

**Modifizierung
von Silizium-Oberflächen
zur Immobilisierung
von Biomolekülen**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
im Fachbereich Chemie der Universität Hamburg

vorgelegt von

Ute Haker

aus Berlin

Hamburg 2000

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juli 1996 bis Dezember 1999 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Hubert Köster im Institut für Organische Chemie, Abteilung für Biochemie und Molekularbiologie, am Fachbereich Chemie der Universität Hamburg angefertigt.

Erster Gutachter: Prof. Dr. H. Köster

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. J. Voß

Tag der letzten mündlichen Prüfung: 17. Mai 2000

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
2 Problemstellung	7
3 Silizium-Wafer	9
3.1 Funktionalisierung der Silizium-Oberfläche	9
3.2 Bestimmung der Beladungsdichte	10
3.3 Konzepte zur Erhöhung der Beladungsdichte	13
4 Organisch-chemische Synthesen	17
4.1 Synthese eines trifunktionellen Linkers	17
4.2 Synthese eines dendritischen Amidit-Synthons	18
4.3 Synthese eines Spacers	21
5 Aufbau dendritischer Strukturen auf Silizium-Oberflächen	23
5.1 Konvergenter Ansatz: Kondensation von Polylysin.....	23
5.2 Divergenter Ansatz: Stufenweiser Aufbau dendritischer Strukturen	26
5.3 Vergleich der Beladungsdichten.....	32
6 Immobilisierung von Oligonucleotiden an Silizium-Wafer	35
6.1 Immobilisierung von Oligonucleotiden an modifizierte Silizium-Wafer	37
6.2 Einsatz der Oligonucleotid-Wafer in enzymatischen Reaktionen.....	40
7 Alkalische Phosphatase	59
7.1 Eigenschaften und Bedeutung der Alkalischen Phosphatase	59
7.2 Expression und Isolierung der Alkalischen Phosphatase	63
7.2.1 Quantifizierung der Alkalischen Phosphatase.....	65
7.2.2 Bestimmung der spezifischen Aktivität der Alkalischen Phosphatase	65
7.2.3 Charakterisierung der rekombinanten Alkalischen Phosphatase mittels MALDI-TOF MS	66
7.3 Immobilisierung der Alkalischen Phosphatase an Silizium-Wafer.....	68
7.3.1 Quantifizierung immobilisierter Alkalischer Phosphatase.....	72
7.3.2 Bestimmung der spezifischen Aktivität immobilisierter Alkalischer Phosphatase.....	73
7.3.3 Abhängigkeit der Aktivität der Enzym-Wafer von der zur Immobilisierung angebotenen Enzymmenge	74
7.3.4 Enzymkinetische Untersuchungen der Enzym-Wafer	75
7.3.5 Versuch zum Blockieren potentieller Bindungsstellen durch Lysin	78
7.3.6 Experimente zur Aufklärung der Anbindung der Alkalischen Phosphatase	80
7.3.7 Untersuchung der Enzym-Wafer mittels MALDI-TOF MS	80
7.4 Einsatz der Enzym-Wafer in DNA-Rekombinationstechniken.....	82
7.4.1 Dephosphorylierung von DNA.....	85

8 Diskussion	93
9 Zusammenfassung	101
10 Summary	103
11 Experimenteller Teil	105
11.1 Allgemeine Hinweise	105
11.1.1 Chemikalien.....	105
11.1.2 Geräte und Methoden	106
11.2 Organisch-chemische Synthesen.....	109
11.2.1 3,5-Dicarbomethoxyphenoxyessigsäure 1	109
11.2.2 3,5-Dicarbomethoxyphenoxyessigsäure-p-nitrophenylester 2	109
11.2.3 Tris-2,2,2-[(cyanoethoxy)methyl]ethanol 3	110
11.2.4 Tris-2,2,2-[(methoxycarbonyl)ethoxy]methyl}ethanol 4	111
11.2.5 Tert-butyl dimethylsilyl-tris-2,2,2-[(methoxycarbonyl)ethoxy]-methyl}-ethanol 5 ..	112
11.2.6 Tert-butyl dimethylsilyl-[tris-2,2,2-(5-oxy-2-oxa-pentyl)ethanol] 6	112
11.2.7 Tert-butyl dimethylsilyl-{tris-2,2,2-[3-(4,4'-dimethoxytrityloxy)propyloxy	
methyl]ethanol} 7	113
11.2.8 Tris-2,2,2-[3-(4,4'-dimethoxytrityloxy)propyloxymethyl]ethanol 8	114
11.2.9 Tris-2,2,2-[3-(4,4'-dimethoxytrityloxy)propyloxymethyl]ethyl-N,N-diiso-	
propylaminocyan-ethoxyphosphoramidit 9	115
11.2.10 Pyridinium-4-O-(4,4'-dimethoxytrityl)butyrat 10	116
11.2.11 Darstellung von p-Nitrophenyl-4-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-butyrat 11	116
11.2.12 Darstellung von t-Butyl-p-nitrophenylcarbonat 12	117
11.2.13 Umsetzung von Poly-D,L-lysin mit t-Butyl-p-nitrophenylcarbonat.....	118
11.3 Silizium-Wafer.....	119
11.3.1 Funktionalisierung der Silizium-Oberfläche	119
11.3.2 Quantifizierung der Beladungsdichte	119
11.3.3 Aktivierung aminofunktionalisierter Silizium-Wafer mit DITC	123
11.3.4 Kopplung von tBoc geschütztem p-Nitrophenyl aktiviertem Polylysin 13 an	
aminofunktionalisierte Silizium-Wafer	123
11.3.5 Umsetzung DITC-aktivierter Silizium-Wafer mit Polylysin.....	124
11.3.6 Kopplung von 3,5-Dicarbomethoxyphenoxyessigsäure-p-nitrophenylester 2 an die	
Silizium-Oberfläche.....	124
11.3.7 Aminolyse der an die Silizium-Oberfläche gekoppelten 3,5-Dicarbomethoxy-	
phenoxyessigsäure	124
11.3.8 Kopplung von Tris-2,2,2-[3-(4,4'-dimethoxytrityloxy)propyloxymethyl]ethyl-N,N-	
diisopropylaminocyan-ethoxyphosphoamidit 9 an die Silizium-Oberfläche	124
11.3.9 Kopplung von p-Nitrophenyl 4-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-butyrat 11 an die Silizium-	
Oberfläche	125
11.3.10 Kopplung des 5'-Amino-Modifiers 3-(Trifluoracetyl-amino)propyl-(-2-cyano-	
ethyl)-(N,N-diisopropyl)-phosphoamidit 14 an die Silizium-Oberfläche.....	125
11.3.11 Dedimethoxytritylierung geschützter modifizierter Silizium-Oberflächen.....	125
11.3.12 Immobilisierung von Oligonucleotiden an aminofunktionalisierte Silizium-Wafer	
11.4 PROBE-Reaktion mit Oligonucleotid-Wafer	127
11.4.1 Reinigung der Reaktionsansätze mit Hilfe von ZipTip™	128
11.4.2 Reinigung der Überstände der PROBE-Reaktion an fester Phase durch	
Ethanol fällung	128
11.4.3 Analyse der Reaktionsprodukte mittels MALDI-TOF MS	129

11.5 Expression, Reinigung und Analyse der Alkalischen Phosphatase BAPHis6	130
11.5.1 Nährmedien	130
11.5.2 Übernachtkulturen	130
11.5.3 Induktion.....	131
11.5.4 Zellaufschluß	131
11.5.5 Metallchelate-Affinitätschromatographie	131
11.5.6 Ultrafiltration.....	132
11.5.7 Präparation von Proteinproben für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	133
11.5.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	133
11.5.9 Native Polyacrylamidgelelektrophorese.....	134
11.5.10 Quantifizierung der Proteinmenge	135
11.5.11 Bestimmung der enzymatischen Aktivität.....	135
11.6 Immobilisierung der Alkalischen Phosphatase an Silizium-Wafer.....	137
11.6.1 Farbreaktion zum Nachweis enzymatischer Aktivität an der Silizium-Oberfläche	137
11.6.2 Bestimmung der enzymatischen Aktivität immobilisierter Alkalischer Phosphatase.	138
11.6.3 Quantifizierung der immobilisierten Proteinmenge	138
11.6.4 Experiment zur Enzymsättigung	138
11.6.5 Vergleichende enzymkinetische Untersuchungen.....	139
11.7 Rekombinationsexperimente unter Verwendung von an Silizium-Wafer immobilisierter Alkalischer Phosphatase	140
11.7.1 Agarose-Gelelektrophorese	140
11.7.2 Dephosphorylierung	141
11.7.3 Reinigung von DNA nach der Glasmilch-Methode	141
11.7.4 Ethanol-fällung	142
11.7.5 Ligation	142
11.7.6 Bakterientransformation.....	143
11.7.7 Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA.....	144
11.7.8 Restriktionskartierung	144
12 Anhang	147
12.1 Expressionsvektor pBAPHIS6	147
12.2 Gefahrstoffanhang	148
12.2.1 Liste der verwendeten Gefahrstoffe	148
12.2.2 Entsorgungshinweise.....	149
13 Literaturverzeichnis	151

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ACN	Acetonitril
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
AU	<i>absorption units</i>
BAP	Bakterielle Alkalische Phosphatase
BCA	<i>bicinchoninic acid</i> (Bicinchoninsäure)
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
bp	Basenpaar(e)
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
C	Cytosin
CIP	<i>calf intestine Phosphatase</i>
CPG	<i>controlled pore glass</i> (Glas mit bestimmter Porengröße)
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
DCA	<i>dichloroacetic acid</i> (Dichloressigsäure)
DCC	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid
DITC	1,4-Phenylendiisothiocyanat
dCTP	Desoxycytidin-5'-triphosphat
ddNTP	Didesoxyribonucleosid-5'-triphosphat
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DMF	Dimethylformamid
DMT	Bis(4-Methoxyphenyl)phenylmethyl-, (4,4'-Dimethoxytrityl-)
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonucleinsäure)
dNTP	Desoxyribonucleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat
E_{λ}	Extinktion bei der Wellenlänge λ
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Et_3N	Triethylamin
FDNP	2,4-Dinitrofluorbenzol
g	Gramm
G	Guanin
3-HPA	3-Hydroxypicolinsäure
h	Stunde(n)
IMAC	<i>immobilized metal ion affinity chromatography</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
Kat	Katal
keV	Kiloelektronenvolt
LCA	<i>long chain alkylamine</i>

MALDI	<i>matrix assisted laser desorption/ionisation</i>
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
MPG	<i>magnetic porous glass</i>
MS	Massenspektrometrie
μTAS	<i>micro total analysis system</i>
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NTA	<i>nitrilotriacetic acid</i> (Nitrilotriessigsäure)
Oligo	Desoxyoligoribonucleotid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
pNPP	p-Nitrophenylphosphat
PROBE	<i>primer oligo base extension</i>
R _f -Wert	<i>ratio of fronts</i> (Retentionsfaktor)
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SBH	<i>sequencing by hybridization</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDTB	N-Succinimidyl-4-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-butyrat
t	Zeit
T	Thymin
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TEAAc	Tetraethylammoniumacetat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TNBS	Trinitrobenzolsulfonsäure
TOF	<i>time-of-flight</i> (Flugzeitanalysator)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
u	<i>unit</i>
UV	Ultraviolett
X-Gal	(5-Brom-4-chlor-3-indolyl)-β-D-galactosid

1 Einleitung

Das Human-Genom-Projekt (*human genome organization*, HUGO)^[1,2] und verwandte öffentliche und private Forschungsprojekte haben sich die Bestimmung der Sequenz des humanen Genoms und der Genome medizinisch und ökonomisch relevanter Organismen zum Ziel gesetzt. Diese Bestrebungen sind durch die Möglichkeit der Identifizierung neuer Targets für therapeutische Eingriffe, neue diagnostische Marker für humane Krankheiten und die Entwicklung verbesserter Agrar- und Industrieprodukte motiviert. Die aufgeklärten Sequenzen werden in Datenbanken zusammengefaßt und bilden die Grundlage zukünftiger Bestrebungen, funktionelle Zusammenhänge herzustellen. Der Aufbau dieser Datenbanken bildet die Basis zur Beantwortung der Fragen nach der Verbindung zwischen Krankheiten und bestimmten Genabschnitten (Discovery), der Lokalisierung dieser Gene im Genom (Mapping), der Ausbreitung der Gene nach Translation in Proteine (Expression) und den Unterschieden zwischen den Genen verschiedener Organismen (Genetische Variation). Der Umfang der zu sequenzierenden DNA, sowie die zunehmende Bedeutung der diagnostischen DNA-Sequenzierung machen die Entwicklung schnellerer und effektiverer Analyseverfahren notwendig.

Für das Ziel der Miniaturisierung bekannter Prozesse und der damit ermöglichten schnelleren Analyse, der Senkung der Kosten, einfacheren Handhabbarkeit durch Automatisierung^[3] und hochgradigen Parallelisierung kommt den DNA-Arrays^[4] bzw. -Chips eine besondere Bedeutung zu.

Unter DNA-Arrays^[5] versteht man miniaturisierte Träger, auf deren Oberflächen DNA-Moleküle bekannter Sequenz in einem geordneten Raster immobilisiert oder synthetisiert sind. Diese Arrays können z.B. für einen Hybridisierungsassay und für Sequenzierung durch Hybridisierung (*sequencing by hybridization*, SBH)^[6-10] Verwendung finden. Die Grundidee des SBH ist die Tatsache, daß es 4^n mögliche Worte der Länge n (entspricht der Länge der Oligonucleotidsequenz) für ein Vier-Buchstaben-Alphabet (entspricht den vier möglichen Basen) gibt. Die Sequenzierung durch Hybridisierung erfordert daher z.B. die Untersuchung aller 65 536 Kombinationsmöglichkeiten für ein 8mer. Wird z.B. ein 12mer der Sequenz AGCCTAGCTGAA mit dem kompletten Satz aller möglichen Oktamere hybridisiert, so können fünf der Sonden, nämlich die Sequenzen TCGGATCG,

CGGATCGA, GGATCGAC, GATCGACT und ATCGACTT, perfekte Dublices ausbilden. Die Ausrichtung der überlappenden Sequenzen der Hybridisierungs-sonde ermöglichen die Rekonstruktion des der 12mer Target-DNA komplementären Stranges:

```

T C G G A T C G
  C G G A T C G A
    G G A T C G A C
      G A T C G A C T
        A T C G A C T T
        -----
T C G G A T C G A C T T

```

Zwei generelle Vorgehensweisen zur Sequenzierung von DNA durch Hybridisierung sind denkbar: In einem der Ansätze wird ein kompletter Satz der 4ⁿ Oligonucleotide der Länge n in einem geordneten Array an eine feste Oberfläche immobilisiert^[11-14]. Die unbekannte DNA-Sequenz wird an diesen Array hybridisiert. Bei optimaler Interpretation der Daten können aus dem Hybridisierungsmuster alle n-fachen Worte der Sequenz erhalten werden. Dies ist ausreichend, um kurze Sequenzen zu bestimmen. In dem zweiten Format wird an einen Array von immobilisierten DNA-Proben^[9,15] jeweils nur ein kurzes Oligonucleotid zur Zeit hybridisiert. Wird dies 4ⁿ mal für jedes Oligonucleotid der Länge n wiederholt, kann die Sequenz aller Proben bestimmt werden.

Während der erste Ansatz geeignet ist, eine kleine Anzahl von DNA-Fragmenten zu sequenzieren, ermöglicht die zweite Methode die Untersuchung einer großen Zahl von DNAs parallel auf kurze bestimmte Sequenzen hin. In beiden Vorgehensweisen liegt das Potential der Methode in der parallelen Analyse vieler Sequenzen begründet.

Grundlegende Anforderungen an einen geeigneten DNA-Array sind die kovalente Anbindung der Oligonucleotide an die Oberfläche, wobei die Oberfläche selbst den Hybridisierungsvorgang nicht beeinflussen darf. Sie darf keine signifikante Menge der Target-DNA unspezifisch binden und die Annäherung der Target-DNA an gebundene Oligonucleotide nicht sterisch oder elektrostatisch behindern.

Der klassische Weg zur kovalenten Anbindung von DNA auf die Oberfläche ist die post-synthetische Anbindung^[13,14,16-19]. Eine neuere Methode ermöglicht die *in situ* Synthese^[20-27] des gewünschten Oligonucleotids direkt auf dem Träger, der für die folgende Analyse eingesetzt wird. Für die *in situ* Synthese von DNA auf Oberflächen sind zwei Wege beschritten worden. Die erste Methode verwendet die Standard-

Phosphoramiditchemie zur Verknüpfung der 3'-Base mit dem Träger. Die zweite Methode kombiniert Festphasenchemie, photolabile Schutzgruppen und Photolithographie^[21,22,28,29]. Dieses in Abbildung 1-1 dargestellte Konzept sieht vor, daß oberflächengebundene Hydroxylgruppen durch eine photolabile Gruppe X geschützt sind.

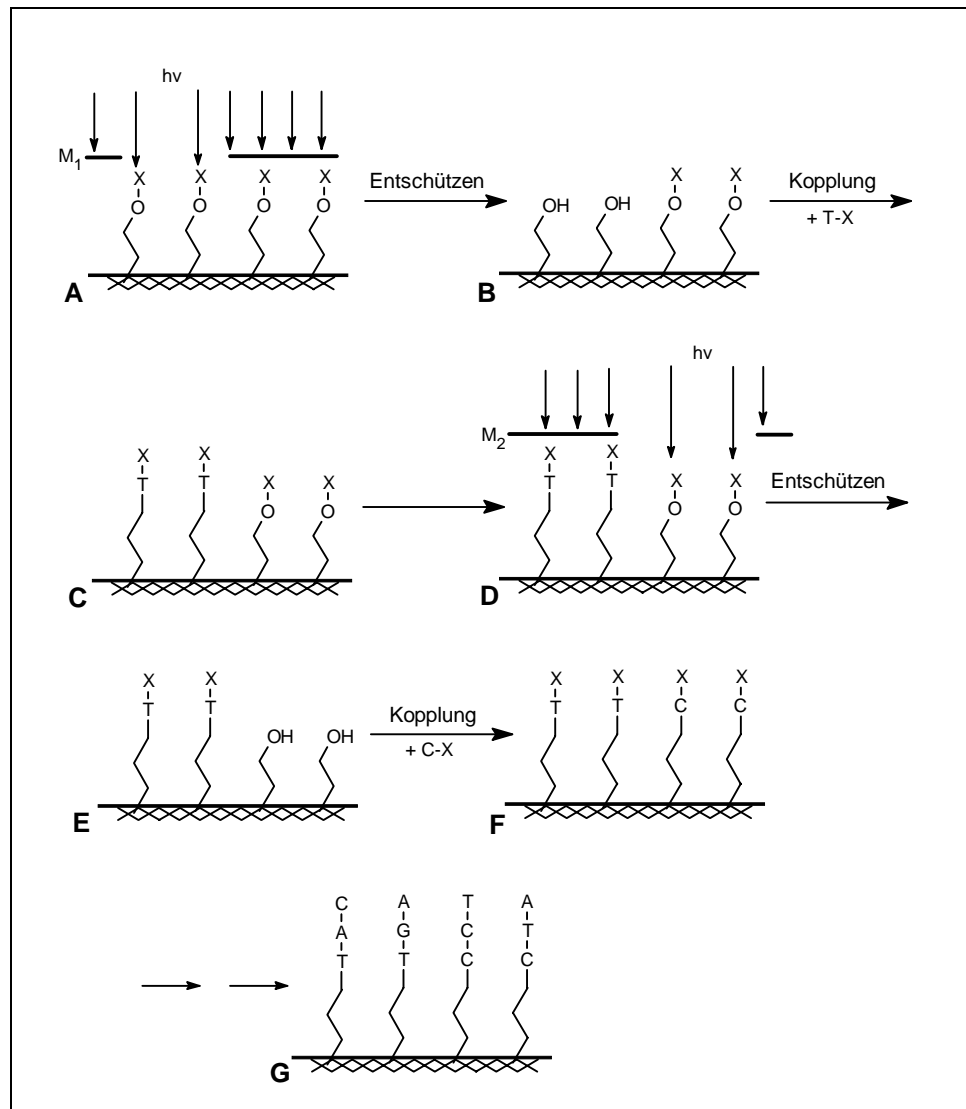


Abb. 1-1: Konzept der parallelen *in situ* Synthese an fester Phase unter Verwendung photolithographischer Masken

Wird nun ein definierter Bereich durch eine lithographische Maske M_1 mit Licht der Energie $h\nu$ bestrahlt, erfolgt die Entschützung (**A**). Die freien Hydroxylgruppen dieses Oberflächenausschnitts (**B**) sind dann für die Reagentien der Kopplungsreaktion zugänglich. Der erste Synthesebaustein T, der wiederum die photolabile Schutzgruppe X trägt, wird kovalent an den Träger gebunden (**C**). Eine weitere Maske M_2 (**D**) kann

anschließend zur Photoaktivierung eines anderen Bereiches verwendet werden. Das mehrfache Durchlaufen dieses Zyklus der Photoentschätzung und Kopplung verschiedener Synthesebausteine führt schließlich zu einem Satz von Produkten, deren Monomerabfolge an jeder Position des Trägers (**G**) bekannt ist.

Die ältere Methode bedient sich der automatisierten Festphasensynthese^[30,31] von Oligonucleotiden und nach der Abspaltung der Stränge vom Träger der spezifischen Immobilisierung über Print- oder Spottingtechnologien auf der Oberfläche eines Chips.

Auf geeignete Weise modifizierte DNA kann kovalent auf mit Aminosäuren funktionalisierte^[32-34], Carboxyl-^[35-37], Epoxid-^[17,38] oder Aminogruppen^[18,37,39,40] tragende Oberflächen gebunden werden.

Eine Reihe von Trägermaterialien wurden zur Immobilisierung von Oligonucleotiden für den Einsatz in diagnostischen DNA-Applikationen untersucht. Grundsätzlich lassen sich folgende Materialien, die als Träger Verwendung finden, unterscheiden:

- Nitrocellulose, Nylonmembrane^[35,40-42] und Filter
- definierte geometrische Teilchen, wie *controlled pore glass* (CPG)^[43-46]
- amorphe Materialien, wie Acrylamidgel^[47,48], Polystyrolmatrices^[39], Mikrotiterplatten^[33,34,39,49], Harze, TentaGel™, *magnetic beads*^[37,50]
- planare Oberflächen, wie Glas^[23,51-53], Goldbeschichtungen^[54] oder Silizium-Wafer^[17,38,55]

Die chemische Anbindung von Oligonucleotiden auf eine Oberfläche kann z.B. durch Kondensation am 3'- oder 5'-Ende aminomodifizierter Oligonucleotide an eine als Epoxid funktionalisierte Silizium-Oberfläche erfolgen. Dabei werden Beladungsdichten von 100 fmol DNA/mm² erreicht^[8].

Die vorgestellten Techniken besitzen Vor- und Nachteile. Während die photolithographisch gesteuerte Synthese zur Zeit die beste hinsichtlich Mustervariabilität ist, ist die Qualität der Oligonucleotide bei den anderen Verfahren besser. Hinzu kommt, daß diese Syntheseart nur eine Ausrichtung des Oligonucleotids, nämlich in 3'-5'-Richtung, erlaubt und damit enzymatische Verlängerungen am immobilisierten Strang unmöglich macht, da die DNA-Polymerase eine 5'-3'-Aktivität besitzt. Ein nachträgliches Aufbringen von DNA hingegen läßt eine Variation der Konzentration jedes Molekültyps auf dem Chip zu, wodurch Bindungs- und Hybridisierungsverhalten beeinflußt werden können; zusätzlich können chemische Modifikationen in die Moleküle eingeführt werden.

Die konventionelle Detektionstechnik für molekulare Bindungsassays ist die Autoradiographie, bei der molekulare Bestandteile mit Radioisotopen wie ^{32}P oder ^{35}S markiert^[39] werden. Ein ebenso etabliertes Verfahren ist die Auswertung von Hybridisierungsmustern durch den Nachweis von Fluoreszenzsignalen^[48,56,57] einer zuvor mit entsprechenden Farbstoffen markierten Sonde. Eine weitere nichtradioaktive Methode der Detektion von Nukleinsäuren bieten Enzyme-linked Assays^[58-60], bei denen z.B. mit Digoxigenin markierte Sonden^[61] eingesetzt werden, deren Nachweis indirekt durch die Bestimmung der enzymatischen Aktivität der entsprechenden Antikörperkonjugate der Alkalischen Phosphatase erfolgen kann.

Ein besonders vielversprechendes Verfahren zur Entwicklung von automatisierbaren, präzisen Detektionssystemen für die DNA-Diagnostik im Routinebetrieb stellt die matrix-unterstützte Laser-Desorptions/Ionisations-Flugzeit-Massenspektrometrie^[62] (MALDI-TOF MS) dar. Die Methode ermöglicht die Analyse einer Mischung von Biomolekülen innerhalb von sehr kurzer Zeit in einem Schritt und macht Gelelektrophorese und Markierung unnötig. Diese Vorteile lassen MALDI-TOF MS zu einer einfachen und schnellen Methode zur Analyse^[63,64], Sequenzierung^[65] und Diagnostik^[66,67] von DNA erscheinen. Die Kombination eines Arrays mit immobilisierten DNA-Sonden und der Analyse mittels MALDI-TOF MS ermöglicht die Gewinnung einer großen Zahl von Sequenzdaten innerhalb kürzester Zeit.

Die DNA-Chip-Technologie eröffnet viele Einsatzmöglichkeiten auf unterschiedlichen Gebieten. So kann sie in der Landwirtschaft bei der Züchtung von Pflanzen und Tieren, zur Optimierung von Pestiziden, bei der Qualitätskontrolle von Lebensmitteln, zum Hochdurchsatzscreening in der Chemie oder in der Umwelttechnik Anwendungen finden. Medizinische Einsatzgebiete ergeben sich z.B. in der Mutationsanalyse von Genen in der Diagnostik genetischer Krankheiten, der MHC (*major-histocompatibility-complex*)-Typisierung in der Transplantationsmedizin, der Identifizierung von Mikroorganismen oder der Analyse komplexer Genexpressionsmuster^[68-70].

Die Miniaturisierung chemischer und biochemischer Systeme haben zur Entwicklung einer Fülle von Geräten geführt, die die sich wiederholenden Prozesse des Transports von Flüssigkeiten (Pumpen und Ventile), des Bestimmens von Volumina, der Temperaturkontrolle, des Mischens und Separierens im Mikromaßstab^[71-73] ermöglichen. Überdies

wurden Mikrosysteme mit mehreren funktionell integrierten Eigenschaften entwickelt. Die an eine Polymerasekettenreaktion (PCR) gekoppelte Kapillarelektrophorese mit integrierter Echtzeit-Detektion^[74,75] ist ein Beispiel für die Entwicklung der miniaturisierten Totalanalyse-Systeme (*micro total analysis systems*, μ TAS)^[76], mit denen das Konzept des „Labors auf einem Chip“ verwirklicht werden soll^[77-79].

Einen entscheidenden Bestandteil biochemischen Arbeitens stellen enzymatische Reaktionen dar. Im Zuge der Miniaturisierung und der Einführung integrierter Durchflusssysteme bietet die Immobilisierung von Enzymen z.B. an die innere Oberfläche von Kanälen eine Möglichkeit der kontinuierlichen Prozeßführung. Derartig beladene Oberflächen finden unter anderem als bioanalytische Sensorsysteme zur Überwachung von Stoffwechselmetaboliten oder in Toxizitätstest Verwendung. Es wurden z.B. Mikroanalyse-Systeme zur Identifizierung von Proteinen entwickelt, bei denen die vorbereitete Probe durch einen immobilisierten Protease-Reaktor fließt und anschließend on-line für die Analyse mittels MALDI-TOF MS vorbereitet wird^[80].

Die Anforderungen aus der kombinatorischen Chemie, dem Wirkstoffscreening, der genetischen Identifizierung sowie der medizinischen und Umweltdiagnostik treiben die Entwicklungen der Miniaturisierung, Parallelisierung und Automatisierung chemischer Prozesse voran, wobei den Mikroreaktoren bzw. Chipformaten unter Ausnutzung der Vorteile der Festphasenstrategie eine besondere Bedeutung zukommt.

2 Problemstellung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die kovalente Anbindung von Oligonucleotiden und Proteinen an Silizium-Oberflächen untersucht werden. Dabei standen Überlegungen zu Konzepten zur Erhöhung der Beladungsdichte auf der planaren Oberfläche im Vordergrund.

Bei Festphasen-Kopplungen können die Moleküle zwar dicht gepackt sein, liegen jedoch bei maximaler Belegung nur in einer monomolekularen Schicht vor. Die Anzahl immobilisierter Moleküle errechnet sich bei ebenen, nicht-porösen Oberflächen leicht aus dem Verhältnis der Oberfläche zum Flächenbedarf eines Einzelmoleküls.

Zur Erhöhung der Beladungsdichte gebundener Oligonucleotide werden unterschiedliche Ansätze verfolgt. Grundsätzlich wird in allen Vorgehensweisen eine Erweiterung der Zweidimensionalität der planaren Oberfläche in die dritte Dimension angestrebt. Denkbar ist zunächst der Gebrauch poröser Materialien, die gegenüber Chips eine deutlich größere Oberfläche zur Verfügung stellen. Im Durchflußverfahren kann hier die Immobilisierungsreaktion analog zur Festphasenoligonucleotidsynthese an CPG erfolgen. Ein anderer Ansatz verfolgt die Immobilisierung in Gel-Pads aus Polyacrylamid^[81], in die automatisiert präsynthetisierte Oligonucleotide eingebracht und kovalent gebunden werden.

Das Konzept dieser Arbeit sieht die Modifizierung der planaren Oberfläche unter Aufbau dendritischer Strukturen vor. Dabei erfolgt z.B. bei der Kondensation eines trifunktionellen Synthons für den Kondensationsschritt der n ten Generation eine Vermehrung der Oberflächenfunktionalität um den Faktor 2^n . Abbildung 2-1 zeigt exemplarisch die Vervielfältigung der Oberflächenfunktionalität durch den Aufbau einer dendritischen Topologie. Im dargestellten Beispiel B wird mit den gewählten multivalenten Bausteinen, quantitative Umsetzungen vorausgesetzt, eine Steigerung der Beladungsdichte gegenüber A um das Sechsfache erreicht.

3 Silizium-Wafer

Silizium besitzt als Oberflächenmaterial überlegene Eigenschaften: es ist vergleichsweise inert gegenüber organischen Lösungsmitteln und besitzt eine hohe biologische Verträglichkeit. Die Silizium-Oberfläche kann auf vielfältige Weise modifiziert werden, um so den jeweiligen Anforderungen der modernen Molekularbiologie Rechnung zu tragen. Nicht zuletzt können die das Silizium betreffenden Erkenntnisse aus der hoch entwickelten Mikroelektronik- und Mikrosystem-Technologie genutzt werden. All diese Vorteile lassen Silizium als den geeignetsten Kandidaten zur Entwicklung hoch integrierter Arrays aus Reaktionskompartimenten erscheinen, der den wachsenden Ansprüchen der Biochemie und Molekularbiologie an Miniaturisierung, Parallelisierung und Automatisierung angepaßt werden kann.

Gegenüber porösen Silizium-Partikeln bieten die planaren Wafer den Vorteil der gleichberechtigten Zugänglichkeit aller funktioneller Gruppen. Die Planarität der Oberfläche ist zudem die Voraussetzung für den direkten Einsatz der Wafer als Target in der matrixunterstützten Laser-Desorptions/Ionisations-Flugzeit Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS).

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente an der Silizium-Oberfläche wurden an quadratischen Wafer mit 4 mm Kantenlänge und einer Dicke von 0.4 mm durchgeführt. Beide Seiten und die Kanten wurden gleichberechtigt behandelt und somit für alle Berechnungen eine Gesamtoberfläche von 40 mm² zu Grunde gelegt.

3.1 Funktionalisierung der Silizium-Oberfläche

Die Silizium-Wafer wurden zunächst mit Ethanol gewaschen und dann in der oxidierenden Flamme eines Bunsenbrenners ausgeglüht. Die so vorbehandelten Wafer wurden anschließend einzeln mit einer (3-Aminopropyl)triethoxysilan-Lösung in Toluol^[82-84] bei 60 °C für 16 Stunden inkubiert. Nach dem Waschen mit unterschiedlichen Lösungsmitteln wurden die auf diese Weise erhaltenen aminofunktionalisierten Silizium-Wafer (vgl. Abb. 3-1) entweder für die Quantifizierung der oberflächengebundenen funktionellen Gruppe, weitere Reaktionen bzw. die Aktivierung durch einen homobifunktionellen Linker eingesetzt.

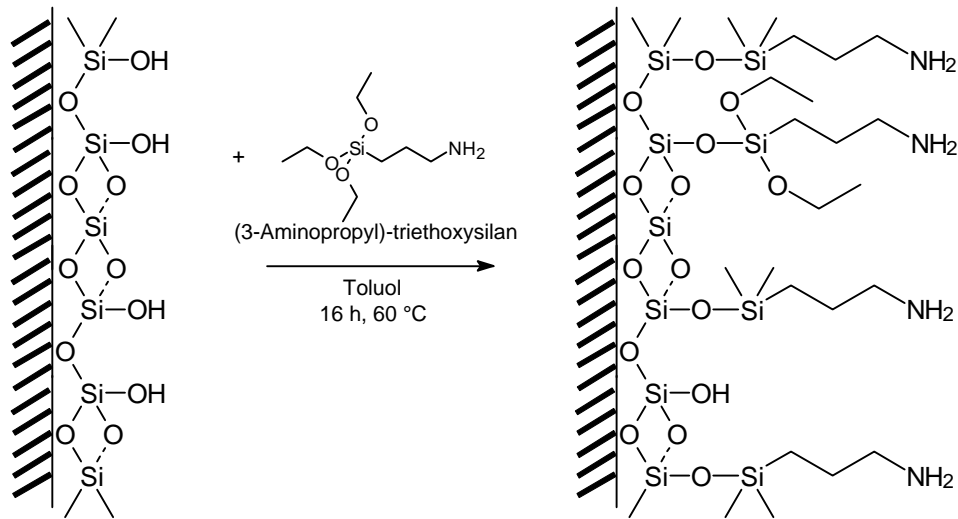


Abb. 3-1: Schematische Darstellung der Aminofunktionalisierung der Silizium-Oberfläche

3.2 Bestimmung der Beladungsdichte

Um eine Veränderung der Beladungsdichte der Silizium-Oberfläche verfolgen zu können, müssen zunächst geeignete Nachweismethoden ausgewählt werden. Da ein direkter Nachweis von Reaktionen an einer Oberfläche nicht möglich ist, muß auf indirekte Verfahren zurückgegriffen werden. Im Verlauf der vorliegenden Arbeit wurden photometrische Nachweismethoden chromophorer Abgangsgruppen, die in einer vorangegangenen Reaktion eingeführt werden, untersucht.

Pikrinsäure-Assay

Der Pikrinsäure-Assay ist ein mögliches Verfahren zur Quantifizierung oberflächengebundener Aminofunktionen^[85,86]. Durch die Behandlung des Trägermaterials mit einer Pikrinsäure-Lösung in Dichlormethan werden die Aminogruppen in Pikrate überführt. Nach Waschen mit Dichlormethan zur Entfernung überschüssiger Pikrinsäure wird mit einer starken Base wie Triethylamin, die Pikrat von der Oberfläche in Lösung zu verdrängen vermag, behandelt. Die Pikrat-Lösung wird bei 373 nm photometrisch vermessen. Aus den gemessenen Extinktionen kann mit Hilfe einer Eichgeraden die Stoffmenge oberflächengebundener Aminogruppen berechnet werden.

Trityl-Assay

4,4'-Dimethoxytritylchlorid (DMTrCl) ist als Reagenz zur Einführung von 5'-Hydroxylschutzgruppen von Nucleosiden in der Oligonucleotidsynthese^[87,88] bekannt, weist jedoch eine stärkere Reaktivität gegenüber Aminogruppen auf. Die Umsetzung der oberflächengebundenen Aminogruppen erfolgt mit einer DMTrCl-Lösung in Pyridin. Dem Waschen des festen Trägers mit Pyridin und Dichlormethan folgt die Detritylierung mit Dichloressigsäure-Lösung in Dichlormethan. Die Extinktionen der Dimethoxytrityllösungen bei 504 nm liefern durch Korrelation mit einer Eichgerade die Konzentration an von der Oberfläche abgespaltenen Tritylkationen.

SDTB-Assay

Eine einfache und sensitive Methode zur Bestimmung polymergebundener Aminogruppen bietet der Einsatz von N-Succinimidyl-4-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-butyrat (SDTB) als Acylierungsreagenz^[89]. Nach der Acylierungsreaktion in Gegenwart katalytischer Mengen 4-Dimethylaminopyridin (DMAP) wird von überschüssigem Reagenz befreit und durch Behandlung mit Perchlorsäure detrityliert. Das freie Dimethoxytritylkation kann spektrophotometrisch quantifiziert werden. Im Vergleich zur DMTrCl-Methode bietet dieses Verfahren den Vorteil der Selektivität gegenüber Aminogruppen in Gegenwart von Hydroxylfunktionen. Ein Sulfo-SDTB-Assay^[90] zur Quantifizierung matrixgebundener Aminogruppen ist kommerziell erhältlich.

TNBS-Assay

In Anlehnung an die Sanger-Methode zur Identifizierung der N-terminalen Aminosäure^[91] von Peptiden durch Umsetzung mit 2,4-Dinitrofluorbenzol (FDNB) wurde der Trinitrobenzolsulfonsäure-Assay (TNBS) zur chemischen Modifikation von Proteinen zur Aufklärung der funktionellen Bedeutung der Aminosäureseitenketten eingeführt^[92-94]. Später wurde dieser Assay^[95] als Mikro-Test zum Nachweis unvollständiger Kopplungsreaktionen^[96] in der Festphasenpeptidsynthese vorgeschlagen. Trinitrobenzolsulfonsäure reagiert in wässriger Lösung bei pH 8 bei Raumtemperatur ausschließlich mit primären Aminogruppen zum orange-roten spektrophotometrisch detektierbaren Trinitrophenylpeptid^[97-102]. Die Regenerierung der Aminogruppe kann einerseits durch Hydrazin unter Freisetzung von 1-Hydroxy-4,6-dinitrobenzotriazol^[103] oder andererseits durch Behandlung mit starken Basen, wie konz. Ammoniak oder 1 N Natronlauge, unter Abspaltung von Pikrat^[92] erfolgen.

Die Silizium-Wafer wurden zunächst mit 4 %iger Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen und anschließend mit 4 %iger Natriumhydrogencarbonat-Lösung und 0.1 %iger 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure in N,N-Dimethylformamid bei 40 °C behandelt. Nach der Zugabe von Salzsäure wurden die Wafer mehrfach mit Wasser gewaschen. Die Abspaltung des Pikrats erfolgte mit 1 N Natronlauge. Die Pikratlösungen wurden gegen eine Blindprobe bei 353 nm photometrisch vermessen. Die Berechnung der Konzentration an freigesetztem Pikrat erfolgte über die lineare Regressionsgleichung einer Verdünnungsreihe von Pikrinsäure in 1 N Natronlauge. Während mit dem Pikrinsäure-Assay ionisch gebundenes Pikrat erfaßt wird, erfolgt mit dem TNBS-Assay die Quantifizierung kovalent fixierten Pikrats.

Erste Untersuchungen zur Eignung der ausgewählten Assays zur Quantifizierung oberflächengebundener Aminofunktionen erfolgten an magnetischen Glaspartikeln mit definierter Porengröße (*magnetic porous glass long chain alkylamin*, MPG-LCA). Die Beladungsdichte mit Aminogruppen wurde vom Hersteller durch Perchlorsäuretitration^[104] mit Kristallviolett als Indikator bestimmt. Gemäß den Herstellerangaben betrug die Stoffmenge oberflächengebundener Aminogruppen für 10 µl MPG-Suspension (0.3 mg beads) 23 nmol. Der Pikrinsäure-Assay lieferte 13 ± 3 nmol, während mit Hilfe des Dimethoxytrityl-Assays 15 ± 3 nmol gemessen wurden. Damit weichen die aus den Assays erhaltenen Meßwerte um ca. 40 % von den Herstellerangaben ab.

Die beschriebenen Assays wurden nun auf Silizium-Wafer vor bzw. nach erfolgter Aminofunktionalisierung angewandt. Tabelle 3-1 zeigt vergleichend die aus den unterschiedlichen Assays erhaltenen Meßergebnisse. Es wurden jeweils 10 bis 20 Wafer vermessen und die erhaltenen Werte für die Beladungsdichte gemittelt. Besonders auffällig ist die unterschiedlich große Varianz der Meßwerte. Der Dimethoxytrityl- und der SDTB-Assay liefern kaum reproduzierbare Werte und sind damit für die Quantifizierung an Silizium gebundener Aminogruppen ungeeignet. Es muß generell darauf verwiesen werden, daß indirekte Nachweisverfahren stets abhängig von dem Einfluß der Oberfläche sind. Im allgemeinen können Wechselwirkungen zwischen funktioneller Gruppe und Reagenz nicht von denen der hydrophoben Oberfläche und Reagenz unterschieden werden. Besonders groß scheint die Wechselwirkung der Dimethoxytritylgruppe mit der Oberfläche zu sein, wie der hohe Meßwert für einen unmodifizierten Silizium-Wafer zeigt.

Für die weiteren Untersuchungen zur Bestimmung der Beladungsdichte mit Aminogruppen wurden ausschließlich der TNBS- und Pikrinsäure-Assay verwendet.

Die Beladungsdichte aminofunktionalisierter Silizium-Wafer beträgt ca. 45 pmol/mm². Versuche zur Verlängerung der Reaktionszeit und zur Temperaturerhöhung während der Aminofunktionalisierung führten zu keiner Steigerung der Beladungsdichte.

Vergleichend an unpolierten, einseitig polierten und polierten Silizium-Wafer durchgeführte Quantifizierungen lieferten keine meßbaren Unterschiede für die Beladung mit Aminogruppen.

n (NH₂) [pmol/mm²]	belassene Silizium-Wafer	aminofunktionalisierte Silizium-Wafer
Pikrinsäure-Assay	10 ± 4	45 ± 9
DMTrCl-Assay	55	198
TNBS-Assay	3 ± 2	88 ± 18
SDTB-Assay	3 ± 2	18 ± 11

Tab. 3-1: Stoffmenge oberflächengebundener Aminogruppen [pmol/mm²] ermittelt durch verschiedene Assays

3.3 Konzepte zur Erhöhung der Beladungsdichte

Die Grenzen der Beladungsdichte auf einer planaren Oberfläche sind theoretisch mit dem Durchmesser der immobilisierten Moleküle gegeben. Die maximale Belegung der Oberfläche ergibt sich zu

$$\text{Stoffmenge } N = \frac{\text{Trägerfläche } A}{\text{Raumbedarf } R}$$

wobei der minimale Raumbedarf der tatsächlichen räumlichen Ausdehnung des Moleküls entspricht. Die immobilisierbare Stoffmenge N läßt sich theoretisch vergrößern, indem der Raumbedarf R der Moleküle erniedrigt wird. Dies ist z.B. denkbar, indem die Einflüsse der hydrophoben Eigenschaften der Oberfläche, die zu einer erschwerten Anbindung führen können, durch die Einführung entsprechender Spacer vermindert werden. Ein weiterer Ansatz ist die Vergrößerung der Trägerfläche A durch die Ausdehnung der planaren Oberfläche in die dritte Dimension. Durch die kovalente Verknüpfung baumartig verzweigter,

dendrimerer Spacer können beide Ansatzpunkte berücksichtigt werden. Die eingeführten Alkylketten selbst können durch polare Gruppen die Hydrophilie der Oberfläche erhöhen und zusätzlich die Starrheit der Ebene aufheben. Dendritische Strukturen^[105] führen zudem zu einer Vervielfältigung der funktionellen Gruppen auf der Oberfläche und sollten flexible Anbindungsstellen für Biomoleküle liefern.

Im Verlauf dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Vorgehensweisen zum Aufbau dendritischer Strukturen^[106-108] auf der Silizium-Oberfläche untersucht.

Zunächst wurde ein divergenter Ansatz^[109] durch die stufenweise Kondensation eines multivalenten Moleküls an die funktionalisierte Silizium-Oberfläche, die dem Kern eines Dendriten im klassischen Sinn gleichzusetzen ist, verfolgt.

Betrachtet man den Kern als Molekül mit f_k funktionellen Gruppen A, so wird durch Umsetzung mit Molekülen des Typs CB_n (C = reaktive Einheit, B = Endgruppe) die Zahl der Endgruppen um das $f_k n$ -fache erhöht und der Kern um die Einheiten erweitert, die die Endgruppen B tragen (vgl. Abb. 3-2). Die Gruppe B stelle eine geschützte Funktion A dar, die in der anschließenden Entschützungsreaktion freigesetzt wird. Es liegt nun ein Dendrimer der 1. Generation mit $f_k n$ funktionellen Gruppen A vor, die für weitere entsprechende Umsetzungen zur Verfügung stehen.

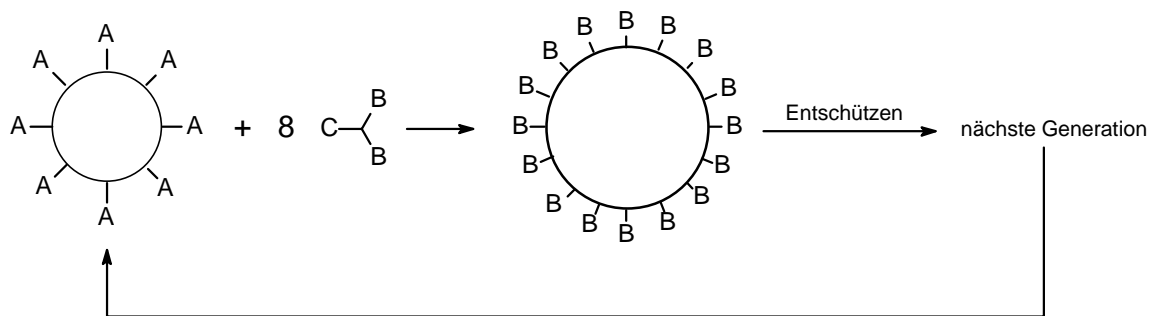
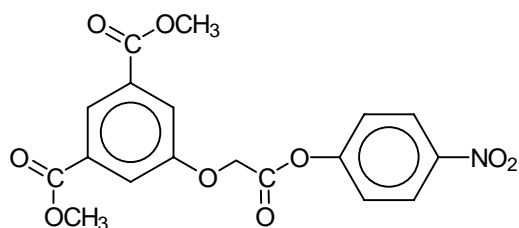


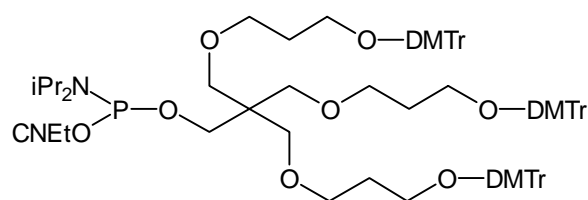
Abb. 3-2: Schematische Darstellung der divergenten Synthese zum Aufbau eines perfekten Dendrimers mit $f_k = 8$ und $n = 2$

Voraussetzung für den Aufbau eines perfekten, molekulareinheitlichen Dendriten ist ein quantitativer Umsatz bei jedem Reaktionsschritt. Unvollständige Umsetzungen führen zu einer Potenzierung der Fehler während des weiteren Wachstums.

Zur Vervielfältigung der Oberflächenfunktionalität wurden im Verlauf dieser Arbeit zwei multivalente Linker (vgl. Abb. 3-3) eingesetzt.



3,5-Dicarbomethoxyphenoxyessigsäure-p-nitrophenylester

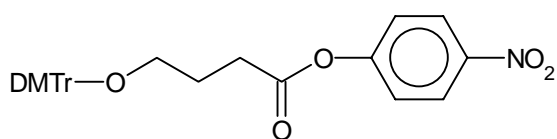
2

Tris-2,2,2-[3-(4,4'-dimethoxytrityloxy)-propyloxymethyl]ethyl-N,N-diisopropylaminocyanoethoxyphosphoamidit

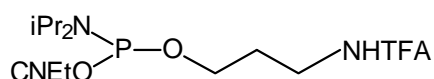
9**Abb. 3-3:** Zur Vervielfältigung der Oberflächenfunktionalität eingesetzte multivalente Linker

Während der 3,5-Dicarbomethoxyphenoxyessigsäure-p-nitrophenylester 2 zur Kopplung an primäre Aminogruppen unter Ausbildung von Amidbindungen geeignet ist, kann Tris-2,2,2-[3-(4,4'-dimethoxytrityloxy)-propyloxymethyl]ethyl-N,N-diisopropylaminocyanoethoxy-phosphoamidit 9 analog zur klassischen Oligonucleotidsynthese^[110] mit Hydroxylgruppen umgesetzt werden. Durch den trifunktionellen Linker 2 ist theoretisch eine Verdoppelung der Oberflächenfunktionalität möglich. Die Kondensation des Amidit-Synthons 9 sollte zu einer Verdreifachung führen. Zum Aufbau dendritischer Strukturen an der Oberfläche durch Kopplung dieser beiden Molekültypen ist die Überführung von Amino- in Hydroxylgruppen bzw. von Hydroxyl- in Aminogruppen notwendig. Hierzu fanden zwei entsprechende Spacer Verwendung:

Als aktivierter Ester ist p-Nitrophenyl-4-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-butyrat 11 zur



p-Nitrophenyl-4-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-butyrat

11

3-(Trifluoroacetyl-amino)propyl-(2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)-phosphoramidit

14

Umsetzung mit Aminogruppen geeignet und liefert nach Detritylierung freie Hydroxylgruppen. Das während der Entschützungsreaktion gebildete Dimethoxytritylkation kann zudem photometrisch erfaßt werden und liefert so eine Möglichkeit der Reaktionsverfolgung.

Abb. 3-4: Strukturformeln der verwendeten Spacer

Analog zur gebräuchlichen Amidit-Kopplung an Hydroxylgruppen kann 3-(Trifluoroacetylamino)propyl-(2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)-phosphoramidit **14** eingesetzt werden. Nach erfolgter Entschützung stehen primäre Aminogruppen zur Verfügung.

Neben diesem divergenten Konzept wurde andererseits ein konvergenter Ansatz^[111] untersucht, bei dem zunächst die spätere Dendrimerperipherie synthetisiert und abschließend an den Kern bzw. die Silizium-Oberfläche kondensiert wurde. Als Dendrimersegment wurde Polylysin gewählt, das nach Kopplung an die Silizium-Wafer als Dendrimeroberfläche zahlreiche ϵ -Aminogruppen des Lysins präsentieren sollte.

4 Organisch-chemische Synthesen

4.1 Synthese eines trifunktionellen Linkers

In vorausgegangenen Untersuchungen^[112] wurde bereits 3,5-Dicarbomethoxyphenoxyessigsäure-p-nitrophenylester **2** als trifunktioneller Linker konzipiert, der sich nach kovalenter Anbindung an aminofunktionalisiertes CPG als geeignet erwies, die Oberflächenfunktionalität annähernd zu verdoppeln. Bei diesem Molekül handelt es sich um einen 1,3,5-substituierten Aromaten, der über einen aktivierten Ester an die primären Aminogruppen eines festen Trägers kondensiert werden kann und zudem zwei äquivalente funktionelle Gruppen für weitere Kopplungsreaktionen liefert.

Die Synthese von 3,5-Dicarbomethoxyphenoxyessigsäure-p-nitrophenylester **2** erfolgte ausgehend von Dimethyl-5-hydroxyisophthalat (vgl. Abb. 4-1).

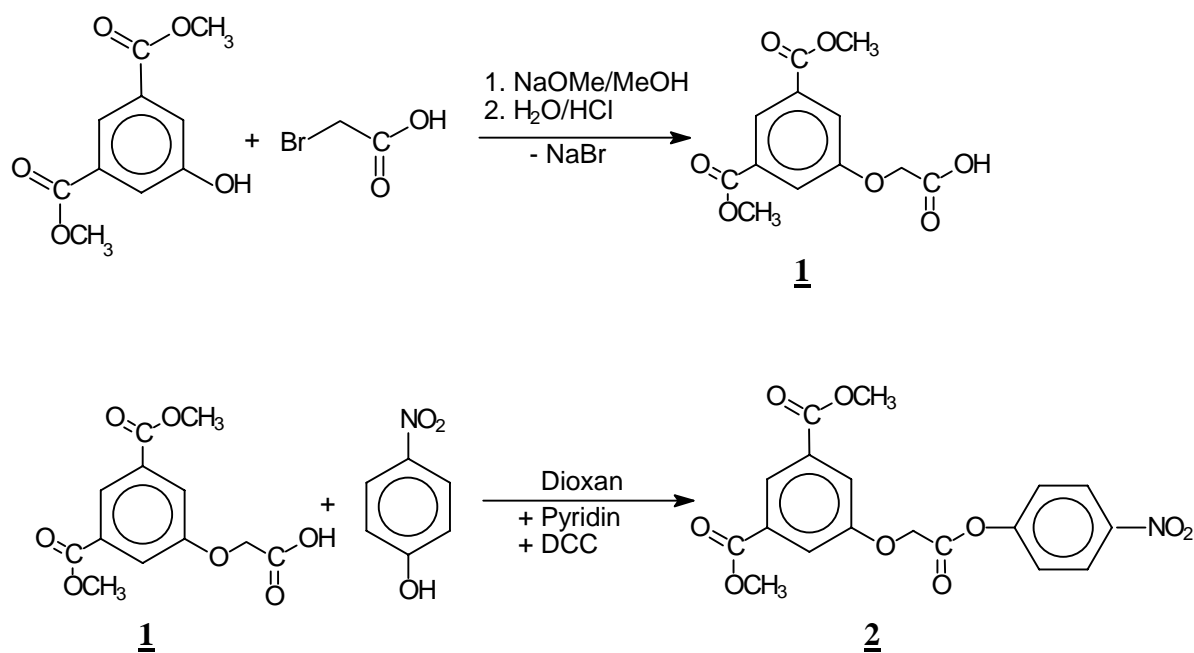


Abb. 4-1: Reaktionsschema zur Synthese von 3,5-Dicarbomethoxyphenoxyessigsäure-p-nitrophenylester **2**

Zunächst wurde Dimethyl-5-hydroxyisophthalat mit Bromessigsäure in Methanol mit Natriummethanolat durch 20 stündiges Kochen unter Rückfluß^[113] zum entsprechenden Phenylether **1** umgesetzt. Nach Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung konnte 3,5-Dicarbomethoxyphenoxyessigsäure **1** in 66 %iger Ausbeute erhalten werden.

Die weitere Synthesestrategie sah nun eine Aktivierung der Carbonsäure **1** zum p-Nitrophenylester^[114] **2** vor. Die Reaktion wurde in Dioxan unter Zusatz von Pyridin und Verwendung einer N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid-Lösung (DCC, 1 mol/l) bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach Aufarbeitung und Trocknung wurde 3,5-Dicarbo-methoxyphenoxyessigsäure-p-nitrophenylester **2** in 81 %iger Ausbeute erhalten. Die Charakterisierung erfolgte mittels ¹H-NMR, ¹³C-NMR- und Massenspektrometrie.

4.2 Synthese eines dendritischen Amidit-Synthons

Neben dem beschriebenen trifunktionellen Linker wurde als weiteres verzweigtes multifunktionelles Molekül Tris-2,2,2-[3-(4,4'-dimethoxytrityloxy)propyloxymethyl]ethyl-N,N,-diisopropylaminocynoethoxyphosphoamidit^[115] **9** synthetisiert. Dieses Molekül bietet zwei entscheidende Vorteile. Einerseits kann die Kopplung an den festen Träger unter den in der Festphasen-Oligonucleotid-Synthese üblichen bewährten Bedingungen erfolgen, andererseits kann über die photometrische Quantifizierung des nachfolgend abzuspaltenden Dimethoxytrityl-Kations die Ausbeute des Kondensationsschrittes bestimmt werden. Auf indirekte Nachweisverfahren zur Quantifizierung der Beladungsdichte der Oberfläche könnte somit verzichtet werden.

Im Gegensatz zum aromatischen Linker wird mit der Einführung dieses Pentaerythritderivates die Hydrophilie der Silizium-Oberfläche erhöht. Dies könnte einen entscheidenden Einfluß auf die Eignung der modifizierten Oberfläche zur Anbindung von Biomolekülen zur Folge haben.

Abbildung 4-2 zeigt das Syntheschema zur Darstellung dieses „verdreifachenden“ Amidit-Synthons **9**. Zunächst erfolgte die Umsetzung von Pentaerythrit mit Acrylnitril zur tricyanoethoxy-substituierten Verbindung **3**. Dabei reagiert Acrylnitril als vinyloge Elektronenakzeptorverbindung basenkatalysiert unter Addition der Hydroxyfunktionen des Alkohols. Das Hauptnebenprodukt, die vollständig substituierte Verbindung, konnte säulenchromatographisch abgetrennt werden. Das Produkt Tris-2,2,2-[(cyanoethoxy)-methyl]ethanol **3** konnte insbesondere durch das für Nitrile charakteristische Signal im ¹³C-NMR-Spektrum bei 117.99 ppm identifiziert werden. Die Dreifachsubstitution wurde durch das Integralverhältnis der Methylenprotonen im ¹H-NMR-Spektrum bestätigt.

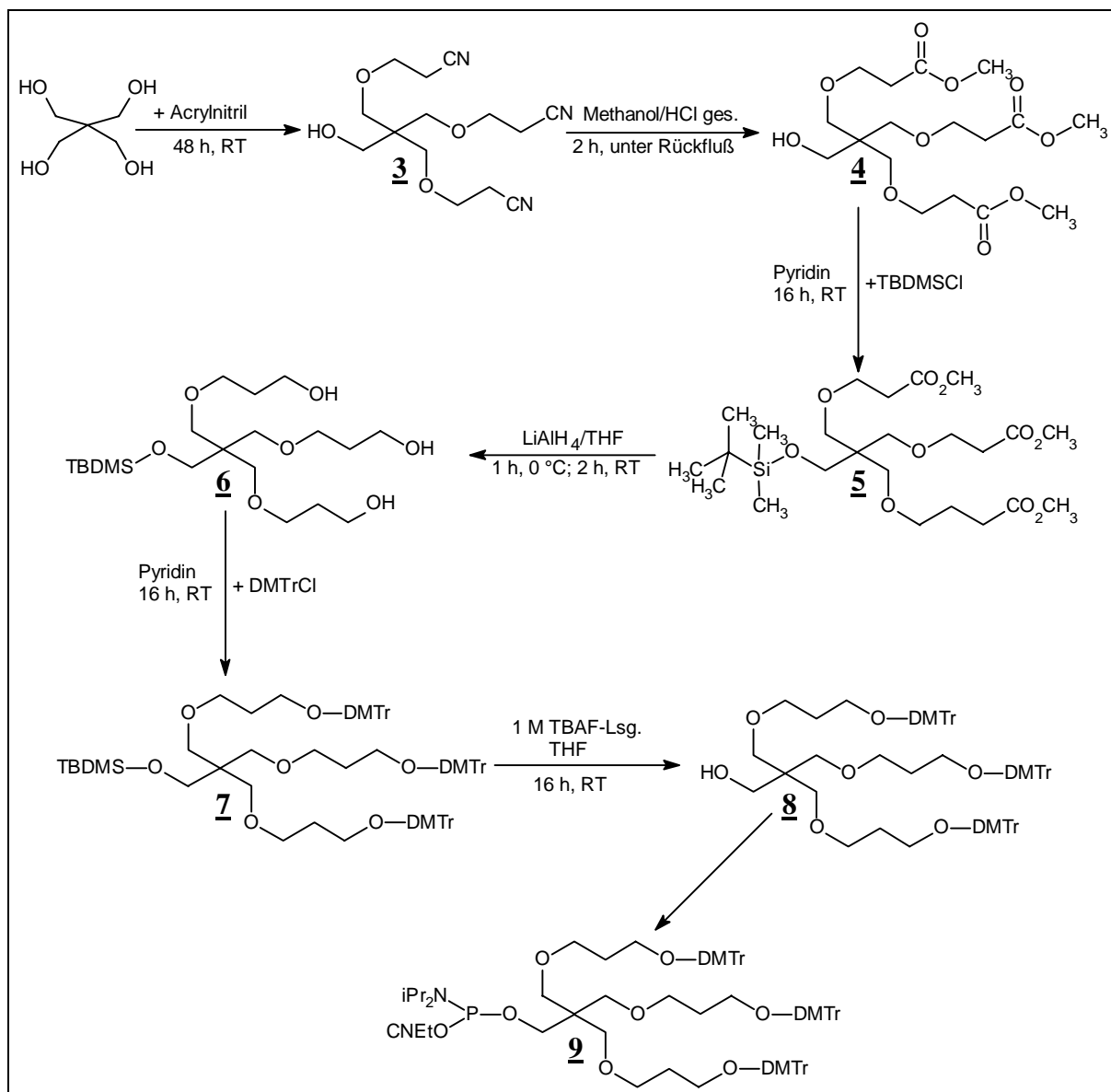


Abb. 4-2: Syntheschema zur Darstellung von Tris-2,2,2-[3-(4,4'-dimethoxytrityloxy)-propylmethyl]ethyl-N,N,-diisopropylaminocyanethoxyphosphamidit **9**

In Gegenwart von wasserfreiem Chlorwasserstoff wurde durch Addition von Methanol intermediär der Iminoester gebildet, der nach Hydrolyse den Triester Tris-2,2,2-[[methoxycarbonyl]ethoxy]methyl]ethanol **4** in 72 %iger Ausbeute lieferte. Das Produkt wurde durch das Auftreten des Carbonyl-Signals bei 172.5 und des Signals für die Methoxygruppe bei 52.06 ppm im ^{13}C -NMR-Spektrum charakterisiert.

