1}$), 156.95 (O-$\underline{C}$O-NH), 174.14 ($CH_2\underline{C}O_2H$), 174.83 ($\underline{C}O_2H$) ppm

N-(5-Amino-1-carboxypentyl)-iminodiessigsäure
(N^α,N^α-Bis(carboxymethyl)-Lysin), LDA 2
6.77 g (17 mmol) Z-LDA 1 wurden in 68 ml 0.5 M NaOH gelöst und mit 340 mg 10% Palladium/Aktivkohle (Merck) versetzt. Es wird 24 h bei RT unter H_2 gerührt. Der Katalysator wurde abfiltriert, das Filtrat wurde versetzt mit 6.8 ml 5 M HCl und 200 ml Ethanol. Es wurde über Nacht bei 4 °C stehengelassen. Der gebildete weiße Niederschlag wurde filtriert und erneut in 0.5 M NaOH gelöst. Nach nochmaliger Fällung mit 5 M HCl/Ethanol wurde abgesaugt und der Niederschlag mit wenig Ethanol gewaschen und im Hochvakuum getrocknet.
Ausbeute 2.9 g (11 mmol) weißer Feststoff (64%, Lit. 76%), M=262.26 g/mol ($C_{10}H_{18}N_2O_6$)
RP-DC Acetonitril/Wasser 3:1, R_f 0.17
IR (KBr): 1534 (m, -NH_3^+-Def.), 1628 (s, C=O-Val. in -COO^-), 2561 und 3006 (m, N-H-Val. in -NH_3^+) cm^{-1}
^{1}H-NMR (D_2O): δ=1.34-1.90 (m, 6H, βγδ-C$\underline{H}_2$), 2.87 (t, 2H, ε-C$\underline{H}_2$), 3.72-3.90 (5H, α-C$\underline{H}$ und C$\underline{H}_2CO_2H$) ppm
^{13}C-NMR (D_2O): δ=23.38 (γ-$\underline{C}H_2$), 26.75 (β-$\underline{C}H_2$), 26.89 (δ-$\underline{C}H_2$), 39.44 (ε-$\underline{C}H_2$), 55.60 ($\underline{C}H_2CO_2H$), 68.11 (α-$\underline{C}H$), 170.61 ($CH_2\underline{C}O_2H$), 172.44 ($\underline{C}O_2H$) ppm

Synthese von N-Succinimidyl-3-[bis(4-methoxyphenyl)]-chlormethylbenzoat, m-NHS-DMT-Cl 6 [77]

3-Carboxybenzaldehyd (Isophtalaldehydsäure)
10.3 g (45 mmol) 3-Dichlormethylbenzoesäurechlorid wurden in 150 ml Wasser suspendiert. Das Gemisch wurde auf 100 °C erwärmt und portionsweise versetzt mit 14 g (140 mmol) $CaCO_3$. Es wurde 3½ h unter Rückfluß gerührt und anschließend vorsichtig versetzt mit 36 ml 5 M HCl. Der weiße Niederschlag wurde abgesaugt, mit 100 ml salzsaurem Wasser gewaschen und im Hochvakuum getrocknet.
Ausbeute 6.8 g (45 mmol) weißer Feststoff (100%, entspr. Lit.), M=150.13 g/mol ($C_8H_6O_3$)
DC Dichlormethan/Methanol 8:2

3-[Bis(4-methoxyphenyl)-methyl]-benzoesäure 3
6.8 g (45 mmol) Isophtalaldehydsäure wurden in 140 ml Eisessig gelöst und mit 11.5 ml (105 mmol) Anisol versetzt. Nach Zutropfen von 22 ml konz. H_2SO_4 bei 0 °C wurde 15 h bei RT gerührt. Der Ansatz wurde zu 550 ml Eis gegeben und mit Ethylacetat ausgeschüttelt. Die

organische Phase wurde mit Wasser gewaschen, die wäßrige Phase wurde mit Ethylacetat gegengeschüttelt und die vereinigten organischen Phasen wurden mit Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde evaporiert und der Rückstand bis zur Abwesenheit von Essigsäure mit Toluol koevaporiert. Es wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Laufmittel Dichlormethan/Methanol 9:1) und der erhaltene Feststoff im Hochvakuum getrocknet.
Ausbeute 8.31 g (24 mmol) weißer Feststoff (53%, Lit. 50%), M=348.4 g/mol ($C_{22}H_{20}O_4$)
DC Dichlormethan/Methanol 8:1
^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ=3.80 (s, 6H, OC<u>H</u>$_3$), 5.55 (s, 1H, R_3C<u>H</u>), 6.85 (d, 4H, CH_3O-Ar-<u>H</u>, ortho), 7.03 (d, 4H, CH_3O-Ar-<u>H</u>, meta), 7.44 (m, 2H, HO_2C-Ar-<u>H</u>, meta, para), 7.93 (s, 1H, HO_2C-Ar-<u>H</u>, ortho$_1$), 8.01 (d, 1H, HO_2C-Ar-<u>H</u>, ortho$_2$) ppm
^{13}C-NMR ($CDCl_3$): δ=55.00 (R_3<u>C</u>H), 55.22 (O<u>C</u>H$_3$), 113.80 (<u>C</u>$_{CH3O\text{-}Ar}$-H, ortho), 128.18 (<u>C</u>$_{HOOC\text{-}Ar}$-H, ortho), 128.37 (<u>C</u>$_{HOOC\text{-}Ar}$-H, meta/para), 130.22 (<u>C</u>$_{CH3O\text{-}Ar}$-H, meta), 130.92 (<u>C</u>$_{HOOC\text{-}Ar}$-H, ortho$_1$), 134.35 (<u>C</u>$_{HOOC\text{-}Ar}$-H, meta/para), 135.78 (<u>C</u>$_{Ar}$-R3), 145.10 (<u>C</u>$_{Ar}$-R3), 158.10 (R_2<u>C</u>$_{Ar}$-OCH$_3$), 172.00 (<u>C</u>OOH) ppm

N-Succinimidyl-3-[bis(4-methoxyphenyl)-methyl]-benzoat <u>4</u>
Zu 8.31 g (24 mmol) 3-[Bis(4-methoxyphenyl)]-methylbenzoesäure <u>3</u> in 110 ml 1,4-Dioxan und 6.3 ml Pyridin wurden 2.75 g (24 mmol) NHS und 5.68 g (28 mmol) DCC gegeben.
Nach 22 h Rühren bei RT wurde der gebildete weiße Niederschlag abfiltriert und mit 1,4-Dioxan gewaschen. Das Filtrat wurde mit 200 ml Wasser versetzt und mit Dichlormethan ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde mit Wasser gewaschen und mit Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde evaporiert und der Rückstand bis zur Abwesenheit von Pyridin mit Toluol koevaporiert. Der Rückstand wurde zur Entfernung von Dicyclohexylharnstoff in wenig Dichlormethan aufgenommen und filtriert, das Filtrat wurde bis zur Trockne eingeengt. Zur Entfernung von etwaigen Resten an DCC wurde der Rückstand mit n-Hexan digeriert. Nach Umkristallisation in Ethanol wurde im Hochvakuum getrocknet.
Ausbeute 5.54 g (52%, Lit. 88%) weißer Feststoff, M=445.1 g/mol ($C_{26}H_{23}NO_6$)
DC Dichlormethan/Methanol 96:4
^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ=2.81 (s, 4H, C<u>H</u>$_2$), 3.71 (s, 6H, OC<u>H</u>$_3$), 5.43 (s, 1H, R_3C<u>H</u>), 6.76 (d, 4H, CH_3O-Ar-<u>H</u>, ortho), 6.92 (d, 4H, CH_3O-Ar-<u>H</u>, meta), 7.34 (m, 2H, R_2NO_2C-Ar-<u>H</u>, meta, para), 7.81 (s, 1H, R_2NO_2C-Ar-<u>H</u>, ortho$_1$), 7.92 (d, 1H, R_2NO_2C-Ar-<u>H</u>, ortho$_2$) ppm
^{13}C-NMR ($CDCl_3$): δ=24.65 (<u>C</u>H$_2$), 53.9 (R_3<u>C</u>H), 54.24 (O<u>C</u>H$_3$), 112.90 (<u>C</u>$_{CH3O\text{-}Ar}$-H, ortho), 124.13 (<u>C</u>$_{Ar}$-R3), 127.50 (<u>C</u>$_{R2NOOC\text{-}Ar}$-H, ortho$_2$), 127.81 (<u>C</u>$_{R2NOOC\text{-}Ar}$-H, meta/para), 129.22 (<u>C</u>$_{CH3O\text{-}Ar}$-H, meta), 130.25 (<u>C</u>$_{R2NOOC\text{-}Ar}$-H, ortho$_1$), 134.29 (<u>C</u>$_{R2NOOC\text{-}Ar}$-H, meta/para), 134.89 (<u>C</u>$_{Ar}$-R3), 144.83 (<u>C</u>$_{Ar}$-R3), 157.23 (R_2<u>C</u>$_{Ar}$-OCH$_3$), 160.90 (<u>C</u>O-NR$_2$), 168.19 (<u>C</u>O$_2$R) ppm

