

**Darstellung einzelsträngiger
DNA-Polymeraseprodukte über eine kovalente
Membrananbindung und deren enzymatische
Umsetzungen**

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Chemie
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Frank Barnekow
aus Bad Schwartau

HAMBURG
1 9 9 8

1. Gutachter: Prof. Dr. H. Köster

2. Gutachter: Prof. Dr. J. Voß

Tag der letzten Prüfung: 25. September 1998

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom November 1992 bis Dezember 1997 am Insitut für Biochemie und Molekularbiologie der Universität Hamburg durchgeführt. Die rasterelektronische Aufnahme der Biodyne C Membran wurde im Institut für Festkörperphysik in der KFA Jülich aufgenommen.

Diese Arbeit wurde mit dem Satzprogramm $\text{\LaTeX}2_{\epsilon}$ gesetzt. Dabei wurde das Makropaket $\text{\X}\text{\LaTeX}$ von Shinsaku Fujita für die Erstellung der Strukturformeln verwendet. Die Zeichnungen im EPS-Format erfolgten mit `xfig 3.2`. Für die Formatierung wurde das KOMA-Skript von Frank Neukam und Markus Kohm eingesetzt. Die Mikrotypographie erfolgte nach dem Artikel "Mikrotypographie-Regeln" von Marion Neubauer. Die Visualisierung und Bearbeitung der Meßergebnisse erfolgte mit `\Xmgr v3.01p17` von ACE/gr und `gnuplot 3.5` von Thomas Williams. Die Regressionen wurden mit dem `gnuplot`-Plugin `gnufit` von Carsten Grammes durchgeführt. Die Molekülmassen der einzelnen Verbindungen wurden mit dem Programm `cactvs` von Wolf-D. Ihlenfeldt berechnet. Die graphische Bildbearbeitung und Konvertierung von Bitmaps in *encapsulated Postscript*-Dateien erfolgte mit `ImageMagick` von John Christy. Für Programmierarbeiten wurden die Interpreter der Sprachen GNU `awk 3.0.3`, PERL 5.004 und Tcl/Tk in den Versionen 7.6p2 bzw. 4.2p2 verwendet. Als Compiler der Programmiersprache C diente `gcc 2.7.2.1`. Alle oben angeführten Programme und Pakete sind frei im Internet erhältlich.

Als Betriebssystem diente S.u.S.E. Linux 5.0 (Reg.: F73SKZ) mit OSF Motif 2.0.1 von MetroLink.

Herrn Prof. Dr. Hubert Köster danke ich herzlich für die Überlassung des Themas, wertvolle Diskussionen und Anregungen sowie freundschaftliche Beratung. Außerdem danke ich den Mitarbeitern des Arbeitskreises für ihre Hilfsbereitschaft.

1. Abkürzungsverzeichnis

abs.	absolut
A	Absorption
A	Ampere
A	Adenin
A ₆₀	Amplikon, 60 b lang
Abb.	Abbildung
AH	Aminohexyl
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
A.U.	<i>Absorption units</i> (Absorptionseinheiten)
b	Base(n)
bp	Basenpaar(e)
bu	Butyl
bzl	Benzoyl
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
c	centi
C	Cytosin
CPG	<i>Controlled pore glass</i> (Glas mit definierten Poren)
COSY	<i>Correlated Spectroscopy</i>
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-5'-triphosphat
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat
dNTP	Desoxyribonucleosid-5'-triphosphat
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat
dUTP	Desoxyuridin-5'-triphosphat
Da	Dalton
DE	<i>Delayed ion extraction</i> (Verzögerte Ionenextraktion)
DCA	Dichloressigsäure
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DHU	<i>Dicyclohexylurea</i> (Dicyclohexylharnstoff)
DIG	Digoxigenin
DITC	1,4-Phenylendiisothiocyanat

DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMT	4,4'-Dimethoxytrityl
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonucleinsäure)
DTE	Dithioerythriol
DTT	Dithiothreitol
ε	Extinktionskoeffizient
EDC	Ethyl-(dimethylaminopropyl)-carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
f	femto
Fa.	Firma
g	Gramm
G	Guanosin
HPA	<i>3-Hydroxypicolinic acid</i> (3-Hydroxypicolinsäure)
HPLC	<i>High pressure liquid chromatography</i> (Hochdruckflüssigkeitschromatographie)
<i>i</i> -	<i>iso</i> -
IEX	<i>Ion exchange</i> (Ionenaustausch)
IR	Infrarot
<i>k</i>	Geschwindigkeitskonstante
k	kilo
λ	Lambda
l	Liter
log	Logarithmus
μ	mikro
M	molar
<i>m</i> -	<i>meta</i> -
m	Meter
m	milli
min	Minute
<i>M</i>	Molmasse
MALDI-TOF	<i>Matrix assisted laser desorption ionisation - time of flight</i> (matrixunterstützte Laserdesorptions/ionisations-Flugzeit)
MS	Massenspektrometrie
<i>n</i>	Anzahl
n	nano
NBT	<i>Nitroblue, tetrazolium salt</i>
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NMR	<i>Nucleic magnetic resonance</i> (Kernresonanz)
OPC	OligoPak TM -Cardridge
<i>p</i> -	<i>para</i> -

p	piko
ppm	<i>Parts per million</i> (Anteile pro Millionen)
P ₂₇	<i>fill-in</i> -Produkt, 27 b lang
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
POE	Polyoxyethylen
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RF	replikative Form
RP	<i>reversed phase</i> (Umkehrphase)
RP-(60)	reverser <i>Primer</i> , 17 b lang
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonucleinsäure)
RSP	<i>reverse sequencing primer</i>
sec	Sekunde
<i>sym.</i>	symmetrisch
SDS	<i>Dodecyl sulfate, sodium salt</i>
SSPE	<i>Sodium chloride – Sodium phosphate-EDTA buffer</i>
SVPDE	<i>Snake venome phosphodiesterase</i>
<i>t</i>	<i>Time</i> (Zeit)
<i>t</i> _{1/2}	Halbwertszeit
T ₅₀	<i>Template</i> , 50 b lang
<i>T_m</i>	Schmelzpunkt
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TAE	Tris/Acetat/EDTA
TBE	Tris/Borat/EDTA
TBS	Tris <i>buffered saline</i>
TE	Tris/EDTA
TEA	Triethylamin
TEAAc	Triethylammoniumacetat
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin
TFA	<i>Trifluoroacetic acid</i> (Trifluoressigsäure)
THF	Tetrahydrofuran
TMS	Tetramethylsilan
U	Umdrehungen
U	<i>Unit</i> (Einheit)
USP	<i>universal sequencing primer</i>
UTP	Uridin-5'-triphosphat
UV	Ultraviolett
VIS	Visuell
V	Volt
X-Phosphat	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat

Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungsverzeichnis	i
I. Einleitung	1
2. Einführung	2
3. Problemstellung	5
II. Allgemeiner Teil	7
4. Die organisch-chemischen Synthesen	8
4.1. Die carboxysubstituierten Trityl Verbindungen	8
4.1.1. Synthese der meta-Verbindungen	9
4.1.2. Synthese der para-Verbindungen	14
4.2. Die Spacer Moleküle	22
4.2.1. 1,6-Diaminohexan	22
4.2.2. Polyoxyethylendiamine	23
4.3. Sonstige Verbindungen	23
4.3.1. Tritylierung von Thymidin	23
4.3.2. para-Nitrophenyliodacetat	25
4.3.3. Cysteaminyl-3-[bis-(4-methoxyphenyl)]-thymidinylmethylbenzoat .	25
5. Die Desoxyribonucleinsäuren	28
5.1. Die Oligonucleotide	28
5.1.1. Die Synthese der Oligonucleotide	29
5.1.2. Die Sequenzen	32
5.1.3. Die Retritylierungen	37
5.1.4. Aminolysen der aktivierten Ester	40
5.1.5. Abspaltung, Entschützung und Aufreinigung der Oligonucleotide .	43
5.1.6. Charakterisierung der Oligonucleotide	44
5.2. Die Vektoren	48
5.2.1. λ -DNA	49
5.2.2. M13mp18	49
5.2.3. pUC19	49

6. Die Membrane	53
6.1. Die Biodyne C Membrane	53
6.1.1. Die Silent Monitor Plates des EVENT 4160-Systems	54
6.1.2. Aktivierung mit para-Nitrophenol	55
6.1.3. Aktivierung mit EDC	61
6.1.4. Anbindungsexperimente	61
6.1.5. Vergleich der Biodyne C Membrane mit den Silent Monitor Plates	69
6.1.6. Ergebnisse der Anbindungsexperimente	70
6.2. Die PVDF Membrane	70
6.2.1. Aktivierung mit DITC	71
6.2.2. Anbindungsexperimente	72
7. Die enzymatischen Umsetzungen	73
7.1. Die Enzyme	75
7.1.1. Die Polymerasen	75
7.1.2. Die Restriktionsenzyme	77
7.1.3. Die Phosphodiesterase	78
7.2. Polymeraseexperimente mit membrangebundenen Oligonucleotiden	79
7.2.1. Hybridisierungsexperimente	79
7.2.2. Fill-In Experimente	80
7.2.3. PCR-Versuche	84
7.3. Polymeraseexperimente mit derivatisierten Oligonucleotiden in Lösung	85
7.3.1. Versuche mit dem Klenow-Fragment und der Kornberg-Polymerase	85
7.3.2. PCR-Versuche	86
7.3.3. Fill-In-Experimente mit der Tth-DNA-Polymerase	89
7.4. Experimente mit Restriktionsenzymen	91
7.5. Phosphodiesteraseexperimente	94
III. Zusammenfassung	95
IV. Diskussion	103
V. Experimenteller Teil	109
8. Methodischer Teil	110
8.1. Allgemeines	110
8.2. Die verwendeten Materialien	111
8.2.1. Puffer und Lösungen	111
8.2.2. Nucleinsäuren	115
8.2.3. Enzyme und ihre Puffer	115
8.2.4. Chemikalien	118

8.3.	Die präparative Plattenchromatographie	118
8.4.	Die Aufreinigung von Oligonucleotiden mit OPC TM Säulen	119
8.5.	Die Detektion membrangebundener, digoxigenerter Polymeraseprodukte .	120
8.6.	Die HPLC	120
8.6.1.	Die RP-HPLC	120
8.6.2.	Die IEX-HPLC	121
8.6.3.	Das SMART-System	121
8.7.	Die Elektrophoresen	122
8.7.1.	Die Polyacrylamid-Elektrophorese	122
8.7.2.	Die Agarose-Elektrophorese	123
9.	Die organisch chemischen Synthesen	124
9.1.	Die carboxysubstituierten Trityl Verbindungen	124
9.1.1.	Synthese der meta-Verbindungen	124
9.1.2.	Synthese der para-Verbindungen	129
9.2.	Sonstige Verbindungen	132
9.2.1.	Tritylierung von Thymidin	132
9.2.2.	Synthese von para-Nitrophenyliodacetat 24	133
9.2.3.	Cysteaminy-3-[bis-(4-methoxyphenyl)]-thymidinylmethylbenzoat 25	133
10.	Die Oligonucleotide	134
10.1.	Die unmodifizierten Oligonucleotide	134
10.2.	Die modifizierten Oligonucleotide	134
10.2.1.	Reaktionen mit den N-Succinimidyl-Estern	134
10.2.2.	Reaktionen mit den para-Nitrophenyl-Estern	135
10.2.3.	Aminolysen der aktivierten Ester	135
10.2.4.	Abspaltung, Entschützung und Aufreinigung der Oligonucleotide .	137
11.	Die Membrane	139
11.1.	Die Biotyne C Membrane	139
11.1.1.	Aktivierung mit para-Nitrophenol	139
11.1.2.	Aktivierung mit EDC	140
11.2.	Die PVDF Membrane	142
11.2.1.	Aktivierung mit DITC	142
11.2.2.	Anbindungsexperimente	142
12.	Die enzymatischen Umsetzungen	143
12.1.	Polymeraseexperimente mit membrangebundenen Oligonucleotiden	143
12.1.1.	Hybridisierungsexperimente	143
12.1.2.	Fill-In Experimente	143
12.1.3.	PCR-Versuche	144
12.2.	Polymeraseexperimente mit derivatisierten Oligonucleotiden	145
12.2.1.	Fill-In-Experimente	145

12.2.2. PCR-Experimente	146
12.3. Experimente mit Restriktionsenzymen	147
12.4. Phosphodiesteraseexperimente	147
 VI. Anhang	 149
 13. Software	 150
13.1. Programme zur Berechnung von Molmassen	150
13.1.1. Das Programm olimass.tcl	150
13.1.2. Das Programm olimass.pl	154
13.1.3. Das Statistik-Programm statistic.awk	156
 14. ^1H-NMR-Spektren	 158

Teil I.

Einleitung

2. Einführung

Die Molekularbiologie und Biochemie haben in den letzten Jahren deutlich an Bedeutung gewonnen, wobei besonders die Nucleinsäure-Analytik in den Blickpunkt gerückt ist. Durch die Entwicklung der Polymerasekettenreaktion (PCR) [1–3] und das daraus hervorgegangene *cycle sequencing* ist man in der Lage, bereits kleinste Mengen an Nucleinsäuren zu amplifizieren und sequenzieren. Der routinemäßige Einsatz in der klinischen Chemie und ehrgeizige Großprojekte, wie beispielsweise die vollständige Sequenzbestimmung des menschlichen Erbgutes durch die *human genomic organisation* (HUGO), erfordern eine Weiterentwicklung der analytischen und gentechnischen Methoden. Das Auftrennen der Sequenzierprodukte über gelelektrophoretische Verfahren ist zeitintensiv und fehleranfällig. Moderne massenspektrometrische Analyse-Methoden, wie MALDI-TOF-MS, ermöglichen die Aufnahme von Oligonucleotid-Massenspektren innerhalb kürzester Zeit [4, 5]. Allerdings stellt diese Technik hohe Anforderungen an die Probenreinheit. So macht sich beispielsweise die Gegenwart metallischer Kationen in den Spektren durch eine starke Verbreiterung der Signale störend bemerkbar [6, 7]. Detergentien haben einen negativen Einfluß auf das Kristallisationsverhalten der Proben mit der Matrix. Eine Aufreinigung der Proben über eine RP-HPLC kann Salze, Enzyme und nicht-eingebaute Nucleosidtriphosphate aus den Sequenzieransätzen entfernen [8]. Da mit der MALDI-TOF-MS auch doppelsträngige Nucleinsäuren nachgewiesen werden können, wäre eine Abtrennung der *Template*-DNA vor der Analyse wünschenswert. Neben den in der DNA-Sequenzierung eingesetzten Polymerase-Reaktionen steht also die Aufreinigung der Produkte im Mittelpunkt neuer Entwicklungen. Zusätzlich zur Beschleunigung der Verfahren wird dabei eine Automatisierung angestrebt. Wie sowohl die Protein-Sequencer als auch die Peptid- [9–13] und DNA-Synthesizer [14–21] zeigen, ist eine Automatisierung in der Biochemie stark mit dem Begriff der Festphasenchemie verbunden [22]. Festphasenchemische Arbeiten besitzen im Vergleich zur Chemie in Lösung Vorteile in der Reaktionsführung und bei der Aufarbeitung der Produkte [23].

- Überschüssige Edukte lassen sich durch einfaches Spülen vom Träger entfernen. Aufwendiges Umsalzen der Produkte für die MALDI-TOF-MS entfällt.
- Wie bei der organischen Festphasensynthetik kann eine thermodynamische und kinetische Beeinflussung des Reaktionsverlaufes ausgenutzt werden. Große Überschüsse von Edukten in der Reaktions-Lösung führen zu höheren Umsätzen.
- Durch niedrige Beladungen am Träger ist es möglich, Reaktionen, die in extremen

Verdünnungen auftreten, durchzuführen.¹

- Es besteht bei Festphasenreaktionen prinzipiell die Möglichkeit der Beeinflussung der Stabilität der gebundenen Moleküle durch Wechselwirkungen mit dem Träger z.B. durch Nutzung des Templat-Effektes.
- Die gewünschte Automatisierung ist verhältnismäßig einfach zu bewerkstelligen.

Allgemein werden bei Polymerase-Reaktionen reaktiv kurze Oligonucleotide an eine einzelsträngige *Template*-Nucleinsäure zu einem partiellen Doppelstrang hybridisiert. Am 3'-Ende des *Primers* wird in Gegenwart der Nucleosidtriphosphate der Doppelstrang komplettiert [24]. Bei der Sequenzierung nach SANGER kommen neben den Nucleosidtriphosphaten Dideoxytriphosphate zum Einsatz, so daß es an definierten Stellen zu Syntheseabbrüchen kommt [25]. Die Einbeziehung der Festphasenchemie kann in diesem Falle ein Anbindung des *Primers* vor oder nach der enzymatischen Umsetzung bedeuten.

Da die DNA-Polymerasereaktionen unter milden, physiologischen Bedingungen ablaufen, kommt eine Vielzahl an Trägermaterialien als feste Phase in Betracht. Die Wahl des Trägers kann sich deshalb in erster Linie an der *Form* der Produkte orientieren, von denen es grundlegend folgende Unterteilungen gibt:

- Geometrische Teilchen, wie zum Beispiel stäbchenförmige Polyethylen-Pins, die mit Acrylsäure funktionalisiert sind [26]. Eine besondere Gruppe innerhalb dieser Unterteilung stellen die sphärischen Partikel wie z.B. CPG dar [27, 28].
- Planare Flächen mit Glas [29, 30] oder Goldbeschichtungen [31] und Silicium in Form von *silicon wafer* [32].
- Mit aktivierten Gruppen beladene Gefäße wie Multititerplatten [33–35].
- Amorphe Materialien wie Harze, TentaGelTM, *magnetic beads* [36] oder Ppropfpolymer [37–39].
- Produkte wie Membrane und Filter [40–43].

Bei Betrachtungen der Molekül-Anbindung über das Ankermolekül an den festen Träger sind Überlegungen wichtig, die berücksichtigen, wie das Molekül immobilisiert werden soll und wie es wieder abgespalten werden kann, denn für Nucleinsäuren kommen nicht alle chemischen Behandlungen in Frage². Die Polarität der Nucleinsäuren sorgt für eine schlechte Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln. Die Abspaltungsreaktionen sollten unter möglichst schonenden Bedingungen stattfinden. Neben den säurelabilen DMT-Verbindungen [40–42, 44] werden heute unter anderem photolabile Moleküle [45–48] und Biotin-Streptavidin-Komplexe [36, 49–54] als Linker-Moleküle untersucht.

¹Die Umsetzung von aktivierten Estern am *controlled pore glass* mit 1,6-Diaminohexan zu Monoamiden ist ein Beispiel: Während bei solchen Reaktionen in Lösung lediglich Diamide isoliert werden konnten, verläuft die Reaktion am festen Träger annähernd quantitativ.

²Irreversible Immobilisierungen sind in der Literatur bereits beschrieben, werden allerdings hier nicht weiter behandelt [29, 43].

Neben Überlegungen über die Anbindung des Anker- oder Linkermoleküls an den Träger ist auch die Frage nach der Anbindung der Nucleinsäure an das Linkermolekül von Bedeutung. Prinzipiell kommt nur eine Anbindung der Oligonucleotide mit dem 5'-Ende in Betracht, da alle bekannten DNA-Polymerasen den partiellen Einzelstrang in 5'→3'-Richtung auffüllen, wobei die Matrix-Nucleinsäure in 3'→5'-Richtung abgelesen wird [24]. Da bei den DNA-Polymerasereaktionen im Allgemeinen mit *Primern* und Matrix-DNA gearbeitet wird, ist es notwendig, die *Primer* vor der enzymatischen Reaktion mit einem Linker-Molekül zu versehen, oder die Reaktion gleich an der festen Phase durchzuführen [40].

3. Problemstellung

Bei der Wahl der Form des festen Trägers, fiel die Entscheidung zugunsten der Membrane [55]. Durch die Entwicklung von Membran-Filter-Multititerplatten im Verbund mit dem EVENT 4160- System der Firma Eppendorf, ist es möglich, bis zu 96 Proben parallel zu verarbeiten [56]. Als Prototyp standen *Silent Monitor* Membranfilter-Multititerplatten mit einer Biotyne C Membran zur Verfügung [55, 57]. Biotyne C ist ein carboxyliertes Material auf Nylonbasis. Die carboxylierten Membrane wurden im Rahmen dieser Arbeit mit unterschiedlichen Verbindungen aktiviert und anschließend funktionalisiert. An die aktivierten Membrane sollten Oligonucleotide als *Primer* über ein Linkermolekül kovalent gebunden werden. Es konnte bereits gezeigt werden, daß sich aminohexylierte *para*-Carboxytrityl-Verbindungen als Linkermolekül eignen [40–42]. Nachteilig erschien die – im Vergleich zu den unterivatisierten Trityl-Ethern – höhere Stabilität gegenüber Säuren, die eine längere Abspaltung erfordert. Aus diesem Grund sollten neue Moleküle synthetisiert werden, die in *meta*-Stellung zum Ether funktionalisiert sind [42]. Ferner sollte das als *Primer* in der enzymatischen Reaktion einzusetzende Oligonucleotid am DNA-Synthesizer produziert, am festen Träger belassen, mit einem aktivierten Carboxy-Tritylchlorid umgesetzt und einer Aminolyse mit einem Diamin oder Cysteamin unterworfen werden. Das so funktionalisierte Oligonucleotid sollte mit Ammoniak vom CPG abgespalten und aufgereinigt werden. Es bestanden zwei Möglichkeiten der Einbindung der Festphasenchemie, deren Realisierungsmöglichkeiten im Laufe dieser Arbeit überprüft wurden.:

1. Der derivatisierte *Primer* kann an aktivierte Membrane unter Ausbildung einer Amidbindung gebunden und im weiteren Verlauf in enzymatischen Reaktionen eingesetzt werden.
2. Das oben angeführte Oligonucleotid kann direkt als *Primer* in DNA-Polymerasereaktionen eingesetzt werden. Die verlängerten Produkte können an aktivierte Membrane kovalent gebunden, aufgereinigt und wieder abgespalten werden.

Beide Verfahren ermöglichen theoretisch die Darstellung von einzelsträngigen Polymerase- oder Sequenzier-Produkten, die direkt mit den Verfahren der HPLC und MALDI-TOF-MS untersucht werden können [5]. Ein alternativer Ansatz zur Sequenzierung mit Polymerasen ist der Einsatz von Phosphodiesterasen in der Sequenzierung. Auch hier erfolgt eine vorgelagerte Polymerase-Reaktion in Lösung. Über die Membrananbindung kann dann ein einzelsträngiges Produkt hergestellt werden, daß im An-

schluß mit der Phosphodiesterase partiell abgebaut werden kann. Mit den Restriktionsendonucleasen sollte eine weitere Klasse Enzyme an den Membranen und den derivatisierten Oligonuceotiden untersucht werden.

Durch eine Anbindung von hochmolekularen Polyoxyethylendiaminen an aktivierte Membrane, bzw. deren Einsatz als Diamin in der Aminolyse von aktivierten Carboxytrityl-Oligonucleotiden, sollte der Einfluß des Abstandes der *Primer* zu den Membranen überprüft werden. Alternativ zur Amidbindung sollte im Verlauf dieser Arbeit die Ausbildung eines Schwefel-Ethers aus membrangebundenem Iodacetamid und mercaptoderivatisierten Trityl-Oligonucleotiden untersucht werden.

Neben der Biotyne C Membran wurde auch eine Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF) aktiviert. Dazu kann die PVDF-Membran mit 1,4-Diaminohexan funktionalisiert und anschließend mit 1,4-Penylendiisothiocyanat (DITC) umgesetzt werden [58]. An diese Membrane können ebenfalls Oligonucleotide gebunden werden [40].

Teil II.

Allgemeiner Teil

4. Die organisch-chemischen Synthesen

Inhaltsangabe

4.1. Die carboxysubstituierten Trityl Verbindungen	8
4.1.1. Synthese der meta-Verbindungen	9
4.1.2. Synthese der para-Verbindungen	14
4.2. Die Spacer Moleküle	22
4.2.1. 1,6-Diaminohexan	22
4.2.2. Polyoxyethylendiamine	23
4.3. Sonstige Verbindungen	23
4.3.1. Tritylierung von Thymidin	23
4.3.2. para-Nitrophenyliodacetat	25
4.3.3. Cysteaminyl-3-[bis-(4-methoxyphenyl)]-thymidinylmethylbenzoat	25

4.1. Die carboxysubstituierten Trityl Verbindungen

Mit Hilfe von Tritylchloriden ist es möglich, festphasengebundene Oligonucleotide am 5'-Ende unter Ausbildung einer Etherbindung zu derivatisieren. Die Tritylchloride können auf unterschiedliche Art und Weise substituiert sein, so daß durch die Tritylierung neue funktionelle Gruppen an das Oligonucleotid gebracht werden können. Handelt es sich bei den Substituenten um Carbonylgruppen in *para*-Stellung zum quartären Kohlenstoffatom, sind die Etherbindungen deutlich stabiler als die bei unsubstituierten Tritylen. Es liegt die Vermutung nahe, daß dies auf -M und -I-Effekte zurückzuführen ist, die durch Mesomerie über den Ring auf die Etherbindung Einfluß nehmen. Durch eine niedrigere Elektronendichte ist die Etherbindung bei einem elektrophilen Angriff eines Protons stabiler.

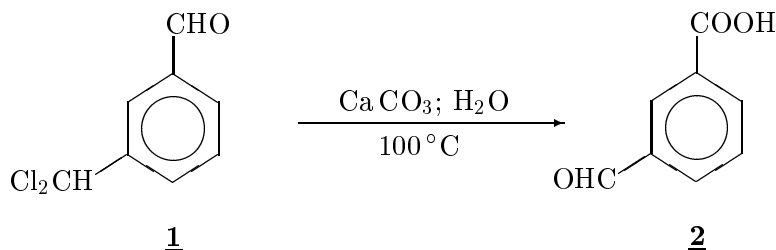
Eine längere Behandlung mit Essigsäure zur Abspaltung der Tritylgruppe begünstigt auch die Depurinierungen des Oligonucleotids. Aus diesem Grund wurden *meta*-substituierte Tritylchloride synthetisiert, die sich leichter wieder abspalten lassen sollten [42].

Als aktivierende Komponente in den Tritylverbindungen wurden zwei Substanzen eingesetzt: Das *para*-Nitrophenol und das *N*-Hydroxysuccinimid (NHS). Auch wenn die *para*-Nitrophenolester nicht so reaktiv sind, wie die des NHS, bieten sie in anderer Hinsicht Vorteile. Bei der Umsetzung mit Nucleophilen wird intensiv gelbes *para*-Nitrophenolat freigesetzt, daß sich gut visuell und photometrisch detektieren läßt.

4.1.1. Synthese der meta-Verbindungen

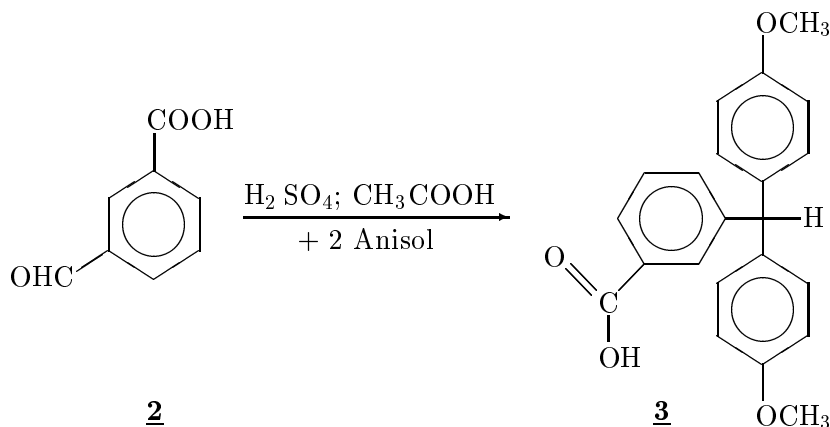
Die Synthese der *meta*-Verbindungen deckt sich mit denen der *para*-Verbindungen. Da die Synthese nach GILDEA [41] kompliziert ist und teure Ausgangsmaterialien benötigt, wurde auf die Synthesestrategie von LEIKAUF [42] zurückgegriffen.

Isophtalaldehydsäure



Da die Isophtalaldehydsäure relativ teuer ist, wurde sie synthetisiert. Die in der Literatur [59] beschriebene Arbeitsweise unter Schutzgas erwies sich als unnötig. Die Verbindung **2** ist auch bei längerem Kontakt mit Luftsauerstoff stabil und zeigte keine Tendenzen zur Oxidation. Die Reaktion verlief quantitativ.

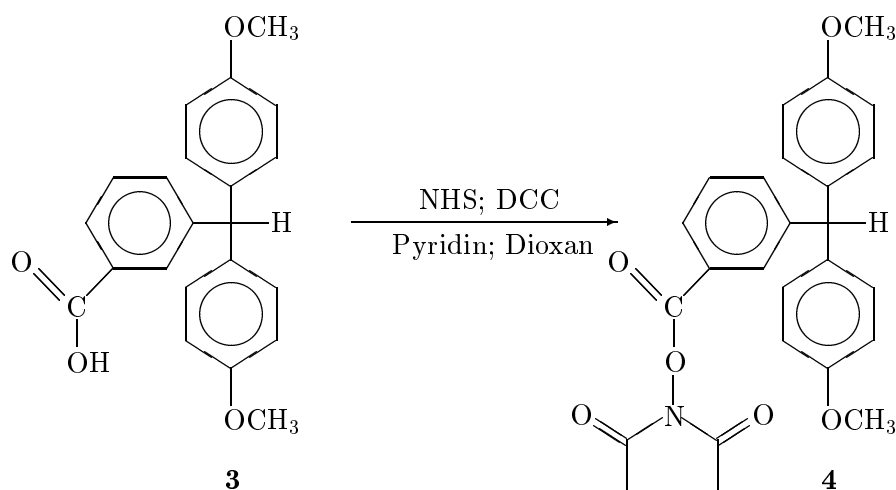
3-[Bis-(4-methoxyphenyl)]-methyl-benzoesäure



In diesem Syntheseschritt kommt es zunächst zu einer Protonierung der Carbonylgruppe, die dann das Anisol bevorzugt in *para*-Stellung¹ elektrophil angreift. Der so entstandene diphenylsubstituierte, sekundäre Alkohol wird wiederum protoniert. Unter Wasserabspaltung entsteht ein Carbeniumion, was ein weiteres Anisolmolekül elektrophil angreift. Die so dargestellte Verbindung **3** wurde säulenchromatographisch oder durch Kristallisation aus Ethanol oder Diethylether aufgereinigt. Das Laufmittel setzte sich aus Dichlormethan : Methanol = 99 : 1 zusammen. Es wurden Ausbeuten um 80 % erreicht.

¹Entsprechend *ortho*-substituierte Tritylverbindungen konnten bei der säulenchromatographischen Aufreinigung erhalten und mittels NMR charakterisiert werden.

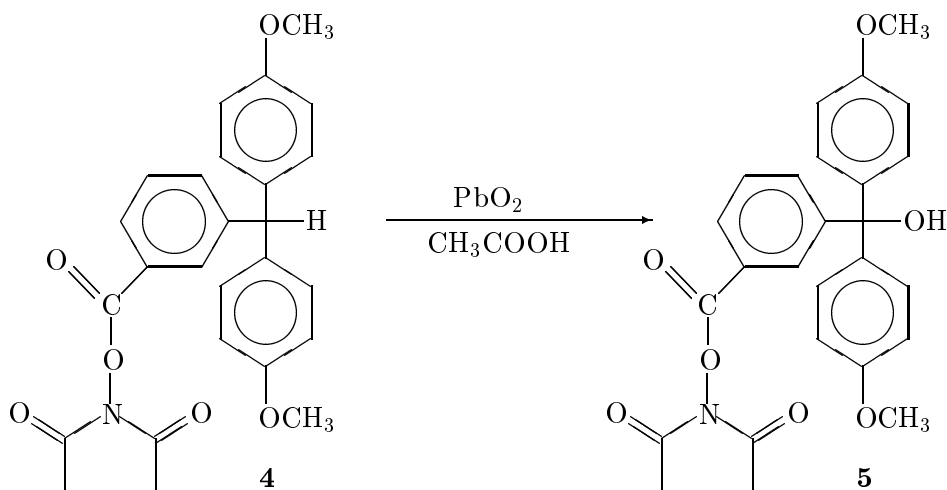
N-Succinimidyl-3-[bis-(4-methoxyphenyl)]-methylbenzoat



Vor der Oxidation zum Carbinol 5 wurde das Triphenylmethan 3 mit *N*-Hydroxysuccinimid in Gegenwart von DCC zum aktiven Ester 4 umgesetzt [60]. Dazu wurde ein geringer Überschuß an Carbodiimid eingesetzt. Die Lösung wurde nach beendeter Reaktion von dem ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff abfiltriert. Dabei wurde besonders berücksichtigt, daß der Dicyclohexylharnstoff relativ unpolar ist und entsprechend stark dazu neigt, das Produkt 4 zu binden.

Der aktivierte Ester 4 wurde aus Ethanol umkristallisiert. Die Ausbeuten betrugen bis zu 91 %.

N-Succinimidyl-3-[bis-(4-methoxyphenyl)]-hydroxymethylbenzoat



Die Oxidation des aktivierten Esters 4 zum Carbinol 5 erfolgte in Gegenwart von

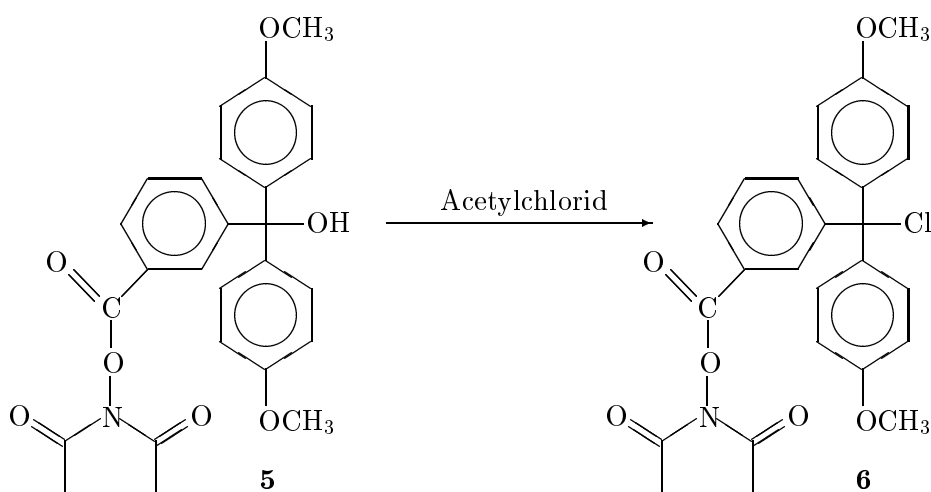
Blei-(IV)-oxid. In der Literatur wurden solche Umsetzungen mit frisch synthetisierten Oxiden durchgeführt [61]. Allerdings zeigten dünnschichtchromatographische Vergleiche, daß mit über 150 Tage altem PbO₂ durchaus noch gute Ausbeuten erzielt werden können. Bei späteren Ansätzen wurde handelsübliches Blei-(IV)-oxid eingesetzt.

Bei dieser Reaktion wurde das Ölbad auf 130 °C vorgeheizt, um die bei der Aufheizphase entstehenden Nebenreaktionen zu verhindern. Die Oxidation wurde abgebrochen, wenn eine dünnschichtchromatographische Analyse die gleiche Menge Nebenprodukt wie Edukt aufzeigte. Der R_f-Wert des Nebenproduktes lag zwischen denen des Eduktes und des Produktes.

Das Reaktionsgemisch wurde säulenchromatographisch über Kieselgel 60 mit einem Laufmittelgemisch von Dichlormethan und Methanol = 99.6 : 0.4 aufgereinigt. Dem Laufmittel wurden 0.03 % Pyridin zugesetzt um saure Reaktionen des Kieselgels mit dem Carbinol 5 zu unterbinden.

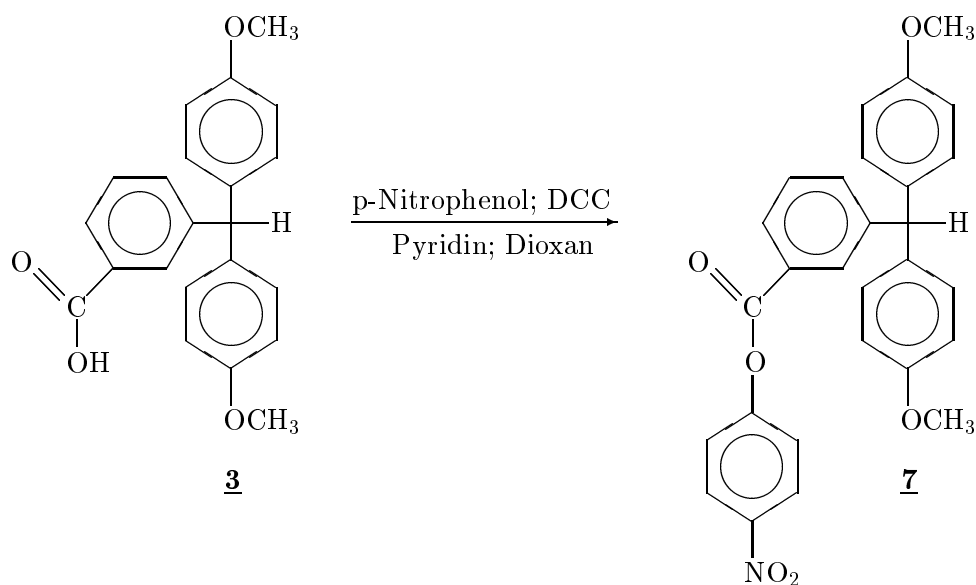
Die erzielten Ausbeuten lagen zwischen 16 und 22 % und waren deutlich geringer, als die der entsprechenden *para*-substituierten Verbindung.

N-Succinimidyl-3-[bis-(4-methoxyphenyl)]-chlormethylbenzoat

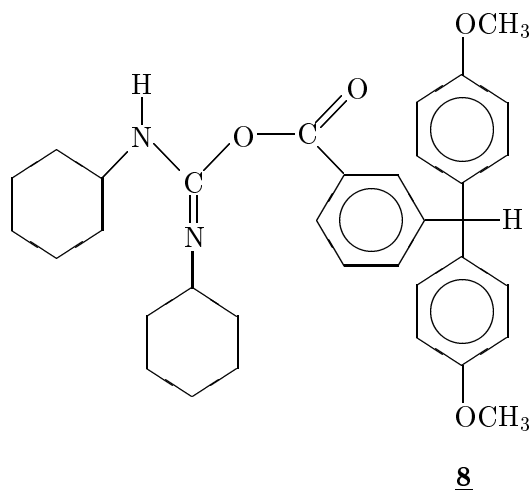


Die Umsetzung vom Carbinol 5 zum Chlorid 6 erfolgte mit frisch destilliertem Acetylchlorid. Auf Grund der Hydrolyseempfindlichkeit des Produktes wurde unter Feuchtigkeitsausschluß gearbeitet. Im Gegensatz zur entsprechenden *para*-Verbindung konnte das Chlorid 6 nicht kristallin erhalten werden. Nach dem Abdestillieren des Acetylchlorids und der entstandenen Essigsäure wurde der ölige Rückstand in 1,4-Dioxan aufgenommen und lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde im Exsikkator bei Raumtemperatur gelagert.

para-Nitrophenyl-3-[bis-(4-methoxyphenyl)]-methylbenzoat

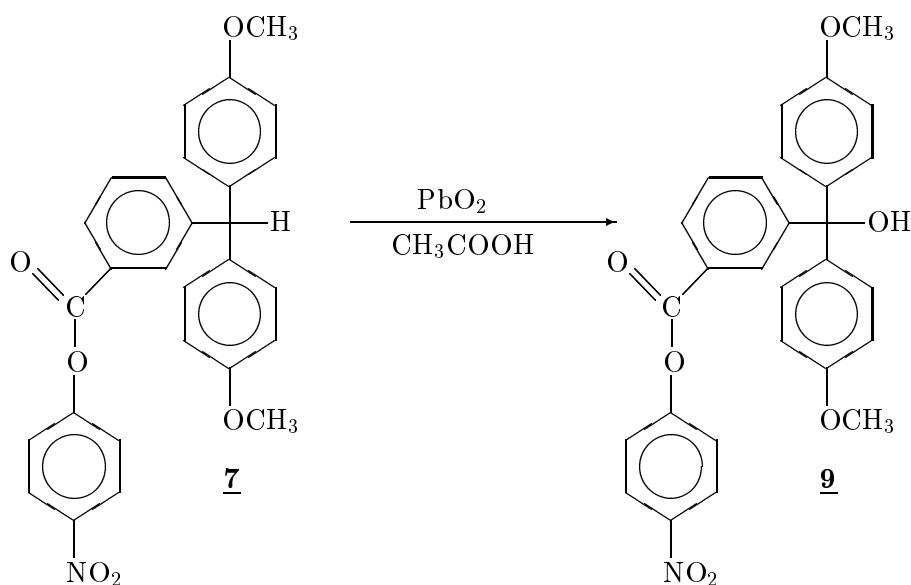


Die Darstellung des aktivierten Esters **7** erfolgte analog zur Synthese der NHS-Verbindung **4**. Die Reaktion konnte dünnschichtchromatographisch verfolgt werden, wobei ein Laufmittelgemisch von Dichlormethan und Methanol im Verhältnis 8 : 2 verwendet wurde. Bei der Detektion mit UV-Licht bei einer Wellenlänge von 254 nm wurde ein Nebenprodukt mit einem R_f -Wert von 0.81 sichtbar. Das Produkt **7** hat unter diesen Bedingungen einen R_f -Wert von 0.92; der Wert des Eduktes **3** lag bei 0.38 und zeigte die für Carbonsäuren charakteristische Spur. Während sich bei der Behandlung des Dünnschichtchromatogramms mit Ammoniakdämpfen das Produkt gelb färbte, reagierte das Nebenprodukt nicht. Nach dem Ausschütteln mit Wasser konnte diese Verbindung nicht mehr nachgewiesen werden. Eine NMR-Analyse legt die Vermutung nahe, daß es sich bei der Verbindung um den DCC-aktivierten Ester **8** handelt.



Die Ausbeuten lagen mit 26 % deutlich unter denen der NHS-Ester. Verbindung **7** wurde über Kieselgel 60 säulenchromatographisch aufgereinigt. Als Laufmittel wurde ein Gemisch aus Dichlormethan und Methanol in den Verhältnissen 99 : 1 eingesetzt. Das als gelbee Öl erhaltene Produkt wurde in Ethanol zur Kristallisation gebracht.

para-Nitrophenyl-3-[bis-(4-methoxyphenyl)]-hydroxymethylbenzoat

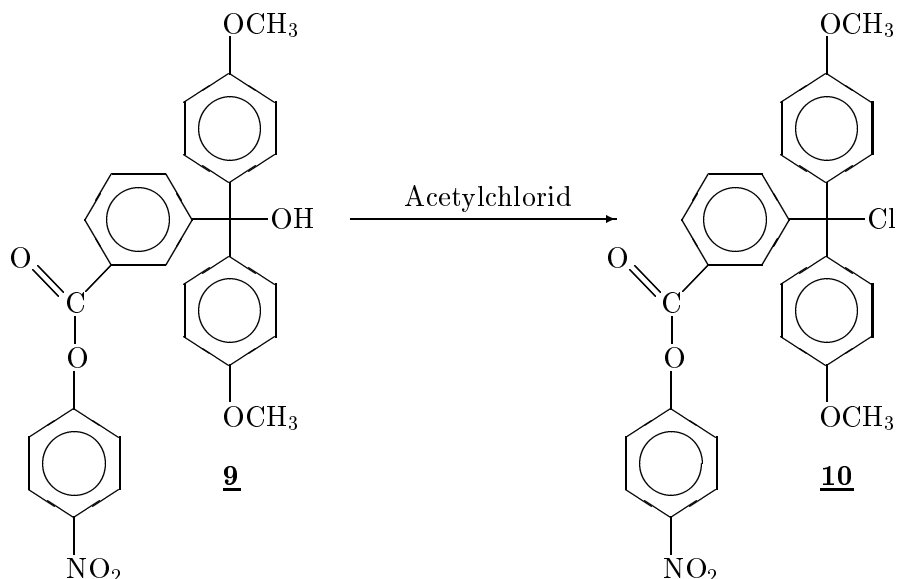


Die Oxidation des aktivierten Esters **7** zum Carbinol **9** verlief in Ausbeuten um 46 %. Auch in dieser Reaktion wurde das Ölbad auf 130 °C vorgeheizt, um unerwünschte

Nebenreaktionen möglichst zu unterbinden.

Die Umsetzung und säulenchromatographische Aufreinigung wurde analog zu denen des NHS-substituierten Carbinols **5** durchgeführt. In dieser Trennung wurden ca. 0.03 % Pyridin dem Laufmittel zugesetzt. Da die *para*-Nitrophenyl-Ester unpolarer sind als die entsprechenden NHS-Ester, ist der Zeitaufwand der Chromatographie im Falle der Verbindung **9** erheblich geringer.

para-Nitrophenyl-3-[bis-(4-methoxyphenyl)]-chlormethylbenzoat

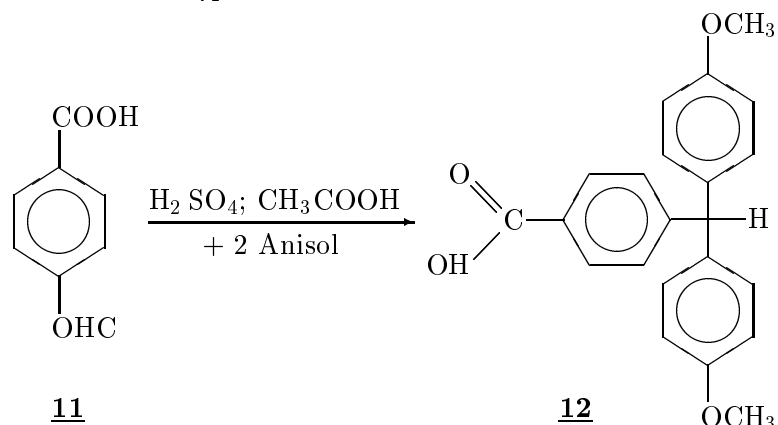


Zur Darstellung des Chlorids **10** wurde das Carbinol **9** mit Acetylchlorid unter Rückfluß gekocht. Im Gegensatz zur NHS-Verbindung **6** gelang es jedoch das Produkt zu kristallisieren. Dazu wurde nach dem Abdestillieren des Acetylchlorids und der entstandenen Essigsäure der Rückstand aus THF / Hexan umkristallisiert. Die weißen Kristalle verfärbten sich an der Luft schnell rosa und wurden unter Argon bei Raumtemperatur gelagert. Es konnten Ausbeuten von 66 % erzielt werden.

4.1.2. Synthese der para-Verbindungen

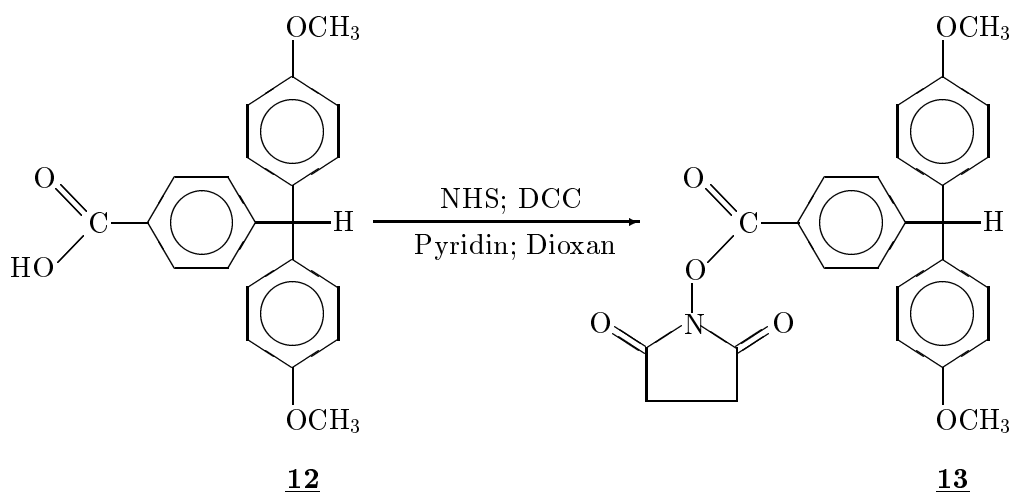
Die Darstellung von *N*-Succinimidyl-4-[bis-(4-methoxyphenyl)]-chlormethylbenzoat **15** wurde schon von GILDEA beschrieben [41]. Es handelt sich dabei um eine komplizierte vierstufige Synthese, die mit verhältnismäßig teuren Edukten startet. Deshalb wurden die *para*-substituierten Verbindungen nach einer Synthese nach LEIKAUF [42] durchgeführt.

4-[Bis-(4-methoxyphenyl)]-methyl-benzoesäure



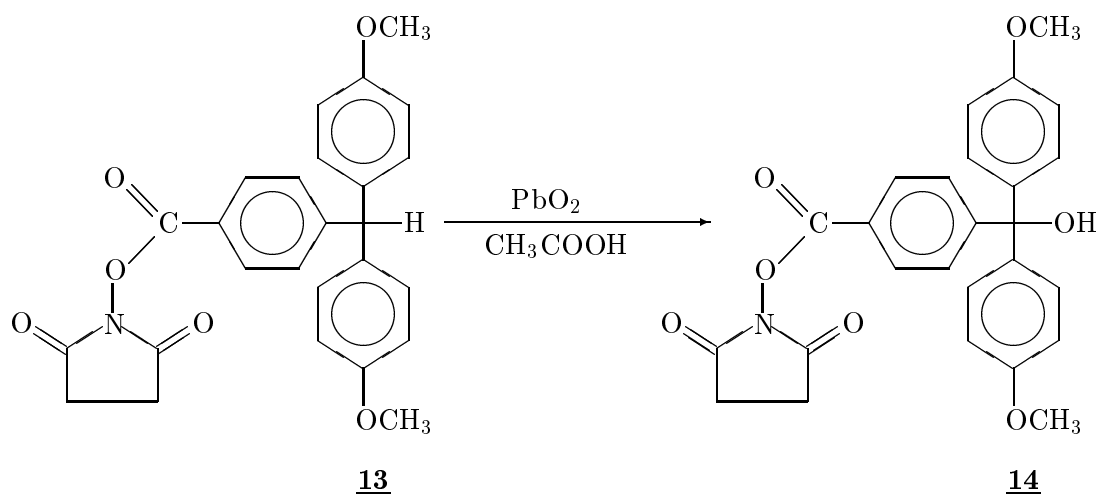
Ausgangssubstanz für diese Synthese ist die Terephthalaldehydsäure **11**, die kommerziell erhältlich ist. Der Reaktionsmechanismus entspricht dem der Darstellung der Carbonsäure **3**. Auf die zeitintensive Aufarbeitung nach LEIKAUF [42] wurde verzichtet. Das Produkt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt. Es wurden Ausbeuten um 67 % erzielt.