Es folgte die Einführung der *Tert*-butyldimethylsilyl-Schutzgruppe an der verbliebenen Hydroxylfunktion in 88 %iger Ausbeute. Im ^1H -NMR-Spektrum traten die für Methylsilylgruppen typischen Signale bei 0.0 ppm auf.

Im nächsten Schritt wurden die Methylesterfunktionen durch Lithiumaluminiumhydrid in Tetrahydrofuran zum Triol **6** reduziert. *Tert*-butyldimethylsilyl-[tris-2,2,2-(5-oxy-2-oxapentyl)ethanol] **6** konnte in 66 %iger Ausbeute erhalten werden. Die erfolgreiche Umsetzung wurde durch das Verschwinden der Signale für die Methoxygruppe im ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum bestätigt. Im ^{13}C -Spektrum wurde eine deutliche Verschiebung des Signals für die benachbarten Methylengruppen nach tieferem Feld (35.18 ppm für CH_2CO_2 in **5**, 61.64 ppm für CH_2OH in **6**) beobachtet. Die Zuordnung der Signale erfolgte mit Hilfe von ^1H - ^{13}C -Cosy-Experimenten.

Es folgte die Tritylierung des Triols durch einen geringen Überschuß an 4,4'-Dimethoxytritylchlorid unter Verwendung von Dimethylaminopyridin und EDIP als Katalysatoren. Die deutlich erhöhte Mobilität des dreifach tritylierten Produktes *Tert*-butyldimethylsilyl-{tris-2,2,2-[3-(4,4'-dimethoxytrityloxy)-propyloxymethyl]ethanol} **7** ermöglichte die chromatographische Abtrennung der unvollständig tritylierten Nebenprodukte. Das Produkt konnte unter anderem mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie durch das Signal für das Molekül-Ion sowie des Signals, das der Masse des um eine Dimethoxytritylgruppe verminderten Molekülions entspricht, charakterisiert werden.

Die anschließende Desilylierung mit Tetrabutylammoniumfluorid-Lösung in Tetrahydrofuran führte zum tridimethoxytritylierten Alkohol Tris-2,2,2-[3-(4,4'-dimethoxytrityloxy)propyloxymethyl]ethanol **8** in 71 %iger Ausbeute. NMR-spektrometrisch konnten keine für Silylgruppen charakteristischen Signale beobachtet werden. Das Signal der Methylengruppe, die zuvor der TBDMSO-Gruppe benachbart war, wurde nach tieferem Feld verschoben.

Die abschließende Phosphitylierung^[116] erfolgte durch Umsetzung mit Chloro-[diisopropylamino]- β -cyanoethoxyphosphin in Gegenwart von Diisopropylamin als Katalysator. Der erhaltene weiße Feststoff konnte mit Hilfe von ^1H -, ^{13}C - und ^{31}P -NMR sowie den COSY-Experimenten und über MALDI-TOF-Massenspektrometrie als Tris-2,2,2-[3-(4,4'-dimethoxytrityloxy)propyloxymethyl]ethyl-N,N-diisopropylaminocyanoethoxyphosphoramidit **9** identifiziert werden.

4.3 Synthese eines Spacers

Zur Überführung oberflächengebundener Aminogruppen in Hydroxylfunktionen wurde mit der Verbindung p-Nitrophenyl-4-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-butyrat **11** ein Molekül synthetisiert, das als aktivierter Ester direkt an Aminogruppen unter Ausbildung einer Amidbindung kondensiert werden kann. Die zur Freisetzung der Hydroxylgruppen anschließend durchzuführende Detritylierung bietet wiederum die Möglichkeit der Reaktionskontrolle durch photometrische Quantifizierung des 4,4'-Dimethoxytritylkations. Gemäß Abbildung 4-3 wurde im ersten Reaktionsschritt 4-Hydroxybuttersäure-Natriumsalz durch Umsetzung mit 4,4'-Dimethoxytritylchlorid an der Hydroxylfunktion geschützt. Nach säulenchromatographischer Reinigung wurde in 43 %iger Ausbeute Pyridinium-4-O-(4,4'-dimethoxytrityl)butyrat **10** erhalten. Die Charakterisierung erfolgte mittels ^1H -, ^{13}C -NMR- und Massenspektrometrie.

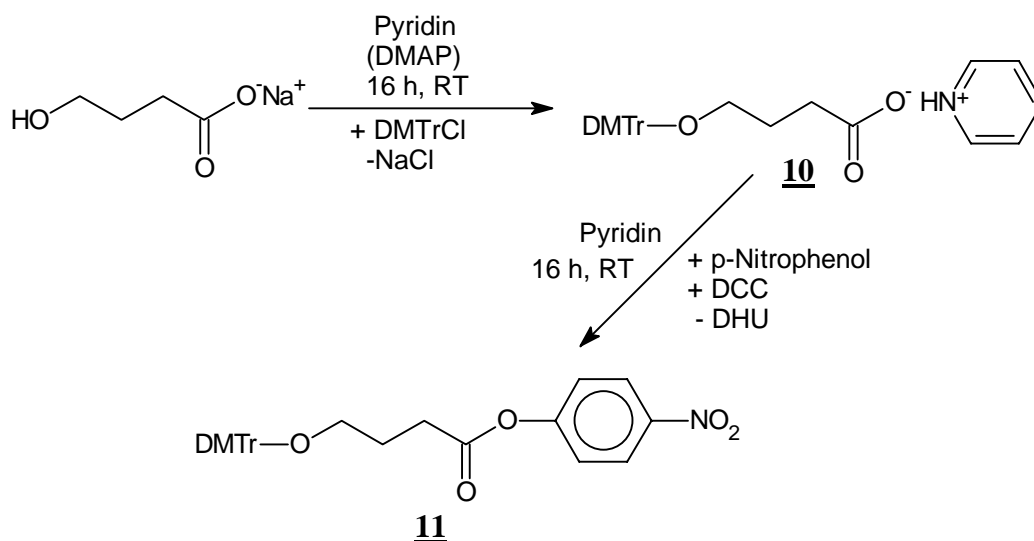


Abb. 4-3: Syntheschema zur Darstellung von p-Nitrophenyl-4-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-butyrat **11**

Die Aktivierung der Carbonsäure **10** zum p-Nitrophenylester **11** erfolgte wiederum mit einer 1 M N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid-Lösung (DCC) bei Raumtemperatur. Nach Aufarbeitung und Trocknung wurde p-Nitrophenyl-4-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-butyrat **11** erhalten und mit Hilfe spektrometrischer Methoden charakterisiert.

5 Aufbau dendritischer Strukturen auf Silizium-Oberflächen

5.1 Konvergenter Ansatz: Kondensation von Polylysin

Es wurde versucht, Polylysin nach zwei verschiedenen Methoden an die aminofunktionalisierte Oberfläche zu binden. Die erste Methode beinhaltet eine der Peptidsynthese^[117-119] entlehnte Schutzgruppen-, Aktivierungs- und Kopplungsstrategie^[120]. Polylysin wurde zunächst mit t-Butyl-p-nitrophenylcarbonat^[121] **12** umgesetzt^[122]. Das Reagenz ermöglicht die Einführung der Boc-Schutzgruppe unter Freisetzung von p-Nitrophenol, welches *in situ* nach Zusatz von DCC zur Darstellung des aktivierten Esters dient (vgl. Abb. 5-1). Die Einführung der Aminoschutzgruppe und die Aktivierung der Carboxylfunktion erfolgen mit Hilfe dieses Reagenzes in einer Eintopfreaktion.

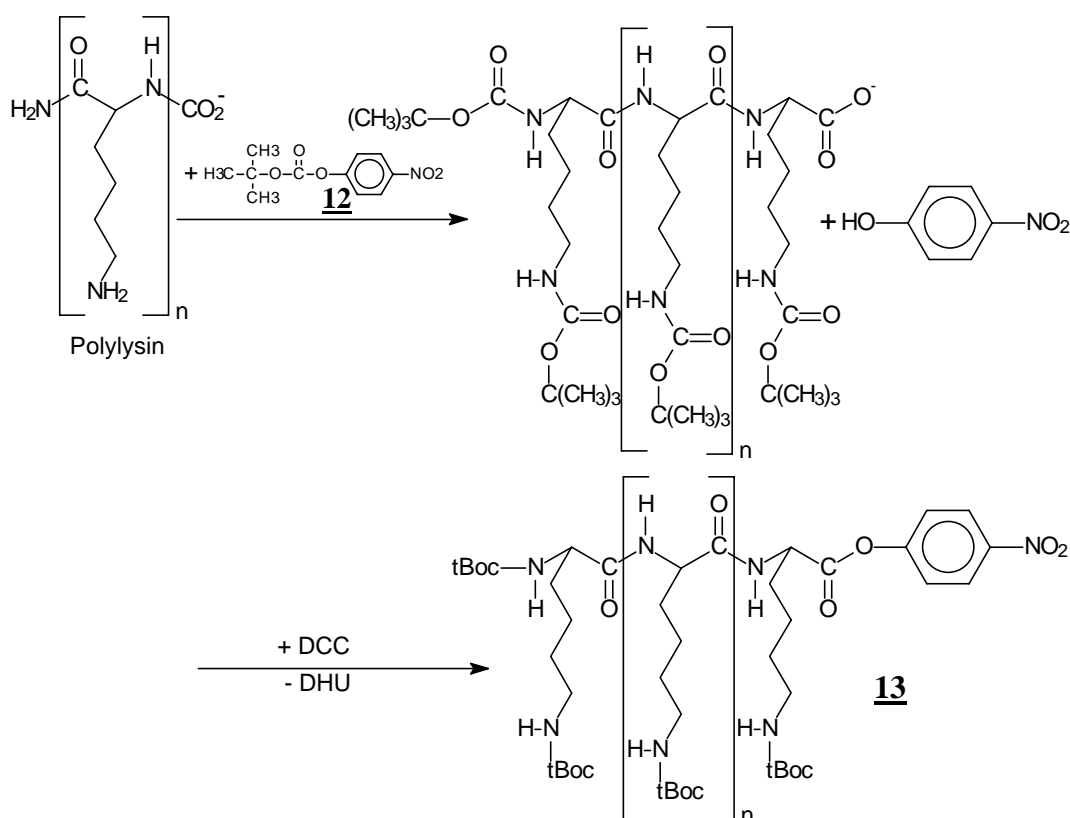


Abb. 5-1: Reaktionsschema zur Einführung der tBoc-Schutzgruppe unter gleichzeitiger Aktivierung zum p-Nitrophenylester an Polylysin

Das geschützte und aktivierte Polylysin **13** (vgl. Abb. 5-2) wurde mit den oberflächengebundenen Aminofunktionen umgesetzt und anschließend mit Trifluoressigsäure entschützt.

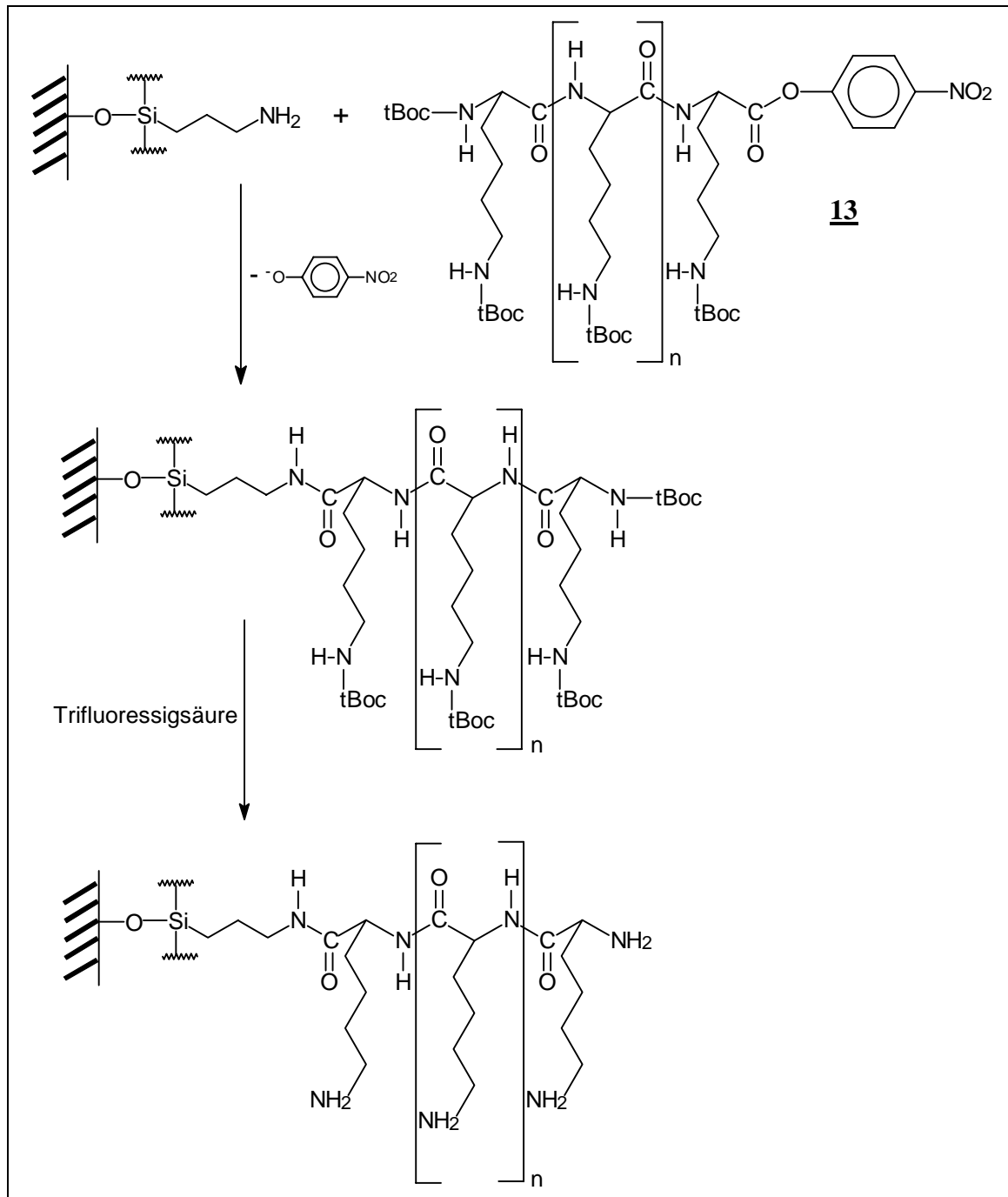


Abb. 5-2: Reaktionsschema zur Anbindung von tBoc-geschütztem Polylysin an aminofunktionalisierte Silizium-Wafer

Die Quantifizierung der Aminofunktionen mit Hilfe des TNBS-Assays lieferte nach der Entschützung 20 pmol/mm^2 Aminofunktionen. Entgegen den Erwartungen ist die Beladungsdichte durch Aminogruppen stark reduziert worden. Dies könnte auf eine unvollständige Entschützung zurückzuführen sein. Doch auch nach weiteren Versuchen der Entschützung wurde keine Steigerung der Beladungsdichte gemessen. Es ist zu berücksichtigen, daß sich die Oberflächeneigenschaften und damit die Bedingungen für den

Assay durch die Kopplung des hydrophilen, polaren Polypeptids gravierend verändert haben. Die Meßwerte eines Assays sind daher für verschieden modifizierte Oberflächen nicht unbedingt vergleichbar. Darüber hinaus könnte es bereits bei der Synthese des geschützten aktivierten Polymers in der Eintopfreaktion durch nicht quantitative Umsetzungen zu Vernetzungsreaktionen in Lösung gekommen sein, so daß eine Anbindung an die Oberfläche gar nicht erfolgen konnte. Mit einer Reaktionsfolge, bei der zunächst α - und ϵ -Aminogruppen vollständig geschützt werden und nach Reinigung die Aktivierung der Carboxylfunktion erfolgt, könnte die Quervernetzung vermieden werden. Es wurde jedoch ein zweiter, weniger aufwendiger Weg der Anbindung des Polymers gemäß Abbildung 5-3 beschrieben.

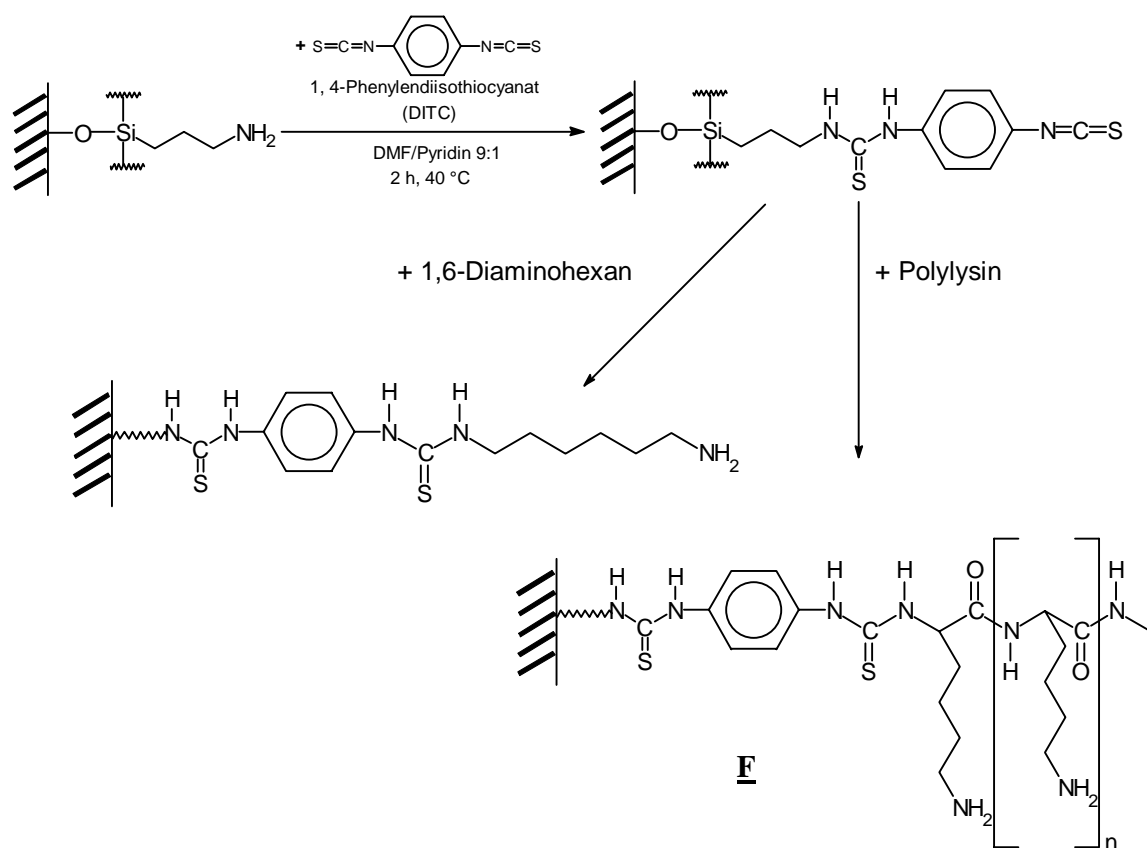


Abb. 5-3: Reaktionsschema zur Anbindung von Polylysine an mit DITC aktivierte Silizium-Wafer

Die aktivierte Komponente sollte nach dieser Methode die feste Phase selbst sein. Aminofunktionalisierte Silizium-Wafer wurden mit dem homobifunktionellen Reagenz 1,4-Phenyldiisothiocyanat (DITC) umgesetzt. Zur Überprüfung der Eignung für die Umsetzung mit Aminogruppen wurde anschließend zur Kontrolle mit 1,6-Diaminohexan

inkubiert. Auf jeder Reaktionsstufe wurden die Aminogruppen mit Hilfe des Pikrinsäure-Assays quantifiziert. Nach der Umsetzung mit 1,4-Phenylendiisothiocyanat wurde ein Rückgang der Beladungsdichte von 45 pmol/mm^2 auf $13 \pm 3 \text{ pmol/mm}^2$ beobachtet. Dies entspricht einer Umsatzrate von 71 %. Nach der anschließenden Kopplung von 1,6-Diaminohexan wurden $21 \pm 4 \text{ pmol/mm}^2$ NH_2 -Funktionen gemessen. Die Umsetzung der aktivierten Aminofunktionen erfolgte damit in 66 %iger Ausbeute. Im nächsten Schritt wurde die kovalente Anbindung von Polylysin unter den gleichen Bedingungen untersucht. Nach der Aktivierung durch Umsetzung mit DITC wurde mit einer 0.1 %igen (w/v) Polylysin-Lösung unter Zusatz von N-Methylmorpholin behandelt. Der Pikrinsäure-Assay lieferte für die auf diese Weise modifizierte Oberfläche **F** einen Meßwert von ca. 100 pmol/mm^2 Aminogruppen.

5.2 Divergender Ansatz: Stufenweiser Aufbau dendritischer Strukturen auf der Oberfläche

Der Aufbau der dendritischen Struktur auf der Silizium-Oberfläche erfolgte auf zwei unterschiedlichen Reaktionswegen (vgl. Abb. 5-4 und Abb. 5-6) unter Verwendung des aromatischen trifunktionellen Linkers **2**, des verdreifachenden Amidit-Synthons **9** und eines Linkers zur Überführung von primären Aminogruppen in Hydroxylfunktionen **11**.

Dem ersten Syntheschema (Abb. 5-4) folgend wurde versucht, das dimethoxytrityl-geschützte Amidit-Synthon mit der Silizium-Oberfläche zu verknüpfen. Bei quantitativem Umsatz sollte durch die Einführung dieses Dendriten eine Verdreifachung der Beladung mit funktionellen Gruppen erreichbar sein.

Ausgehend vom aminofunktionalisierten Silizium-Wafer **A** mußte zunächst eine Überführung der Aminogruppen in Hydroxylfunktionen durch Umsetzung mit p-Nitrophenyl-4-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-butyrat **11** erfolgen. Dieser Linker ermöglicht nach seiner Einführung die direkte Quantifizierung der disponierten funktionellen Gruppen über die Detritylierung.

Die Wafer wurden mit DMF/Triethylamin (8:1) überschichtet und mit einer 0.14 M p-Nitrophenyl-4-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-butyrat-Lösung in Dioxan/Pyridin (10:1) versetzt. Nach 16 Stunden Schütteln bei Raumtemperatur wurde mit DMF, Ethanol, Dioxan und Dichlormethan gewaschen.

Die photometrische Bestimmung der durch Behandlung mit 3 %iger Dichloressigsäure-Lösung abgespaltenen Dimethoxytritylgruppen ergab eine Stoffmenge von 117 ± 28 pmol Tritylkationen bezogen auf einen 40 mm^2 Wafer. Das entspricht einer Konzentration von ca. 3 pmol/mm^2 . Die Ergebnisse dieses Assays korrelieren damit nicht mit den aus dem Pikrinsäure-Assay erhaltenen Meßwerten von 45 pmol/mm^2 Aminofunktionen.

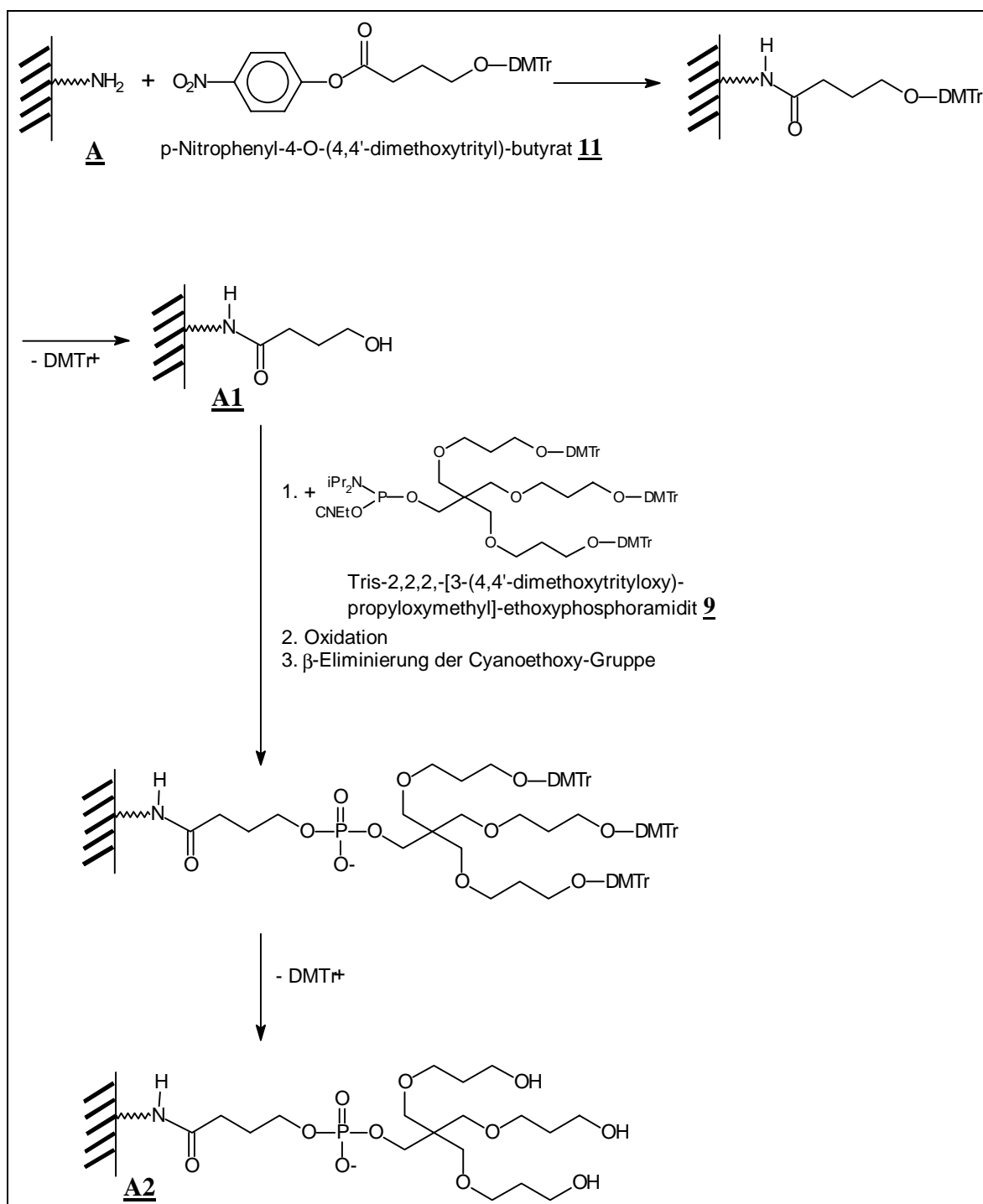


Abb. 5-4: Schema 1 zur Modifizierung der Silizium-Oberfläche

Der Entschützung der Hydroxyfunktionen folgte die Kondensation des Amidits. Die Umsetzung erfolgte in einer Glovebox bzw. in durch Septen verschlossenen Reaktionsgefäßen unter Argon. Die zuvor mit Pyridin und Acetonitril gewaschenen Wafer wurden individuell mit 250 nmol Amidit in Acetonitril und jeweils 5 µl einer Tetrazol-Lösung (0.22 µmol/µl) versetzt. Nach einer Stunde Schütteln bei Raumtemperatur wurden weitere 125 nmol Amidit und 5 µl der Tetrazol-Lösung zugegeben. Nach einer weiteren Stunde wurden die Überstände abgenommen und mehrfach mit Acetonitril gewaschen. Durch Zugabe einer Iod-Lösung erfolgte die Oxidation zum Phosphat. Überschüssiges Iod wurde durch Waschen mit 5 %iger Natriumhydrogensulfit-Lösung reduziert. Zur Überprüfung der Kopplung erfolgte die Detritylierung mit 3 %iger Dichloressigsäure in Dichlormethan. Es wurden 109 ± 28 pmol/Wafer Dimethoxytritylkationen gemessen.

Die freien Hydroxylgruppen wurden im folgenden Reaktionsschritt mit 3-(Trifluoracetyl-amino)propyl-(2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)-phosphoamidit **14** (*5'-Amino-Modifizier*) umgesetzt.

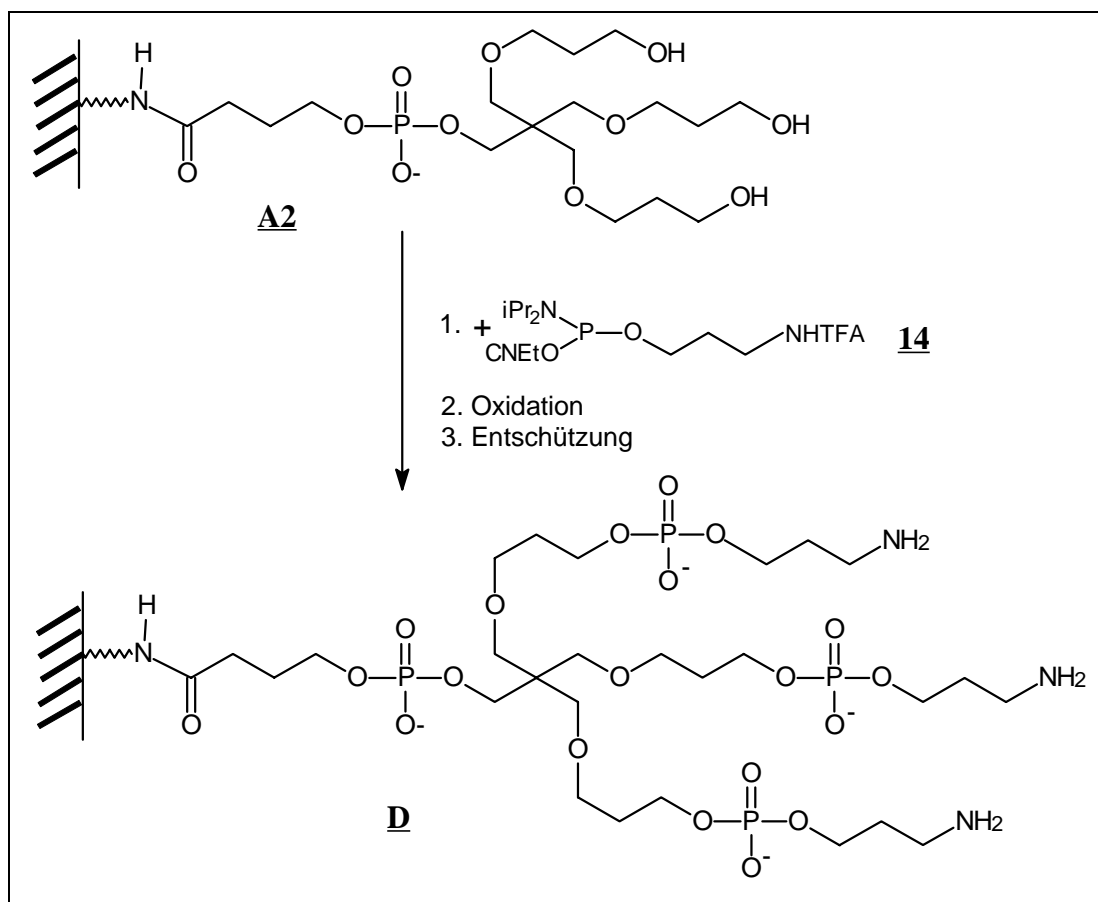


Abb. 5-5: Reaktionsschema zur Kopplung des 5'-Amino-Modifiziers zur Darstellung von Oberfläche **D**

Die im Hochvakuum getrockneten Wafer wurden mit 120 μl einer 5'-Amino-Modifizier-Lösung (2.5 $\mu\text{mol/ml}$) in Acetonitril unter Argon und 12 μl der Tetrazol-Lösung versetzt. Nach einer Stunde Schütteln bei Raumtemperatur wurden die Überstände abgenommen und jeweils dreimal mit Acetonitril, Iod-Lösung, Wasser, 5 %iger Natriumhydrogensulfid-Lösung, Wasser, Ethanol und Dioxan gewaschen.

Die Entschützung der Aminogruppen erfolgte durch einstündige Behandlung der Wafer mit 2 N Natronlauge bei Raumtemperatur unter gleichzeitiger β -Eliminierung der Cyanoethyl-Schutzgruppe.

An der auf diesem Wege modifizierten Oberfläche **D** wurden mit Hilfe des Pikrinsäure-Assays gemittelt 1.143 nmol Aminogruppen pro Wafer gemessen. Dies entspricht einer Dichte von 29 pmol/mm² Aminogruppen.

Der zweite Syntheseweg (vgl. Abb. 5-6) sah die Kopplung des aktivierten trifunktionellen aromatischen Linkers 3,5-Dicarbomethoxyphenoxyessigsäure-p-nitrophenylester **2** an die aminofunktionalisierten Silizium-Wafer vor. Nachdem die aminofunktionalisierten Wafer den entsprechenden Waschschritten unterworfen waren, wurden sie individuell mit DMF/Triethylamin-Lösung (8:1) überschichtet und mit einer 0.1 M 3,5-Dicarbomethoxyphenoxyessigsäure-p-nitrophenylester-Lösung in Dioxan/Pyridin (10:1) versetzt. Nach 20 Stunden Schütteln bei Raumtemperatur wurden die Wafer gewaschen.

Die getrockneten Wafer wurden zur Aminolyse der Methylesterfunktionen mit frisch destilliertem Ethylendiamin versetzt und 16 Stunden bei 4 °C geschüttelt. Die Wafer wurden abschließend mit verschiedenen Lösungsmitteln gewaschen und in Dioxan bei 4 °C gelagert.

Der Reaktionsverlauf wurde mit dem Pikrinsäure-Assay verfolgt. Die einfach funktionalisierten Wafer lieferten in diesem Fall einen Meßwert von 35 pmol/mm², während für die Wafer nach Kondensation des trifunktionellen Linkers und der Aminolyse eine Beladungsdichte von 65 pmol/mm² Aminofunktionen ermittelt wurde. Durch die Einführung des zweiarmigen aromatischen Dendriten konnte folglich eine Erhöhung der Beladungsdichte um 86 % erreicht werden.

Im folgenden Reaktionsschritt wurden die primären Aminogruppen in Hydroxylfunktionen durch Umsetzung mit p-Nitrophenyl-4-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-butyrat **11** überführt (vgl. Abb. 5-4, S. 27). Die Detritylierung erfolgte mit 3 %iger Dichloressigsäure in Dichlormethan und lieferte eine Beladung von 12 pmol/mm².

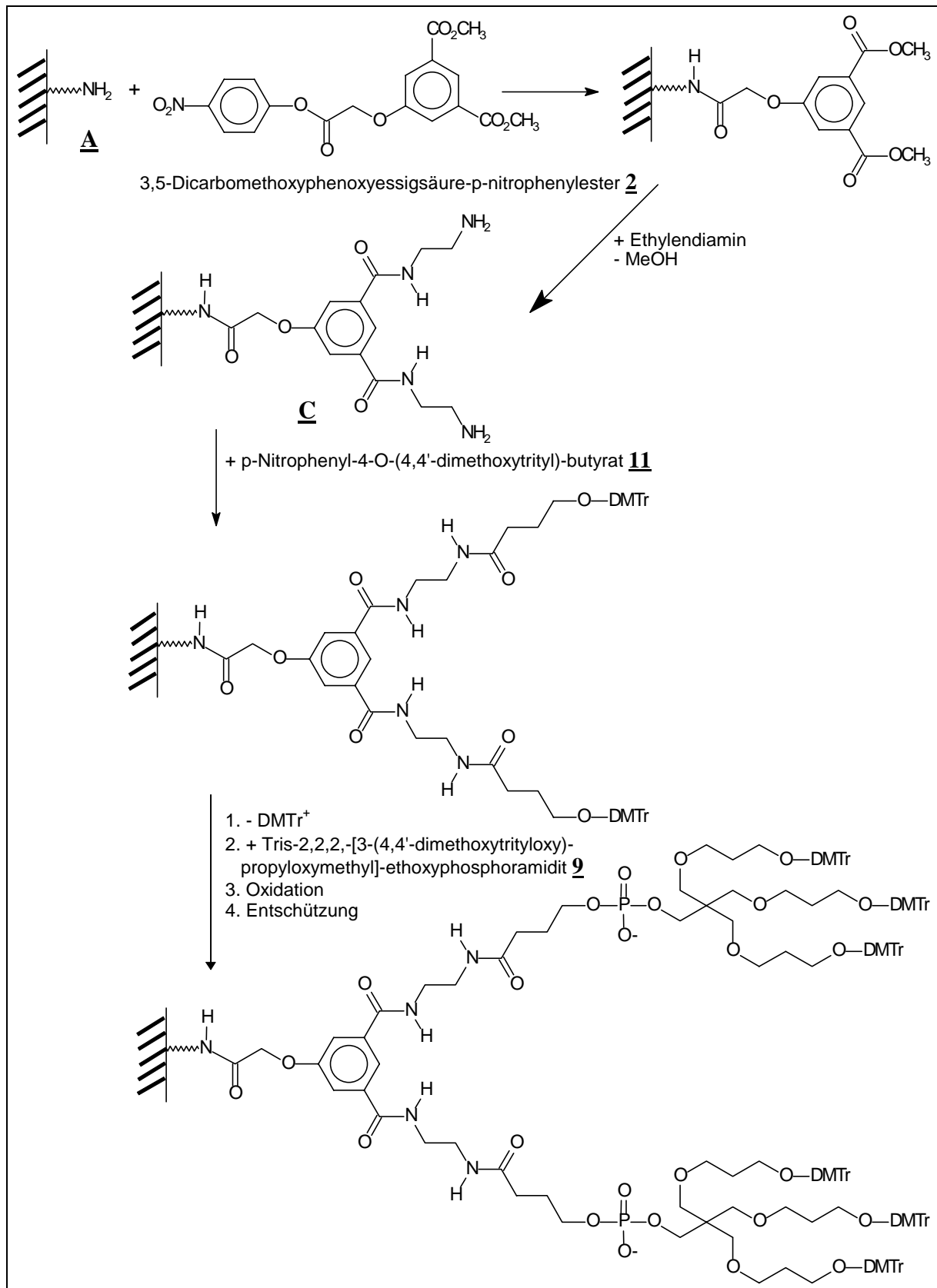


Abb. 5-6: Schema 2 zur Modifizierung der Silizium-Oberfläche

Die freien Hydroxylfunktionen wurden wie bereits oben beschrieben zunächst mit dem dendritischen Amidit-Synthon **9** umgesetzt. Die Detritylierung lieferte hier eine Beladungsdichte von 156 ± 34 pmol/Wafer. Es folgte die Kopplung des 5'-Amino-Modifiers **14** an die freien Hydroxylfunktionen und anschließende Entschützung der Aminogruppen.

Der Pikrinsäure-Assay lieferte für die Oberfläche **E** eine Stoffmenge von 1.722 nmol Pikrat pro Wafer, dies entspricht einer Beladungsdichte von 43 pmol/mm².

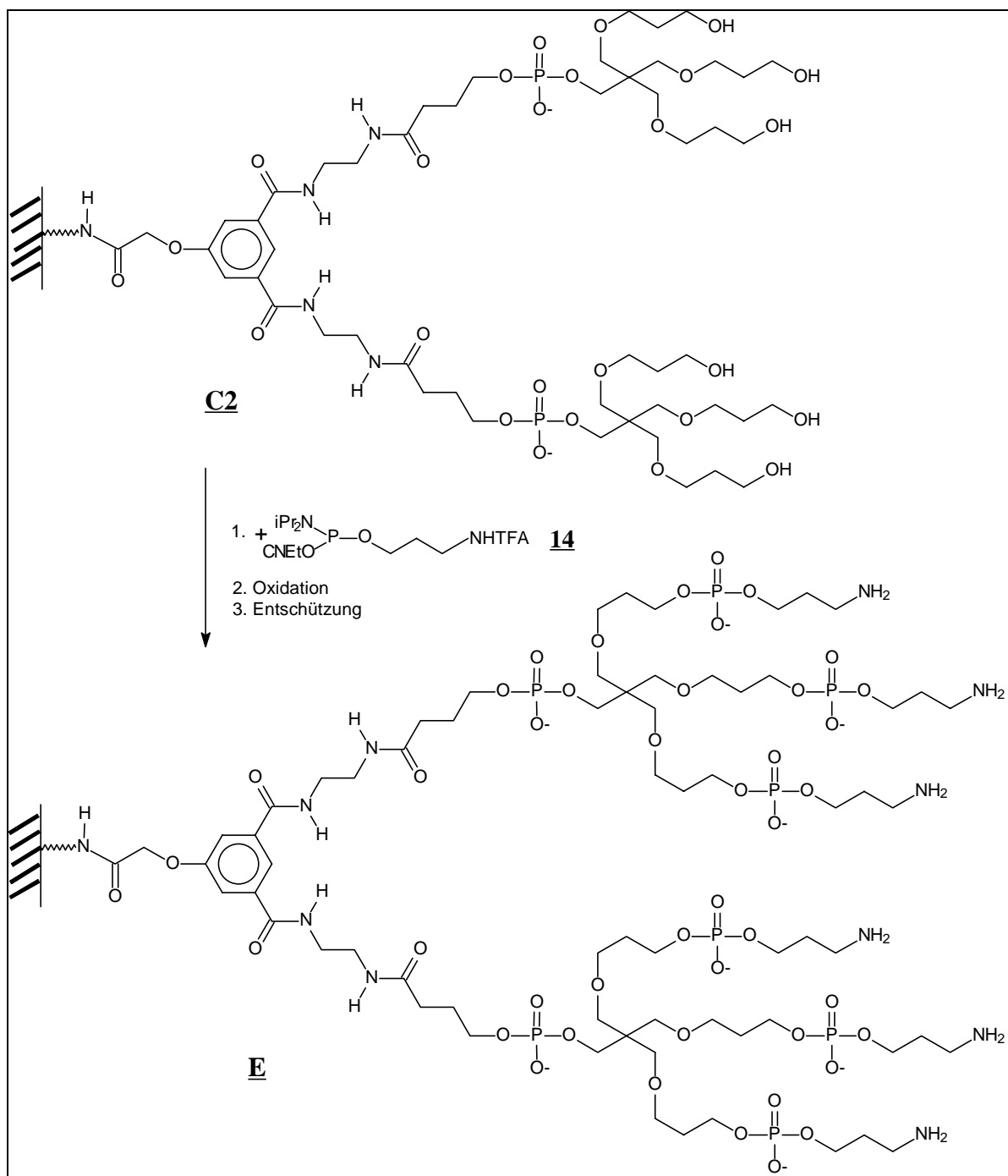


Abb. 5-7: Reaktionsschema zur Kopplung des 5'-Amino-Modifiers **14** zur Darstellung von Oberfläche **E**

Neben der Herstellung dieser verzweigten Oberflächen wurden vergleichend einfache Kopplungsreaktionen an die aminofunktionalisierte Oberfläche **A** durchgeführt.

So wurde die Umsetzung mit p-Nitrophenyl-4-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-butyrat **11** mit einer anschließenden Detritylierung und Kopplungsreaktion mit dem 5'-Amino-Modifizier **14** zur Darstellung der Oberfläche **B** kombiniert (vgl. Abb. 5-8).

Hier lieferte die Detritylierung nach der Kondensation des heterobifunktionellen Linkers **11** eine Beladung von 94 pmol pro Wafer. Nach der Umsetzung mit dem 5'-Amino-Modifizier wurden mit Hilfe des Pikrinsäure-Assays ca. 480 pmol/Wafer bzw. 12 pmol/mm² gemessen.

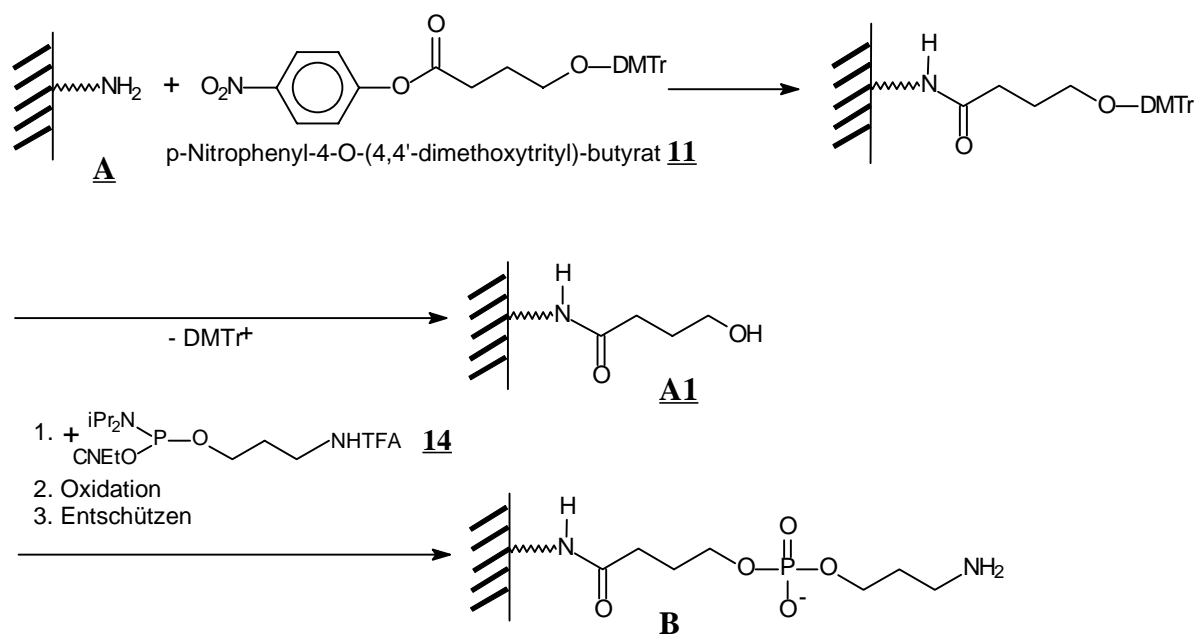
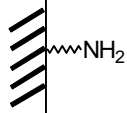
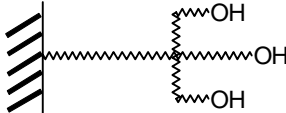
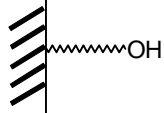
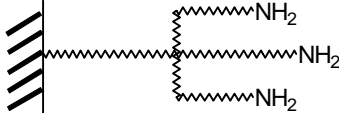
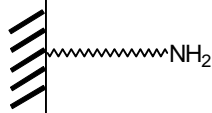
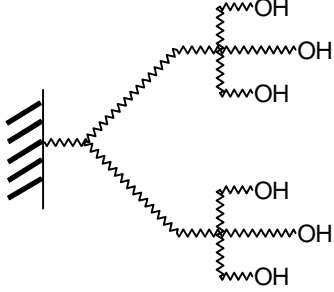
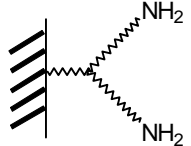
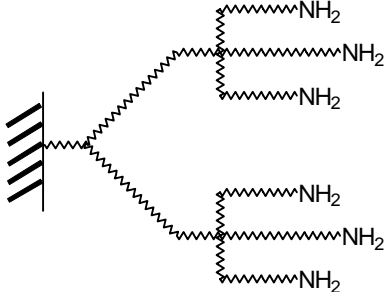
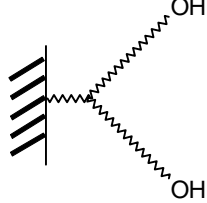
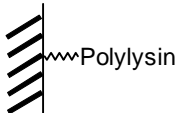


Abb. 5-8: Syntheschema zur Darstellung der Oberfläche **B**

5.3 Vergleich der Beladungsdichten

Abschließend zur Modifikation der Oberflächen durch Kondensation dendritischer Synthons wurden die ermittelten Beladungsdichten verglichen. In Tabelle 5-1 sind die Oberflächenmodifikationen schematisch vereinfacht mit den gemessenen Werten für die jeweilige Anzahl funktioneller Gruppen dargestellt. Die Meßwerte wurden aus zwei grundsätzlich verschiedenen Assays erhalten. Die Quantifizierung der Hydroxylgruppen erfolgte durch die photometrische Bestimmung der abgespaltenen Dimethoxytrityl-

Schutzgruppe. Die der Aminogruppen wurde mit Hilfe des Pikrinsäure-Assays durchgeführt. Die Ergebnisse der beiden Assays können folglich nicht miteinander verglichen werden. Die Beladungsdichten der Hydroxylgruppen sind um den Faktor 10 niedriger als die Werte für die Aminogruppen. Ein Vergleich der Beladungsdichten der Aminogruppen auf den verschiedenen Reaktionsstufen zeigt zunächst, daß von Oberfläche **A** zu Oberfläche **B** eine deutliche Verringerung der Anzahl an Aminogruppen gemessen wird.

Oberflächenmodifikation	Beladungsdichte	Oberflächenmodifikation	Beladungsdichte
A 	45 pmol/mm ² (PA)	A2 	3 pmol/mm ² (DA)
A1 	3 pmol/mm ² (DA)	D 	29 pmol/mm ² (PA)
B 	12 pmol/mm ² (PA)	C2 	4 pmol/mm ² (DA)
C 	65 pmol/mm ² (PA)	E 	43 pmol/mm ² (PA)
C1 	12 pmol/mm ² (DA)	F 	100 pmol/mm ² (PA)

Tab. 5-1: Zusammenstellung der gemessenen Beladungsdichten für unterschiedlich modifizierte Silizium-Oberflächen (PA: Pikrinsäure-Assay, DA: Detritylierungs-Assay)

Es scheint, als würden die beiden Kopplungsreaktionen mit den nötigen Entschützungen bei der Synthese von **B** nicht quantitativ verlaufen und so zu einer Abnahme der von der Oberfläche präsentierten Aminogruppen führen. Würde jeder der vier aufeinanderfolgenden erforderlichen Reaktionsschritte mit einer Umsatzrate von 72 % erfolgen, so führte die Potenzierung zu der gemessenen Dichte von 12 pmol/mm².

Der Vergleich der Werte für die Oberflächen nach der Kondensation von multivalenten Linkern bestätigt die Zunahme der Dichte funktioneller Gruppen. Von Oberfläche **A** zur „verdoppelten“ Oberfläche **C** ist eine deutliche Erhöhung der Werte festzustellen. Die „verdreifachte“ Oberfläche **D** liefert demgegenüber im Vergleich mit **A** einen um 36 % erniedrigten Wert. Hier trägt vermutlich die größere Anzahl der notwendigen Reaktionsschritte, die nicht quantitativ verlaufen, zu einer Potenzierung der Kopplungsfehler bei. Während zur Darstellung von **B** vier Reaktionsschritte erforderlich sind, müssen für **D** sechs Umsetzungen durchgeführt werden. Der Vergleich der „einfachen“ Oberfläche **B** mit der „dreifachen“ **D** zeigt eine deutliche Erhöhung der Beladungsdichte um den Faktor 2.4. Die Kopplung des dendritischen Amidit-Synthons ist demnach erfolgreich verlaufen und hat annähernd zu einer Verdreifachung im Vergleich zu ähnlich modifizierten Oberflächen geführt. Oberfläche **E** weist im Vergleich zu **D** eine weitere Erhöhung der Beladungsdichte um den Faktor 1.5 auf. Die theoretisch erreichbare Verdoppelung wurde nicht erreicht, was vermutlich auf nicht quantitativ verlaufende zusätzlich erforderliche Umsetzungen zurückzuführen ist.

Die durch Kondensation von Polylysin erhaltene Oberfläche **F** liefert mit 100 pmol/mm² die höchste Beladungsdichte an Aminogruppen.

Es muß darauf hingewiesen werden, daß die Vergleiche der Meßwerte des Pikrinsäure-Assays für die unterschiedlichen Oberflächen nur unter dem Vorbehalt erfolgen können, daß der Einfluß der Modifizierung auf die ionische Anbindung des Pikrats an die Aminogruppen unberücksichtigt bleibt. So können unspezifische Wechselwirkungen der eingeführten Linker mit der Pikrinsäure zu einer Verfälschung der Meßwerte führen. Generell wäre die radioaktive Detektion eines entsprechend markierten, sterisch wenig anspruchsvollen Reagenzes den hier durchgeführten photometrischen Verfahren aufgrund der höheren Genauigkeit vorzuziehen.

6 Immobilisierung von Oligonucleotiden an Silizium-Wafer

Die Methoden der kovalenten Anbindung modifizierter Oligonucleotide an feste Phasen sind ursprünglich den Verfahren zur Immobilisierung von Peptiden und Proteinen entlehnt. Grundsätzlich kann eine Verknüpfung zwischen Hydroxyl-, Amino- oder Carboxylgruppen des Trägermaterials mit Thiol^[123,124]-, Hydroxyl-, Amino- oder Carboxylgruppen des zu immobilisierenden Biomoleküls erfolgen. Der eigentlichen Kopplung geht eine Aktivierungsreaktion der entsprechenden funktionellen Gruppen einer der Komponenten, Festphase oder Oligonucleotid bzw. Protein, voraus. Im allgemeinen empfiehlt sich eine Aktivierung der an der Oberfläche eingeführten funktionellen Gruppen, da die Aktivierung der gelösten Komponente zu inter- oder intramolekularen Vernetzung als Nebenreaktion führen kann.

Exemplarisch seien in Abbildung 6-1 (S. 36) die gängigsten Verfahren schematisch kurz vorgestellt. In den ausgewählten Beispielen erfolgt die Kopplung über primäre Amino- bzw. Thiolgruppen des Liganden an die aktivierten Oberflächenfunktionen.

Die Aktivierung von oberflächengebundenen Carboxylgruppen ist sowohl mit Hilfe von Carbodiimiden über die Ausbildung eines o-Acylisoharnstoffderivates (Abb. 6-1, A.) als auch über die Bildung des p-Nitrophenylesters (vgl. Abb. 6-1, B.) möglich. Analog können Carboxylgruppen z.B. der Aminosäureseitenketten eines Proteins in Gegenwart eines Carbodiimids an einen aminofunktionalisierten Träger gebunden werden. Die Verknüpfung erfolgt jeweils unter Ausbildung einer Amidbindung. Desweiteren können Carbonsäureester nach Überführung in die reaktiveren Azide (vgl. Abb. 6-1, C.) unter Ausbildung einer Amidbindung mit Aminogruppen eines Biomoleküls reagieren. Durch die Umsetzung mit Bromcyan (vgl. Abb. 6-1, D.) ist die Aktivierung von Hydroxylgruppen zu Iminocarbonsäurediestern möglich. Nach Einführung eines bifunktionellen Epoxids (vgl. Abb. 6-1, E.) als hydrophilen Spacer gelingt die Anbindung von Aminogruppen an Hydroxylfunktionen unter Ausbildung von sekundären Aminbrücken. Zur Verknüpfung von primären Aminen mit oberflächengebundenen Aminogruppen ist als heterobifunktionelles crosslinking Reagenz N-Succinimidyl-(4-iodoacetyl)-aminobenzoat (SIAB, Abb. 6-1, F.) geeignet, welches nach Kopplung an die Oberfläche eine Iodoacetamido-Gruppe präsentiert, die wiederum mit Thiofunktionen kondensieren kann. Diese Immobilisierungstechnik wurde bereits erfolgreich zur kovalenten Anbindung disulfidmodifizierter Oligonucleotide nach Reduktion an Silizium-Wafer angewandt^[62].

6 Immobilisierung von Oligonucleotiden an Silizium-Wafer

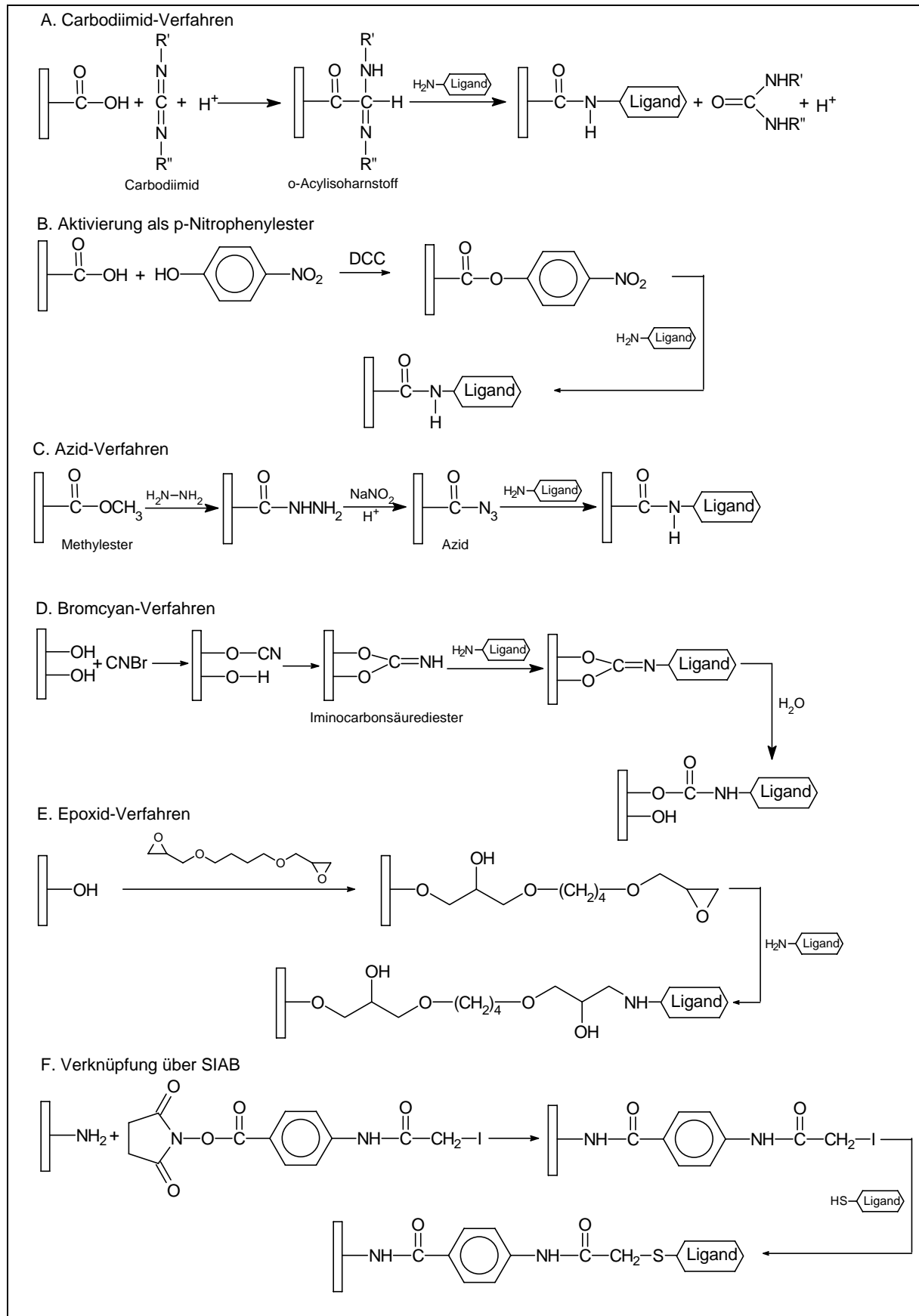


Abb. 6-1: Gebräuchliche Bindungsmethoden zur kovalenten Immobilisierung von Biomolekülen an wasserunlösliche organische und anorganische Träger

In der vorliegenden Arbeit sollte die Verknüpfung aminomodifizierter Oligonucleotide an aminogruppentragende Silizium-Oberflächen erfolgen.