N-Succinimidyl-3-[bis(4-methoxyphenyl)-hydroxymethyl]-benzoat, m-NHS-DMT-OH <u>5</u>
Zu 3 g (6.7 mmol) N-Succinimidyl-3-[bis(4-methoxyphenyl)]-methylbenzoat <u>4</u> in 100 ml Eisessig wurden 2.23 g (9.4 mmol) PbO_2 gegeben. Es wurde bei 120 °C gerührt, bis gemäß DC die Menge des bei der Reaktion gebildeten Nebenproduktes gleich der Menge des Produktes war (etwa 30 min). Der Ansatz wurde zu 360 ml Eis gegeben, das Gemisch wurde mit Ethylacetat ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde mit Wasser gewaschen und mit Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde evaporiert und der Rückstand bis zur Abwesenheit von Essigsäure mit Toluol koevaporiert. Anschließend wurde in n-Hexan suspendiert und bis zur vollständigen Lösung unter Rückfluß mit Aceton versetzt. Die Lösung

wurde bis zur Hälfte eingeengt und über Nacht bei 4 °C stehengelassen. Der gebildete weiße Niederschlag wurde abgesaugt und im Hochvakuum getrocknet.
Ausbeute 1.6 g (3.5 mmol) weißer Feststoff (52%, Lit. 70%), M=459.45 ($C_{26}H_{23}NO_7$)
Eine zur Umkristallisation mit n-Hexan/Aceton alternative Aufarbeitungsmethode bestand in der säulenchromatographischen Aufreinigung (Laufmittel Dichlormethan/Methanol 99.6:0.4, 0.03% Pyridin) des Produktes und anschließender Koevaporation mit Toluol bis zur Abwesenheit von Pyridin. Hierbei ergab sich jedoch häufig keine befriedigende Reinheit.
DC Dichlormethan/Methanol 99:1, Nebenprodukt läuft zwischen Edukt und Produkt
^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ=2.82 (s, 1H, R_3C-O<u>H</u>), 3.73 (s, 6H, OC<u>H</u>$_3$), 6.77 (d, 4H, CH_3O-Ar-<u>H</u>, ortho), 7.08 (d, 4H, CH_3O-Ar-<u>H</u>, meta), 7.37 (m, 1H, R_2NO_2C-Ar-<u>H</u>, meta), 7.54 (d, 1H, R_2NO_2C-Ar-<u>H</u>, para), 7.97 (d, 1H, R_2NO_2C-Ar-<u>H</u>, ortho$_2$), 8.08 (s, 1H, R_2NO_2C-Ar-<u>H</u>, ortho$_1$) ppm
^{13}C-NMR ($CDCl_3$): δ=24.65 (<u>C</u>H$_2$), 54.27 (O<u>C</u>H$_3$), 112.47 (<u>C</u>$_{CH3O\text{-}Ar}$-H, ortho), 123.76 (<u>C</u>$_{Ar}$-R3), 127.35 (<u>C</u>$_{R2NOOC\text{-}Ar}$-H, meta), 128.08 und 128.21 (<u>C</u>$_{CH3O\text{-}Ar}$-H, meta und <u>C</u>$_{R2NOOC\text{-}Ar}$-H, ortho$_2$), 128.46 (<u>C</u>$_{R2NOOC\text{-}Ar}$-H, ortho$_1$), 133.46 (<u>C</u>$_{R2NOOC\text{-}Ar}$-H, para), 137.59 (<u>C</u>$_{Ar}$-R3), 147.48 (<u>C</u>$_{Ar}$-R3), 157.90 (R_2<u>C</u>$_{Ar}$-OCH_3), 160.87 (<u>C</u>O-NR_2), 168.21 (<u>C</u>O_2R) ppm

N-Succinimidyl-3-[bis(4-methoxyphenyl)-chlormethyl]-benzoat, m-NHS-DMT-Cl <u>6</u>
100 mg (0.22 mmol) N-Succinimidyl-3-[bis(4-methoxyphenyl)]-hydroxymethylbenzoat <u>5</u> wurden mit 2 ml frisch destilliertem Acetylchlorid 3 h unter Rückfluß erhitzt. Das Acetylchlorid wurde evaporiert und der Rückstand zweimal mit 1,4-Dioxan lyophillisiert. Es wurde bei 60 °C im Hochvakuum getrocknet.
Ausbeute 104 mg (0.22 mmol) rosa Feststoff (100%), M=477.9 g/mol ($C_{26}H_{22}NO_6Cl$)
Die Verbindung war zu instabil für dünnschichtchromatographische oder NMR-spektroskopische Untersuchungen.
Die Reaktivität des Chlorids wurde mit 2´-Desoxythymidin getestet. Hierbei wurden jeweils 10 mg (21 µmol) m-NHS-DMT-Cl mit 7 mg (28 µmol) 2´-Desoxythymidin in 240 µl Pyridin bei RT umgesetzt. Die dünnschichtchromatographische Untersuchung (Dichlormethan/Methanol 9:1) zeigte nach 30 min fast vollständige Umsetzung.

Synthese von p-Nitrophenyl-3-[bis(4-methoxyphenyl)-chlormethyl]-benzoat, m-pNP-DMT-Cl <u>14</u> [78]

Die Synthese von m-pNP-DMT-OH <u>13</u> erfolgte in zwei Schritten aus <u>3</u> auf dieselbe Weise wie die Synthese von m-NHS-DMT-OH <u>5</u>. Anstelle von NHS wurde p-Nitrophenylphosphat verwendet. Aus <u>3</u> hergestelltes p-Nitrophenyl-3-[bis(4-methoxyphenyl)-methyl]-benzoat <u>12</u> wurde nach Umkristallisation in Ethanol säulenchromatographisch (Laufmittel Dichlormethan/Methanol 99:1) aufgereinigt, bevor es zu <u>13</u> umgesetzt wurde. Die Synthese von m-pNP-DMT-Cl <u>14</u> aus m-pNP-DMT-OH <u>13</u> wurde so vorgenommen wie die Darstellung von <u>5</u> aus <u>6</u>. Das Chlorid wurde jedoch nicht durch Evaporation des Acetylchlorides, sondern durch Fällung mit Diethylether gewonnen.
Die jeweils erhaltenen Ausbeuten sowie die ^{1}H- und ^{13}C-NMR-spektroskopische Daten der Verbindungen entsprachen den Literaturwerten.

m-pNP-DMT-Cl 14 wurde zur Überprüfung seiner Reaktivität auf dieselbe Weise wie m-NHS-DMT-Cl 6 mit 2´-Desoxythymidin umgesetzt. Eine Aufreinigung und Charakterisierung des dabei erhaltenen Produktes wurde nicht vorgenommen.

Synthese von N-{5-[3´-Bis(p-methoxyphenyl)hydroxymethyl]benzoylamino-1-carboxypentyl}-iminodiessigsäure 7

Zu 115 mg (0.44 mmol) LDA 2 in 11.5 ml Methanol und 480 µl (3.80 mmol) 4-Ethylmorpholin wurden 100 mg (0.22 mmol) m-NHS-DMT-OH 5 in 5.8 ml Chloroform getropft. Nach 24 h Rühren bei RT hatte sich 5 gemäß DC quantitativ umgesetzt. Das Lösungsmittel wurde evaporiert und der Ansatz durch präparative Dünnschichtchromatographie (Methanol/Chloroform 2:1, 0.25% 4-Ethylmorpholin) aufgereinigt. Das Produkt wurde bis zur Abwesenheit von 4-Ethylmorpholin mit Wasser koevaporiert und im Hochvakuum getrocknet.
Ausbeute 84 mg (0.14 mmol) weißer Feststoff (63%), M=606.62 g/mol ($C_{32}H_{36}N_2O_{10}$)
DC Dichlormethan/Methanol 96:4
RP-DC Wasser/Acetonitril 2:1
^{1}H-NMR (D_2O): δ=1.09-1.73 (m, 6H, βγδ-C<u>H</u>$_2$), 3.20 (t, 2H, ε-C<u>H</u>$_2$), 3.23-3.44 (m, 5H, α-C<u>H</u> und C<u>H</u>$_2$CO$_2$H), 3.67 (s, 6H, OC<u>H</u>$_3$), 6.77 (d, 4H, CH$_3$O-Ar-<u>H</u>, ortho), 6.99 (d, 4H, CH$_3$O-Ar-<u>H</u>, meta), 7.30 (m, 2H, R$_2$N-OC-Ar-<u>H</u>, meta, para), 7.48 (s, 1H, R$_2$N-OC-Ar-<u>H</u>, ortho$_1$), 7.56 (d, 1H, R$_2$N-OC-Ar-<u>H</u>, ortho$_2$) ppm

NTA-Funktionalisierung von mit NHS-DMT-Ester retritylierten Oligonukleotiden

Quantifizierung von an CPG gebundenen 5´-DMT-on-Oligonukleotiden
Zur Quantifizierung wurde jeweils 1 mg mit 5´-DMT-on-Oligonukleotiden beladenes CPG in einer 0.2 µmol Reaktionssäule (Reaction Column Assembly, PerSeptive Biosystems GmbH, Hamburg, GEN860459) eingesetzt. Es wurde mit 3% DCA/Dichlormethan detrityliert und eluiert, bis keine Färbung des Eluats mehr zu beobachten war. Anschließend wurde das Eluat bei λ=504 nm photometrisch vermessen. Der durch Eichreihen mit DMT-OH ermittelte Extinktionskoeffizient des 2,2´-Dimethoxytrityliumions war unter diesen Bedungungen ε=89 cm^2/µmol. Es ergab sich eine typische Beladung der Träger von 20 nmol Oligonukleotid je mg CPG.
Die Untersuchung der vom Träger abgespaltenen tritylierten Oligonukleotide durch RP-HPLC ergab einen Tritylierungsgrad von 90-95%.

Abspaltung von trägergebundenen Oligonukleotiden und Entschützung
Alle an CPG gebundenen Oligonukleotide waren an ihrem 3´-Ende über einen Succinat-Linker an den Träger gebunden. Jeweils 1 mg mit Oligonukleotid beladenes CPG in einer 0.2 µmol Reaktionssäule wurde zur Spaltung des basenlabilen Succinat-Linkers mit 600 µl 32% NH$_3$ 15 min bei RT inkubiert. Das Eluat wurde zur Abspaltung der Basenschutzgruppen des Oligonukleotides (Benzoylschutzgruppe bei A und C, Isobutyrylschutzgruppe bei G) 20 h bei 55 °C oder 24 h bei RT inkubiert. Es wurde versetzt mit 2 ml n-Butanol, gründlich vermischt und zentrifugiert (15800 g, 20 min). Das Zentrifugat wurde abpipettiert und das Pellet

lyophillisiert. Das Oligonukleotid wurde in 100 µl Wasser aufgenommen und photometrisch quantifiziert. Es ergab sich dabei - je nach Art des abgespaltenen Oligonukleotides - eine Konzentration von 120-150 pmol/µl. Bei einer Trägerbeladung von 20 nmol/mg entspricht dies einer Ausbeute von 60-75%.