N-Succinimidyl-4-[bis-(4-methoxyphenyl)]-methylbenzoat



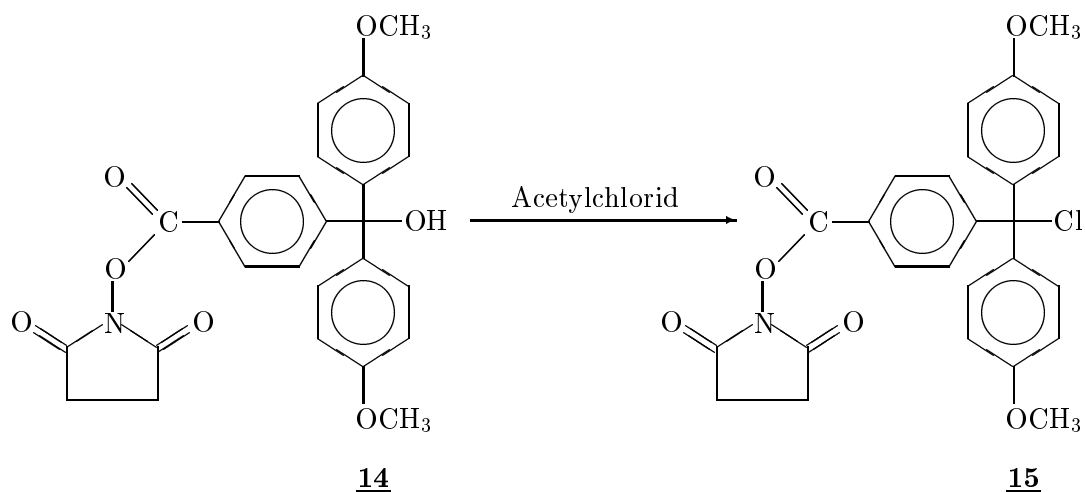
Der aktivierte Ester **13** wurde analog zum *meta*-Isomer **4** synthetisiert. Dazu wurde die Carbonsäure **12** vier Stunden mit Dicyclohexylcarbodiimid und *N*-Hydroxysuccinimid in Pyridin / Dioxan unter Rückfluß gekocht. Nach dem Abfiltrieren vom Dicyclohexylharnstoff wurde der Filtrückstand sehr sorgfältig mit 1,4-Dioxan gewaschen, da das Harnstoffderivat das unpolare Produkt **13** verhältnismäßig stark retardiert. Der Ester **13** wurde aus Ethanol umkristallisiert und in Ausbeuten um 85 % erhalten.

N-Succinimidyl-4-[bis-(4-methoxyphenyl)]-hydroxymethylbenzoat



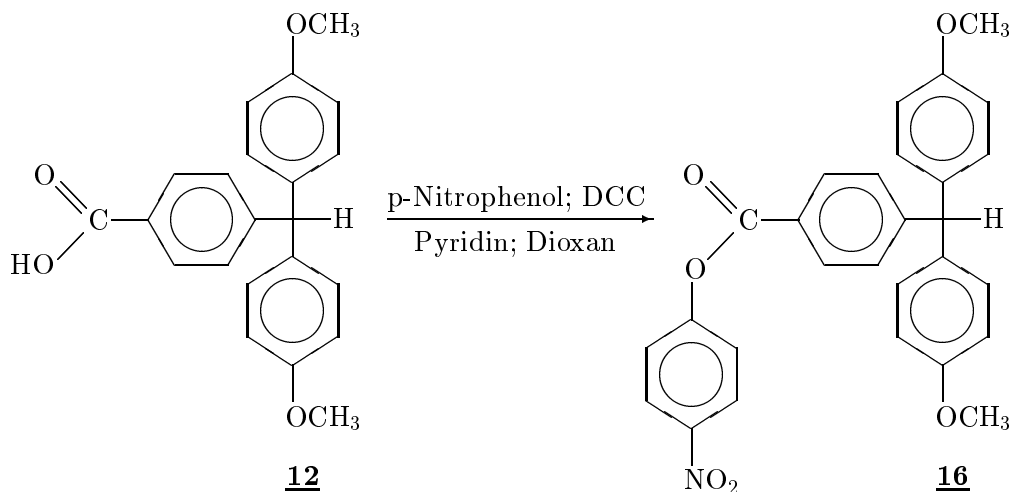
Die Oxidation des Triphenylmethans **13** zum Carbinol **14** erfolgte mit Blei-(IV)-oxid in Eisessig. Das Ölbad wurde auf 130°C vorgeheizt, um Nebenreaktionen während der Aufheizphase zu unterbinden. Die Reaktion wurde abgebrochen, als eine dünn-schichtchromatographische Analyse eine ähnliche Konzentration von Nebenprodukten und Edukt anzeigte. Der R_f -Wert der Nebenprodukte liegt zwischen dem des Produkts und dem unpolaren Edukt. Die Aufreinigung erfolgte säulenchromatographisch an Kieselgel mit einem Laufmittelgemisch von Dichlormethan : Methanol = 99.6 : 0.4. Der flüssigen Phase wurden zur Stabilisierung der Produkts **14** 0.03 % Pyridin zugemischt. Es wurden Ausbeuten von 10 bis 70 % erlangt.

N-Succinimidyl-4-[bis-(4-methoxyphenyl)]-chlormethylbenzoat



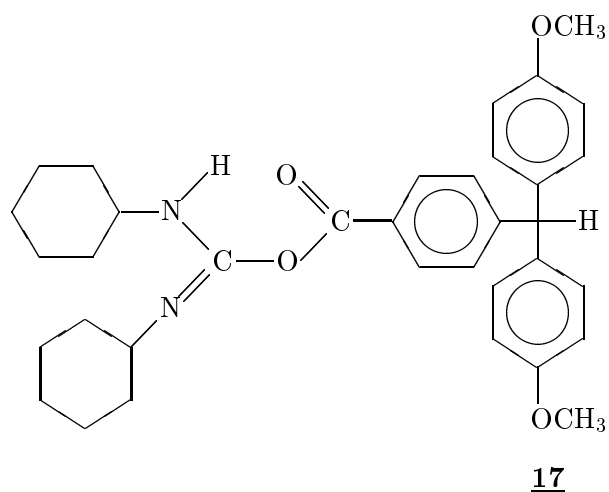
Das Chlorid **15** wurde durch Kochen des Carbinols **14** mit frisch destilliertem Acetylchlorid unter Rückfluß erhalten. Nach dem Abkühlen wurde der Lösung die gleiche Menge Diethylether zugesetzt. Über Nacht kristallisierte die Verbindung **15** in Form von weißen Nadeln aus, die unter Schutzgas filtriert wurden. Das Produkt **15** wurde in einem Exsikkator bei Raumtemperatur gelagert. Es konnten Ausbeuten von 84 % erreicht werden.

para-Nitrophenyl-4-[bis-(4-methoxyphenyl)]-methylbenzoat

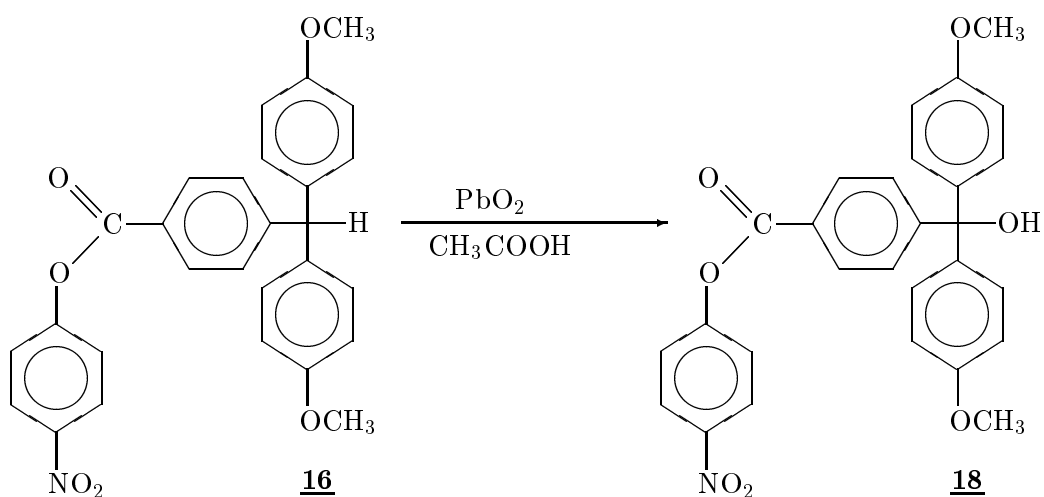


Analog zum aktivierten Ester **7** wurde die Verbindung **16** synthetisiert. Da es nicht gelang, das gelbe Rohprodukt aus Ethanol zu kristallisieren, wurde es zunächst säulenchromatographisch aufgereinigt. Wie bei der entsprechenden *meta*-Verbindung **7** wurde als Laufmittel ein Lösungsmittelgemisch aus Dichlormethan und Methanol im Verhältnis 99 : 1 gewählt. Die so aufgereinigte Substanz wurde anschließend aus Ethanol umkristallisiert und in einer Ausbeute von 19 % erhalten.

Bei der säulenchromatographischen Aufreinigung des Syntheseansatzes konnte das reaktive Zwischenprodukt **17** isoliert und mittels NMR-Spektroskopie identifiziert werden.



para-Nitrophenyl-4-[bis-(4-methoxyphenyl)]-hydroxymethylbenzoat



Die Oxidation wurde unter den gleichen Bedingungen wie die der Synthese des *meta*-Isomers **9** durchgeführt. Die säulenchromatographische Aufreinigung erfolgte mit der Laufmittelzusammensetzung Dichlormethan : Methanol = 99.6 : 0.4. Dem Laufmittel wurden zur Stabilisierung des Carbinols **18** etwa 0.03 % Pyridin zugesetzt. Das Produkt ließ sich weder aus Aceton / Hexan noch aus Hexan / Ethanol umkristallisieren. Die Ausbeuten lagen bei 54 % der Theorie.

Kernresonanzspektroskopische Analysen von 16 und 18 ergaben ähnliche Spektren im Bereich von 6.5 bis 8.5 ppm. Im Spektrum von Verbindung 16 sind bei 6.84 und 6.98 ppm Signale von je vier Protonen zu finden, wobei das erste von den zu den Methoxy-Gruppen *ortho*-ständigen und das letzte von den *meta*-ständigen aromatischen Protonen verursacht wird. Analoges gilt für die Dubletts bei 6.84 und 7.18 ppm von Verbindung 18.

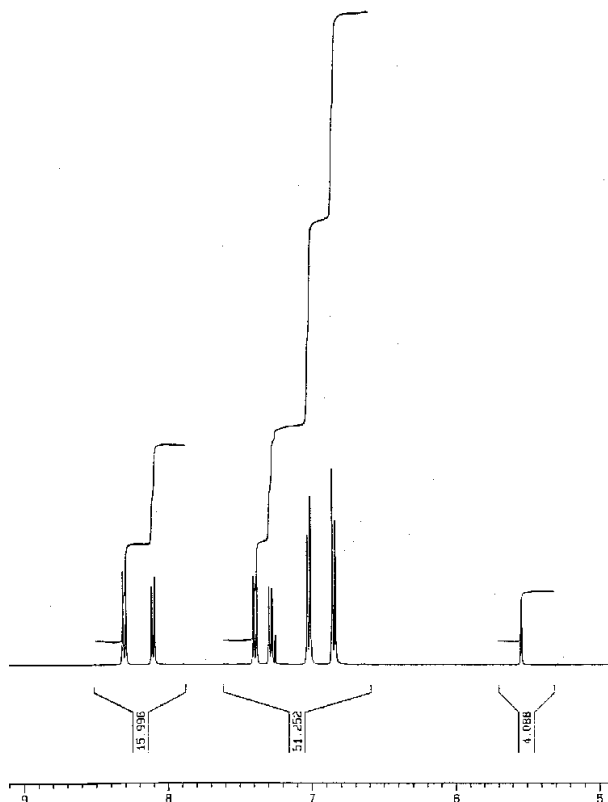


Abbildung 4.1.: Ausschnitt aus dem ^1H -NMR-Spektrum von 16

Im tieferen Feld folgen weitere vier Dubletts, die ihren Ursprung in je zwei aromatischen Protonen tragen. Bei dem Triphenylmethan 16 konnten folgende Positionen ermittelt werden:

- 7.27 ppm: Zwei aromatische Protonen, *meta*-ständig zur Nitro-Gruppe,
- 7.39 ppm: Zwei aromatische Protonen, *meta*-ständig zur Carbonyl-Gruppe,
- 8.08 ppm: Zwei aromatische Protonen, *ortho*-ständig zur Nitro-Gruppe,
- 8.30 ppm: Zwei aromatische Protonen, *ortho*-ständig zur Carbonyl-Gruppe,

Das Signal bei 5.52 ppm hat seinen Ursprung im Proton an dem tertiären Zentral-kohlenstoff des Triphenylmethans, was im Triphenylcarbinol **18** zur OH-Gruppe oxidiert wurde, die mit dem deuterierten Lösungsmittel einen H/D-Austausch eingeht. Das Signal ist in dem Spektrum von Verbindung **18** nicht detektierbar.

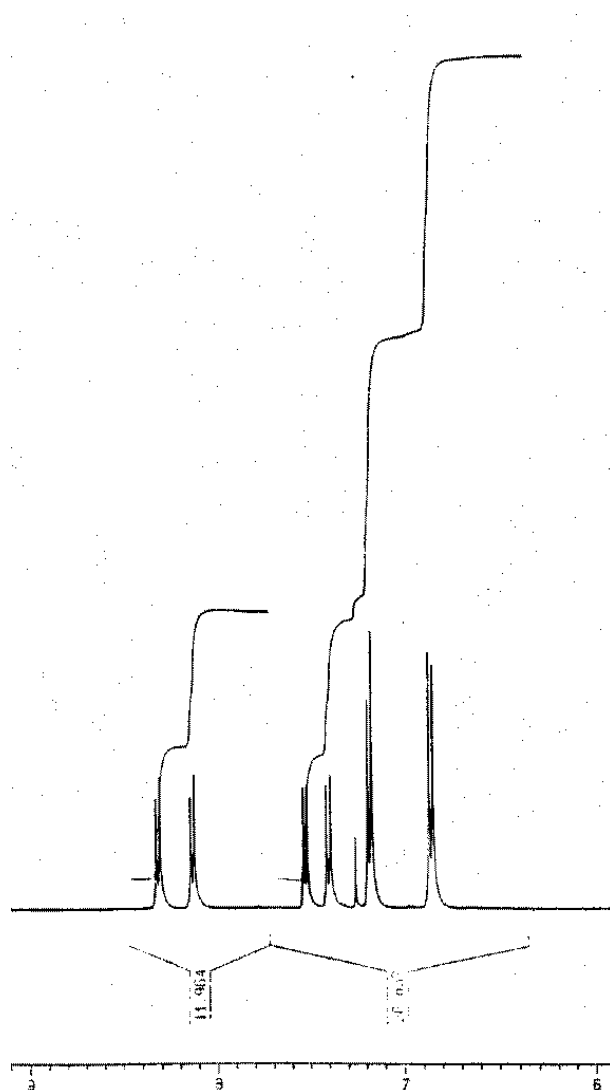


Abbildung 4.2.: Ausschnitt aus dem ^1H -NMR-Spektrum von **18**

Die Dubletts im Feld tiefer als 7.3 ppm werden durch folgende Protonen verursacht:

- 7.40 ppm: Zwei aromatische Protonen, *meta*-ständig zur Nitro-Gruppe,
- 7.51 ppm: Zwei aromatische Protonen, *meta*-ständig zur Carbonyl-Gruppe,
- 8.12 ppm: Zwei aromatische Protonen, *ortho*-ständig zur Carbonyl-Gruppe,

- 8.29 ppm: Zwei aromatische Protonen, *ortho*-ständig zur Nitro-Gruppe,

Die Zuordnungen konnten nach Analyse von ^1H - ^1H -COSY-Kopplungsmessungen unter Zuhilfenahme von Inkrementtabellen gemacht werden [62]. Durch diese Analysen konnte festgestellt werden, daß sich die Kopplungsmuster der Verbindungen **16** und **18** im ^1H -NMR-Spektrum umkehren.

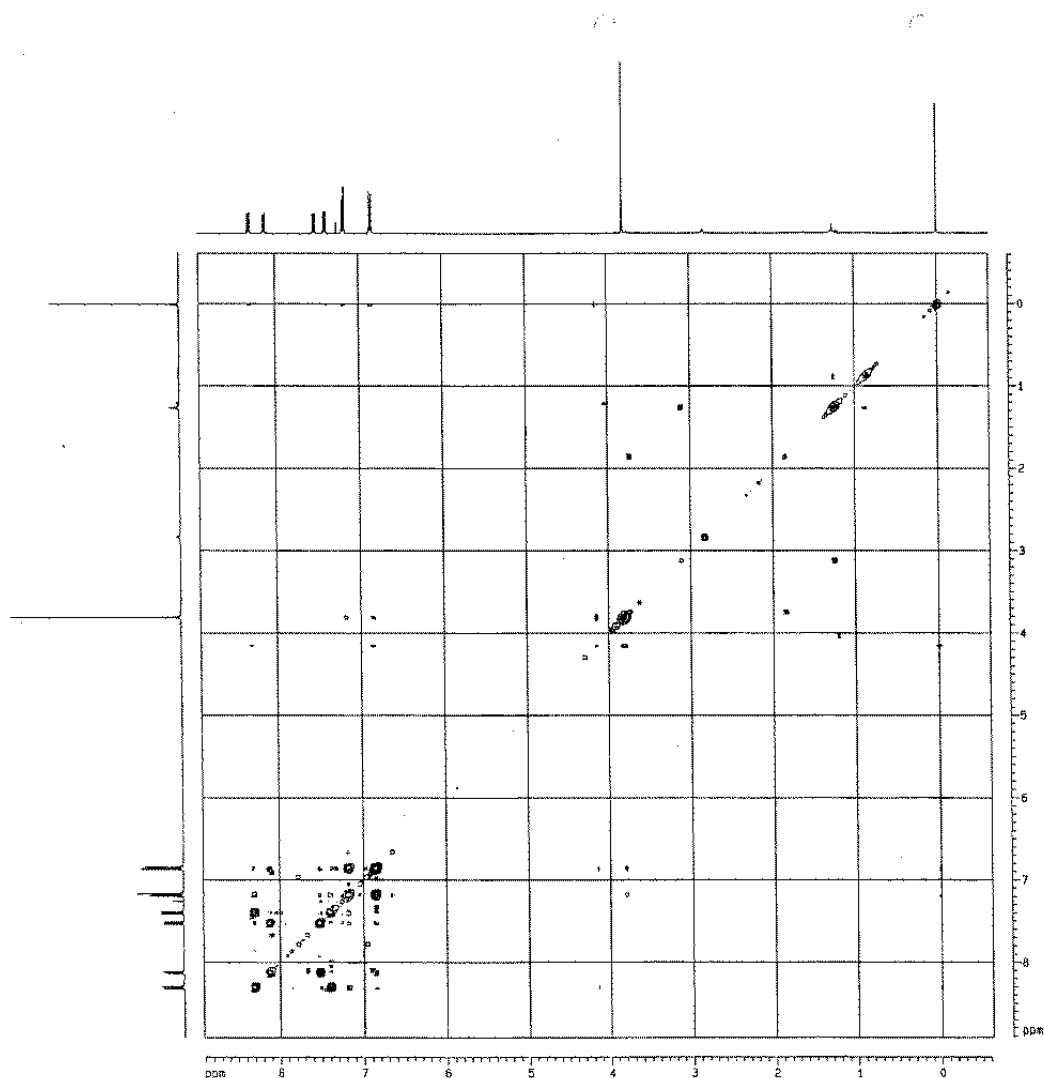
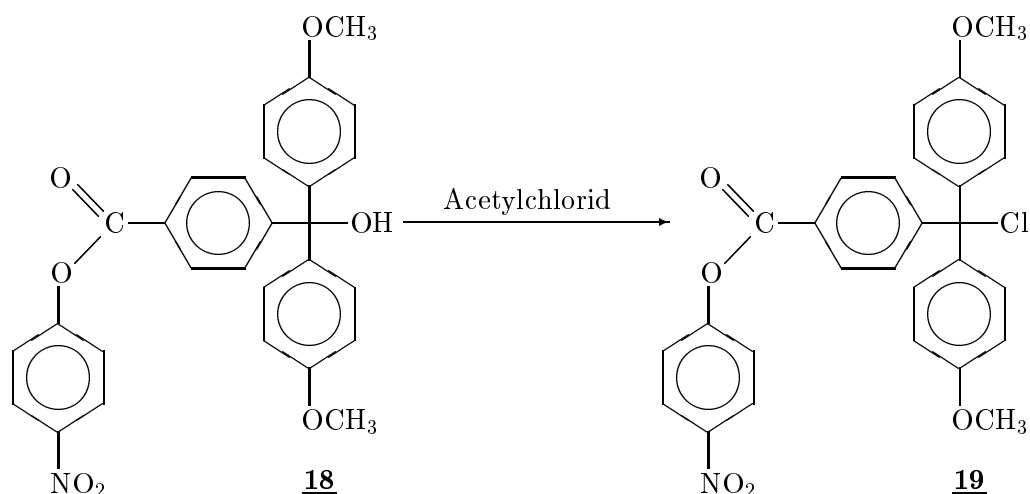


Abbildung 4.3.: ^1H - ^1H -COSY-NMR-Spektrum von **16**

para-Nitrophenyl-4-[bis-(4-methoxyphenyl)]-chlormethylbenzoat



Das Chlorid **19** wurde der *meta*-Verbindung **10** entsprechend synthetisiert. Dazu wurde das Carbinol **18** mit frisch destilliertem Acetylchlorid im Rückfluß gekocht. Es gelang nicht, das Produkt kristallin zu erhalten. Nach dem Abdestillieren des Acetylchlorids und der entstandenen Essigsäure wurde das Rohprodukt mit Toluol koevaporiert und mit 1,4-Dioxan lyophilisiert. Die Ausbeute lag bei 63 %. Das Chlorid wurde im Exsikkator bei Raumtemperatur gelagert.

4.2. Die Spacer Moleküle

Als Basiskonzept der Anbindung von Oligonucleotiden galt im Rahmen dieser Arbeit folgendes:

- Das 5'-Ende der Oligonucleotide ist mit einer aktivierenden funktionellen Gruppe *via* DMT versehen, die als nucleophile Komponente dient.
- Die Membrane tragen aktivierte Carboxylgruppen oder andere reaktive Substituenten, die als elektrophile Komponenten fungieren.
- Beide – Oligonucleotide und Membrane – werden mittels Spacer-Moleküle miteinander verbunden.

Auf Grund ihrer Nucleophilie erwiesen sich primäre α,ω -Diamine als brauchbare Verbindungen für diese Aufgabe.

4.2.1. 1,6-Diaminohexan

1,6-Diaminohexan ist ein günstiges, kommerziell erhältliches Diamin mit einem Schmelzbereich von 42–45 °C. Der Siedepunkt liegt bei 204–205 °C. Damit läßt sich 1,6-

Diaminohexan über eine Vakuumdestillation aufreinigen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 1 M Lösungen in Wasser oder 1,4-Dioxan : Wasser im Verhältnis 9 : 1 eingesetzt.

4.2.2. Polyoxyethylendiamine

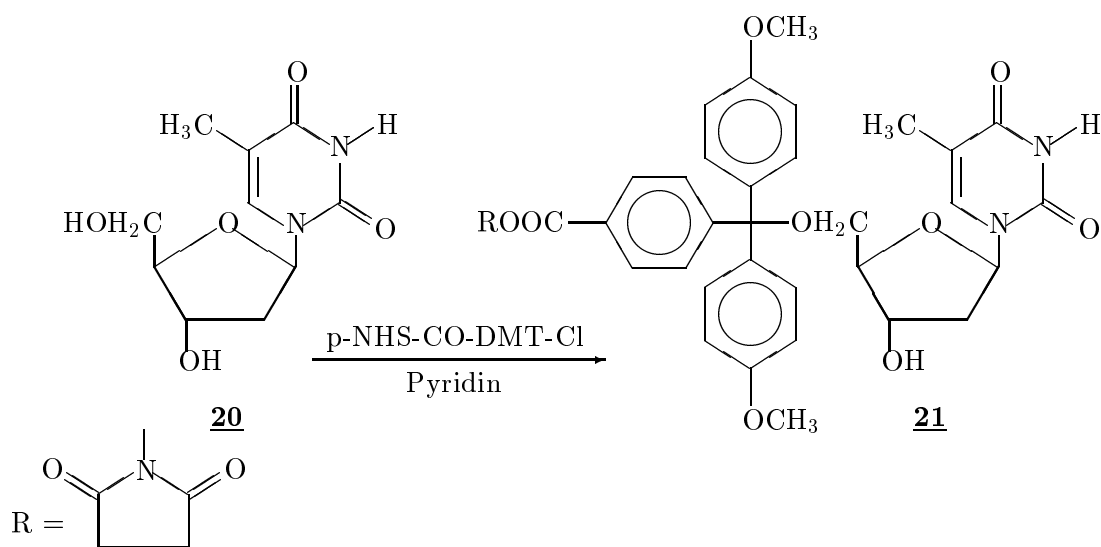
Da auch enzymatische Experimente mit membrangebundenen Oligonucleotiden durchgeführt wurden, und Enzyme sterisch anspruchsvoll sind, wurde versucht, den Abstand der Oligonucleotide von den Membranen zu vergrößern. Deshalb wurden auch Untersuchungen mit Polyoxyethylendiaminen² unterschiedlicher Größe durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß die polyoxyethylen-gekoppelten Oligonucleotide gegen Hitze instabil sind, sofern sie membrangebunden vorliegen.

4.3. Sonstige Verbindungen

4.3.1. Titylierung von Thymidin

Bevor die unterschiedlichen Chloride mit Oligonucleotiden umgesetzt wurden, wurden mit Thymidin Modellverbindungen synthetisiert, die im Gegensatz zu den Oligonucleotiden spektroskopisch untersucht und charakterisiert werden konnten.

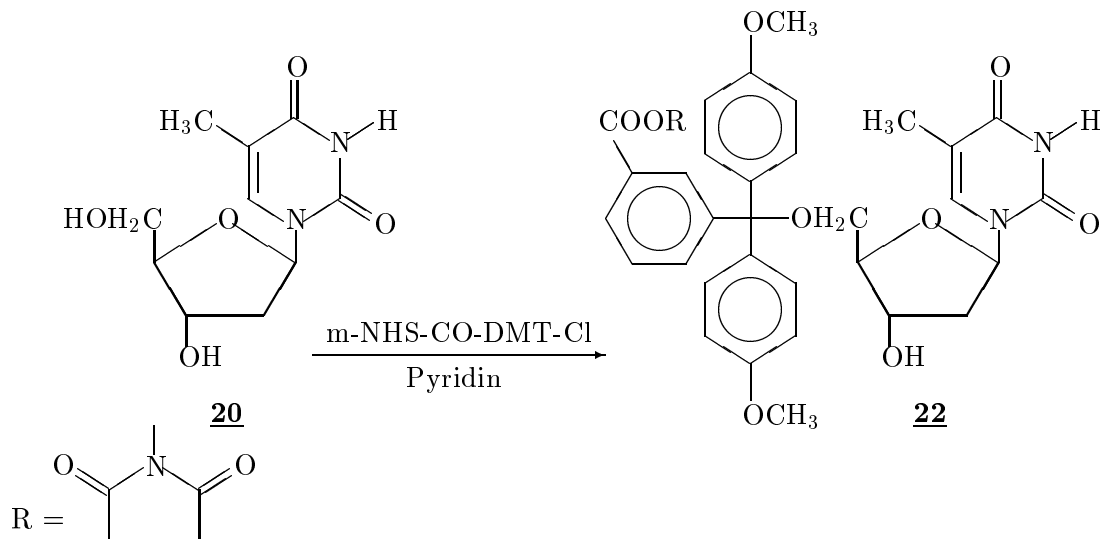
Umsetzung mit N-Succinimidyl-4-[bis-(4-methoxyphenyl)]-chlormethylbenzoat



²RAPP Polymere GmbH
Ernst-Simon-Str. 9
72077 Tübingen

Prinzipiell erfolgt die Synthese von **21** durch die Umsetzung von Thymidin mit dem Chlorid **15** in Pyridin [41]. Auf eine explizite Synthese von **21** konnte verzichtet werden, da das Produkt als Referenz vorlag.

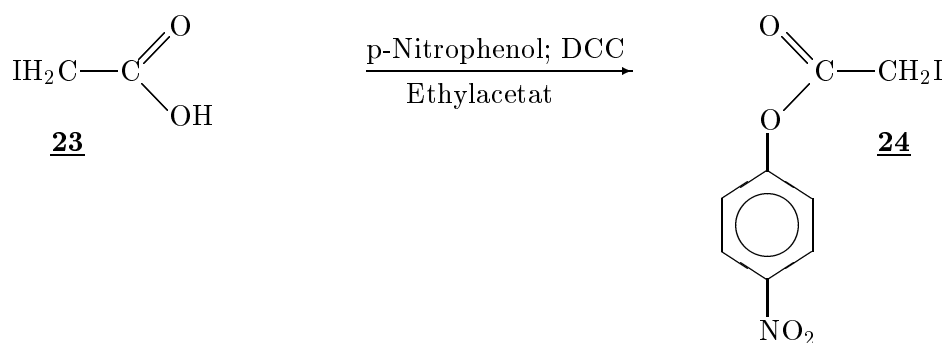
Umsetzung mit N-Succinimidyl-3-[bis-(4-methoxyphenyl)]-chlormethylbenzoat



Die Umsetzung von Thymidin **20** mit dem Chlorid **6** erfolgte in Pyridin bei Raumtemperatur. Die Aufreinigung erfolgte über Plattenchromatographie, gefolgt von einer präparativen Dünnschichtchromatographie. Die Ausbeute betrug 18 %.

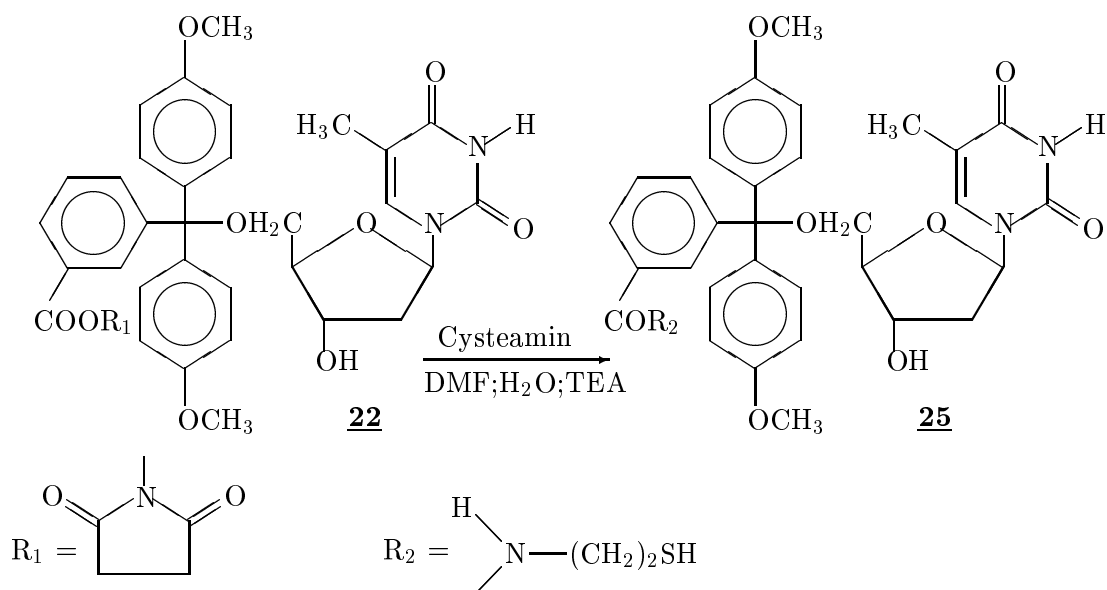
In einem zweiten Ansatz wurde versucht, die Tritylierung unter den Bedingungen der Retritylierung von festphasengebundenen Oligonucleotiden durchzuführen. Dazu wurde das Chlorid **15** in einer Lösung von Dichlormethan, *sym.*-Collidin und Tetrabutylammoniumperchlorat gelöst. Anschließend wurde zu dieser Lösung Thymidin gegeben. Da sich das Thymidin nicht komplett löste, wurde der Ansatz mit etwas DMF versetzt. Die Aufreinigung erfolgte säulenchromatographisch mit einer diskontinuierliche Gradientenelution. Anschließend wurde das Produkt aus Toluol / Cyclohexan umkristallisiert. Die Ausbeuten lagen bei 4 %.

4.3.2. *para*-Nitrophenyliodacetat



Neben der Anbindung von aminofunktionalisierten Oligonucleotiden an aktivierte, membrangebundene Carbonsäuren, wurde eine weitere Strategie untersucht. Mercapto-
gruppen können mit iodierten Verbindungen unter Ausbildung einer Thioether-Bindung
reagieren. Zu diesem Zweck wurde das *para*-Nitrophenyliodoacetat **24** synthetisiert [63].
Das Reaktionsschema entspricht denen der anderen aktivierten Ester. Versuche mit Py-
ridin, Dioxan und DMF als Lösungsmittel schlugen fehl. Erfolgreicher waren die Um-
setzungen in Ethylacetat bei 0 °C. Das Produkt wurde aus Ethanol umkristallisiert. Es
wurden Ausbeuten von 76 % erzielt.

4.3.3. Cysteaminyl-3-[bis-(4-methoxyphenyl)]-thymidinylmethylbenzoat



Als Modellverbindung für die Anbindung unter Ausbildung von Thioethern diene
das Amid **25**. Es sollte im späteren Verlauf mit membrangebundenen Iodacetamid umge-
setzt werden. Zur Darstellung von **25** wurden **22** und Cysteamin **26** in unterschiedlichen

Lösungsmitteln gelöst und miteinander zur Reaktion gebracht. Dazu wurden folgende Lösungen hergestellt:

	Verbindung			pH
	<u>22</u>	<u>26</u>	<u>25</u>	
Lösungsmittel	H ₂ O ^a	H ₂ O; Pyridin	-	6-7
	Borat-Puffer ^{a b}	Borat-Puffer ^b	-	8.0
	DMF	H ₂ O;TEA	+	9.0

Tabelle 4.1.: Umsetzungen von **22** mit Cysteamin **26**

^aDa sich Verbindung **22** nur sehr schlecht in wässrigen Lösungen löst wurde etwas Ethanol zugesetzt.

^bGebrauchsfertiger Puffer Firma Merck.

Wie aus Tabelle 4.1 hervorgeht, war nur der Versuch bei pH 9.0 erfolgreich. Da die Ansätze im Mikromaßstab durchgeführt wurden, wurde keine Ausbeute bestimmt. Die Charakterisierung und Quantifizierung erfolgte durch HPLC-Analysen.

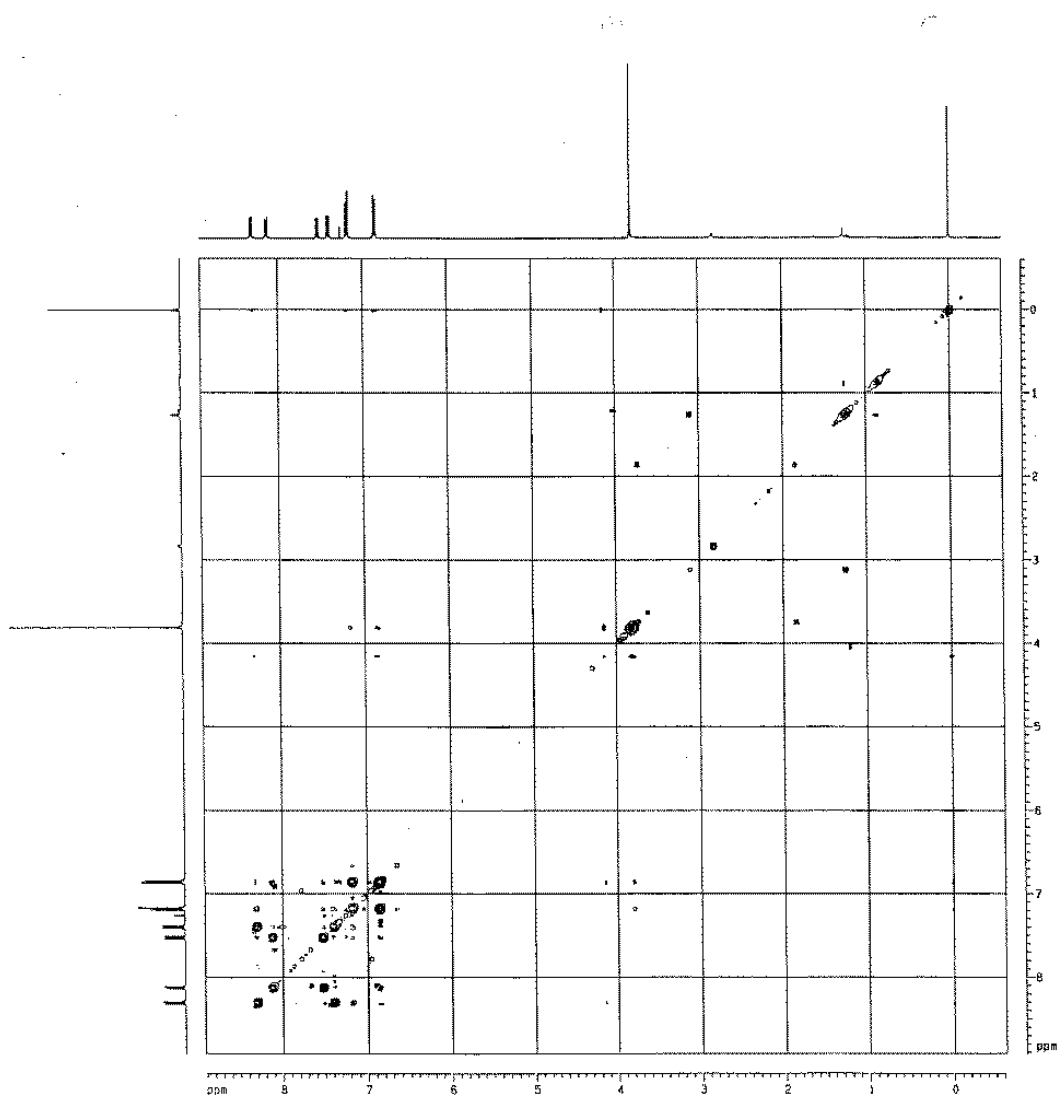


Abbildung 4.4.: ^1H - ^1H -COSY-NMR-Spektrum von 18

5. Die Desoxyribonucleinsäuren

Inhaltsangabe

5.1. Die Oligonucleotide	28
5.1.1. Die Synthese der Oligonucleotide	29
5.1.2. Die Sequenzen	32
5.1.3. Die Retrixylierungen	37
5.1.4. Aminolysen der aktivierten Ester	40
5.1.5. Abspaltung, Entschützung und Aufreinigung der Oligonucleotide	43
5.1.6. Charakterisierung der Oligonucleotide	44
5.2. Die Vektoren	48
5.2.1. λ -DNA	49
5.2.2. M13mp18	49
5.2.3. pUC19	49

5.1. Die Oligonucleotide

Zur Durchführung der Anbindungs- und Polymerase-Experimente wurde eine Reihe von Oligonucleotiden hergestellt. Die Synthesen erfolgten nach der Phosphoamidit-Methode, wobei die zu derivatisierenden Oligonucleotide zunächst am CPG belassen wurden. In diesen Fällen wurde die letzte Dimethoxytrityl-Gruppe von den *Primern* abgespalten. Die Aufreinigung der underivatisierten Oligonucleotide erfolgte über präparative HPLC oder mit Hilfe der OPCTM-Säulen der Firma ABI. Die hochmolekularen *Primer*, die Polyoxyethylengruppen als *Spacer* trugen, wurden mit Membranfiltern der Firma Millipore aufgereinigt.

Die ersten Polymerase-Kettenreaktionen wurden mit der DNA des Bakteriophagen Lambda als *Template* durchgeführt, wobei die beiden *Primer* λ_1 und λ_2 ein 500 Basen-paar großes Fragment flankieren. Ein Amplikon dieser Größe konnte problemlos mittels Agarose- und Polyacrylamid-Elektrophorese analysiert werden. Nach der Etablierung der Polymerase-Experimente wurden die Experimente auf das M13mp18-System mit dem *universal sequencing primer* USP übertragen.

Da die Polymerase-Experimente zum Teil mit synthetischen *Templates* durchgeführt wurden, mußte sichergestellt werden, daß die Molmassen und Kettenlängen der Matrix-DNA und Amplikons deutlich voneinander differieren. Andernfalls wäre eine Unterscheidung des *fill-in*-Produkts vom Edukt weder gelelektrophoretisch noch massenspektrometrisch oder chromatographisch möglich. Außerdem mußte berücksichtigt werden, daß

in MALDI-TOF-Spektren doppelsträngige sowie doppelt geladene DNA unterscheidbar ist. In kleinerem Umfang sind auch dreifachgeladene Oligonucleotide und Signale bei der dreifachen Molmasse der Nucleinsäuren detektierbar. Aus diesem Grund wurde ein *Template-Primer*-System gewählt, bei der das *Template* einen 13 Basen langen 3'-Überhang gegenüber dem 17 Basen langen *Primer* hatte. Das *fill-in*-Produkt hatte eine Länge von 27 Basen. Bei dem *Template* handelte es sich um ein 50mer.

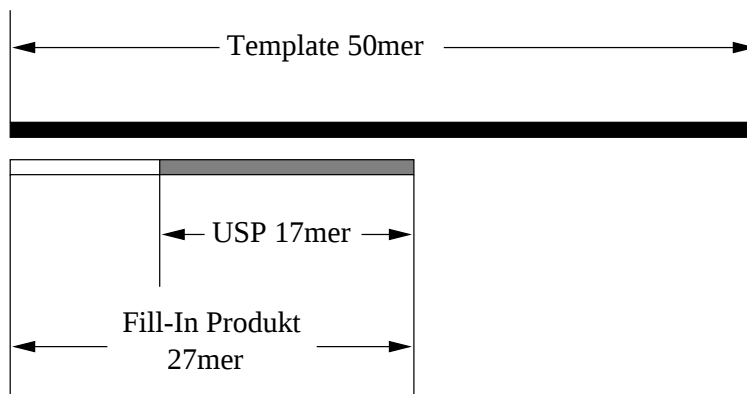


Abbildung 5.1.: *Primer*-Konzept der *fill-in*-Experimente

5.1.1. Die Synthese der Oligonucleotide

Oligonucleotide sind aus chemischer Sicht Phosphorsäureester. Mittlerweile werden DNA-Fragmente fast ausschließlich nach der Phosphoamidit-Methode hergestellt [19, 64, 65]. Die Synthesen finden in automatisierten DNA-Synthesizern an der festen Phase statt. Lediglich in speziellen Fällen greift man noch auf die H-Phosphonat-Methode zurück [17, 18, 66, 67].

Die Phosphoamidit-Methode

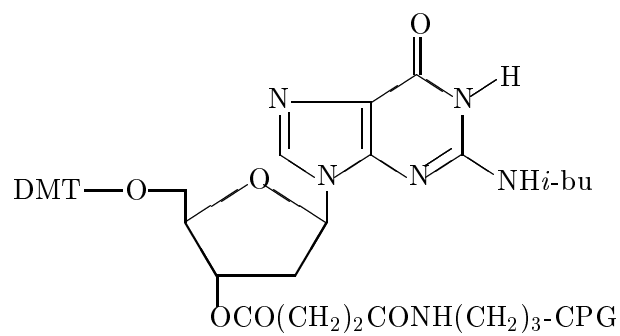
Im ersten Schritt der Oligonucleotid-Synthese nach der Phosphoamidit-Methode wird das DMT mit Dichloressigsäure von der ersten Base am CPG abgespalten. Mit der freien 5'-OH-Gruppe kann nun das Phosphoamidit **27** reagieren. Das Amidit setzt sich hierbei zunächst unter Abspaltung von Diisopropylamin mit dem Tetrazol um. Das so entstandene Tetrazolid greift dann die terminale Hydroxy-Gruppe der festphasengebundenen Base elektrophil an. Im nächsten Schritt findet nach der erfolgreichen Verlängerung der Kette die Oxidation des Phosphonats zum Phosphat statt. Weitere eventuell vorhandene OH-Gruppen, die auf unvollständige Kettenverlängerung zurückzuführen sind, werden mit Acetanhydrid zur Reaktion gebracht (*Capping*). Dazu wird das Anhydrid mit *N*-Imidazol zu einem Acetimidazolid aktiviert. Das *Capping* ist notwendig, um das Auftreten von Fehlsequenzen zu unterbinden. Nach erneuter Detritylierung wird der

Syntheseweg so oft durchlaufen, bis die gewünschte Kettenlänge erreicht ist. Pro Zyklus wird das Oligonucleotid um eine Base verlängert.

Bedingt durch die Vorteile der Festphasenchemie können pro Syntheszyklus Kopplungsausbeuten von bis zu $k = 99\%$ erreicht werden. Die Gesamtausbeute A – vor der Aufreinigung – berechnet sich dann bei einer Kettenlänge von n wie folgt:

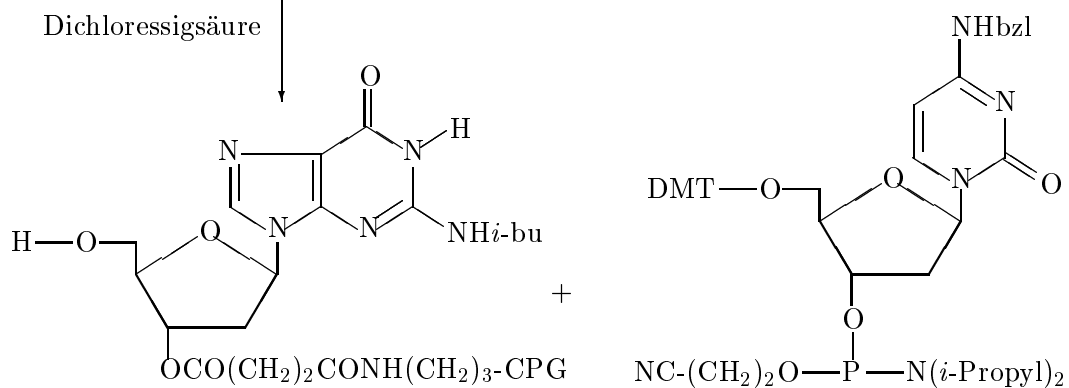
$$A = 100(k^{n-1}) \quad (5.1)$$

Bei einem Oligonucleotid mit 17 Basen und einer Kopplungsausbeute von 99 % liegt die Gesamtausbeute bei 85 %. Liegt die Kopplungsausbeute bei 98 %, verringert sich die Gesamtausbeute auf 72 %. Somit ist es verständlich, warum bei der Phosphoramidit-Methode extrem trockene Lösungsmittel verwendet werden müssen, da Wasser als Nucleophil mit den Amiditen bzw. Tetrazoliden reagieren würde.



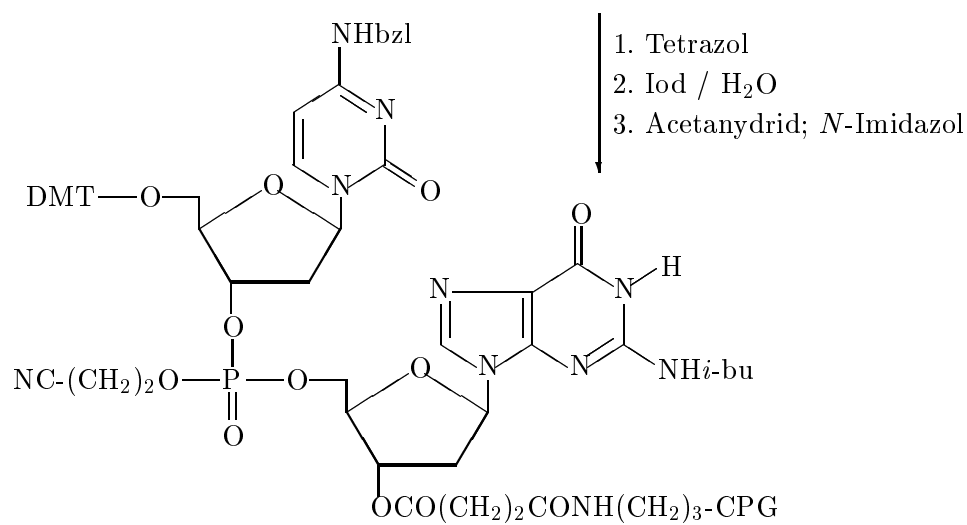
27

Dichloressigsäure



28

29



30

Da Amidite bzw. Tetrazolide mit allen nucleophilen Gruppen reagieren, müssen die exocyclischen Aminogruppen der Basen geschützt werden. Traditionelle Schutzgruppen sind die Isobutyryl- für das Guanosin und die Benzoyl-Gruppe für Adenosin und Cytidin. Thymidin verbleibt an der Base ungeschützt. Schutzgruppen die sich von der *tert*-Butylphenoxyessigsäure ableiten, lassen sich deutlich schneller abspalten.

5.1.2. Die Sequenzen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Oligonucleotide synthetisiert, die in Polymerase-Experimenten als *Primer* und Matrix dienen. Einige Nucleinsäuren wurden vor der Abspaltung von der festen Phase mit den Tritylchloriden **6**, **10**, **15** und **19** retrimyliert. Die aktivierten Ester wurden anschließend mit Nucleophilen zur Reaktion gebracht.

Zur Ermittlung des molaren Extinktionskoeffizienten ε wurden die Koeffizienten der Purinbasen in Puffern bei pH 7 mit 14 000 und die der Pyrimidinbasen mit 7 000 bei einer Wellenlänge von 260 nm angenommen¹. Wenn man die Wechselwirkungen der Basen untereinander nicht mitberücksichtigt, kann man das Lambert-Beersche Gesetz mit

$$A = \log_{10} \frac{I_0}{I} = \sum_{i=1}^n \varepsilon_i c_i \quad (5.2)$$

beschreiben. Die molaren Extinktionskoeffizienten der einzelnen Basen werden mit ihrer Anzahl im Oligonucleotid multipliziert und aufsummiert. Aus den Absorptionen der Lösungen bei 260 nm läßt sich so die Konzentration der Nucleinsäuren abschätzen.

Der Lambda-Primer λ_1

Der *Primer* λ_1 ist 25 Basen lang, hat eine Molmasse von 7 635.84 g mol⁻¹ und folgende Sequenz:

5'-GGT TAT CGA AAT CAG CCA CAG CGC C-3'

Als molarer Extinktionskoeffizient ε wurde ein Wert von 266 000 errechnet. Ein Maximum im UV-Spektrum konnte bei 259.5 nm beobachtet werden.