Es wurde daher eine der Sequenzierung mit Hilfe des automatisierten Festphasen-Edman Abbaus^[125-131] entlehnte Immobilisierungstechnik verfolgt. Über die Kopplung des homobifunktionellen Linkers 1,4-Phenylendiisothiocyanat (DITC) können in diesem Verfahren Aminofunktionen der Proteine kovalent an Polystyrol-Träger, mikroporöse Membranen^[132], Glas Fiber Sheets^[133] oder aminopropyliertes poröses Glas^[134,135] immobilisiert werden. Die Immobilisierung 5'-aminomodifizierter Oligonucleotide an mit DITC aktivierte aminopropylierte Glasoberflächen wurde bereits erfolgreich durchgeführt^[18,136].

6.1 Immobilisierung von Oligonucleotiden an modifizierte Silizium-Wafer

Die Versuche zur Immobilisierung von 5'-aminomodifizierten Oligonucleotiden wurden an den nach Kapitel 5 synthetisierten unterschiedlich derivatisierten aminogruppentragenden Silizium-Oberflächen **A** bis **F** sowie an unmodifizierten Silizium-Wafer **Q** durchgeführt, die in der Übersicht in Abbildung 6-3 (S. 38) zusammenfassend dargestellt sind.

Die Aktivierung der aminomodifizierten Oberflächen **A** bis **F** erfolgte durch Umsetzung mit 1,4-Phenylendiisothiocyanat (DITC, vgl. Abb. 6-2). Da generell bei den Kondensationsreaktionen zur Oberflächenmodifikation auf das Capping nicht umgesetzter Bindungsstellen verzichtet wurde, wurden als Kontrolle unmodifizierte Silizium-Wafer **Q** (vgl. Abb. 6-3) in der Aktivierungsreaktion eingesetzt.

Die Reaktion der Aminogruppen mit dem homobifunktionellen Linker wurde in DMF/Pyridin unter Schütteln bei 40 °C durchgeführt.

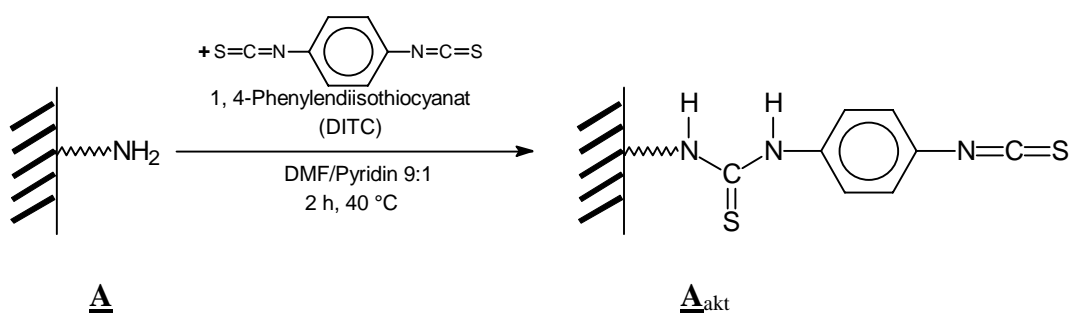


Abb. 6-2: Reaktionsschema zur Aktivierung der aminofunktionalisierten Silizium-Wafer **A** mit 1,4-Phenylendiisothiocyanat zur Oberfläche **A_{akt}**

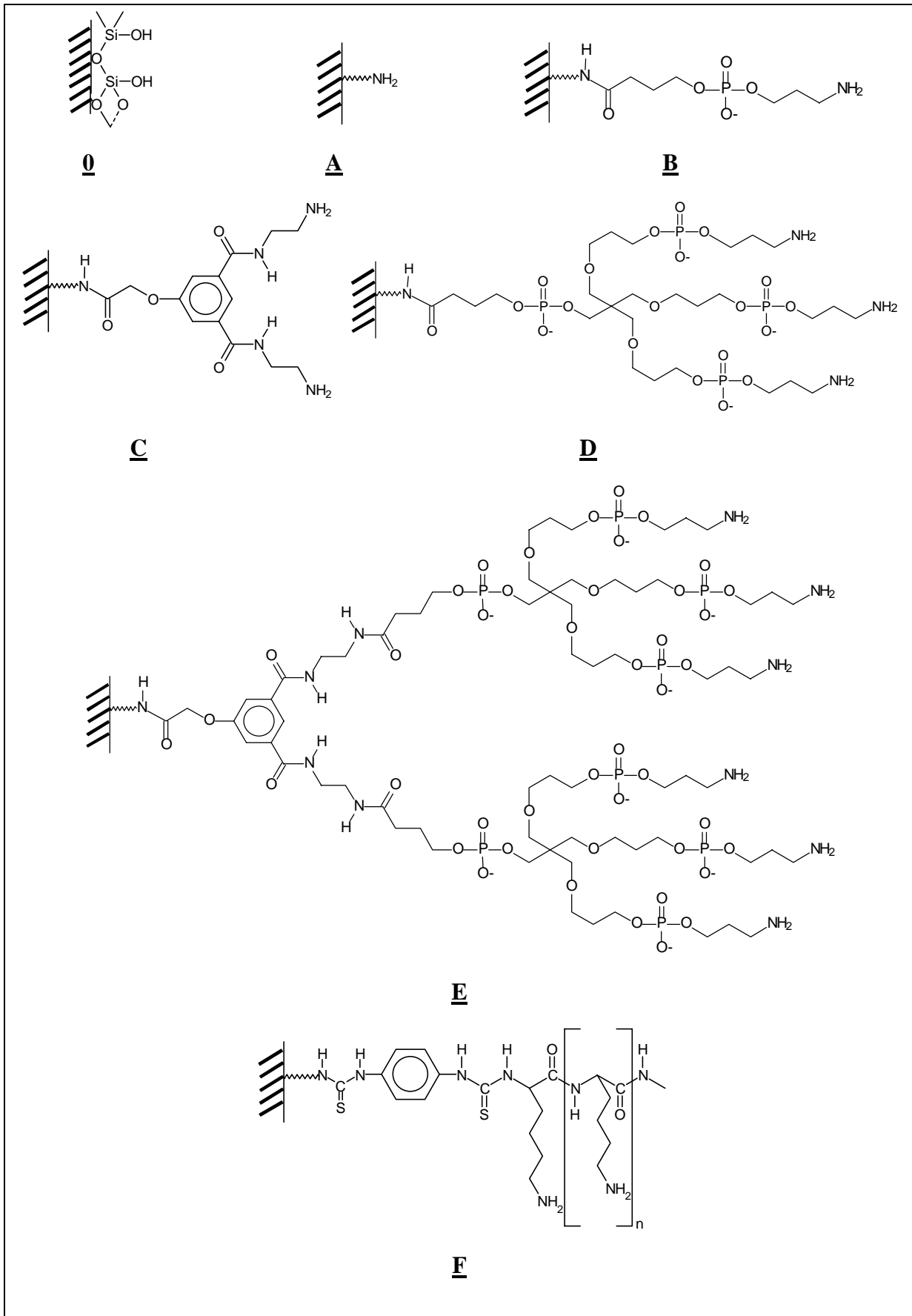


Abb. 6-3: Übersicht der synthetisierten aminofunktionalisierten Silizium-Wafer

Die erfolgreiche Kopplung dieses homobifunktionellen Linkers an die Oberfläche A sowie die Eignung der auf diese Weise aktivierten Silizium-Wafer A_{akt} zur Anbindung von primären Aminogruppen wurden bereits in Kapitel 5.1 untersucht und diskutiert.

Die aktivierten Silizium-Wafer O_{akt} und A_{akt} bis F_{akt} wurden mit DMF, Ethanol und Wasser gewaschen und direkt in der Immobilisierungsreaktion eingesetzt. Zum Nachweis unspezifisch gebundenen Oligonucleotids wurden als weitere Kontrolle nicht-aktivierte aminofunktionalisierte Silizium-Wafer A analog behandelt.

Für die Immobilisierung 5'-aminomodifizierter Oligonucleotide wurden die Silizium-Wafer (A, O_{akt}, A_{akt} bis F_{akt}, vgl. auch Tab. 6-1, S. 54/55) zur Erniedrigung des einzusetzenden Reaktionsvolumens in Reaktionsgefäße, die eine möglichst geringe Auflagefläche der Wafer und die gleichberechtigte Benetzung beider Seiten gewährleisten, überführt und mit je 50 µl einer 8.2 µM Oligonucleotid-Lösung in Kaliumhydrogenphosphat-Puffer (pH 8.0) überschichtet.

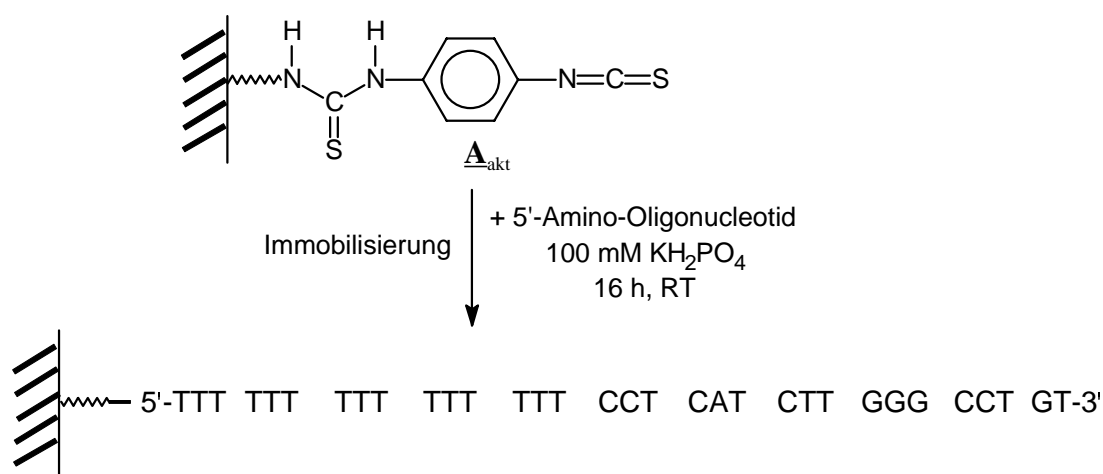


Abb. 6-4: Reaktionsschema zur Immobilisierung aminomodifizierter Oligonucleotide an mit DITC aktivierte Silizium-Oberflächen A_{akt}

Die Reaktion erfolgte über Nacht unter Schütteln bei Raumtemperatur. Die Wafer wurden anschließend mit Wasser gewaschen und dreimal für je 30 Minuten mit einem Hochsalz-Puffer zum Entfernen unspezifisch gebundenen Oligonucleotids bei 65 °C behandelt. Nach erneutem Waschen mit Wasser waren die Silizium-Wafer bei 4 °C lagerfähig und wurden exemplarisch in Primeroligo-Basenverlängerungsreaktionen (*PRimer Oligo Base Extension*, PROBE) auf die Möglichkeit ihrer Verwendung in enzymatischen Reaktionen hin getestet.

6.2 Einsatz der Oligonucleotid-Wafer in enzymatischen Reaktionen

Der Nachweis der erfolgreichen Immobilisierungsreaktion sowie der Eignung der synthetisierten mit Oligonucleotid beladenen Silizium-Wafer in Hybridisierungsexperimenten sollte anhand einer PROBE-Reaktion erbracht werden. Diese Methode hat sich als geeignetes Verfahren zur Detektion von Mutationen^[66,137-139] mittels MALDI-TOF MS etabliert. Während bei der Sequenzierung nach Sanger^[140-142] ein statistischer Abbruch der Kettenverlängerungsreaktion durch den Zusatz eines Didesoxynucleotids erreicht werden soll, wird in diesem Reaktionsansatz ein Desoxynucleotid vollständig durch ein Didesoxynucleotid ersetzt. Dieser Austausch gegen einen Terminator führt zur kontrollierten Unterbrechung der enzymatischen Verlängerung eines an ein Template hybridisierten Primers. Die deutliche Massendifferenz zwischen dem verwendeten Primer und dem Terminationsprodukt erlaubt eine massenspektrometrische Analyse der Reaktionsprodukte mittels MALDI-TOF MS. In dieser Arbeit wurde ein 16mer mit einer Masse von 4988.3 Da als Primer verwendet, welches bei korrekter Hybridisierung und enzymatischer Umsetzung ein um zwei Basen verlängertes Terminationsprodukt der Masse 5630.7 Da liefern sollte.

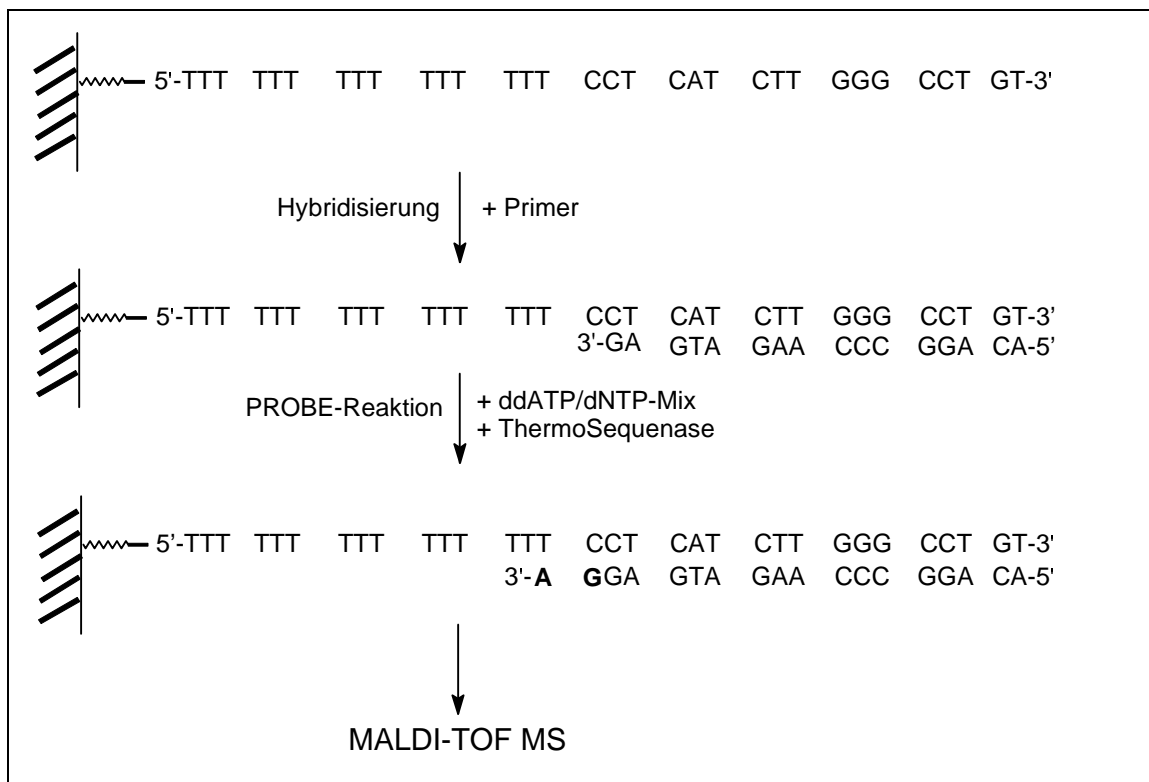


Abb. 6-5: Schematische Darstellung der enzymatischen Reaktion zur Verlängerung des an die Festphase hybridisierten Primers

Die mit Oligonucleotid beladenen Silizium-Oberflächen **A**, **O_{akt}** und **A_{akt}** bis **E_{akt}** wurden in eine Mikrotiterplatte mit flachem Boden überführt und mit jeweils 50 µl einer Reaktionsmischung aus Primer, den Desoxynucleotidtriphosphaten dTTP, dGTP und dCTP sowie dem Didesoxynucleotid ddATP jeweils in einer Endkonzentration von 50 µM und der DNA-Polymerase ThermoSequenase™ überschichtet. Es wurden zwei verschiedene Temperaturprogramme mit unterschiedlichen Zykluszeiten gefahren. Zunächst wurde ein Programm über Reaktionszeiten von 10 Sekunden bei 40 °C und 5 Sekunden bei 72 °C erprobt. Anschließend wurden die Zykluszeiten auf 10 bzw. 5 Minuten ausgedehnt. Nach dem Durchlaufen der Temperaturzyklen wurde auf 25 °C temperiert und die Mikrotiterplatte auf Eis gekühlt. Die Überstände der Reaktionsansätze wurden abgenommen und die Wafer dreimal mit Ammoniumcitrat-Puffer gewaschen. Die Wafer wurden auf einem Probenhalter befestigt und 3-Hydroxypicolinsäure-Lösung als Matrix aufgebracht. Die Matrix-Lösung wurde einerseits manuell mit einem Volumen von 600 nl und andererseits automatisiert mit Hilfe eines Nanoplotters á 6 nl auf die Oberfläche aufgetragen. Zur Überprüfung der PROBE-Reaktion wurden parallel Reaktionen in Lösung durchgeführt. Als Negativkontrolle fungierte ein Reaktionsansatz in Lösung ohne Zusatz des Templates.

In der Makropräparation wurde das unterschiedliche Kristallisationsverhalten der Matrix in Abhängigkeit von der Oberflächenmodifikation deutlich. Besonders die Oberflächen **B_{akt}**, **D_{akt}** und **E_{akt}**, deren Spacer ein Phosphatrückgrat enthält, führten zu einer inhomogenen, gestörten Kristallstruktur. Die durch den aromatischen Kern und Amidbindungen charakterisierte Oberflächenmodifikation **C_{akt}** hingegen lieferte kompakte Kristalle mit der Matrix. Die Kristalle auf der Polylysin-Oberfläche **E_{akt}** waren durch eine gleichmäßige, gerastert erscheinende Struktur gekennzeichnet. Diese unterschiedlichen Kristallformationen erschweren eine vergleichende Interpretation der erhaltenen MALDI-TOF Massenspektren, da durch sie das Desorptionsverhalten der Proben maßgeblich beeinflusst wird.

Um möglichst repräsentative Spektren zu erhalten, wurden jeweils fünf Matrixspots pro Oberfläche für beide Temperaturzyklen aufgebracht und massenspektrometrisch untersucht.

Das MALDI-TOF Massenspektrum liefert das Gesamtergebnis unterschiedlicher Versuchsbestandteile. So werden mit dieser Methode die kovalente Immobilisierung des Template-Stranges an die Oberfläche, die Hybridisierung des Primers an das Template,

eventuelle unspezifische Bindungen des Primers an die Oberfläche sowie die enzymatische Reaktion an dem hybridisierten Primer gleichzeitig nachgewiesen.

Alle Überstände der PROBE-Reaktionen an fester Phase wurden abgenommen und nach Aufreinigung der DNA durch Ethanol-fällung ebenfalls massenspektrometrisch analysiert.

Abbildung 6-6 zeigt zunächst die MALDI-Spektren für Positiv- und Negativkontrollreaktionen (Ia, Ib) in Lösung nach der Aufreinigung mit Hilfe von ZipTips™.

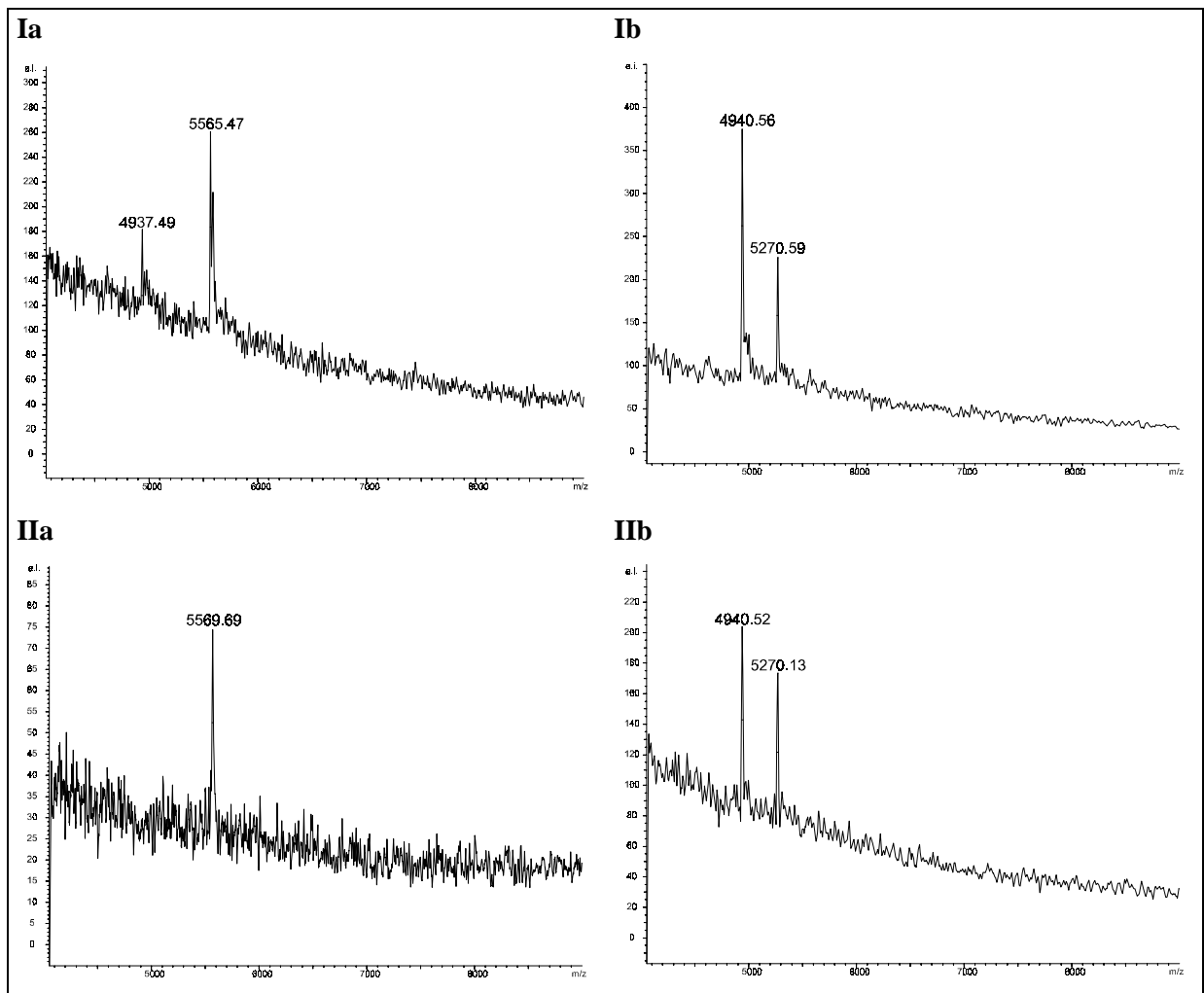


Abb. 6-6: MALDI-TOF Massenspektren der Positiv- und Negativkontrollen in Lösung für kurze und um den Faktor 60 verlängerte Zykluszeiten der PROBE-Reaktion

- Ia:** Positivkontrollreaktion für kurze Zykluszeiten
- Ib:** Negativkontrollreaktion für kurze Zykluszeiten
- IIa:** Positivkontrollreaktion für lange Zykluszeiten
- IIb:** Negativkontrollreaktion für lange Zykluszeiten

ZipTip_{C18} ist eine 10 µl Pipettenspitze, die mit ca. 0.6 µl Harzbett (C18 sphärisches Silica, 15µm, 200 Å Porengröße) am Außenende versehen ist und zum Konzentrieren, Entsalzen

sowie für die Abscheidung von Detergenzien aus biologischen Proben eingesetzt wird und für die Vorbereitung für die Massenspektrometrie geeignet ist.

Die Positivkontrolle zeigt für die PROBE-Reaktion mit kurzen Zykluszeiten deutliche Signale für den eingesetzten Primer bei 4937.49 m/z und das Terminationsprodukt bei 5565.47 m/z. Da den Messungen keine Kalibrierung auf diesen Massenbereich vorausging, sind die konstanten Abweichung von jeweils ca. 50 m/z von den berechneten Werten erklärbar. Für die längeren Zykluszeiten der PROBE-Reaktion zeigt das Spektrum der Positivkontrolle lediglich ein starkes Signal für das Terminationsprodukt. Die Verlängerung der Zykluszeiten hat somit offensichtlich zu einem quantitativen Umsatz des Primers geführt. Die Negativkontrollreaktionen (Abb. 6-6, Ib und IIb) zeigen für beide Zykluszeiten neben dem Signal für den Primer eines um 329.6 Massenzahlen erhöhtes Signal, welches durch die Verlängerung des Primers um ein dGMP (m/z = 329.2 Da) entstanden sein kann. Eventuell hat eine Kontamination mit Template oder ein unspezifischer Einbau zur korrekten Verlängerung geführt.

Die zur Kontrolle eingesetzte ebenfalls mit DITC aktivierte und mit aminomodifiziertem Oligonucleotid umgesetzte belassene Silizium-Oberfläche \mathbf{Q}_{akt} lieferte nach der Sekunden-PROBE-Reaktion keine Signale im MALDI-Spektrum, während sich nach den längeren Zykluszeiten ein Signal für das korrekte Terminationsprodukt (vgl. Abb. 6-7) nachweisen ließ.

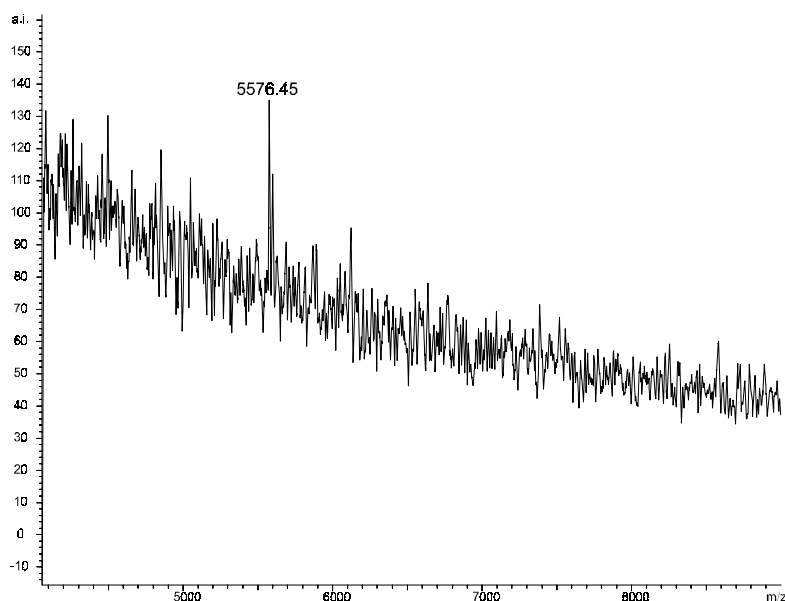


Abb. 6-7: MALDI-TOF Massenspektrum der PROBE-Reaktion mit langen Zykluszeiten an der belassenen Silizium-Oberfläche nach Umsetzung mit DITC (\mathbf{Q}_{akt})

Die Spektren sind durch ein ungünstiges Signal/Rausch-Verhältnis gekennzeichnet. Das Auftreten dieses Signals schwacher Intensität muß auf Anbindungen des Templates zurückgeführt werden, da dies eine Voraussetzung für die Hybridisierung des Primers und damit für die korrekte enzymatische Verlängerungsreaktion ist. Die um den Faktor 60 verlängerten Zykluszeiten scheinen die Produktbildung erst zu ermöglichen. Als Ursachen könnte sowohl die sehr geringe Template-Dichte als auch die durch den direkteren Oberflächenkontakt eingeschränkte enzymatische Aktivität der ThermoSequenase herangezogen werden.

Die Analyse der Reaktionsüberstände (Abb. 6-8) ergab für die kurzen Zykluszeiten lediglich ein Signal sehr starker Intensität für den nicht umgesetzten Primer während für die längeren Reaktionszeiten das korrekte Terminationsprodukt sowie in deutlich geringeren Intensitäten Primer und um nur ein dGMP verlängerter Primer nachweisbar waren.

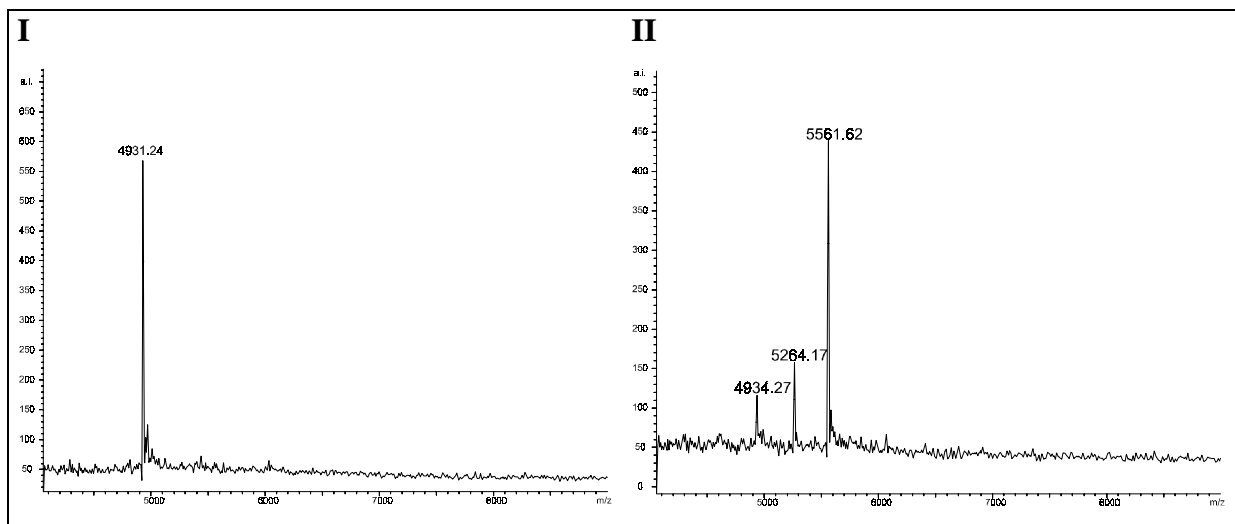


Abb. 6-8: MALDI-Spektren der durch Ethanol-fällung gereinigten DNA aus den Reaktionsüberständen beider PROBE-Reaktionen an Silizium-Oberfläche Q_{akt}

I: Überstand für kurze Zykluszeit

II: Überstand für lange Zykluszeit

Diese Ergebnisse korrelieren mit den Auswertungen der MALDI-Spektren, die direkt von der Oberfläche erhalten wurden. Nach Durchlaufen der kurzen Reaktionszyklen, ist demnach keine enzymatische Verlängerung des Primers erfolgt. Die langen Zykluszeiten hingegen führen zum korrekten Terminationsprodukt. Die stärkere Intensität dieses Produktsignals in Lösung läßt unter Vernachlässigung des unterschiedlichen Desorptionsverhaltens den Schluß zu, daß die Konzentration immobilisierten Templates sehr gering und/oder die Hybridisierung in direkter Oberflächennähe behindert ist. Erst die

verlängerten Zykluszeiten führen zur korrekten Hybridisierung des Primers an das oberflächengebundene Template und damit zur enzymatischen Verlängerung. Das Auftreten des um ein dGMP verlängerten Zwischenproduktes in Lösung ist ein weiterer Hinweis auf die ungünstigen Reaktionsbedingungen. Das Signal kann durch einen Abbruch der enzymatischen Reaktion durch die Oberflächennähe oder durch ein vorzeitiges Denaturieren des um dG-verlängerten Primers begründet sein.

Im folgenden soll die PROBE-Reaktion an den während der Immobilisierungsreaktion eingesetzten nicht-aktivierten, aminofunktionalisierten Silizium-Wafer A betrachtet werden. Mit dieser Oberfläche sollen unspezifische Templateanbindungen an Aminogruppen während der Immobilisierungsreaktion untersucht werden.

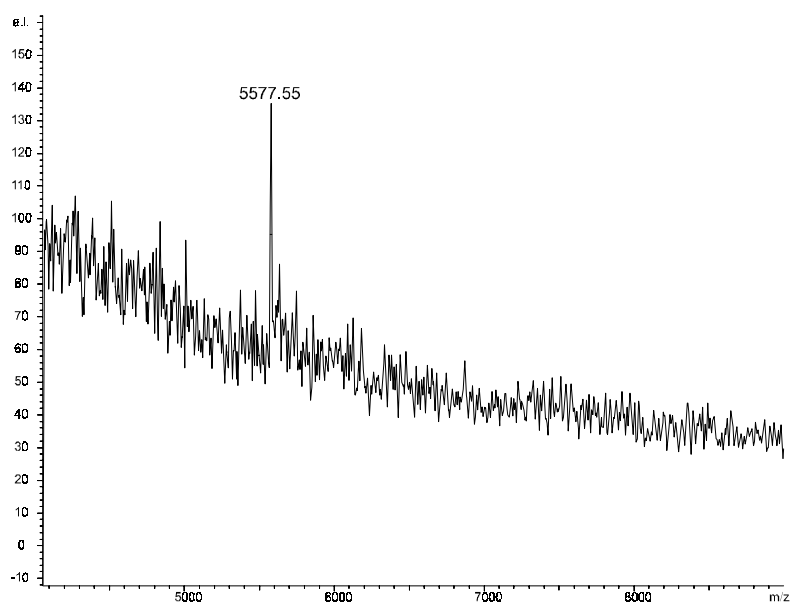


Abb. 6-9: MALDI-TOF Spektrum für die PROBE-Reaktion mit langen Zykluszeiten an der nichtaktivierten aminofunktionalisierten Oberfläche A

Das Spektrum (Abb. 6-9) zeigt ein Signal für das korrekte Terminationsprodukt. Jedoch sind nur geringe Mengen nachweisbar, wie das schlechte Signal/Rausch-Verhältnis dokumentiert. Die aminofunktionalisierte Oberfläche A vermag demnach in geringen Konzentrationen möglicherweise über ionische Wechselwirkungen Template-DNA zu binden, deren Menge ausreicht, um bei entsprechend langen Zykluszeiten zur Produktbildung zu führen. Die Analyse der Überstände bestätigt auch hier das bevorzugte Vorliegen des gebildeten Produkts in Lösung, da die Kapazität gebundener Template-DNA zur Hybridisierung zu gering zu sein scheint. Das Vorliegen, des um dGMP verlängerten

Primers läßt zudem vermuten, daß die enzymatische Aktivität stark eingeschränkt ist, so daß es zur Denaturierung vor vollständiger Kettenverlängerung kommen kann.

Nach diesen Kontrollexperimenten sollen nun die Reaktionen an den unterschiedlich modifizierten mit DITC aktivierten Oberflächen $\underline{\mathbf{A}}_{\text{akt}}$ bis $\underline{\mathbf{F}}_{\text{akt}}$ betrachtet werden.

Die einfachste Oberflächenmodifikation stellt die Aminofunktionalisierung durch Silanisierung dar. Diese mit DITC aktivierten ($\underline{\mathbf{A}}_{\text{akt}}$) und mit aminomodifiziertem Oligonucleotid umgesetzten Wafer zeigten nach einer Reaktion mit kurzen Zykluszeiten starke Signale für den Primer sowie für das korrekt verlängerte Terminationsprodukt im Verhältnis 1 : 1.6 (vgl. Abb. 6-10, Ia).

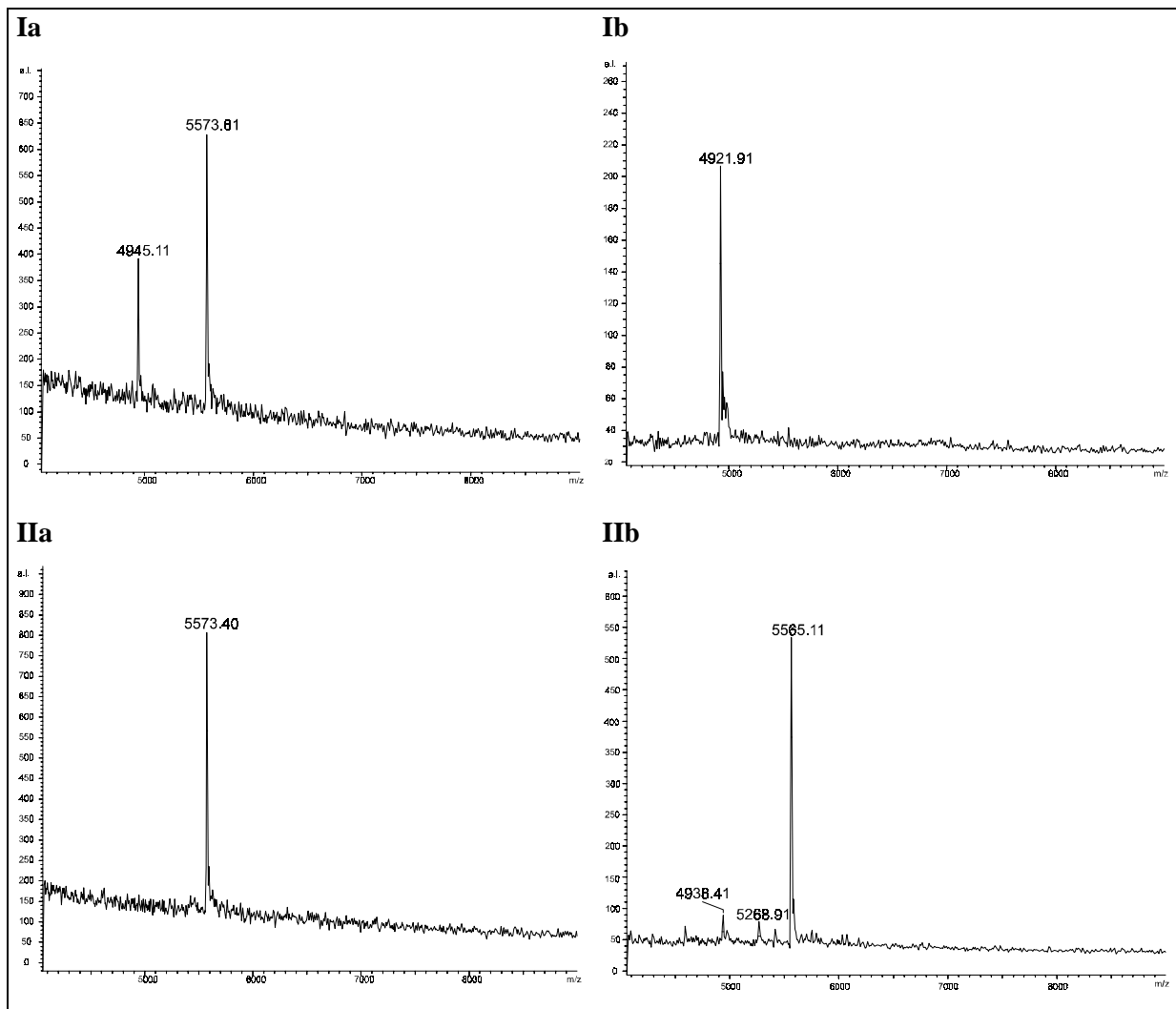


Abb. 6-10: MALDI-TOF Massenspektren der PROBE-Reaktion an Oberfläche $\underline{\mathbf{A}}_{\text{akt}}$

- Ia:** Analyse der Oberfläche nach PROBE-Reaktion mit kurzen Zykluszeiten
- Ib:** Analyse des Überstandes nach PROBE-Reaktion mit kurzen Zykluszeiten
- IIa:** Analyse der Oberfläche nach PROBE-Reaktion mit langen Zykluszeiten
- IIb:** Analyse des Überstandes nach PROBE-Reaktion mit langen Zykluszeiten

Aus dem Überstand ließ sich nicht umgesetzter Primer nachweisen (Abb. 6-10, Ib).

Nach Durchlaufen der langen Zykluszeiten trat im MALDI-TOF-Spektrum lediglich das Signal für das Terminationsprodukt mit sehr großer Intensität auf (IIa). Auch das Spektrum des Überstandes zeigt das Signal des Terminationsproduktes mit der größten Intensität (IIb). Als Nebenprodukte lassen sich hier ebenfalls Primer und der um dGMP verlängerte Primer detektieren (Produkt/Primer+G/Primer 50 : 3 : 4).

Der annähernd quantitative Umsatz des Primers bei langen Zykluszeiten verdeutlicht den geringen Anteil bzw. die geringe Stabilität unspezifischer Wechselwirkungen des Primers mit der Oberfläche. Das Primersignal, welches für die kürzeren Zykluszeiten an der Oberfläche nachgewiesen werden kann, rührt demnach nicht von unspezifischen Anbindungen her sondern ist ursächlich auf mangelnde enzymatische Aktivität zurückzuführen. Wäre auch bei langen Zykluszeiten das Primersignal aufgetreten, so wäre dies ein sicherer Hinweis auf unspezifische Anlagerung des Primers an die Oberfläche, der auf diese Weise dem Reaktionsgleichgewicht entzogen würde.

Die massenspektrometrische Analyse der PROBE-Reaktion an Oberfläche **B_{akt}**, ergibt ein ähnliches Bild, wie die an der Oberfläche **A_{akt}**. Silizium-Wafer **B_{akt}** unterscheiden sich von **A_{akt}** insbesondere durch die Länge des eingeführten Spacers, welcher für **B_{akt}** um 10 Atome verlängert ist. Die veränderten Oberflächeneigenschaften werden zusätzlich durch die Amid- und Phosphatbindung geprägt. Die Anzahl funktioneller Gruppen sollte, quantitative Umsatzraten vorausgesetzt, für beide Oberflächen vergleichbar sein.

Die Massenspektren von der Oberfläche **B_{akt}** nach der PROBE-Reaktion mit kurzen Reaktionszeiten (vgl. Abb. 6-11, Ia) zeigen Signale für das Terminationsprodukt und den Primer. Beide Signale treten jedoch im Vergleich zu denen, die für die Oberfläche **A_{akt}** erhalten wurden (vgl. Abb. 6-10, Ia) mit verminderter Intensität auf. Dies kann auf unterschiedliches Kristallisationsverhalten zurückzuführen sein, welches die Desorption von der Oberfläche **B_{akt}** und damit die Detektierbarkeit der Reaktionsprodukte negativ beeinflusst. Das Verhältnis des Produktsignals zum Primersignal ist im Vergleich zu dem von Oberfläche **A_{akt}** erhaltenen Wert zugunsten der Bildung des Produktes verschoben (Produkt/Primer 2.4 : 1).

Der gegenüber Oberfläche **A_{akt}** verlängerte Spacer, der zu einer Vergrößerung des Abstandes zwischen dem immobilisierten Template und der Silizium-Oberfläche führt, könnte die Ursache für eine erleichterte Hybridisierung des Primers und eine bessere Enzymzugänglichkeit sein. Eine größere Distanz zur Oberfläche wirkt sich andererseits

positiv auf die räumlichen Gegebenheiten aus und vermindert zudem ihren hydrophoben Einfluß auf Desoxyoligonucleotid und Enzym.

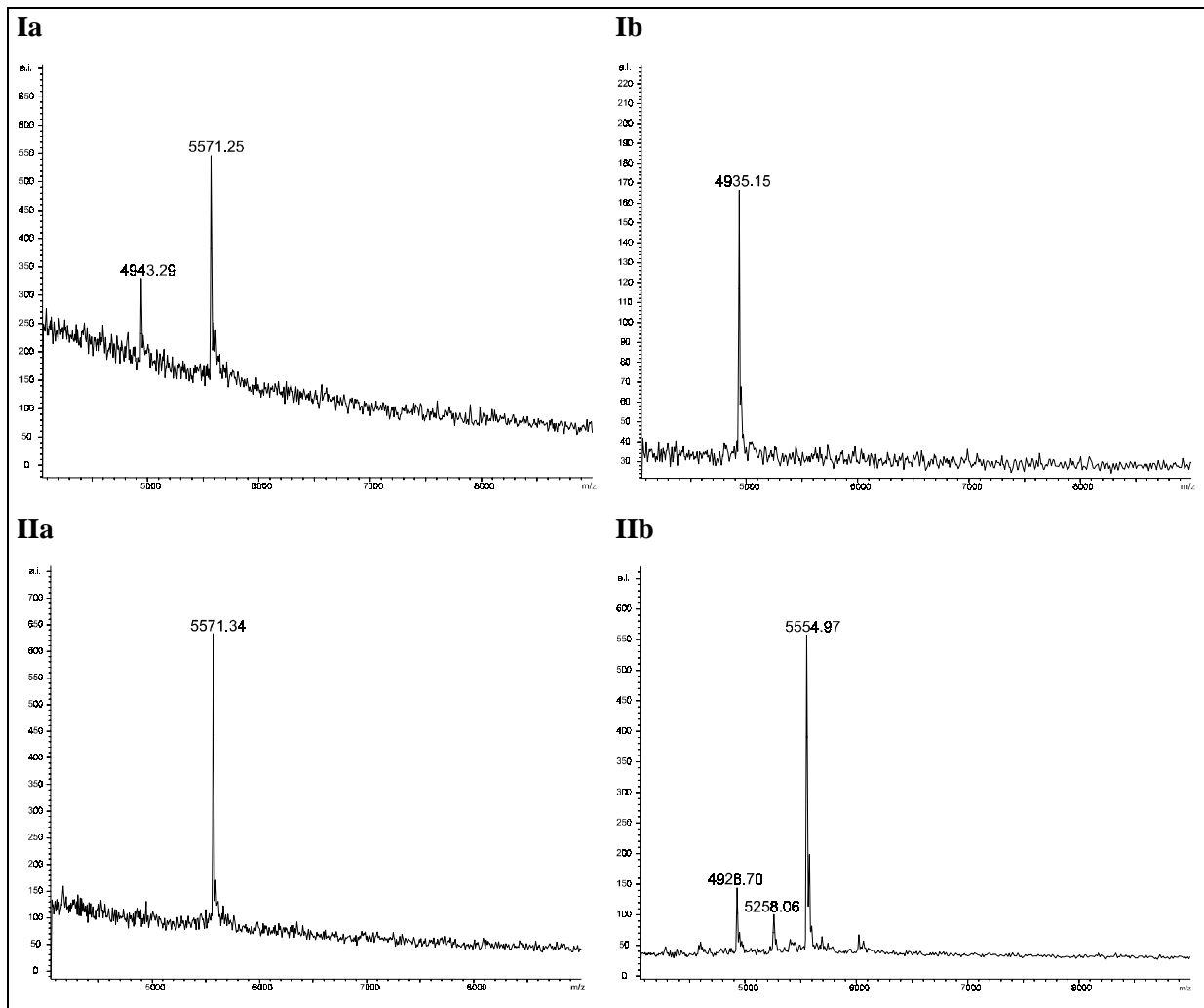


Abb. 6-11: MALDI-TOF Massenspektren der PROBE-Reaktion an Oberfläche **B_{akt}**

- Ia:** Analyse der Oberfläche nach PROBE-Reaktion mit kurzen Zykluszeiten
- Ib:** Analyse des Überstandes nach PROBE-Reaktion mit kurzen Zykluszeiten
- IIa:** Analyse der Oberfläche nach PROBE-Reaktion mit langen Zykluszeiten
- IIb:** Analyse des Überstandes nach PROBE-Reaktion mit langen Zykluszeiten

Im Überstand dieser Reaktion (vgl. Abb. 6-11, Ib) läßt sich auch für Oberfläche **B_{akt}** nicht umgesetzter Primer nachweisen. Die zeitlich verlängerte PROBE-Reaktion liefert an der Oberfläche quantitative Umsätze des Primers zum Terminationsprodukt (vgl. Abb. 6-11, IIa). Im Überstand lassen sich auch hier neben dem Produkt der Primer sowie der um ein dGMP verlängerte Primer in ähnlichen Mengenverhältnissen wie für Oberfläche **A_{akt}** nachweisen.

Mit der Modifizierung des Silizium-Wafers zu Oberfläche **C_{akt}** (vgl. Abb. 6-3, S. 38 u. Tab. 6-1, S. 54/55) sollte der Versuch unternommen werden, die Anzahl der für die

Immobilisierung des Oligonucleotids zur Verfügung stehenden Aminogruppen zu verdoppeln. Die Eigenschaften des eingeführten Spacers sind durch den aromatischen Kern und die Amidbindungen geprägt.

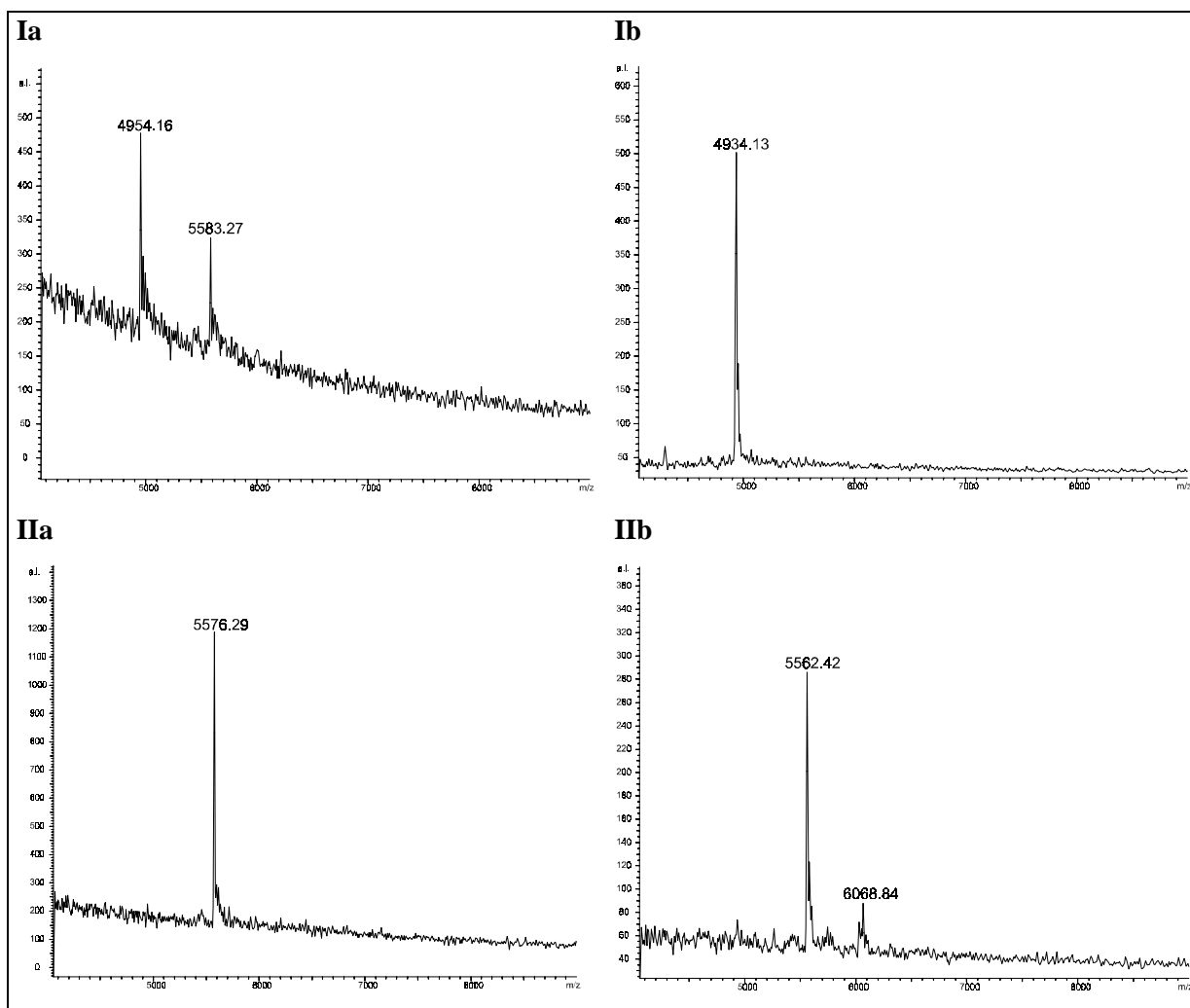


Abb. 6-12: MALDI-TOF Massenspektren der PROBE-Reaktion an Oberfläche C_{akt}

- Ia:** Analyse der Oberfläche nach PROBE-Reaktion mit kurzen Zykluszeiten
- Ib:** Analyse des Überstandes nach PROBE-Reaktion mit kurzen Zykluszeiten
- IIa:** Analyse der Oberfläche nach PROBE-Reaktion mit langen Zykluszeiten
- IIb:** Analyse des Überstandes nach PROBE-Reaktion mit langen Zykluszeiten

Die kürzeren PROBE-Reaktionszyklen liefern im MALDI-Spektrum (vgl. Abb. 6-12, Ia) sowohl Signale für das Produkt als auch für den Primer. In diesem Fall überwiegt jedoch die Intensität des Primersignals gegenüber der des Produktsignals (Produkt/Primer 1 : 3). Im Überstand der Reaktion läßt sich mit starker Intensität der Primer nachweisen. In den verlängerten Zykluszeiten wird hingegen von der Oberfläche und auch aus dem Reaktionsüberstand nur das Produkt mit besonders starker Intensität detektiert. Die quantitative

Umsetzung des Primers scheint an dieser Oberfläche bei langen Zykluszeiten vollzogen zu sein.

Die Modifizierung zu Oberfläche **D** (vgl. Abb. 6-3, S. 38) sollte zu einer Verdreifachung der von der Silizium-Oberfläche präsentierten Aminogruppen führen. Damit verbunden ist zudem im Vergleich zu Oberfläche **A** eine deutliche Verlängerung des Spacers um 20 Atome, die über Phosphat- und Etherbrücken erfolgt ist.

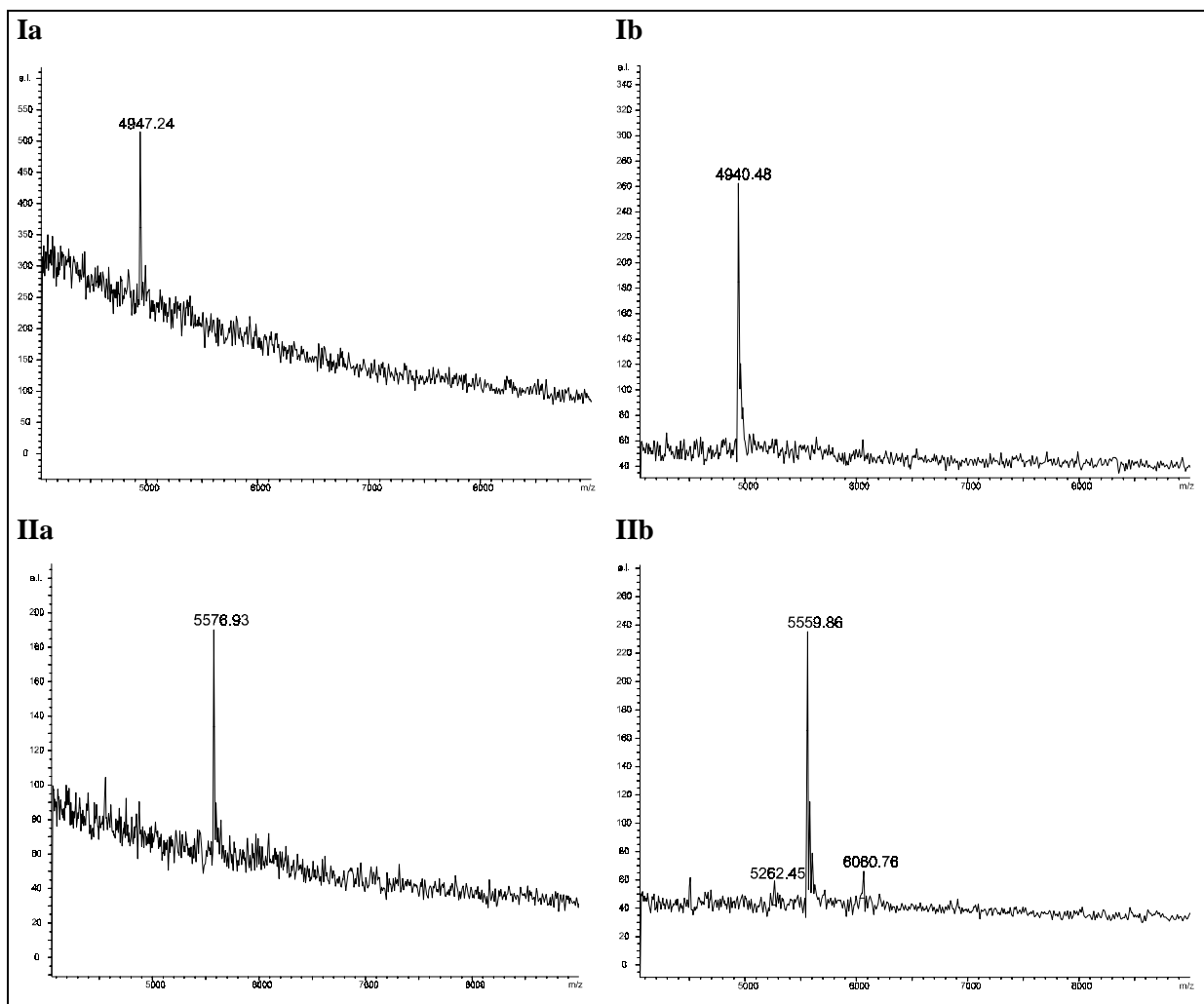


Abb. 6-13: MALDI-TOF Massenspektren der PROBE-Reaktion an Oberfläche **D_{akt}**

- Ia:** Analyse der Oberfläche nach PROBE-Reaktion mit kurzen Zykluszeiten
- Ib:** Analyse des Überstandes nach PROBE-Reaktion mit kurzen Zykluszeiten
- IIa:** Analyse der Oberfläche nach PROBE-Reaktion mit langen Zykluszeiten
- IIb:** Analyse des Überstandes nach PROBE-Reaktion mit langen Zykluszeiten

An dieser Oberfläche ist während der kürzeren Reaktionszeit keine Verlängerung des Primers detektierbar. Von der Oberfläche und aus dem Überstand läßt sich jeweils lediglich der Primer nachweisen. Die Signalintensitäten von der Oberfläche sind zudem gering, was

in der gestörten Kristallstruktur, die damit das Desorptionsverhalten verschlechtert, begründet sein kann. Nach Durchlaufen der längeren Zykluszeiten lassen sich jedoch sowohl von der Oberfläche als auch aus dem Überstand nur Signale für das korrekte Terminationsprodukt erhalten. Auch an dieser Oberfläche ist demnach mit Verlängerung der Zykluszeiten eine quantitative Umsetzung des Primers erfolgt.

Zur Darstellung der Oberfläche **E** (vgl. Abb. 6-3) wurden Kondensationsreaktionen zur Herstellung von Oberfläche **C** und **D** kombiniert. Die Beladungsdichte mit Aminogruppen sollte theoretisch um das Sechsfache gesteigert sein. In diesem Fall ist der Spacer durch den trifunktionellen aromatischen Kern sowie das über Amid- und Phosphatgruppen eingeführte Pentaerythritderivat charakterisiert.