Retritylierung von USP mit m-NHS-DMT-Cl 6 zu 5´-(m-NHS-DMT)-USP 8 [128]
Zur Retritylierung mit m-NHS-DMT-Cl 6 wurde ein an CPG (Porengröße 50 nm) 3´-gebundenes 5´-DMT-on-Oligonukleotid mit der Sequenz 5´-GTA AAA CGA CGG CCA GT-3´ und einem Molekulargewicht von 5227.33 Da verwendet (USP), das direkt durch Standardsyntheseverfahren nach der Phosphoamiditmethode an einem DNA-Synthesizer hergestellt wurde. Das Oligonukleotid wurde zunächst detrityliert und quantifiziert.
Anschließend wurden jeweils 30 mg des beladenen CPG in einer 1.0 µmol Reaktionssäule (PerSeptive, GEN860458) mit 600 µl Retritylierungslösung (0.2 M m-NHS-DMT-Cl, 0.2 M Tetrabutylammoniumperchlorat, 0.4 M 2,4,6-Collidin in Dichlormethan) 1 h bei RT inkubiert. Es wurde mit Dichlormethan gewaschen, bis im Eluat mit 3% DCA/Dichlormethan keine Tritylkationen mehr festzustellen waren. Zur Quantifizierung der Reaktion wurde das Oligonukleotid auf 1 mg Träger mit 3% DCA/Dichlormethan detrityliert, wobei so vorgegangen wurde wie bei der Quantifizierung von an CPG gebundenen 5´-DMT-on-Oligonukleotiden. Die photometrische Messung erfolgte bei λ=517 nm, der durch Eichreihen mit m-NHS-DMT-OH 5 bestimmte Extinktionskoeffizient des Trityliumions in 3% DCA/Dichlormethan war ε=84 cm^2/µmol. Typischerweise waren 75% des eingesetzten Oligonukleotides retrityliert worden.
Zur Analyse wurde das retritylierte Oligonukleotid von 1 mg Träger abgespalten und entschützt. Der NHS-Ester wurde hierbei durch die alkalischen Reaktionsbedingungen hydrolysiert. Nach Fällung und Aufnahme in Wasser wurde photometrisch quantifiziert. Die Güte der Retritylierung wurde nochmals mittels PAGE überprüft.
MG 5´-(m-COOH-DMT)-USP 17: 5573.71 Da
MALDI-TOF MS (3-HPA): MH^+=332.2 (52%, Tritylgruppe, hydrolysierter Ester), 5228.7 (100%, untritylierter USP), 5573.5 (84%, tritylierter USP, Carboxylat-Ion 17) m/z

Umsetzung von 8 mit Diaminohexan zum Amid
5´-(NH_2-(C_6H_{12})-NH-m-DMT)-USP 9 [78]
1 mg von mit m-NHS-DMT-USP 8 beladenem CPG in einer 0.2 µmol Reaktionssäule wurde 3 h mit 1 M 1,6-Diaminohexan bei RT inkubiert. Es wurde mit Wasser gewaschen und anschließend vom Träger abgespalten. Nach Entschützung und Fällung wurde das Oligonukleotid in 100 µl Wasser aufgenommen.
RP-HPLC zeigte 55% untritylierten USP und 23% Produkt.
MG 5´-(NH_2-(C_6H_{12})-NH-m-DMT)-USP 9: 5671.90 Da
MALDI-TOF MS (3-HPA): MH^+=445.8 (46%, Tritylgruppe, Diaminohexan-Amid), 5254.7 (100%, untritylierter USP), 5699.6 (68%, Amid 9) m/z

Synthese von NTA-funktionalisiertem Oligonukleotid 5´-(m-LDA-DMT)-USP 10
1 mg mit retrityliertem Oligonukleotid 5´-(m-NHS-DMT)-USP 8 beladenes CPG in einer 0.2 µmol Reaktionssäule wurde mit 600 µl 0.5 M LDA 2 (mit Triethylamin auf pH 9.0 eingestellt) 3 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde mit Wasser gewaschen. Das Oligonukleotid wurde vom Träger abgespalten und entschützt. Es wurde gefällt und nach

Aufnahme in 100 µl Wasser photometrisch quantifiziert. RP-HPLC zeigte 55% untritylierten USP und 38% Produkt (5´-(m-LDA-DMT)-USP 10) und hydrolysierten Ester.
MG 5´-(m-LDA-DMT)-USP 10: 5817.71 Da
MALDI-TOF MS (3-HPA): MH^+=332.3 (20%, Tritylgruppe, hydrolysierter Ester), 595.8 (19%, Tritylgruppe, LDA-Amid), 5246.0 (100%, untritylierter USP), 5591.2 (27%, tritylierter USP, Carboxylat-Ion 17), 5849.7 (39%, Amid 10) m/z

Aufreinigung von 5´-(m-LDA-DMT)-USP 10 mit OPC
Eine Oligonucleotide Purification Cartridge (400771 Applied Biosystems, Foster City, USA) wurde equilibriert mit 5 ml Acetonitril und 5 ml 2 M TEA pH 7.4. 70 nmol 5´-(m-LDA-DMT)-USP 10 in 1 ml 16% NH_3 wurden mehrfach über die Säule gegeben. Es wurde gewaschen mit 5 ml 1.5 M NH_3 und 10 ml Wasser. Die Elution erfolgte mit 1 ml 0.1 M TEA/Acetonitril 3:2.
MALDI-TOF MS (3-HPA): MH^+=5235.7 (100%, untritylierter USP), 5832.2 (57%, Amid 10) m/z

Versuche mit N-Succinimidyl-4-[bis(4-methoxyphenyl)-chlormethyl]-benzoat, p-NHS-DMT-Cl 16
p-NHS-DMT-Cl 16 [77] wurde von F. Barnekow, Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie, Universität Hamburg, zur Verfügung gestellt. Die Retritylierung von Oligonukleotiden mit 16 wurde auf dieselbe Weise vorgenommen wie die Retritylierung mit m-NHS-DMT-Cl 6 (siehe oben). An CPG immobilisierter und retritylierter USP wurde 1 h mit 0.1 M LDA pH 8.0 bei RT inkubiert. Es wurde mit Tris-HCl pH 8.0 gewaschen. Nach Abspaltung, Entschützung und Fällung wurde das Oligonukleotid in Wasser aufgenommen. Die Analyse mit MALDI-TOF MS zeigte keine Umsetzung des retritylierten Oligonukleotides mit LDA.

NTA-Funktionalisierung von 5´-phosphorylierten Oligonukleotiden

Synthese des Phosphoamidates 5´-LDA-P-USP 11 über das Imidazolid
400 pmol 5´-phosphorylierter USP (5´-P-USP, 5307.31 Da, Biometra) wurden versetzt mit 50 µl 0.2 M Imidazol (mit HCl auf pH 6.1 eingestellt) und 50 µl frisch angesetztem 0.24 M EDC. Es wurde 3 h 40 min bei RT inkubiert. Der Ansatz wurde mit einem Microcon-3 Mikrokonzentrator (NCO 10, Amicon GmbH, Königsholz) diafiltriert und dabei auf ein Volumen von ca. 10 µl eingeengt. Es wurde versetzt mit 100 µl 0.25 M LDA 2 (mit HCl auf pH 7.7 eingestellt) und 3 h bei 50 °C inkubiert. Der Ansatz wurde erneut diafiltriert und mit 100 µl 0.1 M Ammoniumacetat (pH 7.0) und 100 µl Wasser gewaschen.
MG 5´-LDA-P-USP 11: 5551.55 Da
MALDI-TOF MS (3-HPA): MH^+=5291.1 (100%, 5´-P-USP), 5530.8 (42%, Amidat 11) m/z

Synthese des Phosphoamidates 5´-LDA-P-USP 11 über den HOBT-Phosphodiester
400 pmol 5´-phosphorylierter USP (5´-P-USP) in 15µl 70% DMF wurden versetzt mit 35 µl frisch angesetztem 2 M HOBT und 0.5 M EDC in 70% DMF. Es wurde 3 h bei 4 °C inkubiert. Zur Fällung wurde versetzt mit 5 µl 4 M LiCl und 275 µl Aceton. Nach 20 h bei -20 °C wurde zentrifugiert (30 min 15800 g). Der Überstand wurde abpipettiert und das Pellet versetzt mit 20 µl 0.33 M LDA 2 (mit NaOH auf pH 9.3 eingestellt). Nach 12 h Inkubation bei 4 °C wurde

mit einem Microcon-3 Mikrokonzentrator (Amicon) diafiltriert und mit 100 µl 3 M Ammoniumacetat und 4x100 µl Wasser gewaschen. Alternativ zur Diafiltration wurde die Aufreinigung mittels HPLC unter Verwendung einer Fast Desalting Column vorgenommen.
MALDI-TOF MS (3-HPA): MH^+=5298.6 (77%, 5´-P-USP), 5430.8 (86%, USP-HOBT-Addukt ?), 5563.3 (100%, Amidat 11) m/z

Anbindung von BAPHis6 an CPG-gebundene NTA-funktionalisierte Oligonukleotide

Jeweils 2-3 mg mit Amid 9 oder 10 beladenes CPG der Porengröße 50 nm (hergestellt wie oben beschrieben) in 0.2 µmol Reaktionssäulen (PerSeptive) wurden gewaschen mit 600 µl gesättigter $NiCl_2$-Lösung pH 7.0. Nach Waschen mit 5 ml Wasser wurde 30 min bei 4 °C inkubiert mit 900 pmol BAPHis6 in 600 µl Phosphatpuffer (50 mM Na_2HPO_4, 300 mM NaCl, pH 8.0). Es wurde mit 5 ml Phosphatpuffer gewaschen und die Aktivität des Eluates wie oben beschrieben bestimmt. Das CPG wurde 10 min bei RT mit Elutionspuffer (50 mM Na_2HPO_4, 300 mM NaCl, 500 mM Imidazol, pH 7.0) inkubiert. Die Aktivität des Eluates wurde bestimmt. Anhand der gemessenen spezifischen Aktivität von BAPHis6 konnte die Menge an gebundenem Enzym berechnet werden. Die spezifische Bindung betrug für das Amid 9 20 pmol und für das Amid 10 30 pmol BAPHis6 je mg CPG.