Der Lambda-Primer λ_2

Der *Primer* λ_2 besteht ebenfalls aus 25 Nucleotiden. Seine Molmasse beträgt 7 696.87 g mol⁻¹; die Sequenz setzt sich wie folgt zusammen:

5'-GAT AGA TTC GTG TCC GTA CAA CTG G-3'

Der molare Extinktionskoeffizient ε beträgt 266 000. Im UV-Spektrum liegt ein Maximum bei 260 nm.

¹NEWTON ermittelt den molaren Extinktionskoeffizienten nach $(8\,400 \times T) + (15\,200 \times A) + (12\,010 \times G) + (7\,050 \times C)$ für neutrale Lösungen [2]. Allerdings berücksichtigt auch dieser Ansatz weder die Stapeleffekte noch die Hypo- bzw. Hyperchromie der Nucleinsäure-Lösungen [68].

Der universal sequencing Primer USP

Der *universal sequencing primer* USP hybridisiert an das 3'-Ende der *multiple cloning site* einer Reihe von Plasmiden, weshalb er prädestiniert für Polymerase-Experimente ist. Das Oligonucleotid ist ein siebzehn Basen langes Fragment mit einer Molmasse von $5\,228.34\text{ g mol}^{-1}$. Der *universal sequencing primer* hat folgende Sequenz:

5'-GTA AAA CGA CGG CCA GT-3'

Der molare Extinktionskoeffizient ε wurde mit 196 000 angenommen. Ein Maximum im UV-Spektrum liegt bei 256 nm.

Zur Quantifizierung der Oligonucleotide nach Abspaltung von den Membranen, wurde eine Eichreihe mit dem *universal sequencing primer* aufgenommen. Die Konzentration der einzelnen Lösungen wurde mittels UV-Spektroskopie ermittelt. Die Bestimmung der Integrale² erfolgte nach *reversed phase* HPLC-Trennung.

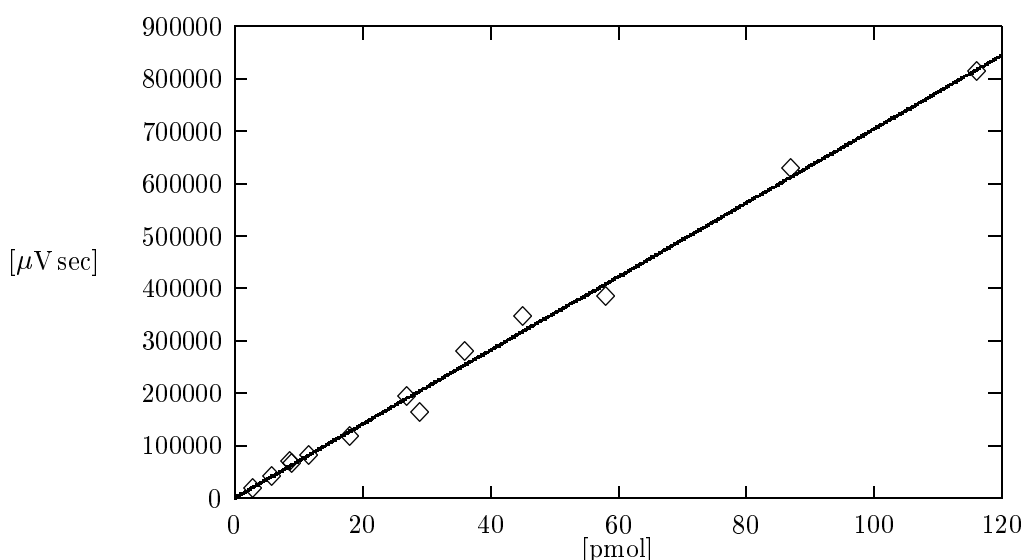


Abbildung 5.2.: Eichgerade des USP mittels RP-HPLC

Bei der linearen Regression wurde die Gerade durch den Achsennullpunkt gezwungen. Es ergab sich für die Funktion

$$ax = y \text{ eine Steigung von } a = 7040.83 \pm 104.58 \frac{\mu\text{V sec}}{\text{pmol}} \quad (5.3)$$

²Die Signalfäche errechnet sich aus dem Integral der Signalstärke in μV über der Zeit in Sekunden.

Der reverse sequencing Primer RSP

Der *reverse sequencing primer* RSP schließt mit dem 5'-Ende der *multiple cloning site* vieler Plasmide und Vektoren ab. Dieses Oligonucleotid wurde für die Polymerase Kettenreaktion verwendet. Der RSP hat sechzehn Basen und eine Molmasse von $4\,874.13\text{ g mol}^{-1}$. Der *Primer* besitzt folgende Sequenz:

5'-AAC AGC TAT GAC CAT G-3'

Der molare Extinktionskoeffizient wurde mit $175\,000$ berechnet. Ein Maximum der UV-Absorption liegt bei 258 nm .

Der reverse sequencing Primer RP(-60)

Da die Molmasse des Amplikons vom USP und dem RSP für MALDI-TOF-Untersuchungen relativ hoch war, wurde ein zweiter reverser *Primer* synthetisiert. Er hybridisiert mit der *multiple cloning site* von M13mp18. Mit dem USP wird durch den RP(-60) ein 60 Basen langes Fragment bei der PCR amplifiziert.

Der reverse *Primer* RP(-60) hat eine Molmasse von $5\,211.31\text{ g mol}^{-1}$ und ist siebzehn Basen lang. Das Oligonucleotid hat folgende Sequenz:

5'-CCG GGG ATC CTC TAG AG-3'

Für den molaren Extinktionskoeffizienten wurde ein Wert von $191\,000$ errechnet. Es wurde ein Maximum im UV-Spektrum bei 257 nm beobachtet.

Das Template T₅₀

Wie aus Abbildung 5.1 hervor geht, wurde ein Oligonucleotid als *Template* synthetisiert, das überlappend mit dem *universal sequencing primer* hybridisiert. Bei diesem Oligonucleotid handelt es sich um ein 50 Basen langes DNA-Fragment. Das *fill-in*-Produkt mit dem USP ist ein 27 Basen langes Oligonucleotid. Die zehn Basen am 5'-Ende wurden so gewählt, daß das Oligonucleotid möglichst keine intramolekularen Sekundärstrukturen ausbilden kann und ist deshalb kein Fragment der *multiple cloning site* von M13mp18 oder pUC19.

Die Molmasse des T₅₀ beträgt $15\,336.6\text{ g mol}^{-1}$. Das Oligonucleotid besitzt folgende Sequenz:

5'-TTG CGT ACA CAC TGG CCG TCG TTT TAC AAC GTC GTG ACT-
GGG AAA ACC CT-3'

Der molare Extinktionskoeffizient wurde mit $518\,000$ berechnet. Ein Maximum im UV-Spektrum lag bei 257 nm .

Das Amplikon A₆₀

Setzt man den USP und den RP(-60) mit M13mp18 in einer PCR ein, so erhält man ein 60 Basenpaar langes DNA-Fragment. Zu Vergleichszwecken wurde das vom USP ausgehende einzelsträngige Amplikon A₆₀ synthetisiert. Es hat eine Molmasse von 18 495,6 g mol⁻¹ und folgende Sequenz:

5'-GTA AAA CGA CGG CCA GTG CCA AGC TTG CAT GCC TGC AGG-
TCG ACT CTA GAG GAT CCC CGG-3'

Ein Maximum im UV-Spektrum wurde bei 259,5 nm gemessen. Der molare Extinktionskoeffizient wurde mit 644 000 berechnet.

Das Fill-In-Produkt P₂₇

Durch die Verlängerung des USP an T₅₀ in Gegenwart von Polymerasen und dNTPs entsteht das *fill-in*-Produkt P₂₇, das zu Vergleichszwecken ebenfalls synthetisiert wurde. Das 27 Basen lange Fragment hat eine Molmasse von 8 342,28 g mol⁻¹ und besitzt folgende Sequenz:

5'-GTA AAA CGA CGG CCA GTG TG TAC GCA A-3'

Der molare Extinktionskoeffizient beträgt 308 000. Ein UV-Maximum wurde bei 257 nm gemessen. Das *fill-in*-Produkt P₂₇ ist kein Fragment der *multiple cloning site* von M13mp18 oder pUC19.

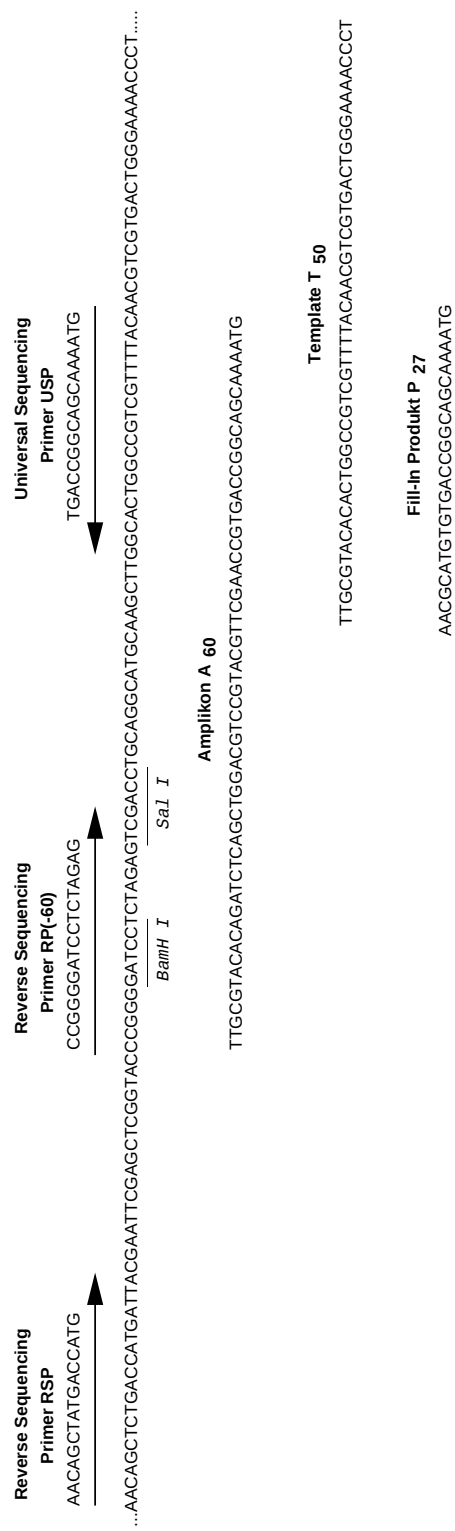


Abbildung 5.3.: Die *multiple cloning site* von M13mp18 und die Lage der Oligonucleotide und Restriktionsschnitte

5.1.3. Die Retritylierungen

Zur Einführung einer terminalen Aminogruppe wurden die festphasengebundenen *Primer* USP **32** und λ_1 **33** mit aktivierten Estern in Form von Tritylchloriden retrityliert [41, 69]. Dazu wurden die Trityl-Lösungen mit einer Einweg-Tuberkulin-Spritze aufgezogen und auf die CPG-Säulen gesteckt. Das andere Ende der Säulen wurde ebenfalls mit einer Tuberkulin-Spritze verschlossen. Während der Reaktion wurden die Lösungen periodisch von den beiden Spritzen aufgezogen. Die tritylierten Oligonucleotide wurden dann mit Nucleophilen umgesetzt, vom CPG-Träger abgespalten, entschützt und aufgereinigt.

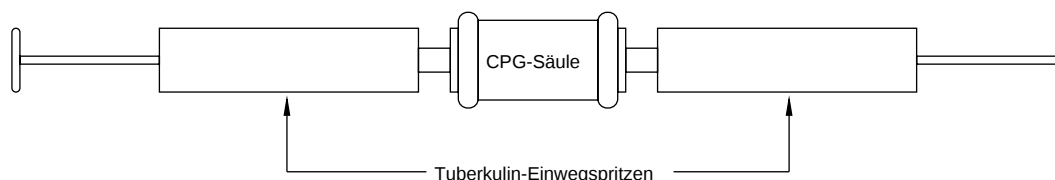
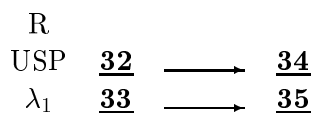
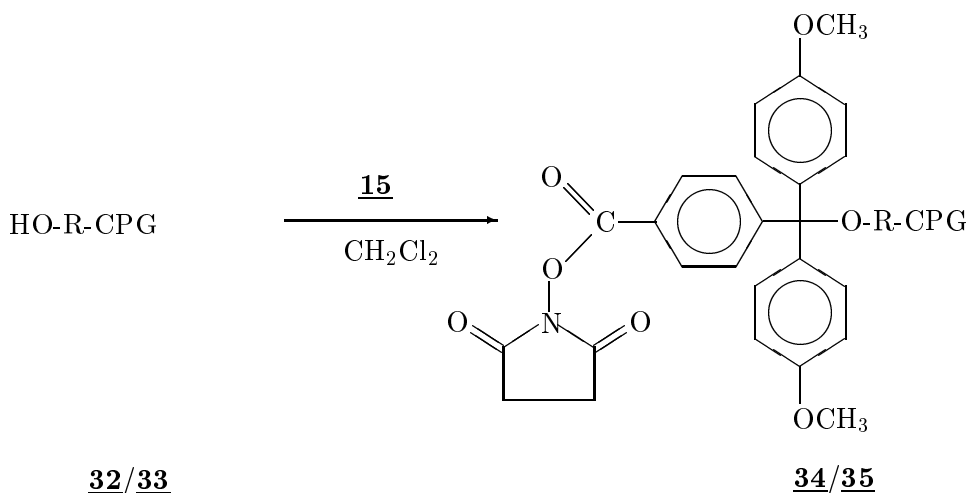


Abbildung 5.4.: Versuchsaufbau der Retritylierung

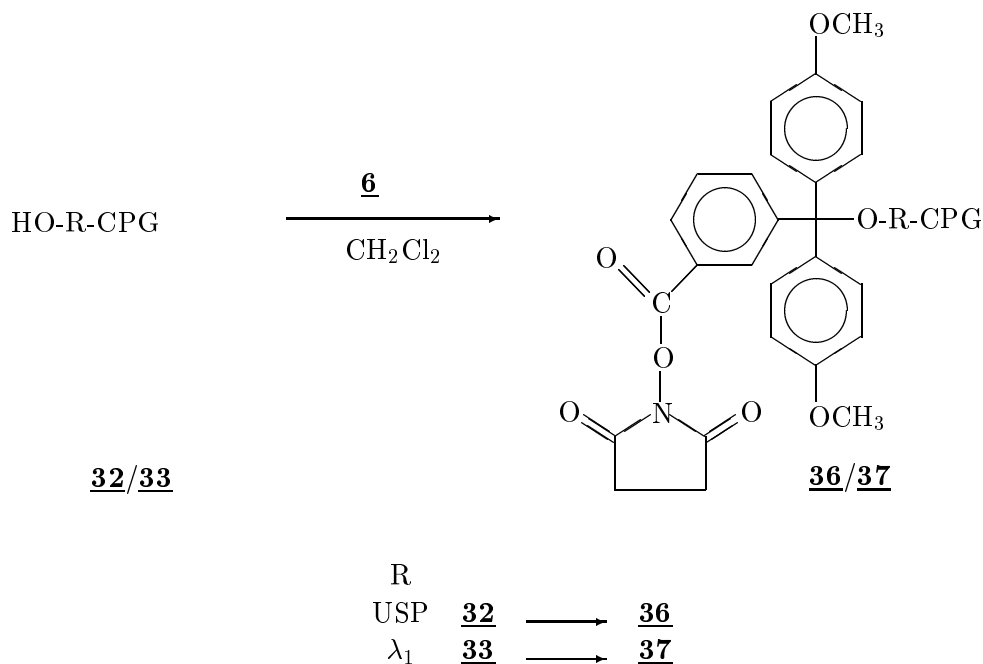
Reaktionen mit den N-Succinimidyl-Estern



Umsetzung mit N-Succinimidyl-4-[bis-(4-methoxyphenyl)]-chlormethylbenzoat:
 Der *universal sequencing primer* USP **32** und der *Primer* λ_1 **33** wurden nach der

Phosphoamidit-Methode im 1 μ mol-Maßstab synthetisiert. Die 5'-DMT-Gruppen wurden abgespalten, die Oligonucleotide am CPG belassen. Zur Retrikylierung wurde eine Lösung von **15**, Tetrabutylammoniumperchlorat und *sym.*-Collidin in Dichlormethan mit dem festphasengebundenen Oligonucleotiden **32** und **33** 50 Minuten in Kontakt gebracht. Nach den Reaktionen wurden die Lösungen mit einer der Spritzen aus der CPG-Säule entfernt³. Das CPG wurde mit Dichlormethan gewaschen und an der Luft getrocknet.

Die Aufgabe des Tetrabutylammoniumperchlorats besteht in der Stabilisierung des Trityl-Kations. Das *sym.*-Collidin fängt das während der Reaktion freiwerdende HCl ab [69].



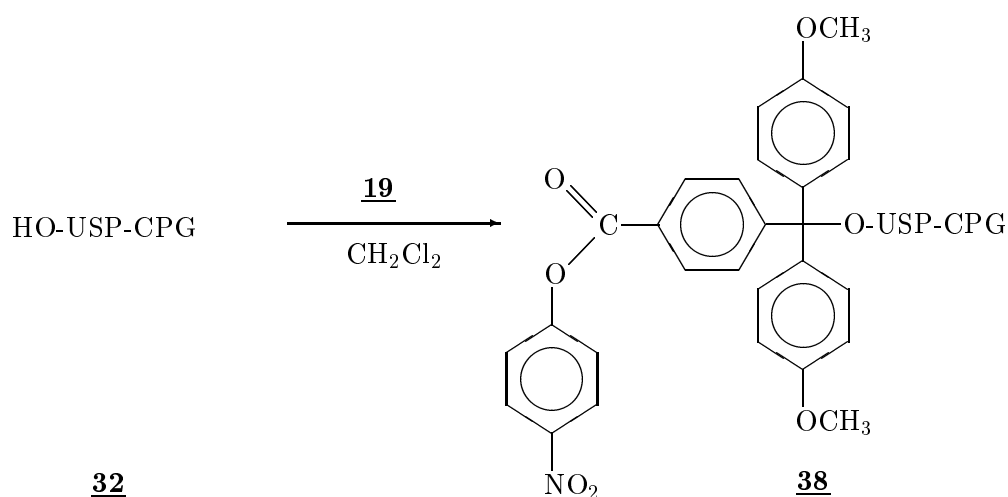
Umsetzung mit N-Succinimidyl-3-[bis-(4-methoxyphenyl)]-chloromethylbenzoat:

Zur Darstellung der *meta*-Verbindungen **36** und **37** wurden die festphasengebundenen *universal sequencing primer* **32** und λ_1 **33** analog zu den *para*-Verbindungen **34** und **35** am CPG umgesetzt. Dazu wurden das Chlorid **6**, *sym.*-Collidin und Tetrabutylammoniumperchlorat in Dichlormethan gelöst und mit dem festphasengebundenen Oligonucleotid **32** zur Reaktion gebracht. Bei Retrikylierungen mit dem aktivierten Ester **6** mußten die Lösungen stets frisch angesetzt werden.

Die Reaktionszeit betrug 50 Minuten. Die Reaktion wurde in einem Aufbau nach Abbildung 5.4 durchgeführt. Nach dem Entfernen der Reaktionslösung wurde das CPG mit Dichlormethan gespült und an der Luft getrocknet. Dazu wurde durch die CPG-Säule mit einer Einwegspritze Luft geblasen, bis der feste Träger trocken war, was an einer deutlichen Aufhellung des CPGs beobachtet werden konnte.

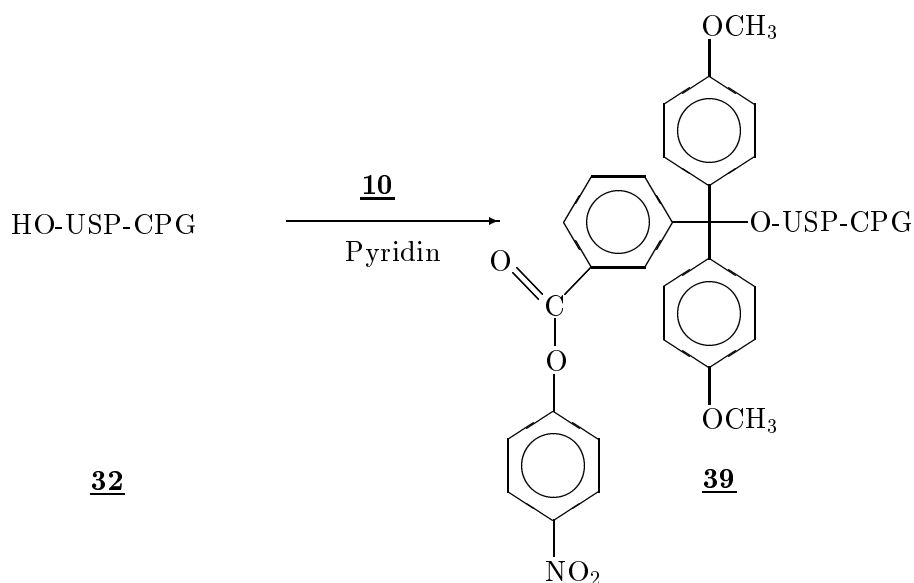
³Die Lösungen ließen sich für weitere Retrikylierungen bis zu zwei Tage lang verwenden.

Reaktionen mit den para-Nitrophenyl-Estern



Umsetzung mit para-Nitrophenyl-4-[bis-(4-methoxyphenyl)]-chlormethylbenzoat: Ebenfalls analog zur Synthese des tritylierten Oligonucleotids **34** konnte das *para*-nitrophenylierte Produkt **38** dargestellt werden. Das Chlorid **19** wurde in Gegenwart von Tetrabutylammoniumperchlorat und *sym.*-Collidin in Dichlormethan gelöst und 50 Minuten mit dem festphasengebundenen *universal sequencing primer* **32** umgesetzt. Das CPG wurde anschließend ausgiebig mit Dichlormethan gespült und an der Luft getrocknet.

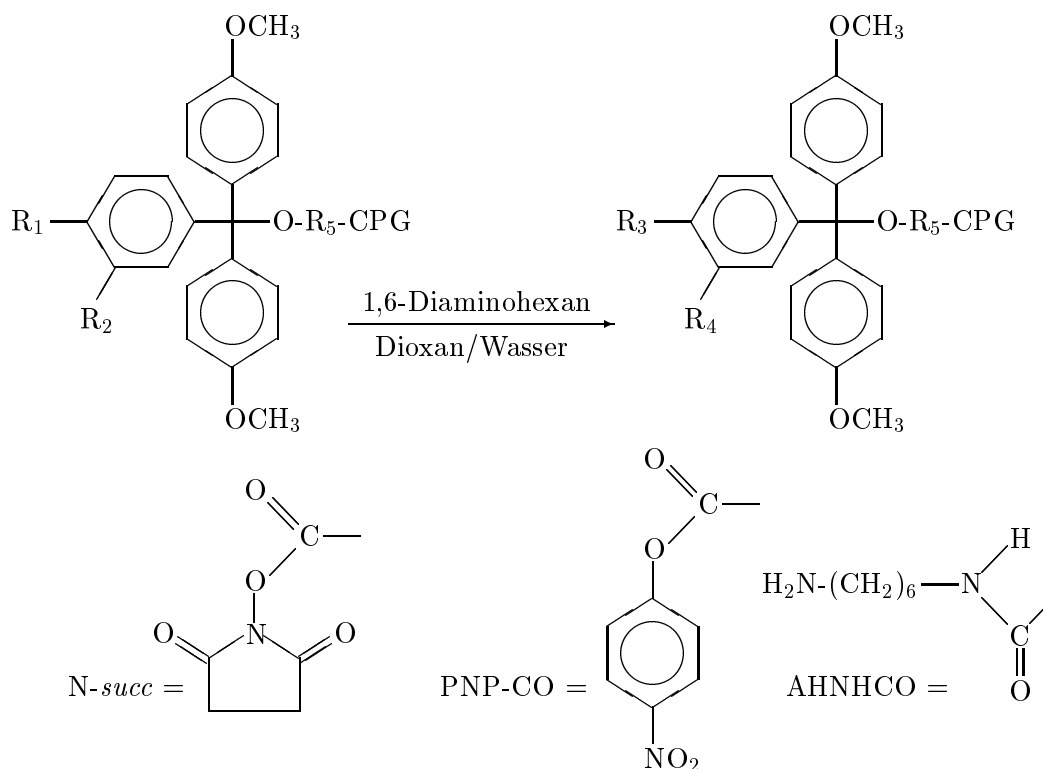
Alle Reaktionen wurden in einem Aufbau wie in Abbildung 5.4 dargestellt durchgeführt.



Umsetzung mit *para*-Nitrophenyl-3-[bis-(4-methoxyphenyl)]-chlormethylbenzoat:

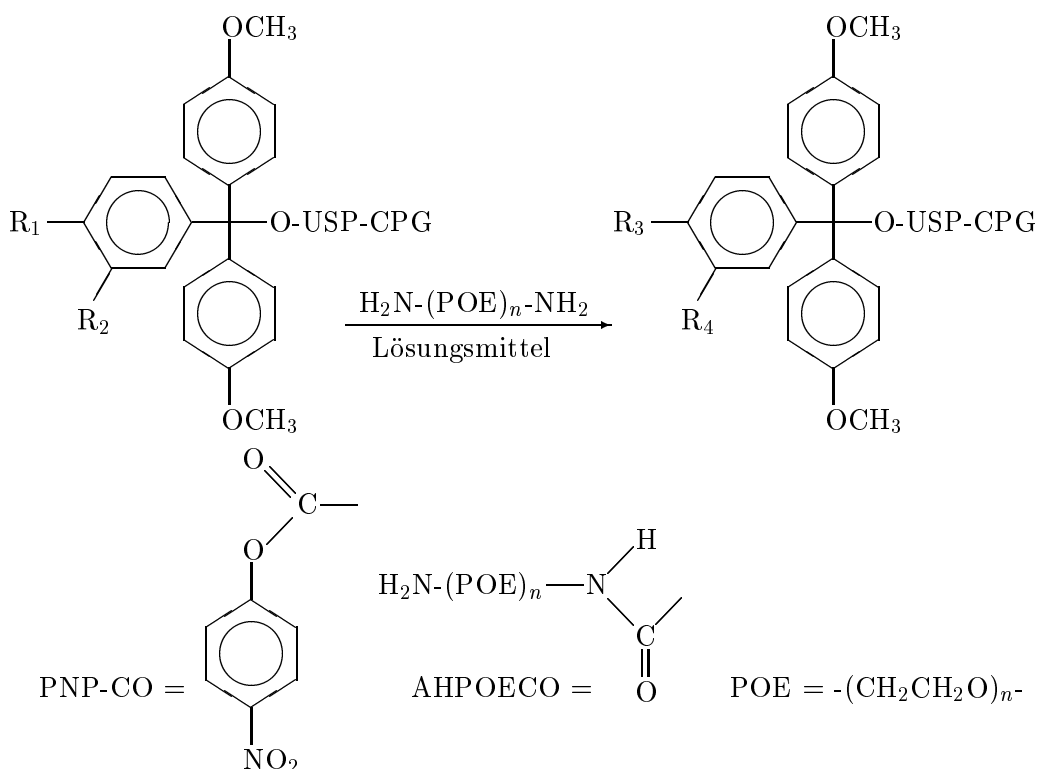
Im Gegensatz zur Umsetzung mit dem Tritylchlorid **19** zum *Primer* **38** gelang die Umsetzung des aktivierten Esters **10** zum festphasengebundenen Oligonucleotid **39** nicht ohne Probleme. Die Verbindung **10** ist in Dichlormethan extrem schlecht löslich. Um Reaktionen mit CPG-gebundenen Oligonucleotiden durchführen zu können, war es notwendig, den festen Träger zunächst in frisch getrocknetem Pyridin vorzulegen und dann den aktivierten Ester **10** zuzufügen. Das CPG wurde vorsichtig geschüttelt – um Zerstörungen durch Reibung zu verhindern – und anschließend über eine Fritte filtriert. Es wurde mit Pyridin und Dichlormethan gewaschen und an der Luft getrocknet.

5.1.4. Aminolysen der aktivierten Ester



	R ₁	R ₂		R ₃	R ₄	R ₅
34	N- <i>succ</i>	H	→	40	AHNHCO	H
36	H	N- <i>succ</i>	→	41	H	AHNHCO
35	N- <i>succ</i>	H	→	42	AHNHCO	H
37	H	N- <i>succ</i>	→	43	H	AHNHCO
38	PNPCO	H	→	44	AHNHCO	H
39	H	PNPCO	→	45	H	AHNHCO

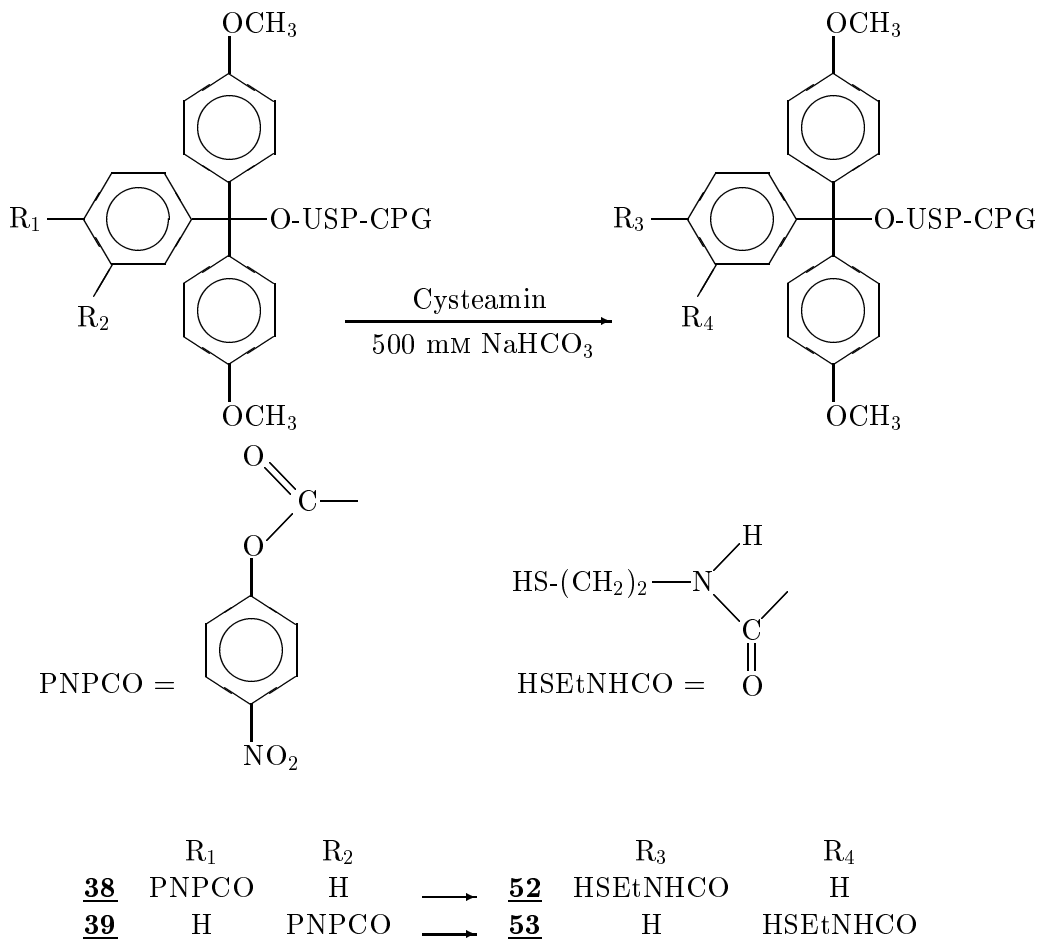
Umsetzungen mit 1,6-Diaminohexan: Die Reaktion mit 1,6-Diaminohexan erfolgte ebenfalls in einer Konstruktion wie in Abbildung 5.4 gezeigt. Die Reaktion verlief sowohl in Wasser als auch in Dioxan-Wasser-Gemischen erfolgreich. Eine Hydrolyse der aktivierten Ester 5,9,14 und 18 konnten in dünnsschichtchromatographischen Versuchen in 1 M 1,6-Diaminohexan-Lösung in Wasser nicht nachgewiesen werden. Die Gründe liegen in der geringeren Konzentration und der niedrigeren Nucleophilie der OH^- -Ionen. Im Allgemeinen wurden die Reaktion mit einem Lösungsmittelgemisch von Dioxan : Wasser = 9 : 1 durchgeführt.



	R ₁	R ₂		R ₃	R ₄	n	Lösungsmittel			
							Dioxan	Wasser	TEA	
<u>38</u>	PNPCO	H	→	<u>46</u>	AHPOECO	H	45	9	1	0.02
<u>38</u>	PNPCO	H	→	<u>47</u>	AHPOECO	H	68	9	0.9	0.1
<u>38</u>	PNPCO	H	→	<u>48</u>	AHPOECO	H	136	9	0.9	0.1
<u>39</u>	H	PNPCO	→	<u>49</u>	H	AHPOECO	45	9	1	0.02
<u>39</u>	H	PNPCO	→	<u>50</u>	H	AHPOECO	68	9	0.9	0.1
<u>39</u>	H	PNPCO	→	<u>51</u>	H	AHPOECO	136	9	0.9	0.1

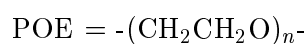
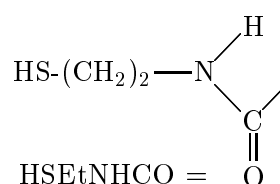
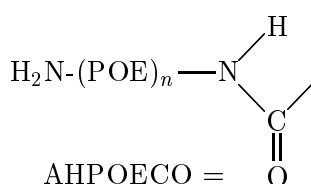
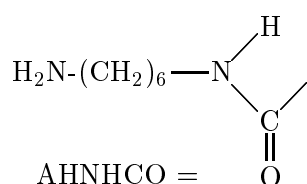
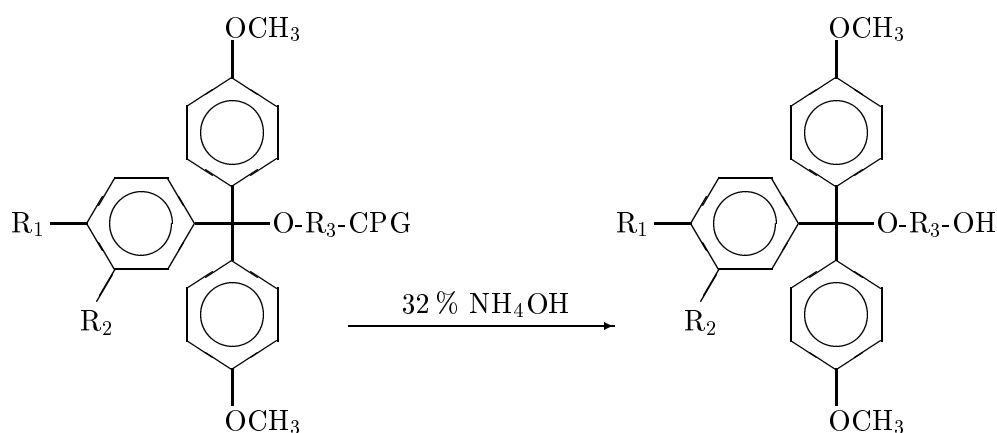
Umsetzungen mit Polyoxyethylendiaminen: Zur Vergrößerung des Abstandes zwischen Oligonucleotid und Membran wurden Versuche mit langkettigen Diaminen gemacht. Bei den Diaminen handelte es sich um Polyoxyethylendiamine. Die durchschnitt-

liche Anzahl der Oxyethylen-Gruppen ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$) ist mit n angegeben. Zur Erhöhung der Nucleophilie wurden die Lösungen mit Triethylamin versetzt. Die Reaktionszeit betrug eine Stunde. Die festphasengebundenen *Primer* wurden anschließend mit Wasser bis zur Neutralität gewaschen. Wie die anderen Derivatisierungen, wurden auch die Versuche in dem in Abbildung 5.4 gezeigten Versuchsaufbau durchgeführt.



Umsetzungen mit Cysteamin: Nachdem gezeigt werden konnte, daß die Anbindung von Cystamin an aktivierte Ester abhängig vom pH-Wert ist, wurde die Reaktion in 500 mM NaHCO_3 bei einem pH-Wert von 8.4 durchgeführt. Zur Aminolyse des Esters wurde das CPG 30 Minuten geschüttelt, über eine Fritte filtriert und mit Wasser neutral gewaschen. Der feste Träger wurde mit Ethanol gespült und an der Luft getrocknet.

5.1.5. Abspaltung, Entschützung und Aufreinigung der Oligonucleotide



	R ₁	R ₂	R ₃	n		
34	AHNHCO	H	USP		→	54
35	AHNHCO	H	λ ₁		→	55
36	H	AHNHCO	USP		→	56
37	H	AHNHCO	λ ₁		→	57
46	AHPOECO	H	USP	45	→	58
47	AHPOECO	H	USP	68	→	59
48	AHPOECO	H	USP	136	→	60
49	H	AHPOECO	USP	45	→	61
50	H	AHPOECO	USP	68	→	62
51	H	AHPOECO	USP	136	→	63
52	HSEtNHCO	H	USP		→	64
53	H	HSEtNHCO	USP		→	65

Abspaltung: Die Abspaltung der Oligonucleotide vom CPG erfolgte mit 32 % NH₃. Zur Reaktion wurde der feste Träger zweimal mit der ammoniakalischen Lösung 30 Minuten in dem in Abbildung 5.4 gezeigten Aufbau behandelt. Die zweite Behandlung mit dem Ammoniak diente in erster Linie dem Spülen des CPGs.

Entschützung: Die Entschützung der *Primer* erfolgte ebenfalls mit 32 % NH_3 . Die Cyanoethylgruppen des Phosphats werden bereits bei der Abspaltung als Acrylnitril eliminiert. Die Benzoyl- und *iso*-Butyryl-Basenschutzgruppen wurden durch eine zwanzigstündige Behandlung der ammoniakalischen Lösung bei 55 °C hydrolysiert.

Aufreinigung: Bei der Aufreinigung der abgespaltenen Produkte wurden die tritylierten Verbindungen von den Rumpf- und Fehlsequenzen abgetrennt. Außerdem fand eine Umsalzung statt, da bei der späteren Membrananbindung Ammoniumionen stören. Es wurden drei unterschiedliche Methoden verwendet:

- Aufreinigung mit OligoPakTM-Säulen: Nach der Basenentschützung wurden die ammoniakalischen Lösungen wie in der Anleitung beschrieben auf die OligoPakTM-Säulen gegeben. Anstelle des Detritylierungsschrittes mit Trifluoressigsäure wurden die tritylierten Oligonucleotide mit 40 % Acetonitril in 100 mM Triethylammoniumacetat pH 7.0 eluiert.

Für die folgenden Methoden wurden die Oligonucleotide zunächst mit Butanol aus der ammoniakalischen Lösung gefällt. Mit diesem Verfahren ließ sich ein Großteil der bei der Entschützung freigewordenen Benzoesäure von den *Primern* abtrennen. Die Pellets wurden in 5 % Acetonitril in 100 mM Triethylammoniumacetat pH 7.0 gelöst.

- Aufreinigung über RP-HPLC: Die tritylierten Oligonucleotide konnten im Nanomol-Maßstab mit einer analytischen HPLC von den Rumpfsequenzen und dem untritylierten USP abgetrennt werden. Dabei wurde eine Gradientenelution von 5 bis 40-% Acetonitril in 100 mM Triethylammoniumacetat pH 7.0 über einen Zeitraum von 40 Minuten durchgeführt. Mit einer präparativen HPLC-Anlage wurden Oligonucleotide im Mikromol-Maßstab aufgereinigt.
- Aufreinigung mit den Membranfiltern 5000 NMWLTM: Da die polyoxyethylierten Oligonucleotide sich nicht über die OligoPakTM-Säulen aufreinigen ließen und die HPLC-Chromatogramme nicht eindeutig interpretierbar waren, wurden die *Primer* mit den Membranfiltern 5000 NMWLTM der Firma Millipore aufgereinigt. Dabei sind die Membrane für Moleküle mit einer Molmasse $M < 5\,000$ Da durchlässig. Die höhermolekularen Produkte werden bei der Zentrifugation zurückgehalten und anschließend mit Puffer von den Membranen eluiert.

5.1.6. Charakterisierung der Oligonucleotide

HPLC

Zur Charakterisierung der Oligonucleotide wurde eine *reversed phase* HPLC durchgeführt. Dabei wurde ein Gradient aus folgenden Puffersystemen verwendet:

- Puffer A: 5 % (v/v) Acetonitril in 100 mM Triethylammoniumacetat pH 7.0.
- Puffer B: 40 % (v/v) Acetonitril in 100 mM Triethylammoniumacetat pH 7.0.

Der Gradient wurde über einen Zeitraum von 40 Minuten kontinuierlich von 0 % B auf 100 % B erhöht. Bei der verwendeten Säule der Firma Waters⁴ betrugen die Retentionszeiten für Oligonucleotide ohne DMT-Gruppe etwa zehn Minuten. Die Oligonucleotide mit den unsubstituierten Dimethoxytritylgruppen wurden nach ca. 25 Minuten detektiert. Handelte es sich bei den Oligonucleotiden um 54,55,56 oder 57, betrugen die Retentionszeiten ungefähr 20 Minuten, wobei die kürzeren Oligonucleotide etwas später eluierten, als die um acht Basen längeren λ -Primer. Die Ursache für dieses Verhalten ist in dem relativ größeren Einfluß der Tritylgruppen auf kurzkettige Oligonucleotide zu suchen. Je länger die tritylierten Oligonucleotide werden, desto kleiner wird der Einfluß der unpolaren Dimethoxytritylgruppen. Die unsubstituierten und die derivatisierten Oligonucleotide nähern sich in ihrer Polarität immer stärker an. Die im Vergleich zu den unsubstituierten Dimethoxytrityl oligonucleotiden kürzeren Retentionszeiten sind auf den polaren Charakter der Amid- und Aminogruppen zurückzuführen.

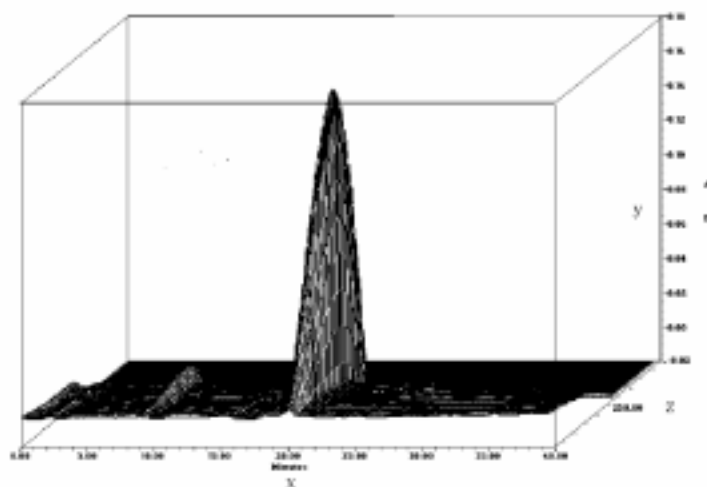


Abbildung 5.5.: 3D-Darstellung der HPLC-Ergebnisse durch einen Photodiodenarray

Abbildung 5.5 zeigt die dreidimensionale Darstellung einer repräsentativen Trennung über HPLC. Die Daten wurden mit einem Photodiodenarray als Detektor aufgenommen. Die x -Achse bildet den zeitlichen Verlauf über 40 Minuten ab, die y -Achse zeigt die Absorption und die z -Achse stellt die Wellenlänge von 200 bis 300 nm dar. Bei der Probe handelte es sich um den aminohexylierten, tritylierten *universal sequencing primer* 54.

Abbildung 5.6 zeigt das Chromatogramm aus Abbildung 5.5 bei einer Wellenlänge von 254 nm. Das untritylierte Oligonucleotid hat in diesem Fall eine Retentionszeit von 8.1 Minuten. Das Produkt 54 wurde nach 20.1 Minuten detektiert. Das Maximum an unsubstituiert-tritylierten Oligonucleotiden eluierte nach 24.7 Minuten.

⁴39 x 300 mm Nova Pak C 18, 60 Å, 4 µm Partikel

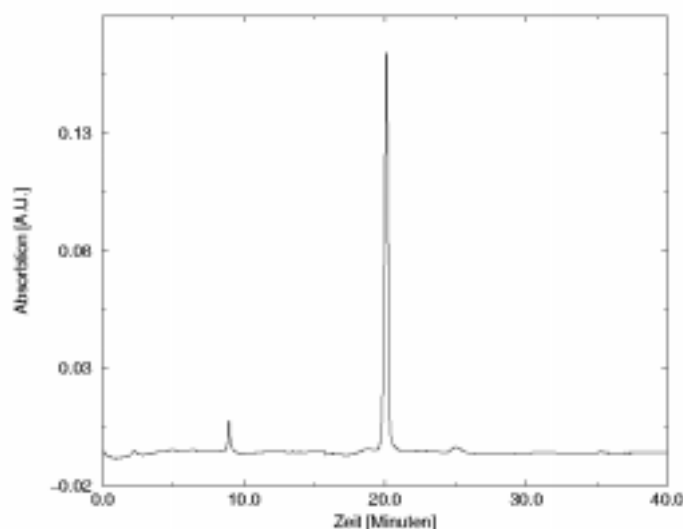


Abbildung 5.6.: 2D-Darstellung der HPLC-Ergebnisse bei 254 nm

UV-Spektroskopie

Zur Quantifizierung wurden die Oligonucleotide mit Reinstwasser verdünnt und in Quarzküvetten im UV-Bereich vermessen (siehe Abbildung 5.7). Dazu wurde ein Meßbereich von 200 bis 300 nm durchlaufen⁵.

Unter Berücksichtigung der Verdünnung konnten aus den bei 260 nm ermittelten Werten mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten ϵ die Oligonucleotidkonzentrationen errechnet werden. Unabhängig von der Art der Trityl-Verbindungen wurden Ausbeuten um 10 % erreicht. Die Lösungen wurden mit Wasser oder Puffer auf Konzentrationen von 100 bzw. 50 pmol μl^{-1} eingestellt.

MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Für die MALDI-TOF-Spektrometrie wurden die Oligonucleotide auf eine Konzentration von 10 pmol μl^{-1} mit Reinstwasser verdünnt. Je 500 nl dieser Lösungen wurden mit je 500 nl Matrix [70–72] versetzt. Als Matrix diente eine 3-Hydroxypicolinsäure-Lösung⁶:

⁵Eine einfache Messung bei einer Wellenlänge von 260 nm stellt nicht sicher, daß die Absorption nur vom Oligonucleotid verursacht wurde. Unreine, stark salzhaltige Proben täuschen einen höheren DNA-Anteil vor.

⁶70 mg HPA und 10 mg Ammoniumdihydrogencitrat werden in 70 μl Acetonitril : Wasser = 1 : 1 gelöst.

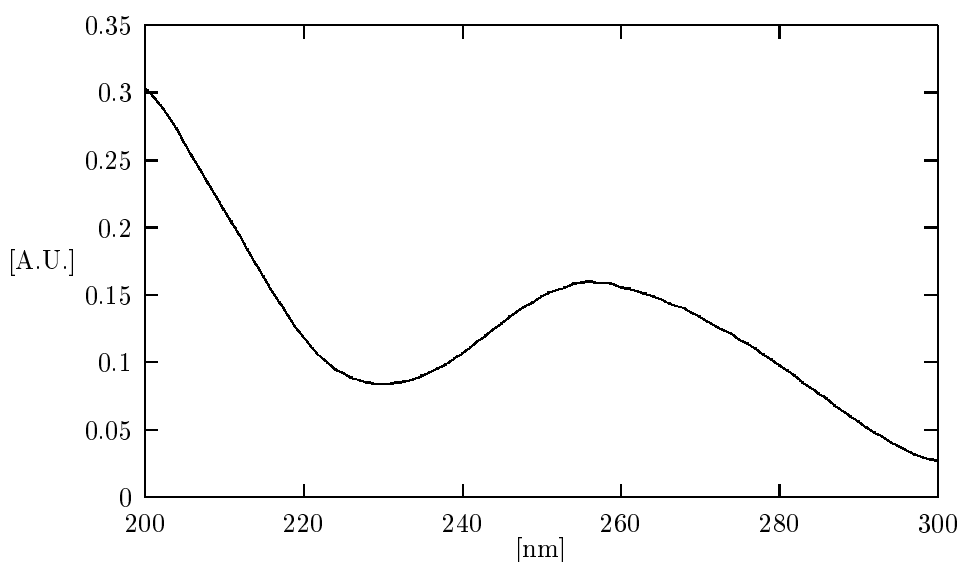
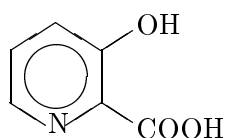


Abbildung 5.7.: UV-Spektrum von **54** in Wasser



Die Berechnungen der Molmassen der Oligonucleotide erfolgte mit den Programmen `olimass.tcl` und `olimass.pl`. Der *source-code* ist im Anhang aufgelistet. Für die aminohexylierten Trityl oligonucleotide **54** und **56** wurde eine Molmasse von $5\,672.90\text{ g mol}^{-1}$ errechnet.

In Abbildung 5.9 sind deutliche Spuren von Detritylierungen und Depurinierungen erkennbar. Ob die Etherspaltung durch die Einwirkung des Lasers oder die Acidität der Matrix verursacht wurde, konnte nicht ermittelt werden.

Gel-Elektrophoresen

Zur Untersuchung der hochmolekularen Oligonucleotide **58-63** wurden Polyacrylamid-gelelektrophoresen durchgeführt. Dabei handelte es sich um denaturierende Harnstoffgele mit 20 % Polyacrylamidgehalt und folgender Zusammensetzung:

- 5 ml 40 % Acrylamid-Lösung
- 3.5 ml Reinstwasser
- 10 μl TEMED

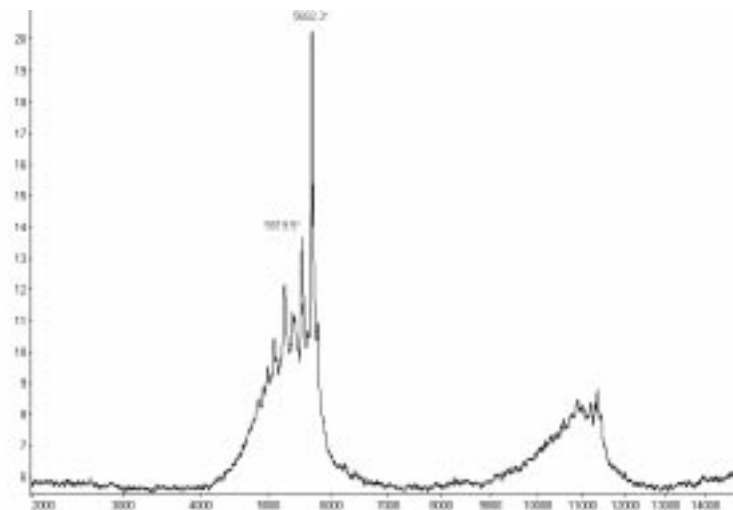


Abbildung 5.8.: MALDI-TOF-Spektrum von 54

- 1 ml 10 x TBE-Puffer
- 4.2 g Harnstoff
- 500 μ l 1 % APS-Lösung

An das Gel wurde zunächst zehn Minuten eine Spannung von 80 V gelegt, die dann auf 150 V erhöht wurde. Nach 1.5 Stunden wurde die Elektrophorese beendet. Das Anfärben der DNA-Banden erfolgte mit 0.1 % Methyleneblau in 500 mM Natriumacetat-Puffer bei pH 5.2 über einen Zeitraum von 30 Minuten [73]. Anschließend wurde das Gel 45 Minuten mit Wasser gewaschen. Nucleinsäuren treten als blaue Banden hervor. Alternativ wurden die Nucleinsäure-Banden auch mit *stains all*⁷ sichtbar gemacht [74].