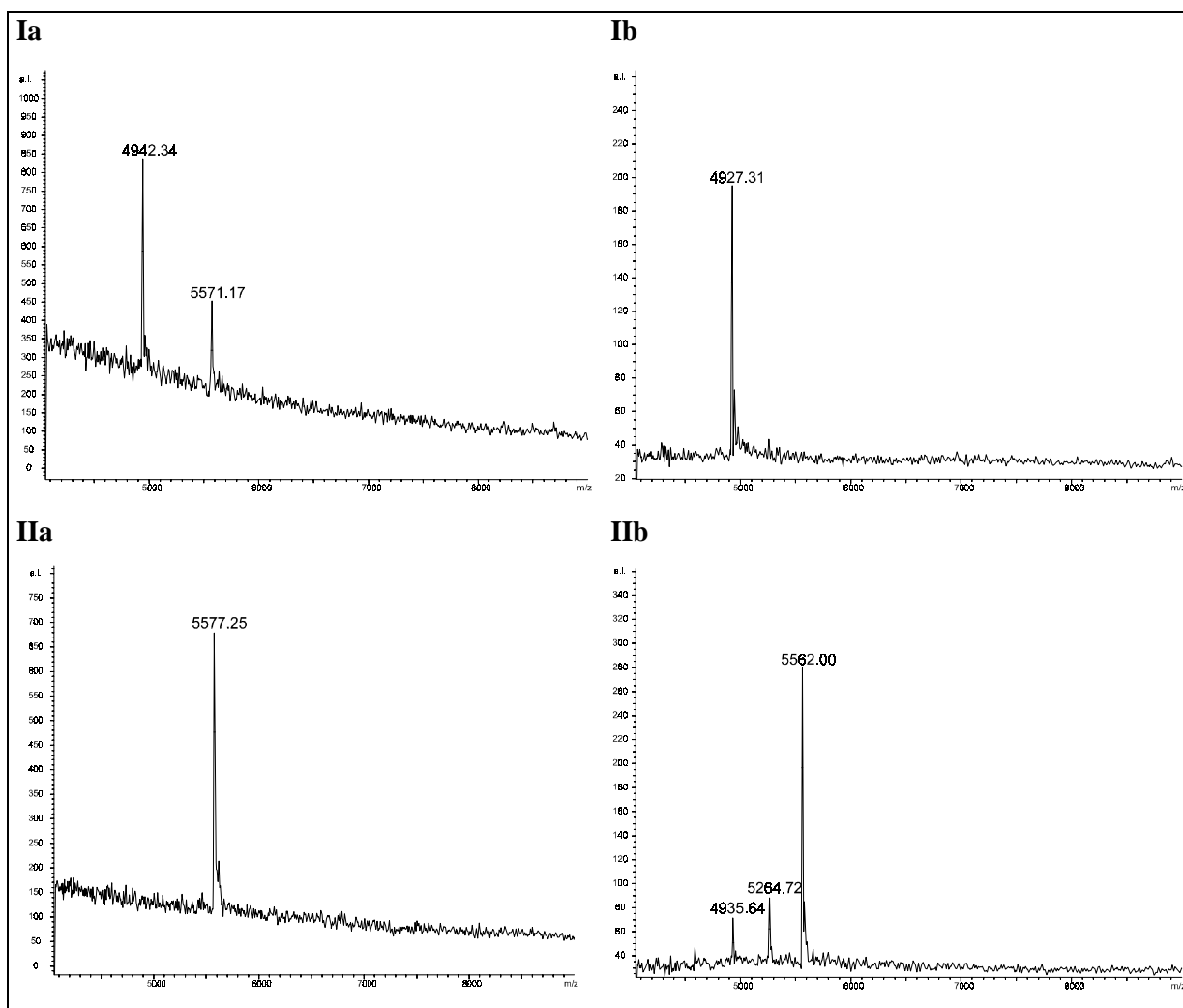


Abb. 6-14: MALDI-TOF Massenspektren der PROBE-Reaktion an Oberfläche **E_{akt}**

- Ia:** Analyse der Oberfläche nach PROBE-Reaktion mit kurzen Zykluszeiten
- Ib:** Analyse des Überstandes nach PROBE-Reaktion mit kurzen Zykluszeiten
- IIa:** Analyse der Oberfläche nach PROBE-Reaktion mit langen Zykluszeiten
- IIb:** Analyse des Überstandes nach PROBE-Reaktion mit langen Zykluszeiten

Auch diese Oberfläche liefert wie bereits Oberfläche \underline{C}_{akt} in der kürzeren PROBE-Reaktion Signale für Primer und Terminationsprodukt, wobei die Intensität des Signals für den Primer um den Faktor Drei stärker ist als das des Produktes (Produkt/Primer 1 : 3, vgl. Abb. 6-14). Aus dem Überstand läßt sich analog der Primer detektieren. Die längere Reaktion führt jedoch auch in diesem Fall zu einem annähernd quantitativen Umsatz. Von der Oberfläche läßt sich nur das Produkt detektieren, während im Überstand auch Primer und der um ein dG verlängerte Primer nachweisbar sind (Produkt/Primer+G/Primer 26 : 6 : 4).

Oberfläche \underline{F} (vgl. Abb. 6-3) unterscheidet sich gravierend von den bisher beschriebenen. In diesem Fall wurde zur Modifizierung ungeordnet polymerisiertes Lysin mit der zur Anbindung des Oligonucleotids gewählten Immobilisierungsstrategie auf die Oberfläche kondensiert.

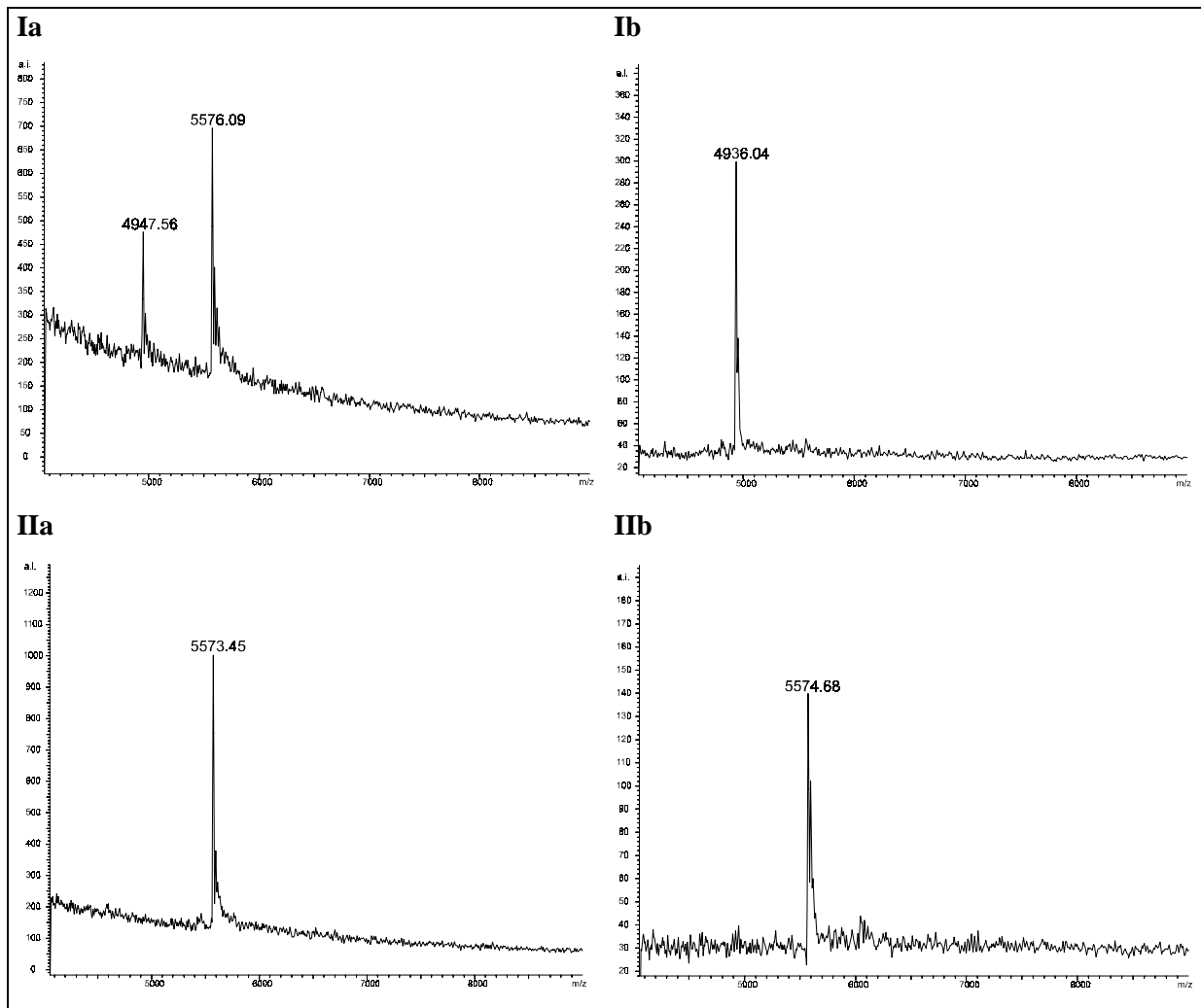


Abb. 6-15: MALDI-TOF Massenspektren der PROBE-Reaktion an Oberfläche \underline{F}_{akt}

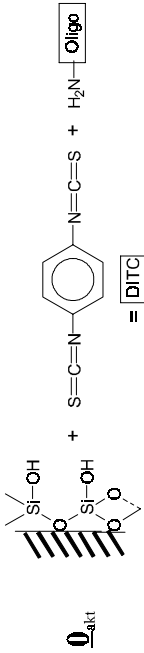
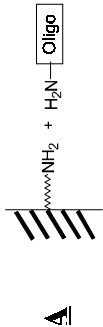
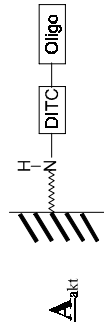
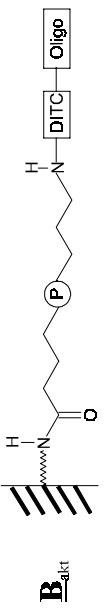
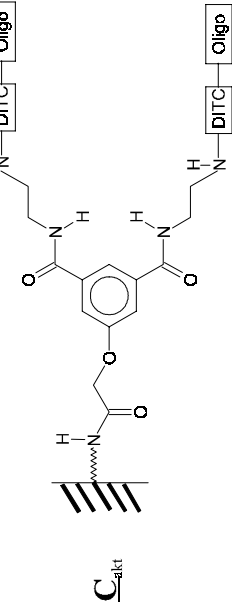
- Ia:** Analyse der Oberfläche nach PROBE-Reaktion mit kurzen Zykluszeiten
- Ib:** Analyse des Überstandes nach PROBE-Reaktion mit kurzen Zykluszeiten
- IIa:** Analyse der Oberfläche nach PROBE-Reaktion mit langen Zykluszeiten
- IIb:** Analyse des Überstandes nach PROBE-Reaktion mit langen Zykluszeiten

Auch für diese Oberfläche traten in den Spektren (vgl. Abb. 6-15) nach der Sekunden-PROBE-Reaktion sowohl Signale für das Produkt als auch für den Primer auf, wobei das Produkt im Überschuß vorlag (Produkt/Primer 2 : 1). Aus dem Überstand wurde ein starkes Signal für den Primer erhalten.

Die verlängerten Zykluszeiten hatten auch für die Polylysin-Oberfläche eine quantitative Umsetzung des Primers zum Terminationsprodukt zur Folge. Wie auch für die Oberflächen **C_{akt}** und **D_{akt}** ließ sich auch hier aus dem Überstand nur Produkt nachweisen. Besonders auffällig war für diese Oberfläche, daß ohne langwierige Suche nach einem „sweet-spot“ optimale Spektren mit Signalen sehr hoher Intensität erhalten werden konnten.

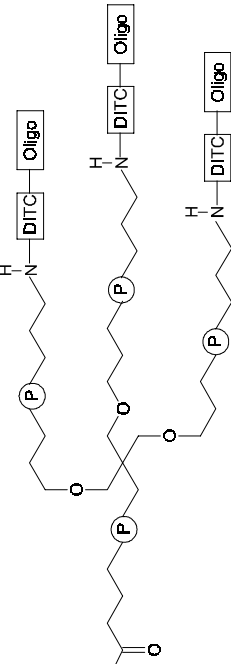
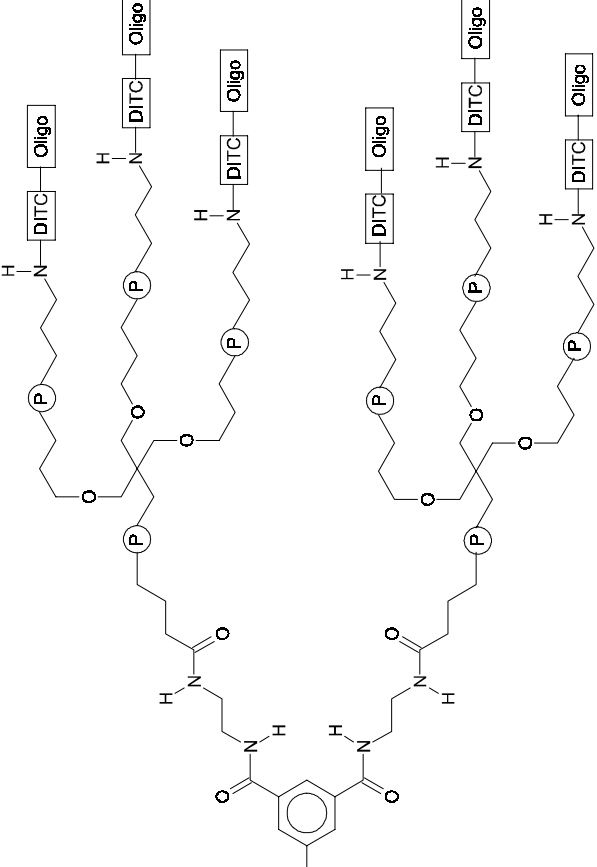
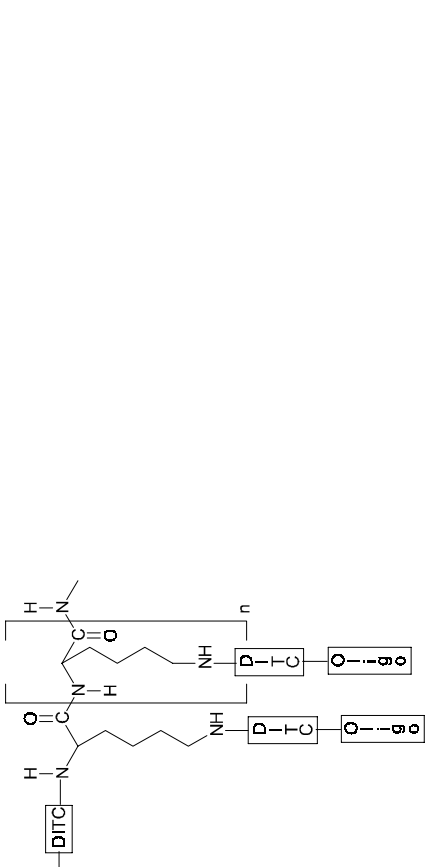
Die MALDI-TOF Massenspektren bestätigen insgesamt die erfolgreiche Immobilisierung des aminomodifizierten Oligonucleotids an alle modifizierten Oberflächen. In Tabelle 6-1 (s. S. 54/55) sind die Ergebnisse der Auswertungen der PROBE-Reaktion an den verschiedenen Oberflächen in einer Übersicht zusammengestellt.

An allen Oligonucleotid-Wafer ist die Hybridisierung des Primers und die Verlängerung zum korrekten Terminationsprodukt erfolgt. Nach Durchlaufen der langen Zykluszeiten der PROBE-Reaktion ist an allen Oberflächen ein quantitativer Umsatz erreicht. Die Unterschiede der enzymatischen Reaktion an den verschiedenen modifizierten Oberflächen lassen sich lediglich anhand der Spektren für die kurzen Zykluszeiten festmachen. Aus den Reaktionsüberständen läßt sich für alle Ansätze nur nicht umgesetzter Primer detektieren, d.h. daß bei den kurzen Zykluszeiten noch keine Denaturierung des Reaktionsproduktes von der Oberfläche nachweisbar ist. Die massenspektrometrische Analyse von der Oberfläche liefert also direkten Aufschluß über die gesamten Vorgänge der enzymatischen Verlängerungsreaktion. Lediglich für Oberfläche **D_{akt}** läßt sich nach Durchlaufen der kurzen Reaktionszeiten keine Umsetzung des Primers detektieren. Die anderen Oberflächen unterscheiden sich in ihren Umsatzraten. Oberfläche **B_{akt}** und Oberfläche **F_{akt}** liefern mit einem Primer/Produkt-Verhältnis von 1 : 2.4 bzw. 1 : 2 die höchsten Umsatzraten.

Oberflächenmodifikation	kurze Zyklen		lange Zyklen	
	Oberfläche m/z	Überstand m/z	Oberfläche m/z	Überstand m/z
Positivkontrollreaktion in Lösung	-	4937.49 5565.47	-	5569.69
Negativkontrollreaktion in Lösung	-	4940.56 5270.59	-	4940.52 5270.13
	n. n.	4931.24	5576.45	4934.27 5264.17 5561.62
	n. n.	n. n.	5577.55	n. n.
	4945.11 5573.61 Primer/Produkt: 1 : 1.6	4921.91	5573.40	4938.41 5268.91 5565.11
	4943.29 5571.25 Primer/Produkt: 1 : 2.4	4935.15	5571.34	4928.70 5258.06 5554.97
	4954.16 5583.27 Primer/Produkt: 3 : 1	4934.13	5576.29	5562.42

Tab. 6-1: Übersicht der Auswertung der MALDI-Spektren nach der PROBE-Reaktion mit an

6 Immobilisierung von Oligonucleotiden an Silizium-Wafer

 <p>D_{akt}</p>	4947.24	4947.24	5262.45 5559.86
 <p>E_{akt}</p>	4942.34 5571.17 Primer/Produkt: 3 : 1	4927.31	4935.64 5264.72 5562.00 5577.25
 <p>F_{akt}</p>	4947.56 5576.09 Primer/Produkt: 1 : 2	4936.04	5574.68

unterschiedlich modifizierte Silizium-Wafer immobilisiertem Template

Für die Unterschiede, die die MALDI-TOF Massenspektren für das Reaktionsverhalten an verschiedenen Oberflächen dokumentieren, kann eine Vielzahl von Faktoren verantwortlich sein. Die Grundvoraussetzung für Hybridisierung des Primers besteht in der erfolgreichen Immobilisierung des Templates an die Oberfläche. Bereits für die Immobilisierungsreaktion spielen die Charakteristika der Oberflächenmodifikation eine wichtige Rolle. So erschweren negativ geladene hydrophobe Spacer die Annäherung des Oligonucleotids. Darüber hinaus bestimmen sterische Effekte die Umsatzrate der Kondensationsreaktion. Einen wesentlichen Faktor stellt die Beladungsdichte des immobilisierten Templates dar. Eine zu geringe Beladungsdichte könnte durchaus geringere Umsatzraten zur Folge haben. Jedoch auch der umgekehrte Fall, eine zu hohe Beladungsdichte, könnte zu einer Abnahme der Umsatzrate führen, da eine zu dichte Belegung der Oberfläche mit Template die Hybridisierungsrate vermindern und zudem zu einer erschwerten Zugänglichkeit für das Enzym führen kann.

Neben der Länge der eingeführten Spacer und dem damit verbundenen Abstand des immobilisierten Stranges von der hydrophoben Silizium-Oberfläche spielt auch die Polarität dieses Spacers eine entscheidende Rolle. Zu kurze Spacer mit hydrophoben Eigenschaften erschweren die räumliche Annäherung des Primers und der Polymerase.

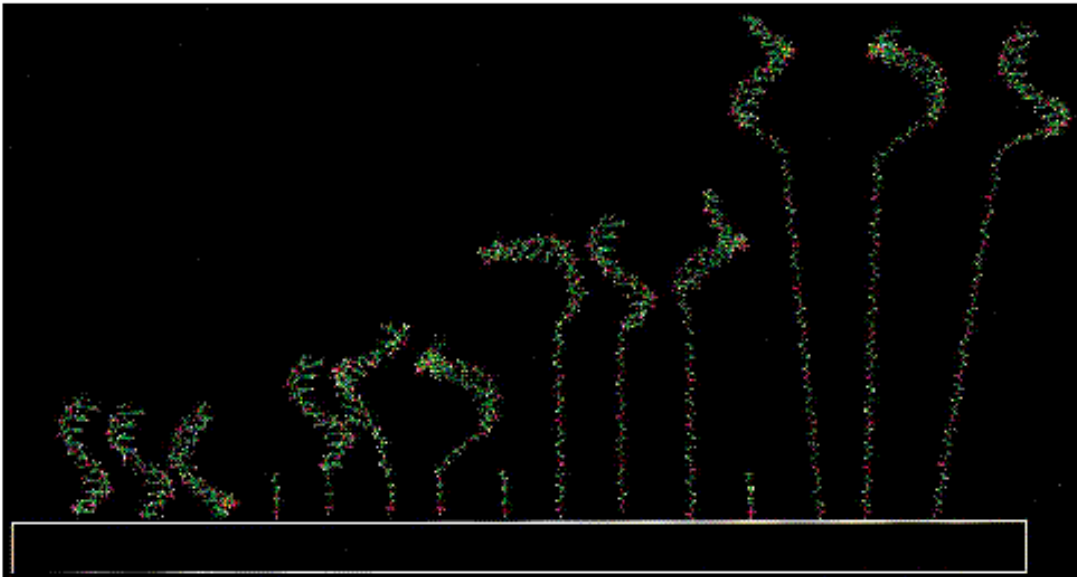


Abb. 6-16: Darstellung eines über unterschiedlich lange Spacer immobilisierten Templates^[143]

Im Verlauf dieser Arbeit konnte anhand von in Gegenwart unmodifizierter Silizium-Wafer durchgeführten PCR-Reaktionen gezeigt werden, daß die Anwesenheit der Oberfläche zu einem Verlust enzymatischer Aktivität der DNA-Polymerase führte. Daraus folgt, daß die Länge des Spacers und der daraus resultierende Abstand des Substrates von der Oberfläche entscheidend für die enzymatische Reaktion ist. Abbildung 6-16 illustriert die Zunahme der Flexibilität und damit der Zugänglichkeit eines immobilisierten Templates in Abhängigkeit von der Spacerlänge.

Die beschriebene Vielfalt möglicher Ursachen für das unterschiedliche Verhalten der Oberflächen $\underline{\mathbf{A}}_{\text{akt}}$ bis $\underline{\mathbf{F}}_{\text{akt}}$ erschwert eine Interpretation der Ergebnisse, da keiner der Faktoren separat betrachtet und analysiert werden kann.

Die Oberfläche $\underline{\mathbf{B}}_{\text{akt}}$ und $\underline{\mathbf{F}}_{\text{akt}}$, die nach Ablauf der kurzen PROBE-Reaktion zu den besten Umsatzraten führten, unterscheiden sich gravierend in ihrer Modifikation. Während Oberfläche $\underline{\mathbf{B}}_{\text{akt}}$ keinerlei Verzweigung am Spacer aufweist und, quantitative Kopplungsausbeuten vorausgesetzt, die gleiche Beladungsdichte an Aminogruppen wie die einfach funktionalisierte Oberfläche $\underline{\mathbf{A}}_{\text{akt}}$ aufweisen sollte, ist Oberfläche $\underline{\mathbf{F}}_{\text{akt}}$ durch eine ungeordnete dendritische Topologie des Spacers gekennzeichnet. Die Beladungsdichte mit Aminogruppen ist für Oberfläche $\underline{\mathbf{F}}_{\text{akt}}$ deutlich erhöht. Für Oberfläche $\underline{\mathbf{B}}_{\text{akt}}$ ist zudem das anionische Phosphatrückgrat charakteristisch. Inwieweit die einzelnen Unterschiede der beiden Oberflächen sich mit ihren positiven und negativen Effekten zu der Endbeobachtung, dem Massenspektrum, addieren läßt sich nicht festmachen.

Der Vergleich des Resultats von Oberfläche $\underline{\mathbf{A}}_{\text{akt}}$ mit dem von Oberfläche $\underline{\mathbf{B}}_{\text{akt}}$ bestätigt die Bedeutung der Spacerlänge und des anionischen Phosphatrückgrats; die Bedeutung eines Unterschiedes in der Beladungsdichte mit Aminogruppen kann hier vernachlässigt werden. Offensichtlich begünstigt die Einführung des Spacers zur Oberfläche $\underline{\mathbf{B}}_{\text{akt}}$ die Umsatzrate des Primers zum Terminationsprodukt. Ob dies auf eine bessere Zugänglichkeit der aktivierten Aminogruppen für das aminomodifizierte Oligonucleotid während der Immobilisierung, der Zugänglichkeit des Templates für den Primer während der Hybridisierung oder aber auf einen positiven Einfluß der Modifikation auf die enzymatische Reaktion selbst zurückzuführen ist bleibt offen.

Ein Vergleich der unterschiedlichen an der Oberfläche eingeführten Verzweigungen, die zu einer Vervielfältigung der Beladungsdichte führen sollten, kann durch die Betrachtung der Ergebnisse aus den PROBE-Reaktionen an den Silizium-Wafer $\underline{\mathbf{C}}_{\text{akt}}$, $\underline{\mathbf{D}}_{\text{akt}}$ und $\underline{\mathbf{E}}_{\text{akt}}$ (s. Tab. 6-1, S. 54/55) erfolgen. Während mit der Oberfläche $\underline{\mathbf{C}}$ eine Verdoppelung der

Beladungsdichte erreichbar wäre, sollte mit Wafer **D** und **E** eine Steigerung der Oberflächenfunktionalität um den Faktor Drei bzw. Sechs erfolgt sein. Für die kurzen Zykluszeiten der PROBE-Reaktion wurde an den Oberflächen **C_{akt}** (vgl. Abb. 6-12, S. 49) und **E_{akt}** (vgl. Abb. 6-14, S. 51) die Umsetzung des Primers zum Terminationsprodukt mit einem jeweiligen Intensitätsverhältnis von 3 : 1 beobachtet. An dem Silizium-Wafer **D_{akt}** ist unter diesen Bedingungen noch keine Verlängerung detektierbar. Diese Ergebnisse erscheinen nicht verständlich, sofern sie nur unter dem Aspekt der Beladungsdichten betrachtet werden. Es erscheint zunächst nicht verständlich, daß eine Verdreifachung der Oberflächenfunktionalität wie sie Wafer **D** aufweisen sollte, im Vergleich zu der Verdoppelung an Oberfläche **C** und der Steigerung der Beladungsdichte um den Faktor Sechs an Oberfläche **E** zu schlechteren Umsetzungen führen sollte. Wäre mit der Verdreifachung schon eine zu Dichte Beladung erreicht, deren sterische Hinderung zu erniedrigten Umsatzraten während der Aktivierung, Immobilisierung, Hybridisierung und/oder enzymatischen Reaktion führt, so dürfte eine weitere Zunahme der von der Oberfläche präsentierten funktionellen Gruppen an Oberfläche **E** keine besseren Ergebnisse liefern. Beim Vergleich dieser drei Oberflächen sind somit auch weitere Faktoren wie die Länge und Eigenschaften des jeweils eingeführten Linkers sowie unvollständige Kopplungsraten während der Modifizierungen der Oberflächen zu berücksichtigen. Beim Übergang von Oberfläche **C** über **D** zu **E** nimmt die Anzahl der zur Modifizierung nötigen Reaktionsschritte, die damit verbundenen Verluste der Umsatzraten, die Länge des Linkers und dessen anionischer Charakter zu. Um diese Faktoren differenzierter betrachten zu können und einen alleinigen Zusammenhang zur Beladungsdichte herstellen zu können wären Untersuchungen an weiteren Oberflächen notwendig.

Insgesamt ist die gewählte Immobilisierungsstrategie mit der Einführung von 1,4-Phenylendiisothiocyanat zur Aktivierung an Silizium gebundener Aminogruppen zur kovalenten Anbindung eines aminomodifizierten Oligonucleotids geeignet. Als Ergebnis dieser Untersuchungen läßt sich darüberhinaus festhalten, daß auf Capping-Schritte verzichtet werden kann, da für alle Oberflächen der Anteil unspezifisch gebundenen Primers vernachlässigbar ist. Die einfach modifizierte Oberfläche **A_{akt}** führt bereits zu eindeutigen Untersuchungsergebnissen, d.h die eingeführten Modifikationen bieten für die gewählte Versuchsanordnung keine entscheidenden Vorteile.

Zur Quantifizierung der Beladungsdichte an immobilisierten Oligonucleotid wären vergleichende Experimente mit z.B. radioaktiv markierten Nucleotiden erforderlich.

7 Alkalische Phosphatase

7.1 Eigenschaften und Bedeutung der Alkalischen Phosphatase

Die Phosphatasen^[144] bilden eine große Klasse strukturell und mechanistisch unterschiedlicher Enzyme, die die Hydrolyse von Phosphomonoestern katalysieren. Phosphorsäureester und die sie metabolisierenden Enzyme spielen eine beachtliche Rolle in einer Reihe wichtiger biologischer Prozesse wie der RNA/DNA-Reparatur und -Synthese, der Signaltransduktion, dem Phospholipidmetabolismus, der Energiespeicherung, der Transkriptionskontrolle, der Proteinaktivierung/-deaktivierung, der Zelltransformation sowie einer Reihe weiterer biochemischer Reaktionen. Im allgemeinen werden Phosphatasen basierend auf ihrer Substratspezifität oder ihrem katalytischen Mechanismus klassifiziert. Eine dritte historische Klassifizierung beruht auf dem pH-Optimum der katalytischen Aktivität. Demnach werden Saure von Alkalischen Phosphatasen unterschieden.

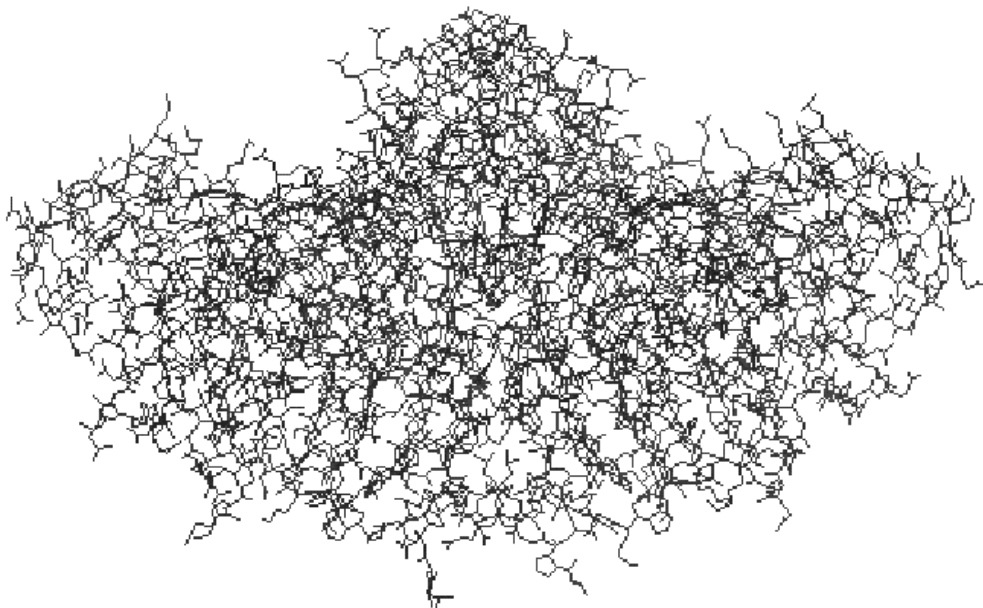


Abb. 7-1: Dreidimensionale Struktur des Dimers der Bakteriellen Alkalischen Phosphatase (Quelle: Brookhaven-Datenbank)

Die Alkalische Phosphatase (EC 3.1.3.1)^[145-147] ist das am besten untersuchte Enzym dieser Klasse. Die K_m und k_{cat} Werte für die Hydrolyse einfacher Phosphoester liegen zwischen 1-250 mM und 30-150 s⁻¹. Das Enzym findet in der Molekularbiologie zur

Dephosphorylierung von Nukleinsäuretermini, zur Herstellung von Hybridproteinen zum Studium der Genexpression, zur Kopplung an Antikörper für den Einsatz in ELISA^[148,149] (*enzyme linked immunosorbent assay*) und andere Bioassays sowie zur nichtradioaktiven Detektion von Proteinen und Nukleinsäuren^[59,60,150-152] Verwendung.

Die Bakterielle Alkalische Phosphatase war die erste Phosphatase, deren Kristallstruktur geklärt werden konnte^[153,154](vgl. Abb. 7-1).

Die Bakterielle Alkalische Phosphatase (BAP) aus *E. coli* besteht aus zwei identischen Untereinheiten mit einer Länge von jeweils 450 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 47.2 kDa^[155]. Jede Untereinheit weist zwei intracatenare Disulfidbrücken auf^[156]. Abbildung 7-2 zeigt die Struktur einer Monomereinheit des Enzyms als Bändermodell.

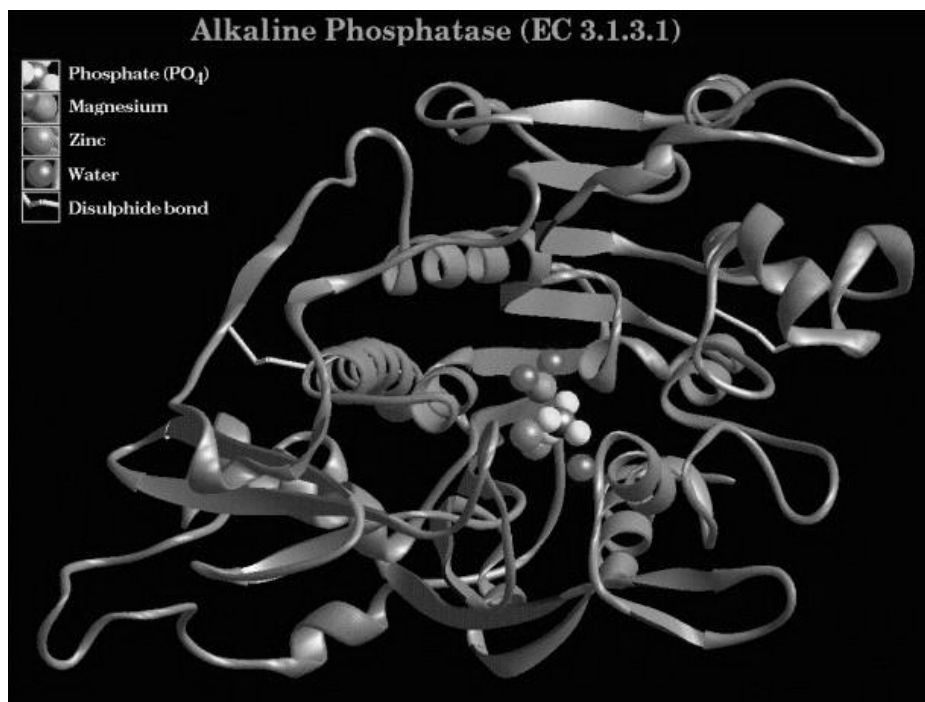


Abb. 7-2: Bändermodell einer Untereinheit der Alkalischen Phosphatase (Quelle: protein data bank, <http://pdb.gmd.de>)

In den beiden aktiven Zentren des Enzyms sind je Untereinheit zwei Zinkionen und ein Magnesiumion koordiniert^[157] (vgl. Abb. 7-3). Die Magnesiumionen sind sowohl für die Struktur als auch für die katalytische Aktivität des Enzyms essentiell^[158]. Nur das aus beiden Untereinheiten bestehende Dimer ist katalytisch aktiv. Als nukleophile Zentren sind ein Serin- und ein Arginin-Rest an der enzymatischen Reaktion beteiligt.

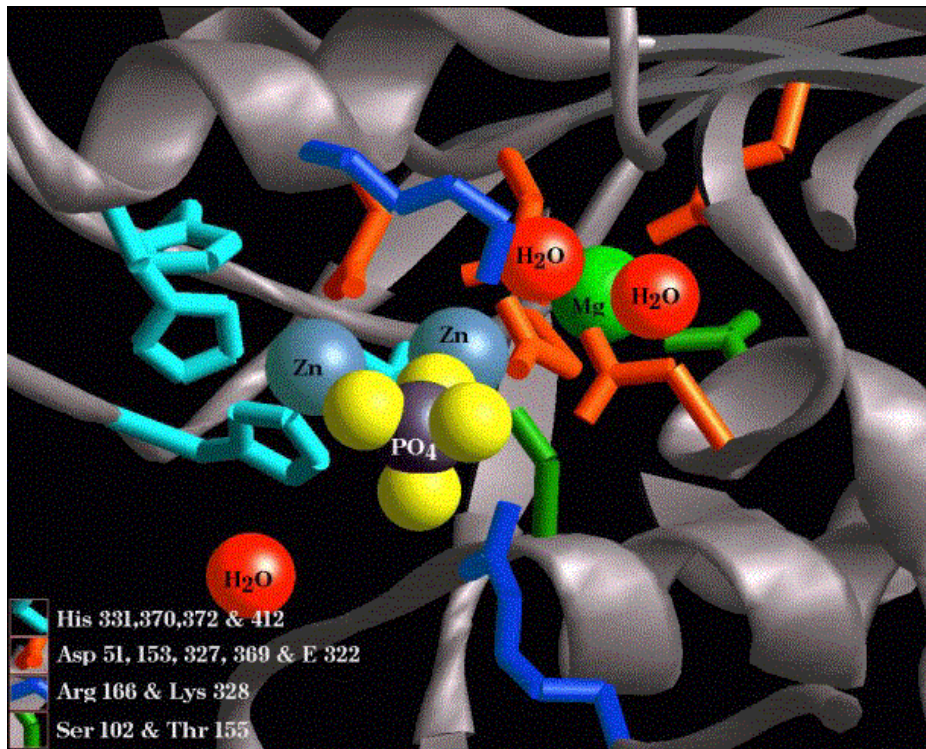


Abb. 7-3: Bändermodell des aktiven Zentrums der Alkalischen Phosphatase
(Quelle: protein data bank, <http://pdb.gmd.de>)

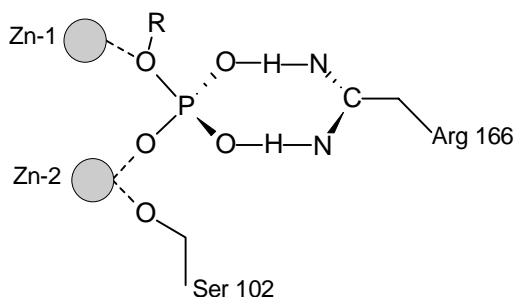


Abb. 7-4: Orientierung des Phospho-
monoesters im aktiven Zentrum
der Alkalischen Phosphatase

Der Serin-Rest ist als Alkoxid an ein Zink(II)-Ion des aktiven Zentrums koordiniert. Der Phosphat-ester bindet an die beiden Zink(II)-Ionen (vgl. Abb. 7-4) und wird desweiteren durch Wasserstoffbrückenbindungen an einen Arginin-Rest und über ionische Wechselwirkungen an das Magnesium(II)-Ion und einige weitere Reste aktiviert.

Für diese Arbeit wurde die rekombinante Bakterielle Alkalische Phosphatase BAPHis6^[159] ausgewählt. Dieses Enzym stellt eine Modifikation der Bakteriellen Alkalischen Phosphatase (BAP) dar, die carboxyterminal zusätzlich einen Hexahistidin-Tail enthält. Das Anfügen eines Oligohistidinpeptids ist die am häufigsten angewandte rekombinante Modifikation von Proteinen, die die Isolierung und Aufreinigung vereinfacht^[160]. Die Verlängerung mit einem Oligohistidin-Tail ermöglicht die Aufreinigung mittels *Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography* (IMAC)^[161]. Das Trennprinzip dieser Methode besteht in der Affinität der Imidazolreste benachbarter Histidine zu

immobilisierten Metallionen mit freien Koordinationsstellen. Die Metallionen werden über Chelatliganden, die mit einer festen Matrix kovalent verknüpft sind, gebunden.

Zur Aufreinigung der BAPHis6 wurden kommerziell erhältliche feste Phasen mit zweiwertigen Nickel-Ionen (Ni-NTA Resin, Qiagen GmbH) eingesetzt, deren Trägerharz ein Agarosederivat ist. An dieser Agarose-Matrix werden Nickel(II)-Ionen durch den vierzähligen Chelatliganden Nitrilotriessigsäure (*nitrilo-tri-acetic acid*, NTA) fixiert^[162,163], der kovalent an die Agarose-Moleküle gebunden ist. Vier der sechs Ligandenbindungsstellen in der oktaedrischen Koordinationssphäre des Ni(II)-Ions werden durch die NTA-Gruppe belegt (Abb. 7-5). Die zwei verbleibenden Koordinationsstellen ermöglichen eine Wechselwirkung mit den Imidazolresten des Hexahistidin-Tails.

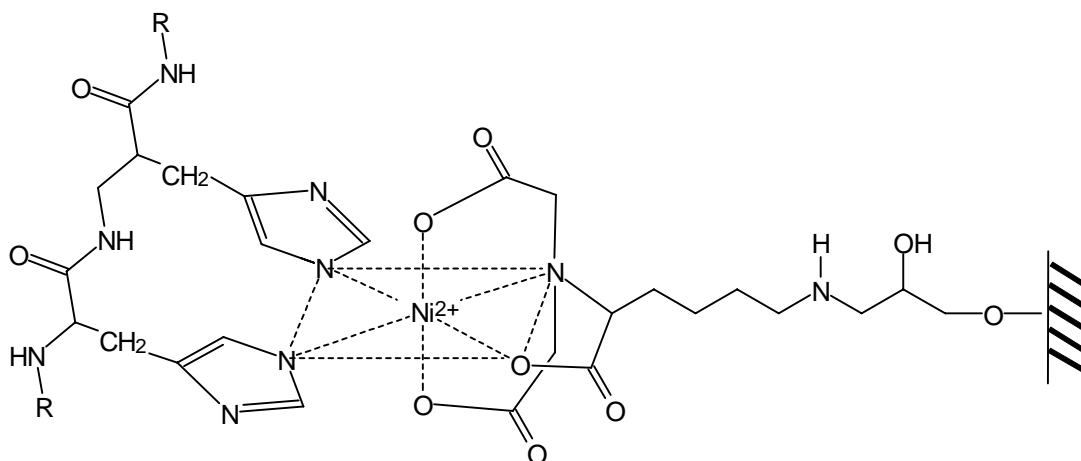


Abb. 7-5: Struktur des Imidazol-Ni-NTA-Agarose Komplexes^[164]

Die Hexahistidin-Fusionproteine können vom Ni-NTA-Harz durch Verringerung des pH-Wertes oder durch Zugabe eines komplexierenden Liganden, dessen höhere Affinität zum Metallion zur Verdrängung der Imidazolreste aus der Koordinationssphäre führt, eluiert werden.

Die rekombinant hergestellte BAPHis6 ist aufgrund ihrer bemerkenswerten Stabilität gegenüber Detergenzien und Temperaturerhöhungen sowie ihrer durch einfache Isolierungsverfahren guten Verfügbarkeit für erste Versuche zur Immobilisierung von Proteinen an Silizium-Wafer besonders geeignet. Die einfache und schnelle Detektierbarkeit der enzymatischen Aktivität des Enzyms über durch Dephosphorylierung hervorgerufene Farbreaktionen erlaubt eine Kontrolle der jeweiligen Reaktionsschritte und -bedingungen.

7.2 Expression und Isolierung der Alkalischen Phosphatase

Der Expressionsvektor pBAPHis6 enthält das rekombinante Gen für die carboxyterminal um einen Hexahistidin-Tail verlängerte Alkalische Phosphatase aus *E. coli*, welches unter Kontrolle des *tac*-Promotors^[165] einem Hybridpromotor, der durch Fusion von Sequenzabschnitten des *trp*- und des *lac*-Operons konstruiert wurde, steht.

Die Induktion der Proteinexpression von BAPHis6 in mit pBAPHis6 transformierten *E. coli* JM83-Zellen ist durch Zugabe von Isopropyl- β -D-thiogalactosid (IPTG) über das Nährmedium möglich. Es verhindert in Analogie zum natürlichen Substrat Lactose die Bindung des *lac*-Repressors an den Promotor, kann aber im Gegensatz zur Lactose nicht enzymatisch abgebaut werden. Eine optimale Proteinexpression wurde durch die Zugabe von 1 mM IPTG zum Kulturmedium nach einer vorangegangenen Wachstumsphase von 2.5 Stunden erzielt^[154]. Die Induktionsphase dauerte ebenfalls 2.5 Stunden und erfolgte bei 37 °C.

Zur Isolierung der rekombinanten Alkalischen Phosphatase wurde ein vereinfachtes Zellaufschlußverfahren angewendet, welches das Sonifizieren der Kulturen durch eine Abfolge von Detergenzien- und Wärmebehandlung ersetzt. Dazu wurden die Zellen nach Ablauf der Induktionsphase durch Zentrifugation geerntet. Das Sediment wurde in einer Pufferlösung, die 2 % Triton X-100 enthält, resuspendiert und eingefroren. Es folgten mehrfaches Erwärmen bis auf 70 °C, Einfrieren und schließlich das Abzentrifugieren der unlöslichen Zellbestandteile. Die Alkalische Phosphatase lag im Überstand angereichert vor.

Der carboxyterminale Hexahistidin-Tail der rekombinanten Alkalischen Phosphatase ermöglichte die Isolierung aus dem Rohextrakt durch Metallchelate-Affinitäts-Chromatographie. Zur Aufreinigung von BAPHis6 wurden kommerziell erhältliche Phasen mit zweiwertigen Nickel-Ionen (Ni-NTA Resin, Qiagen GmbH) eingesetzt. Nach einer Vorbehandlung der Agarose-Matrix mit einer Nickelchlorid-Lösung wurde entsprechend der Herstellerangaben verfahren.

Der Zellrohextrakt wurde mit einer Suspension der Agarose-Matrix versetzt, wobei die Histidin-Reste der BAPHis6 das Nickel(II)-Ion komplexieren, und das Enzym während der nun folgenden Waschschriffe am festen Träger zurückgehalten wird. Durch Zentrifugation über einen Filter wurden gelöste Verunreinigungen abgetrennt. Die Elution des Enzyms erfolgte durch imidazolhaltigen Puffer, da Imidazol eine höhere Affinität zu Nickel(II)-

Ionen besitzt und daher die Histidin-Reste aus der Koordinationssphäre zu verdrängen vermag.

Die qualitative Analyse des isolierten Proteins erfolgte auf den verschiedenen Stufen der Reinigung durch Polyacrylamidgelelektrophorese (Abb. 7-6). Dabei wurde einerseits die enzymatische Aktivität durch native, mit BCIP/NBT gefärbte Gele, sowie andererseits die Gesamtproteinmenge durch denaturierende SDS-haltige Gele untersucht.

Das durch Affinitätschromatographie isolierte Protein wurde abschließend durch Ultrazentrifugation mit Hilfe von Einweg-Mikrokonzentratoren (Microcon 3) über Membranen mit einer Ausschlußgröße von 3000 Da gereinigt und konzentriert. Das Protein wurde mit Wasser eluiert und bei 4 °C gelagert. Aus 200 ml Ausgangskulturvolumen wurden 400 µl BAPHis6-Lösung erhalten.

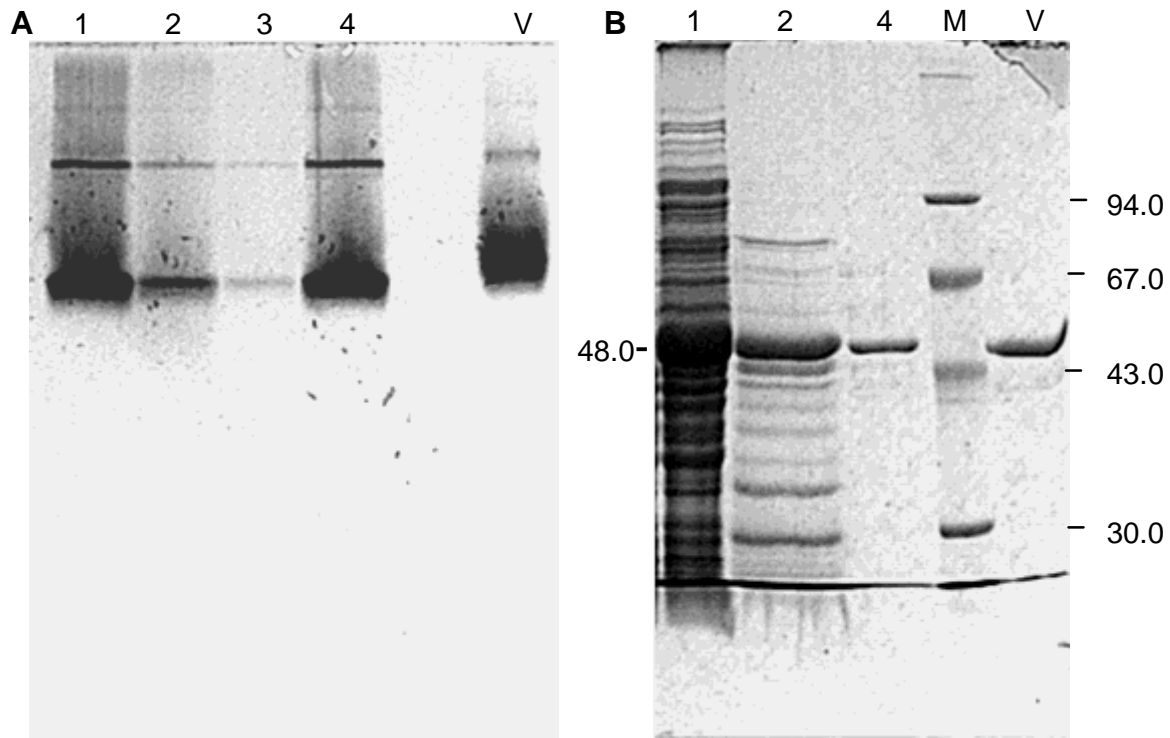


Abb. 7-6: Polyacrylamidgele der rekombinanten BAPHis6 auf verschiedenen Reinigungsstufen

A: natives Polyacrylamidgel, Anfärbung mit BCIP/NBT

B: SDS-Polyacrylamidgel, denaturierend, Anfärbung mit Coomassie

1: Ausgangsmaterial

2: Überstand nach Zellaufschluß

3: Durchlauf der Ni-NTA-Säule

4: Eluierte Fraktion

M: Proteingrößenmarker (Angaben in kDa)

V: Vergleich 0.04 u BAP (MBI)

7.2.1 Quantifizierung der Alkalischen Phosphatase

Die Proteinmengenbestimmung von BAP erfolgte photometrisch mit dem Bicinchoninsäure (*Bicinchoninic Acid*, BCA)-Assay^[166]. Diese Methode kombiniert die bekannte Reduktion von Cu(II)-Ionen zu Cu(I)-Ionen durch Proteine in alkalischem Medium (Biuret-Reaktion^[167]) und deren

Komplexierung durch Bicinchoninsäure^[168]. Das violette Reaktionsprodukt (Abb. 7-7), das durch die Wechselwirkung zweier Moleküle BCA mit einem Cu(I)-Ion gebildet wird, ist wasserlöslich und hat ein

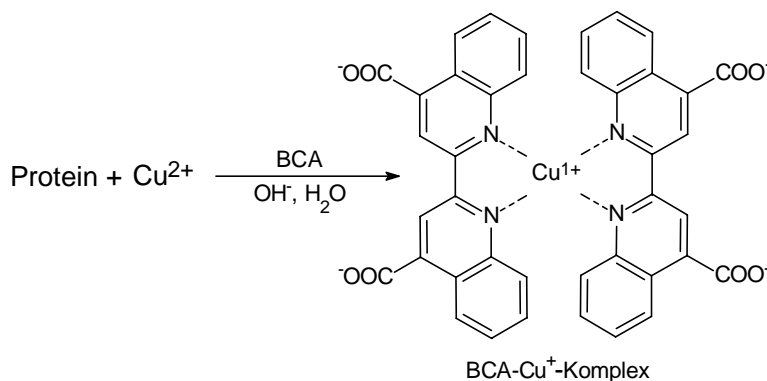


Abb. 7-7: Komplexierung von Cu¹⁺ durch Bicinchoninsäure;
 $\lambda_{\text{max}} = 562 \text{ nm}$

Absorptions-maximum bei 562 nm. Die Bildung des farbigen Komplexes mit BCA ist ursächlich auf die makromolekulare Struktur des Proteins, die Anzahl der Peptidbindungen sowie die Anwesenheit der Aminosäuren Cystein, Tryptophan und Tyrosin zurückzuführen^[169]. Da der BCA-Assay keine Endpunktmethode ist, sondern die Farbentwicklung mit der Zeit fortschreitet, ist es erforderlich, für jede Quantifizierung eine Eichgerade mit einer BSA-Verdünnungsreihe bekannter Konzentrationen parallel zu erstellen.

Die Reagenzlösungen wurden in Einmalküvetten (mit Stopfen) mit einem Aliquot der Enzym-Lösung bzw. BSA-Lösung versetzt und unter kräftigem Schütteln im Wasserbad eine Stunde auf 60 °C temperiert. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die Extinktionen der Lösungen gegen eine Blindprobe bei 562 nm gemessen. Aus den Meßwerten der BSA-Verdünnungsreihe wurde eine Eichgerade erstellt. Für 1 µl der nach Kapitel 10.3 isolierten Enzym-Lösung wurden Proteinmengen von 9 bis 12 µg erhalten, dies entspricht bezogen auf das Ausgangskulturvolumen von 200 ml einer Menge von ca. 4 mg Protein.

7.2.2 Bestimmung der spezifischen Aktivität der Alkalischen Phosphatase

Die Aktivitätsbestimmung der Alkalischen Phosphatase wird durch die Umsetzung von Substraten zu farbigen Dephosphorylierungsprodukten ermöglicht. Üblicherweise erfolgt die Bestimmung der enzymatischen Aktivität über die Dephosphorylierung von p-Nitro-

phenylphosphat (pNPP) zum gelbgefärbten p-Nitrophenolat-Anion. Diese Reaktion kann bei einer Wellenlänge von 405 nm photometrisch verfolgt werden. In dieser Arbeit wurde die Quantifizierung der enzymatischen Aktivität nach der Methode von Mössner *et al.*^[170] in 1 M Diethanolamin-Puffer (pH 9.8) unter Zusatz von 0.5 mM Magnesiumchlorid durchgeführt.

Eine enzymatische Einheit (*unit*, u) der Alkalischen Phosphatase ist dabei definiert als die Menge Enzym, die 1 μmol pNPP in einer Minute hydrolysiert^[171].

Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität erfolgte in Einmalküvetten, indem ein Aliquot der Enzym-Lösung in Diethanolamin-Puffer vorgelegt und mit Substratlösung versetzt wurde. Die Küvetten wurden intensiv geschüttelt, und in zeitlichen Abständen wurde die Extinktion der Lösung bei 405 nm gemessen. Aus den Extinktionen wurden über die lineare Regressionsgleichung einer Verdünnungsreihe von p-Nitrophenol in Diethanolamin-Puffer die Konzentrationen freien p-Nitrophenolats errechnet.

Für 1 μl der Enzym-Lösung wurden im Mittel enzymatische Aktivitäten von 0.45 u gemessen. Bezogen auf 200 ml Kulturvolumen (vgl. 10.3) wurden somit 180 u Alkalische Phosphatase isoliert.

Die spezifische Aktivität des Enzyms ergibt sich aus dem Quotienten der enzymatischen Aktivität und der Proteinmenge zu ca. 0.04 u/ μg bzw. 0.67 Kat/kg.

7.2.3 Charakterisierung der rekombinanten Alkalischen Phosphatase durch MALDI-TOF MS

Das Molekulargewicht der rekombinanten Alkalischen Phosphatase wurde durch MALDI-TOF Massenspektrometrie bestimmt. Dazu wurde die wässrige Enzym-Lösung nach der Reinigung durch Metallchelate-Affinitätschromatographie und Ultrazentrifugation eingesetzt. Als Matrixsubstanz fand 3-Hydroxypicolinsäure (3-HPA) Verwendung. Als Probenhalter fungierte ein Silizium-Wafer. Die Messungen wurden im positiven Ionenmodus durchgeführt, d.h. die beobachteten Massen entsprechen denen der einfach protonierten Moleküle.

Das MALDI-Spektrum in Abbildung 7-8 zeigt ein deutliches Signal bei 48049 m/z. Da auf eine Kalibrierung des Gerätes auf den zu detektierenden Massenbereich verzichtet wurde, stimmt dieser Wert im Rahmen der Genauigkeit sehr gut mit der theoretischen Masse des Monomers der Alkalischen Phosphatase von 48020 g/mol^[159] überein.

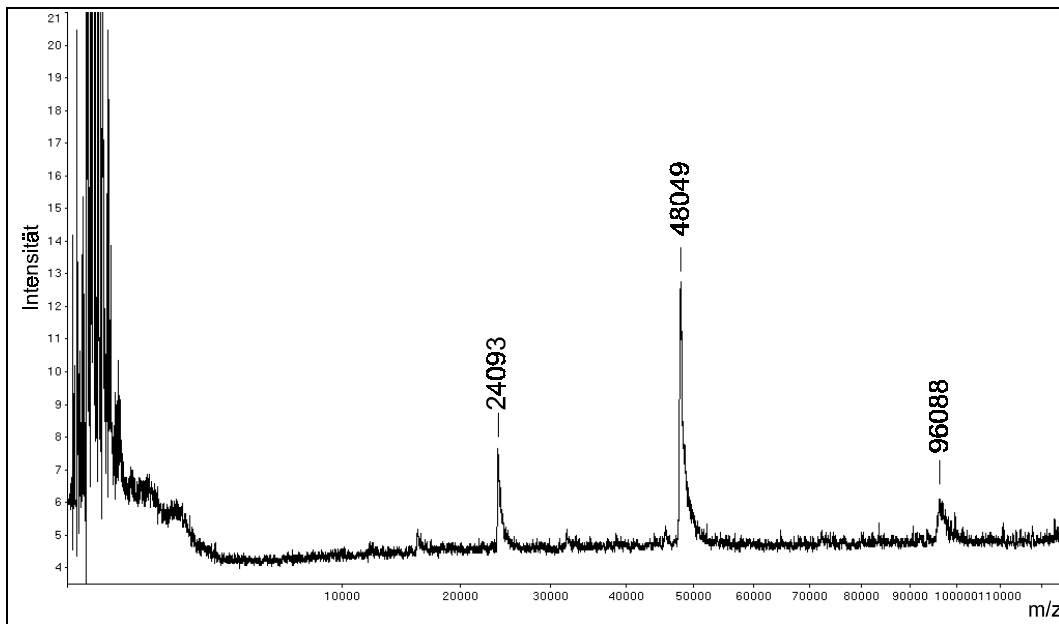


Abb. 7-8: MALDI-TOF Massenspektrum von BAPHis6

Neben diesem Hauptpeak sind die Signale des Dimers bei 96088 m/z und des zweifach geladenen Monomers bei 24093 m/z erkennbar. Die deutlich geringere Intensität des Signals des Dimers im Vergleich zu der des Signals des Monomers läßt sich mit Trennung des nicht-kovalenten Enzymkomplexes unter dem Einfluß der Laserenergie erklären.

Das MALDI-Spektrum bestätigt das Vorliegen der in hoher Reinheit isolierten rekombinanten Alkalischen Phosphatase BAPHis6.