Festphasensynthesen von Oligonukleotiden mit 5´-Histidin-Tails

Die Synthesen erfolgten an CPG-gebundenen Oligonukleotiden mit der Sequenz des USP (siehe oben), und zwar zum einen mit 5´-aminohexylphosphat-modifiziertem Oligonukleotid (5´-NH_2-$(CH_2)_6$-P-USP, 5406.48 Da, Biometra) und zum anderen unter Verwendung von mit m-NHS-DMT-Cl 6 5´-retrityliertem und anschließend mit 1,6-Diaminohexan umgesetztem Oligonukleotid (5´-NH_2-$(CH_2)_6$-NH-m-DMT-USP, 5671.90 Da, 9). Um eine etwaige Degradation der synthetisierten His-Tails durch die Bedingungen der Entschützungsreaktion (32% NH_3, 20 h, 55 °C) nach der Abspaltung vom Träger auszuschließen, wurde zur Kontrolle auch ein an CPG-gebundenes, 5´-aminohexylphosphat-modifiziertes 2´-Desoxythymidin-25mer (5´-NH_2-$(CH_2)_6$-P-T_{25}, 7720.82 Da, Biometra) ohne Basenschutzgruppen umgesetzt. Die Porengröße des CPG betrug bei den 5´-aminohexyl-modifizierten Oligonukleotiden 100 nm, bei den 5´-retritylierten Oligonukleotiden 50 nm. In jede Synthese wurde jeweils 1 mg beladener Träger eingesetzt. Die Oligonukleotide waren über einen 3´-Succinat-Linker an den Träger gebunden, die verwendeten Basenschutzgruppen waren die Benzoylschutzgruppe im Falle von A und C und die Isobutyrylschutzgruppe bei G.
Die Synthesen fanden unter Feuchtigkeitsausschluß und unter Argon-Schutzgasatmosphäre in 0.2 µmol Reaktionssäulen (PerSeptive) statt.
Die Kopplungsreaktion wurde entweder mit PyBOP, DIPEA und Fmoc-His(Fmoc)-OH in DMF oder mit reaktivem Ester Fmoc-His(Fmoc)-OPfp in DMF vorgenommen.

Die Synthesen wurde im folgenden Zyklus durchgeführt:

1. Inkubation mit Kopplungslösung bei RT (Kopplungsreaktion)

2. Waschen mit DMF

3. Inkubation mit 20% Piperidin in DMF bei RT (zur Abspaltung von Fmoc)

4. Waschen mit DMF

Jeder Zyklus wurde sechsmal pro Synthese vorgenommen.
Die Konzentrationen der Kopplungslösungen sowie die Inkubationszeiten der Kopplung und der Abspaltung von Fmoc wurden in verschiedenen Ansätzen variiert.

Die anschließende Abspaltung, Entschützung und Fällung der Oligonukleotide wurde so vorgenommen wie oben beschrieben (bei der Umsetzung mit 5´-NH_2-$(CH_2)_6$-P-T_{25} wurde kein Entschützungsschritt durchgeführt). Nach Aufnahme in Wasser wurde photometrisch quantifiziert, wobei für alle Oligonukleotide als Näherungswert der Extinktionskoeffizient des jeweiligen unmodifizierten Oligonukleotides verwendet wurde. Die Analyse der Produkte erfolgte durch MALDI-TOF MS.
Die theoretischen Massen der jeweiligen Produkte sind in Tabelle 4 angegeben.

	-His_1	-His_2	-His_3	-His_4	-His_5	-His_6
5´-NH_2-USP	5542.62	5679.76	5816.91	5954.05	6091.20	6228.34
Amid 9	5803.05	5945.19	6082.33	6219.48	6356.63	6493.77
5´-NH_2-T_{25}	7857.96	7995.10	8132.24	8269.38	8406.52	8543.66

Tabelle 4. Theoretische Massen der Histidin-Addukte der verschiedenen verwendeten Oligonukleotide. Angaben in Da.

Umsetzung von 5´-(NH_2-(C_6H_{12})-NH-m-DMT)-USP 9 mit Fmoc-His(Fmoc)-OPfp
Kopplungslösung: 70 mM Fmoc-His(Fmoc)-OPfp in DMF
Inkubationszeiten: Kopplungsreaktion 20 min, Abspaltung von Fmoc 5 min
Es war nur eine geringe Umsetzung zum His_1-Addukt erkennbar.
MALDI-TOF MS (3-HPA): MH^+=5236.4 (100%, USP), 5679.7 (86%, 5´-(NH_2-(C_6H_{12})-NH-m-DMT)-USP), 5815.6 (77%, His_1-Addukt) m/z

Umsetzung von 5´-(NH_2-(C_6H_{12})-NH-m-DMT)-USP 9 mit PyBOP/Fmoc-His(Fmoc)-OH
Kopplungslösung: 80 mM PyBOP, 80 mM Fmoc-His(Fmoc)-OH, 0.16 M DIPEA in DMF
Inkubationszeiten: Kopplungsreaktion 20 min, Abspaltung von Fmoc 5 min
Hauptprodukt dieser Reaktion war das His_2-Addukt.
MALDI-TOF MS (3-HPA): MH^+=5233.5 (83%, USP), 5671.4 (62%, 5´-(NH_2-(C_6H_{12})-NH-m-DMT)-USP), 5951.2 (100%, His_2-Addukt), 6086.7 (65%, His_3-Addukt), 6232.2 (40%, His_4-Addukt) m/z

Umsetzung von 5´-NH_2-$(CH_2)_6$-P-T_{25} mit PyBOP/Fmoc-His(Fmoc)-OH
Kopplungslösung: 0.16 M PyBOP, 0.16 M Fmoc-His(Fmoc)-OH, 0.32 M DIPEA in DMF
Inkubationszeiten: Kopplungsreaktion 1 h, Abspaltung von Fmoc 40 min
Edukt war nicht mehr erkennbar.

MALDI-TOF MS (3-HPA): MH^+=7858.6 (68%, His_1-Addukt), 7980.0 (100%, His_2-Addukt), 8122.6 (89%, His_3-Addukt), 8275.3 (76%, His_4-Addukt), 8415.5 (54%, His_5-Addukt) m/z

Umsetzung von 5´-NH_2-$(CH_2)_6$-P-USP mit Fmoc-His(Fmoc)-OPfp
Kopplungslösung: 70 mM Fmoc-His(Fmoc)-OPfp in DMF
Inkubationszeiten: Kopplungsreaktion 20 min, Abspaltung von Fmoc 5 min
Größere Produkte als His_1-Addukt waren nicht erkennbar.
MALDI-TOF MS (3-HPA): MH^+=5401.9 (100%, 5´-NH_2-$(CH_2)_6$-USP), 5536.8 (70%, His_1-Addukt) m/z

Umsetzung von 5´-NH_2-$(CH_2)_6$-P-USP mit PyBOP/Fmoc-His(Fmoc)-OH und Aufreinigung der Reaktionsprodukte mit Ni-NTA-Harz
Kopplungslösung: 80 mM PyBOP, 80 mM Fmoc-His(Fmoc)-OH, 0.16 M DIPEA in DMF
Inkubationszeiten: Kopplungsreaktion 30 min, Abspaltung von Fmoc 20 min
His_2-, His_3-, His_4- und His_5-Addukte waren zu beobachten, jedoch weder Edukt noch His_1- oder His_6-Addukt.
MALDI-TOF MS (3-HPA): MH^+=5681.5 (64%, His_2-Addukt), 5823.6 (100%, His_3-Addukt), 5960.9 (68%, His_4-Addukt), 6092.3 (20%, His_5-Addukt) m/z
1 nmol der Reaktionsprodukte wurde mit 800 µl aktiviertem Ni-NTA-Harz (siehe oben) 2 h bei 4 °C unter leichtem Schwenken inkubiert. Das Harz wurde in einen Mikro-Spin Zentrifugenfilter 0.45 µm (Roth) überführt und mit Waschpuffer (50 mM Na_2HPO_4, 300 mM NaCl, 10% Glycerin, pH 7.0) gewaschen. Die Oligonukleotide wurden mit Elutionspuffer (50 mM Na_2HPO_4, 300 mM NaCl, 500 mM Imidazol, 10% Glycerin, pH 6.0) eluiert. Aliquote der Waschlösung, der Elutionslösung und der mit Ni-NTA inkubierten Ausgangslösung wurden über einen Microcon-3 Mikrokonzentrator (Amicon) diafiltriert. Es wurde jeweils mit 0.1 M Ammoniumacetat (pH 7.0) und Wasser gewaschen. Nach photometrischer Quantifizierung wurde massenspektroskopisch vermessen. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengefaßt.

	His_2-Addukt	His_3-Addukt	His_4-Addukt	His_5-Addukt
Ausgangslösung	100%	67%	0%	0%
Waschlösung	100%	85%	0%	0%
Elutionslösung	67%	100%	71%	31%

Tabelle 5. Relative Intensitäten der massenspektrometrischen Signale der verschiedenen Histidin-Addukte.

11. Literaturverzeichnis

1. Ruth J.L. Mol. Biotechnol. 6 (1996) 163-178

2. Gosh S.S., Kao P.M., McCue A.W., Chappelle H.L. Bioconjug. Chem. 1 (1990) 71-76

3. Craig D.B., Wong J.C.Y., Dovichi N.J. Anal. Chem. 68 (1996) 697-700

4. Beck S., Köster H. Anal. Chem. 62 (1990) 2258-2270

5. Ishii J.K., Gosh S.S. Bioconjug. Chem. 4 (1993) 34-41

6. Vary C.P.H., Carmody M., Leblanc R., Hayes T., Rundell C., Keilson L.
   Genetic Analysis: Biomolecular Engineering 13 (1996) 59-65

7. Li P., Medon P.P., Skingle D.C., Lanser J.A., Symons R.H.
   Nucleic Acids Res. 15 (1987) 5275-5287

8. Jablonski E., Moomaw E.W., Tullis R.H., Ruth J.L.
   Nucleic Acids Res. 14 (1986) 6115-6128

9. Farmar J.G., Castaneda M. BioTechniques 5 (1991) 588-589

10. Edman J.C., Evans-Holm M.E., Marich J.E., Ruth J.L.
    Nucleic Acids Res. 16 (1988) 6235

11. Reyes R.A., Cockerell G.L. Nucleic Acids Res. 21 (1993) 5532-5533

12. Büning H., Gärtner U., v.Schack D., Baeuerle P.A., Zorbas H.
    Anal. Biochem. 234 (1996) 227-230

13. Wilchek M., Bayer E.A. Methods Enzymol. 184 (1990) 5-13

14. Niemeyer C.M., Sano T., Smith C.L., Cantor C.R.
    Nucleic Acids Res. 22 (1994) 5530-5539

15. Cronan J.E. Biol. Chem. 256 (1990) 10327-10333

16. Schmitz G.G., Walter T., Kessler C. Anal. Biochem. 192 (1991) 222-231

17. Ducancel F., Gillet D., Menez A., Boulain J.C. C. R. Acad. Sci. III 315 (1992) 221-224

18. Mackey J., Guan N., Rashtchian A. Life Technologies Focus 14 (1996) 112-116

19. Benzinger E.A., Riech A.K., Shirley R.E., Kucharik K.R.
    Appl. Theor. Electrophor. 4 (1995) 161-165

20. Chiu N.H.L., Christopoulos T.K. Anal. Chem. 68 (1996) 2304-2308

21. Cate R.L., Ehrenfels C.W., Wysk M., Tizard R., Voyta J.C., Murphy O.J., Bronstein I. Genet. Anal. Tech. Appl. 8 (1991) 102-106

