

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 retritiliert 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 periplasmic 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 determined 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 retriylated 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 normally 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.