7.3 Immobilisierung der Alkalischen Phosphatase an Silizium-Wafer

Die Immobilisierung von Enzymen ist ein Schlüsselbegriff in der Enzymtechnologie^[172] und steht für eine Fixierung oder Bindung von Enzymen^[173] während der Reaktionsphase, so daß sie sich vom Substrat und Produkt physikalisch abtrennen lassen.

Die Immobilisierung kann durch physikalische oder chemische Bindung an einen Träger oder durch Einschluß in eine semipermeable Membran erfolgen. Das wachsende Interesse an Techniken zur Immobilisierung von Enzymen liegt in den entscheidenden Vorteilen begründet. So können Enzyme in immobilisierter Form mehrfach verwendet werden, und die Umsetzung kann kontinuierlich in Reaktionsrührgefäßen oder Säulen erfolgen. Desweiteren sind die erhaltenen Produkte enzymfrei, und die Produktbildung kann besser kontrolliert werden. Zusätzlich dienen immobilisierte Enzyme als Modelle zum Studium der Verknüpfung von Enzymen an ihre natürliche Zellmembran.

Die größten Einsatzgebiete trägergebundener Enzyme liegen in der industriellen Verfahrenstechnik, insbesondere in der Nahrungsmittel- und Getränkeindustrie^[174]. Einige wichtige Anwendungsgebiete sind die Hydrolyse von Proteinen zu Peptiden und Aminosäuren, die Herstellung von Käse, die Umwandlung von Maisstärke in Glucose und von Glucose in Fructose, die Klärung von Weinen und Obstsaften, sowie z.B. zur Synthese von Penicillinen.

Die Immobilisierung von Enzymen kann auf sehr unterschiedlichen Wegen (vgl. Abb. 7-9) erfolgen. Die gebräuchlichste Technik ist die kovalente Verknüpfung an aktivierte makromolekulare, wasserunlösliche Trägermaterialien wie synthetischen Polymeren^[175-177], Cellulosederivaten^[178] oder Glas^[179,180]. Die Enzymimmobilisierung erfolgt in allen Fällen über nukleophile Gruppen der Aminosäureseitenketten über ein Azid, Isocyanat oder Carbodiimid.

Die Adsorption an oberflächenaktive Trägermaterialien wie Kohlenstoff, Aluminiumoxid, Ionenaustauscherharze oder Glas ist die älteste Immobilisierungstechnik. Da keine zusätzlichen Reagenzien notwendig sind, ist die Gewinnung der Präparate sehr einfach. Die Stabilität der Komplexe ist jedoch stark von pH-Wert, der Temperatur und Ionenstärke abhängig. Eine Aggregation von Enzymen, die zu Wasserunlöslichkeit führt, kann durch Quervernetzung mit Hilfe bifunktioneller Reagenzien unter Ausbildung intramolekularer kovalenter Verknüpfungen erreicht werden.

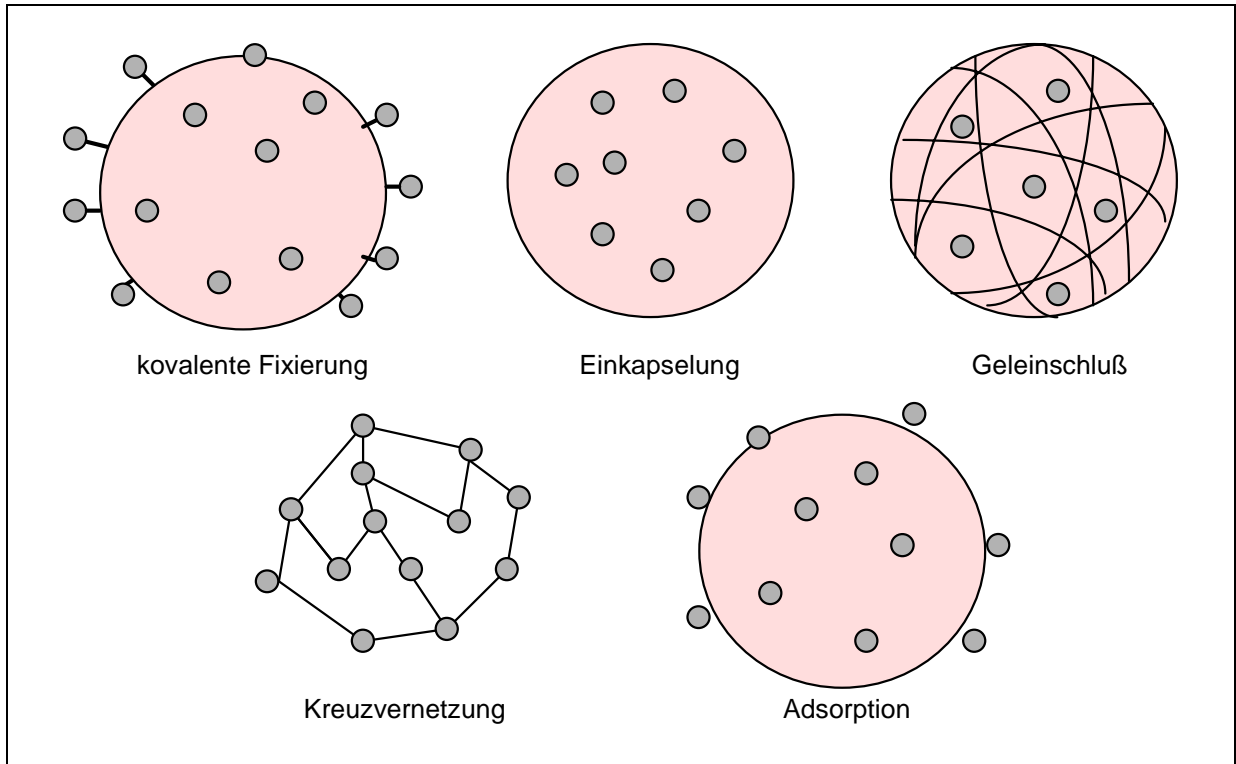


Abb. 7-9: Schematische Darstellung der Immobilisierungstechniken

Eine weitere Immobilisierungstechnik stellt die Einkapselung von Enzymen in Membranen, die für niedermolekulare Substanzen permeabel sind, dar. Diese Mikrokapseln können aus Cellulosenitrat, synthetischen Polymeren, Phospholipiden oder Collagen gebildet werden. Läßt man Materialien wie Kieselgel, Stärke oder Polyacrylamide in Gegenwart von Enzymen polymerisieren, so werden diese in die Polymermatrix eingehüllt^[181]. Bei diesem Einschluß in Gele ist die Modifizierung des Enzyms durch die zugegebenen Reagenzien zu unterbinden, und das Netzwerk sollte zudem keine Barriere für die Substrat- und Produktdiffusion darstellen.

Im Verlauf der vorliegenden Arbeit sollte eine kovalente Immobilisierung der Alkalischen Phosphatase an Silizium-Wafer erreicht werden. Im allgemeinen kann die kovalente Verknüpfung von Proteinen über die Thiol-, Amino^[182]- oder Carboxylfunktionen der Aminosäureseitenketten, sowie über die Termini an eine entsprechend aktivierte Oberfläche erfolgen. Geeignete Verfahren zur kovalenten Immobilisierung von Biomolekülen wurden bereits in Kapitel 6.1 vorgestellt.

Wie bereits für die Immobilisierung aminomodifizierter Oligonucleotide beschrieben, wurde auch hier 1,4-Phenylendiisothiocyanat (DITC) als homobifunktionelles Akti-

vierungsreagenz eingesetzt. Analog wurden zur kovalenten Anbindung der Alkalischen Phosphatase die Silizium-Wafer **0** zunächst durch Umsetzung mit Aminopropyltriethoxysilan aminofunktionalisiert (vgl. Reaktionsschema Abb. 7-10) und nach mehreren Waschschrinen zur Aktivierung zwei Stunden bei 40 °C mit einer 100 mM Lösung von DITC in DMF/Pyridin behandelt. Die aktivierten Silizium-Wafer **A_{akt}** wurden zügig mit DMF, Ethanol und Wasser gewaschen und sofort in der Immobilisierungsreaktion eingesetzt.

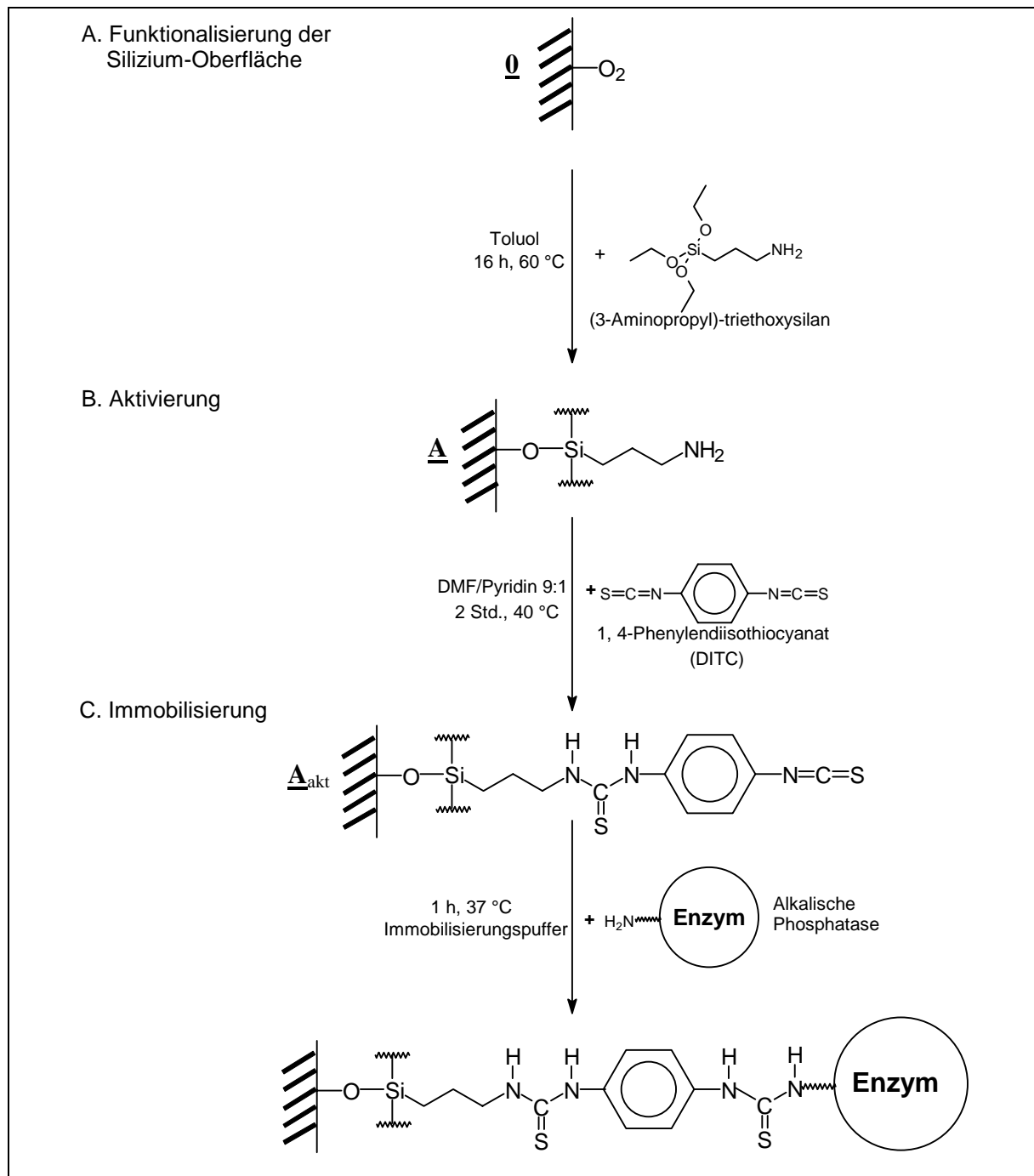


Abb. 7-10: Reaktionsschema zur Immobilisierung der Alkalischen Phosphatase an Silizium-Wafer

Den eigentlichen Versuchen zur Immobilisierungsreaktion gingen Untersuchungen des Einflusses des als „Wetting-Solution“ (50 % 2-Propanol, 2 % Tween[®]20, 1 % N-Methylmorpholin) zur Immobilisierung von Proteinen für den Festphasen-Edman-Abbau üblichen Puffers auf die enzymatische Aktivität der Alkalischen Phosphatase voraus. Dazu wurden Aliquots der Enzym-Lösung über Microcon-Konzentratoren zentrifugiert und mit jeweils unterschiedlichen Puffern drei Stunden bei 37 °C inkubiert, wobei der Anteil an 2-Propanol variiert und mit einem DMF-haltigen Puffer und dem Phosphatase-Puffer (0.1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, 0.05 M MgCl₂, pH 9.5) verglichen wurde. Nach Zentrifugation und Waschen mit Wasser wurden die Membranen mit 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP)- und Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT)-Lösungen^[183] behandelt.

Die beiden Reagenzien bilden nach Umsetzung durch Alkalische Phosphatase einen intensiv blau gefärbten unlöslichen Niederschlag. BCIP wird während der Reaktion durch Alkalische Phosphatase hydrolysiert und unterliegt nach dem Durchlaufen einer Zwischenstufe der Dimerisierung zu einem Indigofarbstoff. NBT wird als Oxidationsmittel während dieser Dimerisierungsreaktion zum NBT-Formazan reduziert (vgl. Abb. 7-11).

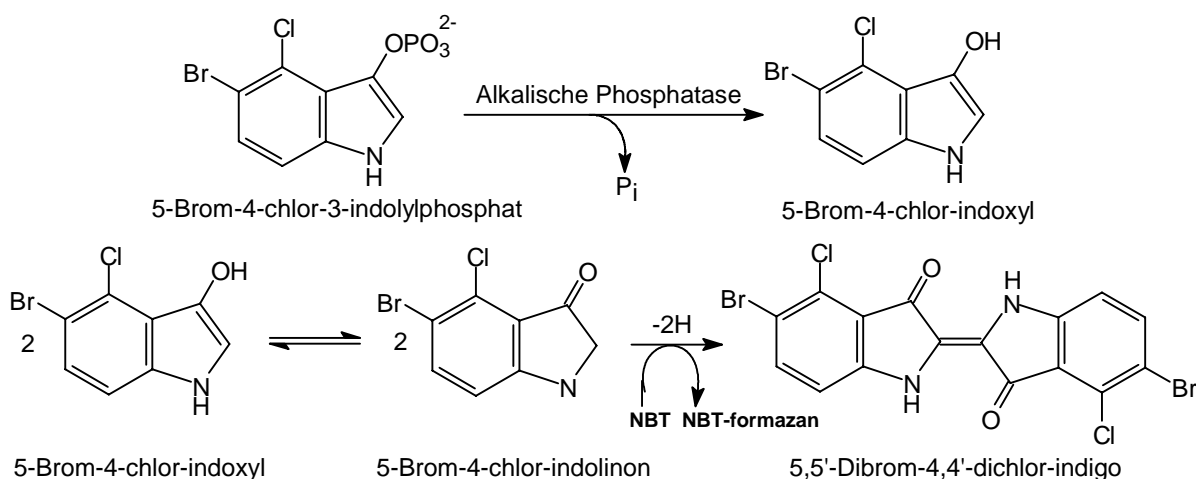


Abb. 7-11: Dephosphorylierung und Dimerisierung von BCIP zu einem Indigofarbstoff

Eine deutliche Blaufärbung wurde nur im Falle der Tween[®]20-haltigen Puffer beobachtet, wobei ein hoher Anteil an 2-Propanol sich nicht negativ auf die enzymatische Aktivität auswirkte. Der Zusatz von DMF führte wie erwartet zu einem Verlust der enzymatischen Aktivität. Die Farbentwicklung des mit Phosphatase-Puffer inkubierten Enzyms erfolgte zeitlich stark verzögert und erst nach erneuter Zugabe an Färbelösungen.

In ersten Versuchen zur Anbindung der Alkalischen Phosphatase wurde der aktivierte Silizium-Wafer somit mit der gebräuchlichen „Wetting-Solution“ überschichtet, mit 1 μ l Enzym-Lösung (entspricht 2 μ l der nach 10.3 isolierten Lösung) versetzt und eine Stunde bei 37 °C in einem Schüttelinkubator bei 220 rpm inkubiert. Abschließend wurden die Wafer mehrfach mit Puffer und Wasser gewaschen und in Wasser bei 4 °C gelagert.

Der Nachweis der immobilisierten Alkalischen Phosphatase erfolgte in Vorversuchen wie bereits beschrieben durch Färbeexperimente mit BCIP- und NBT-Lösungen.

Wurden die Enzym-Wafer in Tris-Puffer mit BCIP- und NBT-Lösung versetzt, so bildete sich ein kräftig blauer Niederschlag. Dieser Niederschlag befand sich nur auf der direkten Oberfläche des Wafer; die Lösung selbst blieb klar. Kontrollexperimente mit belassenen und aminofunktionalisierten, nicht-aktivierten Silizium-Wafern zeigten keinerlei Blaufärbung. Wurde zum Immobilisierungsansatz zusätzlich zum Enzym mit BSA versetzt, so konnte im Färbeexperiment keine enzymatische Aktivität nachgewiesen werden.

Mittels dieses einfachen Nachweises der enzymatischer Aktivität an der Silizium-Oberfläche wurden die Bedingungen der Immobilisierungsreaktion weiter optimiert.

Da die Gegenwart von Magnesium- und Zink-Ionen essentiell für die Ausbildung der aktiven Konformation der Alkalischen Phosphatase ist, wurde versucht das Puffersystem durch Zusatz dieser zweiwertigen Metallionen für die Immobilisierungsreaktion zu optimieren. Dazu wurde die „Wetting-Solution“ in verschiedenen Anteilen mit einem Tris- bzw. Phosphat-Puffer gemischt und in der Immobilisierungsreaktion eingesetzt. Die Anbindung des Enzyms wurde rein visuell über die BCIP/NBT-Farbreaktion nachgewiesen. Die schnellste und stärkste Farbentwicklung erfolgte auf einem Enzym-Wafer, bei dessen Herstellung die „Wetting-Solution“ und Tris-HCl-Puffer (50 mM Tris, 1 mM MgCl₂, 0.1 mM ZnCl₂, pH 8.0) im Verhältnis 1:4 eingesetzt wurden.

7.3.1 Quantifizierung immobilisierter Alkalischer Phosphatase

Die Proteinmengenbestimmung von an Silizium-Wafer immobilisierter Alkalischer Phosphatase erfolgt mit Hilfe des bereits beschriebenen BCA-Assays (Fa. Pierce). Die Enzym-Wafer wurden in Einmalküvetten überführt und mit Assay-Reagenzlösung versetzt. Um die sehr geringen Proteinmengen detektieren zu können, wurde die Inkubationszeit auf zwei Stunden bei 60 °C verlängert. Abbildung 7-12 zeigt die lineare Regressionsgerade für

die BSA-Verdünnungsreihe mit den erhaltenen Meßwerten für 1 µl der Enzym-Lösung und für einen Enzym-Wafer.

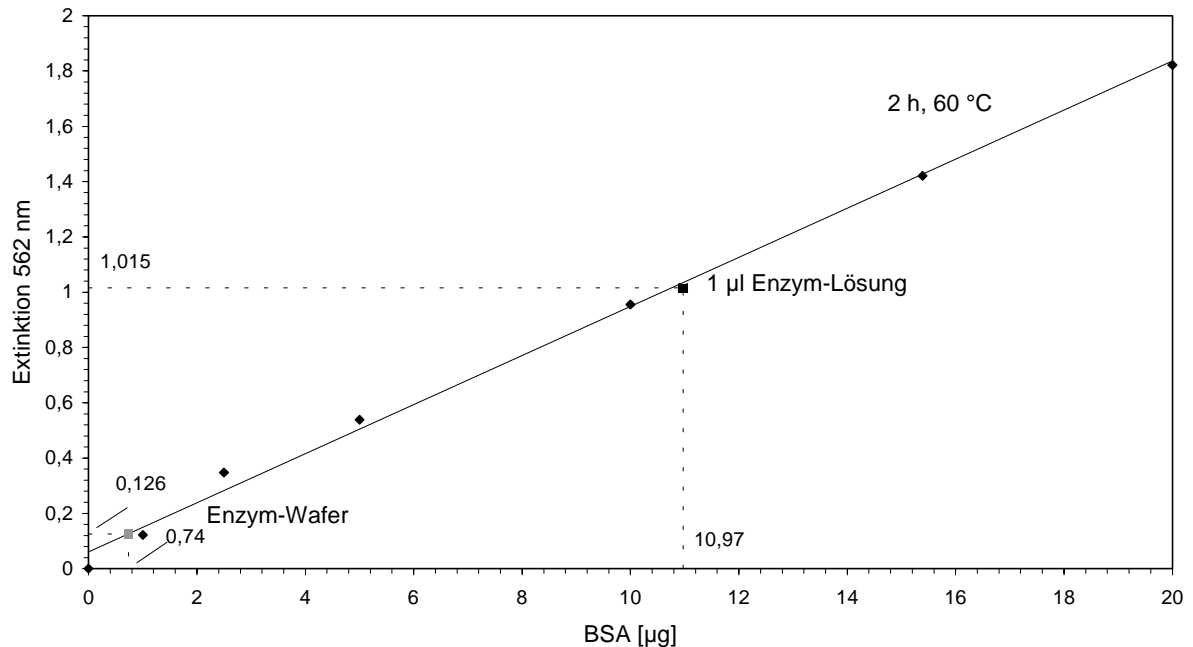


Abb. 7-12: BSA-Eichgerade zur Proteinmengenbestimmung

7.3.2 Bestimmung der spezifischen Aktivität immobilisierter Alkalischer Phosphatase

Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität der Enzym-Wafer erfolgte analog zu der Methode, die für die Enzym-Lösung bereits beschrieben wurde. Die mit Diethanolamin-Puffer gewaschenen Enzym-Wafer wurden in Einmalküvetten transferiert und mit Diethanolamin-Puffer versetzt. Anschließend wurde Substratlösung zugegeben. Die Küvetten wurden kräftig geschüttelt. In zeitlichen Abständen wurde die Extinktion der Lösung gegen eine Blindprobe gemessen. Aus der graphischen Auftragung der aus den Extinktionen ermittelten Stoffmenge p-Nitrophenolats und der Zeit (Abb. 7-13) ergibt sich aus der Steigung der linearen Regressionsgeraden die Umsatzrate des Enzym-Wafers.

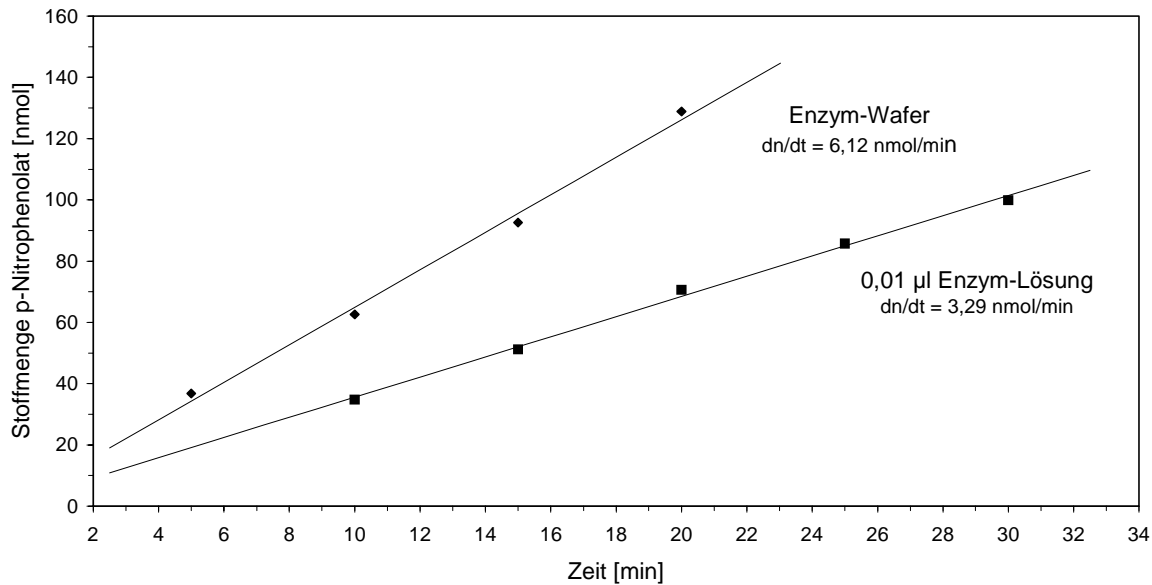


Abb. 7-13: Darstellung des Umsatzes von p-Nitrophenylphosphat durch Enzym-Lösung bzw. Enzym-Wafer

Es wurden Umsatzraten von 5 nmol/min bezogen auf einen Enzym-Wafer mit einer Fläche von 40 mm² gemessen; dies entspricht einer enzymatischen Aktivität von 0.005 u.

7.3.3 Abhängigkeit der Aktivität der Enzym-Wafer von der zur Immobilisierung angebotenen Enzymmenge

Mit DITC aktivierte Silizium-Wafer A_{akt} wurden mit unterschiedlichen Mengen der Enzym-Lösung inkubiert. Nach der Immobilisierung wurde jeweils die enzymatische Aktivität gemessen und gegen die eingesetzte Aktivität graphisch aufgetragen (vgl. Abb. 7-14). Aus dem Kurvenverlauf ergibt sich eine maximale enzymatische Aktivität des Enzym-Wafers bei einer eingesetzten Aktivität von 1 u Alkalische Phosphatase. Mit Zunahme der zur Immobilisierungsreaktion eingesetzten Enzymmenge erreicht die enzymatische Aktivität der entsprechenden Wafer ein um ca. 50 % abgesenktes Plateau.

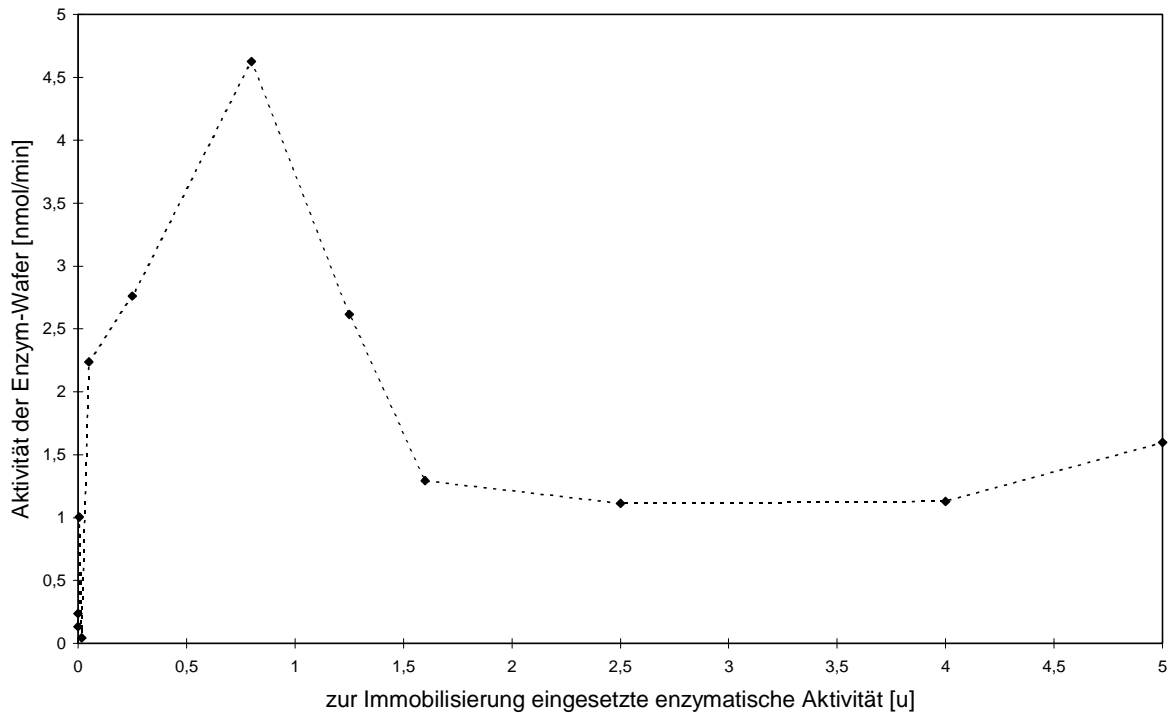


Abb. 7-14: Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität der Enzym-Wafer von der zur Immobilisierung angebotenen Enzymmenge

Für das Auftreten eines deutlichen Maximums an erreichbarer enzymatischer Aktivität wären zwei Erklärungen denkbar. Möglicherweise führen bei einer Erhöhung der Beladungsdichte sterische Hinderungen zu einer Abnahme der enzymatischen Aktivität. Zudem könnte die Anwesenheit einer möglichen Kontamination, deren Einfluß sich erst bei höheren Enzymkonzentrationen bemerkbar macht, zu einer unzureichenden Enzymbeladung führen.

Aus diesem Experiment ergibt sich somit als optimale für die Immobilisierungsreaktion einzusetzende Enzymmenge 1 u Alkalische Phosphatase.

7.3.4 Enzymkinetische Untersuchungen der Enzym-Wafer

Bei der Bindung an die Oberfläche eines Trägers organischer oder anorganischer Natur ändern sich die charakteristischen Eigenschaften des Enzyms. Das kinetische Verhalten trägergebundener Enzyme wird besonders je nach Wahl des Trägermaterials beeinflusst durch die Ladung des Trägers, die Ladung des Substrates, den Porendurchmesser des

Trägers, die Substanzdiffusionsgeschwindigkeit, die Porendiffusionsgeschwindigkeit und viele andere Parameter. Zusätzlich spielen die Rühr- bzw. Durchflußgeschwindigkeiten des Substrates eine große Rolle in der Kinetik oder zumindest der beobachtbaren scheinbaren Kinetik des trägergebundenen Enzyms.

Vergleichend wurde die enzymatische Aktivität immobilisierter und freier Alkalischer Phosphatase in Abhängigkeit von der Substratkonzentration gemäß einer Michaelis-Menten-Kinetik untersucht. Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität erfolgte wie unter 7.3.2. beschrieben, wobei die Konzentration an freiem Enzym entsprechend der Aktivität eines Wafers gewählt wurde. Abbildung 7-15 zeigt die für die Michaelis-Menten-Kinetik typischen hyperbolischen Kurvenverläufe.

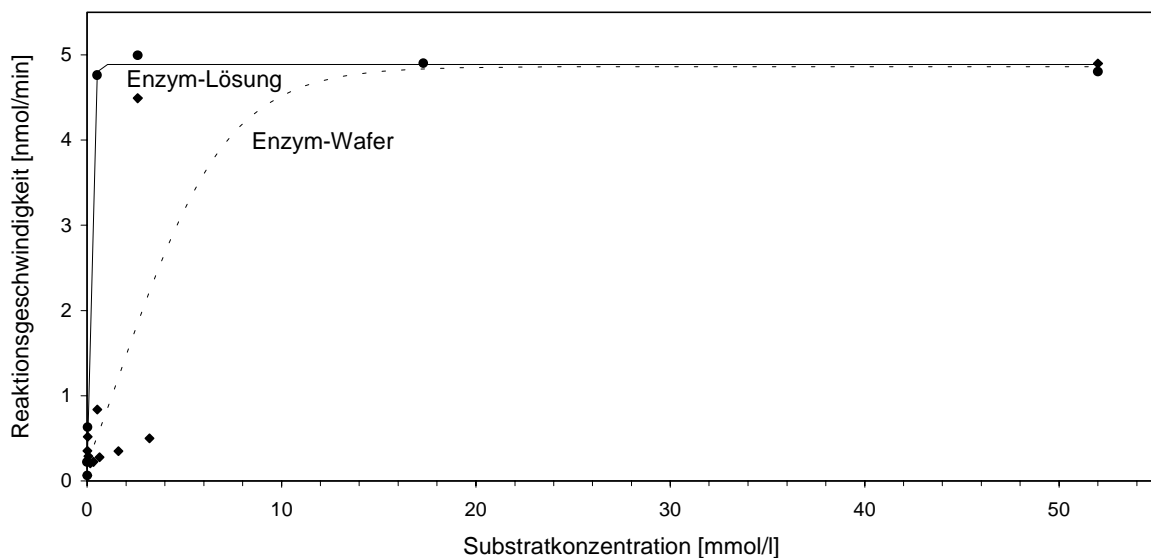


Abb. 7-15: Michaelis-Menten-Kinetik der Alkalischen Phosphatase in Lösung und nach Immobilisierung an Silizium-Wafer

Die Reaktionsgeschwindigkeiten nähern sich asymptotisch einem Grenzwert v_{\max} von 5 nmol/min. Das immobilisierte Enzym erreicht im Vergleich zum gelösten das Sättigungsplateau verzögert, d.h. bei einer höheren Substratkonzentration. Die Affinität des Enzyms zum Substrat ist folglich wie erwartet in gelöster Form größer. Im Falle der immobilisierten Alkalischen Phosphatase ist vermutlich die Zugänglichkeit des auf eine begrenzte Oberfläche konzentrierten Enzyms für das Substrat erschwert. Das beobachtete kinetische Verhalten ist somit durch erschwerte Diffusion erklärbar. Als charakteristische Größe für die beiden Enzymformen lassen sich die Michaelis-Menten-Konstanten K_M

betrachten. K_M entspricht der Substratkonzentration, bei der die halbe maximale Umsatzgeschwindigkeit erreicht wird. Aus Abbildung 7-15 lässt sich für das gelöste Enzym ein Wert von 0.3 mmol/l und für den Enzym-Wafer von 3.8 mmol/l bestimmen.

Auch die zweifache reziproken Darstellungen nach Lineweaver-Burk (Abb. 7-16) bestätigen das unterschiedliche kinetische Verhalten der Enzymformen.

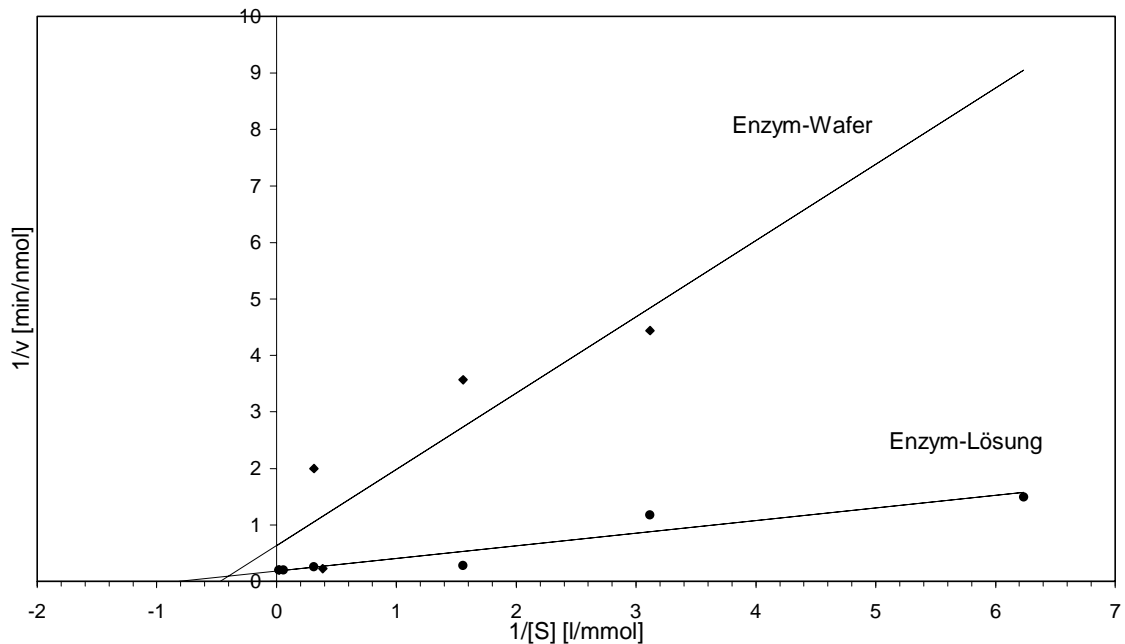


Abb. 7-16: Lineweaver-Burk-Diagramm

Es ergeben sich Geraden mit der Steigung K_M/v_{\max} . Setzt man für beide Enzymkonformationen die gleiche maximale Reaktionsgeschwindigkeit voraus, folgt für das gebundene Enzym ein deutlich erhöhter K_M -Wert. Der Abszissenabschnitt entspricht $-1/K_M$ und ist im Falle des immobilisierten Enzyms gegen den Nullpunkt verschoben. Die Ungenauigkeit der Betrachtungsweise nach Lineweaver-Burk wird aus den Ordinatenabschnitten, die dem Wert für $1/v_{\max}$ entsprechen, deutlich. Obwohl, wie aus der Darstellung nach Michaelis-Menten hervorgeht, gebundenes und freies Enzym die gleiche maximale Reaktionsgeschwindigkeit erreichen, schneiden die Geraden der zweifach reziproken Auftragung die Ordinate nicht an der selben Stelle.

7.3.5 Versuch zum Blockieren potentieller Bindungsstellen durch Lysin

Die maximale Aktivität immobilisierter Enzyme liegt nicht zwangsläufig bei maximaler Beladungsdichte vor. Eine zu hohe räumliche Dichte der Enzymeinheiten auf der Oberfläche könnte negative Auswirkungen auf die Ausbildung der Aktiven Zentren haben, so daß sich möglicherweise aus der sterischen Behinderung eine Absenkung der potentiell erreichbaren enzymatischen Aktivität ergibt. Um diesen Effekt eingehender zu untersuchen, wurden Immobilisierungsreaktionen unter gleichzeitiger Zugabe von Lysin durchgeführt. Die Aminogruppen des Lysins sollten in Konkurrenz zu denen des Enzyms treten, so daß eine erhöhte Lysin-Konzentration während der Immobilisierung eine geringere Beladungsdichte mit Enzym zur Folge haben sollte.

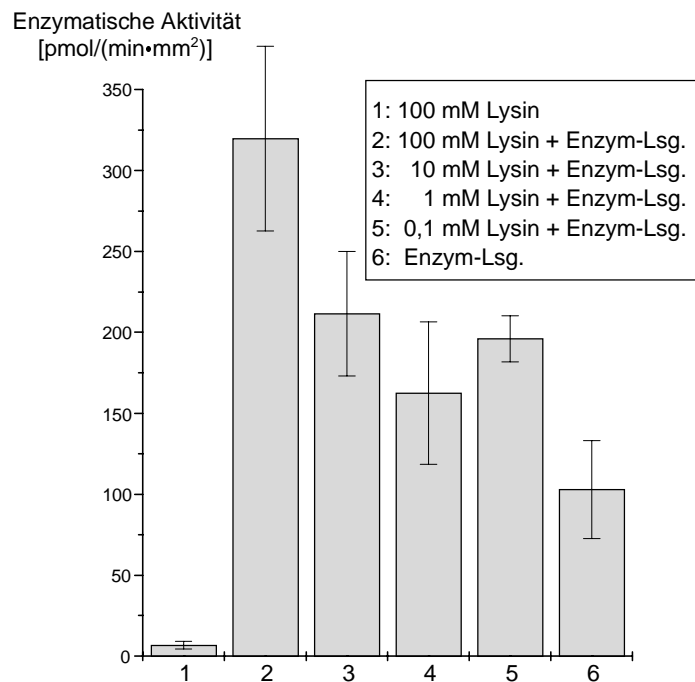


Abb. 7-17: Darstellung der enzymatischen Aktivität in Abhängigkeit der während der Immobilisierungsreaktion zugesetzten Menge an Lysin

Aus der Graphik (Abb. 7-17) geht deutlich hervor, daß bei Zugabe einer konstanten Enzymmenge mit wachsender Lysin-Konzentration die enzymatische Aktivität steigt. Der unter Zusatz von 100 mM Lysin hergestellte Enzym-Wafer zeigt eine gegenüber dem nur in Gegenwart der Enzym-Lösung hergestellten Enzym-Wafer eine doppelte Aktivität.

Aus diesem erstaunlichen Ergebnis ergeben sich mehrere Vermutungen. Es liegt nahe, daß die Zugabe von Lysin adhäsive und ionische Wechselwirkungen des Enzyms mit der festen

Phase verstärkt und so zu einer erhöhten Menge an gebundener Alkalischer Phosphatase führt. Diese Annahme ist durch die Einführung weiterer Waschschriffe mit salzhaltigen Puffern zum Aufbrechen ionischer Wechselwirkungen zu bestätigen. Es wäre desweiteren denkbar, daß sich während der Immobilisierungsreaktion Wechselwirkungen zwischen Lysin und Enzym positiv auf die Kopplungsausbeute auswirken. Andererseits könnte postuliert werden, daß die Beladungsdichte mit Alkalischer Phosphatase so hoch ist, daß sich die Untereinheiten behindern und die aktiven Zentren für das Substrat nicht mehr frei zugänglich sind. Die Zugabe von Lysin könnte nun ein Blockieren potentieller Bindungsstellen zur Folge haben und so zur Immobilisierung einer geringeren Menge Alkalischer Phosphatase unter vollständiger Erhaltung der enzymatischen Aktivität führen. Zur Verifizierung dieser möglichen Interpretationen wurden zusätzliche Experimente durchgeführt. Zunächst konnte durch ein analog mit Alkalischer Phosphatase in Lösung durchgeführtes Experiment gezeigt werden, daß die Gegenwart von Lysin nicht generell zu einer Erhöhung der enzymatischen Aktivität führt. Die gemessene Aktivität des Enzyms in Lösung erwies sich als von der Menge zugesetzten Lysins unabhängig.

Um zu untersuchen, ob Lysin potentielle Bindungsstellen der Alkalischen Phosphatase zu blockieren vermag, wurden parallel mit DITC aktivierte Silizium-Wafer einerseits erst mit Lysin und anschließend mit Enzym und andererseits in umgekehrter Reihenfolge umgesetzt. Da für beide Enzym-Wafer vergleichbare enzymatische Aktivitäten gemessen wurden, hat die Vorbehandlung mit Lysin offenbar keinen Einfluß auf die Menge gebundenen aktiven Enzyms. Um eventuell vorhandene ionische Wechselwirkungen zwischen Lysin und Enzym zu unterbinden und dadurch unspezifische Bindung des Enzyms an die Oberfläche von kovalenter zu unterscheiden, wurde sowohl der mit Lysin präinkubierte als auch der direkt hergestellte Enzym-Wafer mit einem Hochsalz-Puffer (50 mM Na_2HPO_4 , 300 mM NaCl, pH 7.85) behandelt. Für beide Enzym-Wafer wurden unveränderte Werte für die enzymatische Aktivität erhalten. Wurde jedoch der direkt hergestellte Enzym-Wafer anschließend mit einer Lysin-Lösung behandelt, so stieg die enzymatische Aktivität um ca. 40 % des ursprünglichen Werts. Aus diesem Ergebnis läßt sich schließen, daß die Gegenwart von Lysin lediglich die aktive Konformation des Enzyms und damit die Umsatzrate begünstigt. Ob dieser positive Einfluß eventuell über eine Erhöhung der Hydrophilie der Oberfläche durch Adsorption von Lysin, die sich vorteilhaft auf die Tertiärstruktur des Enzyms auswirkt, erklärt werden kann, bleibt offen.

7.3.6 Experimente zur Aufklärung der Anbindung der Alkalischen Phosphatase

Die Alkalische Phosphatase zeichnet sich wie bereits eingangs beschrieben durch ihre besondere Quartärstruktur aus. Beide Untereinheiten besitzen jeweils ein aktives Zentrum und sind dennoch nur als Dimer aktiv. Es besteht daher die Möglichkeit, daß bei der Anbindung an eine feste Phase entweder beide Untereinheiten kovalent fixiert vorliegen, oder nur ein Monomer kovalent an die Oberfläche gebunden wird, während das andere sich durch ionische Wechselwirkungen, die über die Metallionen vermittelt werden, anlagert. Zur Abschätzung dieser beiden denkbaren Anbindungsformen wurde der Einfluß von einer Behandlung mit EDTA-Lösung und anschließender Rückführung von Metallionen auf die enzymatische Aktivität untersucht. Die für die Ausbildung der aktiven Konformation notwendigen Metallionen werden durch EDTA komplexiert, wodurch die enzymatische Aktivität stark zurückgehen sollte. Wird nun anschließend mit Magnesium(II)- und Zink(II)-Ionen behandelt, so sollte die enzymatische Aktivität bei kovalenter Anbindung beider Untereinheiten wieder ihren Ausgangswert erreichen.

Im Experiment zeigte sich wie erwartet ein Rückgang der enzymatischen Aktivität nach der Behandlung mit EDTA-haltigem Tris-Puffer gegen Null. Enzym-Wafer, die zunächst mit EDTA behandelt, mit Wasser gewaschen und anschließend mit Mg^{2+}/Zn^{2+} -haltigem Puffer inkubiert wurden, erreichten lediglich 20 % der ursprünglichen enzymatischen Aktivität. Aus dem Experiment folgt, daß nicht alle Untereinheiten kovalent an die Oberfläche gebunden sind. Ob die nach der Renaturierung vorliegende enzymatische Aktivität auf einen geringen Anteil kovalent gebundenen Dimers oder aber auf eine Reassoziierung immobilisierter Monomer-Einheiten zurückzuführen ist, läßt sich nicht festmachen.

7.3.7 Untersuchung der Enzym-Wafer mittels MALDI-TOF MS

Vergleichend zur Enzym-Lösung (vgl. Kap. 7.2.3, S. 66) wurden Enzym-Wafer mit der MALDI-TOF Massenspektrometrie untersucht. Dazu wurde die Matrix-Lösung direkt auf den Wafer gegeben, welcher zuvor auf einem Target befestigt wurde. Während für die Enzym-Lösung (vgl. Abb. 7-8, S. 67) auch das Dimer detektierbar ist, tritt im MALDI-TOF Massenspektrum des Enzym-Wafers (Abb. 7-18) lediglich bei 48040 m/z ein deutliches Signal für die Monomer-Einheit der Alkalischen Phosphatase auf. Die Beobachtung, daß

vom Enzym-Wafer demnach keine Dimereinheiten desorbiert werden konnten, liefert eine zusätzliche Bestätigung der Ergebnisse aus 7.3.6. Es scheint keine unspezifische Anbindung intakter Dimere an die Oberfläche erfolgt zu sein. Die enzymatische Aktivität der Enzym-Wafer liegt in der Komplexierung kovalent gebundener Monomere mit freien Monomeren oder aber kovalent gebundener intakter Dimere begründet.

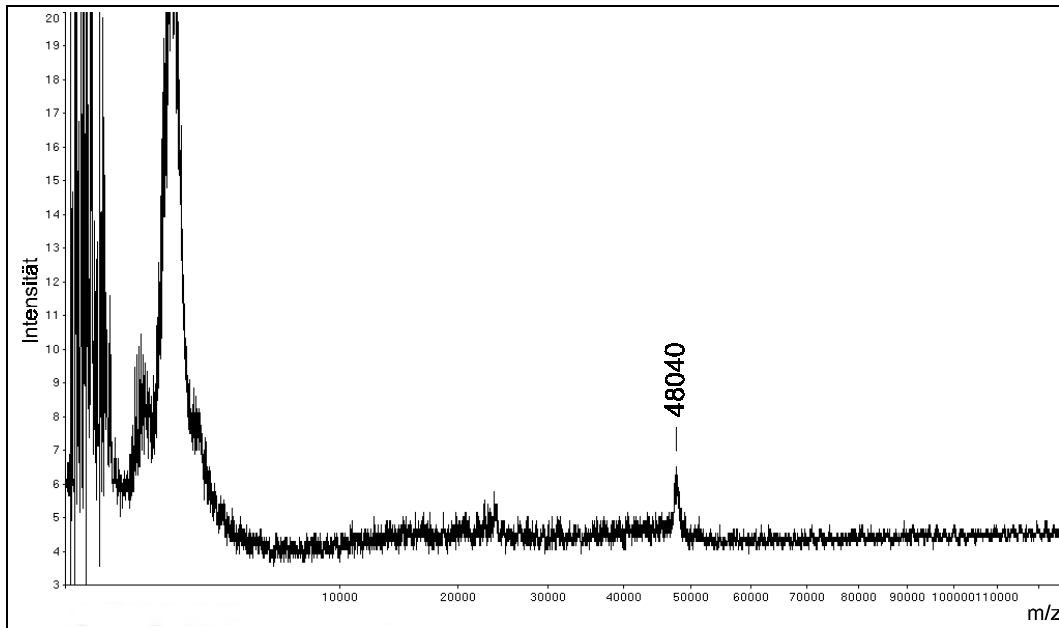


Abb. 7-18: MALDI-TOF Massenspektrum von auf Silizium-Wafer immobilisierter BAPHis6

7.4 Einsatz der Enzym-Wafer in DNA-Rekombinationstechniken

Die Behandlung von DNA mit Alkalischer Phosphatase ist ein fester Bestandteil molekularbiologischer Rekombinationstechniken.

Eine mögliche Vorgehensweise zur Herstellung rekombinanter DNA besteht darin, zunächst den ausgewählten Plasmid-Vektor sowie die Fremd-DNA mit dem gleichen Restriktionsenzym zu schneiden. Bei der Zusammenlagerung der durch die Restriktion entstandenen kohäsiven Enden entstehen Verbindungen, deren Phosphodiesterbrücken geöffnet sind. DNA-Ligase katalysiert die Reparatur dieser Einzelstrangbrüche und es entsteht eine intakte doppelsträngige DNA.

Die Ligationsreaktion muß so optimiert sein, daß möglichst viele rekombinante Moleküle entstehen. Die erneute Ringbildung des gespaltenen Vektors, die Entstehung von Dimerisierungsprodukten und Mehrfachinsertionen soll unterdrückt werden. Der Rezirkularisierung der linearisierten DNA-Fragmente kann durch eine Erhöhung der DNA-Konzentration des Inserts entgegengewirkt werden. In verdünnten Lösungen erfolgt die intramolekulare Ringbildung bevorzugt, da die Wahrscheinlichkeit einer intermolekularen Reaktion sinkt.

Eine zusätzliche Möglichkeit stellt die Behandlung der linearisierten Plasmid-Vektor-DNA mit Alkalischer Phosphatase dar (vgl. Abb. 7-19). Die enzymatische Entfernung der 5'-Phosphatgruppen verhindert eine erneute Ringbildung sowie die Ausbildung von Plasmiddimeren. Die Zirkularisierung des Vektors kann nur dann erfolgen, wenn die Fremd-DNA, die keiner Phosphatase-Behandlung unterzogen wurde, und damit für jede Ligationsstelle eine 5'-Phosphatgruppe liefert, zugegeben wird. Dabei verbleibt an jeder Verknüpfungsstelle ein unligierter Einzelstrangbruch, der jedoch durch den zellulären Reparaturmechanismus des Wirtsorganismus nach der Transformation geschlossen werden kann. Der Einbau nur eines Fragmentes der Fremd-DNA kann über das Konzentrationsverhältnis Plasmid/Insert beeinflußt werden. Die Ausbeute an rekombinantem Plasmid ist generell am höchsten, wenn Vektor und Insert im Verhältnis 1:3 eingesetzt werden.

Die Dephosphorylierungsreaktion an der linearisierten Vektor-DNA macht vor ihrem Einsatz in der Ligation zusätzliche Reinigungsschritte notwendig. So ist die DNA z.B. durch Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion vom Enzym zu befreien und anschließend ethanolisch zu fällen. An einer festen Matrix immobilisierte Alkalische Phosphatase würde die Durchführung derartiger Ligationsansätze entscheidend

vereinfachen. Die linearisierte Vektor-DNA würde lediglich in entsprechendem Puffer mit der enzymbeladenen Matrix inkubiert und nach Entfernen des Trägermaterials direkt in der Ligationsreaktion eingesetzt werden können.

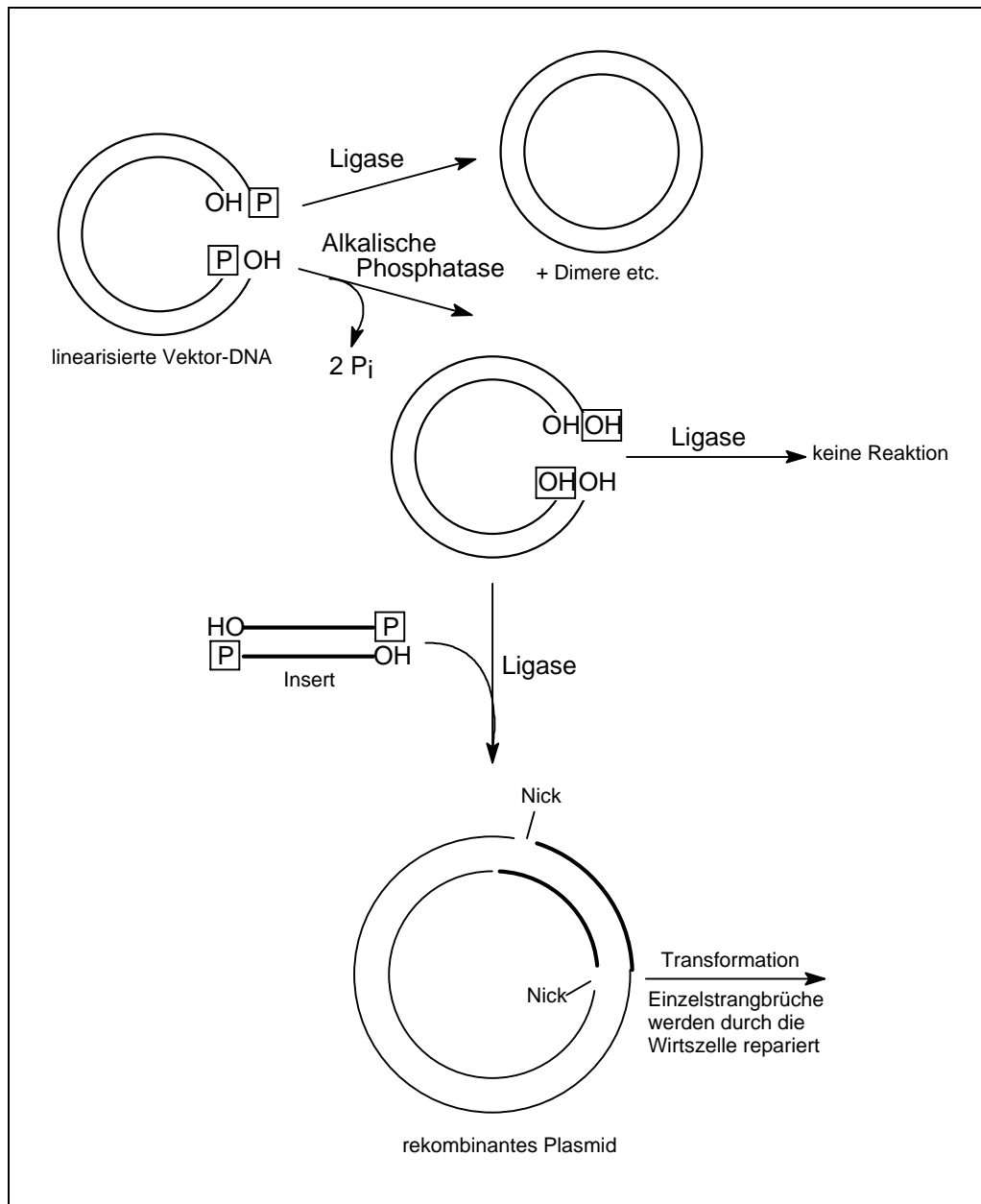


Abb. 7-19: Herstellung eines rekombinanten Plasmids

Die Einsatzmöglichkeit der wie in Kapitel 7.3 beschrieben dargestellten Enzym-Wafer zur Dephosphorylierung von DNA wurde vergleichend zur gängigen Methode untersucht. Der Nachweis der erfolgreichen Dephosphorylierung von Plasmid-DNA erfolgte nach dem allgemein gebräuchlichen Verfahren der Blau-Weiß-Selektion. Üblicherweise findet dieses Verfahren zum Nachweis eingebauter DNA in Plasmide der pUC-Familie Anwendung.

Ein typischer Plasmidvektor zur Vermehrung klonierter DNA-Fragmente enthält als wichtigste Bestandteile einen Replikationsursprung (*ori*, *origin of replication*), der die effiziente Vermehrung des Plasmids ermöglicht, ein Resistenzgen wie z.B. *amp^R* für die Ampicillin-Resistenz zur Selektion von Zellen, die das Plasmid enthalten, und Restriktionsschnittstellen zum Einbau fremder DNA. Dieser besonders eingefügte DNA-Abschnitt mit vielen Restriktionsschnittstellen (*MCS*, *multiple cloning site*) liegt innerhalb eines 5'-Abschnitts des *lacZ*-Gens von *E. coli*. Dieser Abschnitt codiert einen aminoterminalen Teil der β -Galactosidase. Der integrierte Polylinker, die *MCS*, führt nicht zu einer Unterbrechung des Leserasters des *lacZ*-Gens. In einem geeigneten *E. coli*-Wirtstamm, der auf seinem Genom den 3'-Abschnitt des *lacZ*-Gens besitzt und daher den carboxyterminalen Teil der β -Galactosidase liefert, führt die Expression zur Synthese aktiver β -Galactosidase. Läßt man derartige Bakterien auf Agarplatten wachsen, die die farblose Substanz (5-Brom-4-chlor-3-indolyl)- β -D-galactosid (X-Gal) enthält, wird nach Induktion mit IPTG durch die Spaltung von X-Gal durch die β -Galactosidase ein unlöslicher blauer Farbstoff (5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo) gebildet (vgl. Abb. 7-20 und 7-11). Daher erscheinen *E.coli*-Kolonien mit Plasmiden, in deren Polylinker-Region keine Fremd-DNA integriert wurde, blau. Der Einbau der Fremd-DNA in die *MCS* zerstört jedoch das Leserraster des *lacZ*-Gens. Die betreffenden Bakterien-Kolonien bleiben in Gegenwart von X-Gal farblos.

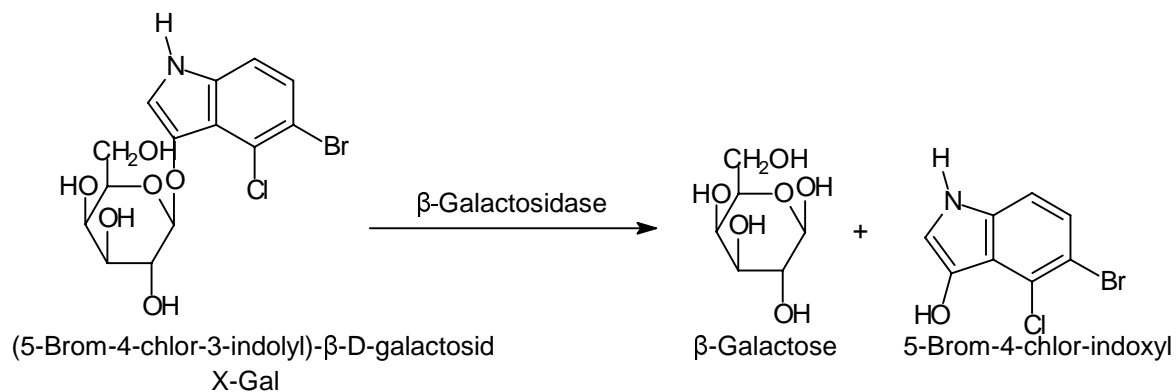


Abb. 7-20: Spaltungsreaktion von X-Gal durch β -Galactosidase

Dieses Verfahren wurde in einer vereinfachten Version als Nachweismethode der Dephosphorylierung von DNA durch die Alkalische Phosphatase herangezogen. Durch Restriktionsverdau eines geeigneten Plasmids mit einem entsprechenden Restriktionsenzym werden kohäsive Enden erzeugt. An den 3'-Enden trägt das einfach geschnittene

Plasmid eine freie OH-Gruppe, während das 5'-Ende durch Phosphatgruppen gebildet wird. Dies sind genau die Voraussetzungen, die das Enzym DNA-Ligase benötigt, um die erneute Ausbildung einer Phosphodiesterbindung zwischen den beiden DNA-Ketten zu katalysieren. Nach erfolgreicher Ligation läge das ursprüngliche Plasmid vor, das nach Transformation die Expression der β -Galactosidase ermöglicht. Nach Ausbringen auf ampicillinhaltigen mit X-Gal behandelten Agarplatten würden die blau gefärbten Wirtskolonien sichtbar. Wird jedoch das doppelsträngige einfach geschnittene Plasmid erfolgreich durch Alkalische Phosphatase dephosphoryliert, so können die Stränge durch DNA-Ligase nicht ligiert werden. Nach Transformation und Ausbringen auf analog behandelten Agarplatten wären keine Kolonien erkennbar.