22. Olesen C.E., Martin C.S., Bronstein I. BioTechniques 15 (1993) 480-485

23. Ioannou P.C., Christopoulos T.K. Anal. Chem. 70 (1998) 698-702

24. Tizard R., Cate R.L., Ramachandran K.L., Wysk M., Voyta J.C., Murphy O.J., Bronstein I. Proc. Natl. Acad. Sci. 87 (1990) 4514-4518

25. Holmstrøm K., Rossen L., Rasmussen O.F. Anal. Biochem. 209 (1993) 278-283

26. Karger A.E., Weiss R., Gesteland R.F. Nucleic Acids Res. 20 (1992) 6657-6665

27. Beck S., O´Keeffe T., Coull J.M., Köster H. Nucleic Acids Res 1 7 (1989) 5115-5123

28. Church G.M., Kiefer-Higgins S. Science 240 (1988) 185-188

29. Richterich P., Church G.M. Methods Enzymol. 218 (1993) 187-222

30. Köster H., Beck S., Coull J.M., Dunne T., Gildea B.D., Kissinger C., O´Keffe T. Nucleic Acids Res. Symposium Series 24 (1991)

31. Kessler C. Nonradioactive Labeling Methods for Nucleic Acids
in: Kricka L.J. Nonisotopic DNA Probe Techniques (1992) 29-92
Academic Press, New York

32. Ford C.F., Suominen I., Glatz C.E. Protein Expression Purif. 2 (1991) 95-107

33. Sano T., Smith C.L., Cantor C.R. Bio/Technology 11 (1993) 201-206

34. Brizzard B.L., Chubet R.G., Vizard D.L. BioTechniques 16 (1994) 730-735

35. Witkowski A., Daunert S., Kindy M.S., Bachas L.G. Anal. Chem. 65 (1993) 1147-1151

36. Porath J. Protein Expression Purif. 3 (1992) 263-281

37. Hochuli E., Döbeli H., Schacher A. J. Chromatogr. 411 (1987) 177-184

38. Hochuli E. Genetic Engineering 12 (1990) 87-98
Plenum Press, New York

39. Smirnov Y.V., Fradkov A.F., Chakmakhcheva O.G., Efimov V.A.
Russian Journal of Bioorganic Chemistry 21 (1995) 341-342

40. Komissarov A.A., Marchbank M.T., Deutscher S.L.
Anal. Biochem. 247 (1997) 123-129

41. Hoang D.Q., Simcox T.G., McGowan B.A., Simcox M.E.
Stratagene Strategies 9 (1996) 12-13

42. Gu J., Stephenson C.G., Iadarola M.J. BioTechniques 17 (1994) 257-262

43. Kashlev M., Martin E., Polyakov A., Severinov K., Nikiforov V., Goldfarb A.
Gene 130 (1993) 9-14

44. Schmitz M.L., Baeuerle P.A. BioTechniques 17 (1994) 714-717

45. Ravagnani A., Arst H.N. Nucleic Acids Res. 23 (1995) 3069-3070

46. Yoshihisa T., Ito K. J. Biol. Chem. 271 (1996) 9429-9436

47. Zentgraf H., Frey M., Schwinn S., Tessmer C., Willemann B., Samstag Y., Velhagen I.
Nucleic Acids Res. 23 (1995) 3347-3349

48. Botting C.H., Randall R.E. BioTechniques 19 (1995) 362-363

49. Schmitt L., Dietrich C., Tampé R. J. Am. Chem. Soc. 116 (1994) 8485-8491

50. Bergmann F., Bannwarth W. Tetrahedron Lett. 36 (1995) 1839-1842

51. Nielsen J., Brenner S., Jand K.D. J. Am. Chem. Soc. 115 (1993) 9812-9813

52. Ørum H., Nielsen P.E., Jørgensen M., Larsson C., Stanley C., Koch T.
BioTechniques 19 (1995) 472-480

53. Finn P.J., Gibson N.J., Fallon R., Hamilton A., Brown T.
Nucleic Acids Res. 24 (1996) 3357-3363

54. Zueva N.N., Dalev P.G., Lazarova D.L. Biokhimiya 58 (1993) 1009-1023

55. Murphy J.E., Kantrowitz E.R. Mol. Microbiol. 12 (1994) 351-357

56. Murphy J.E., Xu X., Kantrowitz E.R. J. Biol. Chem. 268 (1993) 21497-21500

57. Mellgren R.L., Slaughter G.R., Thomas J.A. J. Biol. Chem. 252 (1977) 6082-6089

58. Coleman J.E., Gettins P. Adv. Ezymol. Rel. Areas Mol. Biol. (1983) 55-61
Academic Sciences, New York

59. Sowadski J.M., Handschumacher M.D., Murthy H.M.K., Foster B.A., Wyckoff H.W. J . Mol. Biol. 186 (1985) 417-433

60. Coleman J.E. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 21 (1992) 441-483

61. Janeway C.M.L., Xu X., Murphy J.E., Chaidaroglou A., Kantrowitz E.R. Biochemistry 32 (1993) 1601-1609

62. Nakata A., Shinagawa H., Shima H. FEBS Lett. 175 (1984) 343-348

63. Michaelis S., Hunt J.F., Beckwith J. J. Bacteriol. 167 (1986) 160-167

64. Inouye H., Barnes W., Beckwith J. J. Bacteriol. 149 (1982) 434-439

65. Chang C.N., Kuang W.-J., Chen E.Y. Gene 44 (1986) 121-125

66. Maunders, M.J. Alkaline Phosphatase
in: Burrell M.M. Methods in Molecular Biology 16 (1993) 331-341
Humana Press Inc., Totowa

67. Agrawal D.K., Wanner B.L. J. Bacteriol. 172 (1990) 3180-3190

68. Hoffman C.S., Wright A. Proc. Natl. Acad. Sci. 82 (1985) 5107-5111

69. Seidler A. Protein Eng. 7 (1994) 1277-1280

70. Birnboim H.C., Doly J. Nucleic Acids Res. 7 (1979) 1513-1523

71. Ausubel, F. Current Protocols in Molecular Biology (1987) 2.4.1-2.4.5
John Wiley & Sons, New York

72. Oberbäumer, I. Gene 49 (1986) 81-91

73. Blum E., Horst G., Kröger M. J. Biochem. Biophys. Methods 29 (1994) 113-121

74. QIAGEN Plasmid Handbook 2/95 30-31

75. The QIAexpressionist, Quiagen, Sommer 1992, 36-46

76. Mössner E., Boll M., Pfleiderer G. Z. Physiol. Chem. 361 (1980) 543-549

77. Leikauf E., Barnekow F., Köster H. Tetrahedron 51 (1995) 3793-3802

78. Barnekow F. Dissertation Universität Hamburg (1998)

79. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning, 2. Aufl. (1989)
Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York

80. Fürste J.P., Pansegrau W., Frank R., Blöcker H., Scholz P., Bagdasarian M., Lanka E.
Gene 48 (1986) 119-131

81. Amann E., Brosius J., Ptashne M Gene 25 (1983) 167-178

82. McPherson M.J., Quirke P., Taylor G.R. PCR - A practical approach, 2. Aufl. (1992)
IRL Press, Oxford

83. Ruppert A., Szalay B., v.d.Boom D., Horst G., Köster H.
Anal. Biochem. 230 (1995) 130-134

84. Min C., Verdine G.L. Nucleic Acids Res. 24 (1996) 3806-3810

85. Nieba L., Nieba-Axmann S.E., Persson A., Hämäläinen M., Edebratt F., Hansson A., Lidholm J., Magnusson K., Karlsson Å.F., Plückthun A.
Anal. Biochem. 252 (1997) 217-228

86. Ibelgaufts H. Gentechnologie von A bis Z , 1. Aufl. (1993) 20-21
VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim

87. Bessey O.A., Lowry O.H., Brock M.J. J. Biol. Chem. 161 (1946) 321-329

88. Torriani A. Meth. Enzymol. 12 (1968) 212-218

89. MBI Fermentas Molecular Biology Product Guide (94/95) 92

90. Shabarova Z.A. Biochimie 70 (1988) 1323-1334

91. Wolter A. Dissertation Universität Hamburg (1987) a) 295-296 b) 226

92. Beaucage S.L., Caruthers M.H. Tetrahedron Lett. 22 (1981) 1859-1862

93. Sinha N.D., Biernat J., Köster H. Tetrahedron Lett. 24 (1983) 5843-5846

94. Kwiatkowski M., Samiotaki M., Lamminmäki U., Mukkala V.-M., Landegren U.
Nucleic Acids Res. 22 (1994) 2604-2611

95. Erdey L., Gyimesi J., Meisel T. Acta Chim. Hung. 21 (1959) 327-332

96. Baur R., Richter F., Birnbach S., Fikentscher R., Oftring A., Winkler E.
BASF AG (Ludwigshafen) Offenlegungsschrift DE 37 12329 A1 (1988)

97. Houben-Weyl 11/2 (1958) 408 ff.

98. Corey D.R., Schultz P.G. Science 238 (1987) 1401-1403

99. Chu B.C.F., Orgel L.E. Proc. Natl. Acad. Sci. 82 (1985) 963-967

100. Chu B.C.F., Orgel L.E. Nucleic Acids Res. 16 (1988) 3671-3691

101. Michaelis L., Schubert M.P. J. Biol Chem. 106 (1934) 331-341

102. Du Vigneaud V., Andrieth L.F., Lorin H.S. J. Am. Chem. Soc. 52 (1930) 4500-4504

103. Bergmann M., Michaelis G. Ber. Dtsch. Chem. Ges. 63 (1930) 987-989

104. Emiliozzi R., Pichat L., Herbert M. Bull. Soc. Chim. Fr. (1959) 1544-1545

105. Burns J.A., Butler J.C., Moran J., Whitesides G.M. J. Org. Chem. 56 (1991) 2648-2650

106. Jones J. The Chemical Synthesis of Peptides (1991)
Clarendon Press, Oxford

107. Schmitt L., Technische Universität München, persönliche Mitteilung

108. Chen S.-C. J. Chromatogr. 238 (1982) 480-482

109. Dietrich C., Boscheinen O., Scharf K.D., Schmitt L., Tampe R.
Biochemistry 35 (1996) 1100-1105

110. Dietrich C., Schmitt L., Tampe R. Proc. Natl. Acad. Sci. 92 (1995) 9014-9018

111. Clifford M. PCT Int. Appl. WO 92 10,505

112. Pietrzyk D.J., Cahill W.J., Stodola J.D. J. Liq. Chromatogr. 5 (1982) 443-461

113. Bada J.L. Racemization of Amino Acids
in: Barrett G.C. Chemistry and Biochemistry of the Amino Acids (1985) 399-414
Chapman and Hall, New York