Das Gel in Abbildung 5.10 enthält als Längenstandards pBR322/*Hae* III- (linke Spur) und pBR322/*Msp* I-*digest* (rechte Spur).

5.2. Die Vektoren

Für die Polymerase-Kettenreaktion wurden im Verlauf dieser Arbeit unterschiedliche Nucleinsäuren als Matrix-DNA verwendet. Dabei handelte es sich sowohl um cyclische als auch um lineare Nucleinsäuren, die auch als Klonierungsvektoren Anwendung finden. Zur Etablierung der PCR wurden die ersten Experimente mit der linearen λ -DNA gemacht. Später wurden aus Kompatibilitätsgründen die Versuche an das *universal sequencing primer*-System angepaßt.

⁷ *stains all* = 1-Ethyl-2-ethyl-[3-(1-ethyl-naphto-[1,2-*d*]-thiazolin-2-yliden)-methylpropenyl]-naphto-[1,2-*d*]-thiazoliumbromid

5.2.1. λ -DNA

Der Phage Lambda (λ) besitzt ein lineares, doppelsträngiges DNA-Molekül mit einer Molmasse von $32 \cdot 10^6$ Dalton entsprechend 49 kb. An beiden 5'-Enden des Moleküls befinden sich überstehende Einzelstränge mit einer Länge von 12 Nucleotiden. Da die Basen komplementär zu einander sind, werden sie auch als kohäsive (*sticky*) Enden bezeichnet [75, 76].

5.2.2. M13mp18

Der virulente Phage M13 – er gehört der Gruppe der filamentösen Phagen an – besitzt eine einzelsträngige, zirkuläre DNA, welche in der nativen Form aus 6 407 Nucleotiden besteht. Aus dem Wildtyp-M13-Phagen wurden von MESSING eine Reihe von Klonierungsvektoren entwickelt [77, 78]. In den Polymerase-Experimenten wurde die doppelsträngige DNA M13mp18 RF⁸ eingesetzt. M13mp18 RF besteht aus 7 250 Basenpaaren.

5.2.3. pUC19

Bei den pUC-Plasmiden handelt es sich um extrem vielseitige Klonierungsvektoren [79]. Es sind zirkuläre, doppelsträngige Nucleinsäuren mit einem modifizierten Gen der Ampicillinresistenz, einem veränderten *ori* von pBR322 und einem Teil des *lacZ*-Gens von *E.coli* [80]. Die *multiple cloning site* ist der von M13mp19 identisch. Dabei unterscheidet sich diese lediglich in der Orientierung eines 54 Basen langen Fragments in der Polylinker-Region. pUC19 setzt sich aus 2686 Basenpaaren zusammen.

⁸RF = replikative Form

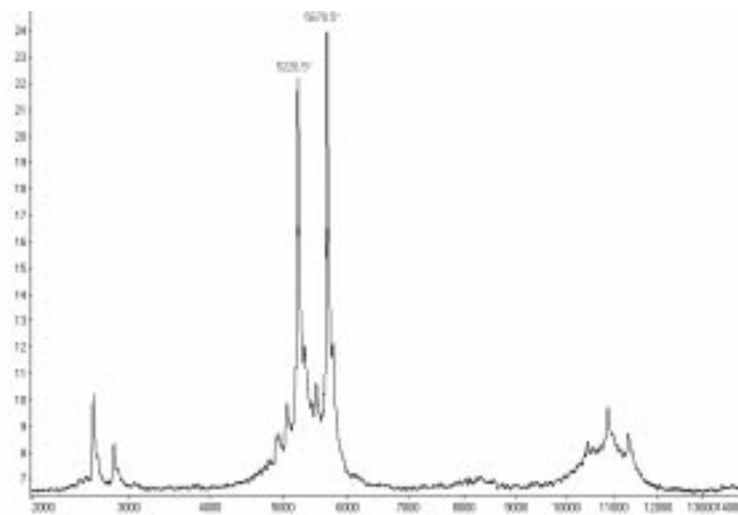


Abbildung 5.9.: MALDI-TOF-Spektrum von 55

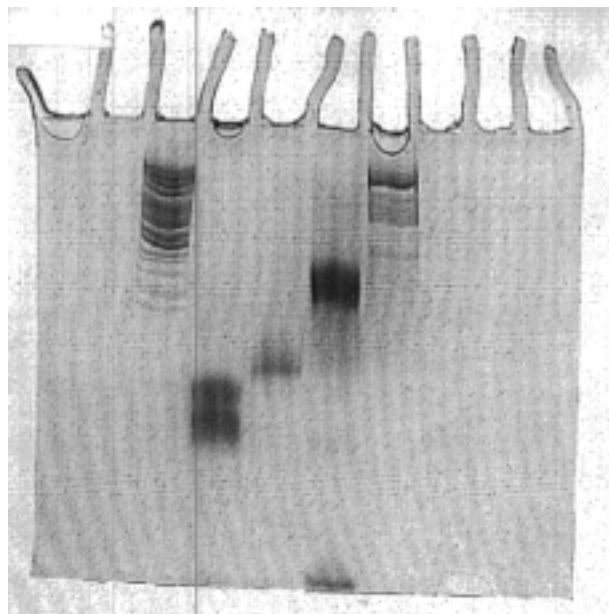


Abbildung 5.10.: PAGE von 58,59 und 60

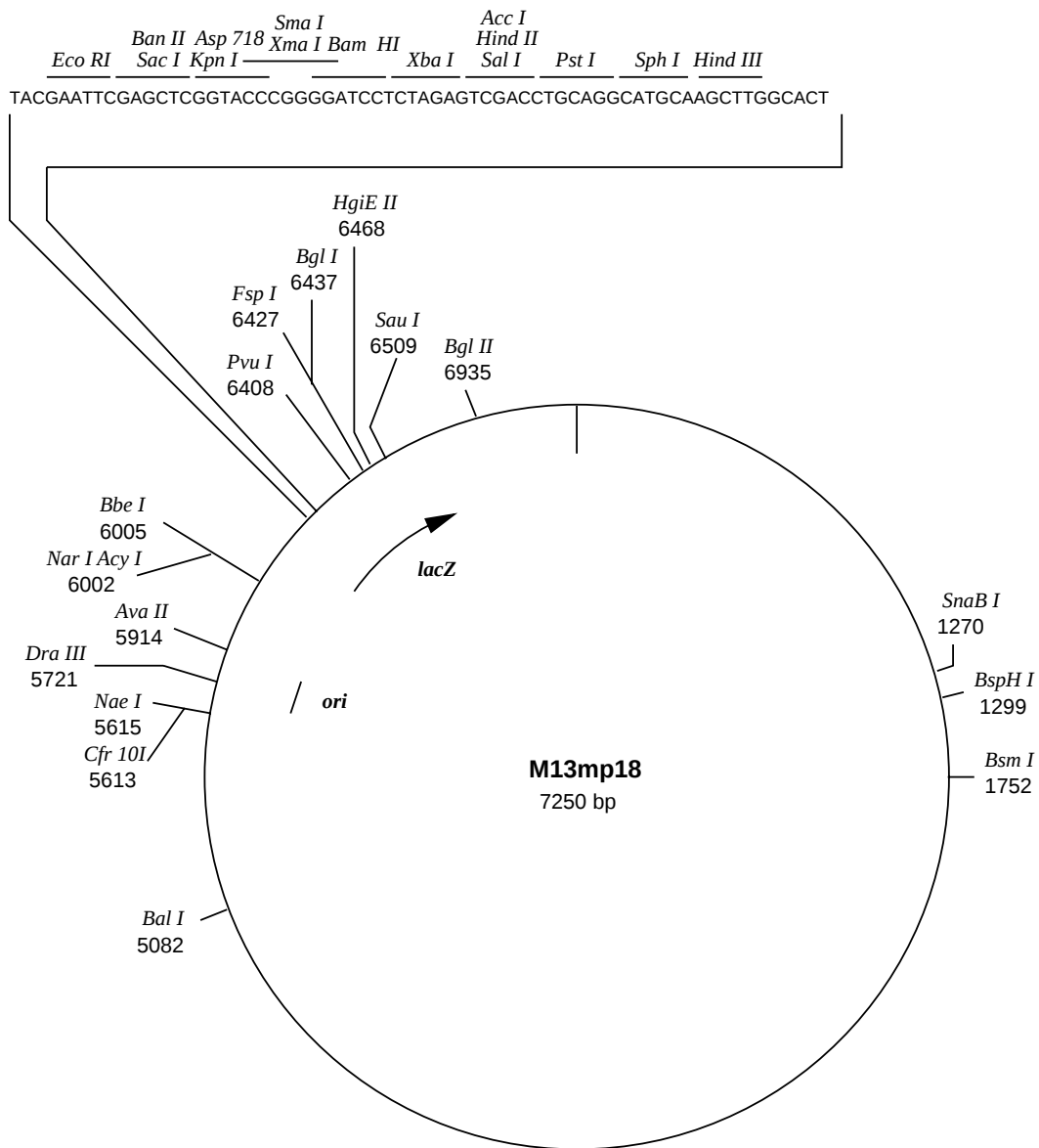


Abbildung 5.11.: Restriktionskarte und *multiple cloning site* von M13mp18

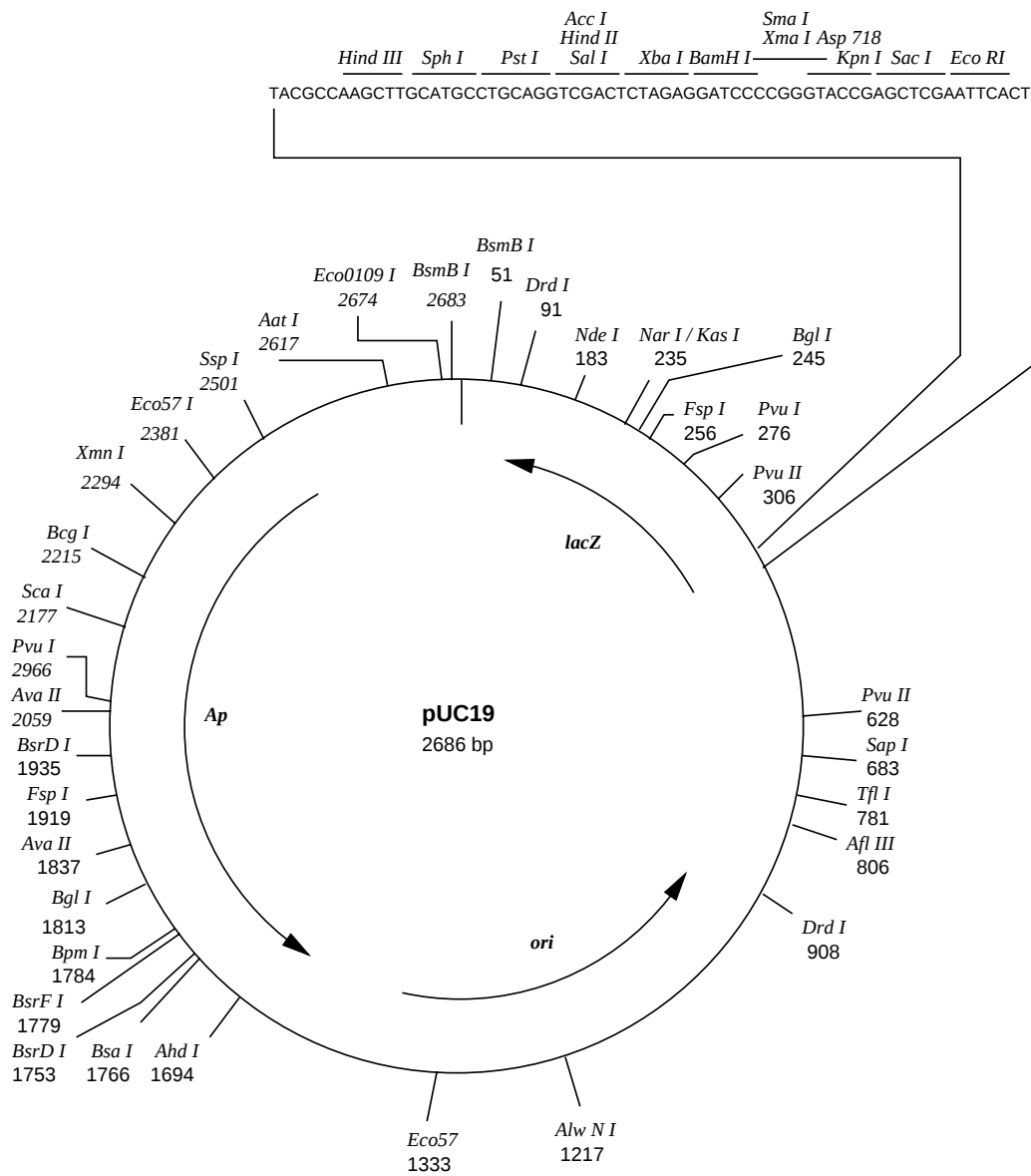


Abbildung 5.12.: Restriktionskarte und *multiple cloning site* von pUC19

6. Die Membrane

Inhaltsangabe

6.1. Die Biotyne C Membrane	53
6.1.1. Die Silent Monitor Plates des EVENT 4160-Systems	54
6.1.2. Aktivierung mit <i>para</i> -Nitrophenol	55
6.1.3. Aktivierung mit EDC	61
6.1.4. Anbindungsexperimente	61
6.1.5. Vergleich der Biotyne C Membrane mit den Silent Monitor Plates	69
6.1.6. Ergebnisse der Anbindungsexperimente	70
6.2. Die PVDF Membrane	70
6.2.1. Aktivierung mit DITC	71
6.2.2. Anbindungsexperimente	72

6.1. Die Biotyne C Membrane

Die Biotyne C Membrane sind carboxylierte Membrane auf Nylonbasis. Die verwendeten Membrane hatten einem Porendurchmesser von $0.45 \mu\text{m}$. Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen verdeutlichen die Sandwichstruktur der Membran (Abb. 6.1). An den Außenseiten befindet sich ein schwammartiges Material. Das Geflecht in der Mitte hat eine stabilisierende Funktion und scheint aus Nylon zu bestehen.

Da keine Herstellerdaten über den Carboxylierungsgrad der Membrane vorlagen, wurde ein Assay zur Quantifizierung der zugängigen Carboxylgruppen entwickelt. Dazu wurden die Membrane mit einer Lösung von *para*-Nitrophenol in Dioxan / Pyridin und einer 1 M DCC-Lösung in Dioxan versetzt. Nach einer Reaktionszeit von zwei Stunden wurden die Membrane mit Ethanol gewaschen. Die letzte Waschlösung wurde mit Ammoniak auf die Abwesenheit von *para*-Nitrophenol untersucht. Zur Abspaltung des *para*-Nitrophenolats wurden die Membrane mit 1 M KOH behandelt. Die Lösungen wurden mittels UV-VIS-Spektroskopie bei einer Wellenlänge von 397.5 nm quantifiziert. Dazu wurde eine Eichgerade mit *para*-Nitrophenol in 1 M KOH erstellt (Abb. 6.2).

Die lineare Regression lieferte für

$$ax + b = y \quad (6.1)$$

$$a = 0.020 \frac{1}{\mu\text{mol}} \quad (6.2)$$

$$\text{und } b = 0.037 \quad (6.3)$$

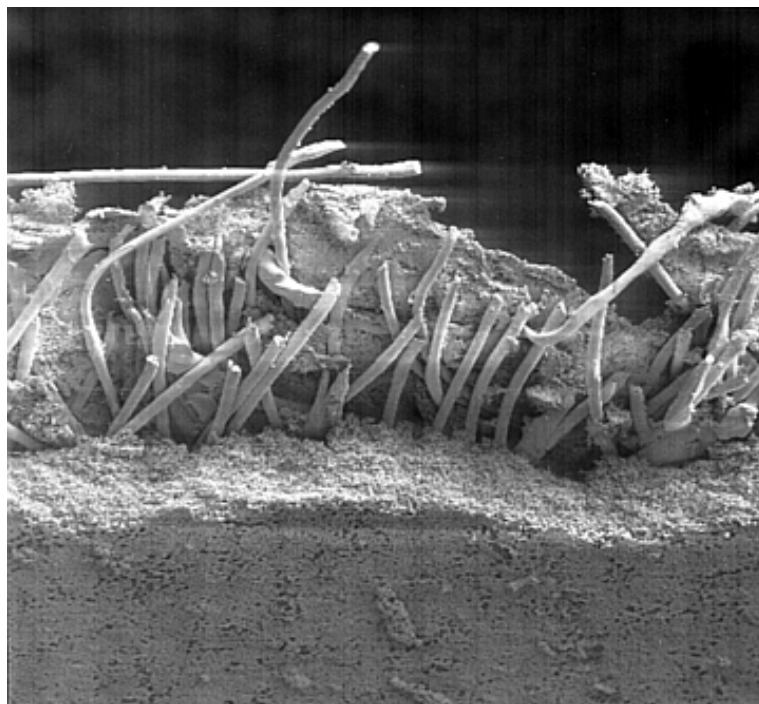


Abbildung 6.1.: Rasterelektronische Aufnahme der Biodyne C Membrane

Mit diesem Verfahren konnte ermittelt werden, daß der Beladungsgrad der Carboxylgruppen auf den Biodyne C Membranen im Bereich von 225 pmol mm^{-2} liegt. Dabei muß allerdings berücksichtigt werden, daß die Veresterung mit einem recht kleinen Molekül vorgenommen wurde. Die schwammartige Struktur der Membrane macht eine hohe Beladung mit den sterisch anspruchsvollen Oligonucleotiden unmöglich.

6.1.1. Die Silent Monitor Plates des EVENT 4160-Systems

Die Firma Eppendorf vertreibt das Produkt EVENT 4160. Dabei handelt es sich um ein Gerät, die durch membranverschlossene Multititer-Platten Flüssigkeiten absaugen kann (Abb. 6.3). Dazu wird in der Absaugkammer mit Hilfe einer Vakuumpumpe Unterdruck erzeugt. Die Firma Pall konzipierte die Multititer-Platten *Silent Monitor Plates*, die mit der Biodyne C Membran ausgestattet waren. Der Umstand, daß diese Prototypen kommerziell nicht erhältlich sind, läßt sich dadurch umgehen, daß man Biodyne C Membrane mit einem herkömmlichen Bürolocher ausstanzt und in Nylon-Membran-Multititer-Platten überführt.

Mit dieser Technik ist es möglich, mit relativ geringem Aufwand bis zu 96 Proben parallel zu verarbeiten [56].

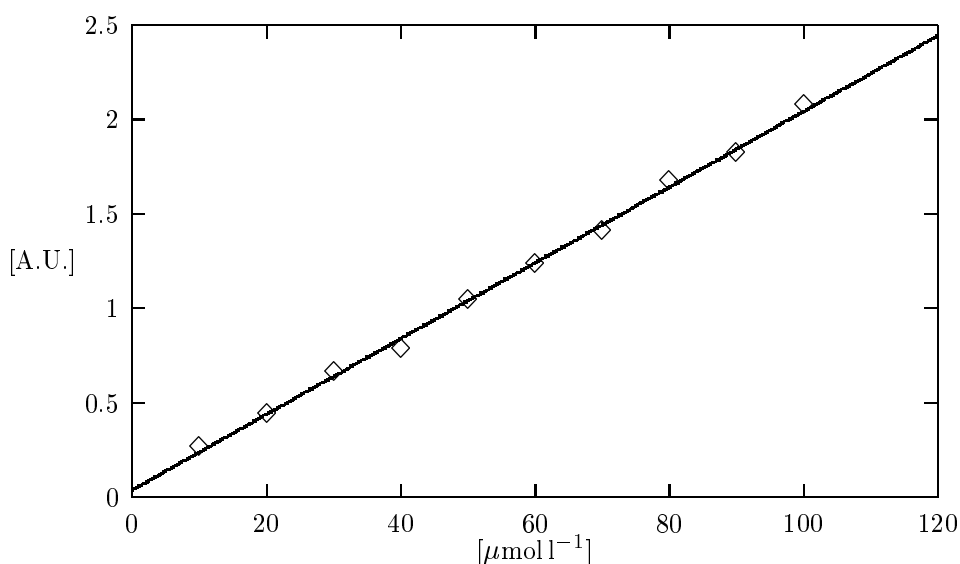
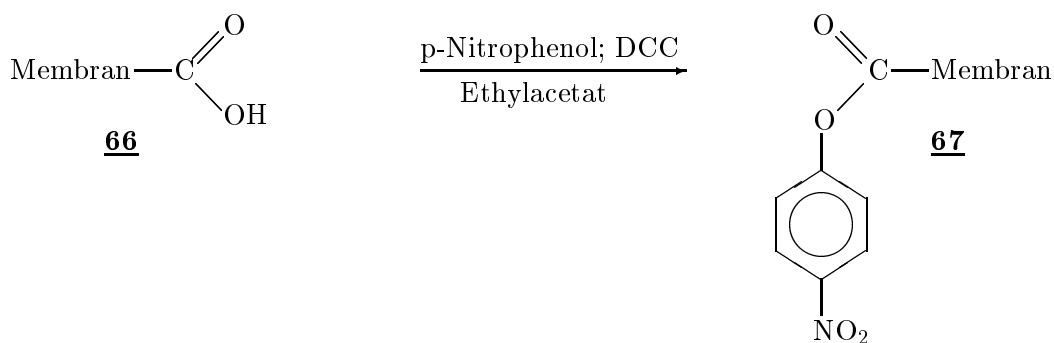


Abbildung 6.2.: Eichgerade von *para*-Nitrophenolat in 1 M KOH

6.1.2. Aktivierung mit *para*-Nitrophenol



Bei der Aktivierung der Biodyne C Membrane mit *para*-Nitrophenol wurden die Membrane als Carbonsäuren behandelt. Um sicherzustellen, daß alle Carboxylgruppen in der H⁺-Form vorlagen, wurden die Membrane zwanzig Minuten mit 100 mM Salzsäure inkubiert. Anschließend wurden die Membrane zwanzig Minuten mit folgenden Lösungen behandelt:

- Lösung A: 1.72 g *para*-Nitrophenol, 46 ml 1,4-Dioxan und 3.2 ml Pyridin
- Lösung B: 1 M DCC in 1,4-Dioxan

Es wurde jeweils ein Verhältnis von Lösung A : Lösung B = 2 : 1 eingesetzt. Beide Lösungen getrennt sind bei Feuchtigkeitsausschluß mehrere Monate bei Raumtemperatur

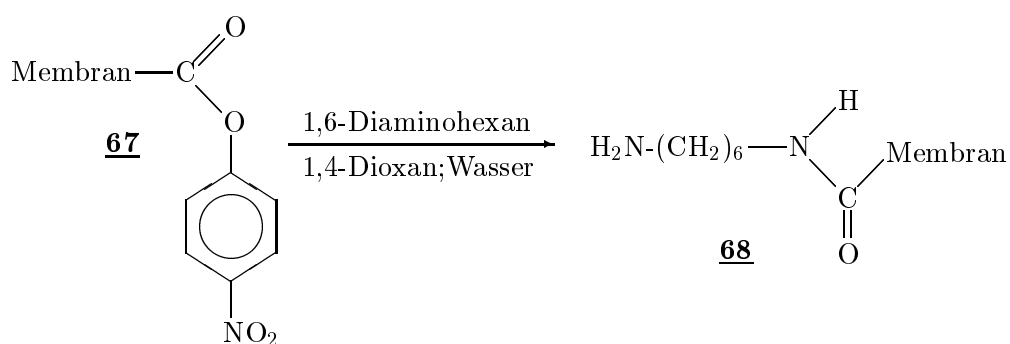


Abbildung 6.3.: Das System EVENT 4160

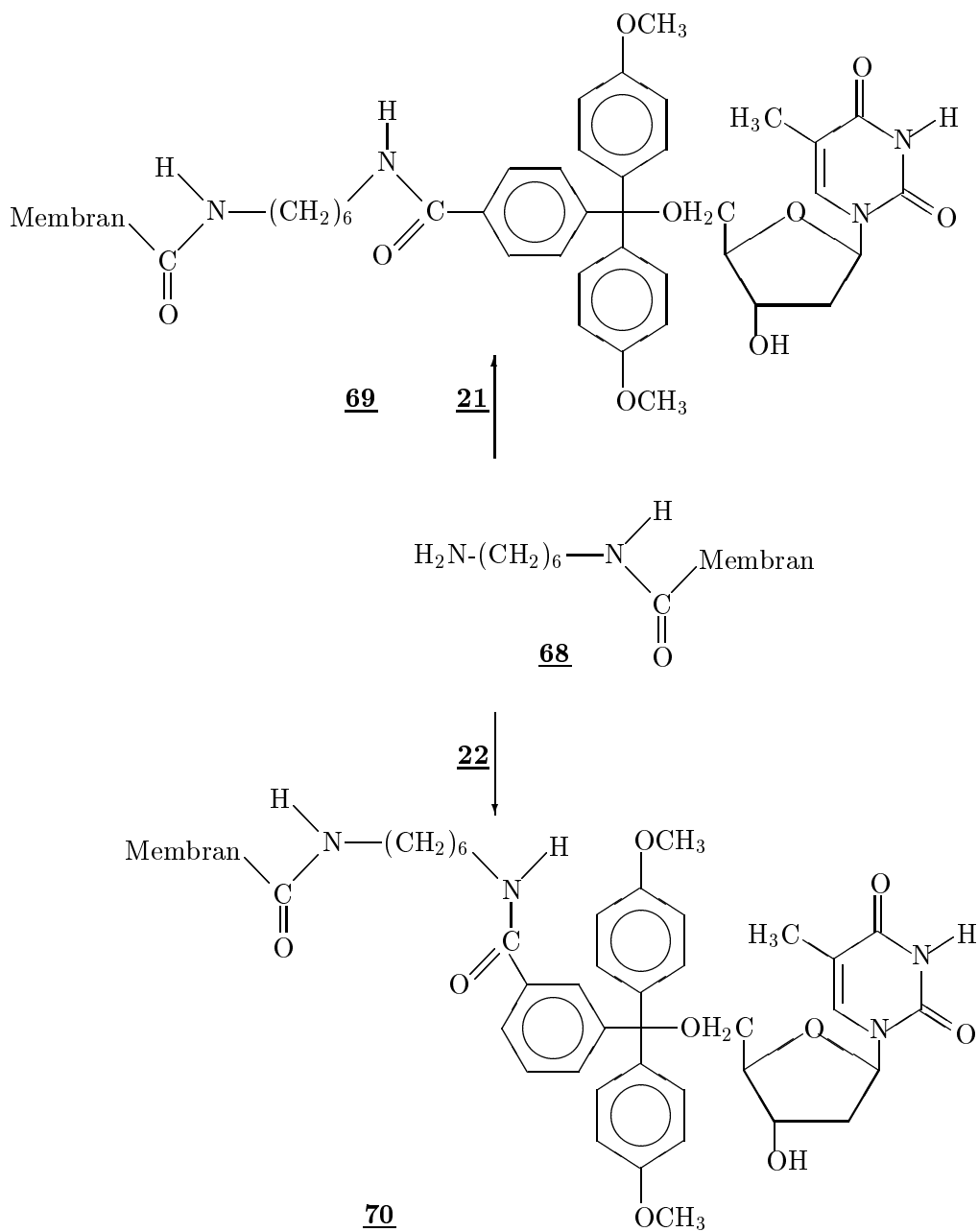
haltbar. Lösung A wurde mit Aluminiumfolie als Lichtschutz umwickelt und im Dunklen verwahrt.

Anbindung von Thymidinderivaten

Zur Anbindung der Thymidinderivate **21** und **22** an die mit *para*-Nitrophenol aktivierten Membrane **67** wurden die Ester zunächst aminolysiert. Dazu wurden die Membrane mit einer 1 M 1,6-Diaminohexan-Lösung in Wasser versetzt. Die sofort auftretende Gelbfärbung ist auf das Freiwerden von *para*-Nitrophenolat-Anionen zurückzuführen. Eine Quantifizierung mittels VIS-Spektroskopie ergab Beladungen von 130 bis 138 pmol mm⁻².



Die aminoderivatisierten Membrane **68** wurden dann mit den aktivierten Estern **21** und **22** umgesetzt.

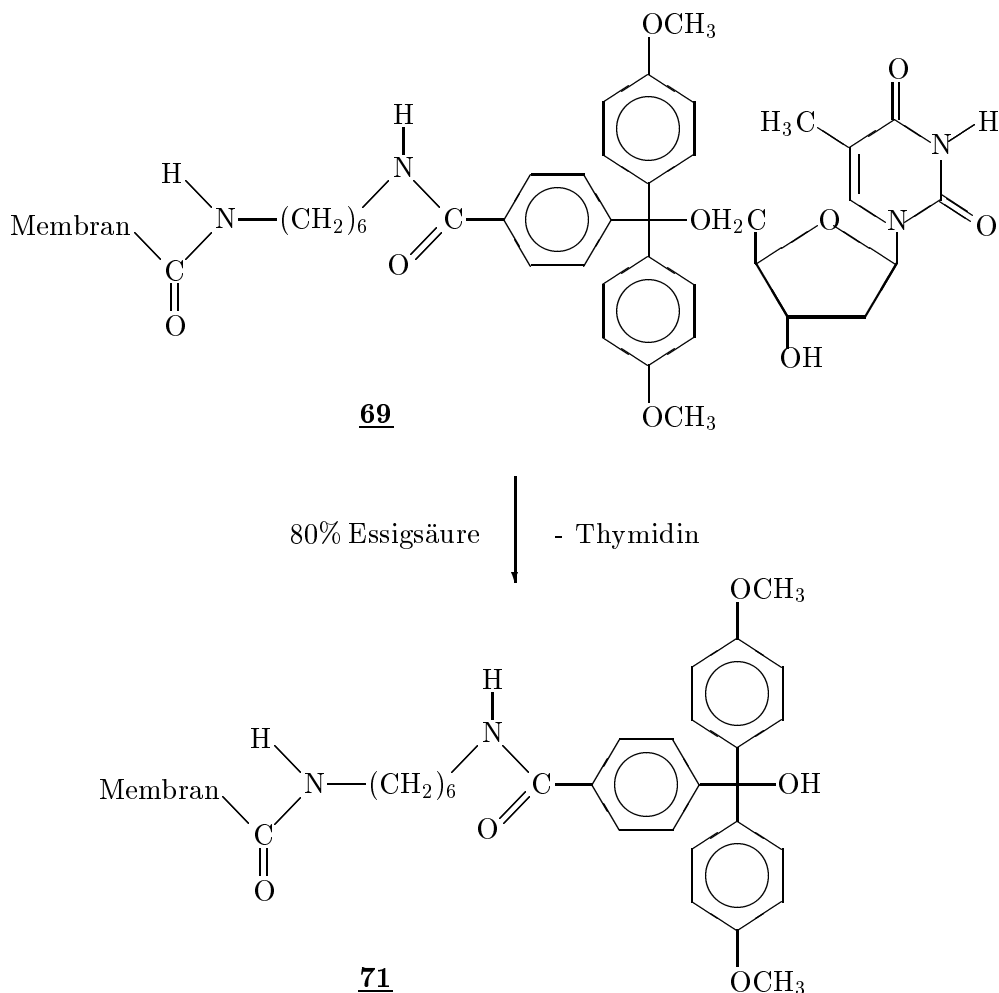


Dazu wurden die Thymidin-Derivate **21** und **22** in einem Lösungsmittelgemisch folgender Zusammensetzung gelöst:

- 3.7 μl 1,4-Dioxan : Pyridin = 10 : 1
- 10.13 μl *N,N*-Dimethylformamid : Triethylamin = 8 : 1

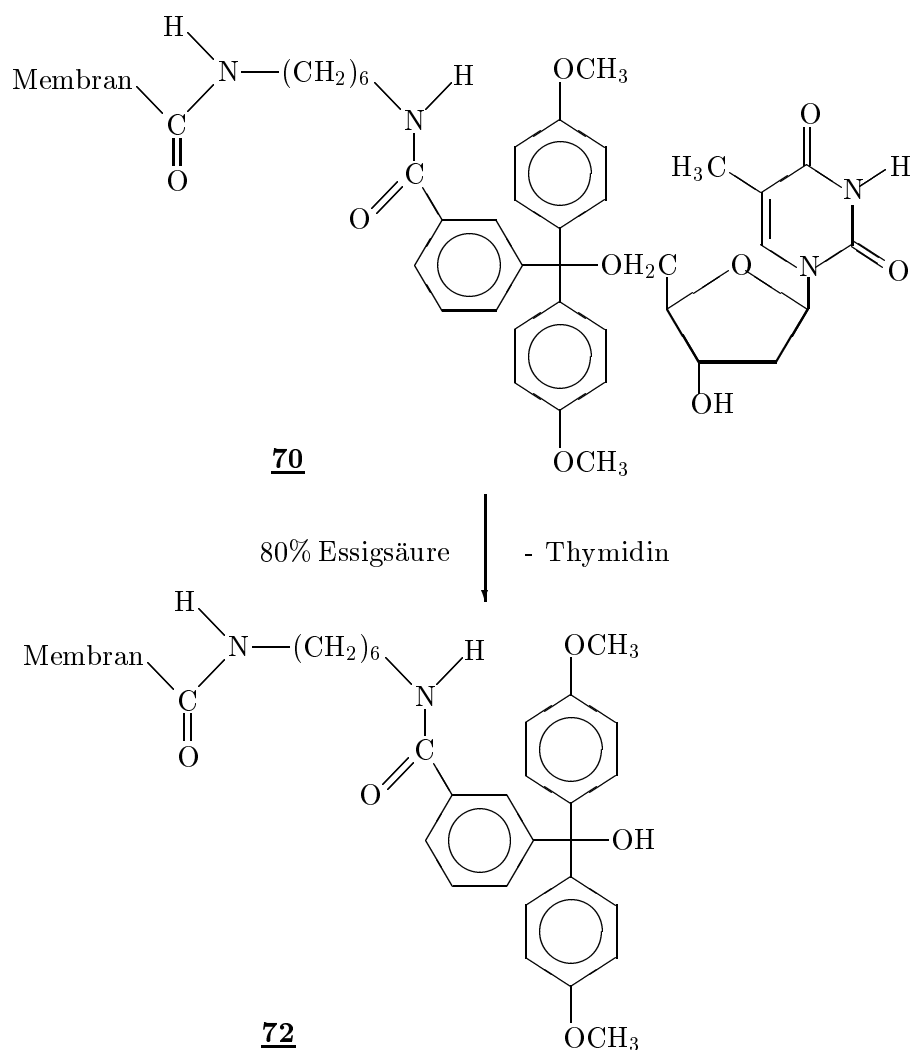
Pro Milligramm aktivierten Esters wurden $3.7\ \mu\text{l}$ Lösung A und $10.13\ \mu\text{l}$ Lösung B verwendet. Die aminoderivatisierte Membran **68** wurde zehn Minuten mit diesen Lösungen behandelt, gewaschen und an der Luft getrocknet. Als Blindprobe diente eine Membran, die nicht mit *para*-Nitrophenol behandelt worden ist. Diese wurde mit 1 M 1,6-Diaminohexan-Lösung versetzt und ebenfalls zehn Minuten mit den Lösungen der aktivierten Ester **21** und **22** in Kontakt gebracht.

Zur Quantifizierung der gebundenen Thymidin-Menge wurden die Membrane **69** und **70** mit 80 % Essigsäure behandelt.



Die Membran **71** wurde mit einer Lösung von 5 % (v/v) Dichloressigsäure in Dichlormethan versetzt und färbte sich rosa. Die Dichloressigsäure-Lösung blieb selbst über Stunden farblos. Beim Waschen der Membrane mit Ethanol verschwand die Färbung schlagartig, trat aber nach erneuter Zugabe von Dichloressigsäure wieder auf. Diese Beobachtungen können als ein deutlicher Hinweis auf eine kovalent gebundene Dimethoxytrityl-Gruppe an den Membranen gewertet werden. Analoge Experimente

wurden mit der Membran **70** durchgeführt.



Im Vergleich mit **71** trat bei der Membran **72** die Rosafärbung bei Behandlung mit Dichloressigsäure wesentlich schneller auf. Auch hier blieb die überstehende Dichlormethanolösung farblos. Die Blindproben blieben stets farblos. Auch in den HPLC-Messungen konnte bei den Blindproben kein Thymidin nachgewiesen werden.

Vergleich der para- und meta-Tritylderivate

Für einen Säurelabilitätsvergleich wurden die beladenen Membrane **69** und **70** mit 80 % Essigsäure behandelt. Zwei Stunden lang wurde alle 15 Minuten ein Aliquot entnommen, lyophilisiert und in 65 % Acetonitril in Wasser gelöst. Mittels RP-HPLC wurden die Proben quantifiziert. Nach zwanzig Stunden wurden die letzten Proben vermessen. Die beiden Werte wurden je gleich 100 % gesetzt. Nach prozentualer Umrechnung der Daten

wurde nun der zeitliche Verlauf der Abspaltung von Thymidin von den Membranen ermittelt.

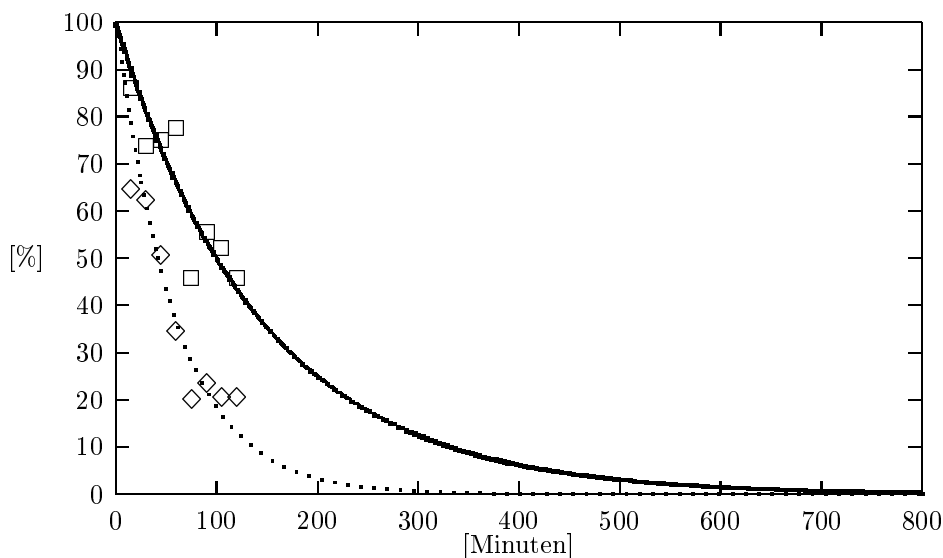


Abbildung 6.4.: Abspaltung von Thymidin von **69** (□) und **70** (◇)

Als Typ der Abspaltungsreaktion wurde eine Reaktion erster Ordnung angenommen¹. Für Reaktionen erster Ordnung gilt mit



der Ansatz

$$\frac{dx}{dt} = kc_A \quad (6.4)$$

wobei c_A die Konzentration des Eduktes A , t die Reaktionszeit, k die Geschwindigkeitskonstante und $x = c_A^0 - c_A$ mit c_A^0 als Anfangskonzentration der Edukte ist. Damit gilt

$$x = c_A^0(1 - e^{-kt}) \text{ bzw.} \quad (6.5)$$

$$c_A = c_A^0 e^{-kt} \quad (6.6)$$

Für die *para*-Membran **69** errechnet sich ein Wert von $k = 1.155 \cdot 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$ und für die *meta*-Membran **70** ist $k = 2.852 \cdot 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$. Für die Halbwertszeit $t_{1/2}$ gilt bei Reaktionen erster Ordnung

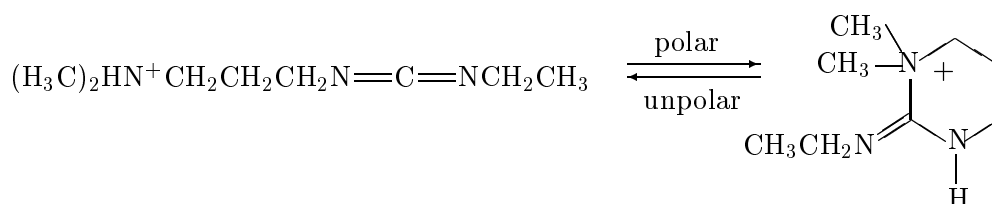
$$t_{1/2} = -\frac{\ln(0.5)}{k} = \frac{0.693}{k} \quad (6.7)$$

¹Bei einer Konzentration von 80 % wurde die Konzentrationsänderung der Essigsäure vernachlässigt.

Damit nehmen sie für die Membran **69** einen Wert von $t_{1/2} = 100.02$ Minuten und für **70** eine Größe von $t_{1/2} = 40.51$ Minuten an. Somit sind die *meta*-substituierten Trityl-Ether deutlich säurelabiler als die entsprechenden *para*-Verbindungen. Leider zeigte sich im Verlauf der Untersuchungen auch, daß die *meta*-Derivate der Oligonucleotide selbst in neutralem Puffer nur eine begrenzte Stabilität besitzen. Nach zwei Wochen Lagerung in acetonitrilhaltigen Triethylammoniumacetat-Puffer pH 7.0 bei -20°C wurde stets eine vollständige Detritylierung von *meta*-substituierten Oligonucleotiden beobachtet.

6.1.3. Aktivierung mit EDC

1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid (EDC)² ist ein wasserlösliches Koppelungsreagenz zur Darstellung von Amiden [81–84]. In polaren Lösungsmitteln liegt die Substanz allerdings nicht als Carbodiimid vor, sondern geht einen intramolekularen Ring-schluß ein [81]:



Zu den polaren Lösungsmitteln kann man auch KBr in KBr-Preßlingen rechnen. Dieses Verhalten erklärt auch die relativ schwache Ausprägung der $\text{N}=\text{C}=\text{N}$ -Bande bei 2100 cm^{-1} (Siehe Abbildung 6.5).

Vor der Reaktion mit dem Carbodiimid wurden die Membrane 15 Minuten mit 100 mM Salzsäure behandelt, um alle Carboxylgruppen in die H^+ -Form zu überführen. Die eigentliche Aktivierung erfolgte über einen Zeitraum von 15 Minuten mit einer stets frisch angesetzten 20 % EDC-Lösung in Wasser.

6.1.4. Anbindungsexperimente

Die Anbindungsexperimente wurden mit den retritylierten Oligonucleotiden **54**, **55**, **56** und **57** durchgeführt. Auch bei diesen Experimenten zeigte sich, daß die *meta*-Trityl-Oligonucleotide **56** und **57** deutlich instabiler als die entsprechenden *para*-Verbindungen **54** und **55** sind. Quantitative Untersuchungen wurden mit dem derivatisierten USP **54** durchgeführt. Ferner wurden Blindproben mit freiem *universal sequencing primer* USP durchgeführt. Dazu wurden die Oligonucleotide mit EDC-aktivierten Biotyne C Membranen umgesetzt. Außerdem wurden **54** und USP mit unbehandelter – nicht mit EDC aktivierter – Membran in Kontakt gebracht.

²Die Abkürzung EDC rührt von der Bezeichnung Ethyl-(dimethylaminopropyl)-carbodiimid her.

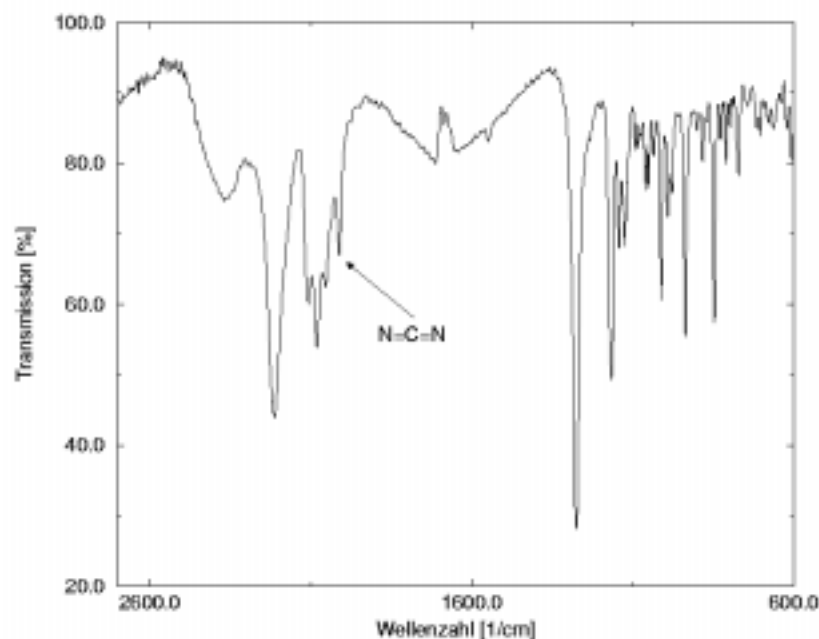


Abbildung 6.5.: Infrarot-Spektrum des 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid (EDC) in KBr

Allgemeines Protokoll zur Anbindung von aminohexylierten Oligonucleotiden

1. Die Membranmultititerplatte wurde kurz mit Reinstwasser gespült, das anschließend mit dem EVENT-System abgesaugt wurde.
2. Die Membrane wurden 15 Minuten mit je 100 μ l 100 mM HCl behandelt und anschließend erneut abgesaugt.
3. Die vorbehandelten Membrane wurden 15 Minuten mit 100 μ l einer frischen EDC-Lösung³ pro *well* behandelt. Die Lösung wurde ebenfalls abgesaugt.
4. Auf diese aktivierten Membrane wurden nun die DNA-Lösungen pipettiert. Die Multititerplatte wurde mit Klebeband verschlossen. Als Reaktionszeiten wurden vier bzw. 24 Stunden gewählt.
5. Nach dem Absaugen der Reaktionslösungen wurden die Membrane je viermal mit ca. 400 μ l TBS-Puffer gewaschen.

³200 mg EDC wurden in 800 mg H₂O gelöst.

6. Um unerwünschte Ester zu zerstören und doppelsträngige DNA zu denaturieren, wurden die Membrane fünf Minuten mit je 50 μl 25 % NH_3 behandelt. Anschließend wurden die Membrane nach dem Absaugen kurz mit Reinstwasser gespült.
7. Zur Abspaltung der einzelsträngigen Oligonucleotide wurden die Membrane zwei Stunden mit je 50 μl 80 % Essigsäure behandelt. Die Membrane wurden zweimal mit je 50 μl Reinstwasser gespült und die vereinigten Lösungen nach dem Absaugen lyophilisiert.

Die Anbindungen erfolgten bei 4 °C. Alle anderen Reaktionen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Alternativ zur Bearbeitung von *Silent Monitor Plates* mit dem EVENT-System 4160 kann man auch Biotyne C Membrane mit einem kommerziellen Bürolocher⁴ ausstanzen und in Mikro-Spin Zentrifugenfiltern der Firma Carl-Roth bearbeiten. Bei den Mikro-Spin Zentrifugenfiltern handelt es sich um Filtereinsätze für Einweg-Reaktionsgefäße mit einem Volumen von 2 ml. Die Filtereinsätze besitzen eine Nylon-Membran mit einem Porendurchmesser von 0.45 μm . Allerdings ist diese Membran nicht carboxyliert, so daß in die Einsätze die ausgestanzten Biotyne C Membrane gebracht werden müssen. Bei der Aktivierung und Anbindung wurden die Absaugschritte durch Zentrifugationsschritte ersetzt. Die Zentrifugation sollte nicht mit höheren Umdrehungszahlen als 10 000 U min^{-1} durchgeführt werden, um die Membrane nicht zu beschädigen.

Die Abhängigkeit der Beladung von der Anbindungsdauer

Über unterschiedliche Zeiträume wurden jeweils 100 pmol Oligonucleotid **54** in Boratpuffer pH 8.5 den EDC-aktivierten Membranen angeboten. Nach dem Spülen der Membrane wurden sie gemeinsam sauer gespalten. Die Lösungen wurden gefriergetrocknet, die Lyophilisate in je 100 μl 20 % Acetonitril in 100 mM Triethylammoniumacetat gelöst und isokratisch unter Startpufferbedingungen mittels RP-HPLC untersucht. Die Integration der Signale lieferte die in Abbildung 6.6 dargestellten Ergebnisse.

Für die Beladungsreaktion wurde wieder eine Reaktion erster Ordnung angenommen. Hier gilt

$$c_A = c_A^\infty (1 - e^{-kt}) \quad (6.8)$$

mit c_A als Oligonucleotidkonzentration nach einer Reaktionszeit t . Nach einer Reaktionszeit von 24 Stunden wurde der letzte Wert ermittelt und lag bei 3.85 pmol. Aus der Regressionsrechnung ergab sich eine maximale Beladung von $c_A^\infty = 3.31$ pmol pro Membran. Für die Geschwindigkeitskonstante wurde ein Wert von $k = 3.642 \cdot 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$ errechnet. Für die Halbwertszeit $t_{1/2}$ gilt bei Reaktionen diesen Typs

$$t_{1/2} = -\frac{\ln(0.5)}{k} = -\frac{0.693}{k} \quad (6.9)$$

Daraus errechnet sich ein Wert von $t_{1/2} = 31.72$ Minuten. Nach zwei Stunden sind bereits 95 % der maximalen Beladung von 58.5 fmol mm^{-2} erreicht.

⁴Die ausgestanzten Scheibchen haben einen Durchmesser von 6 mm und eine Gesamtfläche von 50.27 mm^2 .