7.4.1 Dephosphorylierung von DNA

Für die Dephosphorylierungsreaktion wurde mit *Hind*III geschnittene, linearisierte pOM9-Vektor-DNA^[184] (2704 bp) eingesetzt.

Die Dephosphorylierung wurde einerseits mit an Silizium-Wafer immobilisierter Alkalischer Phosphatase und andererseits mit Enzym-Lösung vergleichbarer enzymatischer Aktivität (0.005 u) durchgeführt. Dazu wurde jeweils die gleiche Menge DNA-Lösung (200 ng DNA) mit einem Enzym-Wafer bzw. der Enzym-Lösung in Dephosphorylierungspuffer 1.5 Stunden bei 37 °C inkubiert. Als Negativkontrollen wurden Ansätze ohne Enzym sowie in Gegenwart unbeladener Silizium-Wafer analog behandelt.

Der Dephosphorylierungsreaktion mit Enzym-Lösung schloß sich die Reinigung der DNA nach der Glasmilch-Methode^[185] an. Im Falle der Dephosphorylierung an fester Phase konnte die DNA durch einfaches Entnehmen des Enzym-Wafers aus dem Reaktionsansatz von Protein befreit werden. Abschließend wurde die DNA aus Ethanol gefällt und in Wasser resuspendiert.

Zur Untersuchung des Anteils eventuell durch Adsorption an die Silizium-Oberfläche gebundener DNA wurden die Enzym-Wafer eine Stunde bei 55 °C mit einem Arginin-Puffer behandelt und die DNA aus Ethanol gefällt.

Die aus den Dephosphorylierungsansätzen erhaltene DNA wurde einer Ligation durch T4-DNA-Ligase bei 4 °C über Nacht unterworfen. Nach Ethanolfällung wurde das DNA-Produkt in jeweils 20 μ l Wasser aufgenommen. Jeweils 10 μ l der DNA-Lösungen wurden

gelelektrophoretisch analysiert. Abbildung 7-21 zeigt für die Dephosphorylierungsansätze mit den Enzym-Wafern (Bahn 4 und 5) ein eindeutiges DNA-Fragment 2704 bp), welches der Kontrollreaktion mit Enzym-Lösung (Bahn 3) entspricht. Die Negativkontrolle (Bahn 1) zeigt die Bildung von DNA-Fragmenten größerer Länge, die durch Dimerbildung während der Ligationsreaktion erklärt werden können.

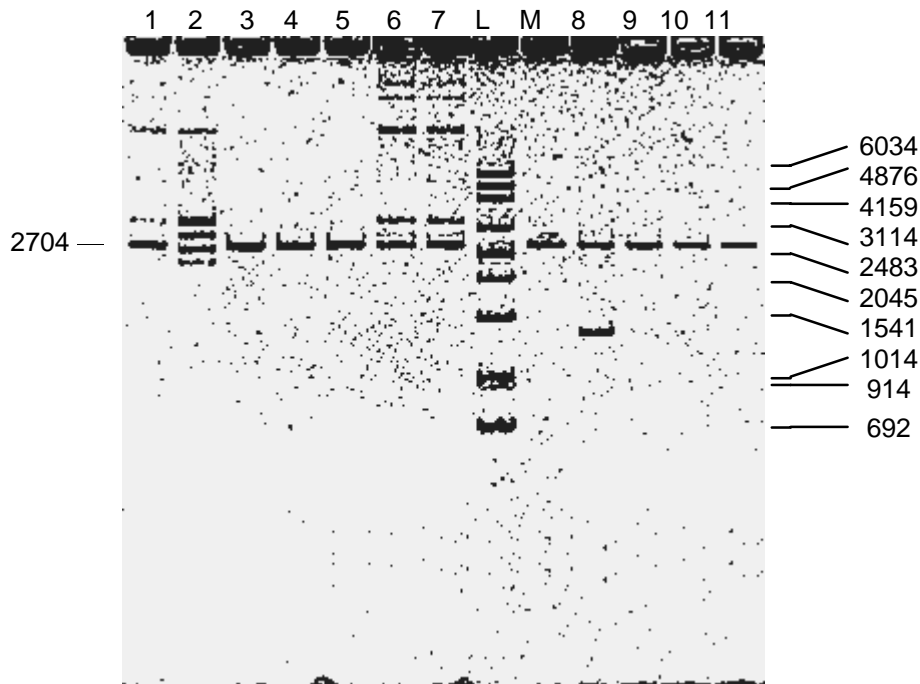


Abb. 7-21: Agarosegel (1%ig (w/v), invertiert abgebildet) zur Überprüfung der Dephosphorylierung mit Enzym-Wafer

Bahn 1-7: DNA nach Dephosphorylierung, Isolierung, Ligation und Fällung

Bahn 1: Negativkontrolle : ohne BAP, Bahn 2: Positivkontrolle: Dephosphorylierung mit CIP, Bahn 3: Dephosphorylierung mit BAPHis6-Lösung, Bahn 4, 5: Dephosphorylierung mit Enzym-Wafer, Bahn 6, 7: Negativkontrolle: Inkubation mit unbeladenem Silizium-Wafer

Bahn L: Längenmarker

Bahn M: Mengenmarker 30 ng pUC19-DNA

Bahn 8-11: aus den Arginin-Überständen ethanolisch gefällte DNA (= durch Adsorption an Silizium-Wafer verursachter DNA-Verlust)

Bahn 8, 9: Enzym-Wafer

Bahn 10, 11: unbeladener Silizium-Wafer

Die positive Kontrollreaktion mit kommerziell erhältlicher Alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (*calf intestine phosphatase*, CIP) lieferte ebenfalls Ligationsprodukte, was dadurch erklärt werden kann, daß keine quantitative Dephosphorylierung durch CIP

erfolgte. Die Produkte der Negativkontrolle (Bahn 1) entsprechen denen der Ansätze die in Gegenwart unbeladener Silizium-Wafer durchgeführt wurden (Bahn 6 und 7).

Die Verluste an adsorptiv an die Silizium-Oberfläche gebundener DNA lassen sich grob durch einen Vergleich der Bandenintensitäten abschätzen. Nach der Dephosphorylierung durch den Enzym-Wafer können nach Fällung ca. 40 ng DNA (entspricht 40 % des halben Ansatzes, Bahn 4) detektiert werden. Nach Behandlung des entnommenen Wafers mit Arginin-Puffer und Fällung werden nochmals ca. 20 ng DNA (Bahn 8) nachgewiesen. Insgesamt können folglich nur 60 ng der anfänglichen 100 ng DNA nachgewiesen werden. Dieser Ausbeuteverlust läßt sich durch die zweifache Ethanol-fällung, die nie quantitativ erfolgt, begründen.

Ein Vergleich der nach der Argininbehandlung gefällten DNA-Menge macht den Einfluß der unterschiedlichen Oberflächenbeschaffenheit der Enzym-Wafer und der Silizium-Wafer deutlich. Die Enzym-Wafer adsorbieren eine größere DNA-Menge (Bahn 8 und 9) als die unbehandelten stark hydrophoben Silizium-Wafer (Bahn 10 und 11).

Die Produkte der Ligationsreaktionen (0.2 µl DNA-Lösung) wurden durch Elektroporation^[186] in *E. coli*-Zellen des Stammes DH10B transformiert. Zur Selektion der transformierten Zellen wurde die Bakteriensuspension auf ampicillinhaltigen Agarplatten ausgestrichen, deren Medium IPTG und X-Gal enthielt. Abbildung 7-22 zeigt eine photographische Aufnahme der Kulturplatten. Kulturplatte A zeigt als Negativkontrolle unzählige blaue Kolonien. Hier wurde die linearisierte Vektor-DNA nicht mit Alkalischer Phosphatase behandelt, so daß sie in der Ligationsreaktion rezyklisieren konnte und nach der Transformation zur Expression aktiver β-Galactosidase befähigt ist. Kulturplatte B zeigt die entsprechende Positivkontrolle der mit Alkalischer Phosphatase behandelten Vektor-DNA. Hier können ca. 15 blaue Kolonien und wenige weiße identifiziert werden. Die erfolgreiche Dephosphorylierung der Vektor-DNA hat in diesem Fall eine Rezyklisierung verhindert und es wird keine aktive β-Galactosidase exprimiert. Ein vergleichbares Ergebnis wurde, wie Kulturplatte C zeigt, durch den Einsatz der Enzym-Wafer erreicht. Die Silizium-Oberfläche selbst hat keinen Einfluß auf die Dephosphorylierungsreaktion, wie aus der weiteren Negativkontrolle, der Kulturplatte D, deutlich wird.

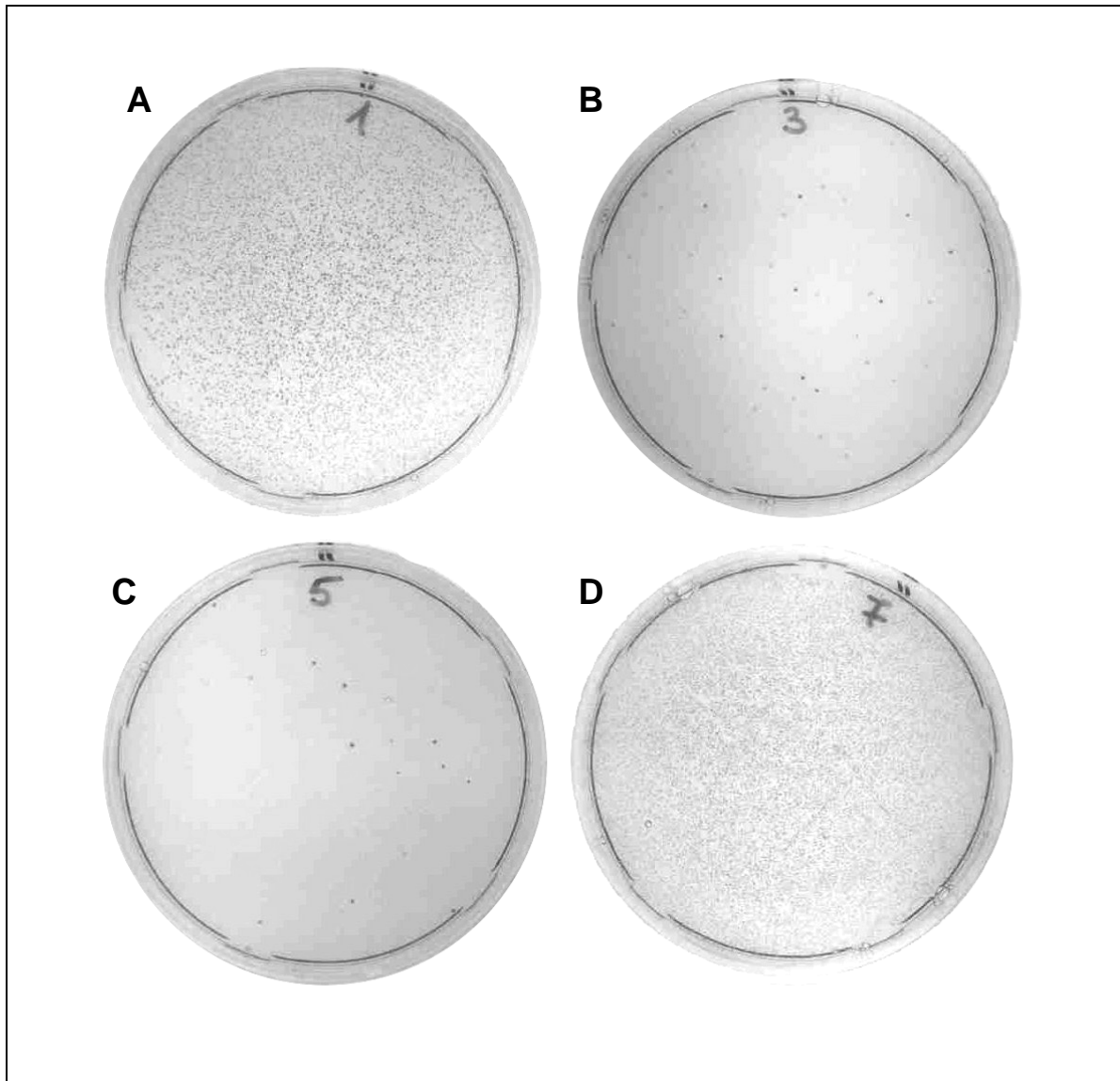


Abb. 7-22: Photographie der Kulturplatten des Blau-Weiß-Screenings zur Überprüfung der Dephosphorylierungsreaktion von Vektor DNA
A: Negativkontrolle: Vektor-DNA ohne BAP
B: Positivkontrolle: Vektor-DNA mit BAP-Lösung
C: Vektor-DNA mit Enzym-Wafer
D: Vektor-DNA mit unbeladenem Silizium-Wafer

Nach diesen Kontrollexperimenten zur Überprüfung der Dephosphorylierung wurde der übliche Weg der Rekombination beschrrieben. Als Insert für die eigentliche Ligation fungierte ein nach Restriktionsverdau mit *Hind*III isoliertes Fragment (1931 bp) des Plasmids pTAPOL3^[187], welche das Gen der Taq-Polymerase enthält. Nach der Ligation und Transformation wurde zur Selektion kompetenter Zellen wie bereits beschrieben auf Agar-Platten ausgestrichen. Aus den in großer Zahl gebildeten weißen Kolonien wurden

einige in ampicillinhaltigem Medium angeimpft und die Plasmid-DNA nach der Minilysat-Methode isoliert und gereinigt. Die Plasmid-DNA-Lösungen wurden zur Kontrolle mit *Hind*III gespalten und gelelektrophoretisch analysiert. Das Gelbild in Abbildung 7-23 bestätigt, daß der Verdau mit *Hind*III zu den Ausgangsfragmenten von 2704 bp (Vektor) und 1931 bp (Insert) führt. Lediglich bei einer Kolonie konnte keine korrekte Ligation mit der Insert-DNA nachgewiesen werden. Bahn 4 zeigt nur die Bande, die der Vektor-DNA entspricht.

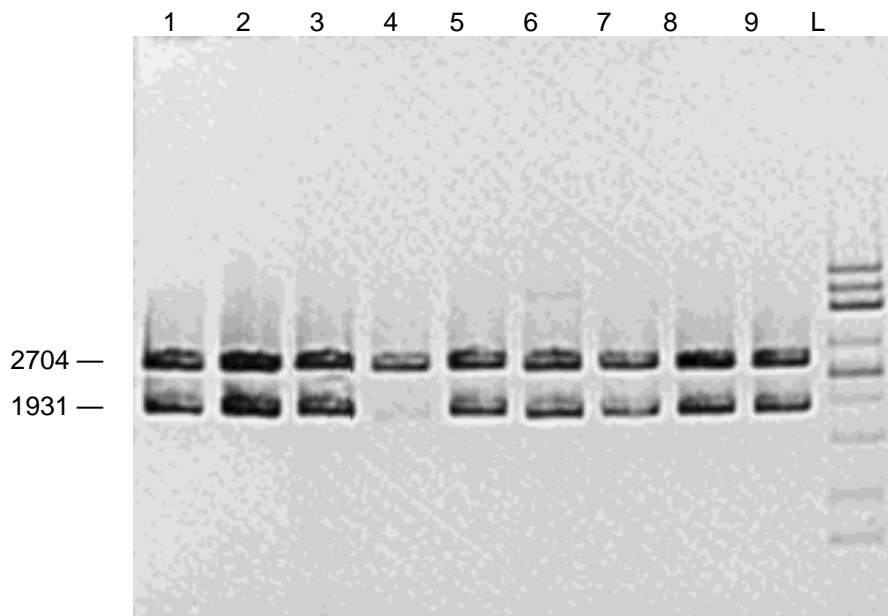


Abb. 7-23: Agarosegel (1 %ig (w/v), invertiert abgebildet) der durch *Hind*III verdauten Plasmid-DNA pTEST (4635 bp)
 Bahn 1-4 einzeln aufgearbeitet Kolonien 1-4
 Bahn 5: Kolonie 5-9
 Bahn 6: Kolonie 10-14
 Bahn 7: Kolonie 15-19
 Bahn 8: Kolonie 20-24
 Bahn 9: Kolonie 25-29
 Bahn L: Längenmarker

Zur Kontrolle wurde die Plasmid-DNA durch eine weitere Restriktionskartierung charakterisiert. Der Verdau mit *Bam*HI und *Mst*I lieferte Fragmente der erwarteten Länge.

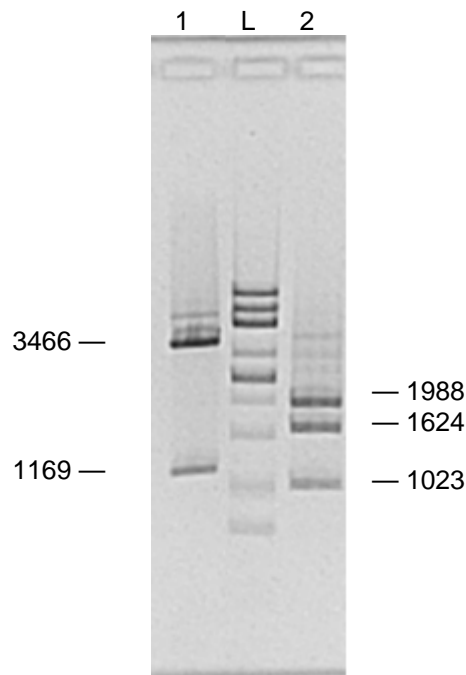


Abb. 7-24: Restriktionskartierung des Ligationsproduktes pTEST (4635 bp)
 Bahn 1: Spaltungsprodukte des *Bam*HI-Verdaus
 Bahn L: Längenmarker
 Bahn 3: Spaltungsprodukte des *Mst*I-Verdaus

Nach diesem erfolgreichen Einsatz an Silizium-Wafer gebundener Alkalischer Phosphatase in Dephosphorylierungsreaktionen von DNA wurde die Wieder-verwendbarkeit des immobilisierten Enzyms untersucht. Dazu wurden die in einer ersten Dephosphorylierungsreaktion verwendeten Enzym-Wafer nach der Behandlung mit Arginin zur Ablösung adsorbierter DNA mit Mg^{2+}/Zn^{2+} -Puffer zur Renaturierung inkubiert und erneut in einer Dephosphorylierungsreaktion eingesetzt. Auf allen Stufen wurden parallel Aktivitätsbestimmungen durchgeführt. Dabei wurde nach dem ersten Einsatz der Enzym-Wafer ein Rückgang der enzymatischen Aktivität auf 0.1 % des Ausgangswertes beobachtet. Die anschließende Behandlung mit dem Renaturierungspuffer führte lediglich zu einer Erhöhung auf ca. 1 % der ursprünglichen Aktivität.

Die enzymatische Aktivität geht demnach während der Behandlung mit Arginin-Puffer und mehrmaligem Waschen verloren. Der Puffer bewirkt die Denaturierung des Enzyms und im Falle der Alkalischen Phosphatase damit verbunden die Spaltung des Enzym-Komplexes in die Monomereinheiten. Da nicht zwangsläufig beide Untereinheiten kovalent gebunden sind, können Monomere während der Waschschriffe entfernt werden und stehen damit nach

Behandlung mit einem Renaturierungspuffer nicht mehr zur Ausbildung des aktiven Enzym-Komplexes zur Verfügung.

Die Alkalische Phosphatase, die nur als über zweiwertige Metallkationen komplexiertes Dimer in aktiver Konformation vorliegt, erscheint daher ungeeignet, um an planare Oberflächen gebunden mehrfach eingesetzt zu werden. Eine einzuführende kovalente Verbrückung der beiden Monomereinheiten würde die Stabilität der katalytisch aktiven Konformation begünstigen. Darüber hinaus wäre die Übertragung der Immobilisierungsbedingungen auf ein als Monomer aktives Enzym, wie z.B. die RNase I, denkbar, um einen Nachweis der Mehrfachverwendbarkeit von an eine Oberfläche fixierten Enzymen erbringen zu können.

8 Diskussion

Die kovalente Verknüpfung von Oligonucleotiden bekannter Sequenz in einem geordneten Raster auf einer Trägeroberfläche gewinnt im Zuge der Miniaturisierung, Automatisierung und Parallelisierung von Verfahren zur DNA-Analyse zunehmend an Bedeutung. Für die Miniaturisierung und eine hinreichende Auflösung werden maximale Beladungsdichten der auf der Chipoberfläche immobilisierten Oligonucleotide angestrebt. Eine optimale Beladungsdichte liegt vor, wenn möglichst viele Moleküle pro Fläche unter Aufrechterhaltung der Zugänglichkeit für einen Hybridstrang sowie für ein Enzym fixiert werden können. Eine besondere Bedeutung kommt der direkten Analyse enzymatischer Reaktionsprodukte von einer planaren Oberfläche mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie zu, die eine Alternative zur zeit- und durchsatzlimitierenden gelelektrophoretischen Auftrennung darstellt.

Grundsätzlich wären für die Herstellung von Oligonucleotid-Arrays genaue Kenntnisse über die Einflüsse des Trägermaterials, der eingeführten Linker sowie die Bedeutung der Länge dieser Linker für die Immobilisierungsreaktion und sich anschließende Experimente von großem Nutzen. Besonders wichtig erscheint die Entwicklung geeigneter Verfahren zur Quantifizierung der Oberflächenfunktionalität sowie der Immobilisierungsrate. Bei der Herstellung von Oligonucleotid-Arrays durch *in situ* Synthese kann die Quantifizierung der einzelnen Kopplungsschritte durch photometrische Vermessung der Detritylierungslösungen erfolgen. U. Maskos *et al.*^[23] führten vergleichende Untersuchungen an CPG und Objektträgern durch und erreichten Beladungsdichten von 0.6 bzw. 0.39 pmol/mm². Diese Meßwerte können jedoch bereits durch die unterschiedliche Oberflächenbeschaffenheit beeinflusst sein. Die poröse Struktur des CPG erschwert die Diffusion während der Umsetzungen, während an der planaren Oberfläche durch unzureichendes Rühren unvollständige Kopplungen erfolgen können. Ein gebräuchliches Verfahren zur Quantifizierung von postsynthetisch immobilisierten Oligonucleotiden stellen radioaktive Markierungen dar. M.D. Eggers *et al.*^[38] ermittelten an Silizium nach Anbindung eines 3'-Amino-Oligonucleotids mit ³²P-Markierung an einen Epoxid-Linker eine Beladungsdichte von 17 fmol/mm². Die Bestimmung ³²P-markierter über 3'-Thiolgruppen an iodoacetamido-modifizierte Silizium-Oberflächen (SIAB) gebundener Oligonucleotide

ergab nach M.J. O'Donnell *et al.*^[62] eine Beladungsdichte von 250 fmol/mm², von denen lediglich 40 %, d.h. 100 fmol/mm², für eine Hybridisierung zugänglich waren.

Die Konzentration eines ³²P-markierten RNA Hybrid-Strangs wurde von E. Southern *et al.*^[143] an durch *in situ* Synthese mit Oligonucleotid beladenem Polypropylen und Glas zu 10 bzw. 0.1 pmol/mm² quantifiziert. Eine deutliche Steigerung der Beladungsdichte mit präsynthetisiertem Oligonucleotid von 1 nmol erreichten S. Dubiley *et al.*^[16] durch die Verwendung von Polyacrylamid-Gel-Pads mit einem Volumen von 1 mm x 1 mm x 0.02 mm mit Hilfe einer Aldehyd-Hydrazid-Kopplung. Der hier erfolgte Übergang von der planaren Oberfläche zu einem Trägermaterial mit dreidimensionalen Ausdehnungen ermöglicht diese deutliche Steigerung der Beladungsdichte.

In dieser Arbeit wurde die Idee der Ausdehnung der Zweidimensionalität des planaren Trägermaterials aufgegriffen, indem geeignete Linker, die eine größere Flexibilität der potentiellen Anbindungsstellen gewährleisten, eingeführt wurden. Mit dem Aufbau dendritischer, multivalenter Linker wurde gleichzeitig eine Vervielfältigung der Aminogruppen erreicht, die von der Oberfläche präsentiert werden und zur kovalenten Verknüpfung von Biomolekülen geeignet sind.

Die Ausbeutebestimmung der Kopplungsreaktionen der Linker erfolgte einerseits durch die photometrische Vermessung der Detritylierungslösungen während der Entschützung der eingeführten Hydroxylgruppen und andererseits durch den Pikrinsäure-Assay an Aminogruppen. Die aus unterschiedlichen Assays erhaltenen Meßwerte zur Verfolgung des Reaktionsverlaufs lassen sich generell nicht miteinander korrelieren. Beide Verfahren sind mit unterschiedlichen systematischen Fehlern behaftet. Der Detritylierungs-Assay erfaßt neben dem kondensierten Linker auch unspezifisch gebundenes Edukt. Der Pikrinsäure-Assay kann ebenfalls durch elektrostatische Wechselwirkungen des Aromaten mit der Oberfläche verfälscht sein. Der Pikrinsäure-Assay ist lediglich geeignet, halbquantitative Aussagen über die Veränderung der Beladungsdichte von Aminogruppen zu treffen.

Die Assays dokumentierten unvollständige Kopplungsausbeuten während des Aufbaus der Oberflächenmodifikation. So konnte mit der Einführung des tetrafunktionellen Amidit-Synthons, das bei quantitativem Umsatz zu einer Verdreifachung führen sollte, eine Erhöhung der Beladungsdichte um den Faktor 2.4 gemessen werden. Auch die Umsatzrate der Kopplung von Aminogruppen an aminomodifizierte Oberflächen über eine Aktivierung mit 1,4-Phenylendiisothiocyanat (DITC) wurde mit Hilfe des Pikrinsäure-Assays zu 66 %

bestimmt. Während dieser vergleichenden Betrachtungen bleiben unspezifische Wechselwirkungen des Assay-Reagenzes mit den unterschiedlichen Oberflächenmodifikationen unberücksichtigt. Diese indirekten Nachweisverfahren zur Ausbeutebestimmung sind grundsätzlich fehlerbehaftet und die aus verschiedenen Assays erhaltenen Meßwerte nicht vergleichbar. Im Verlauf der vorliegenden Untersuchungen wurde angestrebt, standardisiertes aminofunktionalisiertes Trägermaterial bekannter Beladungsdichte zu erwerben, um einen Anhaltspunkt für die Abweichung der Meßwerte verschiedener Assays zu gewinnen. Doch auch für die Anbieter derartiger Materialien ist die Quantifizierung der Beladungsdichten nicht selbstverständlich. Ein Hersteller erteilte Angaben über die aus titrimetrischen Verfahren erhaltenen Beladungsdichten.

Den photometrischen Bestimmungen wäre wegen der höheren Genauigkeit ein radioaktiver Nachweis eines entsprechend markierten Reagenzes vorzuziehen, um aussagekräftige quantitative Vergleiche durchführen zu können.

Die nach Aktivierung mit DITC und Umsetzung mit 5'-aminomodifiziertem Oligonucleotid hergestellten Oligonucleotid-Wafer wurden in einer PROBE (*primer oligo base extension*)-Reaktion eingesetzt und die Reaktionsprodukte direkt mittels MALDI-TOF MS detektiert. Die Massenspektren zeigten für keinen der Reaktionsansätze Signale für die zu immobilisierende Template-DNA. Unspezifische Anbindungen der Template-DNA sind nach den erfolgten Waschschritten somit nicht mehr detektierbar.

In Abhängigkeit von der Oberflächenmodifizierung und der Länge der Zykluszeiten konnten das um zwei Nucleotide verlängerte Terminationsprodukt und der eingesetzte Primer in unterschiedlichen Verhältnissen nachgewiesen werden. Das unterschiedliche Kristallisationsverhalten der verschiedenen Oberflächen mit der Matrix und das daraus resultierende Desorptionsverhalten erlaubt keinen Vergleich der Spektren hinsichtlich der Intensität der Signale. Quantitative Aussagen der enzymatischen Reaktionen an den unterschiedlichen Silizium-Wafer können daher anhand der Spektren nicht getroffen werden.

Die Eigenschaften der an der Oberfläche eingeführten Spacermoleküle sind für die Immobilisierungsreaktion und darauffolgende Hybridisierungsexperimente von entscheidender Bedeutung. Generell gilt, je weiter ein oberflächengebundenes Molekül von dieser entfernt ist, desto mehr nähert es sich dem gelösten Zustand und um so leichter

verlaufen Reaktionen mit Reagenzien in Lösung. Als optimale Spacerlänge wurden von M.S. Shchepinov *et al.*^[188] 40 Atome postuliert, mit denen gegenüber einer Oberfläche ohne Spacer eine 150fache Zunahme der Hybridisierungsrate erreicht wird.

Ein weiteres wichtiges Kriterium für die Eignung einer Oberfläche für Immobilisierungsreaktionen sind die Ladungen innerhalb des Spacers. Eine hohe negative Ladungsdichte kann zur Abstoßung des zu immobilisierenden Oligonucleotids führen.

Die Annäherung des zu hybridisierenden Oligonucleotids kann durch eine Anzahl sterischer Faktoren behindert sein. Eine Annäherung von der Oberflächenseite her ist unmöglich, sofern keine Spacer zwischen Oberfläche und gebundenem Liganden vorhanden sind. Eine Annäherung aus der Lösung kann durch eine zu dichte Beladung der Oberfläche mit immobilisierten Liganden erschwert sein. Zusätzlich wird die Annäherung durch die Eigenschaften der Oberfläche, an die die Liganden gebunden sind, beeinflusst. Die Ladung, Hydrophilie und der Solvatationsgrad des immobilisierten Liganden haben signifikanten Einfluß auf die Umgebung in der die Interaktion der beiden Liganden erfolgt. Quantitative Aussagen über die Dichte des auf den unterschiedlich modifizierten Silizium-Oberflächen immobilisierten Oligonucleotids, sowie die Hybridisierungsausbeute wurden im Verlauf dieser Arbeit nicht getroffen.

Die um den Faktor 60 verlängerten Zykluszeiten führten an allen Oberflächen zur quantitativen Umsetzung des Primers. Die Oberfläche, an der ein Spacer mit einer Länge von insgesamt elf Atomen über eine Amidbindung und eine Phosphatbrücke eingeführt wurde, führte nach Durchlaufen der kurzen Zykluszeiten zu den besten Umsatzraten. Die im Vergleich zu anderen Oberflächenmodifizierungen geringere negative Ladungsdichte, sowie der im Vergleich mit der einfach aminofunktionalisierten Oberfläche größere Abstand der Endgruppen zur Oberfläche begünstigen vermutlich die Annäherung des zu immobilisierenden Oligonucleotids. Die Tatsache, daß die Oberflächen mit verzweigter Oberflächentopologie nicht zu besseren Ergebnissen führen, legen die Vermutung nahe, daß sich eine Erhöhung der Beladungsdichte mit funktionellen Gruppen nicht zwangsläufig positiv auswirken muß. Eine zu dichte Belegung der Oberfläche erschwert die Annäherung des zu hybridisierenden Oligonucleotids und des Enzyms.

Es bleibt anzumerken, daß die Beladungsdichte bei den untersuchten Oberflächenmodifikationen nicht separat betrachtet werden kann. Um jeweils die Bedeutung der Länge

und der Polarität des eingeführten Linkers abzuwägen, wäre die Darstellung weiterer modifizierter Silizium-Oberflächen notwendig. So wären verzweigte Strukturen zu synthetisieren, deren Länge und chemische Eigenschaften mit denen eines unverzweigten Linkers übereinstimmen. Zudem wäre die Anzahl der zur Oberflächenmodifikation nötigen Reaktionsschritte zu verringern, um mögliche Verluste durch unvollständige Umsetzungen zu reduzieren. Darüber hinaus erscheint generell ein konvergenter Ansatz zum Aufbau der dendritischen Topologie von Vorteil zu sein. Durch eine einzige Kondensation eines präsynthetisierten verzweigten Synthons an die Oberfläche könnten Ausbeuteverluste, wie sie beim divergenten Aufbau der Linkerstruktur entstehen, vermieden werden.

Um die Umsatzraten an den unterschiedlichen Oberflächen miteinander vergleichen und quantitative Aussagen treffen zu können, könnte das beschriebene Verfahren um den Einbau Digoxigenin-markierter Terminationsprodukte modifiziert werden. Die Einbaurrate wäre über anti-DIG Konjugate quantifizierbar.

Die gewählten Verfahren zur Verfolgung der Reaktionsverläufe haben sich als unzureichend erwiesen. Um die Vorgänge an der Oberfläche genauer untersuchen zu können, erscheint es von besonderer Bedeutung Methoden zu entwickeln, die eine Charakterisierung der Festphase erlauben.

Mit den vorliegenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß mit der gewählten Immobilisierungsstrategie die Anbindung eines Oligonucleotids erfolgt ist. Das auf diesem Wege immobilisierte Oligonucleotid wurde erfolgreich in Hybridisierungsexperimenten eingesetzt und ist darüber hinaus für die Verwendung in enzymatischen Reaktionen geeignet.

Die hergestellten Oligonucleotid-Wafer bieten für den Einsatz in PROBE-Reaktionen entscheidende Vorteile im Vergleich zur Durchführung in homogener Phase. Die enzymatische Reaktion sowie deren Analyse mittels MALDI-TOF MS kann an einer Oberfläche erfolgen. Einfache, automatisierbare Waschschrte ersetzen übliche Verfahren der Trennung und Isolierung des Reaktionsproduktes.

Die hergestellten Oligonucleotid-Wafer stellen einen grundsätzlichen Bestandteil für zukünftige integrierte Mikrosysteme zur automatisierten MALDI-TOF MS Analyse enzymatischer Reaktionen an DNA-Arrays dar.

In weiteren Experimenten wurde im Verlauf dieser Arbeit gezeigt, daß die Aktivierung der aminofunktionalisierten Silizium-Oberfläche mit DITC ebenfalls zur kovalenten Immobilisierung eines Enzyms geeignet ist. Rekombinante Bakterielle Alkalische Phosphatase (BAP) konnte unter Erhalt der enzymatischen Aktivität an die Silizium-Oberfläche gebunden werden. Die hergestellten Enzym-Wafer wurden erfolgreich zur Dephosphorylierung von DNA eingesetzt.

Immobilisierte Enzyme bieten allgemein den Vorteil der einfachen Abtrennung vom Reaktionsprodukt und der Wiederverwendbarkeit. Im Falle der immobilisierten Alkalischen Phosphatase konnte nach den notwendigen Waschschritten zum Entfernen unspezifisch gebundenen Substrats die Ausgangsaktivität nicht wiederhergestellt werden. Da das Enzym nur als über zweiwertige Metallkationen verbrücktes Dimer enzymatische Aktivität aufweist, und nicht zwangsläufig beide Untereinheiten kovalent gebunden sind, kann das Waschen der Oberfläche zur Abspaltung eines Monomers und damit zum Verlust der Aktivität führen.

Es bleibt zu untersuchen, ob eine einzuführende kovalente Verbrückung der Monomereinheiten zu einer erhöhten enzymatischen Aktivität bzw. Verbesserung der Wiederverwendbarkeit führt. Eine weitere Möglichkeit, die kovalente Fixierung des Enzyms in der aktiven Konformation zu begünstigen, bestünde in dem Zusatz von Substrat während der Immobilisierungsreaktion. Die Gegenwart von Substrat oder einem Analogon würde das Vorliegen der verbrückten, aktiven Konformation des Enzym-Dimers begünstigen und eventuell die Immobilisierung beider Untereinheiten an die Oberfläche ermöglichen.

Ein Teil der enzymatischen Aktivität geht vermutlich aufgrund der mit der Immobilisierung verbundenen Konformationsänderungen in Gegenwart des festen Trägers und/oder partielle Denaturierung des Enzyms verloren.

Die durchgeführten Versuche haben keinen Hinweis auf die genaue Orientierung des Enzyms nach der Immobilisierung liefern können. Die kovalente Verknüpfung erfolgte vermutlich über die Aminogruppen des Lysins. Inwieweit der Histidin-Tail an der Bindungsbildung beteiligt ist bleibt offen. Um die Bedeutung des Histidin-Tails genauer zu untersuchen, wären Immobilisierungsexperimente mit BAP durchzuführen und die

kinetischen Daten beider immobilisierter Enzyme mit denen in homogener Phase zu vergleichen^[189]. Erfolgt die Anbindung an einer willkürlichen Lysin-Position, von denen BAP pro Untereinheit 28 besitzt, so wird das Enzym ungeordnet an der festen Phase fixiert, was mit einem Verlust enzymatischer Aktivität durch die erzwungene Konformationsänderung einhergehen kann. Ein gezielt eingeführter Rest, der sich in der aktiven Konformation in genügend großer Entfernung zum aktiven Zentrum befindet, begünstigt eine Kopplungsreaktion unter Aufrechterhaltung der enzymatischen Aktivität^[190]. Nach einer auf diesem Wege erfolgten Anbindung erscheint es sogar denkbar, daß eine Erhöhung der enzymatischen Aktivität gegenüber dem gelösten Enzym gemessen werden kann, da das Enzym durch die Fixierung und der damit eingeschränkten Beweglichkeit in der aktiven Konformation verbleibt. Inwieweit der Histidin-Tail diese Bedingungen erfüllt, müßte geklärt werden.

Ein Aspekt, der den direkten Vergleich der enzymatischen Aktivität des gebundenen mit dem gelösten Enzym erschwert, ist die unterschiedliche Wirksamkeit des kompetitiven Inhibitors Phosphat. Es konnte gezeigt werden^[189], daß nach Phosphatzusatz für das immobilisierte Enzym ein geringerer Rückgang der enzymatischen Aktivität zu beobachten war, als für das homogene Enzym. Da Phosphat unter den Versuchsbedingungen stark polar und ionisiert vorliegt und die Oberfläche hydrophoben Charakter besitzt, ist zu erwarten, daß der Anteil der Produktmenge in Oberflächennähe geringer ist. Dies erklärt einen geringeren Einfluß des Inhibitors auf das an der Oberfläche immobilisierte Enzym und damit eine eventuell in ihrer Größe „verfälschten“ enzymatischen Aktivität.

In zukünftigen Experimenten könnte die hier erfolgreich eingesetzte Immobilisierungsstrategie auf weitere Enzyme, die als Monomer in ihrer aktiven Konformation vorliegen, übertragen werden. In diesem Fall sollte der Enzym-Wafer mehrfach einsetzbar sein und damit eine weitere Komponente zur Automatisierung von Prozeßabläufen liefern.

9 Zusammenfassung

Für die Modifizierung von Silizium-Oberflächen zur Immobilisierung von Biomolekülen wurden in dieser Arbeit dendritische Oberflächentopologien mit einem konvergenten und einem divergenten Ansatz aufgebaut. Einerseits wurde Polylysin nach Aktivierung der Oberflächenfunktionen als multifunktionelle Einheit eingesetzt. Andererseits erfolgte ein stufenweiser Aufbau der Struktur durch die Kondensation verschiedener in organisch-chemischen Synthesen hergestellter multivalenter Reagenzien. Als multivalente Verbindungen, die für die Kopplungsreaktionen eingesetzt wurden, fungierte einerseits ein trifunktioneller aromatischer Linker (**2**), der über die Ausbildung einer Amidbindung an die Oberfläche gebunden werden konnte, sowie andererseits ein Pentaerythrit-Derivat (**9**, vgl. Abb. 3-3, S. 15), das als Amidit der klassischen Oligonucleotidsynthese entsprechend umgesetzt wurde. Darüber hinaus ermöglichten heterobifunktionelle Linker (**11** und **14**, vgl. Abb. 3-4, S. 15) die Überführung von Amino- in Hydroxylfunktionen und umgekehrt. Die Kopplungsreaktionen wurden in unterschiedlichen Kombinationen durchgeführt und führten letztendlich zu sechs verschiedenen modifizierten aminofunktionalisierten Silizium-Oberflächen, die sich in der Länge des eingeführten Linkers, der Anzahl an eingeführten Verzweigungen sowie ihrer Polarität unterschieden. Um die Beladungsdichte während des Aufbaus der dendritischen Topologie und die Umsatzraten der Kopplungsreaktionen verfolgen zu können, wurden unterschiedliche photometrische Quantifizierungsverfahren eingesetzt. So konnte gezeigt werden, daß die Kopplung des Amidit-Synthons (Oberfläche **D**, vgl. Abb. 6-3, S. 38) zu einer Erhöhung der Zahl an Aminogruppen um den Faktor 2.4 (29 pmol/mm^2) im Vergleich mit einer Oberfläche, an der einfache, analoge Kondensationsreaktionen (Oberfläche **B**, 12 pmol/mm^2) vorgenommen wurden, führt. Eine weitere Oberflächenmodifikation unter Verwendung des trifunktionellen Linkers und des Amidits (Oberfläche **E**) lieferte eine Beladungsdichte von 43 pmol/mm^2 , was einer Steigerung um den Faktor 3.6 entspricht. Mit der Einführung von Polylysin (Oberfläche **F**) wurde eine Beladungsdichte von 100 pmol/mm^2 erreicht. Der Modifizierung der Silizium-Oberfläche folgte die Aktivierung der von der Festphase präsentierten Aminogruppen durch Umsetzung mit 1,4-Phenylendiisothiocyanat (DITC) und die Immobilisierung eines 5'-aminomodifizierten Desoxyoligonucleotids.

Die mit Oligonucleotid beladenen Silizium-Wafer wurden in PROBE (*primer oligo base extension*)-Reaktionen auf ihre Verwendung in Hybridisierungsexperimenten und enzymatischen Reaktionen getestet. Die Oberflächen wurden abschließend direkt mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie analysiert. Es konnte gezeigt werden, daß an allen Oberflächenmodifikationen die kovalente Immobilisierung des Templates, die Hybridisierung des Primers sowie dessen enzymatische Verlängerung erfolgt ist. Der Nachweis des korrekten Terminationsprodukts konnte direkt von der Oberfläche mittels MALDI-TOF MS erbracht werden.

Zusätzlich zur Immobilisierung eines Oligonucleotids wurde die kovalente Anbindung eines Proteins, einer rekombinanten Bakteriellen Alkalischen Phosphatase, untersucht. Hier fanden durch Umsetzung mit Silylierungsreagenz aminofunktionalisierte Silizium-Oberflächen nach analoger Aktivierung Verwendung. Die hergestellten Enzym-Wafer zeigten enzymatische Aktivität und wurden in Dephosphorylierungsreaktionen eingesetzt.

10 Summary

Silicon wafers were modified by building up branched dendritic structures on the surface. This strategy was established in order to increase the number of potential binding sites for the immobilization of biomolecules. The surface modification was achieved both by a convergent and a divergent strategy. On the one hand polylysine as a multifunctional linker was coupled to the activated surface. On the other hand a stepwise strategy by using two types of branched multifunctional molecules was developed. A trifunctional aromatic linker (**2**, fig. 3-3, p. 15) was synthesized, which was attached to the surface by standard peptide chemistry. The other type is represented by a pentaerythrite derivative (**9**, fig. 3-3, p. 15), which was coupled according to solid phase oligonucleotide synthesis. Additionally, heterobifunctional linkers (**11** and **14**, fig. 3-4, p. 15) were used to convert the aminofunctions into hydroxy groups and vice versa. The coupling reactions were carried out in different combinations and finally led to six modified silicon surfaces which differ in the length of the linker, the number of branches, and their polarity. Conversion rates and increase of density of accessible functional groups were quantified by different photometric assays. The attachment of the amidite synthon (surface **D**, fig. 6-3, p. 38) led to a loading capacity of 29 pmol/mm² (increasing factor 2.4). Coupling of the trifunctional linker followed by condensation of the amidite-synthon (surface **E**) led to a density of 43 pmol amino groups per mm² (increasing factor 3.6). Immobilization of polylysine (surface **F**) led to an enhanced density of 100 pmol/mm².

Aminofunctions were activated with the homobifunctional crosslinking agent 1,4-phenylenediisothiocyanate (DITC) followed by immobilization of a 5'-amino modified oligonucleotide. The oligonucleotide wafers were applied to PROBE (*primer oligo base extension*)-reactions in order to prove their applicability in hybridization experiments and enzymatic reactions. Finally, the wafers were analyzed directly by MALDI-TOF mass spectrometry. All different modifications were suitable for covalent attachment of the template, hybridization of the primer and its enzymatic extension. The termination product was detected directly from the surface by MALDI-TOF mass spectrometry.

In addition to the immobilization of an oligonucleotide, the covalent attachment of a protein, recombinant bacterial alkaline phosphatase, was investigated. The enzyme coupled to the activated aminomodified silicon surface possessed enzymatic activity and was applied in dephosphorylation reactions.

11 Experimenteller Teil

11.1 Allgemeine Hinweise

Chemische Umsetzungen erfolgten grundsätzlich unter Feuchtigkeitsausschluß und wurden sofern nötig in geschlossenen Apparaturen mit Hg-Überdruckventilen unter Argon durchgeführt.

Alle Reaktionen wurden dünnschichtchromatographisch verfolgt. Das Einengen der Reaktionsprodukte erfolgte bei Temperaturen $< 40\text{ }^{\circ}\text{C}$.

11.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden sofern nicht anders angegeben von den folgenden Firmen bezogen: Merck (Darmstadt), Sigma (Deisenhofen), Aldrich (Steinheim), Fluka (Deisenhofen), Lancaster (Mühlheim am Main)

Der 5'-Amino-Modifier C3-TFA 6-(Trifluoracetylamino)propyl-(2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)-phosphoramidit wurde von der Firma Glen Research (Sterling, Virginia, USA) erhalten.

Lösungsmittel

Für die chemischen Synthesen wurden ausschließlich absolutierte Lösungsmittel der Firmen Fluka und Aldrich eingesetzt.

Ethylendiamin wurde über Calciumhydrid destilliert und nur frisch verwendet.

Deuterierte Lösungsmittel für die NMR-Spektrometrie wurden von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen.

Es wurde an einer Reinstwasseranlage Milli-Q UF Plus der Firma Millipore (Eschborn) gereinigtes Wasser verwendet.

Silizium-Wafer

Erste Untersuchungen wurden an Ausschußmaterial der Firma Wacker durchgeführt. Die Silizium-Wafer wurden mit einem Glasschneider (Oil Hand Cutter TC-600, Pistol-Grip Supercutter™ (Toyo Industrial Co., LTD., Osaka, Japan)) auf die gewünschte Größe (5 mm \times 5 mm) geschnitten. Für die eigentlichen Oberflächenmodifikationen wurden

beidseitig polierte, vorgeschchnittene quadratische Silizium-Wafer der Firma GeSIM mbH (Großberkmannsdorf) mit einer Kantenlänge von 4 mm und einer Dicke von 0.5 mm verwendet.

Oligonucleotide

5'-Aminomodifiziertes Oligonucleotid sowie die als Primer eingesetzte Sequenz wurden von der Firma Metabion (Martinsried) bezogen.

11.1.2 Geräte und Methoden

UV/VIS-Spektrometrie

Die Aufnahme der Spektren erfolgte an einem Biochrom LKB 4060 Photometer der Firma Pharmacia in Quarzglas bzw. Polystyrolküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm

NMR-Spektrometrie

^1H -NMR-Spektren (500 MHz) und ^{13}C -NMR-Spektren (126 MHz) wurden mit einem Spektrometer Typ DRX 500, ^1H -NMR-Spektren (400 MHz) und ^{13}C -NMR-Spektren (101 MHz) mit einem Spektrometer aufgenommen. Die Spektren wurden soweit erforderlich mit Hilfe von $^1\text{H}, ^1\text{H}$ - und $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -Cosy-Experimenten interpretiert. Als interner Standard diente 0.5 % Tetramethylsilan bzw. das Signal des nicht deuterierten Anteils des verwendeten Lösungsmittels.

^{31}P -NMR-Spektren wurden ebenfalls am Spektrometer Typ AMX 400 der Firma Bruker in deuteriertem Lösungsmittel aufgenommen.

Massenspektrometrie

Die Massenspektren im Direkteinlaßverfahren wurden unter EI-Bedingungen mit dem Massenspektrometer 311A der Firma Varian MAT gemessen

MALDI-TOF-Massenspektren wurden mit einem Vision 2000 Massenspektrometer der Firma Finnigan MAT GmbH sowie an einem Biflex III der Firma Bruker GmbH im „positive ion reflector mode“ mit ca. 20 kV Beschleunigungsspannung aufgenommen. Als Matrix diente eine Lösung von 3-Hydroxypicolinsäure (0.7 M 3-Hydroxypicolinsäure, 0.07 M Ammoniumcitrat in Acetonitril/Wasser 1:1 (v/v))

Elektroporator

Es wurde der Elektroporator *E. coli* Pulser von Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA) verwendet.

pH-Meter

pH Messungen erfolgten mit dem pH537 der Firma WTW GmbH (Weinheim) unter Verwendung der pH-Elektrode InLab 410 Mettler-Toledo (Gießen)

Nanoplotter

In der Mikropreparation wurden die DNA-Proben bzw. die Matrix-Lösung mit einem Nanoliter-Pipetting System SpectroJet™ Nanoplotter der Firma GeSIMmbH (Großerkmannsdorf) auf die Chipoberfläche gebracht.

Thermocycler

PCR und PROBE-Reaktionen wurden in einem Omni-Gene Hybridcycler von MWG (Ebersberg) durchgeführt.

Thermomixer

Die Reaktionen an Silizium-Wafer erfolgten in 1.5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen unter Schütteln in einem Thermomixer des Typs 5436 der Firma Eppendorf-Netheler-Hinz (Hamburg).

Gelelektrophoresen

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

Geldokumentation

Zur Aufnahme von Gelen wurde die CCD-Videokamera der DocuGel 1000 Station der MWG Boitech AG (Ebersberg) verwendet.

Dünnschichtchromatographie

Alle Reaktionen wurden dünnenschichtchromatographisch auf Kieselgel-Fertigfolie (Kieselgel 60 F₂₄₅, Firma Merck) verfolgt. Die Detektion erfolgte 1. visuell unter UV-

Licht, 2. Nach Abdampfen flüchtiger Komponenten mit einem Heißluftfön nochmals unter UV-Licht (zur Unterscheidung flüchtiger und nichtflüchtiger UV-aktiver Verbindungen), 3. Nach Behandlung mit Iod, 5. Nach Behandlung mit Ammoniak zum Nachweis p-nitrophenylhaltiger Verbindungen, 4. nach Besprühen mit einem Sprühreagenz (4 ml p-Anisaldehyd, 2 ml konz. Schwefelsäure, 0.5 ml Eisessig in 80 ml Ethanol) und anschließender thermischer Behandlung mit einem Heißluftfön. Dabei ist Orangefärbung (bereits bei Raumtemperatur sichtbar) ein Hinweis auf DMT-haltige Komponenten.

Die entsprechenden Laufmittelsysteme sind bei der jeweiligen Synthese aufgeführt.

Säulenchromatographie

Präparative chromatographische Trennungen erfolgten an Kieselgel 60 Korngröße 0.040-0.063 mm der Firma Merck (Darmstadt) mit ca. 0.2 bar Überdruck (Flash-Chromatographie).

Die jeweiligen Laufmittelsysteme sind bei den einzelnen Synthesen genannt.

Bakterienstämme

Die verwendeten *Escherichia coli*-Stämme sind Derivate des 1922 in Stanford, Kalifornien, isolierten Stammes *E. coli* K12.

Escherichia coli DH10B (GIBCO BRL):

Genotyp: F⁻ *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ80 *dlacZ*ΔM15 Δ*lacX*74 *deoR recA1 endA1 araD139* Δ(*ara,leu*) 7G97 *galU galKλ-rpsL nupG*

Escherichia coli JM83 (Stammsammlung des Arbeitskreises):

Genotyp: F⁻ *ara* Δ(*lac-proAB*) Φ80 Δ*lacZ*ΔM15 *thi rpsL* (Str⁺)

11.2 Organisch-chemische Synthesen

11.2.1 3,5-Dicarbomethoxyphenoxyessigsäure 1

0.756 g (32.9 mmol) Natrium wurden in einem 100 ml Zweihalskolben mit Rückflußkühler und Tropftrichter vorgelegt. Unter Kühlung im Eisbad wurden 15 ml abs. Methanol vorsichtig zutropft. Die Methanolat-Lösung wurde mit 3.081 g (14.7 mmol) Dimethyl-5-hydroxyisophthalat und einer Lösung von 2.285 g (16.4 mmol) Bromessigsäure in 4 ml abs. Methanol versetzt und 20 Std. unter Rückfluß gekocht. Nach Abkühlen des Reaktionsgemisches wurde auf 20 ml kaltes Wasser gegossen und mit verd. Salzsäure angesäuert. Der ausgefallene weiße Niederschlag wurde abfiltriert, mit Wasser säurefrei gewaschen und im Ölpumpenvakuum getrocknet. 3.020 g Rohprodukt wurden säulen-chromatographisch an 170 g Kieselgel 60 gereinigt (Laufmittel: Dichlormethan/Methanol 93:7 bis 85:15).

$M = 268.22 \text{ g/mol}$; $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{O}_7$

R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 85:15): 0.24

$Smp.$: 164°C (Lit.: $164\text{-}165^\circ\text{C}$)

$Ausbeute$: 2.606 g (9.7 mmol), 66 % d. Th.

$^1\text{H-NMR-Spektrum}$ (400 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 2.51$ (m, DMSO), 3.89 (s, 6H, CH_3), 4.84 (s, 2H, CH_2), 7.66 (s, 2H, H-2,H-6), 8.09 (s, 1H, H-4) ppm

$^{13}\text{C-NMR-Spektrum}$ (400 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 53.42$ (CH_3), 66.48 (CH_2), 120.29 (C-2, C-6), 122.79 (C-4), 132.26 (C-3, C-5), 159.31 (C-1), 166.04 (CO_2), 170.89 (COOH) ppm

$Massenspektrum$ (EI 70 eV): m/z (rel. Intensität %) = 268 (M^+ , 76), 237 ($\text{M}^+ - \text{OCH}_3$, 100), 223 ($\text{M}^+ - \text{CO}_2$, 30), 209 ($\text{M}^+ - \text{CH}_2\text{COO}$, 30), 194 ($\text{M}^+ - \text{OCH}_2\text{CO}_2$, 17), 179 ($\text{M}^+ - \text{CO}_2 - \text{CH}_2\text{COO}$, 24), 151 ($\text{M}^+ - 2 \times \text{CO}_2\text{CH}_3 + \text{H}$, 19), 135 ($\text{M}^+ - \text{OCH}_2\text{CO}_2 - \text{CO}_2\text{CH}_3$, 16), 75 (C_6H_3 , 6), 59 ($-\text{CO}_2\text{CH}_3$, 19)

11.2.2 3,5-Dicarbomethoxyphenoxyessigsäure-p-nitrophenylester 2

1.011 g (3.8 mmol) 3,5-Dicarbomethoxyphenoxyessigsäure wurden in 20 ml abs. Ethylacetat suspendiert und 1 ml abs. Pyridin und 0.447 g (3.4 mmol) p-Nitrophenol zuge-

geben. 5 ml einer 1M Lösung von DCC in abs. Ethylacetat wurden langsam zugetropft. Nach 16 Std. Rühren bei Raumtemperatur wurde das ausgefallene Harnstoffderivat über zwei Faltenfilter abfiltriert. Das Filtrat wurde in 180 ml n-Hexan getropft, der ausgefallene weiße Niederschlag über eine G3 Glasfritte abgesaugt, mit wenig Hexan gewaschen und im Ölpumpenvakuum getrocknet.

$M = 389.32 \text{ g/mol}; \text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{O}_9\text{N}$

R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 85 : 15): 0.88

Ausbeute: 1.204 g (3.1 mmol), 81 % d. Th.

Smp.: 124 °C

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 3.97$ (s, 6H, CH_3), 5.00 (s, 2H, CH_2), 7.23 (CDCl_3), 7.32 (d, 2H, Aryl-H), 7.82 (s, 2H, H-2, H-6), 8.26 (d, 2H, Aryl-H), 8.33 (s, 1H, H-4) ppm

$^{13}\text{C-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 52.60$ (CH_3), 65.39 (CH_2), 67.12 (Dioxan), 76.71-77.35 (CDCl_3), 120.02 (C-2, C-6), 122.21 (C-4), 124.45 (C-2', C-6'), 125.42 (C-3', C-5'), 132.25 (C-3, C-5), 146.00 (C-4'), 154.50 (C-1'), 158 (C-1), 165.75 (CO_2CH_3), 165.93 (CO_2) ppm

Massenspektrum: m/z (rel. Intensität %) = 389 (M^+ , 2), 358 ($\text{M}^+ - \text{OCH}_3$, 3), 223 ($\text{M}^+ - \text{CO}_2$, $-\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$, 24), 193 ($\text{M}^+ - \text{CO}_2$, $-\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$, $-\text{OCH}_3$, 4), 88 (Dioxan, 100), 58 ($\text{NO} + \text{CO}$, 91)

11.2.3 Tris-2,2,2-[(cyanoethoxy)methyl]ethanol 3

Zu einer eisgekühlten Lösung von 47.60 g (0.35 mol) Pentaerythrit und 1.75 g (4 mmol) Natriumhydroxid in 50 ml Wasser wurden 70 ml (56.70 g, 1.07 mol) Acrylnitril gegeben. Nach 48 Stunden Rühren bei Raumtemperatur wurde das Reaktionsgemisch durch Zugabe von 5%iger HCl neutralisiert und dreimal mit je 150 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, eingengt und im Hochvakuum getrocknet. 91.85 g Rohprodukt wurden säulenchromatographisch an Kieselgel 60 gereinigt (Laufmittel: Dichlormethan/Methanol 98 : 2).

$M = 295.33 \text{ g/mol}; \text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{O}_4\text{N}_3$

Ausbeute: 28.53 g (96.6 mmol); 28 % d. Th. (Lit. 64 %)

R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1): 0.62 (I_2 -Kammer)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 2.62$ (t, 6H, OCH_2), 3.49 (s, 2H, CH_2OH), 3.54 (s, 6H, $(\text{OCH}_2)_3\text{C}$), 3.68 (t, 6H, CH_2CN) ppm

$^{13}\text{C-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 18.76$ (CH_2CN), 45.40 ($\text{C}(\text{CH}_2)_4$), 63.71 (CH_2OH), 65.78 (CH_2O), 70.11 ($(\text{OCH}_2)_3\text{C}$), 117.99 (CN) ppm

Massenspektrum: m/z (rel. Intensität %) = 296 (M^+ , 0.06), 54 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN}^+$, 100), 82 ($\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}^+$, 10)

11.2.4 Tris-2,2,2-[[methoxycarbonyl]ethoxy]methyl}ethanol **4**

Eine Lösung von 4.78 g (16.2 mmol) Tris-2,2,2-[(cyanoethoxy)methyl]ethanol **3** in 30 ml mit HCl gesättigtem Methanol abs. wurde 2.5 Stunden unter Rückfluß gekocht. Nach Zugabe von 2 ml Wasser und 1 ml konz. HCl wurde 15 min bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde in 100 ml Wasser aufgenommen und dreimal mit je 50 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden viermal mit je 50 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und unter Vakuum evaporiert. Das Rohprodukt wurde an 150 g Kieselgel säulenchromatographisch gereinigt (Laufmittel: Dichlormethan/Methanol 50 : 1 bis 10 : 1). $M = 394.42$ g/mol; $\text{C}_{17}\text{H}_{30}\text{O}_{10}$

Ausbeute: 4.61 g (11.7 mmol) sirupöse farblose Substanz, 72 % d. Th. (Lit. 75 %)

R_f-Wert (Dichlormethan/Methanol 30 : 1) = 0.43 (I_2 -Kammer)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): 2.40 (t, 6H, OCH_2), 3.26 (s, 6H, $(\text{OCH}_2)_3\text{C}$), 3.44 (s, 2H, CH_2OH), 3.51 (t, 6H, CH_2CO), 3.53 (s, 9H, OCH_3) ppm

$^{13}\text{C-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): 35.15 (CH_2CO_2), 45.34 ($\text{C}(\text{CH}_2)_4$), 52.06 (OCH_3), 65.49 (CH_2OH), 67.24 (OCH_2), 72.37 ($\text{C}(\text{CH}_2\text{O})_3$), 172.5 ($\text{C}=\text{O}$) ppm

Massenspektrum m/z (rel. Intensität %): 59 (CO_2CH_3 , 30), 73 ($\text{CH}_2\text{CO}_2\text{CH}_3$, 32), 87 ($\text{C}_4\text{H}_7\text{O}_2^+$, 100), 219 ($\text{M}^+ - 2 \times \text{C}_4\text{H}_6\text{O}_2$, 6), 363 ($\text{M}^+ - \text{OCH}_3$, 2)

11.2.5 *Tert*-butyldimethylsilyl-tris-2,2,2-[[methoxycarbonyl]ethoxy]-methyl-ethanol 5

3.110 g (7.9 mmol) Tris-2,2,2-[[methoxycarbonyl]ethoxy]methyl]ethanol 3 wurden zweimal mit 10 ml Pyridin abs. koevaporiert und anschließend in 35 ml Pyridin abs. gelöst. Nach der Zugabe von 1.440 g (9.3 mmol) *Tert*-butyldimethylsilylchlorid wurde 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde bis zur Trockne eingengt, der Rückstand in 50 ml Ethylacetat aufgenommen, dreimal mit 50 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert und im Ölpumpenvakuum getrocknet.