114. Hesse M., Meier H., Zeeh B. Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie
4. Aufl. (1991) 154-157, Georg Thieme Verlag, Stuttgart

115. Guzaev A., Salo H., Azhayev A., Lönnberg H. Tetrahedron 51 (1995) 9375-9384

116. Sowa T., Ouchi S. Bull. Chem. Soc. Jpn. 48 (1975) 2084-2090

117. Ralph R.K., Young R.J., Khorana H.G. J. Am. Chem. Soc. 84 (1962) 1490-1491

118. Ivanovskaya M.G., Gottikh M.B., Shabarova Z.A.
Nucleosides & Nucleotides 6 (1987) 913-934

119. Shabarova Z.A., Bogdanov A. Advanced Organic Chemistry Of Nucleic Acids (1994)
VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim

120. Chu B.C.F., Wahl G.M., Orgel L.E. Nucleic Acids Res. 11 (1983) 6513-6529

121. Chu B.C.F., Kramer F.R., Orgel L.E. Nucleic Acids Res. 14 (1996) 5591-5603

122. Gottikh M.B., Ivanovskaia M.G., Shabarova Z.A. Bioorg Khim 14 (1988) 500-510

123. Kuznetsova S.A., Ivanovskaia M.G., Gotthikh M.B., Elov A.A., Shabarova Z.A.
Bioorg Khim 14 (1988) 490-499

124. Kuznetsova S.A., Ivanovskaia M.G., Shabarova Z.A.
Bioorg Khim 13 (1987) 1139-1141

125. Ivanovskaia M.G., Kozlov I.A., Lebedeva I.V., Shabarova Z.A.
Mol. Bio. Engl. Transl. 28 (1994) 754-756

126. Connolly B.A., Rider P. Nucleic Acids Res. 13 (1985) 4485

127. Haker U. Institut für Biochmie und Lebensmittelchemie , Universität Hamburg

128. Gildea B.D., Coull J.M., Köster H. Tetrahedron Lett. 31 (1990) 7095-7098

129. Atherton E., Sheppard R.C Solid phase peptide synthesis (1989) 54-55
IRL Press, Oxford

130. Atherton E., Cameron L.R., Sheppard R.C. Tetrahedron 44 (1988) 843-857

131. Novabiochem Catalog & Peptide Synthesis Handbook (97/98) 58-59

132. Coste J., Le-Nguyen D., Castro B. Tetrahedron Lett. 31 (1990) 205-208

133. Hudson D. J. Org. Chem. 53 (1988) 617-624

12. Anhang

12.1 Nukleinsäuresequenz von phoAHis6 und Aminosäuresequenz von BAPHis6

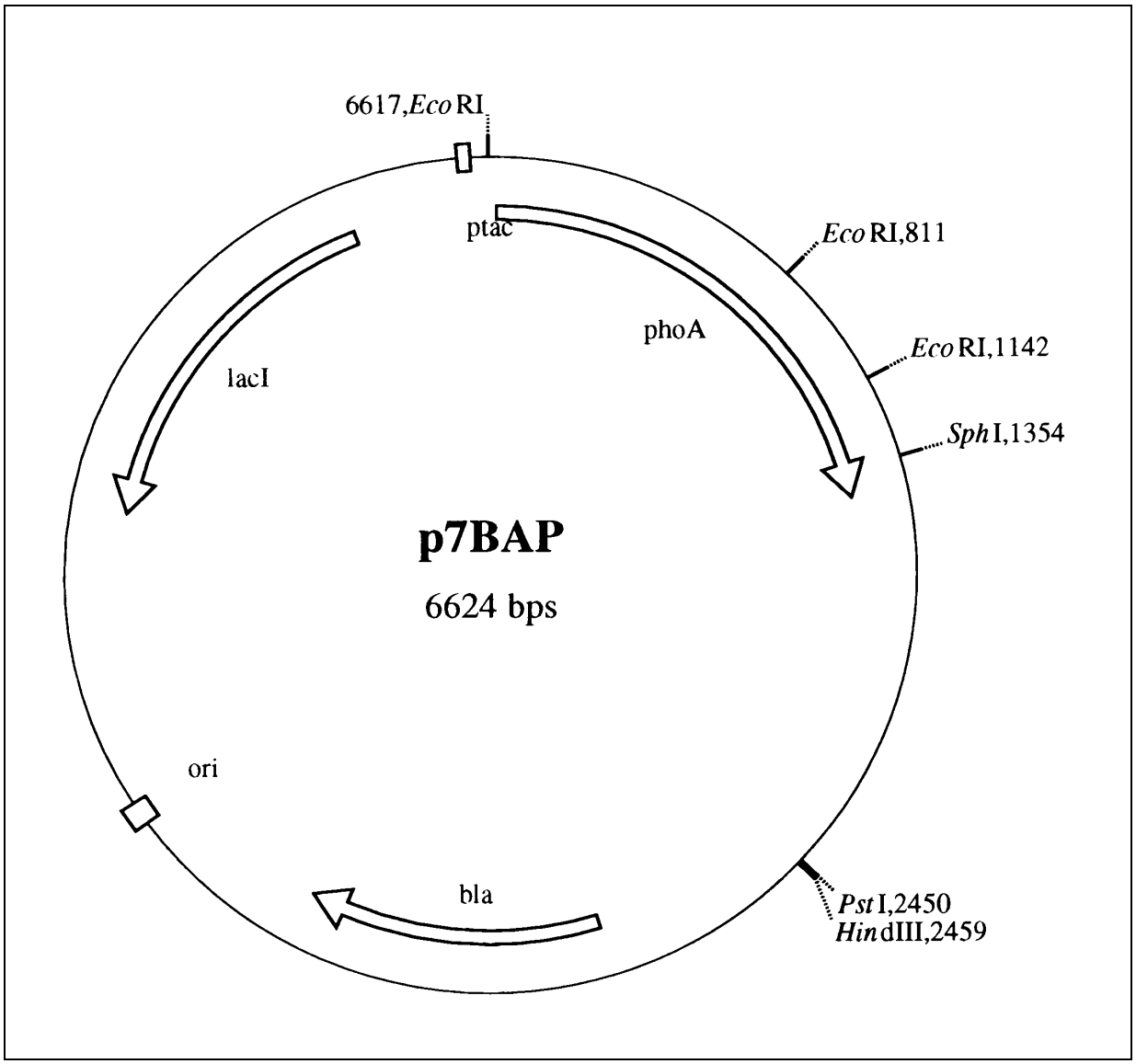
Die Aminosäuresequenz des Signalpeptides ist unterstrichen. Das erste Codon der Gensequenz codiert für Methionin anstelle von Valin.

```
                    T  B   B        M               M         DSHN
                    s  s   s        a               a         scpc
                    p  p   r        e               e         arai
                    A  C   1        3               3         VF21
                                                               > <
            .         .         .         .         .         .         .         .         .
  1 GTGAAACAAAGCACTATTGCACTGGCACTCTTACCGTTACTGTTTACCCCTGTGACAAAAGCCCGGACACCAGAAATGCCTGTTCTGGAA
    CACTTTGTTTCGTGATAACGTGACCGTGAGAATGGCAATGACAAATGGGGACACTGTTTTCGGGCCTGTGGTCTTTACGGACAAGACCTT
    MetLysGlnSerThrIleAlaLeuAlaLeuLeuProLeuLeuPheThrProValThrLysAlaArgThrProGluMetProValLeuGlu

          *                                 *                *
      DHNS BF  D                  DSHN      BBBH  B  M       BS       HAF          HT    D
      spcc cn  d                  scpc      scsg  s  s       ca       pcn          if    d
      aair gu  e                  arai      pgpi  i  e       lu       hiu          ni    e
      V21F 14  1                  VF21      W11A  Y  1       13       1I4          f1    1
         <                         > <      >  <              <                     <
            .         .         .         .         .         .         .         .         .
 91 AACCGGGCTGCTCAGGGCGATATTACTGCACCCGGCGGTGCTCGCCGTTTAACGGGTGATCAGACTGCCGCTCTGCGTGATTCTCTTAGC
    TTGGCCCGACGAGTCCCGCTATAATGACGTGGGCCGCCACGAGCGGCAAATTGCCCACTAGTCTGACGGCGAGACGCACTAAGAGAATCG
    AsnArgAlaAlaGlnGlyAspIleThrAlaProGlyGlyAlaArgArgLeuThrGlyAspGlnThrAlaAlaLeuArgAspSerLeuSer

                  *  *
                  B  S                         P     H    F         AF   MB          F   B
                  p  s                         l     i    o         cn   as          a   s
                  M  p                         e     n    k         iu   ea          u   p
                  1  1                         1     f    1         I4   2A          1   W

            .         .         .         .         .         .         .         .         .
181 GATAAACCTGCAAAAAATATTATTTTGCTGATTGGCGATGGGATGGGGGACTCGGAAATTACTGCCGCACGTAATTATGCCGAAGGTGCG
    CTATTTGGACGTTTTTTATAATAAAACGACTAACCGCTACCCTACCCCCTGAGCCTTTAATGACGGCGTGCATTAATACGGCTTCCACGC
    AspLysProAlaLysAsnIleIleLeuLeuIleGlyAspGlyMetGlyAspSerGluIleThrAlaAlaArgAsnTyrAlaGluGlyAla

               *
       F       MAS                A B    DHBN                 H H            CH       H
       n       shf                c s    spsc                 i h            fp       p
       u       eaa                i i    aapi                 n a            1a       a
       4       13N                I Y    V2W1                 P 1            02       2
                 <                           <
            .         .         .         .         .         .         .         .         .
271 GGCGGCTTTTTTAAAGGTATAGATGCCTTACCGCTTACCGGGCAATACACTCACTATGCGCTGAATAAAAAAACCGGCAAACCGGACTAC
    CCGCCGAAAAAATTTCCATATCTACGGAATGGCGAATGGCCCGTTATGTGAGTGATACGCGACTTATTTTTTTGGCCGTTTGGCCTGATG
    GlyGlyPhePheLysGlyIleAspAlaLeuProLeuThrGlyGlnTyrThrHisTyrAlaLeuAsnLysLysThrGlyLysProAspTyr

                                  *       *                     *
    BMP    H      F    BB   SABEDBBS   H ACH                   BHHHH B  A  T     H         S
    bal    i      n    ss   fcscscsc   i gfp                   sihih s  c  a     g         a
    vee    n      u    pp   aipRagtr   n e1a                   snana p  y  q     a         u
    131    f      4    CW   NIC2V1NF   2 102                   HP1P1 W  1  1     1         3
     <<                 <   > <>   <      <<                    < <
            .         .         .         .         .         .         .         .         .
361 GTCACCGACTCGGCTGCATCAGCAACCGCCTGGTCAACCGGTGTCAAAACCTATAACGGCGCGCTGGGCGTCGATATTCACGAAAAAGAT
    CAGTGGCTGAGCCGACGTAGTCGTTGGCGGACCAGTTGGCCACAGTTTTGGATATTGCCGCGCGACCCGCAGCTATAAGTGCTTTTTCTA
    ValThrAspSerAlaAlaSerAlaThrAlaTrpSerThrGlyValLysThrTyrAsnGlyAlaLeuGlyValAspIleHisGluLysAsp

                        *                     *
            HT          B   B  ABF      B   M ACHM   M       A    S        B         ABNFFB
            if          p   s  csn      s   r gfpa   a       c    f        b         cssons
            ni          M   p  ipu      p   c e1ae   e       i    a        v         ippkup