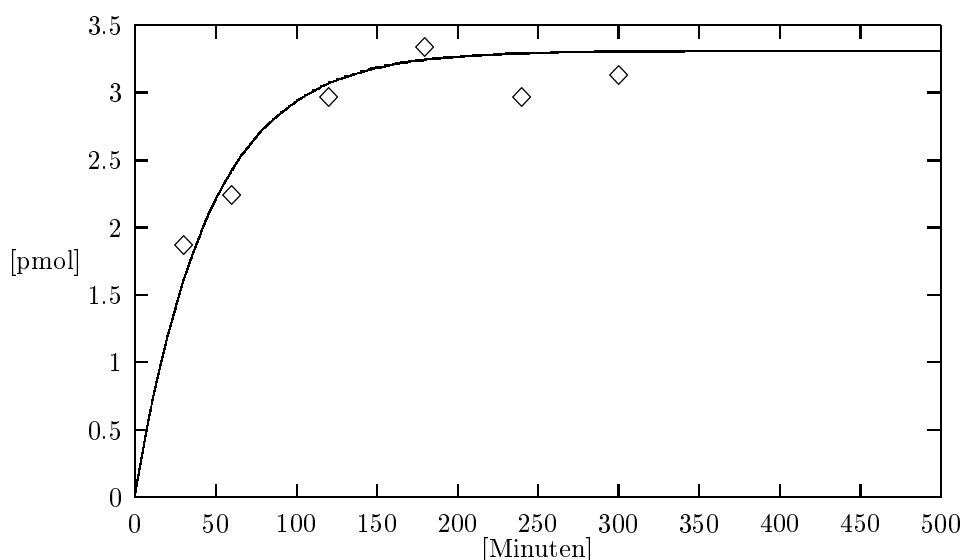


Abbildung 6.6.: Abhängigkeit der Beladung von der Beladungsdauer

Die Abhängigkeit der Beladung von der Konzentration der Oligonucleotide

Es wurden je fünf Anbindungen über einen Zeitraum von einer Stunde durchgeführt, wobei die Konzentration 20, 40, 60, 80 und 100 pmol Oligonucleotid **54** in 100 μ l Boratpuffer pH 8.5 betrug. Nach Abspaltung von den Membranen wurden die Lyophilisate in je 100 μ l 20 % Acetonitril in 100 mM Triethylammoniumacetat gelöst und isokratisch bei Startpufferbedingungen mittels RP-HPLC untersucht. Die Quantifizierung erfolgte durch Integration der Signale.

Die Umrechnung der Integrale in molare Mengen erfolgt mit Hilfe der Steigung $7040 \mu\text{V sec pmol}^{-1}$ aus Abbildung 5.2. Eine Unterscheidung zwischen den vormalig veresterten oder über eine Amidbindung gebundenen Oligonucleotiden in der ammoniakalischen Fraktion war hier nicht möglich. Allerdings wurde festgestellt, daß etwa die gleiche Menge Oligonucleotid in der basischen Fraktion nachweisbar war, wenn man anstelle des derivatisierten Oligonucleotids **54** freien *universal sequencing primer* USP den aktivierten Membranen anbot. Nach ammoniakalischer Behandlung war in diesem Fall jedoch kein Oligonucleotid in der essigsäuren Fraktion detektierbar. Von 100 pmol **54** wurden nach einer Stunde Reaktionszeit etwa 2 pmol pro Membran kovalent über die DMT-Gruppe gebunden. Der Anteil des mit Ammoniak eluierbaren Oligonucleotids lag bei 0.7 bis 0.8 %⁵. Es lag die Vermutung nahe, daß es sich dabei um 3'-OH-veresterte *Primer* handelte.

Es wurden auch Experimente durchgeführt, in denen freier *universal sequencing primer* USP mit EDC-aktivierter Membran zur Reaktion gebracht wurde, wobei die am-

⁵Nach der Lyophilisation des Ammoniaks wurden die Proben zwei Stunden mit 80 % Essigsäure behandelt, erneut lyophilisiert und in 20 % Acetonitril in Wasser aufgenommen.

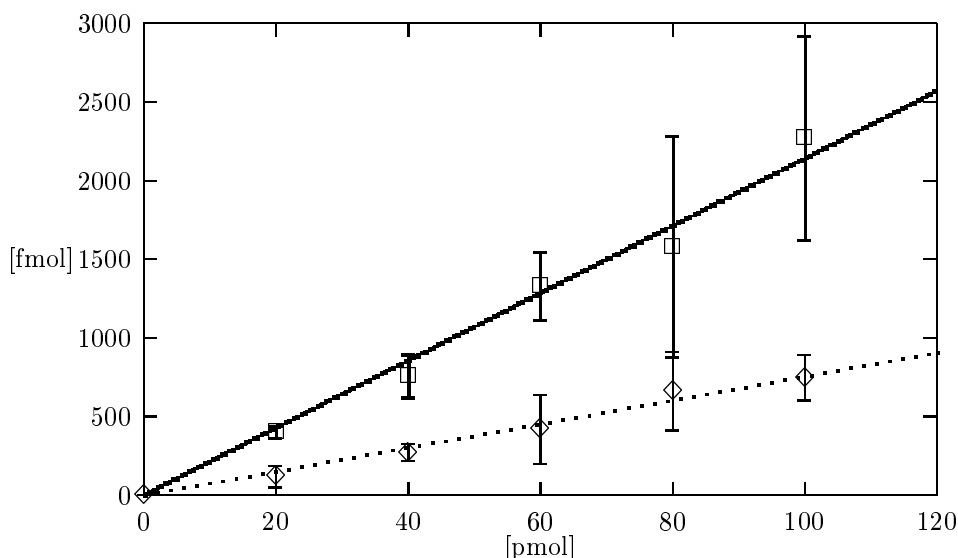


Abbildung 6.7.: Abhängigkeit der Beladung von der Konzentration der Oligonucleotide
 $\square$ = essigsaurer Fraktion; $\diamond$ = ammoniakalische Fraktion

moniakalische Behandlung unterblieb. Nach essigsaurer Behandlung und anschließendem Lyophilisieren konnten auch in diesem Fall Oligonucleotide in Promille-Mengen nachgewiesen werden.

Eine reine TBS-Behandlung der Membrane konnte in keinem dieser Fälle die ammoniakalische Behandlung ersetzen.

Wurde die Biodyne C Membran nicht mit EDC aktiviert, aber mit **54** und USP in Kontakt gebracht, ließen sich lediglich Oligonucleotide nachweisen, wenn man die Membrane weder mit TBS-Puffer noch mit Ammoniak spülte. Nach der TBS-Behandlung waren in diesem Fall keine Oligonucleotide mehr nachweisbar.

Abhängigkeit der Beladung vom pH-Wert der Bindungspuffer

Es wurden je fünf Anbindungen durchgeführt. Dazu wurden je 100 pmol Oligonucleotid in je 100 μL Borat-Puffer eingesetzt. Die pH-Werte der Reaktionslösungen betrugen 7.9, 8.1, 8.3, 8.5, 8.7 und 8.9. Die Anbindung erfolgte bei 4°C über einen Zeitraum von 24 Stunden. Nach Spülen der Membrane wurden die Oligonucleotide sauer abgespalten, lyophilisiert und in 20 % Acetonitril in Wasser gelöst. Durch Integration der Signal-Flächen wurden die Proben quantifiziert. Durch die Meßwerte wurde eine sigmoide Boltzmann-Funktion gelegt:

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{\frac{x-x_0}{dx}}} + A_2 \quad (6.10)$$

Wobei A_1 den unteren y -Wert und A_2 den oberen y -Wert darstellt. x_0 ist der x -Wert des Wendepunktes. dx macht eine Aussage über die Breite der Funktion. Durch eine Regressionsrechnung wurden folgende Parameter für die Funktion erhalten:

$$A_1 = 2.317 \text{ pmol} \quad (6.11)$$

$$A_2 = 4.002 \text{ pmol} \quad (6.12)$$

$$x_0 = 8.447 \quad (6.13)$$

$$dx = 0.1099 \quad (6.14)$$

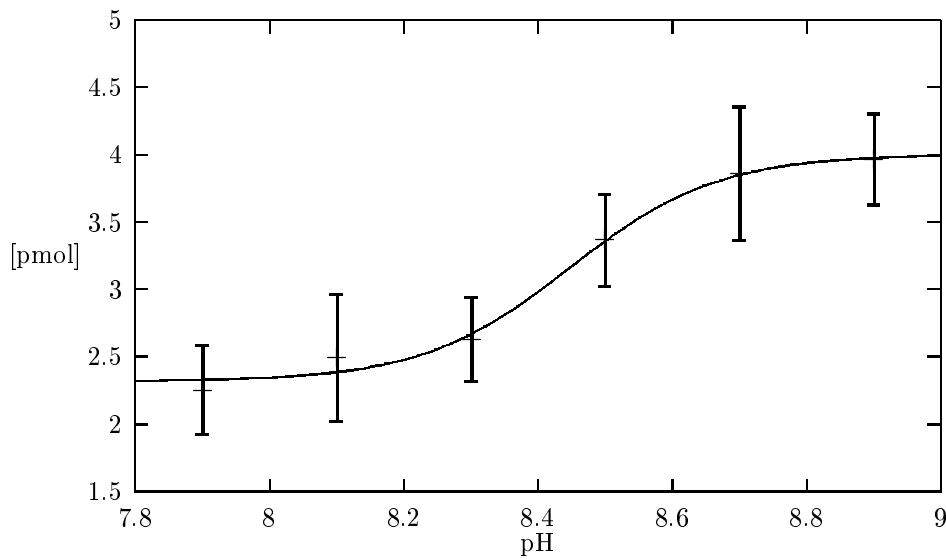
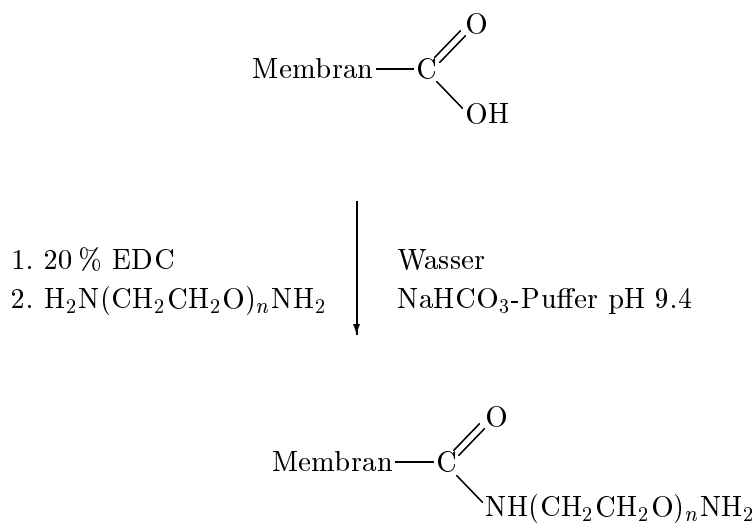


Abbildung 6.8.: Abhängigkeit der Beladung vom pH-Wert

Weitere Anbindungsexperimente

Einbau von Polyoxyethylendiaminen als Spacer: Um den Abstand der Carboxylgruppen von den Membranen zu vergrößern, wurden die langkettigen Polyoxyethylene der Firma Rapp an die EDC-aktivierten Membrane angelagert:



73

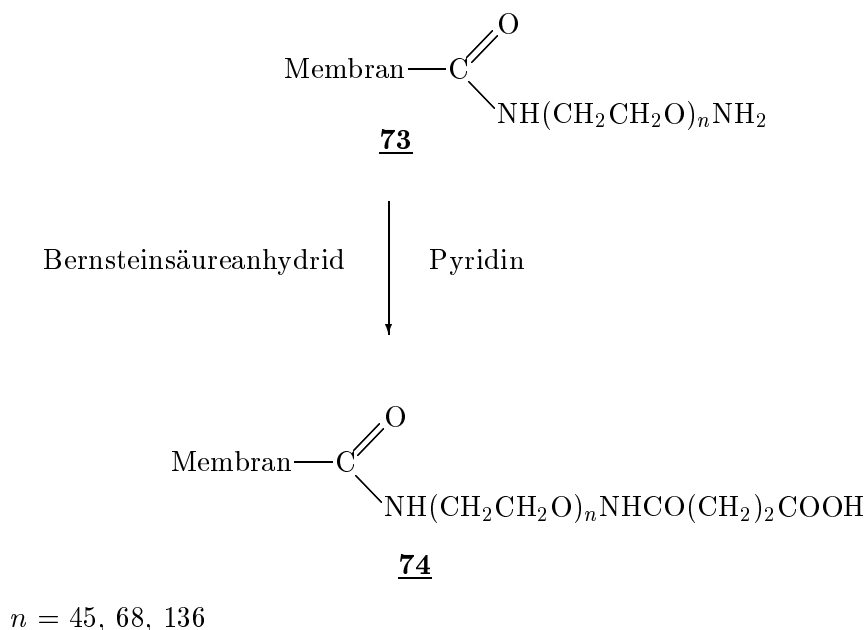
$n = 45, 68, 136$

Zur Quantifizierung der Reaktion wurden die Membrane nach der Behandlung mit den Polyoxyethylendiaminen wie in Abschnitt 6.1.2 beschrieben zunächst mit *para*-Nitrophenol und anschließend mit 1 M KOH behandelt. Die UV-VIS-Analyse der alkalischen Lösung ergab nach Abbildung 6.2, daß von den 225 pmol mm^{-2} Carboxylgruppen nach der Umsetzung mit den Aminen noch 50 pmol mm^{-2} übrig blieben, wenn $n = 45$ oder 136^6 . Bei $n = 68$ lag der Wert bei 33 pmol mm^{-2} .

Anschließend wurden die Membrane mit 1 M Bernsteinsäureanhydrid in Pyridin umgesetzt. Die so erhaltenen terminalen Carboxylgruppen wurden erneut mit *para*-Nitrophenol verestert. Durch alkalische Verseifung und UV-VIS-Spektroskopie wurde abermals die Menge der zugänglichen Carboxylgruppen ermittelt. Die Werte lagen zwischen $80.5 \text{ pmol mm}^{-2}$ für $n = 136$ und 194 pmol mm^{-2} für $n = 68$. Bei $n = 45$ wurde eine Beladung von 103 pmol mm^{-2} errechnet.

Für die langkettigen Polyoxyethylendiamine ist die partielle Verbrückung zweier EDC-aktivierter Membrancarboxylgruppen denkbar. Ein solches Verhalten kann die geringen Beladungswerte erklären.

⁶ n bezeichnet die durchschnittliche Anzahl der Polyoxyethylen-Gruppen, die jedoch nur als Anhaltspunkte gelten. Die Firma Rapp charakterisiert die Polyoxyethylendiamine mit dem Molmassen 2 000, 3 000 und $6\,000 \text{ g mol}^{-1}$.



Die so derivatisierten Membrane wurden nun mit EDC aktiviert und analog zu den normalen Biodyne C Membranen mit **54** und **56** beladen, wobei lediglich mit TBS gespült wurde. Nach Abspaltung mit 80 % Essigsäure und Lyophilisation wurde mittels UV-Spektroskopie ermittelt, daß die Beladungen der Membrane zwischen 2.8 pmol mm^{-2} ($n = 136$) und 5.7 pmol mm^{-2} ($n = 68$) lagen. Bei $n = 45$ wurde ein Wert von 4.6 pmol mm^{-2} errechnet. Nach einer Behandlung mit Wärme (15 Minuten 94°C) konnten nach essigsaurer Abspaltung keine Oligonucleotide mehr in der sauren Fraktion nachgewiesen werden. Zur Anbindung wurden je Membran 4 nmol Oligonucleotid in 500 mM Natriumhydrogencarbonat-Puffer bei pH 9.4 angeboten. Bei einer Fläche⁷ von 56.5 mm^2 errechnen sich so Ausbeuten zwischen 4 und 8 %. Die mit **54** beladenen Membrane mit $n = 136$ wurden als **75** für enzymatische Versuche weiter verwendet.

Anbindungsversuche mit 64: An die aminohexylierte Membran **73** wurde *para*-Nitrophenyliodacetat **24** in Dioxan unter Ausbildung einer Amidbindung gebunden. Die Membran wurde ausgiebig mit Dichlormethan und Ethanol gewaschen und sofort mit dem mercaptoderivatisierten Oligonucleotid **64** in Borat-Puffer bei pH 8.0 umgesetzt. Die Membran wurde mit TBS-Puffer gewaschen und mit 80 % Essigsäure versetzt. Die saure Lösung wurde nach zwei Stunden von der Membran abzentrifugiert und lyophilisiert. Das Pellet wurde in 5 % Acetonitril in 100 mM Triethylammoniumacetat gelöst und mittels RP-HPLC vermessen. Es konnten nur Spuren an USP nachgewiesen werden.

⁷Die Gesamtfläche errechnet nach $A = 2 \cdot \pi r^2$, weil die ausgestanzten Membrane beidseitig beladbar sind.

Anbindung von 54 und 55 in Natriumhydrogencarbonat-Puffer: Analog zu 75 wurden auch die Oligonucleotide 54 und 55 an einfache, mit EDC aktivierte Biotyne C Membrane gebunden. Hier wurden pro Membran 2 nmol 54 bzw. 55 in 500 mM Natriumhydrogencarbonat-Puffer bei pH 9.4 angeboten. Die Membrane wurden mit TBS-Puffer gespült, an der Luft getrocknet und als 76 für enzymatische Experimente zurückgelegt. Dabei handelte es sich um Membrane mit dem *para*-substituierten Tri-tylologonucleotid 54. Durch Abspaltungsversuche wurden Beladungen zwischen 3 und 4 pmol mm⁻² gemessen. Da bei diesen Versuchen Membrane mit einem Durchmesser von $\emptyset = 9 \text{ mm}^2$ – entsprechend einer Fläche von 127 mm² – verwendet wurden, lagen die Ausbeuten bei 20 bis 25 %.

6.1.5. Vergleich der Biotyne C Membrane mit den Silent Monitor Plates

Zum Vergleich der Biotyne C Membrane mit den *Silent Monitor Plates* wurde erneut eine Reihe Anbindungsexperimente durchgeführt. Dazu wurden je 100 pmol 54 in Borat-Puffer pH 8.5 gelöst und auf die EDC-aktivierten Membrane pipettiert. Die Anbindung erfolgte über Nacht bei 4 °C. Analog zu den Beladungen an die *Silent Monitor Plates* wurden Anbindungen an Biotyne C Membrane durchgeführt, die sich in Mikro-Spin Zentrifugenfiltern der Firma Carl-Roth befanden. Die Membrane wurden dazu mit einem kommerziellen Bürolocher ausgestanzt⁸. Anstelle der Absaugschritte wurde zentrifugiert.

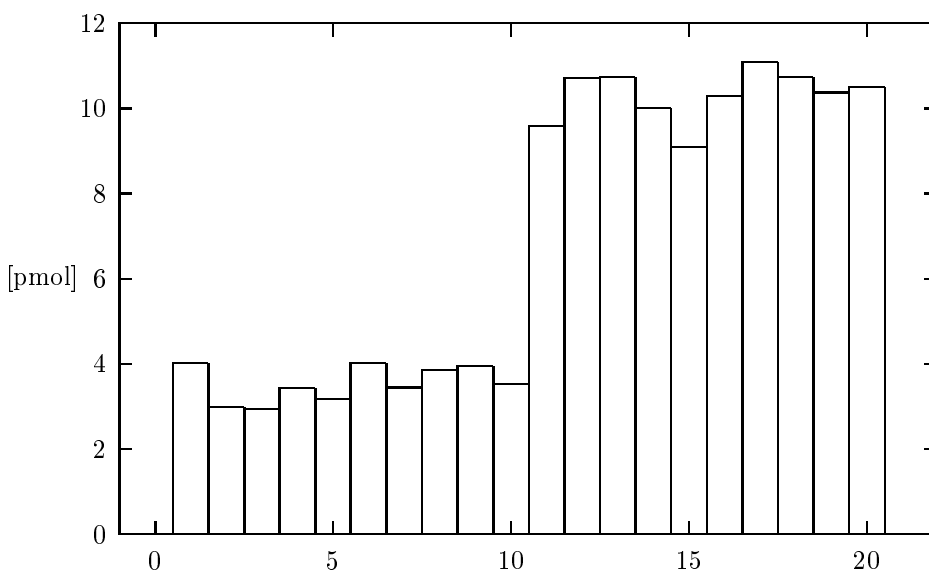


Abbildung 6.9.: Vergleich von *Silent Monitor Plates* mit Biotyne C Membranen.

Die Versuche 1–10 in Abbildung 6.9 wurden in *Silent Monitor Plates* durchgeführt,

⁸Die ausgestanzten Scheibchen haben einen Durchmesser von 6 mm und eine Gesamtfläche von 56.5 mm².

während die Experimente 11–21 in Zentrifugenfiltern gemacht wurden. Es konnte gezeigt werden, daß die Beladung an Biotyne C Membrane in Nylon-Event-Platten der Fa. Eppendorf ähnliche Ergebnisse wie die Beladung an die *Silent Monitor Plates* lieferte. Lyophilisationsversuche von Oligonucleotiden in Reaktions-Gefäßen der Firma Eppendorf und Multititerplatten ergaben, das ca. 40 % weniger Oligonucleotide aus den Multititerplatten resuspendiert werden konnten. Offensichtlich findet in den Multititerplatten – die die essigsäuren Lösungen auffangen – eine stärkere Adsorption statt, als in den Reaktionsgefäßen.

Als problematisch erwies sich bei den *Silent Monitor Plates* auch der Umstand, daß sich nach der Essigsäurespaltung der letzte Tropfen nicht absaugen ließ. Um dennoch quantitative Aussagen machen zu können, wurden die Waschschrte nach der Etherspaltung eingeführt.

6.1.6. Ergebnisse der Anbindungsexperimente

Die durch eine *para*-Nitrophenolaktivierung zugängliche Menge an Carboxylgruppen auf den Biotyne C Membranen liegt im Bereich von 225 pmol mm^{-2} . Eine derartig hohe Beladung mit Oligonucleotiden konnte in keinem Experiment erreicht werden. Eine doppelsträngige DNA-Helix hat einen Durchmesser im Bereich von $20 \text{ \AA}$. Auf eine planare Fläche passen – je nach Anordnung – etwa $250 \cdot 10^9$ Moleküle. Mit einer Menge von $3.29 \cdot 10^{13}$ Molekülen bei einer Konzentration von 53 fmol mm^{-2} ist schon eine Beladung erreicht, die sich auf einer planaren Fläche nicht mehr realisieren läßt. Abbildung 6.1 macht die schwammartige Struktur der Biotyne C Membran deutlich, die zum einen die Oberfläche der Membrane erhöht, zum anderen die Carboxylgruppen schwerer für die sterisch anspruchsvollen Oligonucleotide zugänglich macht. Die Beladungsausbeuten in Prozent lassen sich auf zwei Werte beziehen:

1. Auf die Menge der membrangebundenen, aktivierbaren Carboxylgruppen. Bei einer Beladung von 53 fmol mm^{-2} errechnet sich ein Wert von 0.024 %.
2. Auf die angebotene Menge von Oligonucleotiden. Hier liegt bei einer Beladung von 53 fmol mm^{-2} der Wert bei 3 %.

Da die Aufgabenstellung die Isolierung einzelsträngiger DNA aus Polymerasereaktionen beinhaltet, und die Nucleinsäuremenge in den Lösungen kleiner ist als die Menge der aktivierten, membrangebundenen Carboxylgruppen, ist die prozentuale Angabe in Bezug auf die angebotenen Nucleinsäuremengen aussagekräftiger.

6.2. Die PVDF Membrane

Polyvinylidendifluorid (PVDF) wird zur Herstellung von Immobilon P Membranen verwendet. Die Firma Millipore vertreibt außerdem Durapore Membrane, die ebenfalls aus PVDF bestehen. Bei den folgenden Experimenten kamen die Durapore Membrane FVLP 04700 zum Einsatz.

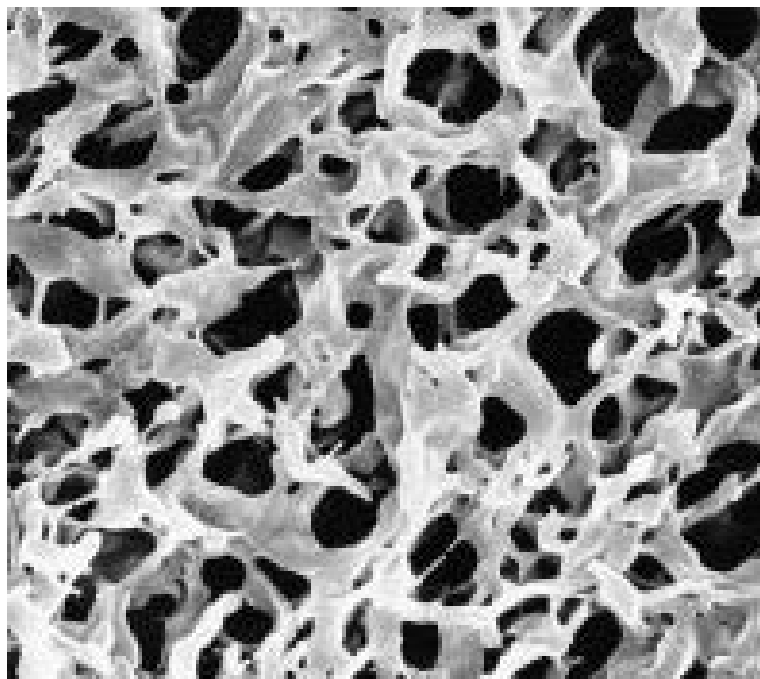
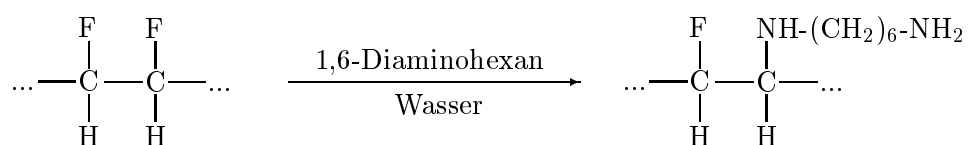


Abbildung 6.10.: Mikroskopische Aufnahme einer PVDF-Membran

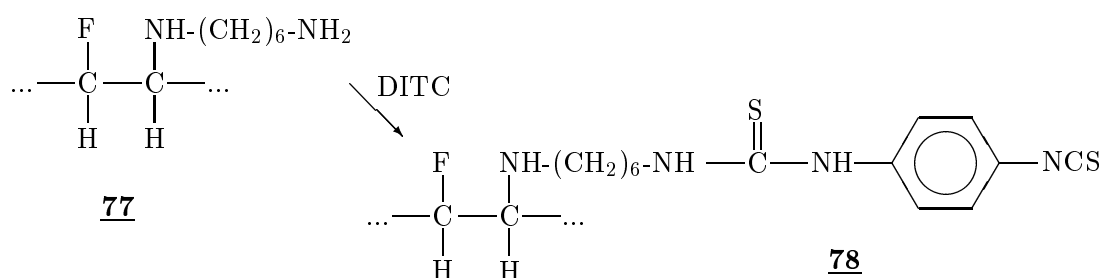
6.2.1. Aktivierung mit DITC

Die Durapore Membrane wurden mit einer 1 M 1,6-Diaminohexanlösung behandelt. Dabei wurde die Membran aminohexyliert [58].



77

Die aminohexylierte Membran **77** wurde nun mit 1,4-Phenyldiisothiocyanat (DITC) unter Ausbildung eines Thioharnstoffes umgesetzt [58].



6.2.2. Anbindungsexperimente

Membrane wie **78** sind in der Lage, Amine kovalent zu immobilisieren [58]. Dabei reagiert das Isothiocyanat mit dem Amin zu einem Thioharnstoff. Vor der Beladung der DITC-aktivierten *Sequelon* Membrane der Firma Millipore werden die zu bindenden Proteine in einer *wetting solution* gelöst. Diese Lösung besteht aus 50 % Wasser, 49 % Isopropanol und 1 % *N*-Methylmorpholin. Durch den Alkoholanteil ist diese Lösung zur Behandlung von Oligonucleotiden ungeeignet [40]. Versuche, Oligonucleotide in Borat-Puffer an **78** zu binden, scheiterten. Lediglich in stark basischen Carbonat-Puffern bei pH 9.4 konnten Oligonucleotide in quantitativen Ausbeuten gebunden werden. Mit dem derivatisierten *universal sequencing primer* **55** beladene Membrane wurden für enzymatische Versuche als **79** zurückgelegt und bei -20 °C gelagert.

7. Die enzymatischen Umsetzungen

Inhaltsangabe

7.1. Die Enzyme	75
7.1.1. Die Polymerasen	75
7.1.2. Die Restriktionsenzyme	77
7.1.3. Die Phosphodiesterase	78
7.2. Polymeraseexperimente mit membrangebundenen Oligo- nucleotiden	79
7.2.1. Hybridisierungsexperimente	79
7.2.2. Fill-In Experimente	80
7.2.3. PCR-Versuche	84
7.3. Polymeraseexperimente mit derivatisierten Oligonucleoti- den in Lösung	85
7.3.1. Versuche mit dem Klenow-Fragment und der Kornberg- Polymerase	85
7.3.2. PCR-Versuche	86
7.3.3. Fill-In-Experimente mit der Tth-DNA-Polymerase	89
7.4. Experimente mit Restriktionsenzymen	91
7.5. Phosphodiesteraseexperimente	94

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Reihe von Experimenten mit unterschiedlichen Enzymen durchgeführt. Ziel war es, mit Hilfe der Membranimmobilisierung von Oligonucleotiden die Aufreinigung der Produkte zu vereinfachen. Dabei wurden zwei unterschiedliche Wege beschritten:

1. Es wurden membrangebundene Oligonucleotide in biochemischen Versuchen als *Primer* eingesetzt. Um eine Inaktivierung der Enzyme zu verhindern, mußten die Membrane zuvor mit Protein-Lösungen behandelt werden (*blocking*).
2. Das derivatisierte Oligonucleotid **54** wurde in molekularbiologischen Experimenten eingesetzt. Zur Aufreinigung der Reaktionsprodukte wurden die Ansätze anschließend mit aktivierten Membranen in Kontakt gebracht. Bei diesem Ansatz mußte folgenden Überlegungen Rechnung getragen werden:
 - Die Anbindungspuffer sollten möglichst identisch mit den Enzym-Reaktionspuffern sein. Auf zusätzliche Fällungsreaktionen sollte verzichtet werden, um Zeit zu sparen und die Verluste gering zu halten.

- Die Anbindungspuffer dürfen kein Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan enthalten. Tris¹ ist ein primäres Amin und würde mit den aktivierten Carbonsäuren reagieren. Da die Pufferkomponenten meist im Überschuß zu den Nucleinsäuren vorhanden sind, würden die DNA-Anbindungen bei dieser Konkurrenz deutlich unterliegen.

Für diesen Ansatz eigneten sich nur die Biodyne C Membrane, da eine Anbindung an DITC-aktivierte PVDF-Membrane nur in Puffern gelang, in denen die eingesetzten Enzyme keinerlei Aktivität besaßen. Abbildung 7.1 verdeutlicht noch einmal die beiden Anbindungskonzepte der *fill-in*-Reaktionen.

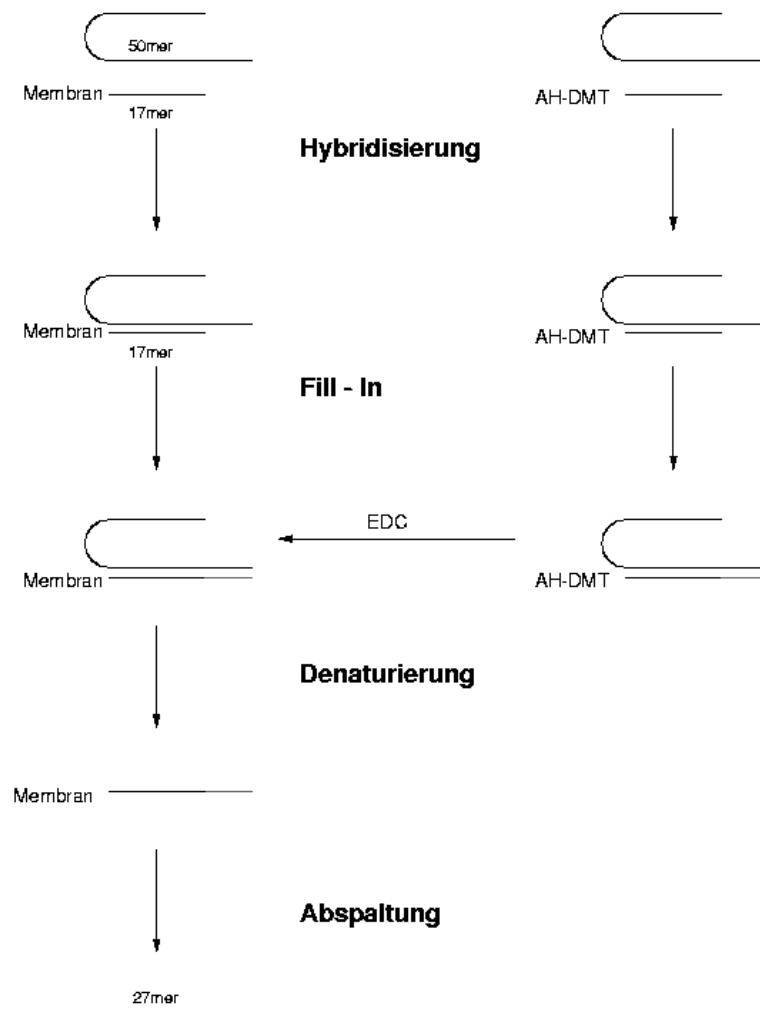


Abbildung 7.1.: Anbindungskonzepte der *fill-in*-Reaktionen

¹Tris wird auch als 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol ((HOCH₂)₃CNH₂) bezeichnet.

7.1. Die Enzyme

7.1.1. Die Polymerasen

Die Polymerasen synthetisieren Nucleinsäuren. Dabei werden schrittweise Nucleotide an den *Primer* angehängt, wenn das Oligonucleotid an eine einzelsträngige Matrix-Nucleinsäure hybridisiert ist. Als Matrize dient eine DNA oder RNA. Die Syntheserichtung ist $5' \rightarrow 3'$, wobei die Matrix-Nucleinsäure in $3' \rightarrow 5'$ -Richtung abgelesen wird. Als Co-Faktor wird im allgemeinen Magnesium benötigt. Bei der eigentlichen Polymerase-Reaktion handelt es sich um einen nucleophilen Angriff der $3'$ -Hydroxygruppe des *Primers* an das α -Phosphat der Nucleotid-Triphosphate. Bei der Umsetzung entstehen Phosphorsäureester und Pyrophosphat.

Wichtig für die Bedeutung der Polymerasekettenreaktion (PCR²) [2, 3] war die Entdeckung von hitzestabilen Polymerasen [85]. Vor dieser Zeit mußte nach jedem PCR-Zyklus erneut Enzym zugesetzt werden, was Kontaminationen begünstigte. Die hitzestabilen Polymerasen ermöglichen den routinemäßigen Einsatz der PCR in der klinischen Chemie und in der Forschung.

Die Taq-DNA-Polymerase

Bei der *Taq*-DNA-Polymerase handelt es sich um die älteste bekannte hitzestabile Polymerase. Sie stammt aus dem Mikroorganismus *Thermus aquaticus*, der aus einer heißen Quelle im Yellowstone Nationalpark isoliert wurde. Die *Taq*-DNA-Polymerase hat ein Molekulargewicht von 94 kDa und baut 35 bis 100 Nucleotide pro Minute ein. Das Temperaturoptimum der Polymerase liegt bei $70-80^\circ\text{C}$. Bei einer Temperatur von 94°C hat das Enzym eine Halbwertszeit von 40 Minuten. Die *Taq*-DNA-Polymerase besitzt zusätzlich eine $5' \rightarrow 3'$ -Exonucleaseaktivität.

Die Pfu-DNA-Polymerase

Die *Pfu*-DNA-Polymerase wurde aus dem thermophilen, marinen Archaeobakterium *Pyrococcus furiosus* isoliert. Das native Enzym besitzt sowohl eine $3' \rightarrow 5'$ - als auch $5' \rightarrow 3'$ -Exonucleaseaktivität. Die *proof-reading*-Funktion verleiht der Polymerase eine zwölfmal höhere Genauigkeit gegenüber der *Taq*-DNA-Polymerase. Wegen der $5' \rightarrow 3'$ -Exonucleaseaktivität ist es bei der *Pfu*-DNA-Polymerase besonders wichtig, in einer PCR das Enzym zuletzt zuzusetzen, da es sonst Matrix und *Primer* abbaut.

Als gentechnisch manipulierte Variante ist die klonierte *Pfu*-DNA-Polymerase (exo^-) im Handel. Ihr fehlt die $3' \rightarrow 5'$ -Exonuclease-Aktivität. Im Vergleich zur *Taq*-DNA-Polymerase besitzt sie eine zehnmal höhere Effektivität, bezüglich des Einbaus von Nucleotiden.

²Polymerase chain reaction



Abbildung 7.2.: 3D-Darstellung der BROOKHAVEN-Daten der *Taq*-DNA-Polymerase

Die *Tth*-DNA-Polymerase

Aus *Thermus thermophilus* HB-8 stammt die *Tth*-DNA-Polymerase, die bei Anwesenheit von Mangan bei 70 °C eine reverse Transskription von RNA ermöglicht [86, 87]. Nach dem Komplexieren der Mangan-Ionen und ihrem Ersatz durch Magnesium, läßt sich anschließend eine PCR durchführen.

In den Experimenten dieser Arbeit erwies sich die *Tth*-Polymerase als die für das Borat-Puffersystem am geeignetsten.

Die *Vent*-DNA-Polymerase

Das die *Vent*-Polymerase kodierende Gen wurde aus dem marinen, thermophilen Archaeobakterium *Thermococcus litoralis* isoliert, in *E.coli*-Bakterien kloniert und exprimiert. Kommerziell erhältlich sind außerdem die hitzestabilerere Deep *Vent*-Polymerase und eine (exo⁻)-Variante.

	<i>Taq</i>	<i>Pfu</i>	<i>Tth</i>	Vent
Halbwertszeit bei 95 °C [min]	40	>120	20	400
5'→3'-Exonucleaseaktivität	vorhanden	nicht vorhanden	vorhanden	nicht vorhanden
3'→5'-Exonucleaseaktivität	nicht vorhanden	vorhanden	nicht vorhanden	vorhanden
Verlängerungsgeschwindigkeit [nt/sec]	75	60	>33	80
Reverse-Transkriptase-Aktivität	nicht vorhanden	?	vorhanden	?
Produkt-Enden	3'A	?	3'A	>95 % glatt
Molekulargewicht [kDa]	94	92	94	?

Tabelle 7.1.: Eigenschaften der eingesetzten thermostabilen Polymerasen

Die Kornberg-Polymerase

Als Kornberg-Polymerase wird die DNA-Polymerase I aus *E.coli* bezeichnet. Sie war die erste Polymerase, mit der in vitro die semikonservative Replikation durchgeführt wurde. Das Kornberg-Enzym verfügt sowohl über eine 3'→5'- als auch 5'→3'-Exonucleaseaktivität. Die 3'→5'-Exonucleaseaktivität verleiht dem Enzym die *proof-reading*-Eigenschaften, die es ihm ermöglichen, falsch eingebaute Nucleotide wieder abzubauen.

Neben der Polymerase I sind auch noch die DNA-Polymerasen II und III bekannt. Sie sind in ihrer Substratspezifität stark eingeschränkt. Das Substrat für die beiden Polymerasen ist eine doppelsträngige DNA mit kleinen Einzelstrangbereichen.

Die *E.coli*-DNA-Polymerase I setzt sich aus einer einzelnen Aminosäurekette mit einer Molmasse von 109 kDa zusammen.

Die Klenow-Polymerase

Die Klenow-Polymerase entsteht durch die proteolytische Spaltung des Kornberg-Enzyms. Das Produkt mit einer Molmasse von 76 kDa besitzt keine 5'→3'-Exonucleaseaktivität mehr.

Sowohl die Kornberg-Polymerase als auch das Klenow-Fragment sind auf Grund ihrer Thermolabilität für die PCR eher ungeeignet, werden in der Molekularbiologie aber zum Verdoppeln einzelsträngiger DNA eingesetzt.

7.1.2. Die Restriktionsenzyme

Restriktionsendonucleasen³ sind Enzyme, die DNA sequenzspezifisch spalten [24]. Meist erkennen sie vier bis sechs Basenpaare innerhalb einer Sequenz, wenn sie gegenläufig

³ ARBER versuchte unterschiedliche Mikroorganismen mit Phagen zu infizieren. Dabei entdeckte er, daß nach der Adsorption und Penetration die Phagen-DNA als fremdartig erkannt und hydrolysiert wurde. Die DNA unterlag also einer *Restriktion* [88].

gleich sind. Derartige Palindrome⁴ haben eine zweizählige Symmetrieachse. Durch die hydrolytische Spaltung können drei verschiedene Produkte gebildet werden:

- *Blunt ends*: DNA-Fragmente mit doppelsträngigen Enden.
- *Sticky ends*: DNA-Fragmente mit 3'- und 5'-einzelsträngigen Enden.

Die Nomenklatur leitet sich von den Mikroorganismen ab, aus denen die Proteine isoliert worden sind. Heute sind mehr als 250 Restriktionsenzyme bekannt.

Bam HI

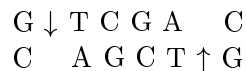
Das Restriktionsenzym *Bam* HI stammt aus *Bacillus amyloliquefaciens* (H) und schneidet Desoxyribonucleinsäuren folgender Sequenz:



Im Falle des Amplikons A₆₀ entsteht durch die Restriktion ein Fragment mit einer Länge von 55 Basen und einer Molmasse von 16 893.6 g mol⁻¹. Sequenz siehe Abbildungen 5.3 und 5.11.

Sal I

Die Endonuclease *Sal* I wurde aus *Streptomyces albus* G isoliert und schneidet DNA-Sequenzen folgender Struktur:



Aus der Restriktion des Amplikons A₆₀ geht ein Oligonucleotid mit einer Länge von 43 Basen und einer Molmasse von 13 186.3 g mol⁻¹ hervor. Sequenz siehe Abbildungen 5.3 und 5.11.

7.1.3. Die Phosphodiesterase

Die Phosphodiesterase *snake venom nuclease* (SVPDE⁵) aus *Crotalus durissus* ist in der Lage, vorzugweise einzelstränge Nucleinsäuren zu spalten⁶ [90]. Dabei arbeitet das Enzym als Exonuclease und greift das 3'-OH-Ende der DNA an. Die SVPDE von Boehringer Mannheim enthält außerdem eine einzelstrangspezifische Endonuclease, die *supercoiled* DNA in eine offen-zirkuläre Form überführen kann [91]. Bei beiden Prozessen entstehen 5'-Mononucleotide.

⁴Ein Palindrom ist ein Wort oder ein Satz, der vor- und rückwärts gelesen die gleiche Bedeutung ergibt.

⁵SVPDE: snake venome phosphodiesterase

⁶LASKOWSKI zeigte allerdings, daß das Enzym auch hochmolekulare, doppelsträngige DNA anzugreifen vermag [89].

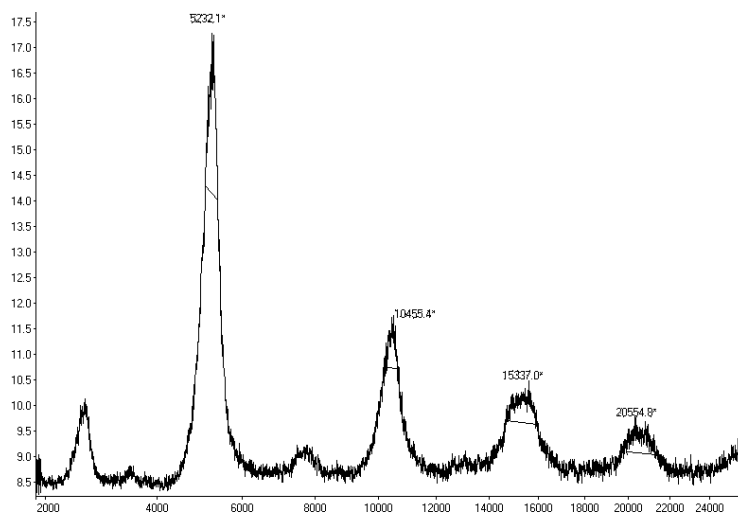


Abbildung 7.3.: MALDI-TOF-Spektrum von T₅₀ und **76**

7.2. Polymeraseexperimente mit membrangebundenen Oligonucleotiden

Um die Aufarbeitung von *fill-in*- und Sequenzierungsprodukten zu vereinfachen und beschleunigen, wurde versucht, Polymerasereaktionen mit 3'-festphasengebundenen Oligonucleotiden als *Primer* durchzuführen.

7.2.1. Hybridisierungsexperimente

Vor der Durchführung der *fill-in*-Reaktionen mit membrangebundenen Oligonucleotiden wurde die Hybridisierung des *Templates* T₅₀ an der Membran **76** untersucht. Dazu wurden mit dem *universal sequencing primer* USP beladene Membrane **76** mit der *Template*-DNA T₅₀ in 5 x SSPE versetzt und in einem auf 85 °C temperierten Trockenschrank gebracht. Der Trockenschrank wurde ausgestellt, die Proben langsam auf Raumtemperatur abgekühlt und zweimal mit 2 x SSPE gewaschen. Nach erneutem Waschen mit Reinstwasser wurden die Membrane mit 80 % Essigsäure versetzt. Die sauren Lösungen wurden nach zwei Stunden abzentrifugiert, lyophilisiert und mittels MALDI-TOF-MS vermessen. Neben dem USP ($M = 5\,228.34 \text{ g mol}^{-1}$) zeigte das MALDI-TOS-Spektrum das *Template* T₅₀ ($M = 15\,361.6 \text{ g mol}^{-1}$) und die doppelsträngige DNA USP/T₅₀ ($20\,589.94 \text{ g mol}^{-1}$). Das Signal bei $10\,455.4 \text{ mol}^{-1}$ hat wahrscheinlich seine Ursache in doppelsträngigem USP, was durch doppelt geladene Hybrid-DNA USP/T₅₀ überlagert sein könnte, worauf die breite Signal Form hindeutet. Mit anderen Hybridisierungspuffern wurden vergleichbare Ergebnisse erzielt.

Um abschätzen zu können, wie sich die Anzahl der Waschschrte auf die Hybridisierung an den Membranen auswirkt, wurden die Waschlösungen mittels UV-Spektroskopie

untersucht. Der Quotient der Absorptionen bei 260 und 280 nm macht eine Aussage über die Reinheit einer Nucleinsäure in Puffern. Die Werte wurden mit denen eines Hybridisierungsexperiments an Blindmembranen verglichen.

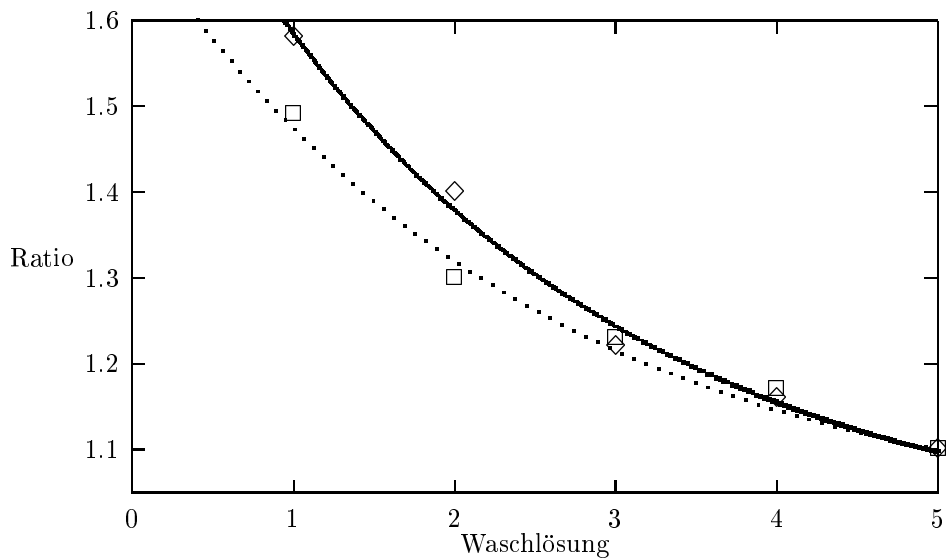


Abbildung 7.4.: Ratio 260/280 [nm] der einzelnen Waschfraktionen; Blindprobe (□); Hybridisierungsprobe (◇)

In Abbildung 7.4 ist ersichtlich, daß sich die Ratio 260/280 beider Proben schon nach drei Waschungen annähert. Aus diesem Grund wurde bei späteren Experimenten auf häufigeres Waschen der hybridisierten Proben verzichtet.

7.2.2. Fill-In Experimente

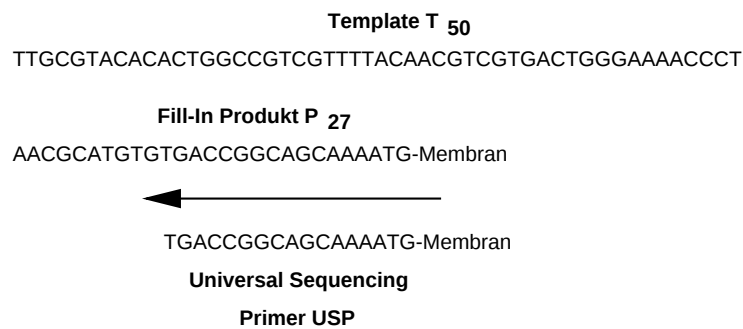


Abbildung 7.5.: *Primer*-Konzept der *Fill-In*-Reaktionen

Für die *fill-in*-Reaktionen mit membrangebundenem *universal sequencing primer* USP wurden die Membrane **75**⁷ und **76**⁸ verwendet. Als Matrix-DNA diente das versetzt an das 17mer hybridisierende Oligonucleotid T₅₀. Das *Primer-Template*-System ist in Abbildung 5.1 verdeutlicht. Das nach der Polymerase-Reaktion zu erwartende Produkt P₂₇ hat eine Länge von 27 Basen und eine Molmasse von 8 342.28 Da. Folgende Experimente wurden durchgeführt:

1. Zunächst wurden die Membrane mit dem *Blocking*-Reagenz der Firma Boehringer behandelt. Das *Blocking*-Reagenz wurde in einem NaCl-Tris-Puffer gelöst und bei 37 °C eine Stunde mit den Membranen **75** und **76** in Kontakt gebracht.
2. Nach dem Waschen der Membrane mit den entsprechenden *fill-in*-Puffern wurde die Matrix-DNA T₅₀ an die Membrane hybridisiert. Dazu wurden die festen Phasen in ein auf 65 °C temperiertes Wasserbad gebracht und anschließend langsam auf 37 °C abgekühlt.
3. Nach Zentrifugation wurden die Desoxynucleotid- und Polymerase-Lösungen auf die Träger gebracht. Zwei unterschiedliche Ansätze wurden verwendet:
 - (a) Ein dNTP-*labeling*-Mix mit digoxigeniertem dUTP und Polymerase I als Enzym.
 - (b) Ein dNTP-Mix mit dem Klenow-Fragment als Polymerase.

Allen Ansätzen wurde BSA zugesetzt. Die Polymerase-Reaktion erfolgte über einen Zeitraum von einer Stunde bei 37 °C.

4. Zur Denaturierung der Doppelstränge wurden die Membrane fünf Minuten mit einer 50 % Formamid-Lösung in 70 mM Ammoniumcitrat bei 65 °C behandelt. Gewaschen wurde mit 70 mM Ammoniumcitrat, gefolgt von Wasser.

