

## 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 ( $29 \text{ pmol/mm}^2$ ) im Vergleich mit einer Oberfläche, an der einfache, analoge Kondensationsreaktionen (Oberfläche **B**,  $12 \text{ pmol/mm}^2$ ) vorgenommen wurden, führt. Eine weitere Oberflächenmodifikation unter Verwendung des trifunktionellen Linkers und des Amidits (Oberfläche **E**) lieferte eine Beladungsdichte von  $43 \text{ pmol/mm}^2$ , was einer Steigerung um den Faktor 3.6 entspricht. Mit der Einführung von Polylysin (Oberfläche **F**) wurde eine Beladungsdichte von  $100 \text{ pmol/mm}^2$  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/mm<sup>2</sup> (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 mm<sup>2</sup> (increasing factor 3.6). Immobilization of polylysine (surface **F**) led to an enhanced density of 100 pmol/mm<sup>2</sup>.

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.