            f1          1   C  IW4      W   1 1023   2       I    N        1         IWB14W
             <                  <<             <<                                    <>
            .         .         .         .         .         .         .         .         .
451 CACCCAACGATTCTGGAAATGGCAAAAGCCGCAGGTCTGGCGACCGGTAACGTTTCTACCGCAGAGTTGCAGGATGCCACGCCCGCTGCG
    GTGGGTTGCTAAGACCTTTACCGTTTTCGGCGTCCAGACCGCTGGCCATTGCAAAGATGGCGTCTCAACGTCCTACGGTGCGGGCGACGC
    HisProThrIleLeuGluMetAlaLysAlaAlaGlyLeuAlaThrGlyAsnValSerThrAlaGluLeuGlnAspAlaThrProAlaAla
```

```
                                 *
            A  MNN      HTH  BM     RAA     H HT  BT           DHNSM
            f  als      ihh  sn     ssv     i hh  ss           spcca
            l  eap      naa  pl     rua     n aa  rp           aaire
            3  33H      P11  C1     212     P 11  1A           V21F3
                <        <         > <        <   <              <
          .         .         .         .         .         .         .         .         .
541 CTGGTGGCACATGTGACCTCGCGCAAATGCTACGGTCCGAGCGCGACCAGTGAAAAATGTCCGGGTAACGCTCTGGAAAAAGGCGGAAAA
    GACCACCGTGTACACTGGAGCGCGTTTACGATGCCAGGCTCGCGCTGGTCACTTTTTACAGGCCCATTGCGAGACCTTTTTCCGCCTTTT
    LeuValAlaHisValThrSerArgLysCysTyrGlyProSerAlaThrSerGluLysCysProGlyAsnAlaLeuGluLysGlyGlyLys

      *                         *
 S TCB   B       NAF   M     B B      MM           F BF H H                 B     AB N
 a alb   i       sln   s     s s      aa           n sn i h                 s     cs s
 u qav   n       puu   e     i p      ee           u pu n a                 p     ip p
 3 111   1       B14   1     1 C      23           4 C4 P 1                 W     IC B
   >             >                                                                 <
          .         .         .         .         .         .         .         .         .
631 GGATCGATTACCGAACAGCTGCTTAACGCTCGTGCCGACGTTACGCTTGGCGGCGGCGCAAAAACCTTTGCTGAAACGGCAACCGCTGGT
    CCTAGCTAATGGCTTGTCGACGAATTGCGAGCACGGCTGCAATGCGAACCGCCGCCGCGTTTTTGGAAACGACTTTGCCGTTGGCGACCA
    GlySerIleThrGluGlnLeuLeuAsnAlaArgAlaAspValThrLeuGlyGlyGlyAlaLysThrPheAlaGluThrAlaThrAlaGly

                                                                                 *
     B            F             B  H HT         BS           FH   T    AE M  M
     b            n             s  i hh         bf           np   s    pc n  a
     v            u             p  n aa         va           uh   p    oR l  e
     1            4             C  P 11         1N           41   A    I1 1  3
                                       <          <            <         <
          .         .         .         .         .         .         .         .         .
721 GAATGGCAGGGAAAAACGCTGCGTGAACAGGCACAGGCGCGTGGTTATCAGTTGGTGAGCGATGCTGCCTCACTGAATTCGGTGACGGAA
    CTTACCGTCCCTTTTTGCGACGCACTTGTCCGTGTCCGCGCACCAATAGTCAACCACTCGCTACGACGGAGTGACTTAAGCCACTGCCTT
    GluTrpGlnGlyLysThrLeuArgGluGlnAlaGlnAlaArgGlyTyrGlnLeuValSerAspAlaAlaSerLeuAsnSerValThrGlu

                                                          *                      *
   HT           B        H                     BTB  HHBB   M  AA          M CRSDN  N
   if           s        a                     sss  ihss   a  sv          a ssesc  l
   ni           i        e                     rpp  natp   e  ua          e pacao  a
   f1           Y        3                     1AC  P1XC   1  12          2 61I11  3
    <                                           <    >        <              > <
          .         .         .         .         .         .         .         .         .
811 GCGAATCAGCAAAAACCCCTGCTTGGCCTGTTTGCTGACGGCAATATGCCAGTGCGCTGGCTAGGACCGAAAGCAACGTACCATGGCAAT
    CGCTTAGTCGTTTTTGGGGACGAACCGGACAAACGACTGCCGTTATACGGTCACGCGACCGATCCTGGCTTTCGTTGCATGGTACCGTTA
    AlaAsnGlnGlnLysProLeuLeuGlyLeuPheAlaAspGlyAsnMetProValArgTrpLeuGlyProLysAlaThrTyrHisGlyAsn

  *
  CT     HA    M  F    CR        AB    M       T    CR    SDEBS H H
  la     pc    a  a    ss        cs    a       s    ss    escsc i h
  aq     hi    e  u    pa        ip    e       p    pa    caRtr n a
  11     1I    3  1    61        IW    2       A    61    IV2NF P 1
   <                               <                      > < <
          .         .         .         .         .         .         .         .         .
901 ATCGATAAGCCCGCAGTCACCTGTACGCCAAATCCGCAACGTAATGACAGTGTACCAACCCTGGCGCAGATGACCGACAAAGCCATTGAA
    TAGCTATTCGGGCGTCAGTGGACATGCGGTTTAGGCGTTGCATTACTGTCACATGGTTGGGACCGCGTCTACTGGCTGTTTCGGTAACTT
    IleAspLysProAlaValThrCysThrProAsnProGlnArgAsnAspSerValProThrLeuAlaGlnMetThrAspLysAlaIleGlu

                                                          *                   *
                                                          CTH B     S      NBFR HT
                                                          lag b     a      linl if
                                                          aqa v     u      anue ni
                                                          111 1     3      314A f1
                                                           <                  <<  <
          .         .         .         .         .         .         .         .         .
991 TTGTTGAGTAAAAATGAGAAAGGCTTTTTCCTGCAAGTTGAAGGTGCGTCAATCGATAAACAGGATCATGCTGCGAATCCTTGTGGGCAA
    AACAACTCATTTTTACTCTTTCCGAAAAAGGACGTTCAACTTCCACGCAGTTAGCTATTTGTCCTAGTACGACGCTTAGGAACACCCGTT
    LeuLeuSerLysAsnGluLysGlyPhePheLeuGlnValGluGlyAlaSerIleAspLysGlnAspHisAlaAlaAsnProCysGlyGln

  *                                         *
 BE        M  TS    T         BCR       H HH  AE     M          M          H     M   A
 sp        r  aa    a         sss       i ha  pc     n          a          p     a   c
 m3        c  qu    q         ipa       n ae  oR     l          e          h     e   i
 A1        1  13    1         Y61       P 12  I1     1          3          1     3   I
  <                                               <
          .         .         .         .         .         .         .         .         .
1081 ATTGGCGAGACGGTCGATCTCGATGAAGCCGTACAACGGGCGCTGGAATTCGCTAAAAAGGAGGGTAACACGCTGGTCATAGTCACCGCT
     TAACCGCTCTGCCAGCTAGAGCTACTTCGGCATGTTGCCCGCGACCTTAAGCGATTTTTCCTCCCATTGTGCGACCAGTATCAGTGGCGA
     IleGlyGluThrValAspLeuAspGluAlaValGlnArgAlaLeuGluPheAlaLysLysGluGlyAsnThrLeuValIleValThrAla
```