Als Kontrollreaktionen wurde eine Reihe von Ansätzen parallel vorbereitet, in denen ebenfalls unmodifizierte und digoxigenierte dNTPs als Substrate verwendet wurden. Als Polymerasen kamen wieder das Kornberg-Enzym und das Klenow-Fragment zum Einsatz. Folgende Experimente wurden im Einzelnen durchgeführt:

- In Anwesenheit von unaktivierten Biotyne C Membranen⁹ wurden *fill-in*-Reaktionen mit dem Oligonucleotid **54** als *Primer* durchgeführt. Als Matrix-DNA diente wieder das 50mer T₅₀. An Stelle des nativen Reaktionspuffers wurde in diesem Fall ein magnesiumhaltiger Phosphatpuffer pH 7.4 verwendet. Vor der Denaturierung wurde die Reaktionslösung abzentrifugiert und anschließend an EDC-aktivierte Membrane gebunden.

⁷Mit USP beladene Biotyne C Membrane mit Polyoxyethylen als *Spacer*.

⁸Mit USP beladene Biotyne C Membrane mit 1,6-Diaminohexan als *Spacer*.

⁹Eine enzymatische Reaktion in Gegenwart von Biotyne C Membrane erforderte in jedem Fall das *Blocking*. Ohne diesen Schritt verliefen die Reaktionen stets negativ.

- Die Membran **76** wurde in einer Polymerase-Reaktion ohne Matrix-DNA eingesetzt.
- In Gegenwart von unmodifizierten Biotin C Membranen wurde nur das *Template* T₅₀ ohne *Primer* einer Polymerase-Reaktion angeboten.

Die Denaturierungs- und Waschschrte wurden parallel zu den anderen Proben vorgenommen. Vor der Detektion wurden die Membrane mit einem Skalpell halbiert. Eine Membranhälfte wurde zwei Stunden mit 80 % Essigsäure¹⁰ behandelt. Die sauren Lösungen wurden abzentrifugiert, lyophilisiert und mittels MALDI-TOF-MS analysiert. Die Proben mit dem digoxigenierten dUTP im Nucleosidtriphosphat-Mix wurden entsprechend der Detektions-Anleitung bearbeitet [92].



Abbildung 7.6.: Ergebnisse der Experimente mit digoxigeniertem dUTP

Nach zwei Stunden Behandlung konnte folgendes beobachtet werden:

1. Eine deutliche Färbung trat in den Experimenten auf, in denen
 - (a) der *Primer* von Anfang an der festen Phase immobilisiert und eine *Template*-DNA hybridisiert war (Abb. 7.6: 1.Membran von links) oder
 - (b) der *Primer* nach der Polymerasereaktion in Gegenwart von Matrix-DNA an die Membran gebunden wurde. (Abb. 7.6: 2.Membran von rechts)
2. Eine schwächere Reaktion wurde detektiert, wenn nur der membrangebundene *Primer* ohne Template-DNA eingesetzt wurde. (Abb. 7.6: 2.Membran von links)
3. Bei den Proben in Gegenwart unaktivierter Biotin C Membrane konnte keinerlei Reaktion nachgewiesen werden. (Abb. 7.6: Membran ganz rechts)
4. Ebenso negativ fiel der Nachweis aus, wenn nur die Matrix-DNA T₅₀ in Gegenwart von unmodifizierten Biotin C Membrane in der *fill-in*-Reaktion eingesetzt wurde. (Abb. 7.6: Membran in der Mitte)

¹⁰Alternativ wurden ca. 0.25 mm² große Membranstücke angefeuchtet und mit Trifluoressigsäure-Dämpfen behandelt. Es trat augenblicklich eine Rosafärbung auf. Die Membrane wurden mit 3-HPA auf dem Probenteller fixiert und vermessen.

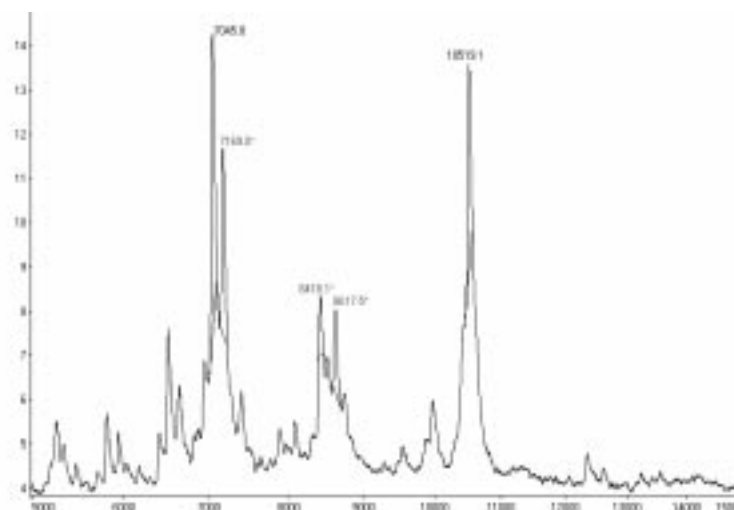


Abbildung 7.7.: MALDI-TOF-Spektrum einer membrangebundenen *fill-in*-Reaktion mit digoxigeniertem dUTP

Die MALDI-TOF-Spektren der membrangebundenen Polymerasereaktionen zeigten keine einheitlichen Produkte, wenn digoxigeniertes dUTP eingesetzt wurde (Abb. 7.7). Das verwendete DIG-11-dUTP verfügte über eine basenlabile Esterbindung¹¹, die bei der Anbindung, Aufarbeitung oder Detektion zum Teil gespalten werden kann. Der Austausch eines Thymidins in den Polymerase-Produkten erhöht die Molmasse um 545.73 Da, wenn das Digoxigenin noch über die Esterbindung mit dem funktionalisierten Desoxyuridin verknüpft ist. Nach einer Spaltung des Esters bei Substitution eines Thymidins durch das derivatisierte Desoxyuridin erhöht sich die Molmasse um 156.23 Da. Das Signal bei 8 418.1 Da kann durch das nicht-digoxigenierte Produkt P₂₇ ($M = 8\,342.28$ Da) hervorgerufen worden sein. Bei dem Signal von 8 617.5 Da kann es sich um ein Polymeraseprodukt mit zwei eingebauten DIG-11-dUTPs handeln, deren Esterbindungen gespalten worden sind ($M = 8\,654.73$ Da). Durch Einbau eines TTPs und eines DIG-11-dUTPs mit anschließendem Kettenabbruch entsteht das Oligonucleotid USP+GTG-DIG-11-dU mit einer Molmasse von 7 040.86 Da, was für das Signal bei 7 045.8 verantwortlich sein kann. Durch Substitution beider Thymidin-Moleküle durch DIG-11-dU und Abspaltung eines Digoxigenins mit Kettenabbruch erhält man ein Molekül der Molmasse 7 197.09 Da, was mit für das Signal bei 7 169.0 Da verantwortlich sein kann. Das Molekül hat die Zusammensetzung G₇A₆T₂C₄DIG-11-dU+11-dU, wobei 11-dU für ein eingebautes DIG-11-dUTP mit anschließender Esterspaltung steht. Das Signals bei 10 519.1 Da konnte nicht zugeordnet werden. In den Versuchen ohne Einsatz von DIG-11-dUTP konnte im MALDI-TOF-Spektrum ein Signal bei 8 355.4 Da nachgewiesen werden, das dem Produkt P₂₇ ($M = 8\,342.28$ Da) zugewiesen werden kann (Abb. 7.8).

¹¹Die Firma Boehringer Mannheim bietet außerdem ein DIG-11-dUTP mit einer alkalistabilen Etherbindung an.

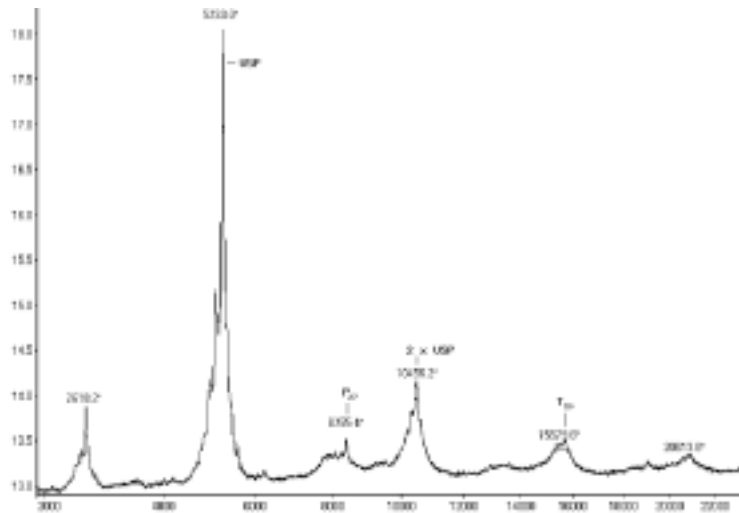


Abbildung 7.8.: MALDI-TOF-Spektrum einer membrangebundenen *fill-in*-Reaktion mit unmodifizierten dNTPs

Ein positiver Nachweis mit HPLC oder Gelelektrophoresen von membrangebundenen Oligonucleotiden gelang nicht. Nach Abspaltung der Produkte von den Membranen war es nicht möglich, eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchzuführen, weil die Proben stets zu viele salzartige Verbindungen enthielten. Die Polymerase-Produkte ließen sich nicht durch Fällung aufreinigen¹². Zwischen den Membranen **75** und **76** konnte kein signifikanter Unterschied in den Ergebnissen festgestellt werden.

7.2.3. PCR-Versuche

Die PCR-Experimente mit der Membran **76** wurden in einem *in-situ*-PCR-Block durchgeführt. Die Membrane wurden mit PCR-Lösungen auf einem Objektträger versetzt. Die Lösungen enthielten je

- eine der thermostabilen Polymerasen
 - *Taq*-DNA-Polymerase
 - *Tth*-DNA-Polymerase
 - *Pfu*-DNA-Polymerase
 - *Vent*-DNA-Polymerase
- eine der PCR-Gegen-*Primer*
 - RP-(60)

¹²Ebenso negativ fielen Versuche aus, durch eine zweistündige Vorbehandlung der Membran mit Essigsäure unerwünschte Salze aus dem Träger zu eluieren.

- RSP
- eine der *Template*-DNA:
 - M13mp18
 - pUC19
- dNTP-Mix
- magnesiumhaltigen PCR-Puffer

Sämtliche Kombinationen wurden untersucht. Auf die Membrane wurden dann Deckgläschen gelegt, die mit Heißwachs verschlossen wurden. Die Objektträger wurden eine Minute auf 94 °C erhitzt. Das *Anealing* erfolgte 30 Sekunden bei 48 °C, die Kettenverlängerung eine Minute bei 72 °C und die Denaturierung 30 Sekunden bei 94 °C. Nach 30 Zyklen wurde die Temperatur fünf Minuten bei 72 °C gehalten. Anschließend wurden die Objektträger auf Raumtemperatur abgekühlt. Nach dem Entfernen der Deckgläschen wurden die Membrane mit TBS-Puffer und Ammoniumcitrat gespült und mit 80 % Essigsäure versetzt. Die sauren Lösungen wurden abzentrifugiert, lyophilisiert und mittels MALDI-TOF-MS analysiert. Mit der PCR unter Verwendung membrangebundener Primer konnte stets nur der *universal sequencing primer* nachgewiesen werden.

7.3. Polymeraseexperimente mit derivatisierten Oligonucleotiden in Lösung

Ein anderer Weg, kovalente Festphasenbindungen zur Aufreinigung von Polymerasereaktions-Produkten einzusetzen, besteht in dem Ansatz, die enzymatische Reaktion in Lösung durchzuführen und deren gewünschte Produkte anschließend an Membranen zu immobilisieren.

7.3.1. Versuche mit dem Klenow-Fragment und der Kornberg-Polymerase

Es wurden Versuche durchgeführt, die zeigten, daß sowohl die Polymerase I als auch das Klenow-Fragment in einem magnesiumhaltigen Phosphat-Puffer bei pH 7.4 arbeiten. Für eine Anbindung an EDC-aktivierte Biotin-Membrane ist es notwendig, Puffer ohne primäre oder sekundäre Amine zu verwenden. Die *fill-in*-Reaktionen wurden analog zu den membrangebundenen Experimenten (Siehe Abschnitt 7.2.2) durchgeführt. Die Anbindung erfolgte wie in Abschnitt 6.2.2 beschrieben. Die Detektion wurde mittels MALDI-TOF-Spektrometrie durchgeführt.

Abbildung 7.9 zeigt, daß nur das erwartete Produkt detektiert werden konnte. Die Polymerase-Reaktion verlief quantitativ. Durch die Denaturierung war keine *Template*-DNA mehr nachweisbar.

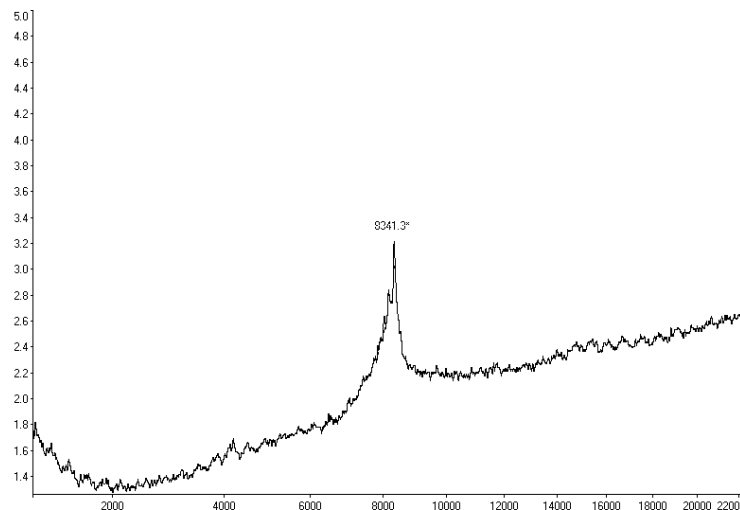


Abbildung 7.9.: MALDI-TOF-Spektrum des *fill-in*-Produktes P₂₇

7.3.2. PCR-Versuche

Vor den Polymerasekettenreaktionen und deren anschließender Anbindung an die Membrane, wurden folgende Experimente gemacht:

- Das Oligonucleotid **54** wurde im Nanomol-Maßstab dem Temperatur-Programm der PCR ausgesetzt, um zu überprüfen, ob eine Detritylierung durch Hitze eintritt. Das tritylierte Oligonucleotid erwies sich als stabil.
- Mit dem λ -System wurde die Akzeptanz der retritylierten Oligonucleotiden **55** und **57** in der PCR getestet. Als Matrix-DNA diente λ -DNA. Der zweite PCR-*Primer* war λ_2 . Es wurde ein 500 bp Fragment amplifiziert, daß mittels Agarose-Elektrophorese nachgewiesen wurde. Nach Etablierung der PCR wurden analoge Experimente wurden mit den Oligonucleotiden USP, RSP und RP-(60) im M13-System gemacht. Bei Verwendung der *Primer* USP und RSP wurde ein 98 bp-Fragment amplifiziert. Durch Einsatz des reversen *Primers* RP-(60) wurde ein 60 bp großes Amplikon erhalten. Die 98 bp große Nucleinsäure wurde im weiteren Verlauf an Biodyn C Membrane kovalent gebunden und mit Restriktionsenzymen behandelt.

PCR	I	II	III	IV	V	VI
Primer I	<u>54</u>	<u>54</u>	<u>54</u>	<u>54</u>	<u>54</u>	<u>54</u>
Primer II	RSP	RSP	RSP	RSP	RSP	RSP
DNA	M13mp18	M13mp18	M13mp18	M13mp18	M13mp18	M13mp18
Puffer	Borat	Borat	Borat	Borat	Borat	Borat
pH	7.9	8.1	8.3	8.5	8.7	8.9
Denaturierung	94 °C; 30 s	94 °C; 30 s	94 °C; 30 s	94 °C; 30 s	94 °C; 30 s	94 °C; 30 s
Elongation	72 °C; 60 s	72 °C; 60 s	72 °C; 60 s	72 °C; 60 s	72 °C; 60 s	72 °C; 60 s
Annealing	48 °C; 30 s	48 °C; 30 s	48 °C; 30 s	48 °C; 30 s	48 °C; 30 s	48 °C; 30 s

Tabelle 7.2.: PCR mit *Taq*-DNA-Polymerase

PCR	VII	VIII	IX	X	XI	XII
Primer I	<u>54</u>	<u>54</u>	<u>54</u>	<u>54</u>	<u>54</u>	<u>54</u>
Primer II	RSP	RSP	RSP	RSP	RSP	RSP
DNA	M13mp18	M13mp18	M13mp18	M13mp18	M13mp18	M13mp18
Puffer	Borat	Borat	Borat	Borat	Borat	Borat
pH	7.9	8.1	8.3	8.5	8.7	8.9
Denaturierung	94 °C; 30 s	94 °C; 30 s	94 °C; 30 s	94 °C; 30 s	94 °C; 30 s	94 °C; 30 s
Elongation	72 °C; 60 s	72 °C; 60 s	72 °C; 60 s	72 °C; 60 s	72 °C; 60 s	72 °C; 60 s
Annealing	48 °C; 30 s	48 °C; 30 s	48 °C; 30 s	48 °C; 30 s	48 °C; 30 s	48 °C; 30 s

Tabelle 7.3.: PCR mit *Tth*-DNA-Polymerase

PCR	XIII	XIV	XV	XVI	XVII	XVIII
Primer I	<u>54</u>	<u>54</u>	<u>54</u>	<u>54</u>	<u>54</u>	<u>54</u>
Primer II	RSP	RSP	RSP	RSP	RSP	RSP
DNA	M13mp18	M13mp18	M13mp18	M13mp18	M13mp18	M13mp18
Puffer	Borat	Borat	Borat	Borat	Borat	Borat
pH	7.9	8.1	8.3	8.5	8.7	8.9
Denaturierung	94 °C; 30 s	94 °C; 30 s	94 °C; 30 s	94 °C; 30 s	94 °C; 30 s	94 °C; 30 s
Elongation	72 °C; 60 s	72 °C; 60 s	72 °C; 60 s	72 °C; 60 s	72 °C; 60 s	72 °C; 60 s
Annealing	48 °C; 30 s	48 °C; 30 s	48 °C; 30 s	48 °C; 30 s	48 °C; 30 s	48 °C; 30 s

Tabelle 7.4.: PCR mit *Pfu*-DNA-Polymerase

PCR	IXX	XX	XXI	XXI	XXIII	XXIV
Primer I	<u>54</u>	<u>54</u>	<u>54</u>	<u>54</u>	<u>54</u>	<u>54</u>
Primer II	RSP	RSP	RSP	RSP	RSP	RSP
DNA	M13mp18	M13mp18	M13mp18	M13mp18	M13mp18	M13mp18
Puffer	Borat	Borat	Borat	Borat	Borat	Borat
pH	7.9	8.1	8.3	8.5	8.7	8.9
Denaturierung	94 °C; 30 s	94 °C; 30 s	94 °C; 30 s	94 °C; 30 s	94 °C; 30 s	94 °C; 30 s
Elongation	72 °C; 60 s	72 °C; 60 s	72 °C; 60 s	72 °C; 60 s	72 °C; 60 s	72 °C; 60 s
Annealing	48 °C; 30 s	48 °C; 30 s	48 °C; 30 s	48 °C; 30 s	48 °C; 30 s	48 °C; 30 s

Tabelle 7.5.: PCR mit Vent-DNA-Polymerase

Neben dem Phosphat-Puffer wurden bei den thermostabilen Polymerasen Borat-Puffer mit unterschiedlichen pH-Werten benutzt. Die *Tth*-DNA-Polymerase erwies sich als am besten geeignet. Durch Agarose-Elektrophoresen wurde ermittelt, daß das Maximum der Enzymaktivität bei etwa pH 8.5 lag. Eine exakte Quantifizierung mittels HPLC war nicht möglich. Um Nucleinsäuren unterschiedlicher Längen trennen zu können, mußte eine Ionenaustauschchromatographie durchgeführt werden. Durch den unterschiedlichen pH der einzelnen Proben kam es zu Signal-Verformungen und -Aufspaltungen, die einen direkten Vergleich der Proben unmöglich machten. Allerdings ist es möglich, eine Quantifizierung und Aufreinigung von PCR-Produkten mit identischem pH-Wert durchzuführen. Dafür eignet sich besonders das SMART-System der Firma Pharmacia, was für kleine Probenmengen optimiert worden ist. Für die Trennung von PCR-Produkten mit einer Länge von etwa 100 Basen wurde folgendes Gradienten-System verwendet:

- Puffer A: TE-Puffer.
- Puffer B: TE-Puffer; 1 M NaCl.

Die Konzentration von Puffer B wurde über einen Zeitraum von zehn Minuten nach der Injektion von 50 % auf 80 % erhöht. Anschließend wurde das System vier Minuten isokratisch mit 80 % Puffer B behandelt. Bei der Verwendung einer *Mono Q PC 1.6/5*-Säule und einer Durchflußrate von $100 \mu\text{l min}^{-1}$ eluierten die PCR-Produkte ca. neun Minuten nach der Injektion.

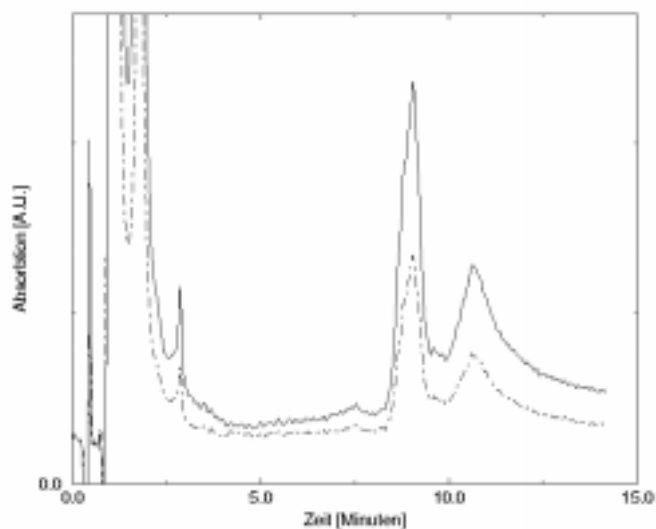


Abbildung 7.10.: SMART-HPLC von **X**. Durchgezogene Linie: 260 nm; Strichpunkt-Linie: 280 nm

Mittels des integrierten Fraktionssammlers wurden die PCR-Produkte aufgefangen und mit dem SMART-System und einer *Fast Desalting PC* 3.2/10-Säule entsalzt. Die Durchflußrate betrug $50 \mu\text{l min}^{-1}$ und wurde mit Reinstwasser oder 100 mM TEAAc-Puffer durchgeführt. Eine abschließende Agarose-Elektrophorese zeigte lediglich die Anwesenheit der PCR-Produkte. *Primer* und Matrix-DNA konnten nicht mehr detektiert werden.

PCR	XXV	XXVI	XXVII	XXIII	XXIX	XXX
Primer I	<u>54</u>	<u>54</u>	<u>54</u>	<u>54</u>	<u>54</u>	<u>54</u>
Primer II	RSP	RSP	RSP	RSP	RSP	RSP
DNA	M13mp18	M13mp18	M13mp18	M13mp18	M13mp18	
Puffer	Phospat	Phospat	Phospat	Phosphat	<i>Taq</i>	<i>Taq</i>
pH	7.4	7.4	7.4	7.4	8.3	8.3
Denaturierung	94 °C; 30 s	94 °C; 30 s	94 °C; 30 s	94 °C; 30 s	94 °C; 30 s	94 °C; 30 s
Elongation	72 °C; 60 s	72 °C; 60 s	72 °C; 60 s	72 °C; 60 s	72 °C; 60 s	72 °C; 60 s
Annealing	48 °C; 30 s	53 °C; 30 s	58 °C; 30 s		48 °C; 30 s	48 °C; 30 s

Tabelle 7.6.: PCR mit *Taq*-DNA-Polymerase

PCR	XXXI	XXXII	XXXIII	XXXIV	XXXV	XXXVI
Primer I	<u>54</u>	<u>54</u>	<u>54</u>	<u>54</u>	<u>54</u>	<u>54</u>
Primer II	RSP	RSP	RSP	RSP	RSP	RSP
DNA	M13mp18	M13mp18	M13mp18	M13mp18	M13mp18	
Puffer	Phospat	Phospat	Phospat	Phosphat	<i>Tth</i>	<i>Tth</i>
pH	7.4	7.4	7.4	7.4	8.3	8.3
Denaturierung	94 °C; 30 s	94 °C; 30 s	94 °C; 30 s	94 °C; 30 s	94 °C; 30 s	94 °C; 30 s
Elongation	72 °C; 60 s	72 °C; 60 s	72 °C; 60 s	72 °C; 60 s	72 °C; 60 s	72 °C; 60 s
Annealing	48 °C; 30 s	53 °C; 30 s	58 °C; 30 s		48 °C; 30 s	48 °C; 30 s

Tabelle 7.7.: PCR mit *Tth*-DNA-Polymerase

In weiteren Experimenten wurde die *Annealing*-Temperatur der PCR über einen Bereich von 48–58 °C variiert. Die besten Ergebnisse wurden bei einer Temperatur von 48 °C erzielt. Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß in Puffern ohne Tris die *Tth*-DNA-Polymerase am besten arbeitet. Das galt sowohl für die Borat- als auch den Phosphat-Puffer.

7.3.3. Fill-In-Experimente mit der *Tth*-DNA-Polymerase

Da sich die *Tth*-DNA-Polymerase als das geeignetste Enzym für die Polymeraseexperimente in Puffern ohne Tris erwies, wurde eine zyklische Polymerasereaktion mit nur einem Primer und dem *Template* T₅₀ als Matrix durchgeführt. Um das Reaktionsprodukt P₂₇ mit Hilfe der IEX-HPLC detektieren zu können, war die Durchführung einer normalen *fill-in*-Reaktion mit dem Klenow- oder Kornberg-Enzym nicht möglich¹³.

¹³Die verwendete *Waters Gene Pak FAX*-Chromatographiesäule erlaubte weder den Einsatz von Harnstoff noch von Formamid zur Denaturierung von Nucleinsäuren.

Mit der IEX-HPLC wurden folgende Versuche durchgeführt:

- Nacheinander wurden etwa gleiche Konzentrationen und Mengen von USP, P₂₇ und T₅₀ injiziert. Alle drei Oligonucleotide eluierten nach unterschiedlichen Retentionszeiten.
- Koinjektion von etwa gleichen Mengen USP und P₂₇. Im Chromatogramm traten bei den erwarteten Zeiten zwei Signale auf.
- Koinjektion von etwa gleichen Mengen P₂₇ und T₅₀. Im Chromatogramm trat lediglich ein Signal auf, daß die gleiche Retentionszeit besaß, wie das des T₅₀. Erst nach Injektion der etwa dreifachen Menge von P₂₇ waren beide Substanzen detektierbar.
- Die gleichen Beobachtungen wurden mit Mischungen aus USP und T₅₀ gemacht.

Obwohl die HPLC bei einer Säulentemperatur von 60 °C durchgeführt wurde, scheinen die Oligonucleotide – wenn es ihre Sequenzen zulassen – intermolekular zu hybridisieren. Um *fill-in*-Experimente in Lösung mit der IEX-HPLC analysieren zu können, ist es notwendig, daß durch die Polymerasereaktion ein Überschuß Produkt in Bezug auf die Matrix-DNA gebildet wird. Solche Ergebnisse können erzielt werden, wenn man zyklische Polymerasereaktionen mit thermostabilen Enzymen durchführt. Im Prinzip handelt es sich dabei um eine “PCR mit nur einem *Primer*” (asymetrische PCR).

PCR	XXXVII	XXXVIII	XXXIX	XL
Primer	54	54	USP	USP
DNA	T ₅₀	T ₅₀	T ₅₀	T ₅₀
Puffer	Borat	Borat	Borat	Borat
pH	8.5	8.5	8.5	8.5
Denaturierung	94 °C; 30 s	94 °C; 30 s	94 °C; 30 s	94 °C; 30 s
Elongation	72 °C; 60 s	72 °C; 60 s	72 °C; 60 s	72 °C; 60 s
Anealing	48 °C; 30 s	48 °C; 30 s	48 °C; 30 s	48 °C; 30 s
Membran-Aktivierung	EDC		EDC	

Tabelle 7.8.: Zyklische Polymerasereaktionen mit *Tth*-DNA-Polymerase

Entsprechend Tabelle 7.8 wurden die Ansätze nach der Polymerasereaktion auf aktivierte und unaktivierte Biodyne C Membrane gebracht, wobei bei **XL** direkt die Reaktionslösung in die HPLC injiziert wurde. Nach dem Waschen, Abspalten und Lyophilisieren wurden die Proben in Puffer gelöst und mittels IEX-HPLC vermessen. Dabei wurde folgender Gradient verwendet:

- Puffer A: 100 µM Tris, 1mM EDTA, 85 mM Borsäure pH 8.0.
- Puffer B: 100 µM Tris, 1mM EDTA, 85 mM Borsäure, 1 M Natriumchlorid pH 8.0.

Der Gradient wurde über einen Zeitraum von 10 Minuten kontinuierlich von 30 % B auf 90 % B erhöht. Die Chromatographie wurde anschließend noch fünf Minuten bei den Endbedingungen fortgesetzt. Die Säulentemperatur betrug 60 °C bei einer Durchflußrate von 750 $\mu\text{l min}^{-1}$. In diesem System hatte der *universal sequencing primer* eine Retentionszeit von 6.0 Minuten. Das *fill-in*-Produkt P₂₇ wurde nach 7.6 Minuten eluiert. Die Matrix-DNA T₅₀ wurde nach 8.7 Minuten detektiert.

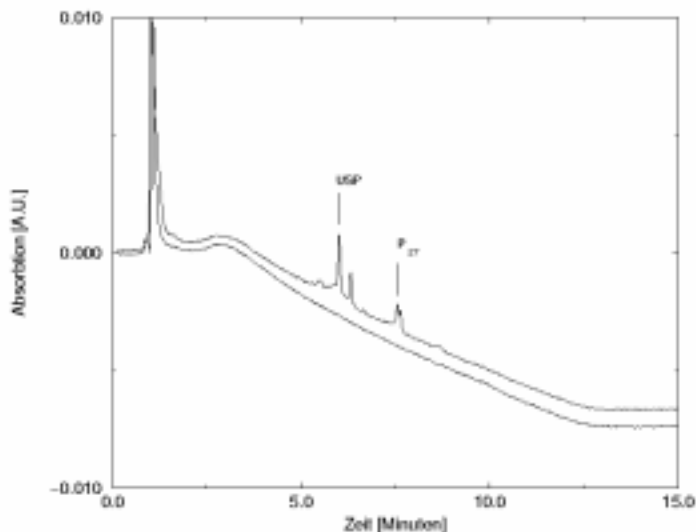


Abbildung 7.11.: IEX-HPLC von **XXXVII** (obere Linie) und **XXXIX** (untere Linie)

Abbildungen 7.11 und 7.12 zeigen Chromatogramme der Versuche **XL**, **XXXVII** und **XXXIX**. Bei Versuch **XXXIX** wurde der Überstand für die Chromatographie verwendet. Von Reaktion **XXXVII** wurde zusätzlich ein MALDI-TOF-Spektrum aufgenommen (Abb. 7.13).

Die Ergebnisse zeigen, daß bei den Experimenten mit einer Aufreinigung der Nucleinsäuren über eine kovalente Membrananbindung, die Produkte einheitlicher sind. In dem IEX-Chromatogramm von **XXXCII** ist keine Matrix-DNA detektierbar. Bei der Substitution von **54** durch USP sind nach der essigsäuren Behandlung überhaupt keine Oligonucleotide nachweisbar (Versuch **XXXIX**). Mit Hilfe der Anbindung an EDC-aktivierte Biodyn C Membran ist es möglich, einzelsträngige Polymeraseprodukte zu erhalten.

7.4. Experimente mit Restriktionsenzymen

Vor den Reaktionen mit den Restriktionsenzymen wurden Polymerasekettenreaktionen mit RSP und **54** als *Primer* in Lösung durchgeführt (Siehe 7.3.2). Das 98 bp große

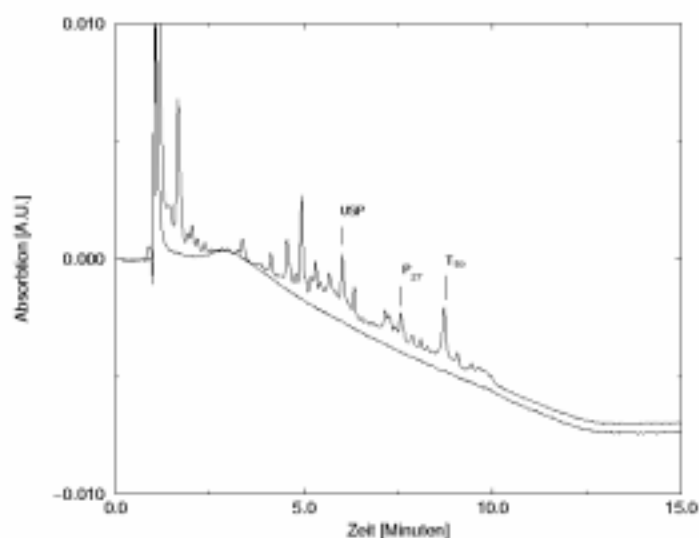


Abbildung 7.12.: IEX-HPLC von **XL** (obere Linie) und **XXXIX** (untere Linie)

Amplifikationsfragment diente als Substrat für die Endonucleasen. Ein Teil der mit dem Oligonucleotid **54** durchgeführten Ansätze wurde nach der Polymerasereaktion an EDC-aktivierte Membrane immobilisiert. Nach der Anbindung wurden die Membrane gewaschen, mit den entsprechenden Restriktionspuffern versetzt und mit *Bam* HI bzw. *Sal* I behandelt. Ein anderer Teil wurde nach der PCR direkt mit den Restriktionsenzymen umgesetzt und anschließend an die Membrane gebunden.

PCR	XLI	XLII	XLIII	XLIV
Primer 1	54	54	USP	USP
Primer 2	RSP	RSP	RSP	RSP
DNA	M13mp18	M13mp18	M13mp18	M13mp18
Puffer	Borat	Borat	Borat	Borat
pH	8.5	8.5	8.5	8.5
Polymerase	<i>Tth</i>	<i>Tth</i>	<i>Tth</i>	<i>Tth</i>
Denaturierung	94 °C; 30 s	94 °C; 30 s	94 °C; 30 s	94 °C; 30 s
Elongation	72 °C; 60 s	72 °C; 60 s	72 °C; 60 s	72 °C; 60 s
Anealing	48 °C; 30 s	48 °C; 30 s	48 °C; 30 s	48 °C; 30 s
Membran-Aktivierung	EDC	EDC		
Restriktionsenzym	<i>Sal</i> I	<i>Bam</i> HI	<i>Sal</i> I	<i>Bam</i> HI

Tabelle 7.9.: Restriktionsexperimente an der Membran

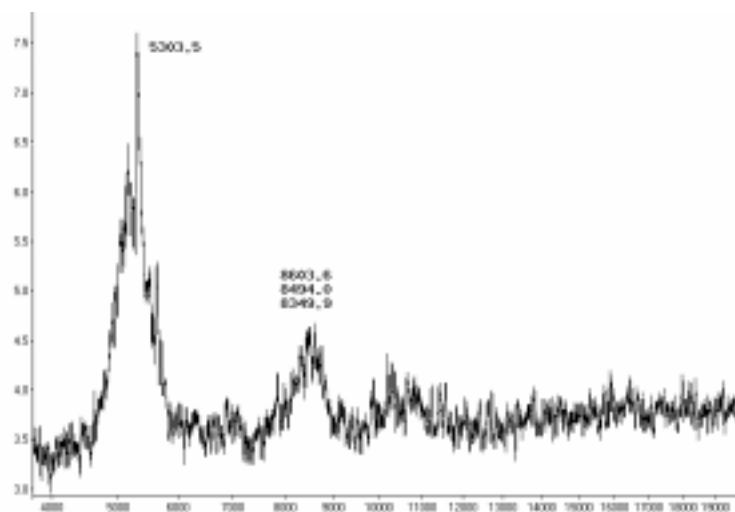


Abbildung 7.13.: MALDI-TOF-Spektrum von **XXXVII**

PCR	XLV	XLVI	XLVII	XLVIII
Primer 1	<u>54</u>	<u>54</u>	USP	USP
Primer 2	RSP	RSP	RSP	RSP
DNA	M13mp18	M13mp18	M13mp18	M13mp18
Puffer	Borat	Borat	Borat	Borat
pH	8.5	8.5	8.5	8.5
Polymerase	<i>Tth</i>	<i>Tth</i>	<i>Tth</i>	<i>Tth</i>
Denaturierung	94 °C; 30 s	94 °C; 30 s	94 °C; 30 s	94 °C; 30 s
Elongation	72 °C; 60 s	72 °C; 60 s	72 °C; 60 s	72 °C; 60 s
Anealing	48 °C; 30 s	48 °C; 30 s	48 °C; 30 s	48 °C; 30 s
Restriktionsenzym	<i>Sal</i> I	<i>Bam</i> HI	<i>Sal</i> I	<i>Bam</i> HI
Membran-Aktivierung	EDC	EDC		

Tabelle 7.10.: Restriktionsexperimente in Lösung

Nach dem Spülen der Membrane mit 25 % Ammoniak und Ammoniumcitrat-Lösung wurden die festen Phasen zwei Stunden mit 80 % Essigsäure behandelt. Die sauren Lösungen wurden abzentrifugiert, lyophilisiert und mittels MALDI-TOF-MS analysiert. Es konnten weder bei den Experimenten in Lösung noch bei den Versuchen an den Membranen Restriktionsprodukte nachgewiesen werden.

7.5. Phosphodiesteraseexperimente

Es wurden die mit den Oligonucleotid USP beladene Membran **76** mit Phosphodiesterase umgesetzt, nachdem die Membran mit der *Blocking*-Lösung II behandelt worden war. Nach einer Reaktionszeit von 30 Minuten wurden die Membrane mit Reinstwasser und einer Ammoniumcitrat-Lösung gespült. Die Reaktionsprodukte wurden über einem Zeitraum von zwei Stunden mit 80 % Essigsäure abgespalten. Die sauren Lösungen wurden lyophilisiert und in Reinstwasser aufgenommen. Parallel zu den Membranexperimenten wurden Versuche mit dem *universal sequencing primer* in Lösung durchgeführt. Die Umsetzungen fanden in Wasser statt und dauerten 30 Minuten. Anschließend wurden die Proben mit flüssigem Stickstoff auf -196°C abgekühlt und lyophilisiert. Die Proben wurden mittels MALDI-TOF-Spektrometrie vermessen.

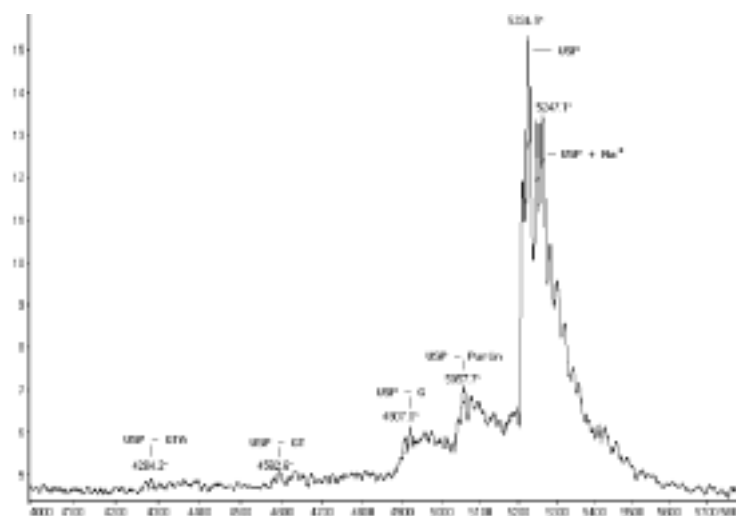


Abbildung 7.14.: MALDI-TOF-Spektrum vom SVPDE-Abbau an der Membran **76**.

Wie in Abbildung 7.14 ersichtlich ist, konnte in erster Linie *Primer* USP ($M = 5228.34\text{ Da}$) detektiert werden. Die Abbauprodukte USP - G ($M = 4899.14\text{ Da}$), USP - GT ($M = 4594.95\text{ Da}$) und USP - GTA ($M = 4281.75\text{ Da}$) gehen fast im Rauschen des Spektrums unter. Bei den höhermolekularen Produkten handelt es sich um die Natrium- bzw. Kalium-Salze der Nucleinsäure. In der selben Zeit wurden die Oligonucleotide in Lösung komplett abgebaut.

Teil III.

Zusammenfassung

Es wurde ein neues Verfahren zur Aufreinigung von Oligonucleotiden entwickelt. Dabei wurden synthetische Oligonucleotide am *controlled pore glass* (CPG) mit *N*-Succinimidyl- oder *para*-Nitrophenyl-[bis-(4-methoxyphenyl)]-chlormethylbenzoaten re-trityliert. Diese aktivierten Ester ließen sich dann mit Nucleophilen zur Reaktion bringen. Durch eine Reaktion mit α,ω -Diaminen wurden sie zu Amiden umgesetzt. Nach Abspaltung vom CPG und Aufreinigung der Oligonucleotide, verfügten sie über eine 5'-terminale Aminogruppe, die kovalent an aktivierte Membrane gebunden werden konnte. Am geeignetsten erwies sich die Biotyne C Membran der Firma Pall. Bei der Biotyne C Membran handelt es sich um carboxylierte Nylonmembrane, die mit dem Carbodiimid EDC aktiviert werden können. Alternativ wurden auch Versuche mit DITC-aktivierten Membranen durchgeführt. Die Bindung erfolgt über das funktionalisierte Tritylmolekül, was seinerseits über eine säurelabile Etherbindung am 5'-Ende des Oligonucleotids verankert ist. Dadurch ist eine reversible Immobilisierung der Nucleinsäuren an den Membranen möglich, da die Tritylgruppe unter relativ milden Bedingungen sauer abspaltbar ist. Die eingesetzten Säuren können relativ einfach durch Trocknung, Lyophilisation oder Extraktion entfernt werden. Ist das Diamin über eine zur Etherbindung *para*-ständige Carboxylfunktion gebunden, ist die Bindung zum Oligonucleotid deutlich stabiler, als die Bindung mit underivatisiertem DMT. Um die elektronischen -I und -M-Effekte zu unterbinden, wurden *meta*-substituierte Tritylchloride als Linkermoleküle synthetisiert [42]. Es zeigte sich, daß sich die Halbwertszeiten in 80 % Essigsäure signifikant voneinander unterscheiden, wobei die *meta*-Verbindung in Säuren instabiler ist. Es wurden zwei Verfahren der Nutzung der aminoderivatisierten Oligonucleotide in enzymatischen Reaktionen unter Einbeziehung der Festphasentechnik untersucht: (a) Membrangebundene Oligonucleotide lassen sich als *Primer* in DNA-Polymerasereaktionen einsetzen. (b) Die funktionalisierten Oligonucleotide werden in Lösung als *Primer* eingesetzt. Die Aufreinigung der Ansätze erfolgt anschließend über eine Membrananbindung. Doppelsträngige DNA läßt sich an der festen Phase denaturieren. Bei der MALDI-TOF-MS oder Ionenaustausch-HPLC störende Edukte und Alkalisalze können einfach mit Pufferlösungen abgespült werden. Die Abspaltung der Oligonucleotide erfolgte in dieser Arbeit meist mit 80 % Essigsäure über einen Zeitraum von zwei Stunden.

Unterschiedliche Anbindungsexperimente von *para*-derivatisierten Oligonucleotiden, führten zu folgenden Resultaten: (a) Die Anbindungsreaktion ist – wie die Detritylierung – eine Reaktion erster Ordnung. (b) Die Abhängigkeit der Beladung von der angebotenen Oligonucleotidmenge ist linear-proportional, wenn die angebotene Oligonucleotidmenge gering im Vergleich zu der Menge EDC-aktivierter Carbonsäuren auf den Membranen war. Die Ausbeuten liegen nach einer Stunde Anbindung in Borat-Puffer pH 8.5 bei 3 %, entsprechend 53 fmol mm^{-2} . (c) Die Abhängigkeit der Anbindung vom pH-Wert läßt sich durch eine sigmoide Boltzmann-Funktion beschreiben und zeigt Ähnlichkeit mit einer Titrationskurve.

Die praktische Durchführung der Aktivierungen, Anbindungen und Abspaltungen erfolgte, wie das Waschen, in Mikro-Spin Zentrifugenfiltern der Firma Carl Roth oder mit der Absaugkammer EVENT 4160 der Firma Eppendorf, mit der bis zu 96 Proben parallel verarbeitet werden können. Positive Ergebnisse wurden mit der Membranfilter-Multititerplatte *Silent Monitor* erzielt, die als Membran Biotyne C enthielt. Alternativ

zur Immobilisierung über eine Amidbindung des Trityl-Linkers an der Membran wurden Untersuchungen mit Thioethern durchgeführt. Dazu wurden die aktivierten Ester der reitritylierten Oligonucleotide am CPG mit Cysteamin aminolysiert, abgespalten und aufgereinigt. Mit 1,6-Diaminohexan funktionalisierte Membrane wurden mit *para*-Nitrophenyliodacetat umgesetzt. Unter Abspaltung von HI kann die Mercaptogruppe mit dem membrangebundenen Amid unter Ausbildung einer R-S-R-Bindung reagieren. Allerdings konnten nur Spuren von Oligonucleotiden nach Abspaltung von der Membran detektiert werden.

Neben der Verwendung von 1,6-Diaminohexan in der Aminolyse der aktivierten Ester, wurden Versuche mit hochmolekularen α,ω -Polyoxyethylendiaminen (POE-Diamine) der Firma Rapp unternommen, um den Abstand der Oligonucleotide von den Membranoberflächen zu vergrößern. In weiteren Experimenten wurden die POE-Diamine mit *para*-nitrophenylierten Membranen umgesetzt. Die auf diesem Wege aminofunktionalisierten Träger wurden dann mit Bernsteinsäureanhydrid in carboxylierte Membrane umgewandelt. An diese festen Phasen konnten dann die reitritylierten Oligonucleotide immobilisiert werden. Die DITC-Aktivierung von PVDF erfolgte nach dem Patent zur Herstellung der *Sequelon*-Membrane [58]. An derartige Membrane wurden dann reitritylierte Oligonucleotide gebunden. Die Anbindung fand bei einem pH von 9.4 statt.

Es wurden enzymatische Experimente mit reitritylierten Oligonucleotiden in Lösung durchgeführt. Im Mittelpunkt standen dabei die DNA-Polymerasereaktionen. Neben *fill-in*-Reaktionen mit dem Klenow-Fragment und der Kornberg-Polymerase wurden auch PCRs durchgeführt. Als *Primer-Template*-System wurde zunächst λ -DNA mit den *Primern* λ_1 und λ_2 eingesetzt. Nach Etablierung der Methoden wurden die *Primer* USP, RSP und RP(-60) verwendet. Als Matrix-DNA dienten pUC19 und M13mp18. Bei den *fill-in*-Reaktionen diente ein synthetisches 50 b langes Fragment als *Template*, was versetzt mit dem USP hybridisiert. Es gelang, daß *fill-in*-Produkt einer Reaktion mit dem Klenow-Fragment in Phosphat-Puffer kovalent an aktivierte Biotin C Membran zu immobilisieren. Die Polymerasekettenreaktionen wurden in unterschiedlichen Puffern durchgeführt. Entscheidend für das Gelingen einer späteren Anbindung an aktivierte Membrane ist die Abwesenheit von Aminen in den Puffern, die in Konkurrenz zu den Aminogruppen der funktionalisierten Nucleinsäuren treten. Vor enzymatischen Experimenten mit den Membranen mußten die festen Phasen stets mit einer *Blocking*-Lösung behandelt werden. Versuche, membrangebundenen USP mit der Phosphodiesterase SVP-DE abzubauen, und so das Oligonucleotid hydrolytisch zu sequenzieren, verliefen wenig erfolgreich. Es wurden Versuche gemacht, digoxigeniertes dUTP mittels Polymerase I in einer *fill-in*-Reaktion einzubauen. Die Reaktion wurde sowohl membrangebunden als auch in Lösung durchgeführt. Die Reaktionsprodukte der Umsetzung in Lösung wurden später an aktivierte Membrane gebunden. Nach einer PCR mit der *Tth*-DNA-Polymerase wurde ein Teil der Produkte an aktivierte Biotin C Membrane gebunden. Die doppelsträngigen Nucleinsäuren wurden sowohl in Lösung als auch an den festen Phasen mit den Restriktionsnucleasen *Bam* HI und *Sal* I behandelt.

Summary

A new technique of purifying oligonucleotides was developed. Therefore CPG-bound, synthetic oligonucleotides were re-tritylated with *N*-succinimidyl- or *para*-nitrophenyl-[bis-(4-methoxyphenyl)]-chloromethylbenzoate. The active esters can react with nucleophiles. They were treated with α,ω -diamines to form amides. After cleavage from the CPG and purification of the oligonucleotides they carry a 5'-terminal amino group, which can be attached covalent to an active membrane. The best results were obtained with Biodyne C membranes produced by Pall. The Biodyne C membrane is a nylon membrane bearing carboxyl groups. The carboxyl groups can be transformed into an active ester with the carbodiimide EDC. Other experiments were performed with DITC activated membranes. The derived trityl molecule is coupled *via* an acid labile ether bond to the 5'-end of the oligonucleotide, which can be cleaved under mild conditions. The acids can easily be removed by evaporation, lyophilisation or extraction. It was observed that due to the -I and -M-effect of the ester functionality in *para* position the trityl ether bond demonstrates a significant increase in stability over the conventionally used DMT ether bonds. Therefore *meta* active trityl chlorides serving as linker molecules were synthesised [42]. It was observed that the half live times of the cleavage reaction in 80 % acetic acid are different and that the *meta* compound is less acid stabile [42]. There are two approaches for the use of amino derived oligonucleotides in enzymatic reactions with the solid phase technology: (a) Membrane attached Oligonucleotides can serve as primers in DNA polymerasereactions. (b) The derived oligonucleotides can serve as primers in solution. The purification will be performed *via* anchoring the products to active membranes. Double-stranded DNA can be denaturated from the solid phases. Educts and alkali ions – which compromise the high resolution of MALDI-TOF-MS and IEX-HPLC – can easily be removed by washing the solid phase with buffers. Most of the cleavage reactions were performed with 80 % acetic acid during two hours.

With different experiments of anchoring *para* derived oligonucleotides to membranes, the following results were observed: (a) The attachment reaction – like the cleavage – is first-order. (b) The relation between the load and the amount of offered oligonucleotides is linear, when the amount of oligonucleotides is much smaller than the amount of EDC-activated carboxy groups on the membranes. After one hour in a borate buffer pH 8.5 yields of 3 % (53 fmol mm^{-2}) were obtained. The relation between the load and the pH can be drawn as a sigmoid Boltzmann function, which looks similar to a titration curve.