$M = 508.68 \text{ g/mol}$; $(\text{C}_{23}\text{H}_{44}\text{O}_{10}\text{Si})$

Ausbeute: 3,550 g (6.9 mmol), 88 % d. Th. (Lit. 98 %)

R_f-Wert (Dichlormethan/Methanol 30:1) : 0.69

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 0.00$ (s, 6H, SiCH₃), 0.87 (s, 9H, tBu), 2.54 (t, 6H, OCH₂), 3.33 (s, 6H, (OCH₂)₃C), 3.47 (s, 2H, CH₂OTBDMS), 3.64 (t, 6H, CH₂CO₂), 3.68 (s, 9H, OCH₃) ppm

¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃): $\delta = -5.45$ (SiCH₃), 18.47 (SiC(CH₃)₃), 26.08 (tBu), 35.18 (CH₂CO₂), 46.20 (C(CH₂)₄), 51.78 (OCH₃), 61.61 (CH₂OTBDMS), 67.01 (OCH₂), 69.54 ((OCH₂)₃C), 172.36 (C=O) ppm

Massenspektrum: m/z (rel. Intensität %) = 55 (48), 57 (40), 89 (94), 119 (58), 161 (100), 75 (C₂H₇OSi⁺, 34), 508 (M⁺, 2)

11.2.6 *Tert*-butyldimethylsilyl-[tris-2,2,2-(5-oxy-2-oxa-pentyl)ethanol] 6

8.59 g (16.9 mmol) *Tert*-butyldimethylsilyl-tris-2,2,2-[[methoxycarbonyl]ethoxy]-methyl]ethanol 5 wurden zwei Tage über *Sicapent* im Exsikkator unter Vakuum getrocknet, in 10 ml THF abs. aufgenommen und innerhalb einer Stunde langsam zu einer eisgekühlten Suspension von Lithiumaluminiumhydrid in 100 ml THF abs. getropft. Nach einer Stunde Rühren unter Eiskühlung wurde zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Über eine halbe Stunde erfolgte die vorsichtige Zugabe von 30 ml 15 %iger Natrium-

hydroxid-Lösung. Der Überstand des Reaktionsgemisches wurde abdekantiert, und der Rückstand mehrfach mit THF gewaschen. Die vereinigten THF-Fractionen wurden mit 50 ml Wasser versetzt und mit 1 M HCl-Lösung neutralisiert. Nach dem Einengen und Trocknen wurden 10 g Rohprodukt erhalten, welches säulenchromatographisch an 300 g Kieselgel 60 gereinigt wurde (Laufmittel: Dichlormethan/Methanol 98:2 bis 90:10).

M = 424.65 g/mol; (C₂₀H₄₄O₇Si)

Ausbeute: 4.77 g (11,2 mmol) farbloses Öl, 66 % d. Th. (Lit. 67 %)

R_f-Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1) : 0.5 (I₂-Kammer)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 0.00 (s, 6H, SiCH₃), 0.85 (s, 9H, tBu), 1.76 (quin., 6H, CH₂CH₂CH₂), 3.33 (s, 6H, (OCH₂)₃C), 3.47 (s, 2H, CH₂OTBDMS), 3.55 (t, 6H, OCH₂), 3.71 (t, 6H, CH₂OH) ppm

¹³C-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = -5.71 (SiCH₃), 18.22 (SiC(CH₃)₃), 25.82 (tBu), 31.70 (CH₂CH₂CH₂), 45.45 (C(CH₂)₄), 61.64 (CH₂OH), 61.76 (CH₂OTBDMS), 70.48 (OCH₂), 70.56 ((OCH₂)₃C) ppm

Massenspektrum: m/z (rel. Intensität %) = 56 (43), 60 (58), 73 (48), 75 (C₂H₇OSi⁺, 98), 83 (100), 87 (83), 105 (50), 133 (43), 367 (36), 424 (M⁺, 0.08)

11.2.7 *Tert*-butyldimethylsilyl-{tris-2,2,2-[3-(4,4'-dimethoxytrityloxy)propyloxy methyl]ethanol} **7**

1.806 g (4.3 mmol) *Tert*-butyldimethylsilyl-[tris-2,2,2-(5-oxy-2-oxa-pentyl)ethanol] **6** wurden mit abs. Pyridin koevaporiert und in 50 ml Pyridin aufgenommen. Die Lösung wurde über zwei Stunden portionweise mit insgesamt 5.426 g (16.0 mmol) 4,4'-Dimethoxytritylchlorid versetzt. Anschließend wurden 0,500 g (4.1 mmol) Dimethylaminopyridin und 0.9 ml (668 mg, 5.2 mmol) Diisopropylethylamin zugegeben. Nach 16 Stunden Rühren bei Raumtemperatur wurde der Reaktionsansatz eingengt und der Rückstand in 100 ml Ethylacetat aufgenommen. Es wurde dreimal mit je 120 ml gesättigter NaHCO₃-Lösung, einmal mit 100 ml NaCl-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und eingengt. 5.805 g Rohprodukt wurden säulenchromatographisch an 300 g Kieselgel 60 gereinigt (Laufmittel: Petrolether (60/70)/Dichlormethan 2:3, 1:4, 1:5, 1:9, Dichlormethan, Dichlormethan/Methanol 10:1 jeweils unter Zusatz von 0,5 % Pyridin).

M= 1331.77 g/mol; (C₈₃H₉₈O₁₃Si)

Ausbeute: 4.705 g (3.9 mmol), 91 % d.Th. (Lit. 58 %)

R_f-Wert (Hexan/Ethylacetat 3:1 + 0,5% Et₃N) : 0.28

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0,00 (s, 6H, SiCH₃), 0.90 (s, 9H, tBu), 1.85 (quin. 6H, CH₂CH₂CH₂), 3.13 (t, 6H, CH₂O), 3.27 (s, 6H, (OCH₂)₃C), 3.44 (t, 6H, DMTrOCH₂), 3.47 (s, 2H, CH₂OTBDMS), 3.81 (s, 18H, OCH₃), 6.84-7.48 (m, 39H, arom.) ppm

¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = -5.25 (SiCH₃), 18.61 (SiC(CH₃)₃), 26,27 (tBuCH₃), 30.73 (CH₂CH₂CH₂), 46,28 (C(CH₂)₄), 55.53 (OCH₃), 61.15 (CH₂ODMTr), 62.13 (CH₂OTBDMS), 68.59 (OCH₂), 69.72 (OCH₂)₃C, 85.73-158.69 (arom., DMTr) ppm

MALDI-TOF Massenspektrum: 1357.4 (MI+Na⁺), 1052.9 (M⁺+ Na⁺-DMTr, berechnet: 1028.6)

11.2.8 Tris-2,2,2-[3-(4,4'-dimethoxytrityloxy)propyloxymethyl]ethanol 8

4.124 g (3.1 mmol) *Tert*-butyldimethylsilyl-{tris-2,2,2-[3-(4,4'-dimethoxytrityloxy)propyloxy-methyl]ethanol} 7 wurden in 50 ml 1 M TBAF-Lösung in THF gelöst und 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von 100 ml Ethylacetat wurde viermal mit 100 ml ges. NaHCO₃-Lösung gewaschen, ausgesalzt, über Natriumsulfat getrocknet und eingeengt. 4.936 g Rohprodukt wurden säulenchromatographisch an 250 g Kieselgel 60 gereinigt (Laufmittel: Petrolether/Ethylacetat 2:1 Zugabe von 0.1 % Pyridin).

M = 1217.50 g/mol; (C₇₇H₈₄O₁₃)

Ausbeute: 2.636 (2.2 mmol), 71 % d.Th. (Lit. 88 %)

R_f-Wert (Hexan/Ethylacetat 3:1 + 0.5 % Et₃N): 0.08

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 1.72 (quin. 6H, CH₂CH₂CH₂), 3.00 (t, 6H, CH₂ODMTr), 3.20 (s, 6H, (OCH₂)₃C), 3.35 (t, 6H, OCH₂), 3.45 (s, 2H, CH₂OH), 3.67 (s, 18H, OCH₃), 6.71-7.34 (m, 39H, arom.) ppm

$^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 30.18$ ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 44.56 ($\text{C}(\text{CH}_2)_4$), 55.11 (OCH_3), 60.32 (CH_2ODMTr), 66.59 (CH_2OH), 68.71 (OCH_2), 71.37 ($\text{OCH}_2)_3\text{C}$), 112.94 - 158.28 (arom., DMTr) ppm

MALDI-TOF Massenspektrum: 1230.78 ($\text{MI}+\text{Na}^+$, berechnet: 1240.49)

11.2.9 Tris-2,2,2-[3-(4,4'-dimethoxytrityloxy)propyloxymethyl]ethyl-N,N-diisopropylaminocyan-ethoxyphosphoramidit **9**

In einem Stickstoffkolben mit Seitenhahn wurden 2.394 g (2.0 mmol) Tris-2,2,2-[3-(4,4'-dimethoxytrityloxy)propyloxymethyl]ethanol **8** nach Koevaporation mit 10 ml abs. Dichlormethan in 15 ml abs. Dichlormethan unter Argon-Atmosphäre gelöst. Über ein Gummiseptum wurden mit kalibrierten Glasspritzen 0.50 ml (2.5 mmol) Diisopropylethylamin und 0.48 ml (2.5 mmol) Chloro[diisopropylamino]- β -cyanoethoxyphosphin zugegeben. Nach 45 Minuten Rühren bei Raumtemperatur wurde das Reaktionsgemisch zu 50 ml 5% iger Natriumhydrogencarbonat-Lösung gegeben und viermal mit je 50 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und evaporiert. 2.786 g Rohprodukt wurden säulenchromatographisch an Kieselgel 60 gereinigt (Laufmittel: Petrolether 60/70/ Ethylacetat $2 : 1$, Zusatz von 0.1% Pyridin).

$M = 1414.9$ g/mol; ($\text{C}_{86}\text{H}_{101}\text{N}_2\text{O}_{14}\text{P}$)

Ausbeute: 2.543 g (1.8 mmol) 91% d.Th. (Lit. 75%)

R_f-Wert (Hexan/Ethylacetat $3:1 + 0.5\%$ Et_3N): 0.20

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.13$ (dd, 12H , $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.26 (t, 2H , CH_2CN), 1.78 (quin., 6H , $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.07 (t, 6H , CH_2ODMTr), 3.24 (s, 6H , $(\text{OCH}_2)_3\text{C}$), 3.39 (t, 6H , OCH_2), 3.52 (sep. 2H , $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 3.71 (s, 2H , CCH_2OP), 3.75 (s, 18H , OCH_3), 4.13 (t, 2H , $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN}$), 6.82 - 7.38 (m, 39H , arom.) ppm

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 20.70$ (CH_2CN), 25.05 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 30.72 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 43.50 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 49.58 ($\text{C}(\text{CH}_2)_4$), 55.58 (OCH_3), 58.34 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN}$), 58.76 (CCH_2OP), 61.08 (CH_2ODMTr), 69.05 (OCH_2), 69.75 ($\text{OCH}_2)_3\text{C}$), 85.75 (c_q , DMTr), 117.50 (CH_2CN), 112.97 - 158.29 (arom., DMTr) ppm

MALDI-TOF Massenspektrum: 1424.63 (MI^+)

11.2.10 Pyridinium-4-O-(4,4'-dimethoxytrityl)butyrat 10

0.285 g (2.3 mmol) 4-Hydroxybuttersäurenatriumsalz wurden zweimal mit je 25 ml abs. Pyridin koevaporiert und anschließend in 15 ml abs. Pyridin aufgenommen. Es folgte die Zugabe von 0.914 (2.7 mmol) 4,4'-Dimethoxytritylchlorid und 0.144 g (1.2 mmol) 4-Dimethylaminopyridin. Nach 16 Stunden Rühren bei Raumtemperatur wurde das Reaktionsgemisch eingeengt, in 40 ml Dichlormethan aufgenommen, zweimal mit je 40 ml Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, evaporiert und im Hochvakuum getrocknet. 0.825 g Rohprodukt wurden säulenchromatographisch an 100 g Kieselgel 60 (Laufmittel: Dichlormethan/Methanol 95:5; 0.1 % Pyridin) gereinigt.

$M = 406.48 \text{ g/mol}$; $\text{C}_{25}\text{H}_{26}\text{O}_5$

Ausbeute: 0.485 g (0.99 mmol); 43 % d. Th.

R_f-Wert (Dichlormethan/Methanol 85:15) : 0.74

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): $\delta = 1.74$ (quin. 2H, CH₂CH₂CH₂), 2.30 (t, 2H, CH₂CO₂), 2.98 (t, 2H, CH₂ODMTr), 3.74 (s, 6H, OCH₃), 6.97-7.37 (m, 13H, arom.), 7.19 (Pyridin), 7.45 (Pyridin), 8.62 (Pyridin) ppm

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆): $\delta = 24.91$ (CH₂CH₂CH₂), 30.56 (CH₂CO₂), 54.91 (OCH₃), 61.94 (CH₂ODMTr), 85.14 (C_q, DMTr), 113.03-157.89 (arom.), 174.10 (CO₂) ppm

Massenspektrum: m/z (rel. Intensität %) = 486 ((M+Pyridin)⁺, 0,2), 406 (M⁺, 8), 303 (DMTr⁺, 100)

11.2.11 Darstellung von p-Nitrophenyl-4-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-butyrat 11

1.527 g (3.14 mmol) Pyridinium-4-O-(4,4'-dimethoxytrityl)butyrat 10 wurden zweimal mit 5 ml abs. Pyridin koevaporiert und unter Argon-Atmosphäre in 50 ml abs. Dioxan gelöst. Nach Zugabe von 3.5 ml abs. Pyridin und 0.581 g (4.18 mmol) p-Nitrophenol wurden unter Rühren langsam 5 ml 1 M DCC-Lösung in Dioxan zugetropft. Nach 16 Stunden Rühren bei Raumtemperatur wurde das ausgefallene Harnstoffderivat abfiltriert, das Filtrat eingeengt, mehrfach mit Dioxan lyophilisiert und im Ölpumpenvakuum getrocknet.

$M = 527.57 \text{ g/mol}$; $\text{C}_{31}\text{H}_{29}\text{NO}_7$

Ausbeute: 3.17 g Rohprodukt

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 2.15 (quin. 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2.38 (t, 2H, CH_2CO_2), 3.07 (t, 2H, CH_2ODMTr), 3.72 (s, 6H, OCH_3), 6.82-8.28 (m, arom.) ppm

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6): δ = 24.84 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 33.81 (CH_2CO_2), 55.36 (OCH_3), 66.71 (CH_2ODMTr), 85.14 (C_q , DMTr), 113.11-155.55 (arom.), 164.43 (CO_2) ppm

Massenspektrum: m/z (rel. Intensität %) = 527 (M^+ , 0.5), 406 (M^+ , 0.2), 303 (DMTr^+ , 100)

11.2.12 Darstellung von t-Butyl-p-nitrophenylcarbonat 12

Zu einer Lösung von 2.147 g (29.0 mmol) t-Butanol in 10 ml abs. Pyridin wurden bei 0 °C 5.236 g (26.0 mmol) p-Nitrophenylchlorformiat portionsweise zugegeben. Nach zwei Stunden Rühren bei Raumtemperatur wurde ausgefallenes Pyridiniumhydrochlorid abfiltriert. Das Filtrat wurde mit 5 ml Wasser versetzt und dreimal mit je 15 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten Etherphasen wurden jeweils zweimal mit je 10 ml 1 N HCl, ges. NaHCO_3 -Lösung und ges. NaCl -Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und eingeeengt. Das Produkt wurde mehrfach mit Dioxan lyophilisiert und im Ölpumpenvakuum getrocknet.

$M = 239.23$ g/mol; $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{NO}_5$

Ausbeute: 2.209 g (9.2 mmol); 32 % d.Th.

R_f -Wert (Dichlormethan/Methanol 9:1): 0.55

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 1.58 (s, 9H, CH_3), 7.37 (d, 2H, CH arom.), 8.44 (d, 2H, CH arom.) ppm

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ = 27.64 (CH_3), 77.03 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 150.55 ($\text{C}=\text{O}$), 121.93, 125.22 (CH, arom.), 145.16, 155.72 (C_q , arom.) ppm

11.2.13 Umsetzung von Poly-D,L-lysin mit t-Butyl-p-nitrophenylcarbonat

50 mg Poly-D,L-Lysin (16.5-33.5 nmol α -NH₂, COOH, 1353-5561 nmol ϵ -NH₂) wurden in 1 ml ges. NaHCO₃-Lösung gelöst und mit einer Lösung von 25 mg (0.1 mmol) t-Butyl-p-nitrophenylcarbonat in 1 ml Dioxan versetzt. Nach drei Stunden Kochen unter Rückfluß wurde unter Eisbadkühlung mit 40 μ l einer 0.1 N HCl- Lösung angesäuert und 80 μ l einer 0.01 M DCC-Lösung zugegeben. Nach 16 Stunden Rühren bei Raumtemperatur wurde das ausgefallene Harnstoffderivat abfiltriert und das Filtrat lyophilisiert. Der Rückstand wurde in 5 ml Ethylacetat aufgenommen und mit 4 ml Wasser und 4 ml ges. NaHCO₃-Lösung gewaschen und die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet.

Nach Trocknung im Ölpumpenvakuum wurde der Rückstand in 5 ml Dioxan/Pyridin 10:1 aufgenommen und direkt zur Kopplung an die feste Phase eingesetzt.

11.3 Silizium-Wafer

11.3.1 Funktionalisierung der Silizium-Oberfläche

Die Silizium-Wafer wurden mit Ethanol gewaschen und in der Bunsenbrennerflamme bzw. in einem Muffelofen ausgeglüht. Die heißen Wafer wurden jeweils in 750 µl einer in 1.5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen vorgelegten 25 %igen 3-(Triethoxysilyl)-propylamin/Toluol-Lösung überführt und bei 65 °C über Nacht geschüttelt.

Die Überstände wurden abgenommen und die Wafer jeweils dreimal mit je 750 µl Toluol, DMSO, Ethanol, 0.05 M NaHCO₃-Lösung, Wasser und Ethanol gewaschen.

11.3.2 Quantifizierung der Beladungsdichte

Pikrinsäure-Assay

Die Silizium-Wafer wurden in 1.5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen dreimal mit je 750 µl Dichlormethan gewaschen und in frische Reaktionsgefäße überführt. Die Wafer wurden jeweils mit 500 µl einer 0.1 M Pikrinsäure-Lösung in Dichlormethan versetzt und bei Raumtemperatur ½ Stunde geschüttelt. Der Überstand wurde abgenommen, die Wafer dreimal mit je 200 µl Dichlormethan gewaschen und in frische 1.5 ml Reaktionsgefäße überführt. Die trockenen Wafer wurden jeweils mit einem Volumen V 4 %iger Triethylamin/CH₂Cl₂-Lösung versetzt, kurz geschüttelt, und die Überstände in 100 µl-Quarzküvetten (mit Stopfen) photometrisch bei 373 nm gegen 4 % Triethylamin/Dichlormethan-Lösung (v/v) vermessen.

Die Konzentration an freigesetztem Pikrat läßt sich nach folgender Geradengleichung aus den Extinktionen berechnen:

$$c[\text{nmol/ml}] = (E_{373} - 0.0036)/0.01678$$

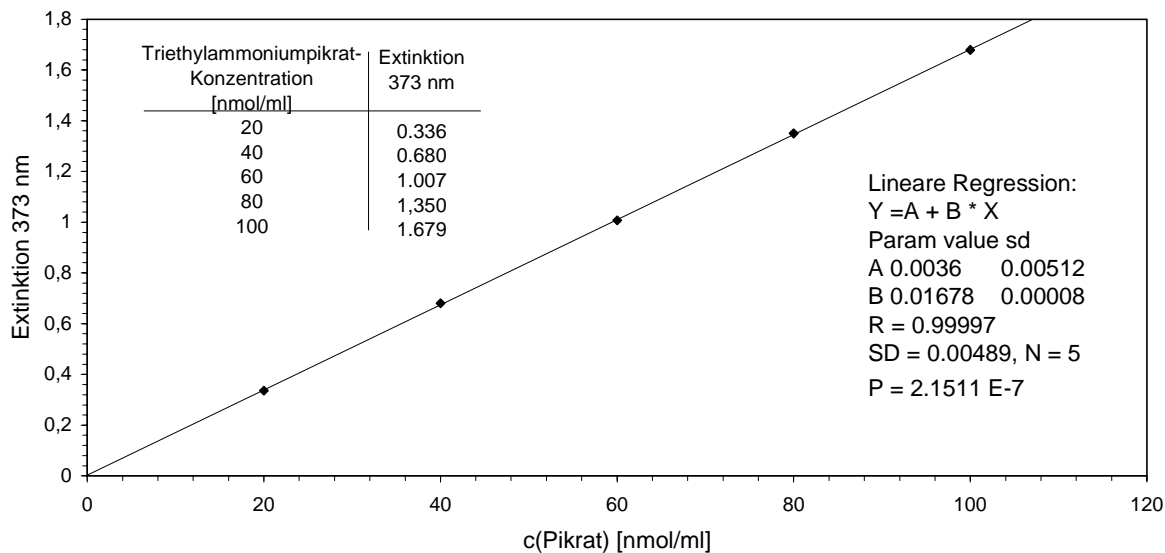


Abb. 11-1: Pikrat-Eichreihe

Dimethoxytrityl-Assay

Die Silizium-Wafer wurden jeweils dreimal mit je 500 μ l Pyridin gewaschen und mit je 500 μ l einer N,N'-Dimethoxytritylchlorid-Lösung (352 mg/5 ml Pyridin) versetzt. Nach 16 Stunden Schütteln bei Raumtemperatur wurden die Überstände abgenommen, und die Wafer jeweils dreimal mit je 500 μ l Pyridin, Toluol, Methanol und Dichlormethan gewaschen und an der Luft getrocknet. Zur Detritylierung wurden die Wafer mit 3 %iger Dichloressigsäure in Dichlormethan versetzt. Die Detritylierungslösungen wurden gegen 3 %ige Dichloressigsäure in Dichlormethan als Referenz bei 504 nm photometrisch vermessen. Mit der folgenden Geradengleichung, die mit Hilfe einer Eichreihe erhalten wurde, lassen sich aus den Extinktionen die Konzentrationen des Dimethoxytritylkations quantifizieren:

$$c[\text{nmol/ml}] = (E_{504} - 0.01899)/0.08905$$

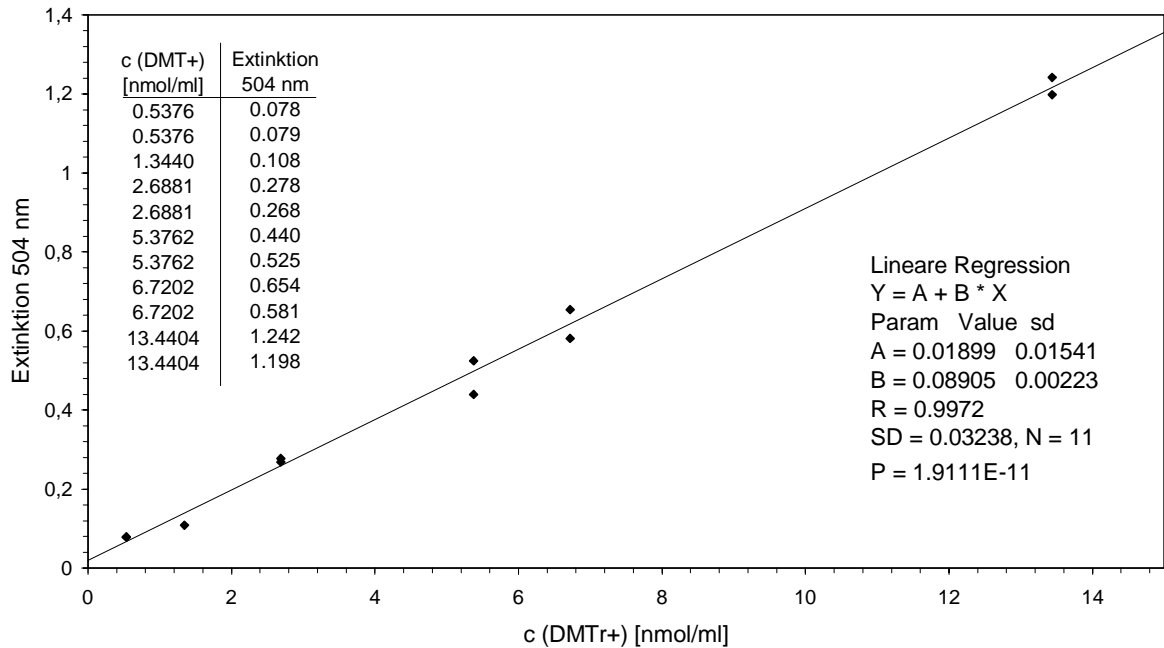


Abb. 11-2: Dimethoxytrityl-Eichreihe in 3 % Dichloressigsäure

SDTB-Assay

Die Bestimmung oberflächengebundener Aminogruppen mit Hilfe des SDTB-Assays erfolgte unter Verwendung des Sulfo-SDTB-Assays der Firma Pierce nach den Angaben des Herstellers.

Die Silizium-Wafer wurden mit Assay-Puffer gewaschen, in 0.5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und mit je 250 μ l Reagenz-Lösung 0.5 Stunden bei Raumtemperatur behandelt. Die Lösung wurde abgenommen, die Wafer dreimal mit Assay-Puffer gewaschen und in 1.5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Es wurde mit Developing-Solution versetzt und die Extinktion der Überstände in 100 μ l Quarzküvetten gegen Developing-Solution bei 498 nm gemessen.

Die Konzentration an freigesetztem Dimethoxytritylkation läßt sich nach folgender Geradengleichung aus den Extinktionen berechnen:

$$c[\text{nmol/ml}] = (E_{498} - 0.13254)/0.06005$$

Assay-Puffer: 50 mM NaHCO₃ (pH 8.5)

Reagenz-Lösung: 0.1 mM s-SDTB in Assay-Puffer
 (3.03g s-SDTB in 1 ml DMF gelöst ad 50 ml mit Assay-Puffer verdünnt)

Developing solution : 36 % Perchlorsäure

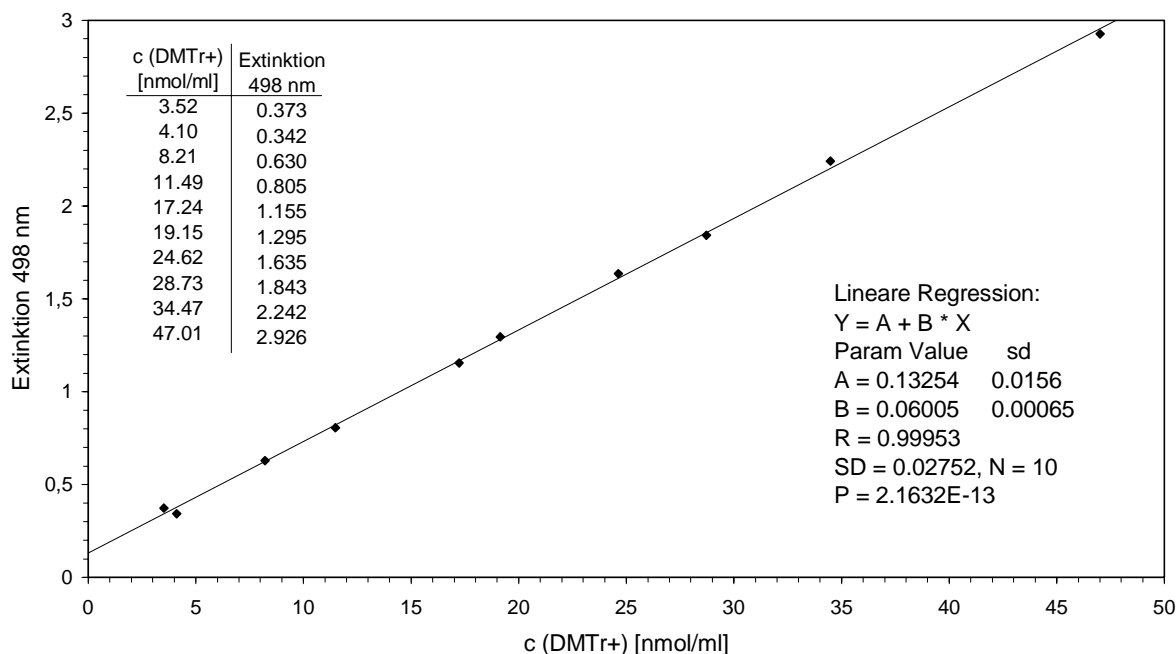


Abb. 11-3: Dimethoxytrityl-Eichreihe in 36 %iger Perchlorsäure

TNBS-Assay

Die Silizium-Wafer wurden dreimal mit 200 μ l 4 % Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen und anschließend mit jeweils 200 μ l einer 0.1 %igen 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure-Lösung in N,N-Dimethylformamid für zwei Stunden bei 40 °C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde mit jeweils 200 μ l 1 N HCl-Lösung versetzt. Die Überstände wurden abgenommen und die Wafer dreimal mit je 250 μ l Wasser gewaschen und in neue Reaktionsgefäße überführt. Zur Abspaltung des Pikrats wurde jeweils mit 200 μ l 1 N Natronlauge versetzt, gut geschüttelt und die Lösung in eine Quarzküvette überführt. Es wurden die Extinktionen bei 353 nm gegen 1N Natronlauge als Referenz gemessen.

Berechnung der Konzentration an freigesetztem Pikrat:

$$c[\text{nmol/ml}] = (E_{353} - 0.04151)/0.01354$$

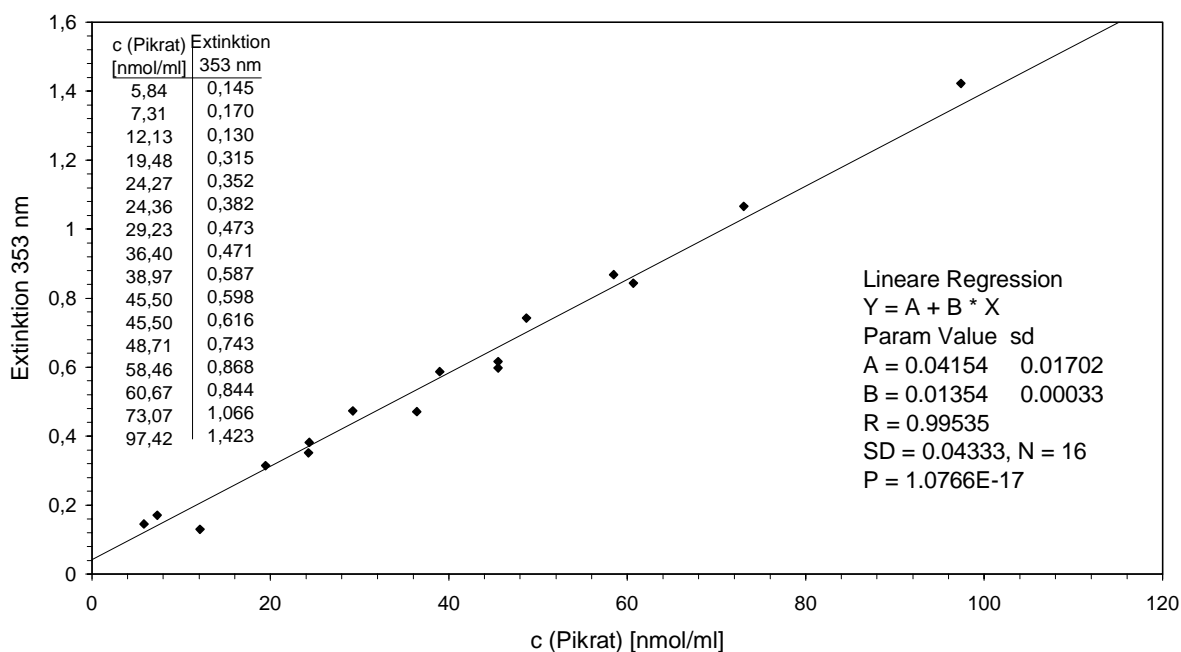


Abb. 11-4: Pikrat-Eichreihe in 1 N Natronlauge

11.3.3 Aktivierung aminofunktionalisierter Silizium-Wafer mit DITC

Die aminofunktionalisierten Silizium-Wafer aus **11.3.1** wurden dreimal mit DMF gewaschen, in frische Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und mit je 750 μ l einer 0.1 M DITC-Lösung in DMF/ Pyridin 9:1 2 Std. bei 40 °C unter Schütteln behandelt. Die Lösung wurde abgenommen, und die Wafer jeweils dreimal mit je 750 μ l DMF und Ethanol gewaschen.

11.3.4 Kopplung von tBoc geschütztem p-Nitrophenyl aktiviertem Polylysin **13** an aminofunktionalisierte Silizium-Wafer

Aminofunktionalisierte Silizium-Wafer (vgl. **11.3.1**) wurden mit 500 μ l DMF/Et₃N 8:1 gewaschen. Anschließend wurde mit je 500 μ l DMF/Et₃N 8:1 versetzt und 250 μ l der Polylysin-Lösung aus 11.2.13 zugegeben. Nach 16 Stunden Schütteln bei Raumtemperatur wurden die Überstände abgenommen, und die Wafer zweimal mit je 500 μ l DMF, Ethanol, Dioxan und Dichlormethan gewaschen und getrocknet. Zur Entschützung wurden die Wafer für eine Stunde mit Trifluoressigsäure behandelt. Abschließend wurde je dreimal mit 500 μ l ges. NaHCO₃-Lösung und Wasser gewaschen.

11.3.5 Umsetzung DITC-aktivierter Silizium-Wafer mit Polylysin

Mit DITC aktivierte aminofunktionalisierte Silizium-Wafer A_{akt} aus **11.3.3** wurden mit jeweils 250 µl einer Poly-L-lysin-Lösung (0.1 % w/v in Wasser, Sigma Diagnostics, USA) und 250 µl N-Methylmorpholin 16 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Überstände wurden abgenommen, und die Wafer dreimal mit je 500 µl Wasser gewaschen.

11.3.6 Kopplung von 3,5-Dicarbomethoxyphenoxyessigsäure-p-nitrophenylester 2 an die Silizium-Oberfläche

Aminofunktionalisierte Silizium-Wafer A aus **11.3.1** wurden mit Dioxan gewaschen und anschließend mit 250 µl DMF/Et₃N 8 : 1 versetzt. Nach der Zugabe von jeweils 250 µl einer 0.1 M 3,5-Dicarbomethoxyphenoxyessigsäure-p-nitrophenylester 2-Lösung in Dioxan/Pyridin 10:1 wurden die Wafer 16 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Überstände wurden abgenommen und die Wafer jeweils dreimal mit je 500 µl DMF, Ethanol und Dioxan gewaschen.

11.3.7 Aminolyse der an die Silizium-Oberfläche gekoppelten 3,5-Dicarbomethoxyphenoxyessigsäure

Die Wafer aus **11.3.6** wurden mit Dichlormethan gewaschen und getrocknet. Es wurde mit jeweils 125 µl frisch destilliertem Ethylendiamin versetzt und 16 Stunden bei 4 °C geschüttelt. Die Überstände wurden abgenommen und die Wafer jeweils dreimal mit je 500 µl Toluol, DMF, Ethanol und Dioxan gewaschen.

11.3.8 Kopplung von Tris-2,2,2-[3-(4,4'-dimethoxytrityloxy)propyloxymethyl]ethyl-N,N-diiso-propylaminocyan-ethoxyphosphamidit 9 an die Silizium-Oberfläche

Hydroxylfunktionen präsentierende Silizium-Oberflächen wurden mit abs. Pyridin und abs. Acetonitril gewaschen und in neue Reaktionsgefäße überführt, die mit Septen verschlossen wurden. Unter Argon wurde nochmals mit abs. Acetonitril gewaschen und mit jeweils 100 µl einer Lösung des dendritischen Amidit-Synthons aus **11.2.9** (2.5 µmol/ml) in Acetonitril und 10 µl einer Tetrazol-Lösung (0.22 µmol/µl) in Acetonitril versetzt. Nach einer Stunde Schütteln wurden die Überstände abgenommen, und die Wafer dreimal mit

Acetonitril gewaschen. Anschließend wurde zur Oxidation mit Iod-Lösung (0.4 M, THF/Pyridin/Wasser 9:1:0.2) behandelt und mit Dioxan, Ethanol, 5 % NaHSO₃-Lösung (w/v), Wasser, Ethanol und Dioxan gewaschen.

11.3.9 Kopplung von p-Nitrophenyl 4-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-butyrat 11 an die Silizium-Oberfläche

Aminofunktionalisierte Silizium-Wafer A aus **11.3.1** bzw. mit dem trifunktionellen Linker versehene Oberflächen C aus **11.3.7** wurden mit je 500 µl DMF/Et₃N 8:1 gewaschen und in neue Reaktionsgefäße überführt. Die Wafer wurden mit je 400 µl DMF/Et₃N 8:1 und 300 µl einer 0.14 M p-Nitrophenyl-4-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-butyrat-Lösung aus **11.2.11** in Dioxan/Pyridin 10:1 versetzt. Nach 16 Stunden Schütteln bei Raumtemperatur wurden die Überstände abgenommen, und die Wafer jeweils dreimal mit je 500 µl DMF, Ethanol, Dioxan und Dichlormethan gewaschen und getrocknet.

11.3.10 Kopplung des 5'-Amino-Modifiers 3-(Trifluoracetylamino)propyl-(2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)-phosphoramidit an die Silizium-Oberfläche

Hydroxylfunktionen präsentierende Silizium-Oberflächen (A1, A2 und C2) wurden getrocknet und in mit Septen verschlossenen Reaktionsgefäßen unter Argon mit 120 µl einer 5'-Amino-Modifizier-Lösung (2.5 µmol/ml) in Acetonitril und 12 µl einer Tetrazol-Lösung für eine Stunde geschüttelt. Die Überstände wurden abgenommen und die Wafer mit Acetonitril, einer Iod-Lösung (0.4 M, THF/Pyridin/Wasser 9:1:0.2), Wasser, 5 % NaHSO₃-Lösung, Wasser, Ethanol und Dioxan gewaschen.

Zur Entschützung wurde zunächst mit Ethanol und Wasser gewaschen und anschließend eine Stunde mit 0.5 M Natronlauge behandelt. Es folgte Waschen mit Wasser, ges. NaHCO₃-Lösung, Wasser, Ethanol und Dichlormethan.

11.3.11 Dedimethoxytritylierung geschützter modifizierter Silizium-Oberflächen

Die Entschützung N,N'-dimethoxytrityl-geschützter Silizium-Oberflächen erfolgte analog zur Dedimethoxytritylierung des DMT-Assays (vgl. **11.3.2**) durch Behandlung mit 3 %iger Dichloressigsäure in Dichlormethan. Die Entschützungreaktion konnte somit gleichzeitig zur Quantifizierung gebundener Hydroxylfunktionen verwendet werden.

11.3.12 Immobilisierung von Oligonucleotiden an aminofunktionalisierte Silizium-Wafer

Mit 1,4-Phenylendiisothiocyanat aktivierte aminofunktionalisierte Silizium-Wafer (A_{akt} bis F_{akt}) wurden einzeln in 2.0 ml Reaktionsgefäße (SafeSeal Microcentrifuge tubes, Sorensen™, BioScience, Inc. Salt Lake City, USA) überführt und mit 50 µl einer 8.2 µM Oligonucleotid-Lösung in 100 mM KH₂PO₄-Puffer pH 8.0 überschichtet. Nach 16 Stunden Schütteln bei Raumtemperatur wurden die Wafer dreimal mit je 150 µl Wasser gewaschen. Anschließend wurde dreimal für je 0.5 Stunden mit 150 µl Waschlösung bei 65 °C behandelt und dreimal mit 150 µl Wasser gewaschen.

Waschpuffer: 20x SSC-Puffer pH 7.0:
 3 M Natriumchlorid
 0.3 M tri-Trinatriumcitrat

Waschlösung: 5x SSC-Puffer
 50% Formamid

11.4 PROBE-Reaktion mit Oligonucleotid-Wafer

Die mit Oligonucleotid beladenen Silizium-Wafer wurden in Mikrotiterplatten mit flachem Boden überführt und mit jeweils 48.32 µl Reaktions-Mix und 1.68 µl Enzym-Lösung versetzt. Zur Kontrolle wurde die Reaktion analog in Lösung unter Zusatz von 1 µl Template (5 pmol/µl) durchgeführt. Als Negativkontrolle diente ein Reaktionsansatz ohne Template.

Die Primeroligonucleotid Basenextensions-Reaktion erfolgte in einem *in situ*-Block eines Thermocyclers mit den Temperaturprogrammen I und II (s.u.). Die Mikrotiterplatte wurde anschließend auf Eis gekühlt, und die Überstände wurden abgenommen. Die Wafer wurden jeweils dreimal mit je 100 µl Waschpuffer gewaschen, getrocknet und auf einem Probenträger des MALDI-TOF-Gerätes befestigt.

Reaktions-Mix (pro Ansatz): 2 µl Primer (10 pmol/µl)
 5 µl ddA-Mix (500 µM ddATP, 500 µM dNTP)
 5 µl ThermoSequenase Reaktionspuffer
 36.32 µl ddH₂O

Enzym-Lösung (pro Ansatz): 1.41 µl Dilution Buffer
 0.27 µl ThermoSequenase™ (32 units/µl)

ThermoSequenase Reaktionspuffer: 260 mM Tris-HCl pH 9.5
 65 mM MgCl₂

ThermoSequenase Dilution buffer: 10 mM Tris-HCl pH 8.0
 1 mM 2-Mercaptoethanol
 0.5 % Tween® 20 (v/v)
 0.5 % Nonidet® P-40 (v/v)

Template-Lösung: 250 pmol/µl

Temperaturprogramm I: 80 °C 1 min
 10 Zyklen: 40 °C 10 s
 72 °C 5 s
 72 °C 3 min
 25 °C

Temperaturprogramm II:	80 °C 1 min
10 Zyklen:	40 °C 10 min
	72 °C 5 min
	72 °C 3 min
	25 °C

Waschpuffer: 0.07 M Ammoniumcitrat

11.4.1 Reinigung der Reaktionsansätze mit Hilfe von ZipTip™

Es wurden ZipTip™ (Fa. Millipore, Eschborn) C18 in Kombination mit einer 10 µl-Pipette verwendet. Die Matrix wurde zunächst durch jeweils dreimaliges Aufnehmen von 10 µl Acetonitril und Waschpuffer äquilibriert. Zur Immobilisierung wurden 10 µl der Probenlösung aufgenommen und ca. 10 x auf- und abgezogen. Zum Waschen wurden einmal 10 µl Waschpuffer und zweimal 10 µl Wasser aufgenommen (jeweils 3 x aufnehmen und ablassen). Die Elution erfolgte durch 10 µl Elutionspuffer (6x aufnehmen und ablassen).

Waschpuffer: 0.1 M Tetraethylammoniumacetat
5 % Acetonitril (v/v)

Elutionspuffer: 0.1 M Tetraethylammoniumacetat
10 % Acetonitril (v/v)

11.4.2 Reinigung der Überstände der PROBE-Reaktion an fester Phase durch Ethanolfällung

Die abgenommenen Überstände wurden mit 3 µl 3M Ammoniumacetat-Puffer, 1 ml seeDNA (Amersham LifeScience, Cleveland, USA) und 100 µl Ethanol versetzt und ¼ Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 20 Minuten bei 15.000 rpm in einer Kühl-zentrifuge zentrifugiert. Die Überstände wurden abgesaugt und das Pellet mit 100 µl 80 %igem eisgekühltem Ethanol gewaschen. Nach Zentrifugation für 2 Minuten bei 15.000 rpm wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet luftgetrocknet. Der Rückstand wurde in 2 µl Wasser aufgenommen und mit Ionenaustauscher (Dowex 50WX8, Mesh: 100-200, NH₄⁺-Form) ½ Stunde inkubiert. Jeweils 600 nl der Probenlösung wurden für die massenspektrometrische Analyse eingesetzt.

11.5 Expression, Reinigung und Analyse der Alkalischen Phosphatase BAPHis6

Die bakterielle Alkalische Phosphatase (BAP) wurde als rekombinantes Protein mit einem His-Tag zur Erleichterung der Aufreinigung exprimiert. Dazu wurde das Plasmid pBAPHis6 (vgl. Anhang) zur Transfektion des *E. coli* Stammes JM 83^[159] eingesetzt.

Genotyp: *F^{ara} Δ(lac-proAB) rpsL (Str⁺) [Φ80 ΔlacZΔM15] thi*

11.5.1 Nährmedien

Als Flüssigmedium wurde autoklaviertes LB (Luria-Bertani-)-Medium bzw. 2TY-Medium verwendet.

LB-Medium: 10 g/l NaCl
 10 g/l Caseinhydrolysat (Select Peptone 140, GIBCO BRL)
 5 g/l Hefeextrakt (GIBCO BRL)

2TY-Medium: 5 g/l NaCl
 20 g/l Caseinhydrolysat
 10 g/l Hefeextrakt

Nach 30 Minuten Sporigieren bei Raumtemperatur wurde autoklaviert. Zur Herstellung selektiver Medien wurde Ampicillin (Sigma Aldrich) zu einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugegeben.

Selektive Nährböden wurden aus LB-Medium unter Zusatz von 8 g/l Agar (Select Agar, GIBCO BRL), 40 ml IPTG-Lösung (20 mg/ml) und 40 µl X-Gal-Lösung (20 mg/ml DMF) hergestellt.

11.5.2 Übernachtskulturen

Übernachtskulturen wurden durch Animpfen von LB-Medium mit Zellen aus einer Glycerinpräparation (820 µl Bakterienkultur der spätlogarithmischen Wachstumsphase wurden mit 180 µl Glycerin versetzt und bei -70 °C gelagert) und Inkubation im Schüttelinkubator bei 37 °C über Nacht gewonnen.

11.5.3 Induktion

200 ml ampicillinhaltiges 2TY-Medium wurden mit 2 ml frischer Übernachtskultur angeimpft, 2,5 Stunden im Schüttelinkubator bei 37 °C belassen und mit einer 100 mM IPTG-Stammlösung zu einer Endkonzentration von 1 mM versetzt. Nach 2,5 Stunden Schütteln bei 37 °C wurden die Zellen durch Zentrifugation (6000 rpm, 3 min) geerntet.

11.5.4 Zellaufschluß

Das Zellsediment wurde in 8 ml Sonication-Puffer und 2 ml 10 % Triton resuspendiert. Die Suspension wurde über Nacht bei -20 °C eingefroren. Nach dem Auftauen wurde für 10 min auf 70 °C erwärmt, auf -70 °C eingefroren und erneut für 10 min auf 70 °C erwärmt. Die unlöslichen Zellbestandteile wurden abzentrifugiert (6000 rpm, 5 min). Das im Überstand befindliche BAPHis6 wurde durch Affinitätschromatographie mit Ni-NTA-Agarose (Qiagen) gereinigt.

11.5.5 Metallchelate-Affinitätschromatographie^[162]

Vorbereitung der Adsorptionsmatrix:

400 µl Matrixsuspension, Ni-NTA-Agarose (Qiagen), wurden in Mikro-Spin Zentrifugenfilter (Roth GmbH) überführt und zentrifugiert. Das Säulenmaterial wurde mit 400 µl NiCl₂-Lsg. (100 mM) 10 min inkubiert. Die Flüssigkeit wurde kurz abzentrifugiert und das Material mit jeweils 400 µl Wasser, Puffer F und Sonication-Puffer gewaschen. Anschließend wurde die Matrix in 100 µl Sonication-Puffer aufgenommen.

Adsorption:

Die vorbereitete Matrix-Suspension wurde zum Zellrohextrakt der induzierten Zellen gegeben und für 1 Stunde bei 4 °C geschüttelt. Durch Zentrifugation (10000 rpm/20 min) wurde die Ni-NTA-Agarose mit dem immobilisierten Protein abgetrennt. Das Sediment wurde viermal mit je 250 µl Waschpuffer gewaschen. Zur Elution wurde mit 200 µl Elutionspuffer bei 37 °C für 30 min inkubiert. Eluat und Matrix wurden durch Zentrifugation in Zentrifugenfiltern voneinander getrennt.

Puffer F:	6 M Guanidinhydrochlorid 0.2 M Essigsäure
Sonication-Puffer:	50 mM Na ₂ HPO ₄ 300 mM NaCl pH 6.9
Waschpuffer:	Sonication-Puffer 10 % Glycerin pH 6.9
Elutionspuffer:	Sonication-Puffer 500 mM Imidazol 10 % Glycerin pH 6.0

11.5.6 Ultrafiltration

Das durch Affinitätschromatographie gewonnene Protein wurde durch Ultrafiltration mit Hilfe von Einweg-Mikrokonzentratoren der Firma Amicon („Microcon 3“) mit Ultrafiltrationsmembranen einer molekularen Ausschlußgröße von 3000 Da aufgereinigt.

Dazu wurde ein Aliquot der Probe in den Ultrafiltrationsaufsatz über einem Auffanggefäß gegeben und ca. 90 min bei 13000 g (11000 rpm) zentrifugiert. Es folgten zwei Waschschrirte mit jeweils 100 µl Wasser (13000g, 60 min). Der Ultrazentrifugenaufsatz wurde nun umgedreht und in einem frischen Auffanggefäß positioniert. Auf die Rückseite der Membran wurden 100 µl Wasser gegeben, und durch Zentrifugation (13000 g, 5 min) wurde das Protein von dieser gelöst und auf 400 µl Lösungsvolumen verdünnt. 1 µl dieser Elutionslösung entsprechen damit 0.5 ml ursprünglichem Kulturvolumen.

Die in Wasser gelöste BAPHis6 wurde bei 4 °C gelagert.

11.5.7 Präparation von Proteinproben für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die Analyse von Proteinen auf einem SDS-Polyacrylamid-Gel wurden diese mit einem SDS-haltigen Lysepuffer denaturiert.

Zur Untersuchung des Gesamtproteingehalts von Zellen wurden diese durch Zentrifugation sedimentiert (6000 rpm/3 min). Das Sediment wurde in 100 µl Lysepuffer aufgenommen und zunächst für 5 min auf 60 °C, dann für 5 min auf 100 °C erhitzt. Zur Entfernung der unlöslichen Zellbestandteile wurde 20 min bei 14000 rpm zentrifugiert.

Proteinlösungen wurden zur Vorbereitung ebenfalls in Lysepuffer aufgenommen und wie die Zellkulturen behandelt.

Lysepuffer:	0.1 M Tris-HCl (pH 6.8)
	5 % SDS
	1 M β-Mercaptoethanol
	15 % Glycerin
	0.005 % Bromphenolblau

11.5.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die gelelektrophoretische Analyse des Proteins wurden denaturierende, diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgele verwendet. Die 10 %igen Gele wurden in zwei Schritten gegossen:

Zunächst wurde die Gellösung für das Trenngel angesetzt und in die Gelzelle gefüllt, so daß ca. 1 cm des oberen Randes frei bleibt. Zur Bildung einer scharfen Grenzschicht wurde mit Wasser überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren des Trenngels wurde das Wasser entfernt und die Lösung für das Sammelgel daraufgegossen. Durch Einführen eines Probenkammes wurden die Probenfächer erzeugt, in die dann die Proben pipettiert wurden.

Die Gele wurden bei einer Spannung von 150-180 V gefahren, bis die Lauffront mit dem Bromphenolblau des Lysepuffers zur Unterkante des Gels gewandert war.

Nach dem Gellauf wurden die Proteinbanden mit Coomassie Brilliant Blue sichtbar gemacht. Dazu wurde das Gel mehrere Stunden in die Färbelösung gelegt und anschließend mit Entfärber behandelt.

Die entwickelten Gele wurden mit der Geldokumentations-Kamera aufgenommen.

Zusammensetzungen der Gellösungen für zwei 10 %ige Minigele:

	<u>Trenngel</u>	<u>Sammelgel</u>
30 %iger Acrylamid/Bisacrylamid Mix 4 K (37.5:1), wäßrige Lösung (w/v) (AGS GmbH)	3.33 ml	0.65 ml
Wasser	4.12 ml	3.05 ml
Trenngel-/Sammelgelpuffer	2.5 ml	1.25 ml
10 %ige AMPS-Lösung	50 µl	25 µl
TEMED	5 µl	5 µl
Trenngelpuffer:	1.5 M Tris-HCl (pH 8.88)	(90.8 g/500 ml)
	0.4 % SDS	(2 g/500 ml)
Sammelgelpuffer:	0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)	(30.3 g/500 ml)
	0.4 % SDS	(2 g/500 ml)
Elektrophoresepuffer:	0,05 M Tris-HCl	(6 g/l)
	0.2 M Glycin	(14.4 g/l)
	0.2 % SDS	(2 g/l)
Färbelösung:	25 % Isopropanol (v/v)	
	10 % Eisessig (v/v)	
	0.02 % Coomassie Brilliant Blue (w/v)	
Entfärber:	10 % Isopropanol (v/v)	
	10 % Eisessig (v/v)	

11.5.9 Native Polyacrylamidgelelektrophorese

Proteine für die native PAGE wurden durch ein schonendes Aufschlußverfahren aus *E. coli* gewonnen: 1.5 ml Suspension von mit Expressionsvektor transfizierten und induzierten Zellen wurden abzentrifugiert (4000 g, 5 min). Das Pellet wurde in 0.5 ml 10 mM Tris-HCl (pH 7.0) resuspendiert. Es wurde nochmals zentrifugiert und das Sediment in 100 µl 10 mM Tris-HCl aufgenommen. Die Zellen wurden bis zum vollständigen Aufschluß durch Ultraschall bei 0 °C sonifiziert, und die Suspension wurde zentrifugiert (20000 g, 20 min).

Diagramm gegen die Zeit aufgetragen (vgl. Abb. 7-13). Die Steigung der erhaltenen Geraden gibt den enzymatischen Umsatz an p-Nitrophenylphosphat pro Zeiteinheit an. Für die BAPHis-8-Lösungen ergaben sich enzymatische Aktivitäten von 0.36 bis 0.5 u bezogen auf 1 μ l Lösung (\cong 144 - 200 u pro 200 ml Kulturvolumen). Die spezifische enzymatische Aktivität ergibt sich damit zu 40 u/mg.

Diethanolamin-Puffer: 0.5 mM MgCl₂
1 M Diethanolamin-HCl, pH 9.8

Substrat-Lsg.: 0.1 M p-Nitrophenylphosphat
in Diethanolamin-Puffer

c (p-Nitrophenol) [nmol/ml]	Extinktion bei 405 nm
0	0
7.28	0.062
12.14	0.094
14.74	0.135
33.77	0.572
36.42	0.569
56.29	0.846
61.92	0.833
103.20	1.628

Lineare Regression:
 $Y = A + B \cdot X$
 $A = -0.04993 \pm 0.03222$
 $B = 0.01593 \pm 0.00067$
 $R = 0.99378$
 $SD = 0.06308, N = 9$
 $P = 6.2067 \cdot 10^{-8}$

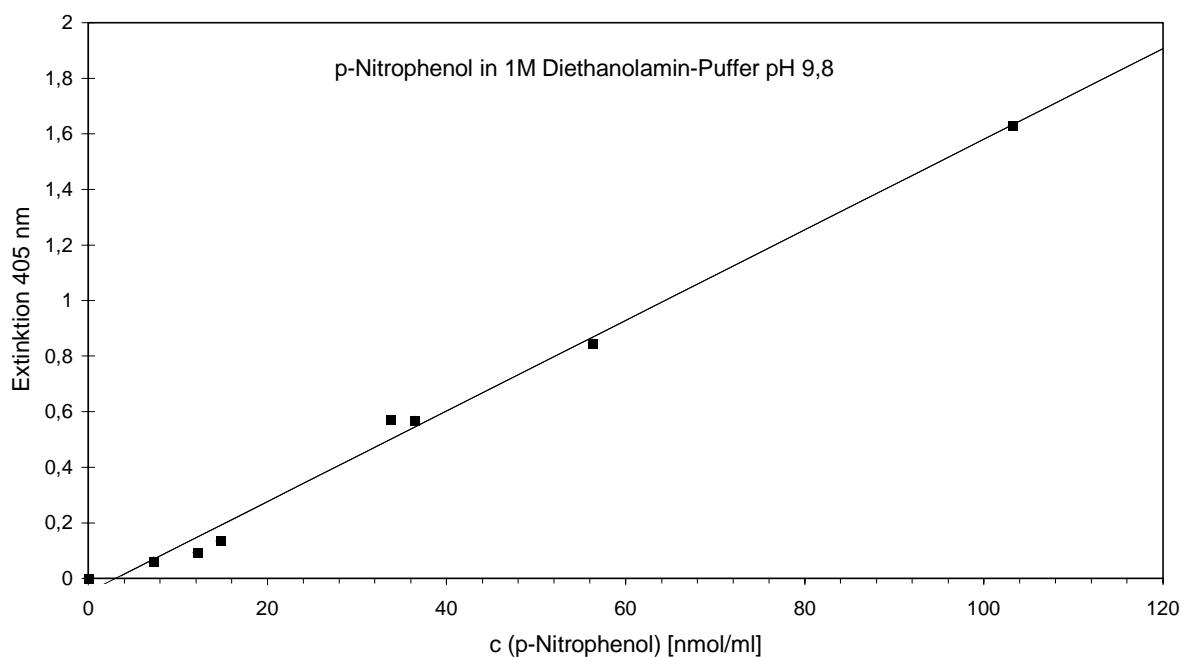


Abb.11-5: p-Nitrophenol-Eichreihe und lineare Regression

11.6 Immobilisierung der Alkalischen Phosphatase an Silizium-Wafer

Die nach Umsetzung mit 1,4-Phenylendiisothiocyanat aktivierten Silizium-Wafer (A_{akt} , vgl. 11.3.3) wurden dreimal mit Immobilisierungspuffer gewaschen und in 0.5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Die Wafer wurden mit Immobilisierungspuffer überschichtet und mit 1 u Alkalischer Phosphatase-Lösung unter kräftigem Schütteln bei 37 °C eine Stunde inkubiert. Abschließend wurde je dreimal mit Immobilisierungspuffer und Wasser gewaschen.