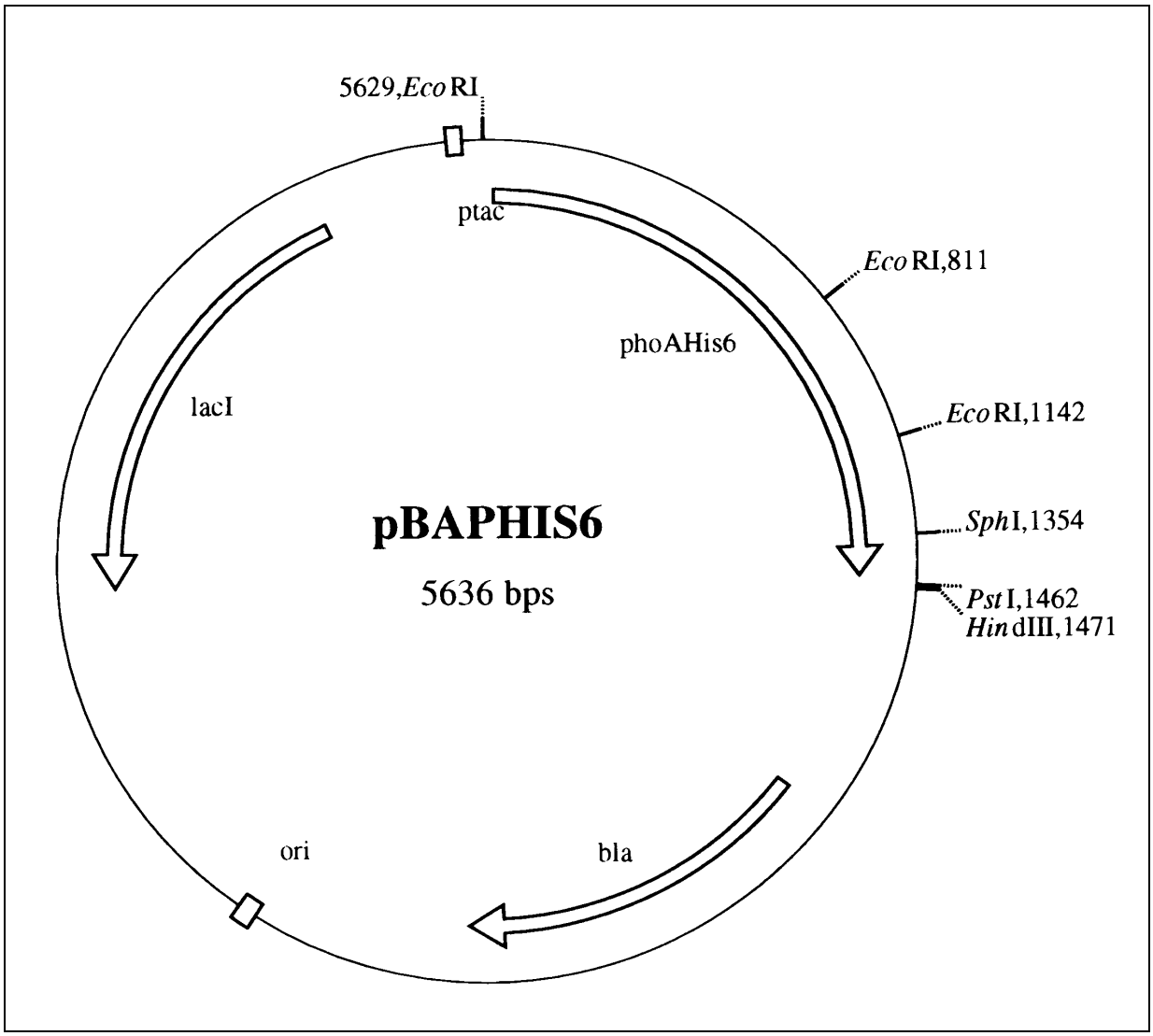
```
                                                                *
     S         B                 H HH           AHDHNA H B  EDEBS HMHH              H HT
     a         s                 i hp           lpspcs a s  cscsc inha              i hs
     u         p                 n aa           uhaaiu e i  NaRtr nlae              n ap
     3         C                 P 12           11V211 3 Y  1V2NF P112              P 1A
                                                  >           < <  <                   <
              .         .         .         .         .         .         .         .         .
1171 GATCACGCCCACGCCAGCCAGATTGTTGCGCCGGATACCAAAGCTCCGGGCCTCACCCAGGCGCTAAATACCAAAGATGGCGCAGTGATG
     CTAGTGCGGGTGCGGTCGGTCTAACAACGCGGCCTATGGTTTCGAGGCCCGGAGTGGGTCCGCGATTTATGGTTTCTACCGCGTCACTAC
     AspHisAlaHisAlaSerGlnIleValAlaProAspThrLysAlaProGlyLeuThrGlnAlaLeuAsnThrLysAspGlyAlaValMet

                      *
            M         EM         HT    M        CH                   F       AHA     NAFF
            a         an         if    b        fp                   n       sac     lcan
            e         rl         ni    o        1a                   u       uei     aiuu
            3         11         f1    2        02                   4       13I     3I14
                       <          <                                                  >  <
              .         .         .         .         .         .         .         .         .
1261 GTGATGAGTTACGGGAACTCCGAAGAGGATTCACAAGAACATACCGGCAGTCAGTTGCGTATTGCGGCGTATGGCCCGCATGCCGCCAAT
     CACTACTCAATGCCCTTGAGGCTTCTCCTAAGTGTTCTTGTATGGCCGTCAGTCAACGCATAACGCCGCATACCGGGCGTACGGCGGTTA
     ValMetSerTyrGlyAsnSerGluGluAspSerGlnGluHisThrGlySerGlnLeuArgIleAlaAlaTyrGlyProHisAlaAlaAsn

                                      *
                          M  S        E       N   AFB              H
                          b  a        a       l   cns              p
                          o  u        r       a   iui              h
                          2  3        1       3   I4Y              1

              .         .         .         .         .         .         .         .
1351 GTTGTTGGACTGACCGACCAGACCGATCTCTTCTACACCATGAAAGCCGCTCTGGGGCTGAAACACCACCATCACCATCAC
     CAACAACCTGACTGGCTGGTCTGGCTAGAGAAGATGTGGTACTTTCGGCGAGACCCCGACTTTGTGGTGGTAGTGGTAGTG
     ValValGlyLeuThrAspGlnThrAspLeuPheTyrThrMetLysAlaAlaLeuGlyLeuLysHisHisHisHisHisHis
```

12.2 Expressionsvektor p7BAP



ptac: *tac*-Promotor
bla: β-Lactamase-Gen
ori: Replikationsursprung
lacI: *lac*-Repressorgen

12.3 Expressionsvektor pBAPHIS6



ptac: *tac*-Promotor
bla: β-Lactamase-Gen
ori: Replikationsursprung
lacI: *lac*-Repressorgen

12.4 Gefahrenmerkmale von verwendeten Gefahrstoffen und Sicherheitsratschläge

Substanz	Gefahrensymbol	R- und S-Sätze
Acetonitril	F, T	R 11-23/24/25 S 16-27-45
Acetylchlorid	F, C	R 11-14-34 S 9-16-26-45
Acrylamid	T	R 45-46-24/25-48/23/24/25 S 53-45
Ammoniaklösung 32%	C, N	R 34-50 S 26-36/37/39-45-61
Ammoniumperoxodisulfat	O, Xn	R 8-22-42/43 S 17-22-24-37-43.8
Anisol	-	R 10 S 16-24
Bicinchoninsäure	Xn	R 36/37-42 S 22-26-36
Blausäure	F^+, T^+	R 12-26 S (1/2)-7/9-16-36/37-38-45
Blei(IV)oxid	T	R 61-62-E20/22-33 S 53-45
Bromessigsäure	T, C	R 23/24/25-35 S 36/37/39-45
n-Butanol	Xn	R 10-20 S 16
Chloressigsäure Natriumsalz	T	R 25-38 S 22-37-45
Chloroform	Xn	R 22-38-40-48/20/22 S 36/37
2,4,6-Collidin	Xn	R 10-22-36/38 S 23.2
1,6-Diaminohexan	C	R 21/22-34-37 S 22-26-36/37/39-45
Dichloressigsäure	C	R 35 S 26-45
3-Dichlormethylbenzoesäurechlorid	C	R 34-36/37 S 26-27-28-36/37/39
Dichlormethan	Xn	R 40 S 23.2-24/25-36-37
N,N´-Dicyclohexylcarbodiimid	T	R 22-24-41-43 S 24/26-37/39-45
Diethanolamin	Xi	R 36/38 S 26
Diethylether	F^+	R 12-19 S 9-16-29-33
N,N-Diisopropylethylamin	F, Xi	R 11-36/38

Substanz	Gefahrensymbol	R- und S-Sätze
N,N-Dimethylformamid	T	R 61-E20/21-36 S 53-45
Essigsäure	C	R 10-35 S 23.2-26-45
Ethanol	F	R 11 S 7-16
Ethidiumbromid	T^+	R 22-26-36/37/38-40 S 26-28.2-36/37-45
Ethylacetat	F	R 11 S 16-23.2-29-33
Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz	Xn	R 22
4-Ethylmorpholin	Xn	R 10-20/22
Formamid	T	R 61 S 53-24/25-37-45
Glutardialdehydlösung 25%	C	R 20/22-34-42/43 S 26-36/37/39-45
Guanidinhydrochlorid	Xn	R 22-36/38 S 22
n-Hexan	F, Xn	R 11-48/20 S 9-16-24/25-51
8-Hydroxychinolin	Xn	R 22
3-Hydroxypicolinsäure	-	R 36/37/38 S 26-37/39
Imidazol	C	R 22-34 S 22-26-36/37/39-45
Isoamylalkohol	Xn	R 10-20 S 24/25
2-Mercaptoethanol	T, N	R 22-23/24-34-51/53 S 26-36/37/39-45-61
Methanol	F, T	R 11-23/25 S 7-16-24-45
Natriumcarbonat	Xi	R 36 S 22-26
Natriumdodecylsulfat	Xn	R 22-36/38
Natriumhydroxid	C	R 35 S 26-37/39-45
Nickel(II)chlorid	T	R 25-43 S 24-37-45
Ninhydrin	Xn	R 22-36/37/38
Phenol	T	R 24/25-35 S 28.6-45
2-Propanol	F	R 11 S 7-16

Substanz	Gefahrensymbol	R- und S-Sätze
Pyridin	F, Xn	R 11-20/21/22 S 26-28.1
Salzsäure 32%	C	R 34-37 S 26-36/37/39-45
Silbernitrat	C	R 34 S 26-45
Schwefelsäure 96%	C	R 35 S 26-30-45
N,N,N´,N´-Tetramethylethylendiamin	F, Xn	R 11-20/22-37/38-41 S 16-26-39
Toluol	F, Xn	R 11 S 16-25-29-33
Triethylamin	F, C	R 11-20/21/22-35 S 3-16-26-29-36/37/39-45
Tris-(hydroxymethyl)aminomethan	Xi	R 36/38
Triton-X100	Xn	R 22-41 S 24-26-39
Zinkchlorid	C	R 34 S 7/8-28.1-45

Danksagung

Ich bedanke mich bei den Mitgliedern des Arbeitskreises für die hilfreiche Unterstützung meiner Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Carsten Siegert für die freundschaftliche Zusammenarbeit. Ich danke den Herren Dr. Dirk van den Boom und Dr. Christian Jurinke für ihre unermüdlichen und zahllosen MALDI-TOF MS-Messungen, Frau Beata Szalay und Frau Claudia Pauk für ihre tatkräftige Hilfe bei allen möglichen größeren und kleineren Problemen und Herrn Dr. Andreas Ruppert für seine Unterstützung während des molekularbiologischen Abschnitts meiner Arbeit. Ein extra Dankeschön ferner an Herrn Dr. Detlev Hochmuth sowie an Frau Nikola Rogmann.

Ich danke vor allem auch meiner Familie, deren Unterstützung diese Arbeit erst möglich gemacht hat.