The anchoring, washing and cleavage was performed in micro spin centrifuge tubes or with the EVENT 4060 vacuum filtration unit, which allows the parallel preparation of 96 probes. Good results were obtained with the *Silent Monitor* micro plates, which contains Biodyne C as the membrane. Different experiments with thiolated oligonucleotides were carried out. The diaminoethane in the aminolysis of the active trityl ether was substituted by cysteamine to form a terminale thiol group. Diaminoethane derived Biodyne C membranes were treated with 4-nitrophenyliodoacetat. Cleaving HI, the thiolated oligonucleotides can react with the membranes forming thio ethers. Unfortunately only poor yields of oligonucleotides have been detected after cleavage.

To raise the distance between the oligonucleotides and the membranes, the diaminoethane was substituted by high molecular α,ω -polyoxyethylenediamines. In later experiments the polyoxyethylenediamines were attached to active membranes, which were

derived with 4-nitrophenol. These amino derived membranes were transformed into carboxy bearing membranes in a reaction of succinic acid anhydride. The activation of the PVDF was performed as described in the patent of building *sequelon* membranes [58]. The attachment was performed in a buffer at pH 9.4.

Enzymatic experiments were carried out with derived oligonucleotides in solution. The most important reactions were the polymerase reactions. Reactions with the Kornberg enzyme and the Klenow fragment and polymerase chain reactions have been performed. In the beginning, the primer-template system was λ -DNA with λ_1 and λ_2 as primers. Later, USP, RSP and RP(-60) were used as primers. M13mp18 and pUC19 DNA served as templates. In the fill-in reaction a 50 b long synthetic oligonucleotide was used as template. The universal sequencing primer is complementary to this template and forms a 27mer in the fill in reaction. The product of a polymerase reaction in phosphate buffer was anchored to an activated Biodyne C membrane. The polymerase chain reactions were performed in different buffers. Important for a successful attachment to active membranes is the absence of amines in the buffers. Before enzymatic reactions with membrane-bound oligonucleotides were carried out, the solid phases had to be treated with a blocking solution. Experiments with the phosphodiesterase SVP-DE¹⁴ to determine the sequence of a membrane-bound oligonucleotide obtained only poor yield. Experiments with DIG-labeled dUTP and Klenow fragment were successful. In both cases – in solution and on membranes – it was possible to detect the 27mer with MALDI-TOF-MS, although the yield was poor. After a polymerase chain reaction with the *Tth* DNA polymerase, M13mp18 as template and USP and RP(-60) serving as primer, aliquots were treated with *Bam* HI and *Sal* I. After washing and cleavage neither in the reaction in solution nor at the membranes oligonucleotides were detected.

¹⁴SVPDE = snake venom phosphodiesterase

Teil IV.

Diskussion

Im Laufe dieser Arbeit wurde eine Reihe von heterobifunktionellen Tritylderivaten als Linker-Moleküle für eine reversible Membran-Immobilisierung von Nucleinsäuren synthetisiert. Dabei handelte es sich um aktivierte Ester von carboxylierten Tritylchloriden, wobei als reaktive Gruppen einerseits *para*-Nitrophenyl- bzw. Succinimidylester, andererseits das Chlor fungierten. Über das am tertiären Kohlenstoff lokalisierte Chlor lassen sich mit festphasengebundenen Oligonucleotiden an ihrem 5'-Ende säurelabile Etherbindungen herstellen. Zu dieser Ethergruppe *para*-ständige Carbonylfunktionen wirken sich stabilisierend auf die Etherbindung aus. Um diese durch -M und -I-Effekte hervorgerufenen Wirkungen zu eliminieren, wurden die entsprechenden *meta*-Verbindungen synthetisiert [42]. Mit diesen Tritylchloriden wurde dann zunächst Thymidin umgesetzt. Nach einer Aktivierung der Biotyne C Membran mit *para*-Nitrophenol und deren Aminolyse mit 1,6-Diaminohexan, wurden die tritylierten Modellverbindungen an die festen Phasen gebunden. Es zeigte sich, daß sich die Halbwertszeiten mit $t_{1/2} = 100.0$ Minuten für die *para*-Verbindung und $t_{1/2} = 41.5$ Minuten für das *meta*-substituierte Molekül in 80 % Essigsäure signifikant unterscheiden [42]. Allerdings neigen Oligonucleotide mit einer *meta*-funktionalisierten Tritylgruppe sowohl in neutralen Pufferlösungen als auch als Lyophilisate zu Detritylierungen. Eine Begründung für dieses Verhalten konnte nicht gefunden werden.

Die aktivierten Ester an den retritylierten Oligonucleotiden lassen sich durch Aminolyse mit α,ω -Diaminen in Amide überführen, so daß die Oligonucleotide am 5'-Ende eine terminale Aminogruppe tragen¹⁵. Da bei der Aminolyse der *para*-Nitrophenolester das mittels VIS-Spektroskopie detektierbare *para*-Nitrophenolat frei wird, läßt sich mit diesen Linkern der Reaktionsverlauf bequem verfolgen und quantifizieren.

Von den oben genannten heterobifunktionellen Tritylchloriden ließen sich lediglich *N*-Succinimidyl-4-[bis-(4-methoxyphenyl)]-chlormethylbenzoat und *para*-Nitrophenyl-3-[bis-(4-methoxyphenyl)]-chlormethylbenzoat in kristalliner Form isolieren, wobei ersteres in höheren Ausbeuten erhalten werden konnte. Überraschend war die schlechte Löslichkeit der *para*-Nitrophenylverbindung in Dichlormethan. Retritylierungen mit dieser Verbindung ließen sich in Pyridin durchführen. Generell zeigte sich, daß sich die *meta*-Derivate der funktionalisierten Tritylchloride in geringeren Ausbeuten mit den festphasengebundenen Oligonucleotiden umsetzen ließen, was auf die sich auf die Reaktivität negativ auswirkenden elektronischen Effekte der Carbonylfunktion zurückzuführen ist. Durch das Arbeiten mit großen Überschüssen in der Festphasenchemie wirkt sich die, im Vergleich zu den Succinimidylestern, geringere Aktivität der *para*-Nitrophenylester nicht negativ auf die Ausbeuten bei der Aminolyse aus. Die erhaltenen *meta*-substituierten Trityl oligonucleotide zeigen eine deutlich höhere Säurelabilität als die entsprechenden *para*-Verbindungen [42]. Auf Grund der einfacheren Handhabbarkeit und der höheren Ausbeuten wurden im Laufe dieser Arbeit die Oligonucleotide meistens mit den mit *N*-Succinimidyl-4-[bis-(4-methoxyphenyl)]-chlormethylbenzoat umgesetzt.

Ein Großteil der Versuche wurde mit der Biotyne C Membran durchgeführt. Diese

¹⁵Versuche mit 5'-terminalen SH-Gruppen, die mit festphasengebundenem Iodacetamid einen Thioether bilden, verliefen mit extrem niedrigen Ausbeuten. Möglicherweise werden die SH-Gruppen sehr rasch zu R-S-S-R oxidiert.

Membran besitzt eine Sandwichstruktur, wobei in der Mitte anscheinend Nylonfäden lokalisiert sind, die einer äußeren, schwammartigen Struktur Halt verleihen. Die Membrane sind mit Carboxyl-Gruppen derivatisiert, die sich ebenfalls in aktivierte Ester überführen lassen [43]. Erste Versuche fanden mit *para*-nitrophenylierten Membranen statt, mit denen es gelang, 1,6-Diaminohexan zu immobilisieren. Dabei wurde eine 1 M Diamin-Lösung in Dioxan angeboten. Durch Quantifizierung des bei der Anbindung freigesetzten *para*-Nitrophenolats mittels VIS-Spektroskopie bei 397.5 nm wurden Beladungen von 130 bis 138 pmol mm⁻² gemessen. Durch Verwendung einer 1 M KOH anstelle der Diaminlösung konnte ein Carboxylierungsgrad der Biotyne C Membrane von 225 pmol mm⁻² festgestellt werden. Aufgrund der extrem porösen, schwammartigen Struktur der Membran kann dieser maximale Beladungsgrad nur durch kleine Moleküle erreicht werden. Spätere Anbindungsversuche mit aminoderivatisierten Trityl-oligonucleotiden scheiterten. Die Ursache dafür lag neben der Größe der Oligonucleotide in der Konzentration der Aminogruppen. Aus praktischen Gründen konnten lediglich 200 µM Oligonucleotid-Lösungen hergestellt werden. Eine Steigerung der Reaktivität der aktivierten Membrane ist durch Einsatz des wasserlöslichen Carbodiimids EDC möglich [81]. Mit derartigen Aktivierungen konnten in Natriumhydrogencarbonat-Puffern Beladungsausbeuten¹⁶ von bis zu 25 % (442 fmol mm⁻²) – bezogen auf die eingesetzten Oligonucleotide – erzielt werden. Die meisten Beladungen an Biotyne C Membrane wurden mit einem reitrylierten *universal sequencing primer* (USP) durchgeführt, wobei die Membrane teilweise mit langkettigen Polyoxyethylendiaminen (POE-Diamine) versehen wurden, um den Abstand der Oligonucleotide von der Membranoberfläche zu vergrößern. Mit Oligonucleotiden beladene Membrane, an denen POE als *Spacer* fungiert, erwiesen sich als nicht hitzestabil. Durch eine Erwärmung der festen Phasen auf 94 °C ließen sich die Nucleinsäuren quantitativ vom Träger abspalten. Mit 1,6-Diaminohexan funktionalisierte Membrane hielten derartigen Bedingungen stand.

An die beladenen Membrane wurde ein versetzt hybridisierendes synthetisches 50 b Fragment hybridisiert. Analog wurde eine Pseudohybridisierung mit unbeladenen Membranen durchgeführt. Die Membrane wurden mit Puffer gewaschen und die Lösungen UV-spektroskopisch analysiert. Es zeigte sich, daß sich bereits durch wenige Waschschritte die gemessenen Werte von beladener und unbeladener Membran angleichen. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß durch die großen Überschüsse der Waschpuffer¹⁷ eine relativ stabile Hybridisierung aufgespalten werden kann. Auf Waschschritte nach der Hybridisierung wurde deshalb in den späteren Versuchen weitgehend verzichtet. Mit den Membranen wurde eine Reihe von enzymatischen Versuchen durchgeführt. Dabei kamen sowohl POE- als auch Hexyl-Diamid-Membrane zum Einsatz. Nach Abspaltung vom Träger konnten mittels MALDI-TOF-Analyse nur wenig Polymerase- und Phosphodiesterase-Produkte nachgewiesen werden. Eindeutig positiv verliefen die Nachweise mit dem DIG DNA *Labeling and Detection Kit* bei Einbau von digoxigeniertem UTP. Prinzipiell sind also festphasengebundene, biochemische Umsetzungen möglich. Die Ausbeuten sind allerdings äußerst gering. Die Ursachen mögen wieder in der schwam-

¹⁶Die Beladungsausbeuten beziehen sich auf die angebotenen Oligonucleotid-Mengen.

¹⁷Als Waschpuffer wurden unter anderem 2 x SSPE eingesetzt.

martigen Struktur der Membrane liegen, was die Reaktionen der sterisch anspruchsvollen Enzyme erschwert. Vor allen Reaktionen ist es notwendig, die Membrane mit einer *Blocking*-Lösung zu behandeln. Das gilt für Reaktionen an und in Gegenwart der Membrane.

Versuche, membrangebundenen USP mit der Phosphodiesterase SVPDE¹⁸ abzubauen, und so das Oligonucleotid hydrolytisch zu sequenzieren, verliefen wenig erfolgreich. Die Abbaufragmente gingen im MALDI-TOF-Spektrum fast im Rauschen unter. Generell sind die Ausbeuten bei Verwendung membrangebundener *Primer* in enzymatischen Reaktionen extrem gering. Ein vielversprechender Ansatz der Sequenzierung von membrangebundenen Nucleinsäuren könnte in der nichtenzymatischen Hydrolyse des Phosphodiester-Rückgrats der DNA liegen. So beschrieben OTT die Verwendung von Zirkonium-(IV)-Verbindungen [93] und YAMADA [94] den Einsatz von Ptaquiloid in der DNA-Spaltung.

Ein zweiter Ansatz, funktionalisierte Oligonucleotide unter Einbindung der Festphasenchemie enzymatisch umzusetzen, ist die Reaktion in Lösung und deren Aufarbeitung durch Immobilisation am Träger. Für das Gelingen einer Anbindung ist es notwendig, daß die Puffer frei von primären und sekundären Aminen oder anderen Nucleophilen sind, da sie in Konkurrenz mit den Amino-Gruppen der Oligonucleotide treten. Es wurden Polymerasekettenreaktionen mit unterschiedlichen Enzymen und Puffern durchgeführt. Neben der *Taq*-, *Pfu*- und VentTM-DNA-Polymerase wurden Versuche mit der *Tth*-DNA-Polymerase durchgeführt, mit der die besten Ergebnisse erzielt wurden. Die optimale *Annealing*-Temperatur bei Einsatz des *universal sequencing primer* (USP) und *reverse sequencing primer* (RSP) in Phosphat-Puffer liegt für die *Tth*-DNA-Polymerase bei 48 °C. Nach der Gleichung $T_m = 2(\text{Anzahl von A+T}) + 4(\text{Anzahl von G + T})$ [°C] liegt der Schmelzpunkt T_m für den USP bei 52 °C. Die *Annealing*-Temperatur liegt im Allgemeinen 3–5 K darunter.¹⁹

Die besten Resultate wurden bei der Verwendung von Borat-Puffern erhalten. Bei der Wahl des pH-Wertes mußte ein Kompromiß zwischen dem optimalen pH der Polymeraseaktivität des Enzyms und dem der Anbindungsreaktion gemacht werden, so daß die meisten Experimente bei pH 8.5 durchgeführt wurden. Die Meßergebnisse der Anbindungsversuche deuten darauf hin, daß sowohl die Anbindung als auch die Abspaltung eine Reaktion erster Ordnung ist. Die Abhängigkeit der Beladung vom pH-Wert läßt sich durch eine sigmoide Boltzmann-Funktion beschreiben, deren Wendepunkt bei einem pH von 8.5 liegt. Die Beladungsausbeuten bei 1 bis 10 µM retritylierten USP-Lösungen in Borat-Puffern lagen bei zwei bis vier Prozent und waren linear-proportional zur angebotenen Oligonucleotidmenge. Durch Erhitzen der Membrane auf 94 °C wurde überprüft, ob die Beladungen den Temperaturen einer Polymerase Kettenreaktion (PCR) standhalten, wobei festgestellt wurde, daß der Beladungsgrad konstant bleibt. Um unspezifisch gebundene oder über eine 3'-Veresterung immobilisierte Oligonucleotide von den Membranen zu Spülen, wurden die festen Phasen nach Waschen mit TBS-Puffer zusätzlich

¹⁸SVPDE = *snake venom phosphodiesterase*

¹⁹Nach der Gleichung $T_m = 81.5 + 16.6(\log[J^+]) + 0.41(\%G + C) - (600/l) - 0.63(\%FA)$ [24] errechnet sich ein Schmelzpunkt von 64 °C. J^+ steht dabei für die Konzentration monovalenter Kationen, l für die Länge der Oligonucleotide und FA für Formamid.

mit 25 % Ammoniaklösung behandelt. Der Anteil der so eluierbaren Oligonucleotide lag bei 0.7 bis 0.8 %. Dieser Wert wurde auch bei der Herstellung von Blindmembranen erhalten. Dabei wurde der underivatisierte *universal sequencing primer* mit EDC-aktivierten Membranen umgesetzt. Bei Versuchen mit inaktivierten Biotin C Membranen und aminoderivatisierten Oligonucleotiden konnten nach Waschen mit Puffer keine Oligonucleotide mehr nachgewiesen werden.

Neben der Verwendung von 1,6-Diaminohexan in der Aminolyse der aktivierten Ester, wurden Versuche mit hochmolekularen Polyoxyethylendiaminen (POE-Diamine) der Firma Rapp unternommen, um den Abstand der Oligonucleotide von den Membranoberflächen zu vergrößern. Die Aufreinigung der so hergestellten Oligonucleotide erwies sich als umständlich, da sie weder über die OPCTM noch über eine HPLC aufgereinigt werden konnten. Eine zeitintensive Aufarbeitung gelang mit den Membranfiltern 5000 NMWLTM der Firma Millipore. In weiteren Experimenten wurden die POE-Diamine mit *para*-nitrophenylierten Membranen umgesetzt. Die auf diesem Wege aminofunktionalisierten Träger wurden dann mit Bernsteinsäureanhydrid in carboxylierte Membrane umgewandelt²⁰. An diese festen Phasen konnten dann die reitrylierten Oligonucleotide immobilisiert werden. Nach einer Wärmebehandlung bei 94 °C und Waschen mit TBS-Puffer konnten allerdings keine Oligonucleotide mehr nach Abspaltung nachgewiesen werden. Ohne die Wärmebehandlung lagen die Beladungsausbeuten bei 4 bis 8 %.

Quantitative Umsetzungen konnten mit DITC²¹-aktivierten und diaminohexylierten PVDF²²-Membranen erreicht werden. Allerdings gelangen die Anbindungen von aminohexylierten Trityl oligonucleotiden nur in Natriumhydrogencarbonat-Puffern bei pH 9.4.

Die Anbindungs-, Wasch- und Abspaltungs-Experimente wurden sowohl mit Zentrifugenfiltern als auch mit der Absaugkammer EVENT 4160 durchgeführt. Bei Verwendung der Absaugkammer werden die abgespaltenen Oligonucleotide am Ende in herkömmlichen Polystyrol-Multititerplatten aufgefangen und lyophilisiert. Verglichen mit den Ausbeuten bei Verwendung von Eppendorf-Reaktionsgefäße wurden um etwa 40 % niedrigere Ausbeuten erzielt. Durch direktes Pipettieren, Lyophilisieren und Resuspendieren von Oligonucleotiden in Eppendorf-Reaktionsgefäße und Multititerplatten konnte gezeigt werden, daß dieser Effekt allein auf die Verwendung der Multititerplatten zurückzuführen ist. Offensichtlich haben Nucleinsäuren eine höhere Affinität zum Material der Multititerplatten als zu dem der Eppendorf-Reaktionsgefäße. Ebenso nachteilig bei Verwendung der EVENT-Kammer ist der Umstand, daß die letzten Mikroliter schwer von der Membranunterseite abzusaugen sind, was man durch mehrfaches Nachspülen ausgleichen kann. Die Reproduzierbarkeit des EVENT-Systems, in Hinblick auf eine Quantifizierung, ist niedriger als bei der Verwendung von Zentrifugenfiltern. Die Stärke des EVENT-Systems liegt im Probendurchsatz. Bis zu 96 Proben können parallel verarbeitet werden. Besonders beim Einsatz einer Mehrkanalpipette kommt hier eine enorme Arbeitserleichterung zum

²⁰Eine direkte Umsetzung von NHS-aktivierten Trityl oligonucleotiden mit den aminofunktionalisierten Membranen ist leider nicht möglich, da bei der Abspaltung der NHS-DMT- *Primer* vom CPG die NHS-Gruppen hydrolysiert werden würden.

²¹DITC = 1,4-Phenylendiisothiocyanat

²²PVDF = Polyvinylidenfluorid

Tragen. Weiterhin sind die Absaugschritte, gefolgt von Waschschritten einfacher handzuhaben, als Zentrifugationen und Waschvorgängen mit den Zentrifugenfiltern.

Um eine deutliche Zeitersparnis bei der Detritylierung zwecks MALDI-TOF-Analyse zu erzielen, können membrangebundene Oligonucleotide durch Behandlung mit Trifluoressigsäure-Dämpfen vom Träger abgespalten werden. Prinzipiell lassen sich Oligonucleotide derartig behandelter Membrane direkt auf dem Träger mittels MALDI-TOF-Spektroskopie detektieren. Problematisch war lediglich die Fixierung der kleinen Membranstücke auf dem Probenhalter. Die Fixierung kleinster Membranstücke mit HPA-Matrix²³ hatte zuweilen zur Folge, daß die Matrix es unmöglich machte, den Laser-Strahl auf die Membran zu lenken.

In der Molekularbiologie wird traditionell die Biotin-Streptavidin-Kopplung in der Festphasentechnik eingesetzt [36, 49–54]. Durch eine Spaltung des Protein-Biotin-Komplexes ist es allerdings nicht möglich, unmodifizierte Nucleinsäuren zu erhalten, weil die Biotin-Oligonucleotid-Bindung irreversibel ist. Mit der in dieser Arbeit vorgestellten Methode der Aufreinigung von DNA-Polymerase-Produkten ist es möglich, einzelsträngige Nucleinsäuren nach *fill-in*-Reaktionen zu erhalten, die sowohl am 5'- als auch am 3'-Ende unmodifiziert sind. Derartige einzelsträngige DNA besitzt Vorteile in der MALDI-TOF- und HPLC-Analytik. Bei Analysen von unaufgereinigten Polymerasereaktionen wurden folgende Beobachtungen gemacht:

1. Doppelsträngige Nucleinsäuren lassen sich durch Ionenaustausch-HPLC²⁴ nicht auftrennen. Der eindeutige Nachweis bestimmter Polymeraseprodukte erfordert einzelsträngige DNA.
2. Unter den Bedingungen der MALDI-TOF-Spektroskopie konnten Doppelstränge aus Matrix und Produkt-DNA nachgewiesen werden. Einzelsträngige DNA kann in niedrigeren Konzentrationen nachgewiesen werden.
3. Die Signale in den MALDI-TOF-Spektren sind auf Grund der Anwesenheit von Alkali- und Erdalkali-Ionen im Vergleich zu synthetischen Oligonucleotiden verbreitert. Die Empfindlichkeit der Messung wird dadurch beeinträchtigt.

Während durch Ionenaustausch- und Umkehrphasen-Chromatographie die störenden Einflüsse der Kationen, Enzyme und nicht-eingebauter Nucleosidtriphosphate eliminiert werden können, ist es mit dieser Methode so nicht möglich, einzelsträngige Nucleinsäuren zu erhalten. Eine Aufreinigung über Festphasenimmobilisierung ermöglicht dagegen die Darstellung von einzelsträngigen Polymeraseprodukten.

²³HPA = 3-Hydroxypicolinsäure

²⁴Moderne HPLC-Anlagen vertragen auf Grund ihrer feinen Kapillaren keine gesättigten Harnstofflösungen als mobile Phase.

Teil V.

Experimenteller Teil

8. Methodischer Teil

Inhaltsangabe

8.1. Allgemeines	110
8.2. Die verwendeten Materialien	111
8.2.1. Puffer und Lösungen	111
8.2.2. Nucleinsäuren	115
8.2.3. Enzyme und ihre Puffer	115
8.2.4. Chemikalien	118
8.3. Die präparative Plattenchromatographie	118
8.4. Die Aufreinigung von Oligonucleotiden mit OPCTMSäulen	119
8.5. Die Detektion membrangebundener, digoxigenerter Polymeraseprodukte	120
8.6. Die HPLC	120
8.6.1. Die RP-HPLC	120
8.6.2. Die IEX-HPLC	121
8.6.3. Das SMART-System	121
8.7. Die Elektrophoresen	122
8.7.1. Die Polyacrylamid-Elektrophorese	122
8.7.2. Die Agarose-Elektrophorese	123

8.1. Allgemeines

Bis auf die Oligonucleotide wurden alle neuen Verbindungen, die im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert wurden, mit folgenden Methoden charakterisiert:

- ¹H-NMR-Spektroskopie mit einem AMX-400 bzw. AMX-250-P der Firma Bruker. Die Spektren wurden bei 250 bzw. 400 MHz aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen beziehen sich auf Tetramethylsilan (TMS), das als interner Standard verwendet wurde.
- ¹³C-NMR-Spektroskopie mit einem AMX-400 bzw. AMX-250-P der Firma Bruker. Die Spektren wurden bei 101 bzw. 63 MHz aufgenommen. Alle chemischen Verschiebungen beziehen sich auf TMS. Die Spektrenaufnahme erfolgte mit der PFT-Technik und ¹H-Breitbandentkoppelung.

- ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren mit einem AMX-400 der Firma Bruker. Die Aufnahme der 2D-Spektren erfolgte mit der COSY-Technik. Durch diese Spektren konnten die einzelnen Signale der Kernresonanzanalysen eindeutig zugeordnet werden.
- Massenspektroskopie mit einem MAT 311A der Firma Finnigan. Die Spektren wurden nach der EI-Methode aufgenommen.
- IR-Spektroskopie mit einem Spektrometer Typ 399 der Firma Perkin Elmer.
- UV-Spektroskopie mit einem Biochrom 4060 der Firma Pharmacia.
- Elementaranalysen durch das mikroanalytische Labor des Institutes für Organische Chemie der Universität Hamburg.
- Schmelzpunkte mit einem Leitz-Heiztischmikroskop. Die Werte sind nicht korrigiert.

Die derivatisierten Oligonucleotide wurden mit einem DNA-Synthesizer Milligen-7500 der Firma Millipore synthetisiert. Die MALDI-TOF-Spektren wurden mit einem Vision 2000-Spektrometer der Firma Finnigan aufgenommen. Die Polymerasekettenreaktionen wurden in einem *Omnigene*-Thermocycler der Firma Hybaid durchgeführt.

8.2. Die verwendeten Materialien

8.2.1. Puffer und Lösungen

Als Lösungsmittel wurde, wenn nichts anderes erwähnt, Wasser verwendet. Wenn keine weiteren Angaben gemacht wurden, wurden die Puffer nach Einstellung des pH-Wertes mit Wasser auf ein Liter aufgefüllt. Die Prozentangaben verstehen sich als Gewichtsprozent (w/w). Volumenprozent (v/v) und andere Angaben werden extra gekennzeichnet. Folgende Lösungen wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet:

Elektrophoresen

TBE-Puffer (10 x)

1	M	Tris
850	mM	Borsäure
10	mM	EDTA; pH 8.3 (20 °C)

TAE-Puffer (20 x)

2	M	Tris
1	M	Essigsäure
100	mM	EDTA; pH 8.0 (20 °C)

Methylenblau-Färbepuffer

0.1 % Methylenblau
500 mM Natriumacetat; pH 5.2 (20 °C)

***stains all*-Stammlösung**

100 mg *stains all*
100 ml Formamid

***stains all*-Färbepuffer**

10 ml *stains all*-Stammlösung
10 ml Formamid
50 ml *iso*-Propanol
130 ml Wasser

Ethidiumbromid-Stammlösung

10 mg Ethidiumbromid
10 ml Wasser

Farbmix für die Agarose-Elektrophorese

50 % (v/v) Glycerin
0.2 % (w/v) SDS
0.05 % (w/v) Bromphenolblau
0.05 % (w/v) Xylencyanol in 1 x TAE-Puffer

Farbmix für die Polyacrylamid-Elektrophorese

98 % (v/v) Formaid
0.05 % (w/v) Bromphenolblau
0.05 % (w/v) Xylencyanol in 1 x TAE-Puffer

Hochdruckflüssigkeitschromatographie

TBE-Puffer (1 x)

100 mM Tris
85 mM Borsäure
1 mM EDTA; pH 8.3 (20 °C)

TBE-Puffer mit NaCl (1 x)

1 M NaCl
100 mM Tris
85 mM Borsäure
1 mM EDTA; pH 8.3 (20 °C)

TE-Puffer (1 x)

10	mM	Tris
1	mM	EDTA; pH 8.0 (20 °C)

TE-Puffer mit NaCl (1 x)

1	M	NaCl
10	mM	Tris
1	mM	EDTA; pH 8.0 (20 °C)

TEAAc-Puffer

100	mM	Triethylammoniumacetat; pH 7.0 (20 °C)
-----	----	--

DIG DNA Labeling Kit (Fa. Boehringer #1 093 657)**Puffer 1** (Maleinsäure-Puffer)

100	mM	Maleinsäure
150	mM	NaCl; pH 7.5 (20 °C)

Blocking Stammlösung I

10 %	(w/v)	<i>Blocking</i> -Reagenz Fa. Boehringer #1 096 176
------	-------	--

Puffer 2 (Blocking-Lösung I)

1	ml	<i>Blocking</i> -Stammlösung
99	ml	Reinstwasser

Puffer 3 (Detektions-Puffer)

100	mM	Tris
100	mM	NaCl
50	mM	NaCl; pH 9.5 (20 °C)

NBT

75	mg	Nitroblau Tetrazolium Salz in 1 ml
70 %	(v/v)	<i>N,N</i> -Dimethylformamid

X-Phosphat

50	mg	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat in 1 ml
70 %	(v/v)	<i>N,N</i> -Dimethylformamid

Färbe-Lösung

45	μ l	NBT
35	μ l	X-Phosphat

20 ml Puffer 3

Sonstige

TBS-Puffer

8	g	NaCl
200	mg	KCl
3	g	Tris; pH 7.4

SSPE-Puffer (20 x)

3	M	NaCl
200	mM	$\text{Na}_x\text{H}_y\text{PO}_4$
20	mM	Na_2EDTA ; pH 8.0 (20 °C)

HPA-Matrix

70	mg	3-Hydroxypicolinsäure
10	mg	Ammoniumdihydrogencitrat
35	μl	Acetonitril
35	μl	Reinstwasser

dNTP-Mix (10 x, Fa. Boehringer)

100	mM	dGTP
100	mM	dATP
100	mM	dTTP
100	mM	dCTP

als Lithiumsalz; pH 7.0

dNTP-Labeling-Mix (10 x, Fa. Boehringer)

1	mM	dGTP
1	mM	dATP
1	mM	dCTP
650	μM	dTTP
350	μM	DIG-11-dUTP; pH 7.5 (20 °C)

Blocking Stammlösung II

100	mM	Tris
150	mM	NaCl
10 %	(w/v)	Blocking-Reagenz Fa. Boehringer #1 096 176

Blocking-Lösung II

1	ml	Blocking-Stammlösung II
99	ml	Reinstwasser

8.2.2. Nucleinsäuren

M13mp18 (Fa. United States Biochemicals)

200	ng μl^{-1}	M13mp18
10	mM	Tris
1	mM	EDTA; pH 7.5 (25 °C)

λ -DNA (Fa. Perkin Elmer Cetus)

1.00	$\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$	λ -DNA
------	---------------------------------	----------------

pUC19-DNA (Fa. Boehringer)

250	ng μl^{-1}	pUC19-DNA
10	mM	Tris
1	mM	EDTA

8.2.3. Enzyme und ihre Puffer

Taq-DNA-Polymerase (Fa. Boehringer)

2.5	U μl^{-1}	Taq-DNA-Polymerase
10	mM	$\text{K}_x\text{H}_y\text{PO}_4$
10	mM	2-Mercaptoethanol
100	mM	KCl
50 %	(v/v)	Glycerin; pH 7.5 (4 °C)

Taq-Inkubations-Puffer (10 x)

100	mM	Tris
15	mM	MgCl_2
500	mM	KCl
1	mg ml^{-1}	Gelatine; pH 8.3 (20 °C)

Pfu-DNA-Polymerase (Fa. Stratagene)

2.5	U μl^{-1}	Pfu-DNA-Polymerase
50	mM	Tris
100	μM	EDTA
1	mM	DTT
0.1 %	(v/v)	NP 40
0.1 %	(v/v)	Tween 20

50 % (v/v) Glycerin; pH 8.4

***Pfu*-Inkubations-Puffer (10 x)**

200 mM Tris
 100 mM (NH₄)₂SO₄
 20 mM MgCl₂
 100 mM KCl
 1 % (v/v) Triton X-100
 1 mg ml⁻¹ BSA; pH 8.75

***Tth*-DNA-Polymerase (Fa. BIOzym)**

5 U μl⁻¹ *Tth*-DNA-Polymerase

***Tth*-Inkubations-Puffer (20 x)**

1 M Tris
 400 mM (NH₄)₂SO₄; pH 9.0

MgCl₂-Lösung

25 mM MgCl₂

Vent-DNA-Polymerase (Fa. New England Biolabs)

2 U μl⁻¹ VentTM-DNA-Polymerase
 10 mM Tris
 100 μM EDTA
 1 mM DTT
 0.1 % (v/v) Triton X-100
 50 % (v/v) Glycerin; pH 7.4

Vent-Inkubations-Puffer (10 x ThermoPolTM)

200 mM Tris
 100 mM (NH₄)₂SO₄
 20 mM MgCl₂
 100 mM KCl
 1 % (v/v) Triton X-100; pH 8.8 (25 °C)

***E.coli* DNA Polymerase I (Fa. Boehringer)**

5 U μl⁻¹ *E.coli*-DNA-Polymerase I
 50 mM K_xH_yPO₄
 1 mM DTE
 50 % (v/v) Glycerin; pH 7.0 (4 °C)

Kornberg-Puffer (10 x)

500	mM	Tris
70	mM	MgCl ₂
10	mM	DTT; pH 7.5

Klenow Enzym (Fa. Stratagene)

10	U μl^{-1}	Klenow Enzym
50	mM	K _x H _y PO ₄
1	mM	DTT
50 %	(v/v)	Glycerin; pH 7.0 (4 °C)

Klenow-Puffer (10 x)

60	mM	Tris
60	mM	NaCl
60	mM	MgCl ₂
0.5 %	(v/v)	Glycerin
10	mM	DTT; pH 7.5

Natriumborat-Stammlösung

3.101	g	Borsäure
12.5	ml	1 M NaOH
		ad 250 ml Wasser

Borat-Buffer

	pH	7.9	8.1	8.3	8.5	8.7	8.9
Stammpuffer [μl]		547	572	607	653	712	805
100 mM HCl [μl]		453	428	393	347	288	195
Σ [μl]		1000	1000	1000	1000	1000	1000

Phosphat-Puffer

600	mM	KH ₂ PO ₄ pH 7.4
60	mM	MgCl ₂

Bam HI-Endonuclease (Fa. Boehringer)

10	U μl^{-1}	<i>Bam</i> HI-Endonuclease
10	mM	Tris
300	mM	KCl
1	mM	EDTA
1	mM	DTT
0.01 %	(v/v)	Triton X-100
50 %	(v/v)	Glycerin; pH 7.4 (4 °C)

***Bam* HI-Restriktionspuffer (10 x)**

100	mM	Tris
50	mM	MgCl ₂
1	M	NaCl
10	mM	2-Mercaptoethanol; pH 8.0 (37 °C)

***Sal* I-Endonuclease (Fa. Boehringer)**

10	U μl^{-1}	<i>Sal</i> I-Endonuclease
10	mM	Tris
1	mM	EDTA
10	mM	DTE
0.01 %	(v/v)	Triton X-100
50 %	(v/v)	Glycerin; pH 7.5 (4 °C)

***Sal* I-Restriktionspuffer (10 x)**

500	mM	Tris
100	mM	MgCl ₂
1	M	NaCl
10	mM	DTE; pH 7.5 (37 °C)

Phosphodiesterase (Fa. Boehringer)

1.5	U mg^{-1}	Phosphodiesterase
50 %	(v/v)	Glycerin; pH 6.0 (4 °C)

8.2.4. Chemikalien

Im Verlauf dieser Arbeit wurden handelsübliche Chemikalien unterschiedlicher Firmen eingesetzt. Trockene Lösungsmittel wurden über Molsieb gelagert. Für die HPLC wurde Acetonitril der Firma Biotronik in der Reinheitsstufe *far UV* verwendet. Das Reinstwasser stammte aus einer Milli-Q UF plus Anlage, der eine Milli-RO 80 Stufe vorgeschaltet war. Beide Geräte stammen von der Firma Millipore. Das Triethylammoniumacetat wurde von der Firma Merck bezogen.

8.3. Die präparative Plattenchromatographie

In einem 1-Liter-Halskolben wurden 130 g Kieselgel PF₂₅₄ mit 320 ml Wasser geschüttelt und 10 bis 15 Minuten stehen gelassen. In der Zwischenzeit wurden die Aluminiumplatten in die mit gelbem Schaumstoff ausgelegten Kunststofftröge gelegt. Nachdem die Kieselgelsuspension nochmals gut geschüttelt wurde, wurde die Masse auf die Aluminiumplatten gegossen. Der gelbe Schaumstoff wurde zuvor mit Photoklammern an den Trögen fixiert. Nach dem Gießen wurden durch Schrägstellen der Tröge die Kieselgelsuspension gleichmäßig auf den Platten verteilt. Die Platten wurden in den Trögen in einem zugfrei-

en Raum eineinhalb Tage getrocknet und anschließend zwei Stunden in einem auf 40 °C temperiertem Ofen gelagert¹. Das eigentliche Trocknen der Platten erfolgte über Nacht bei einer Temperatur von 80 °C.

Zum Auftragen der zu trennenden Substanz wurden vorsichtig die Metallschienen an den unteren Plattenrand angelegt und die Substanzlösung entlang des oberen Randes auf die Kieselgelplatten gebracht. Pro Platte wurde maximal ein Gramm Substanz aufgetragen².

Nach der Entwicklung in den entsprechenden Chromatographiekammern wurden die getrennten Substanzen mittels einer UV-Handlampe detektiert. Nach kurzem Trocknen der Platten wurden die Zonenränder leicht angeritzt und das Kieselgel abgesaugt. Zum Absaugen eignete sich eine Konstruktion aus einer Schlenck-Fritte mit aufgesetztem Eingieß- und angeschlossener Wasserstrahlpumpe. Die Substanzen wurden dann mit dem angegebenen Lösungsmittel über Nacht vom Kieselgel eluiert. Je nach Polarität mußte das Kieselgel mehrfach nachgewaschen werden, um eine quantitative Extraktion zu gewährleisten.

8.4. Die Aufreinigung von Oligonucleotiden mit OPCTMSäulen

Nach der ammoniakalischen Abspaltung der tritylierten Oligonucleotide vom CPG wurden die Lösungen über Nacht bei 55 °C gelagert, um die Basenschutzgruppen zu entfernen. Ohne eine weitere Fällung konnten die Oligonucleotidlösungen mit *Oligonucleotide Purification Cartridges* (OPCTM) aufgereinigt werden. Dazu wurden die OPCTM-Säulen analog zu Abbildung 5.4 mit 5-ml-Einwegspritzen verschlossen, wobei folgende Lösungen über die Einwegspritzen auf die Säulen gebracht wurden:

1. 5 ml Acetonitril,
2. 5 ml 2 M TEAAc,
3. die ammoniakalischen Oligonucleotidlösungen, die zuvor mit der gleichen Menge Reinstwasser versetzt worden sind. Es wurde darauf geachtet, daß die Tropfgeschwindigkeit etwa 1 ml min⁻¹ nicht überschritt. Die Lösung wurde aufgefangen und erneut auf die Säule gegeben.
4. 5 ml 1.5 M Ammoniak, gefolgt von 10 ml Reinstwasser.
5. Anstelle der Detritylierung wurden nun die tritylierten Oligonucleotide mit 1 ml 40 % Acetonitril in 100 mM TEAAc pH 7.0 eluiert.

Die Lösungen wurden lyophilisiert, in 5 % Acetonitril in 100 mM TEAAc pH 7.0 aufgenommen und mittels UV-Spektroskopie quantifiziert.

¹Dieses Vortrocknen verhindert die Rißbildung in den Platten.

²Vom Einritzen einer Auftragsrinne ist abzuraten, weil die Kieselgelplatten kein Gips enthalten und entsprechen leicht brechen.

8.5. Die Detektion membrangebundener, digoxigener Polymeraseprodukte

Nach der *fill-in*-Reaktion der festphasenimmobilisierten Oligonucleotide mit dem DIG-11-dUTP-haltigen dNTP-*labeling*-Mix und der Denaturierung mit Formamid wurden die Membrane zunächst mit Ammoniumcitrat-Lösung und Wasser gewaschen und anschließend mit folgenden Lösungen in einer Petrischale behandelt:

1. Zweimal je eine Minute mit je 20 ml Puffer 1 (Maleinsäure-Puffer),
2. 30 Minuten mit 20 ml Puffer 2 (*Blocking*-Lösung I),
3. 60 Minuten mit einer Lösung aus 5 μ l anti-Digoxigenin-Antikörper Konjugat³ in 10 ml Puffer 2.
4. Zweimal 15 Minuten mit je 20 ml Puffer 3 (Detektions-Puffer).
5. 120 Minuten Färbe-Lösung.

Positive Nachweise waren an einer dunklen Verfärbung erkennbar.

8.6. Die HPLC

8.6.1. Die RP-HPLC

Als analytische *reversed phase* HPLC-Anlage wurde im Rahmen dieser Arbeit ein *Waters chromatography system* 625 mit einem *photodiodearray detector* 996 eingesetzt. Als Säule diente eine *reversed phase column Waters Nova Pak C-18* mit den Maßen 3.9 x 300 mm. Das Packungsmaterial hatte eine Partikelgröße von 4 μ m mit einem Porendurchmesser von 60 Å. Die Datenverarbeitung und Steuerung der Anlage erfolgte mit der Software Millenium 2.0.

Als präparative *reversed phase* HPLC-Anlage wurde ein *Waters chromatography system Delta Prep* 4000 mit einem *Waters detector* 486 und einer Edelstahlsäule der Firma Whatman eingesetzt. Die Säule hatte die Maße 9.4 x 500 mm. Als Packungsmaterial diente PARTISIL 100DS2 M9 mit einer Korngröße von 10 μ m.

Die Gradienten-Systeme

Für analytische Zwecke wurde folgendes Gradientensystem eingesetzt:

- Puffer A: 5 % (v/v) Acetonitril in 100 mM Triethylammoniumacetat pH 7.0.
- Puffer B: 40 % (v/v) Acetonitril in 100 mM Triethylammoniumacetat pH 7.0.

³Bestehend aus polyklonalem anti-Digoxigenin-Schafantikörper und Fab-Fragmenten, die an alkalische Phosphatase konjugiert sind.

Während der Chromatographie wurde der Gradient von 0 % B innerhalb von 40 Minuten linear auf 100 % B erhöht. Die Säulentemperatur betrug 30 °C, die Durchflußrate 1 ml min⁻¹. Präparative Trennungen mit der Delta Prep HPLC wurden mit den gleichen Puffern durchgeführt. Dabei wurde zunächst fünf Minuten isokratisch mit 100 % A chromatographiert. Anschließend wurde innerhalb von 35 Minuten die Konzentration von B auf 100 % gesteigert. Am Ende wurde die Säule noch weitere 15 Minuten mit 100 % B gespült. Die Durchflußrate betrug 4 ml min⁻¹. Die Chromatographiesäule wurde nicht temperiert.

Die isokratischen Systeme

Zur Quantifizierung des von den Membranen abgespaltenen *universal sequencing primers* wurde eine isokratische RP-HPLC durchgeführt. Als Lösungsmittel diente 20 % Acetonitril in 100 mM TEAAc pH 7.0. Die Durchflußrate betrug 1 ml min⁻¹. Die Säule wurde auf 30 °C temperiert.

Zum Nachweis des Thymidins in den Spaltungsexperimenten mit den Modellverbindungen **21** und **22** – bzw. den Membranen **69** und **71** – diente ebenfalls eine isokratische RP-HPLC. Das Lösungsmittel bestand aus 65 % Acetonitril in Wasser. Die Durchflußrate betrug ebenfalls 1 ml min⁻¹. Die Säule wurde auf 30 °C temperiert.

8.6.2. Die IEX-HPLC

Zur Detektion der Polymeraseprodukte wurde eine IEX-HPLC⁴ herangezogen. Das System bestand aus einem *Waters chromatography system* 625 mit einem *photodiodearray detector* 996. Als Säule diente eine *Waters Gene Pak FAX*-Säule. Die Chromatographiesäule wurde auf 60 °C temperiert. Das Puffersystem des Gradienten setzte sich aus folgenden Lösungen zusammen:

- Puffer A: 1 x TBE pH 8.0.
- Puffer B: 1 M NaCl in 1 x TBE pH 7.0.

Innerhalb von zehn Minuten wurde der Anteil von 30 % B auf 90 % B linear erhöht. Anschließend wurde für weitere fünf Minuten die Laufmittelzusammensetzung isokratisch bei den Endbedingungen gehalten. Die Durchflußrate betrug 750 µl min⁻¹.

8.6.3. Das SMART-System

Mit Hilfe des SMART-Systems der Firma Pharmacia war es möglich, PCR-Produkte von den dNTPs, *Primern*, Matrix-DNA und dem Enzym zu trennen. Dazu wurde eine Ionenaustauschchromatographie mit einer *Mono Q PC* 1.6/5-Säule durchgeführt. Die Puffer für die Gradientenelution setzten sich wie folgt zusammen:

- Puffer A: 1 x TE pH 8.0.

⁴IEX: *ion exchange* = Ionenaustausch.

- Puffer B: 1 M NaCl in 1 x TE pH 8.0.

Die Durchflußrate betrug $100 \mu\text{l min}^{-1}$. Die Konzentration von Puffer B wurde von 50 % auf 80 % innerhalb von zehn Minuten erhöht. Anschließend wurde die Laufmittelzusammensetzung weitere vier Minuten bei 80 % B gehalten. Eine Temperierung der Säule war nicht möglich.

0.00	FILL	A,1,10,1500
0.00	FILL	B,1,10,1500
	MIXER_WASH	0
	CONC_B	50
	FLOW	100
1.00	INJECT	100
	AUTOZERO	
	CONC_B	50
3.00	LOAD	
11.00	CONC_B	80
15.00	CONC_B	80

Tabelle 8.1.: Gradientenprogramm für die SMART-HPLC

Zum Entsalzen wurden die gesammelten Fraktionen mit den PCR-Produkten über eine *Fast Desalting PC 3.2/10*-Säule chromatographiert. Als Laufmittel diente 100 mM TEAAc bei tritylierten Oligonucleotiden oder Reinstwasser bei unmodifizierten PCR-Produkten. Die Durchflußrate betrug $50 \mu\text{l}$.

8.7. Die Elektrophoresen

Neben der HPLC und MALDI-TOF-Spektrometrie wurden zur Analyse und Charakterisierung der Nucleinsäuren auch elektrophoretische Trennverfahren eingesetzt. Als Stromversorgungen dienten ein Electrophoresis Constant Power Supply ECPS der Firma Pharmacia und ein Consort E321 der Firma Keutz.

8.7.1. Die Polyacrylamid-Elektrophorese

Zur Detektion von Nucleinsäuren mittels PAGE wurden denaturierende Harnstoffgele angefertigt. Die 20 % Polyacrylamidgele hatten folgende Zusammensetzung:

5	ml	40 % Acrylamid-Lösung
3.5	ml	Reinstwasser
1	ml	10x TBE-Puffer
10	μl	TEMED
4.2	g	Harnstoff
500	μl	1 % APS

Tabelle 8.2.: Zusammensetzung der PAGE-Gele

Die Gele wurden zwei Stunden in vertikalen Mini-PAGE-Kammern der Firma Keutz polymerisiert. Zur Abtrennung von überschüssigem Acrylamid wurde an die Gele 30 Minuten eine Spannung von 80 V angelegt. Nach dem Spülen der Geltaschen wurden je 10 μ l Proben-Lösung mit je 4 μ l Farbmix versetzt, fünf Minuten auf 95 °C erhitzt und anschließend rasch auf 0 °C abgekühlt. Die Lösungen wurden in die Taschen pipettiert.

Zur Analyse von 58,59 und 60 wurde die Elektrophorese zunächst zehn Minuten bei einer Spannung von 80 V durchgeführt. Anschließend wurde die Spannung auf 150 V erhöht und eineinhalb Stunden weiter elektrophoretisiert. Zur Detektion des *fill-in*-Produktes P₂₇ erfolgte der Vorlauf über einen Zeitraum von zwei Stunden bei einer Spannung von 300 V. Die Elektrophorese wurde bei der gleichen Spannung durchgeführt und nach 17 Minuten abgebrochen. Zur Bandendetektion wurden die Gele mit Methylenblau- oder *stains all*-Lösungen angefärbt.

8.7.2. Die Agarose-Elektrophorese

Die Polymerasekettenreaktionen I bis XXXVI wurden mittels Agarose-Elektrophorese analysiert. Dazu wurden 200 mg SeaKem GTG und 600 mg NuSieve-Agarose der Firma BIOzym diagnostik mit 20 ml 1 x TE in einer Mikrowelle aufgekocht und in den Gießstand einer *Mini sub-cell* GT-Kammer der Firma Biolab gebracht. Während der Elektrophorese wurde 75 Minuten eine Spannung von 80 V an die Gele gelegt. Die Bandendetektion erfolgte mit Ethidiumbromid. Als Längenstandard wurde ein pBR322/*Hae* III-*digest* aufgetragen.

9. Die organisch chemischen Synthesen

Inhaltsangabe

9.1. Die carboxysubstituierten Trityl Verbindungen	124
9.1.1. Synthese der meta-Verbindungen	124
9.1.2. Synthese der para-Verbindungen	129
9.2. Sonstige Verbindungen	132
9.2.1. Tritylierung von Thymidin	132
9.2.2. Synthese von para-Nitrophenyliodacetat 24	133
9.2.3. Cysteaminyl-3-[bis-(4-methoxyphenyl)]-thymidinylmethyl- benzoat 25	133

9.1. Die carboxysubstituierten Trityl Verbindungen

9.1.1. Synthese der meta-Verbindungen

Synthese von Isophthalaldehydsäure **2**

10 g (44.75 mmol) 3-Dichlormethylbenzoylchlorid wurden in einem Rundkolben mit 134 ml heißem Wasser versetzt. Zu dem Ansatz wurden in kleinen Portionen insgesamt 12 g Calciumcarbonat gegeben. Die Mischung wurde drei Stunden bei einer Ölbadtemperatur von 135 °C unter Rückfluß gekocht. Der Reaktionsverlauf wurde mittels Dünnschichtchromatographie verfolgt, wobei ein Laufmittelgemisch von Dichlormethan : Methanol = 9 : 1 verwendet wurde. Nach dem Abkühlen der Lösung wurde der Ansatz mit verdünnter Salzsäure angesäuert. Der Niederschlag wurde filtriert, mit verdünnter Salzsäure und Wasser gewaschen und im Hochvakuum bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Ausbeute: 6.7 g (44.4 mmol) 99.3 % d. Th..

¹H-NMR:(400 MHz, CDCl₃): δ 2.05 (s, 1H, Aryl-H, isoliert), 7.75 (t, 1H, Aryl-H), 8.18 (d, 1H, OHC-Aryl-H, ortho), 8.32 (d, 1H, HCOO-ArylH, ortho). - ¹³C-NMR: (100.6 MHz, DEPT, CDCl₃): δ 129.72, 130.73, 133.36, 135.11 (CH,Aryl, +¹), 138.00 (CR₃, Aryl, 0), 166.06 (Aryl-COOH, 0), 191.83 (Aryl-CHO, +). - IR: (KBr): 789 cm⁻¹ (substituierter Aromat), 1699 cm⁻¹ ((C=O)-Valenzschwingung), 2874 cm⁻¹ ((C-H)-Valenzschwingung), 3425 cm⁻¹ ((O-H)-Valenzschwingung). - *Schmelzpunkt*: 176 °C (Lit.: 175 °C [59]).