Phosphatase-Puffer: 0.1 M Tris-HCl (pH 9.5)
 0.1 M NaCl
 0.05 M MgCl₂

Wetting-Solution: 10 ml 2-Propanol
 9.4 ml Wasser
 200 µl N-Methylmorpholin
 400 µl Tween[®] 20

Immobilisierungs-Puffer: Phosphatase-Puffer/Wetting-Solution 4:1

11.6.1 Farbreaktion zum Nachweis enzymatischer Aktivität an der Silizium-Oberfläche

Die mit Alkalischer Phosphatase beladenen Silizium-Wafer wurden dreimal mit Tris-HCl-Puffer pH 9.5 gewaschen, in neue 0.5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und mit jeweils 250 µl Färbelösung inkubiert. Die enzymatische Aktivität wurde durch Entwicklung eines blauen Farbstoffes angezeigt.

Färbelösung: 2 ml Tris-HCl-Puffer pH 9.5
 0.7 µl BCIP (5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat)
 0.9 µl NBT (Nitroblautetrazolium)

11.6.2 Bestimmung der enzymatischen Aktivität immobilisierter Alkalischer Phosphatase

Die Enzym-Wafer wurden mit Diethanolamin-Puffer gewaschen, in 1 ml Einmalküvetten überführt und mit 900 µl Diethanolamin-Puffer versetzt. Die weitere Durchführung erfolgte analog zu **11.5.11**.

11.6.3 Quantifizierung der immobilisierten Proteinmenge

Die Proteinmengenbestimmung erfolgte analog zu **11.5.10**, wobei die Inkubationszeit auf 2 Stunden bei 60 °C ausgedehnt wurde.

11.6.4 Experiment zur Enzymsättigung

Zur Bestimmung der maximal erreichbaren enzymatischen Aktivität der Enzym-Wafer wurde die Immobilisierung unter Einsatz verschiedener Mengen Enzym-Lösung durchgeführt. Die enzymatische Aktivität wurde nach **11.5.11** quantifiziert.

zur Immobilisierung eingesetzte enzymatische Aktivität [u]	enzymatische Aktivität Enzym-Wafer [nmol/min]
0	0.238
0.0005	0.134
0.005	1.004
0.016	0.0458
0.05	2.238
0.25	2.76
0.8	4.6271
1.25	2.616
1.6	1.293
2.5	1.112
4	1.129
5	1.598

Tab. 11-1: Enzymatische Aktivität in Abhängigkeit von der zur Immobilisierung eingesetzten Enzymmenge

11.6.5 Vergleichende enzymkinetische Untersuchungen

Zur Untersuchung der Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität von der Substratkonzentration wurden Enzym-Wafer und Enzym-Lösung in vergleichbarer Menge eingesetzt. Es folgte die Bestimmung der enzymatischen Aktivität gemäß **11.5.11** unter Variation der Substratkonzentration.

[S] [mmol/l]	1/[S]	Enzym-Lösung		Enzym-Wafer	
		v [nmol/min]	1/v	v [nmol/min]	1/v
0.00007	14285.714	0.22	4.545		
0.0052	192.308	0.06	16.667	0.355	2.812
0.006	166.667	0.02	50	0.065	15.385
0.026	38.462	0.63	1.587	0.52	1.923
0.064	15.625	0.15	6.667	0.29	3.448
0.16	6.25	0.67	1.493	0.21	4.762
0.321	3.115	0.85	1.176	0.225	4.444
0.52	1.923	4.76	0.21	0.84	1.19
0.642	1.558	3.53	0.283	0.28	3.571
1.604	0.623	3.73	0.268	0.35	2.857
2.6	0.385	4.99	0.2	4.49	0.223
3.209	0.312	3.81	0.262	0.5	2
17.3	0.058	4.9	0.204		
52	0.019	4.8	0.208	4.9	0.204

Tab. 11-2: Meßwerte der enzymkinetischen Untersuchung

Aus dem Lineweaver-Burk-Plot ergeben sich folgende Regressionsgeraden:

Enzym-Lösung: $1/v = 0.18254 + 0.22404 \cdot 1/[S]$

Enzym-Wafer: $1/v = 0.63347 + 1.34986 \cdot 1/[S]$

Für die maximale Reaktionsgeschwindigkeit und die Michaelis-Menten-Konstante folgt damit:

Enzym-Lösung: $v_{\max} = 5.5 \text{ nmol/min}$ $K_M = 1.23 \text{ mmol/l}$

Enzym-Wafer: $v_{\max} = 1.6 \text{ nmol/min}$ $K_M = 2.16 \text{ mmol/l}$

11.7 Rekombinationsexperimente unter Verwendung von an Silizium-Wafer immobilisierter Alkalischer Phosphatase

Für die Klonierungsexperimente wurde pOM9-Vektor DNA (2704 bp) eingesetzt. Als Insert fungierte ein nach Restriktionsverdau mit *Hind*III isoliertes Fragment (1931 bp) der pTAPOL3-DNA, welche das Gen der Taq-Polymerase enthält. Beide Fragmente wurden nach Verdau und gelelektrophoretischer Trennung aus einem Agarosegel mittels Glasmilch-Reinigung isoliert.

11.7.1 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Überprüfung von Restriktionsspaltungen und zur präparativen Isolierung von DNA-Fragmenten zwischen 8 und 0.2 kb Länge wurden 1 %ige (w/w) Agarosegele verwendet. Die Präparation der Gellösung und das Gießen der Gele erfolgte nach *Maniatis*^[191]. Zum Einfüllen der Proben und zur Kennzeichnung der Laufweite wurde den Proben etwa 1/3 Volumen Blaumarker zugegeben. Nach der Elektrophorese wurden die Gele zur Detektion der DNA für ca. 10 min in einem Ethidiumbromid-Bad gefärbt.

Die Gele wurden mit einer CCD-Videokamera unter UV-Licht der Wellenlänge 254 nm aufgenommen.

Agarosepuffer (10x): 400 mM Tris
 50 mM NaOAc
 10 mM EDTA (pH 7.8)

Blaumarker: 50 % Glycerin
 50 mM EDTA
 0.005 % Bromphenolblau

Ethidiumbromid-Lösung: 3 Tropfen 10 %ige (w/v) Ethidiumbromid-Lösung
 auf 1 Liter Agarosepuffer (1x)

Zusammensetzung des DNA-Fragmentlängenstandards (im Arbeitskreis aus Plasmid-DNA hergestellt, alle Fragmente sind zu gleichen Teilen enthalten):

6034, 4876, 4159, 3114, 2483, 2045, 1541, 1014, 914, 692, 270 bp

11.7.2 Dephosphorylierung

Zur Entfernung der 5'-Phosphatreste des DNA-Fragments (pOM9, 2704 bp, linearisiert) wurde einerseits BAPHis6 in wäßriger Lösung sowie andererseits an Silizium-Wafer immobilisierte BAPHis6 eingesetzt.

Ein Enzym-Wafer trägt eine enzymatische Aktivität von 0.005 u (Kap. 11.4.2). Es wurde ein entsprechendes Volumen an BAPHis6-Lösung eingesetzt.

Dephosphorylierungsansatz:	3 µl Phosphatasepuffer (10x)
	4 µl DNA-Lösung (~200 ng)
	X µl Enzym-Lösung bzw. Enzym-Wafer
	Y µl Wasser
	<hr/>
	30 µl Reaktionsansatz

Phosphatasepuffer (10x):	500 mM Tris-HCl (pH 8.5)
	1 mM EDTA

Die Inkubation erfolgte über 1.5 Stunden bei 37 °C. Das DNA-Fragment wurde mit dem GENE CLEAN KIT der Firma Bio 101 Inc., La Jolla, U.S.A. nach der Glasmilch-Methode (Kap. 11.5.3) aufgereinigt, aus Ethanol gefällt und in 50 µl Wasser resuspendiert.

11.7.3 Reinigung von DNA nach der Glasmilch-Methode

Die Dephosphorylierungsansätze wurden mit der dreifachen Menge gesättigter Natriumiodid-Lösung versetzt und mit jeweils 5 µl Silica-Matrix-Suspension (Glasmilch, GENE CLEAN KIT, Fa. Bio 101 Inc., La Jolla, U.S.A.) inkubiert. Nach Zentrifugation (10000 rpm, 20 s) wurde der Überstand verworfen, und das Sediment dreimal mit je 500 µl eisgekühltem Waschpuffer gewaschen. Durch Resuspension in 50 µl Wasser bei 37 °C wurde die DNA von der Matrix gelöst. Es wurde zentrifugiert (10000 rpm, 20 s), und das die DNA enthaltene Zentrifugat abpipettiert.

Waschpuffer:	50 % Ethanol
	10 mM Tris-HCl
	50 mM NaCl
	1 mM EDTA (pH 7.5)

11.7.6 Bakterientransformation

Bakterienzellen wurden durch Elektroporation transformiert, die im Vergleich zur Calciumchlorid-Methode (Heatshock-Methode) den Vorteil der höheren Transformations-effizienz bietet.

Vorbereitung der Zellen:

Aus einer „Über-Nacht-Kultur“ von *E. coli*-Zellen des Typs DH10B wurde in 100 ml LB-Medium im Verhältnis 1:100 angeimpft. Nach Inkubation bei 37 °C für 1.5 Stunden wurde die Zellkultur 10 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (5000 rpm, 10 min) und das Bakteriensediment in 200 ml eiskaltem 10 %igem Glycerin p.a. resuspendiert.

Es folgten weitere Waschschriffe:

- Zentrifugation (5000 rpm/10 min), Resuspension in 100 ml 10 %igem Glycerin p.a.
- Zentrifugation (5000 rpm/10 min), Resuspension in 20 ml 10 %igem Glycerin p.a.
- Zentrifugation (5000 rpm/10 min), Resuspension in 2 ml 10 %igem Glycerin p.a.

Aliquots von 100 µl wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C gelagert.

Elektroporation:

Die vorbereiteten Zellen wurden langsam auf Eis aufgetaut. Pro Transformation wurden 20 µl Zellsuspension mit 1 µl DNA-Lösung aus einer Ethanol-fällung versetzt und das Gesamtvolumen mit Wasser auf 50 µl aufgefüllt. Das Gemisch wurde in eisgekühlte Porationsküvetten (BioRad) mit einem Elektrodenabstand von 0.1 cm überführt. Nun wurde bei einer Spannung von 1.80 kV mit einer Pulsdauer von etwa 5.5 ms in einem Elektroporator (BioRad) gepulst. Nach Überführung der Zellsuspension in 500 µl SOC-Medium wurde 1 Stunde bei 37 °C geschüttelt. Zur Selektion der transformierten Zellen wurden je 20 µl der Bakteriensuspension auf ampicillinhaltigen Agar-Platten ausgestrichen und ca. 12 Stunden bei 37 °C inkubiert.

SOC-Medium: 2 g/100 ml Caseinhydrolysat (Select Peptone 140, Gibco BRL)
 0.5 g/100 ml Hefeextrakt (Gibco BRL)
 0.01 M NaCl
 0.0025 M KCl
 0.02 M Glucose
 0.02 M MgCl₂

11.7.7 Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA

Minilysat-Methode:

Zur Isolierung von Plasmid-DNA in kleinem Maßstab wurde die Methode der alkalischen Lyse verwendet (Birnboim und Doly^[192], modifiziert nach Ish-Horowicz und Burke^[193]).

1.5 ml einer stationär gewachsenen Bakterienkultur wurden zentrifugiert (6000 rpm/5 min) und der Überstand verworfen. Das Bakteriensediment wurde in 0.1 ml Lösung I resuspendiert. Nach Zugabe von 0.2 ml Lösung II wurde vorsichtig gemischt. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Denaturierungsvorgang durch Zugabe von 0.15 ml Lösung III gestoppt. Die Mischung wurde 20 Minuten auf Eis inkubiert, ausgeflockte Proteine und denaturierte genomische DNA wurden durch Zentrifugation abgetrennt (13500 rpm/10 min).

Die Plasmid-DNA aus dem Überstand wurde durch Dekantieren in ein Eppendorfgesäß mit 1 ml eiskaltem 96 %igem Ethanol 10 min bei Raumtemperatur gefällt.

Die ausgefallene DNA wurde abzentrifugiert (13000 rpm/15 min) und mit 0.5 ml 80 %igem, eiskaltem Ethanol gewaschen. Nach erneuter kurzer Zentrifugation wurde das Sediment 5 min an der Luft getrocknet und in 100 µl Wasser aufgenommen.

Lösung I: 10 mM EDTA
 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)

Lösung II: 0.2 M NaOH
 1 % SDS

Lösung III: 3 M NaOAc (pH 4.8)

11.7.8 Restriktionskartierung

Die analytischen Reaktionsansätze wurden gemäß den Vorschriften der Enzymhersteller ausgeführt. Dabei wurden je Ansatz 10 µl Plasmid-DNA-Lösung aus der Minilysat-Methode eingesetzt. Zur Entfernung von RNA-Verunreinigungen wurden jedem Reaktionsansatz 2-5 ng/µl RNase (Boehringer Mannheim) zugesetzt.

Zusammensetzung eines typischen Restriktionsansatzes:

10 μl Plasmid-DNA-Lösung

1 μl Spaltungspuffer 10x

0.3 μl Restriktionsenzym-Lsg. (ca. 3 u)

0.3 μl Rnase

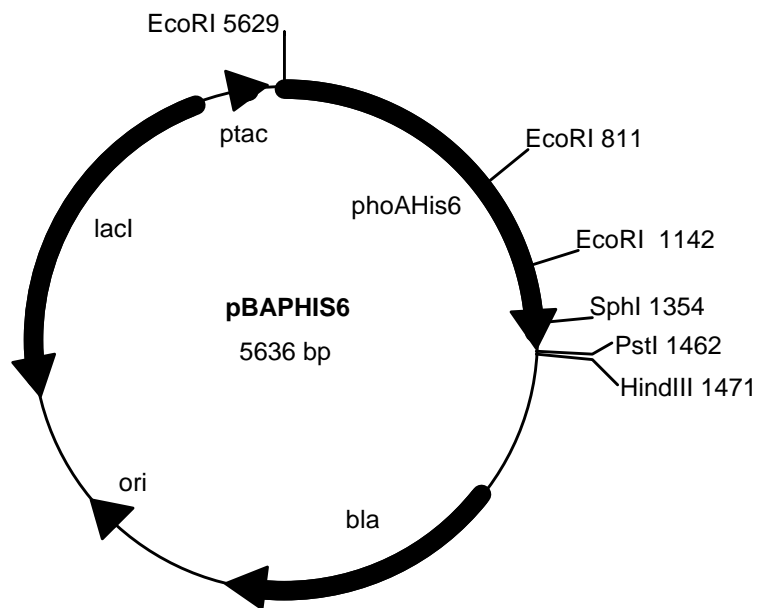
Die Inkubation erfolgte bei der für das Enzym jeweils optimalen Temperatur für einen Zeitraum von einer Stunde.

	Volumenaktivität
<i>Hind</i> III (Roche Diagnostics)	10 U/ μl
<i>Bam</i> HI (Roche Diagnostics)	10 U/ μl
<i>Mst</i> I (Mbl Fermentas)	10 U/ μl

Tab. 11-3: Liste der verwendeten Restriktionsenzyme

12 Anhang

12.1 Expressionsvektor pBAPHIS6^[159]



<i>ptac</i> :	<i>tac</i> -Promotor
<i>bla</i> :	β -Lactamase-Gen
<i>ori</i> :	Replikationsursprung
<i>lacI</i> :	<i>lac</i> -Repressorgen

12.2 Gefahrstoffanhang

12.2.1 Liste der verwendeten Gefahrstoffe

Stoffbezeichnung	Gef.-Symbol	R-Sätze	S-Sätze
Acetonitril	F, T	11-23/24/25	16-27-45
Acrylamid	T	45-46-24/25-48/23/24/25	53-45
Ammoniaklösung 32 %	C, N	34-50	26-36/37/39-45-61
Bicinchoninsäure	Xn	36/37-42	22-26-36
1,6-Diaminohexan	C	21/22-34-37	22-26-36/37/39-45
Dichloressigsäure	C	35	26-45
Dichlormethan	Xn	40	23.2-24/25-36-37
N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid	T	22-24-41-43	24/26-37/39-45
Diethanolamin	Xi	36/38	26
N,N-Diisopropylethylamin	F, Xi	11	9-16-29-33
N,N-Dimethylformamid	T	61-E20/21-36	53-45
Essigsäure	C	10-35	23.2-26-45
Ethidiumbromid	T ⁺	22-26-36/37/38-40	26-28.2-36/37-45
Ethylacetat	F	11	16-23.2-29-33
Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz	Xn	22	-
Formamid	T	61	53-24/25-37-45
n-Hexan	F, Xn	11-48/20	9-16-24/25-51
3-Hydroxypicolinsäure	-	36/37/38	26-37/39
Imidazol	C	22-34	22-26-36/37/39-45
2-Mercaptoethanol	T, N	22-23/24-34-51/53	26-36/37/39-45-61
Methanol	F, T	11-23/25	7-16-24-45
Natriumcarbonat	Xi	36	22-26
Natriumdodecylsulfat	Xn	-	22-36/38
Natriumhydroxid	C	35	7/8-26
Nickel(II)chlorid	T	25-43	24-37-45
Phenol	T	24/25-35	28.6-45
2-Propanol	F	11	7-16
Pyridin	F, Xn	11-20/21/22	26-28.1
Salzsäure 32 %	C	34-37	26-36/37/39-45
Schwefelsäure 96 %	C	35	26-30-45
Tetrahydrofuran	Xi, F	11-19-36/37	16-29-33
N,N,N'N'-Tetramethylethylendiamin	F, Xn	11-20/22-37/38-41	16-26-39
Toluol	F, Xn	11	16-25-29-33
Triethylamin	F, C	11-20/21/22-35	3-16-26-29-36/37/39-45
Trifluoressigsäure	C	35	26-28.2
Tris-(hydroxymethyl)aminomethan	Xi	36/38	-
Triton-X100	Xn	22-41	24-26-39

Tab. 12-1: Gefahrenmerkmale und Sicherheitsratschläge von verwendeten Substanzen

12.2.2 Entsorgungshinweise

Organische halogenfreie bzw. halogenhaltige Lösungsmittel wurden ebenso wie schwermetallhaltige Lösungen und Feststoffe in gesonderte Sammelbehälter gegeben. Saure bzw. alkalische Lösungen wurden neutralisiert und entsprechend der Lösungsmittelart entsorgt.

13 Literaturverzeichnis

- [1] V.A. McKusick,
HUGO news. The Human Genome Organisation: history, purposes and membership
Genomics **5** (1989) 385-387.
- [2] C.R. Cantor
Orchestrating the Human Genome Project
Science **248** (1990) 49-51.
- [3] S. Meier-Ewert, E. Maier, A. Ahmadi, J. Curtis, H. Lehrach
An automated approach to generating expressed sequence catalogues
Nature **361** (1993) 375-376.
- [4] R.C. Anderson, G. McGall, R.J. Lipshutz
Polynucleotide Arrays for Genetic Sequence Analysis
Microsystem in Chemistry and Life Science, A. Manz, H. Becker (ed.)
Springer Verlag Heidelberg 1998
Top. Curr. Chem. **194** (1998) 117-129.
- [5] J.D. Hoheisel
Oligomer chip technology
Trends Biotechnol. **15** (1997) 465-469.
- [6] R. Drmanac, S. Drmanac, Z. Strezoska, T. Paunesku, I. Labat, M. Zeremski,
J. Snoddy, W.K. Funkhouser, B. Koop, L. Hood, R. Crkvenjakov
DNA Sequence Determination by Hybridisation: A Strategy for Efficient Large-Scale
Sequencing
Science **260** (1993) 1649-1652.
- [7] N.E. Broude, T. Sano, C.L. Smith, C.R. Cantor
Enhanced DNA sequencing by hybridization
Proc. Acad. Natl. Sci. USA **91** (1994) 3072-3076.
- [8] M.J. O'Donnell-Maloney, D.P. Little
Microfabrication and array technologies for DNA sequencing and diagnostics
Genetic Analysis **13** (1996) 151-157.
- [9] Z. Strezoska, T. Paunesku, D. Radosavljevic, I. Labat, R. Drmanac,
R. Crkvenjakov
DNA sequencing by hybridization: 100 bases read by a non-gel based method
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88** (1991) 10089-10093.
- [10] A. Goeffeau
Molecular fish on chips
Nature **385** (1997) 202-203.

-
- [11] E.M. Southern
Analyzing polynucleotide sequences
International Patent Application PCT GB 89/00460
- [12] E.M. Southern, U. Maskos
Support-bound oligonucleotides
International Patent Application PCT GB 89/01114
- [13] K.R. Khrapko, Yu P. Lysov, A.A. Khorlin, V.V. Shick, V.L. Florentiev, A.D. Mirzabekov
An oligonucleotide hybridization approach to DNA sequencing
FEBS Lett. **256** (1989) 118-122.
- [14] K.R. Khrapko, Yu.P. Lysov, A.A. Khorlin, I.B. Ivanov, G.M. Yershov, S.K. Vasilenko, V.L. Florentiev, A.D. Mirzabekov
A method for DNA sequencing by hybridization with oligonucleotide matrix
DNA Seq. **1** (1991) 375-388.
- [15] R. Drmanac, I. Labat, I. Brukner, R. Crkvenjakov
Sequencing of megabase plus DNA by hybridization: Theory of the method
Genomics **4** (1989) 114-128.
- [16] S. Dubiley, E. Kirillov, Y. Lysov, A. Mirzabekov
Fractionation, Phosphorylation and Ligation on Oligonucleotide Microchips to enhance Sequencing by Hybridization
Nucleic Acids Res. **25** (1997) 2259-2265.
- [17] J.B. Lamture, K.L. Beattie, B.E. Burke, M.D. Eggers, D.J. Ehrlich, R. Fowler, M.A. Hollis, B.B. Kosicki, R.K. Reich, S.R. Smith, R.S. Varma, M.E. Hogan
Direct detection of nucleic acid hybridization on the surface of a charge coupled device
Nucleic Acids Res. **22** (1994) 2121-2125.
- [18] Z. Guo, R.A. Guilfoyle, A.J. Thiel, R. Wang, L.M. Smith
Direct fluorescence analysis of genetic polymorphisms by hybridization with oligonucleotide arrays on glass supports
Nucleic Acids Res. **22** (1994) 5456-5465.
- [19] G. Yershov, V. Barsky, A. Belgovsky, Eu. Kirillov, E. Krendlin, I. Ivanov, S. Parinov, D. Guschin, A. Drobyshev, S. Dubiley, A. Mirzabekov
DNA analysis and diagnostics on oligonucleotide microchips
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93** (1996) 4913-4918.
- [20] E.M. Southern, U. Maskos, J.K. Elder
Analyzing and Comparing Nucleic Acid Sequences by Hybridization to Arrays of Oligonucleotides: Evaluation Using Experimental Models
Genomics **13** (1992) 1008-1017.
- [21] S.P.A. Fodor, J.L. Read, M.C. Pirrung, L. Stryer, A.T. Lu, D. Solas
Light-Directed, Spatially Addressable Parallel Chemical Synthesis
Science **251** (1991) 767-773.

- [22] A.C. Pease, D. Solas, E.J. Sullivan, M.T. Cronin, C.P. Holmes, S.P.A. Fodor
Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91** (1994) 5022-5026.
- [23] U. Maskos, E.M. Southern
Oligonucleotide hybridisations on glass supports: a novel linker for oligonucleotide synthesis and hybridisation properties of oligonucleotides synthesised *in situ*
Nucleic Acids Res. **20** (1992) 1679-1684.
- [24] E.M. Southern, C.S. Case-Green, J.K. Elder, M. Johnson, K.U. Mir, L. Wang, J.C. Williams
Arrays of complementary oligonucleotides for analysing the hybridisation behaviour of nucleic acids
Nucleic Acids Res. **22** (1994) 1368-1373.
- [25] J.C. Williams, S.C. Case-Green, K.U. Mir, E.M. Southern
Studies of oligonucleotide interactions by hybridisation to arrays: the influence of dangling ends on duplex yield
Nucleic Acids Res. **22** (1994) 1365-1367.
- [26] U. Maskos, E.M. Southern
Parallel analysis of oligodeoxyribonucleotide interactions. I. Analysis of factors influencing oligonucleotide duplex formation
Nucleic Acids Res. **20** (1992) 1675-1678.
- [27] J. Weiler, J.D. Hoheisel
Combining the Preparation of Oligonucleotide Arrays and Synthesis of High-Quality Primers
Anal. Biochem. **243** (1996) 218-227.
- [28] S.P.A. Fodor, R.P. Rava, X.C. Huang, A.C. Pease, C.P. Holmes, C.L. Adams
Multiplexed biochemical assays with biological chips
Nature **364** (1993) 555-556.
- [29] R.J. Lipshutz, D. Morris, M. Chee, E. Hubbell, M.J. Kozal, N. Shah, N. Shen, R. Yang, S.P.A. Fodor
Using Oligonucleotide Probe Arrays To Access Genetic Diversity
BioTechniques **19** (1995) 442-447.
- [30] N.D. Sinha, J. Biernat, H. Köster
Betacyanoethyl-N,N,-dialkylamino/N-morpholino monochloro phosphoramidites: new phosphorylating agents facilitating ease of deprotection and work-up of synthesised oligonucleotides
Tetrahedron Lett. **24** (1983) 5843-5846.
- [31] N.D. Sinha, J. Biernat, J. McManus, H. Köster
Polymer support oligonucleotide synthesis: XVIII. Use of betacyanoethyl-N,N,-dialkylamino phosphoramidite of deoxynucleosides for the synthesis of DNA fragments simplifying deprotection and isolation of the final product
Nucleic Acids Res. **12** (1984) 4539-4557.

- [32] J.A. Running, M.S. Urdea
A procedure for productive coupling of synthetic oligonucleotides to polystyrene microtiter wells for hybridization capture
BioTechniques **8** (1990) 276-277.
- [33] C.R. Newton, D. Holland, L.E. Heptinstall, I. Hodgson, M.D. Edge, A.F. Markham, M.J. McLean
The production of PCR Products with 5' single-stranded tails using primers that incorporate novel phosphoramidite intermediates
Nucleic Acids Res. **21** (1993) 1155-1162.
- [34] T.T. Nikiforov, Y.H. Rogers
The Use of 96-Well Polystyrene Plates for DNA Hybridization-Based Assays: An Evaluation of Different Approaches to Oligonucleotide Immobilization
Anal. Biochem. **227** (1995) 201-209.
- [35] Y. Zhang, M.Y. Coyne, S.G. Will, C.H. Levenson, E.S. Kawasaki
Single-base mutational analysis of cancer and genetic diseases using membrane bound modified oligonucleotides
Nucleic Acids Res. **19** (1991) 3929-3933.
- [36] H. Kosaka, A. Tanaguchi, D.D. Richman, D.A. Carson
Microtiter format gene quantification by covalent capture of competitive PCR products: application to HIV-1 detection
Nucleic Acids Res. **21** (1993) 3469-3472.
- [37] V. Lund, R. Schmid, D. Rickwood, E. Hornes
Assessment of methods for covalent binding of nucleic Acids to magnetic beads, Dynabeads™, and the characteristics of the bound nucleic acids in hybridization reactions
Nucleic Acids Res. **16** (1988) 10861-10880.
- [38] M.D. Eggers, M.E. Hogan, R.K. reich, J.B. Lamture, D.J. Ehrlich, M.A. Hollis, B.B. Kosicki, T. Powdrill, K.L. Beattie, S.R. Smith, R.S. Varma, R. Gangadharan, A. Mallik, B.E. Burke, D. Wallace
A Microchip for Quantitative Detection of Molecules Utilizing Luminescent and Radioisotope Reporter Groups
BioTechniques **17** (1994) 516-524.
- [39] S.R. Rasmussen, M.R. Larsen, S.E. Rasmussen
Covalent Immobilization of DNA onto Polystyrene Microwells: The Molecules Are Only Bound at the 5' End
Anal. Biochem. **198** (1991) 138-142.
- [40] M.G. Ivanovskaya, I.A. Kozlov, I.V. Lebedeva, Z.A. Shabarova
New Method for Covalent Immobilization of Oligonucleotides on Nylon Membranes
Molecular Biology **28** (1994) 754-756.
- [41] R.K. Saiki, P.S. Walsh, C.H. Levenson, H.A. Erlich
Genetic Analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **86** (1989) 6230-6234.

- [42] J. Meinkoth, G. Wahl
Hybridization of Nucleic Acids Immobilized on solid supports
Anal. Biochem. **138** (1984) 267-284.
- [43] A. Wolter
Untersuchungen zur Festphasensynthese von Oligodesoxynucleotiden am Träger Controlled-Pore-Glass unter Verwendung von 2'-Cyanoethylphosphoramidit-Synthesebausteinen
Dissertation Universität Hamburg 1987, 11-15.
- [44] H. Köster, A. Stumpe, A. Wolter
Polymer support oligonucleotide synthesis: rapid and efficient synthesis of oligodeoxynucleotides on porous glass support using triester approach
Tetrahedron Lett. **24** (1983) 747-750.
- [45] S. Ghosh, G.F. Musso
Covalent attachment of oligonucleotides to solid supports
Nucleic Acids Res. **15** (1987) 5353-5372.
- [46] N. Sinha, V. Großbruchhaus, H. Köster
A new synthesis of oligodeoxynucleoside methylphosphonates on control pore glass polymer support using phosphite approach
Tetrahedron Lett. **24** (1983) 877-880.
- [47] E. Fahy, G.R. Davis, L.J. Dimichele, S.S. Gosh
Design and synthesis of polyacrylamide-based oligonucleotide supports for use in nucleic acids diagnostic
Nucleic Acids Res. **21** (1993) 1819-1826.
- [48] D. Guschin, G. Yershov, A. Zaslavsky, A. Gemmell, V. Shick, D. Proudnikov, P. Arenkov, A. Mirzabekov
Manual Manufacturing of Oligonucleotide, DNA, and Protein Microchips
Anal. Biochem. **250** (1997) 203-211.
- [49] N. Zammateo, C. Girardeaux, D. Delforge, J.-J. Pireaux, J. Remacle
Amination of Polystyrene Microwells: Application to the Covalent Grafting of DNA Probes for Hybridization Assays
Anal. Biochem. **236** (1996) 85-94.
- [50] E. Hornes, L. Korsnes
Magnetic DNA Hybridization Properties of Oligonucleotide Probes Attached to Superparamagnetic Beads and Their Use in the Isolation of Poly(A) mRNA From Eucaryotic Cells
GATA **6** (1990) 145-150.
- [51] S.H. Chang, K.M. Gooding, F.E. Regnier
Use of oxiranes in the preparation of bonded phase supports
J. Chromatogr. **120** (1976) 321-333.
- [52] Z. Larin, M.D. Fricker, E. Maher, Y. Ishikawa-Brush, E.M. Southern
Fluoreszenz in situ hybridisation of multiple probes on a single microscope slide
Nucleic Acids Res. **22** (1994) 3689-3692.

- [53] U. Maskos, E.M. Southern
A study of oligonucleotide reassociation using large scale arrays of oligonucleotides synthesised on a glass support
Nucleic Acids Res. **21** (1993) 4663-4669.
- [54] R.M. Zimmermann, E.C. Cox
DNA stretching on functionalized gold surfaces
Nucleic Acids Res. **22** (1994) 492-497.
- [55] C.F. Mandenius, K. Mosbach, S. Welin, I. Lundström
Reversible and Specific Interaction of Dehydrogenases with a Coenzyme-Coated Surface Continuously Monitored with a Reflectometer
Anal Biochem. **157** (1986) 283-288.
- [56] P. Lichter, C.C. Tang, K. Call, G. Hermanson, G.A. Evans, D. Housman, D.C. Ward
High-Resolution Mapping of Human Chromosome 11 by in Situ Hybridization with Cosmid Clones
Science **247** (1990) 64-69.
- [57] E. Maier, H.R. Crollius, H. Lehrach
Hybridization techniques on gridded high density DNA and *in situ* colony filters based on fluorescence detection
Nucleic Acids Res. **22** (1994) 3423-3424.
- [58] T.T. Nikiforov, R.B. Rendle, P. Goelet, Y.-H. Rogers, M.L. Kotewicz, S. Anderson, G.L. Trainor, M.R. Knapp
Genetic Bit Analysis: a solid phase method for typing single nucleotide polymorphisms
Nucleic Acids Res. **22** (1994) 4167-4175.
- [59] E. Jablonski, E.W. Moomaw, R.H. Tullis, J.L. Ruth
Preparation of oligodeoxynucleotide-alkaline phosphatase conjugates and their use as hybridization probes
Nucleic Acids Res. **14** (1986) 6115-6128.
- [60] J. Mackey, N. Guan, A. Rashtchian
Direct Enzyme Coupling to oligonucleotide probes for increased sensitivity and simplified nonradioactive detection
Focus **14** 112-116.
- [61] H.J. Höltnke, W. Ankenbauer, K. Mühleneegger, R. rein, G. Sagner, R. Seibl, T. Walter
The Digoxigenin (DIG) System for non-radioactive labelling and detection of nucleic acids-an overview
Cell. Mol. Biol. **41** (1995) 883-905.
- [62] M.J. O'Donnell, K. Tang, H. Köster, C.L. Smith, C.R. Cantor
High Density, Covalent Attachment of DNA to Silicon Wafers for Analysis by MALDI-TOF Mass Spectrometry
Anal. Chem. **69** (1997) 2438-2443.

- [63] K. Tang, D.J. Fu, S. Kötter, R.J. Cotter, C.R. Cantor, H. Köster
Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of immobilized duplex DNA probes
Nucleic Acids Res. **23** (1995) 3126-3131.
- [64] C. Jurinke, D. van den Boom, A. Jacob, K. Tang, R. Wörl, H. Köster
Analysis of Ligase Chain Reaction Products via Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight-Mass Spectrometry
Anal. Biochem. **237** (1996) 174-181.
- [65] H. Köster, K. Tang, D.J. Fu, A. Braun, D. Van den Boom, C.L. Smith, R.J. Cotter, C.R. Cantor
A strategy for rapid and efficient DNA sequencing by mass spectrometry
Nature Biotechnol. **14** (1996) 1123-1128.
- [66] A. Braun, D.P. Little, H. Köster
Detecting CFTR gene mutations using primer oligo base extension and mass spectrometry
Clin. Chem. **43** (1997) 1151-1158.
- [67] C. Jurinke, B. Zöllner, H.-H. Feucht, A. Jacob, J. Kirchhübel, A. Lüchow, D. van den Boom, R. Laufs, H. Köster
Detection of Hepatitis B Virus DNA in Serum Samples via Nested PCR and MALDI-TOF Mass Spectrometry
Genet. Anal. **13** (1996) 67-71.
- [68] J. DeRisi, L. Penland, P.O. Brown, M.L. Bittner, P.S. Meltzer, M. Ray, Y. Chen, Y.A. Su, J.M. Trent
Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer
Nature Genetics **14** (1996) 457-460.
- [69] D.J. Lockhart, H. Dong, M.C. Byrne, M.T. Follettie, M.V. Gallo, M.S. Chee, M. Mittmann, C. Wang, M. Kobayashi, H. Horton, E.L. Brown
Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays
Nature Biotech. **14** (1996) 1675-1680.
- [70] M. Schena, D. Shalon, R.W. Davis, P.O. Brown
Quantitative Monitoring of Gene Expression Patterns with a Complementary DNA Microarray
Science **270** (1995) 467-470.
- [71] J. Cheng, L.J. Kricka, E.L. Sheldon, P. Wilding
Sample Preparation In Microstructured Devices
Microsystem Technology In Chemistry And Life Science
Top. Curr. Chem. **194** (1998) 215-231.
- [72] W. Ehrfeld, V. Hessel, H. Lehr
Microreactors for Chemical Synthesis and Biotechnology-Current Developments and Future Applications
Microsystem Technology In Chemistry And Life Science
Top. Curr. Chem. **194** (1998) 233-252.

- [73] M. Köhler
Zwischen Molekül und Elektronik
BioTec **3** (1999) 38-40.
- [74] A.T Woolley, K. Lao, A.N. Glazer, R.A. Mathies
Capillary Electrophoresis Chips with Integrated Electrochemical Detection
Anal. Chem. **70** (1998) 684-688.
- [75] A.T. Woolley, D. Hadley, P. Landre, A.J. de Mello, R.A. Mathies, M.A. Northrup
Functional integration of PCR Amplification and Capillary Electrophoresis in a Microfabricated DNA Analysis Device.
Anal. Chem. **68** (1996) 4081-4086.
- [76] H. Zorbas
Miniatur-Durchfluß-PCR: ein Durchbruch?
Angew. Chem. **111** (1999) 1121-1124.
- [77] C.S. Effenhauser
Integrated Chip-Based Microcolumn Separation Systems
Microsystem Technology In Chemistry And Life Science
Top. Curr. Chem. **194** (1998) 51-82.
- [78] S. Shoji
Microsystem Technology In Chemistry And Life Science
Top. Curr. Chem. **194** (1998) 163-188.
- [79] A. van den Berg, T. Lammerink
Micro Total Analysis Systems: Microfluidic Aspects, Integration Concept and Applications
Microsystem Technology In Chemistry And Life Science
Top. Curr. Chem. **194** (1998) 21-49.
- [80] S. Ekström, P. Önerfjord, J.Drott, M. Bengtsson, G. Marco-Varga, J. Nilsson, T. Laurell
A Micromachined Analysis System For Rapid Protein Identification
3rd International Conference on Microreaction Technology 1999 Book of abstracts
- [81] S. Dubiley, E. Kirillov, A. Mirzabekov
Polymorphism analysis and gene detection by minisequencing on an array of immobilized primers
Nucleic Acids Res. **27** (1999) e19
- [82] R.E Majors, M.J. Hopper
Studies of Siloxane Phases Bonded to Silica Gel for Use in High Performance Liquid Chromatography
J. Chrom. Sci. **12** (1974) 767-778.
- [83] J.S. Fritz J.N. King
Removal of Copper and Iron Prior to Water Hardness Titration
Anal. Chem. **48** (1976) 570-572.

- [84] P. Tundo, P. Venturello
Synthesis, Catalytic Activity, and Behavior of Phase-Transfer Catalysts Supported on Silica gel. Strong Influence of Substrate Adsorption on the Polar Polymeric Matrix on the Efficiency of the Immobilized Phosphonium salts
J. Am. Chem. Soc. **101** (1979) 6606-6613.
- [85] A.J. Alpert
Ph.D. Dissertation, Purdue University, W. Lafayette, IN. 47907
- [86] B.F. Gisin
The monitoring of reactions in solid-phase peptide synthesis with picric acid
Anal. Chem. Acta **58** (1972) 248-249.
- [87] V. Amarnath, A.D. Broom
Chemical Synthesis of Oligonucleotides
Chem.Rev. **77** (1977) 183-217.
- [88] V. Kohli, H. Blocker, H. Köster
The Triphenyl (Trityl) Group and Its Use in Nucleotide Chemistry
Tetrahedron Lett. **21** (1980) 2683-2684.
- [89] R.K. Gaur, K.C. Gupta
A Spectrophotometric Method for the Estimation of Amino Groups on Polymer Supports
Anal. Biochem. **180** (1989) 253-258.
- [90] Pierce Chemical Company USA
Sulfo-SDTB Instructions 28610 (1995)
- [91] F. Sanger
The Free Amino groups of Insuline
Biochem. J. **39** (1945) 507.
- [92] K. Satake, T. Okuyama, M. Ohashi, T. Shinoda
The Spectrometric Determination of Amine, Amino Acid and Peptide with 2,4,6-Trinitrobenzene 1-sulfonic Acid
J. Biochem. **47** (1960) 654-660.
- [93] T. Okuyama, K. Satake
On the Preparation and Properties of 2,4,6-Trinitrophenyl-Amino Acids and -Peptides
J. Biochem. **47** (1960) 454-466.
- [94] W.A. Bubnis, C.M. Ofner III
The determination of ϵ -Amino groups in Soluble and Poorly Soluble Proteinaceous Materials by a Spectrophotometric Method Using Trinitrobenzenesulfonic Acid
Anal. Biochem. **207** (1992) 129-133.
- [95] G. Antoni, R. Presetini, P. Neri
A Simple Method for the Estimation of Amino Groups on Insoluble Matrix Beads
Anal. Biochem. **129** (1983) 60-63.

- [96] W.S. Hancock, J.E. Battersby
A New Micro-Test for the Detection of Incomplete Coupling Reactions in Solid-Phase Peptide Synthesis Using 2,4,6-Trinitrobenzenesulphonic Acid
Anal. Biochem. **71** (1976) 260-264.
- [97] R.B. Freedman, G.K. Radda
The Reaction of 2,4,6-Trinitrobenzenesulphonic Acid with Amino Acids, Peptides and Proteins
Biochem. J. **108** (1968) 383-391.
- [98] A.R. Goldfarb
Heterogeneity of Amino Groups in Proteins. I. Human Serum Albumin
Biochem. **5** (1966) 2574-2578.
- [99] A.R. Goldfarb
A Kinetic Study of the Reactions of Amino Acids and Peptides with Trinitrobenzenesulfonic Acid
Biochem. **5** (1966) 2570-2574.
- [100] R. Fields
The Measurement of Amino Groups in Proteins and Peptides
Biochem. J. **124** (1971) 581-590.
- [101] A.P.H. Phan, T.T. Ngo, H.M. Lenhoff
Spectrophotometric Assay for Lysine Decarboxylase
Anal. Biochem. **120** (1982) 193-197.
- [102] R. Fields
The Rapid Determination of Amino Groups with TNBS
Methods Enzym. **25** (1972) 464-468.
- [103] S. Takahashi, T. Yamamura, M. Kamo, K. Satake
Regeneration of Amino Compounds from the 2,4,6-Trinitrophenyl Derivatives by Treatment with Hydrazine
Chem. Let. (1984) 127-130.
- [104] S. Siggia, J.G. Hanna
Quantitative Organic Analysis Via Functional Groups
3rd ed. Wiley and Sons, Inc. New York, London 1963, 432-433.
- [105] H. Frey, K. Lorenz, C. Lach
Dendrimere-von der Ästhetik zur Anwendung?
Chem. in unserer Zeit **30** (1996) 75-85.
- [106] D.A. Tomalia, H. Baker, J. Dewald, M. Hall, G. Kallos, S. Martin, J. Roeck, J. Ryder, P. Smith
Dendritic Macromolecules: Synthesis of Starburst Dendrimers
Macromolecules **19** (1986) 2466-2468.

- [107] D. A. Tomalia, A.M. Naylor, W.A. Goddard III
Starburst-Dendrimere: Kontrolle von Größe, Gestalt, Oberflächenchemie, Topologie und Flexibilität beim Übergang von Atomen zu makroskopischer Materie
Angew. Chem. **102** (1990) 119-238.
- [108] J. Issberner, R. Moors, F. Vögtle
Dendrimere: von Generationen zu Funktionalität und Funktionen
Angew. Chem. **106** (1994) 2507-2514.
- [109] A.D. Meltzer, D.A. Tirrell, A.A. Jones, P.T. Inglefield, D.M. Hedstrand, D.A. Tomalia
Chain Dynamics in Poly(amido amine) Dendrimers. A Study of ¹³C-NMR Relaxation Parameters
Macromolecules **25** (1992) 4541-4548.
- [110] S.L. Beaucage, R.P. Iyer
Advances in the Synthesis of Oligonucleotides by the Phosphoramidite Approach
Tetrahedron **48** (1992) 2223-2311.
- [111] P.R. Ashton, S.E. Boyd, C.L. Brown, N. Jayaraman, J.F. Stoddart
Konvergente Synthese von Dendrimeren mit Kohlenhydrat-Einheiten
Angew. Chem. **109** (1997) 756-759.
- [112] U. Haker
Synthese eines trifunktionellen Linkers für die Festphasensynthese von Oligonukleotiden
Diplomarbeit Universität Hamburg 1996
- [113] A. Loria, E.T. Pesch,
U.S. 2,721,798, Oct. 25, 1955
- [114] M.H. Caruthers, H.G. Gassen, A. Lang (ed.)
Chemical and Enzymatic Synthesis of Gene Fragments
Verlag Chemie Weinheim 1982, 71-79.
- [115] M.S. Shchepinov, I.A. Udalova, A.J. Bridgman, E.M. Southern
Oligonucleotide dendrimers: Synthesis and Use as Polylabelled DNA Probes
Nucleic Acids Res. **25** (1997) 4447-4454.
- [116] F. Seela, K. Kaiser
Oligodeoxyribonucleotides containing 1,3-propanediol as nucleoside substitute
Nucleic Acids Res. **15** (1987) 3115-3129.
- [117] R.B. Merrifield
Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide
J. Am. Chem. Soc. **85** (1963) 2149-2154.
- [118] E. Atherton, R.C. Sheppard
Solid Phase Peptide Synthesis
IRL Press, Oxford University Press 1989

- [119] H.-D. Jakube
Aminosäuren, Peptide, Proteine
Verlag Chemie, Weinheim 1982, 167-179.
- [120] Y.S. Klausner, M. Bodansky
Coupling Reagents in Peptide Synthesis
Synthesis **453** (1972) 453-463.
- [121] G.W. Anderson, A.C. Mc Gregor
t-Butyloxycarbonylamino Acids and Their Use in Peptide Synthesis
J. Am. Chem. Soc. **79** (1975) 6180-6183.
- [122] Y. Wolman, D. Ladkany, M. Frankel
Synthesis of Activated Esters of N-Protected Amino-Acids
J. Chem. Soc. **8** (1967) 689-690.
- [123] A. Collioud, J-F. Clémence, M. Sängler, H. Sigrist
Oriented and Covalent Immobilization of Target Molecules to Solid Supports:
Synthesis and Application of a Light-Activatable and Thiol-Reactive Cross-Linking
Reagent
Bioconjugate Chem. **4** (1993) 528-536.
- [124] L.A. Chrisey, G.U. Lee, C.E. O'Ferrall
Covalent attachment of synthetic DNA to self-assembled monolayer films
Nucleic Acids Res. **24** (1996) 3031-3039.
- [125] P. Edman
Method for Determination of the Amino Acid Sequence in Peptides
Acta Chem. Scand. **4** (1950) 283.
- [126] R.A. Laursen
Immobilized Enzymes, Antigens, Antibodies and Peptides
(H.H. Weetall, ed.) Dekker, New York, 1975, 567.
- [127] R.A. Laursen, A.G. Bonner, M.J. Horn
Instrumentation in Aminoacid Sequence Analysis
(R.N. Perham, ed.) Academic Press, New York, 1975, 73.
- [128] W. Machleidt, E. Wachter
New Supports in Solid-Phase Sequencing
Methods Enzymol. **47** (1977) 263-277.
- [129] R.A. Laursen
Coupling Techniques in Solid-Phase Sequencing
Methods Enzymol. **47** (1977) 277-288.
- [130] A. Previero
Alternative Reagents in Sequential Degradation on Solid-Phase Supports
Methods Enzymol. **47** (1977) 289-299.

- [131] D.A. Powers
Solid-Phase Sequencing in Spinning-Cup Sequenators
Methods Enzymol. **47** (1977) 299-320.
- [132] US Patent 5,011,861
- [133] R. H. Aebersold, D.B. Teplow, L.E. Hood, S.B.H. Kent
Electroblotting onto Activated Glass
J. Biol. Chem. **261** (1986) 4229-4238.
- [134] E. Wachter, W. Machleidt, H. Hofner, J. Otto
Aminopropyl Glass and Its p-Phenylene Diisothiocyanate Derivative, a New Support in Solid-Phase Edman Degradation of Peptides and Proteins
FEBS Letters **35** (1973) 97-102.
- [135] J. Bridgen
Solid Phase Sequencing: a New Support for the High Sensitivity Degradation of Peptides and Proteins
FEBS Letters **50** (1975) 159-162.
- [136] D. Chen, Z. Yan, D.L. Cole, G.S. Srivatsa
Analysis of internal (n-1)mer deletion sequences in synthetic oligodeoxyribonucleotides by hybridization to an immobilized probe array
Nucleic Acids Res. **27** (1999) 389-395.
- [137] D.P. Little, T.J. Cornish, M.J. O'Donnell, A. Braun, R.J. Cotter, H. Köster
MALDI on a Chip: Analysis of Arrays Low-femtomole to Subfemtomole Quantities of Synthetic Oligonucleotides and DNA Diagnostic products Dispensed by Piezoelectric Pipet
Anal. Chem. **69** (1997) 4540-4546.
- [138] D.P. Little, A. Braun, B. Darnhofer-Demar, H. Köster
Identification of apolipoprotein E polymorphisms using temperature cycled primer oligo base extension and mass spectrometry
Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. **35** (1997) 545-548.
- [139] D.P. Little, A. Braun, B. Darnhofer-Demar, A. Frilling, Y. Li, R.T.Jr. McIver, H. Köster
Detection of RET proto-oncogene codon 635 mutations using mass spectrometry
J. Mol. Med. **75** (1997) 745-750.
- [140] F. Sanger, S. Nicklen, A.R. Coulson
DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors
Proc. Natl. Acad. Sci. **74** (1977) 560-564.
- [141] F. Sanger
Sequences, sequences and sequences
Annu. Rev. Biochem. **57** (1988) 1-28.

- [142] A.J.H. Smith
DNA sequence analysis by primed synthesis
Methods. Enzymol. **65** (1980) 560-580.
- [143] E. Southern, K. Mir, M. Shchepinov
Molecular interactions on microarrays
Nature Genet. **21** (1999) 5-9.
- [144] T.S. Widlanski, W. Taylor
Chemistry and Enzymology of Phosphatases
D. Barton, K. Nakanishi (eds.)
Comprehensive Natural Products Chemistry
Vol. 5 Elsevier 1999, 139-162.
- [145] N.N. Zueva, P.G. Dalev, D.L. Lazarova
Properties, production and practical uses of alkaline phosphatase
Biokhimiya **58** (1993) 1009-1023.
- [146] M.J. Maunder
Alkaline Phosphatase
M.M. Burrell (ed.),
Methods in Molecular Biology, Humana Press Inc., Totowa **16** (1993) 331-341.
- [147] T.T. Simopoulos, W.P. Jencks
Alkaline Phosphatase Is an Almost Perfect Enzyme
Biochem. **33** (1994) 10375-10380.
- [148] A. Dzgoev, M. Mecklenburg, P.-O. Larsson, B. Danielsson
Microformat Imaging ELISA for Pesticide Determination
Anal. Chem. **68** (1996) 3364-3369.
- [149] D.N. Posnett, H. McGrath, J.P. Tam
A Novel Method for Producing Anti-peptide Antibodies
J. Biol. Chem. **263** (1988) 1719-1725.
- [150] J.C. Edman, M. E. Evans-Holm, J.E. Marich, J.L. Ruth
Rapid DNA fingerprinting using alkaline phosphatase-conjugated oligonucleotides
Nucleic Acids Res. **16** (1988) 6235.
- [151] J.K. Ishii, S.S. Ghosh
Bead-Based Sandwich Hybridization Characteristics of Oligonucleotide-Alkaline Phosphatase Conjugates and Their Potential for Quantitating Target RNA Sequences
Bioconjugate Chem. **4** (1993) 34-41.
- [152] R.A. Reyes, G.L. Cockerell
Preparation of pure oligonucleotide-alkaline phosphatase conjugates
Nucleic Acids Res. **21** (1993) 5532-5533.
- [153] J.M. Sowadski, M.D. Handschumacher, H.M.K. Murthy, B.A. Foster, H.W. Wyckoff
Refined structure of alkaline phosphatase from *Escherichia coli* at 2.8 Å resolution
J. Mol. Biol. **186** (1985) 417-433.

-
- [154] H.W. Wyckoff
Am. Soc. Microbiol. (1987) 118
- [155] J.E. Murphy, E.R. Kantrowitz
Why are mammalian alkaline phosphatases much more active than bacterial alkaline phosphatases?
Molecular Microbiology **12** (1994) 351-357.
- [156] D.K. Agrawal, B.L. Wanner
A *phoA* structural gene mutation that conditionally affects formation of the enzyme bacterial alkaline phosphatase
J. Bacteriol. **172** (1990) 3180-3190.
- [157] J.E. Coleman
Structure and mechanism of alkaline phosphatase
Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struc. **21** (1992) 441-483.
- [158] C.M.L. Janeway, X. Xu, J.E. Murphy, A. Chaidaroglou, E.R. Kantrowitz
Magnesium in the active site of *Escherichia coli* alkaline phosphatase is important for both structural stabilization and catalysis
Biochem. **32** (1993) 1601-1609.
- [159] S. Feyerabend
Darstellung von Konjugaten aus hexahistidinmodifizierter Bakterieller Alkalischer Phosphatase und NTA-funktionalisierten Oligonucleotiden
Dissertation Universität Hamburg 1999
- [160] P.N. Hengen
Purification of His-Tag fusion proteins from *Escherichia coli*
Trends Biochem. Sci. **20** (1995) 285-286.
- [161] J. Porath
Immobilized metal ion affinity chromatography
Protein Expression Purif. **3** (1992) 263-281.
- [162] E. Hochuli, H. Döbeli, A. Schacher
New metal chelat adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues
J. Chromatogr. **411** (1987) 177-184.
- [163] E.Hochuli
Purification of recombinant proteins with metal chelat adsorbent
Genetic Engineering **12** (1990) 87-98, Plenum Press, New York.
- [164] The QIAexpressionist Qiagen (1992) 36-46.
- [165] E. Amann, J. Brosius, M. Ptashne
Vectors bearing a hybrid *trp-lac* promoter useful for regulated expression of cloned genes in *Escherichia coli*
Gene **25** (1983) 167-178.
- [166] *U.S. Patent No. 4839295*

- [167] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall
Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent
J. Biol. Chem. **193** (1951) 265-275.
- [168] P.K. Smith, R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson, D.C. Klenk
Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid
Anal. Biochem. **150** (1985) 76-85.
- [169] K. Wiechelman, R. Braun, J. Fitzpatrick
Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of groups responsible for colour formation
Anal. Biochem. **175** (1988) 231-237.
- [170] E. Mössner, M. Boll, G. Pfeleiderer
Purification of human and bovine alkaline phosphatases by affinity chromatography
Z. Physiol. Chem. **361** (1980) 543-549.
- [171] O.A. Bessey, O.H. Lowry, M.J. Brock
A Method for the rapid determination of Alkaline Phosphatase with five cubic millimeters of serum
J. Biol. Chem. **164** (1946) 321-329.
- [172] H.-D. Gräf
Immobilisierte Enzyme
Pharmazie i. u. Zeit **2** (1977) 43-48.
- [173] H.-P. Kleber, D. Schlee, W. Schöpp
Biochemisches Praktikum: Methoden für Studium, Praxis, Forschung
Gustav Fischer Verlag, Jena, 5. Aufl. (1997) 242-250.
- [174] H.H. Weetall
Trägergebundene Enzyme und ihre Anwendung in der Nahrungsmittel- und Getränkeindustrie
Chemiker Zeitung **11** (1973) 611-619.
- [175] J. Ronnenberg, B. Preitz, G. Wöstemeier, S. Diekmann
Immobilized residue-specific endoproteinases for protein sequencing
J. Chromatography **656** (1994) 169-177.
- [176] R. Epton, B.L. Hibbert, T.H. Thomas
Enzymes Covalently Bound to Polyacrylic and Polymethacrylic Copolymers
Methods Enzymol. **44** (1976) 84-107.
- [177] J. Turková
Immobilization of Enzymes on Hydroxyalkyl Methacrylate Gels
Methods Enzymol. **44** (1976) 66-83.
- [178] S.A. Barker, S.H. Doss, C.J. Gray, J.F. Kennedy, M. Stacey, T.H. Yeo
 β -D-Glucosidase Chemically Bound to Microcrystalline Cellulose
Carbohydrate Res. **20** (1971) 1-7.

- [179] H.-G. Hong, P.W. Bohn, S.G. Sligar
Optical Determination of Surface Density in Oriented Metalloprotein Nanostructures
Anal. Chem. **65** (1993) 1635-1638.
- [180] D. Janasek, U. Spohn
Poröses Glas als Enzymträger
Bioforum **3** (1998) 108-109.
- [181] P. Wittlich
Neue Verfahren für den Einschluß von Biokatalysatoren
BioTec **2** (1999) 48-49.
- [182] I. Willner, E. Katz, A. Riklin, R. Kasher
Mediated Electron Transfer in Glutathion Reductase Organized in Self-Assembled Monolayers on Au Electrodes
J. Am. Chem. Soc. **114** (1992) 10965-10966.
- [183] H. Ibelgaufts
Gentechnologie von A bis Z
VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim 1. Aufl. (1993) 20-21.
- [184] J. Oberbäumer
New pUC-derived expression vectors for rapid construction of cDNA libraries
Gene **49** (1986) 81-91.
- [185] B. Vogelstein, D. Gillespie
Preparative and analytical purification of DNA from agarose
Proc. Natl. Acad. Sci. **76** (1979) 615-619.
- [186] W. J. Dower, J. F. Miller, C.W. Ragsdale
High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation
Nucleic Acids Res. **16** (1988) 6127-6145.
- [187] A. Ruppert
Stammsammlung des Arbeitskreises
- [188] M.S. Shchepinov, S.C. Case-Green, E.M. Southern
Steric factors influencing hybridisation of nucleic acids to oligonucleotide arrays
Nucleic Acids Res. **25** (1997) 1155-1161.
- [189] S.K. Vishwanath, C.R. Watson, W. Huang, L.G. Bachas, D. Bhattacharyya
Kinetic Studies of Site-Specifically and Randomly Immobilized Alkaline Phosphatase on Functionalized Membranes
J. Chem. Tech. Biotech. **68** (1997) 294-302.
- [190] W. Huang, J. Wang, D. Bhattacharyya, L.G. Bachas
Improving the Activity of Immobilized Subtilisin by Site-Specific Attachment to Surfaces
Anal. Chem. **69** (1997) 4601-4607.

- [191] J. Sambrook, E. Fritsch, T. Maniatis
Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Press, 2. Aufl. 1989, 6.3ff
- [192] H. C. Birnboim, J. Doly
A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA
Nucleic Acids Res. **7** (1979) 1513-1523.
- [193] D. Ish-Horowicz, J. F. Burke
Rapid and efficient cosmid cloning
Nucleic Acids Res. **9** (1981) 2989-2998.

Danksagungen

Herrn Prof. Dr. H. Köster danke ich für die freundliche Überlassung des interessanten Themas, seine motivierende Unterstützung und sein stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Allen Mitgliedern des Arbeitskreises sei für die freundschaftliche Atmosphäre und ihre Hilfsbereitschaft gedankt.

Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Dr. Ralf Wörl; Herrn Dr. Andreas Ruppert für die Vermittlung der Einblicke in molekularbiologische Zusammenhänge; Herrn Dr. Christian Jurinke, Herrn Dr. Dirk van den Boom; Frau Dipl. Chem. Verena Collazo und Frau Dipl. Chem. Silke Atrott für ihre Solidarität in den Zeiten des „Arbeitsdreiecks“; Frau Dipl. Chem. Claudia Matthies, Herrn Dr. Sven Feyerabend für die Bereitstellung des Expressionssystems für die rekombinante BAPHis6, Frau Beata Szalay für die Unterstützung während der molekularbiologischen Experimente sowie Herrn Dipl. Chem Torsten Kähler, unserem „SP“.

Einigen „Ehemaligen“ danke ich für die freundliche Überlassung von Altlasten.

Herrn Dipl. Chem. Holger Bammert und Dr. Carsten Siegert sei für das gründliche und kritische Korrekturlesen dieser Arbeit gedankt.

Meiner Mutter und meinem Bruder möchte ich für die fortwährende Unterstützung während des gesamten Studiums sowie der Promotion danken.

Hiermit erkläre ich, Ute Haker, diese Arbeit selbständig angefertigt und keine weiteren als die genannten Hilfsmittel verwendet zu haben. Andere Promotionsversuche als die hier vorliegende Arbeit mit dem Titel „Modifizierung von Silizium-Oberflächen zur Immobilisierung von Biomolekülen“ habe ich bisher nicht unternommen.

Hamburg März 2000

Ute Haker