¹Ein + in der Angabe der Spektrendaten weist auf eine ¹H¹³C-Kopplung hin; eine 0 auf ein Kohlenstoffatom ohne H-Atome als Nachbarn.

Synthese von 3-[Bis-(4-methoxyphenyl)]-methyl-benzoesäure **3**

6.67 g (44.37 mmol) Isophtalaldehydsäure **2** wurden mit 11.5 ml (105.28 mmol) Anisol in 33 ml Eisessig gelöst. Zu dieser Lösung wurden unter Eiskühlung langsam 13 ml konzentrierte Schwefelsäure zugetropft. Anschließend wurde 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach dünnschichtchromatographischer Umsatzkontrolle – mit einem Laufmittelgemisch Dichlormethan : Methanol = 8 : 2 – wurde der Ansatz auf 400 ml Eiswasser gegeben und fünfmal mit je 100 ml Diethylether extrahiert. Die organische Phase wurde zweimal mit je 200 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und zweimal mit je 100 ml gesättigter Natriumbisulfit-Lösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde abdestilliert und das Produkt **3** aus 150 ml Diethylether umkristallisiert. Ausbeute: 12.3 g (35.3 mmol) 79.2 % d. Th..

$^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, CDCl_3): δ 3.77 (s, 6H, $-\text{OCH}_3$), 5.5 (s, 1H, $\text{R}_3\text{-CH}$), 6.83 (d, 4H, $\text{CH}_3\text{O-Aryl-H}$, ortho), 7.0 (d, 4H, $\text{CH}_3\text{O-Aryl-H}$, meta), 7.36 (s, 2H, HOOC-Aryl-H , meta und para), 7.88 (s, 1H, HOOC-Aryl-H , ortho, isoliert), 7.95 (d, 1H, HOOC-Aryl-H , ortho). - $^{13}\text{C-NMR}$: (100.6 MHz, DEPT, CDCl_3): δ 55.02 ($\text{R}_3\text{-CH}$, +) 55.24 (O-CH_3 , +), 113.85 (C-H , $\text{CH}_3\text{O-Aryl}$, ortho, +), 128.16 (C-H , HOOC-Aryl , ortho, +), 128.48 (C-H , HOOC-Aryl , meta oder para, +), 130.23 (C-H , $\text{CH}_3\text{O-Aryl}$, meta, +), 130.94 (C-H , HOOC-Aryl , ortho, isoliert., +), 134.73 (C-H , HOOC-Aryl , meta oder para, +), 129.36, 135.70, 145.29 (CR_3 , Aryl, 0), 158.17 ($\text{R}_2\text{C-OCH}_3$, Aryl, 0), 172.07 (COOH , 0). - *IR*: (KBr): 1700 cm^{-1} (C=O -Valenzschwingung), 3000 cm^{-1} (aromatische C-H -Valenzschwingung), 3400 cm^{-1} (O-H -Valenzschwingung). - *MS* (EI, 70 eV): m/z (relative Intensität) m/z berechnet für $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{O}_4$ (M^+): 348, gefunden: 348 (M^+ , 75 %); 227 (100 %), 240 ($\text{M-C}_7\text{H}_7\text{O}^+$, 38 %). - *Elementaranalyse* (%) Gefunden: C, 75.95/75.61; H, 5.77/5.79; $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{O}_4$ berechnet C, 75.85; H, 5.79. - *Schmelzpunkt*: 144°C .

Synthese von N-Succinimidyl-3-[bis-(4-methoxyphenyl)]-methylbenzoat **4**

5.90 g (16.93 mmol) 3-[Bis-(4-methoxyphenyl)]-methyl-benzoesäure **3** wurden in einem Gemisch aus 4.5 ml Pyridin und 100 ml 1,4-Dioxan gelöst und mit 1.95 g (16.95 mmol) *N*-Hydroxysuccinimid versetzt. Unter Rühren wurden 19.5 ml (19.5 mmol) einer 1 M DCC-Lösung in 1,4-Dioxan zugegeben. Das Gemisch wurde vier Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der Reaktionsverlauf wurde mittels Dünnschichtchromatographie kontrolliert, wobei ein Laufmittelgemisch der Zusammensetzung Dichlormethan : Methanol = 94 : 4 verwendet wurde. Von der Lösung wurde der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff abfiltriert und sorgfältig viermal mit 1,4-Dioxan gewaschen. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer abdestilliert, der erhaltene Rückstand aus heißem Ethanol umkristallisiert und bis zur Gewichtskonstanz im Vakuum getrocknet. Ausbeute: 6.9 g (15.4 mmol) 90.7 % d. Th..

$^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, CDCl_3): δ 2.85 (s, 4H $-\text{CO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO-}$), 3.78 (s, 6H, $-\text{OCH}_3$), 5.50 (s, 1H, $\text{R}_3\text{-CH}$), 6.83 (d, 4H, $\text{CH}_3\text{O-Aryl-H}$, ortho), 6.99 (d, 4H, $\text{CH}_3\text{O-Aryl-H}$, meta), 7.40 (m, 2H, $\text{R}_2\text{N-OOC-Aryl-H}$, meta und para), 7.88 (s, 1H, $\text{R}_2\text{N-OOC-Aryl-H}$, ortho, isoliert), 7.98 (d, 1H, $\text{R}_2\text{N-OOC-Aryl-H}$, ortho). - $^{13}\text{C-NMR}$: (100.6 MHz, DEPT, CDCl_3): δ 25.66 ($-\text{CO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO-}$, +), 54.92 ($\text{R}_3\text{-CH}$, +) 55.25 (O-CH_3 , +), 113.92

(C-H, CH₃O-Aryl, ortho, +), 128.51 (C-H, R₂N-OOC-Aryl, ortho, +), 128.84 (C-H, R₂N-OOC-Aryl, meta oder para, +), 130.24 (C-H, CH₃O-Aryl, meta, +), 131.24 (C-H, R₂N-OOC-Aryl, ortho, isoliert), 135.9 (C-H, R₂N-OOC-Aryl, meta oder para, +), 125.16, 135.31, 145.86 (CR₃, Aryl, 0), 158.25 (R₂C-OCH₃, Aryl, 0), 161.92 (CO-NR₂, 0), 169.24 (-COOR). - *IR*: (KBr): 1742 cm⁻¹ ((C=O)-Valenzschwingung), 2877 cm⁻¹ (aliphatische (C-H)-Valenzschwingung), 2951 cm⁻¹ (aliphatische (C-H)-Valenzschwingung). - *MS* (EI, 70 eV): m/z (relative Intensität) m/z berechnet für C₂₆H₂₃NO₆ (M⁺): 445, gefunden: 445 (M⁺, 36 %); 331 (100 %). - *Elementaranalyse* (%) Gefunden: C, 69.66/69.82; H, 5.28/5.30; N, 3.19/3.17; C₂₆H₂₃NO₆ berechnet C, 70.1; H, 5.2.; N, 3.14. - *Schmelzpunkt*: 141 °C.

Synthese von N-Succinimidyl-3-[bis-(4-methoxyphenyl)]-hydroxymethylbenzoat **5**

976 mg (2.19 mmol) N-Succinimidyl-3-[bis-(4-methoxyphenyl)]-methylbenzoat **4** wurden mit 682 mg (2.851 mmol) Blei(IV)-oxid in 33 ml Eisessig gelöst und in einem auf 130 °C vorgeheizten Ölbad unter Rückfluß erhitzt. Die Reaktion wurde nach 15 Minuten abgebrochen, da eine dünnschichtchromatographische Analyse die gleiche Menge Nebenprodukt wie Edukt anzeigte. Als Laufmittel wurde Dichlormethan : Methanol = 99 : 1 benutzt. Der R_f-Wert des Nebenproduktes lag zwischen denen des Eduktes und Produktes. Der Ansatz wurde auf 125 ml Eiswasser gegeben und viermal mit je 50 ml Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wurde viermal mit je 200 ml Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer abdestilliert. Der ölige Rückstand wurde mehrfach mit Toluol koevaporiert, bis der Rückstand essigsäurefrei war. Das Rohprodukt wurde über eine präparative Schichtchromatographie mit einem Laufmittelgemisch Dichlormethan : Methanol = 99.6 : 0.4 gereinigt. Dem Laufmittel wurde 0.03 % Pyridin beigemischt. Ausbeute: 216 mg (468 µmol) N-Succinimidyl-3-[bis-(4-methoxyphenyl)]-hydroxymethylbenzoat **5** 21 % d. Th.; 392 mg (233 µmol) 10.7 % Edukt N-Succinimidyl-3-[bis-(4-methoxyphenyl)]-methylbenzoat **4**.

¹H-NMR:(400 MHz, CDCl₃): δ 2.04 (s, 1H, R₃C-OH), 2.85 (s, 4H -CO-CH₂-CH₂-CO), 3.78 (s, 6H, -OCH₃), 6.84 (d, 4H, CH₃O-Aryl-H, ortho), 7.14 (d, 4H, CH₃O-Aryl-H, meta), 7.42 (m, 2H, R₂N-OOC-Aryl-H, meta), 7.6 (d, 1H, R₂N-OOC-Aryl-H, para), 8.03 (d, 1H, R₂N-OOC-Aryl-H, ortho), 8.14 (d, 1H, R₂N-OOC-Aryl-H, ortho, isoliert). - ¹³C-NMR: (100.6 MHz, DEPT, CDCl₃): δ 25.63 (-CO-CH₂-CH₂-CO-), 55.25 (O-CH₃, +), 81.07 (R₃C-OH, 0), 113.46 (C-H, CH₃O-Aryl, ortho, +), 128.33 (C-H, R₂N-OOC-Aryl, meta, +), 129.08 und 129.18 (C-H, CH₃O-Aryl, meta, + und CH₃O-Aryl, ortho, +), 129.45 (C-H, R₂N-OOC-Aryl, ortho, isoliert, +), 134.45 (C-H, R₂N-OOC-Aryl, para, +), 124.77, 138.62, 148.52 (CR₃, Aryl, 0), 158.89 (R₂C-OCH₃, Aryl, 0), 161.87 (CO-NR₂, 0), 169.21 (-COOR). - *IR*: (KBr): 1739 cm⁻¹ ((C=O)-Valenzschwingung), 2933 cm⁻¹ (aliphatische (C-H)-Valenzschwingung), 3451 cm⁻¹ ((O-H)-Valenzschwingung). - *MS* (EI, 70 eV): m/z (relative Intensität) m/z berechnet für C₂₆H₂₃NO₇ (M⁺): 461, gefunden: 461 (M⁺, 16 %); 444 (M-OH⁺, 8 %); 243 (100 %); 135 (72 %). - *Elementaranalyse* (%) Gefunden: C, 67.42/67.6; H, 4.83/4.87; N, 2.79/2.82; C₂₆H₂₃NO₇ berechnet C, 67.67; H, 5.02.; N, 3.04. - *Schmelzpunkt*: 162 °C.

Synthese von N-Succinimidyl-3-[bis-(4-methoxyphenyl)]-chlormethylbenzoat 6

500 mg (1.08 mmol) N-Succinimidyl-3-[bis-(4-methoxyphenyl)]-hydroxymethylbenzoat 5 wurden in 6.5 ml frisch destilliertem Acetylchlorid gelöst. Die Lösung wurde drei Stunden unter Rückfluß bei einer Ölbadtemperatur von 80 °C gekocht. Das Lösungsmittel wurde abdestilliert und der ölige Rückstand mit absolutiertem 1,4-Dioxan lyophilisiert. Das trockene Lyophilisat wurde im Exsikkator bei Raumtemperatur gelagert. Alle Arbeiten erfolgten unter Argon. Ausbeute: 517 mg (1.08 μ mol) 99.2 % d Th.

- *Schmelzpunkt*: 207 °C.

Auf eine Charakterisierung wurde auf Grund der Hydrolyseempfindlichkeit verzichtet. Das Rohprodukt wurde direkt für die Retritylierungsexperimente eingesetzt.

Synthese von para-Nitrophenyl-3-[bis-(4-methoxyphenyl)]-methylbenzoat 7

1.55 g (4.45 mmol) 3-[Bis-(4-methoxyphenyl)]-methyl-benzoesäure 3 wurden mit 620 mg (4.46 mmol) *para*-Nitrophenol in einer Lösung aus 1.18 ml absolutem Pyridin und 17 ml trockenem 1,4-Dioxan gelöst. Zu dieser Lösung wurden 5 ml (5 mmol) einer 1 M DCC-Lösung in 1,4-Dioxan gegeben. Der Ansatz wurde 65 Stunden gerührt und vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoffabfiltriert. Der Filter wurde sorgfältig mit 1,4-Dioxan gewaschen. Die organische Phase wurde mit einem Überschuß Wasser versetzt und dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Nach dem Trocknen der Dichlormethanphase über Natriumsulfat wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abdestilliert. Aus dem Rückstand wurde das verbleibende Pyridin mit Toluol koevaporiert. Rohausbeute: 2.39 g.

Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch mit Kieselgel 60 (Fa. Merck) und einem Laufmittelgemisch von Dichlormethan : Methanol = 99 : 1 gereinigt und anschließend aus Ethanol umkristallisiert. Ausbeute: 550 mg (1.17 mmol) 26.3 % d. Th..

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃): δ 3.78 (s, 6H, -OCH₃), 5.55 (s, 1H, R₃C-H), 6.84 (d, 4H, CH₃O-Aryl-H, ortho), 7.03 (d, 4H, CH₃O-Aryl-H, meta), 7.34 (d, 2H, O₂N-Aryl-H, meta), 7.44 (m, 2H, ROOC-Aryl-H, meta und para), 7.96 (s, 1H, ROOC-Aryl-H, ortho, isoliert), 8.05 (d, 1H, ROOC-Aryl-H, ortho), 8.30 (d, 2H, O₂N-Aryl-H, ortho). - ¹³C-NMR: (100.6 MHz, DEPT, CDCl₃): δ 54.96 (R₃C-H, +), 55.25 (O-CH₃, +), 113.84 (C-H, CH₃O-Aryl, ortho, +), 122.65 (C-H, O₂N-Aryl, meta), 125.24 (C-H, O₂N-Aryl, ortho, +), 128.59, 135.46, 145.68, 155.71, 164.29 (R₃C, Aryl, 0), 128.27 (C-H, ROOC-Aryl, ortho, +), 128.79 (C-H, ROOC-Aryl, meta, +), 130.20 (C-H, CH₃O-Aryl, meta, +), 131.05 (C-H, ROOC-Aryl, ortho, isoliert, +), 135.14 (C-H, ROOC-Aryl, para, +), 158.192 (R₂C-OCH₃, Aryl, 0). - IR: (KBr): 1347 cm⁻¹ ((NO₂)-Valenzschwingung), 1509 cm⁻¹ (aromatische (C-H)-Ringschwingung), 1524 cm⁻¹ ((NO₂)-Valenzschwingung). - MS (EI, 70 eV): m/z (relative Intensität) m/z berechnet für C₂₈H₂₃NO₆ (M⁺): 469, gefunden: 469 (M⁺, 17 %); 333 (⁺OC-C₆H₄-CH(C₆H₄OCH-3)₂, 100 %); 227 (⁺HC(C₆H₄OCH-3)₂, 46 %). - Elementaranalyse (%) Gefunden: C, 71.3/71.32; H, 4.90/4.90; N, 2.98/2.99; C₂₆H₂₃NO₇ berechnet C, 71.63; H, 4.94; N, 2.98. - *Schmelzpunkt*: 108 °C.

Synthese von *para*-Nitrophenyl-3-[bis-(4-methoxyphenyl)]-hydroxymethylbenzoat **9**

500 mg (1.06 mmol) *para*-Nitrophenyl-3-[bis-(4-methoxyphenyl)]-methylbenzoat **7** wurden mit 16 ml Eisessig und 407 mg Blei(IV)-oxid zwanzig Minuten unter Rückfluß gekocht, wobei das Ölbad auf 130 °C vorgeheizt wurde. Nach dem Abkühlen wurde der Ansatz auf einen Überschuß Eis gegeben. Die wässrige Phase wurde zweimal mit Ethylacetat extrahiert. Die organische Phasen wurden mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt. Rohausbeute: 780 mg. Der braune Sirup wurde säulenchromatographisch über Kieselgel 60 (Fa. Merck) aufgereinigt. Als Lösungsmittel diente Dichlormethan : Methanol = 99.6 : 0.4. Dem Laufmittel wurden 0.03 % Pyridin zugesetzt. Aus dem so erhaltenen Produkt wurde das Pyridin mit Toluol koevaporiert. Ausbeute: 277 mg (577 µmol) 46 % d. Th..

¹H-NMR:(400 MHz, CDCl₃): δ 2.82 (s, 1H R₃C-OH), 3.79 (s, 6H, -OCH₃), 6.86 (d, 4H, CH₃O-Aryl-H, ortho), 7.18 (d, 4H, CH₃O-Aryl-H, meta), 7.37 (d, 2H, O₂N-Aryl-H, meta), 7.47 (t, 1H, ROOC-Aryl-H, meta), 7.57 (d, 1H, ROOC-Aryl, para), 8.11 (d, 1H, ROOC-Aryl-H, ortho), 8.32 (m, 3H, O₂N-Aryl-H, ortho und ROOC-Aryl, ortho, isoliert). - ¹³C-NMR: (100.6 MHz, DEPT, CDCl₃): δ 55.28 (Aryl-O-CH₃, +), 81.74 (R₃C-OH, 0), 113.43 (C-H, CH₃O-Aryl, ortho, +), 122.66 (C-H, O₂N-Aryl, meta), 125.24 (C-H, O₂N-Aryl, ortho, +), 128.26, 138.73, 148.27, 158.90, 161.27 (R₃C, Aryl, 0), 128.28 (C-H, ROOC-Aryl, meta +), 129.01, 129.09 121.15 (C-H, ROOC-Aryl, ortho, isoliert, +, ROOC-Aryl, ortho, + und CH₃-OAryl, meta, +) 138.73 (C-H, ROOC-Aryl, para, +), 158.99 (R₂C-OCH₃, Aryl, 0). - IR: (KBr): 1347 cm⁻¹ ((NO₂)-Valenzschwingung), 1509 cm⁻¹ (aromatische (C-H)-Ringschwingung), 1524 cm⁻¹ ((NO₂)-Valenzschwingung). - MS (EI, 70 eV): m/z (relative Intensität) m/z berechnet für C₂₈H₂₃NO₇ (M⁺): 485 (M⁺, 14 %); 468 (M-OH, 8), 437 (⁺OC-C₆H₄-COHH(C₆H₄OCH-3)₂, 100 %); 243 (OC(C₆H₄OCH-3)₂, 71 %). - Elementaranalyse (%) Gefunden: C, 68.88/69.27; H, 4.63/4.93; N, 2.61/2.79; C₂₆H₂₃NO₇ berechnet C, 69.27; H, 4.78.; N, 2.89. - Schmelzpunkt: 172 °C.

Synthese von *para*-Nitrophenyl-3-[bis-(4-methoxyphenyl)]-chlormethylbenzoat **10**

237 mg (488 µmol) *para*-Nitrophenyl-3-[bis-(4-methoxyphenyl)]-hydroxymethylbenzoat **9** wurden drei Stunden mit 3.5 ml frisch destilliertem Acetylchlorid unter Rückfluß gekocht. Nach dem Abkühlen wurde das Lösungsmittel abdestilliert und der Rückstand aus trockenem THF / Hexan umkristallisiert. Alle Arbeiten wurden unter Argon durchgeführt und die Kristalle in einer trockenen Schlenck-Fritte gelagert. Ausbeute: 162 mg (322 µmol) 66 % d. Th..

- Schmelzpunkt: 166 °C.

Auf weitere Charakterisierungen wurde auf Grund der Hydrolyseempfindlichkeit verzichtet.

9.1.2. Synthese der para-Verbindungen

Synthese von 4-[Bis-(4-methoxyphenyl)]-methyl-benzoesäure **12**

910 mg (6.06 mmol) Terephthalaldehydsäure wurden mit 1.54 ml (14.1 mmol) Anisol und 4.4 ml Eisessig versetzt. Die Lösung wurde mit Eiswasser gekühlt und tropfenweise mit 3.12 g konzentrierter Schwefelsäure versetzt. Der Reaktionsverlauf wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt, wobei das Laufmittel aus Dichlormethan : Methanol = 8 : 2 bestand. Nach 22 Stunden wurde der Ansatz auf einen Überschuß Eiswasser gegossen und fünfmal mit Diethylether extrahiert. Die organische Phase wurde fünfmal mit Wasser und zweimal mit einer gesättigten Natriumbicarbonat-Lösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer abdestilliert. Das Rohprodukt wurde mit einer diskontinuierlichen Säulenchromatographie aufgereinigt. Das Laufmittel wurde dabei stufenweise von Dichlormethan zu Dichlormethan : Methanol = 99 : 1 verändert. Ausbeute: 1.42 g (4.08 mmol) 67.3 % d. Th..

$^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, CDCl_3): δ 3.78 (s, 6H, $-\text{OCH}_3$), 5.50 (s, 1H $\text{R}_3\text{C-H}$), 6.83 (d, 4H, $\text{CH}_3\text{O-Aryl-H}$, ortho), 7.00 (d, 4H, $\text{CH}_3\text{O-Aryl-H}$, meta), 7.22 (d, 2H, HOOC-Aryl-H , meta), 8.03 (d, 2H, HOOC-Aryl-H , ortho). - $^{13}\text{C-NMR}$: (100.6 MHz, DEPT, CDCl_3): δ 55.23 und 55.27 (Aryl-O-CH_3 , + und $\text{R}_3\text{C-H}$, +), 113.43 (C-H , $\text{CH}_3\text{O-Aryl}$, ortho, +), 129.45 (C-H , HOOC-Aryl , meta +), 130.24 (C-H , HOOC-Aryl , ortho, + und $\text{CH}_3\text{O-Aryl}$, meta, +) 127.24, 135.44, 151.08 ($\text{R}_3\text{-C}$, Aryl, 0), 158.21 ($\text{R}_2\text{C-OCH}_3$, Aryl, 0), 171.94 (COOH , 0). - MS (EI, 70 eV): m/z (relative Intensität) m/z berechnet für $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{O}_4$ (M^+): 348, gefunden: 348 (M^+ , 83 %); 227 (100 %). - *Schmelzpunkt*: 144-146 °C.

Synthese von N-Succinimidyl-4-[bis-(4-methoxyphenyl)]-methylbenzoat **13**

1.326 g (3.80 mmol) 4-[Bis-(4-methoxyphenyl)]-methyl-benzoesäure **12** wurden in 21 ml Pyridin : 1,4-Dioxan = 20 : 1 gelöst und mit 442 mg (3.81 mmol) *N*-Hydroxysuccinimid versetzt. Zu dieser Lösung wurden 4.3 ml einer 1 M DCC-Lösung in 1,4-Dioxan gegeben. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch überwacht. Als Laufmittel wurde Dichlormethan : Methanol = 96 : 4 eingesetzt. Nach 72 Stunden wurde vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff abfiltriert und der Filter sorgfältig mit 1,4-Dioxan gewaschen. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer abdestilliert und der Rückstand aus Ethanol umkristallisiert. Ausbeute: 1.5 g (3.37 mmol) 85 % d. Th..

$^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, CDCl_3): δ 2.90 (s, 4H, $-\text{CO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO-}$), 3.78 (s, 6H, $-\text{OCH}_3$), 5.52 (s, 1H $\text{R}_3\text{C-H}$), 6.84 (d, 4H, $\text{CH}_3\text{O-Aryl-H}$, ortho), 6.98 (d, 4H, $\text{CH}_3\text{O-Aryl-H}$, meta), 7.25 (d, 2H, $\text{R}_2\text{N-OOC-Aryl-H}$, meta), 8.05 (d, 2H, $\text{R}_2\text{N-OOC-Aryl-H}$, ortho). - $^{13}\text{C-NMR}$: (100.6 MHz, DEPT, CDCl_3): δ 25.69 (C-H , $-\text{CO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO-}$, +) 55.27 und 55.30 (C-H , $\text{R}_3\text{C-H}$, + und Aryl-O-CH_3 , +), 113.93 (C-H , $\text{CH}_3\text{O-Aryl}$, ortho, +), 129.85 (C-H , $\text{R}_2\text{N-OOC-Aryl}$, meta +), 130.26 (C-H , $\text{CH}_3\text{O-Aryl}$, meta, +) 130.65 (C-H , $\text{R}_2\text{N-OOC-Aryl}$, ortho, +) 123.00, 135.10, 152.56 ($\text{R}_3\text{-C}$, Aryl, 0), 158.33 ($\text{R}_2\text{C-OCH}_3$, Aryl, 0), 161.75 (CO-NR_2 , 0), 169.23 (COOR , 0). - MS (EI, 70 eV): m/z (relative Intensität) m/z berechnet für $\text{C}_{26}\text{H}_{23}\text{O}_6$ (M^+): 445, gefunden: 445 (M^+ , 83 %); 331 (100 %). - *Schmelzpunkt*: 183-186 °C.

Synthese von N-Succinimidyl-4-[bis-(4-methoxyphenyl)]-hydroxymethylbenzoat **14**

4.35 g (9.76 mmol) *N*-Succinimidyl-4-[bis-(4-methoxyphenyl)]-methylbenzoat **13** wurden in 90 ml Eisessig gelöst und mit 4.5 g (18.8 mmol) Blei(IV)-oxid versetzt. Der Ansatz wurde zwei Stunden in einem auf 130 °C temperierten Ölbad unter Rückfluß gekocht. Anschließend wurde die Lösung auf 500 ml Eiswasser gegossen und mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit einer Natriumbicarbonat-Lösung säurefrei gewaschen. Anschließend wurde die Lösung nochmals mit Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer abdestilliert. Rohausbeute: 2.5 g. Das Rohprodukt wurde über 150 g Kieselgel 60 (Fa. Merck) chromatographiert, wobei als Laufmittel Dichlormethan : Methanol = 99.6 : 0.4 mit einem Zusatz von 0.03 % Pyridin eingesetzt wurde. Das Produkt **14** wurde in Aceton aufgenommen und mit Petrolether gefällt. Ausbeute: 460 mg (997 µmol) 10.2 % d. Th..

¹H-NMR:(400 MHz, CDCl₃): δ 2.78 (2, 1H, R₃C-OH), 2.88 (s, 4H, -CO-CH₂-CH₂-CO), 3.80 (s, 6H, -OCH₃), 6.85 (d, 4H, CH₃O-Aryl-H, ortho), 7.15 (d, 4H, CH₃O-Aryl-H, meta), 7.50 (d, 2H, R₂N-OOC-Aryl-H, meta), 8.07 (d, 2H, R₂N-OOC-Aryl-H, ortho). - ¹³C-NMR: (100.6 MHz, DEPT, CDCl₃): δ 25.69 (C-H, -CO-CH₂-CH₂-CO, +), 55.31 (C-H, Aryl-O-CH₃, +), 81.32 (R₃C-OH, 0), 113.51 (C-H, CH₃O-Aryl, ortho, +), 128.17 (C-H, R₂N-OOC-Aryl, meta, +), 129.12 (C-H, CH₃O-Aryl, meta, +), 130.19 (C-H, R₂N-OOC-Aryl, ortho, +), 123.65, 138.44, 154.56 (R₃-C, Aryl, 0), 159.01 (R₂C-OCH₃, Aryl, 0), 161.67 (CO-NR₂, 0), 169.21(COOR, 0). - MS (EI, 70 eV): m/z (relative Intensität) m/z berechnet für C₂₆H₂₃O₇ (M⁺): 461, gefunden: 461 (M⁺, 15 %); 444 (M-OH⁺, 8), 243 (100 %), 135 (72 %). - Schmelzpunkt: 166 °C (Lit.: 188–190 °C [41]).

Synthese von N-Succinimidyl-4-[bis-(4-methoxyphenyl)]-chlormethylbenzoat **15**

1.001 g (2.16 mmol) *N*-Succinimidyl-4-[bis-(4-methoxyphenyl)]-hydroxymethylbenzoat **14** wurden drei Stunden in 11 ml frisch destilliertem Acetylchlorid unter Rückfluß gekocht. Nach dem Abkühlen wurden dem Ansatz 6.5 ml Diethylether zugesetzt und über Nacht gelagert. Die weißen Kristalle wurden abfiltriert und bei Raumtemperatur in einem Exsikkator gelagert. Ausbeute: 880 mg (1.83 mmol) 84 % d. Th..

- Schmelzpunkt: 206 °C (Lit.: 209–211 °C [41]).

Auf weitere Charakterisierungen wurde auf Grund der Hydrolyseempfindlichkeit verzichtet.

Synthese von para-Nitrophenyl-4-[bis-(4-methoxyphenyl)]-methylbenzoat **16**

4.3 g (12.2 mmol) 4-[Bis-(4-methoxyphenyl)]-methyl-benzoesäure **12** und 1.72 g (12.3 mmol) *para*-Nitrophenol wurden in 46 ml 1,4-Dioxan und 3.2 ml Pyridin gelöst und tropfenweise mit 14 ml (14 mmol) einer 1M DCC-Lösung in 1,4-Dioxan versetzt. Der Reaktionsverlauf wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt. Als Laufmittel diente Dichlormethan : Methanol = 96 : 4. Nach 16 Stunden wurde der Ansatz filtriert und der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff sorgfältig mit 1,4-Dioxan gewaschen. Die Lösung wurde in einem Schütteltrichter mit einem Überschuß an Wasser versetzt und mit Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet

und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abdestilliert. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über 180 g Kieselgel 60 (Fa. Merck) gereinigt. Als Laufmittel wurde Dichlormethan : Methanol = 99 : 1 verwendet. Das erhaltene Rohprodukt wurde aus Ethanol umkristallisiert. Ausbeute: 1.1 g (2.34 mmol) weiße Nadeln mit gelbgrünem Schimmer. 19.2 % d. Th..

$^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, CDCl_3): δ 3.80 (s, 6H, $-\text{OCH}_3$), 5.52 (s, 1H, $\text{R}_3\text{C}-\underline{\text{H}}$), 6.84 (d, 4H, $\text{CH}_3\text{O-Aryl}-\underline{\text{H}}$, ortho), 6.98 (d, 4H, $\text{CH}_3\text{O-Aryl}-\underline{\text{H}}$, meta), 7.27 (d, 2H, $\text{O}_2\text{N-Aryl}-\underline{\text{H}}$, meta), 7.39 (d, 2H, $\text{ROOC-Aryl}-\underline{\text{H}}$, meta), 8.08 (d, 2H, $\text{O}_2\text{N-Aryl}-\underline{\text{H}}$, ortho), 8.30 (d, 2H, $\text{ROOC-Aryl}-\underline{\text{H}}$, ortho). - $^{13}\text{C-NMR}$: (100.6 MHz, DEPT, CDCl_3): δ 55.27 ($\underline{\text{C-H}}$, Aryl-O-CH_3 , + und $\text{R}_3\text{C-H}$, +), 113.92 ($\underline{\text{C-H}}$, $\text{CH}_3\text{O-Aryl}$, ortho, +), 122.25 ($\underline{\text{C-H}}$, $\text{O}_2\text{N-Aryl}$, meta, +), 125.25 ($\underline{\text{C-H}}$, $\text{O}_2\text{N-Aryl}$, ortho, +), 129.77 ($\underline{\text{C-H}}$, ROOC-Aryl , meta +), 130.25 ($\underline{\text{C-H}}$, $\text{CH}_3\text{O-Aryl}$, meta, +) 130.98 ($\underline{\text{C-H}}$, ROOC-Aryl , ortho, +) 135.23, 145.36, 151.75 ($\text{R}_3\text{-C}$, Aryl , 0), 155.78 ($\text{O}_2\text{N-Aryl}$, 0), 158.28 ($\text{R}_2\text{C-OCH}_3$, Aryl , 0), 164.12 ($\underline{\text{COOR}}$, 0). - *IR*: (KBr): 1249 cm^{-1} ((NO_2) -Valenzschwingung), 1349 cm^{-1} ((NO_2) -Valenzschwingung) 1523 cm^{-1} ($(\text{NO}-2)$ -Valenzschwingung). - *MS* (EI, 70 eV): m/z (relative Intensität) m/z berechnet für $\text{C}_{28}\text{H}_{23}\text{NO}_6$ (M^+): 469, gefunden: 469 (M^+ , 7 %); $331(^+\text{OC-C}_6\text{H}_4\text{-CH}(\text{C}_6\text{H}_4\text{OCH}_3)_2$, 100 %). - *Elementaranalyse* (%) Gefunden: C, 71.59/71.58; H, 4.37/4.66; N, 2.83/2.86; $\text{C}_{28}\text{H}_{23}\text{NO}_6$ berechnet C, 71.63; H, 4.94; N, 2.98. - *Schmelzpunkt*: 122°C .

Synthese von *para*-Nitrophenyl-4-[bis-(4-methoxyphenyl)]-hydroxymethylbenzoat **18**

930 mg (1.98 mmol) *para*-Nitrophenyl-4-[bis-(4-methoxyphenyl)]-methylbenzoat **16**, 757 mg (2.17 mmol) Blei(IV)-oxid und 30 ml Eisessig wurden 20 Minuten unter Rückfluß gekocht, wobei das Ölbad auf 130°C vorgeheizt wurde. Der Reaktionsverlauf wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt, wobei als Laufmittel Dichlormethan : Methanol = 99 : 1 verwendet wurde. Der Ansatz wurde auf einen Überschuß Eis gegeben und zweimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt. Der braune Sirup (1.34 g) wurde säulenchromatographisch gereinigt. Das Laufmittel bestand aus Dichlormethan : Methanol = 99.6 : 0.4 mit einem 0.03 % Pyridin-Zusatz. Das so erhaltene Produkt ließ sich weder aus Hexan / Ethanol noch aus Aceton / Hexan kristallisieren. Ausbeute: 505 mg rotbrauner Sirup (1.04 mmol) 54 % d. Th..

$^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, CDCl_3): δ 2.98 (s, 1H, $\text{R}_3\text{C}-\underline{\text{OH}}$) 3.80 (s, 6H, $-\text{OCH}_3$), 6.84 (d, 4H, $\text{CH}_3\text{O-Aryl}-\underline{\text{H}}$, ortho), 7.18 (d, 4H, $\text{CH}_3\text{O-Aryl}-\underline{\text{H}}$, meta), 7.40 (d, 2H, $\text{O}_2\text{N-Aryl}-\underline{\text{H}}$, meta), 7.51 (d, 2H, $\text{ROOC-Aryl}-\underline{\text{H}}$, meta), 8.12 (d, 2H, $\text{ROOC-Aryl}-\underline{\text{H}}$, ortho), 8.29 (d, 2H, $\text{O}_2\text{N-OOC-Aryl}-\underline{\text{H}}$, ortho). - $^{13}\text{C-NMR}$: (100.6 MHz, DEPT, CDCl_3): δ 55.31 ($\underline{\text{C-H}}$, Aryl-O-CH_3 , + und $\text{R}_3\text{C-H}$, +), 81.36 ($\text{R}_3\text{C-H}$, 0), 113.51 ($\underline{\text{C-H}}$, $\text{CH}_3\text{O-Aryl}$, ortho, +), 122.62 ($\underline{\text{C-H}}$, $\text{O}_2\text{N-Aryl}$, meta, +), 125.27 ($\underline{\text{C-H}}$, $\text{O}_2\text{N-Aryl}$, ortho, +), 127.12 ($\underline{\text{C-H}}$, ROOC-Aryl , meta +), 128.13 ($\underline{\text{C-H}}$, $\text{CH}_3\text{O-Aryl}$, meta, +) 129.12 ($\underline{\text{C-H}}$, ROOC-Aryl , ortho, +) 129.94 ($\underline{\text{C-H}}$, $\text{O}_2\text{N-Aryl}$, ortho, +) 138.52, 145.40, 153.86 ($\text{R}_3\text{-C}$, Aryl , 0), 155.77 ($\text{O}_2\text{N-Aryl}$, 0), 159.01 ($\text{R}_2\text{C-OCH}_3$, Aryl , 0), 164.06 ($\underline{\text{COOR}}$, 0). - *IR*: (KBr): 1251 cm^{-1} ((NO_2) -Valenzschwingung), 1347 cm^{-1} ((NO_2) -Valenzschwingung) 1523 cm^{-1} ($(\text{NO}-2)$ -Valenzschwingung). - *MS* (EI, 70 eV): m/z (relative Intensität) m/z berechnet

für $C_{28}H_{23}NO_7$ (M^+): 485, gefunden: 485 (M^+ , 7 %); 468 (M-OH, 21 %), 347 ($^+OC-C_6H_4-COH(C_6H_4OCH_3)_2$, 89 %), 135 (100 %).

Synthese von *para*-Nitrophenyl-4-[bis-(4-methoxyphenyl)]-chlormethylbenzoat **19**

350 mg (721 mmol) *para*-Nitrophenyl-4-[bis-(4-methoxyphenyl)]-hydroxymethylbenzoat **18** wurden mit 4.5 ml frisch destilliertem Acetylchlorid drei Stunden unter Rückfluß gekocht. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung mit 4.5 ml trockenem Diethylether versetzt. Über Nacht bildete sich eine feiner Niederschlag, der sich jedoch nicht filtrieren ließ. Der Ansatz wurde eingengt, mit Toluol koevaporiert und mit 1,4-Dioxan lyophilisiert. Alle Arbeiten fanden unter Argon statt. Ausbeute: 219 mg (433 mmol) 63.4 % d. Th..

- *Schmelzpunkt*: 225–230 °C.

Auf weitere Charakterisierungen wurde auf Grund der Hydrolyseempfindlichkeit verzichtet.

9.2. Sonstige Verbindungen

9.2.1. Tritylierung von Thymidin

Umsetzung mit *N*-Succinimidyl-3-[bis-(4-methoxyphenyl)]-chlormethylbenzoat **6**

500 mg (1.04 mmol) *N*-Succinimidyl-3-[bis-(4-methoxyphenyl)]-chlormethylbenzoat **6** und 240 mg (1.00 mmol) Thymidin wurden in 6 ml trockenem Pyridin gelöst und drei Tage gerührt. Anschließend wurde der Ansatz auf Eiswasser gegossen und dreimal mit Chloroform extrahiert. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer abdestilliert. Das Rohprodukt wurde einmal einer präparativen Plattenchromatographie mit einem Laufmittel Dichlormethan : Methanol = 99 : 1 unterworfen. Anschließend wurde das Produkt nochmals über eine präparative Dünnschichtchromatographie gereinigt, wobei sich das Laufmittel aus Dichlormethan : Methanol = 9 : 1 zusammensetzte. Ausbeute: 126 mg (184 μ mol) 17.7 % d. Th..

1H -NMR:(400 MHz, $CDCl_3$): δ) 1.53 (s, 1H, $\underline{CH_3}$, Thymidin), 2.32/2.40 (m, 2H, $H2'^a/H2'^b$), 2.87 (s, 4H, -CO- $\underline{CH_2}$ - $\underline{CH_2}$ -CO), 3.32/3.45 (m, 2H, $H5'^a/H5'^b$), 3.80 (s, 6H, -O $\underline{CH_3}$), 4.06 (m, 1H, $H4'$), 4.60 (m, 1H, $H3'$), 6.35 (t, 1H, $H1'$), 6.85 (d, 4H, $\underline{CH_3O-Aryl-H}$, ortho), 7.25 (d, 4H, $\underline{CH_3O-Aryl-H}$, meta), 7.42 (m, 1H, ROOC-Aryl- $\underline{H}$, meta), 7.55 (s, 1H, $H6$), 7.64 (d, 1H, ROOC-Aryl- $\underline{H}$, para), 7.98 (d, 1H, ROOC-Aryl- $\underline{H}$, ortho), 8.34 (s, 1H, ROOC-Aryl- $\underline{H}$, ortho, isoliert), 9.14 (s, 1H, N- $\underline{H}$, Thymidin). - *MS* (EI, 70 eV): m/z (relative Intensität) m/z berechnet für $C_{36}H_{35}N_3O_{11}$ (M^+): 685, gefunden: 648, (0.7 %); 444 (2 %), 117 (100 %). - *Elementaranalyse* (%) Gefunden: C, 63.12/63.08; H, 5.74/5.75; N, 5.22/5.24; $C_{36}H_{35}N_3O_{11}$ berechnet C, 63.06; H, 5.14; N, 6.13. - *Schmelzpunkt*: 104–106 °C.

9.2.2. Synthese von *para*-Nitrophenyliodacetat **24**

2.72 g (10 mmol) *para*-Nitrophenol und 3.29 g (16 mmol) Iodessigsäure wurden in 100 ml Ethylacetat gelöst und bei 0 °C mit einer Lösung von 3.36 g (16 mmol) DCC in 100 ml Ethylacetat versetzt. Der Ansatz wurde 30 Minuten bei 0 °C und anschließend 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde von dem ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff abfiltriert und der Filter sorgfältig mit Ethylacetat gewaschen. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer abdestilliert und das Rohprodukt (8.55 g) aus Ethanol umkristallisiert. Ausbeute: 2.35 g (7.65 mmol) 76.2 % d. Th..

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃): δ) 3.95 (s, 2H, R-CH₂I), 7.27 (d, 2H RCOO-Aryl-H, ortho), 8.29 (d, 2H, O₂N-Aryl-H, ortho). - ¹³C-NMR: (100.6 MHz, DEPT, CDCl₃): δ 53.46 (C-H₂, R-CH₂I, +), 121.99 (C-H, ROOC-Aryl, ortho, +), 125.32 (C-H, O₂N-Aryl, ortho, +), 145.65, 166.57 (R₃C, Aryl, 0). - IR: (KBr): 1348 cm⁻¹ ((NO₂)-Valenzschwingung), 1535 cm⁻¹ (aromatische (C-H)-Ringschwingung), 1739 cm⁻¹ ((C=O)-Valenzschwingung, Carbonsäureester). - MS (EI, 70 eV): m/z (relative Intensität) m/z berechnet für C₈H₆NO₄I (M⁺): 307, gefunden: 307 (M⁺, 4.5 %); 169 und 168 (ICH₂CO⁺, 100 %). - Schmelzpunkt: 77–79 °C (Lit.: 76–77 °C [63]).

9.2.3. Cysteaminyl-3-[bis-(4-methoxyphenyl)]-thymidinylmethylbenzoat **25**

Es wurden folgende Mikroversuche durchgeführt, deren Reaktionsverlauf mittels isokratischer RP-HPLC (65 % Acetonitril in Wasser) untersucht wurden:

1. 1 mg (1.46 μmol) *N*-Succinimidyl-3-[bis-(4-methoxyphenyl)]-thymidinylmethylbenzoat **22** wurde in 1 ml Reinstwasser und 500 μl Ethanol gelöst. 500 μg (4.4 μmol) Cysteaminhydrochlorid wurden mit 500 μl Reinstwasser versetzt. Mit Pyridin wurde ein pH-Wert > 7 eingestellt. Beide Lösungen wurden vereinigt und 24 Stunden gerührt.
2. 1 mg (1.46 μmol) *N*-Succinimidyl-3-[bis-(4-methoxyphenyl)]-thymidinylmethylbenzoat **22** wurde in 1 ml Borat-Puffer pH 8.0 (Fa. Merck) und 500 μl Ethanol gelöst. 500 μg (4.4 μmol) Cysteaminhydrochlorid wurden mit 500 μl Borat-Puffer pH 8.0 versetzt. Beide Lösungen wurden vereinigt und 24 Stunden gerührt.
3. 1 mg (1.46 μmol) *N*-Succinimidyl-3-[bis-(4-methoxyphenyl)]-thymidinylmethylbenzoat **22** wurde in 1 ml DMF gelöst. 500 μg (4.4 μmol) Cysteaminhydrochlorid wurden mit 1 ml Reinstwasser und einem Tropfen Triethylamin versetzt. Beide Lösungen wurden vereinigt und 24 Stunden gerührt.

Vor der Analyse wurden die Lösungen mit 500 μl Dichlormethan versetzt und mit je 1 ml 10 % Citronensäure gewaschen. Die organischen Phasen wurden lyophilisiert und in 100 μl 65 % Acetonitril in Wasser gelöst. Lediglich bei der dritten Reaktion war eine Umsetzung zu erkennen.

10. Die Oligonucleotide

Inhaltsangabe

10.1. Die unmodifizierten Oligonucleotide	134
10.2. Die modifizierten Oligonucleotide	134
10.2.1. Reaktionen mit den N-Succinimidyl-Estern	134
10.2.2. Reaktionen mit den para-Nitrophenyl-Estern	135
10.2.3. Aminolysen der aktivierten Ester	135
10.2.4. Abspaltung, Entschützung und Aufreinigung der Oligonucleotide	137

10.1. Die unmodifizierten Oligonucleotide

Die Oligonucleotide wurden mit einem Milligen-7500-DNA-Synthesizer synthetisiert, oder über die Firma Sequenom bezogen. Die Oligonucleotide wurden nach der HPLC-Aufreinigung in 5 % Acetonitril in 100 mM Triethylammoniumacetat-Puffer gelöst, mittels UV-Spektroskopie quantifiziert und auf eine Konzentration von $100 \text{ pmol } \mu\text{l}^{-1}$ eingestellt. Die Lösungen wurden bei -20°C gelagert.

10.2. Die modifizierten Oligonucleotide

Die Oligonucleotide wurden im $1 \mu\text{mol}$ -Maßstab mit einem Milligen-7500-DNA-Synthesizer synthetisiert oder über die Firma Sequenom bezogen. Die Oligonucleotide für die Retrikylierung wurden am CPG belassen. Die Modifikationen wurden, wenn nicht anders beschrieben, in dem in Abbildung 5.4 gezeigten Aufbau durchgeführt.

10.2.1. Reaktionen mit den N-Succinimidyl-Estern

Umsetzung mit N-Succinimidyl-3-[bis-(4-methoxyphenyl)]-chlormethylbenzoat 6 und N-Succinimidyl-4-[bis-(4-methoxyphenyl)]-chlormethylbenzoat 15

$1.0 \mu\text{mol}$ *universal sequencing primer* 32 bzw. Lambda-Oligonucleotid λ_1 33 wurden mit

72	mg	(150 μmol)	N-Succinimidyl-3-[bis-(4-methoxyphenyl)]-chlormethylbenzoat <u>6</u> bzw. N-Succinimidyl-4-[bis-(4-methoxyphenyl)]-chlormethylbenzoat <u>15</u> ,
54	mg	(158 μmol)	Tetrabutylammoniumperchlorat und
33	μl	(250 μmol)	<i>sym.</i> -Collidin in 600 μl Dichlormethan

50 Minuten bei Raumtemperatur umgesetzt. Die CPG-Säule wurde anschließend fünfmal mit je 1 ml Dichlormethan gewaschen und an der Luft getrocknet.

Trityl-Gruppe		Oligonucleotid		Produkt
<u>15</u>	(<i>para</i>)	USP	<u>32</u>	→ <u>34</u>
<u>15</u>	(<i>para</i>)	λ_1	<u>33</u>	→ <u>35</u>
<u>6</u>	(<i>meta</i>)	USP	<u>32</u>	→ <u>36</u>
<u>6</u>	(<i>meta</i>)	λ_1	<u>33</u>	→ <u>37</u>

Tabelle 10.1.: Umsetzungen mit den *N*-Succinimidyl-Verbindungen

10.2.2. Reaktionen mit den *para*-Nitrophenyl-Estern

Umsetzung mit *para*-Nitrophenyl-4-[bis-(4-methoxyphenyl)]-chlormethylbenzoat

1.0 μ mol *universal sequencing primer* 32 wurden mit

76	mg	(150 μ mol)	<i>para</i> -Nitrophenyl-4-[bis-(4-methoxyphenyl)]-chlormethylbenzoat <u>19</u> ,
54	mg	(158 μ mol)	Tetrabutylammoniumperchlorat und
33	μ l	(250 μ mol)	<i>sym.</i> -Collidin in 600 μ l Dichlormethan

50 Minuten bei Raumtemperatur umgesetzt. Die CPG-Säule wurde anschließend fünfmal mit je 1 ml Dichlormethan gewaschen und an der Luft getrocknet.

Umsetzung mit *para*-Nitrophenyl-3-[bis-(4-methoxyphenyl)]-chlormethylbenzoat

In einem 1.5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß wurde CPG mit 1.0 μ mol *universal sequencing primer* 32 in 600 μ l trockenem Pyridin mit 76 mg (150 μ mol) *para*-Nitrophenyl-3-[bis-(4-methoxyphenyl)]-chlormethylbenzoat 10 vorsichtig 50 Minuten geschüttelt. Der feste Träger wurde anschließend über eine Fritte abfiltriert und mit Pyridin und Ethanol gewaschen. Das CPG wurde nach dem Trocknen an der Luft in eine leere Säule überführt.

Trityl-Gruppe		Oligonucleotid		Produkt
<u>19</u>	(<i>para</i>)	USP	<u>32</u>	→ <u>38</u>
<u>10</u>	(<i>meta</i>)	USP	<u>32</u>	→ <u>39</u>

Tabelle 10.2.: Umsetzungen mit den *para*-Nitrophenyl-Estern

10.2.3. Aminolysen der aktivierten Ester

Alle Modifikationen wurden in dem in Abbildung 5.4 gezeigten Aufbau durchgeführt.

Umsetzungen mit 1,6-Diaminohexan

Zur Umsetzung wurden die festphasengebundenen Oligonucleotide **34** bis **39** zehn Minuten mit 500 μ l (500 μ mol) einer 1 M 1,6-Diaminohexan-Lösung in 1,4-Dioxan : Wasser = 9 : 1 bei Raumtemperatur in Kontakt gebracht.

Oligonucleotid		Produkt
USP 34	→	40
USP 36	→	41
λ_1 35	→	42
λ_1 37	→	43
USP 38	→	44
USP 39	→	45

Tabelle 10.3.: Aminolysen mit 1,6-Diaminohexan

Umsetzungen mit Polyoxyethylendiaminen

Je 1 μ mol reactivitylierter USP **38** und **39** wurden mit Polyoxyethylendiaminen unterschiedlicher Anzahl Oxyethylengruppen n in 1,4-Dioxan / Wasser mit einem Triethylaminanteil umgesetzt. Die Oligonucleotide befanden sich dabei am festen Träger CPG.

Edukt		Produkt	Menge	n	Dioxan	Lösungsmittel		
						Wasser	TEA	Volumen [μ l]
<u>38</u>	→	<u>46</u>	100 mg	45	9	1	0.02	500
<u>38</u>	→	<u>47</u>	150 mg	68	9	0.9	0.1	500
<u>38</u>	→	<u>48</u>	300 mg	136	9	0.9	0.1	1000
<u>39</u>	→	<u>49</u>	100 mg	45	9	1	0.02	500
<u>39</u>	→	<u>50</u>	150 mg	68	9	0.9	0.1	500
<u>39</u>	→	<u>51</u>	300 mg	136	9	0.9	0.1	1000

Tabelle 10.4.: Aminolysen mit Polyoxyethylenen

Umsetzung mit Cysteamin

Zur Aminolyse der aktivierten *para*-Nitrophenylester **38** und **39** mit Cysteamin wurde das CPG aus den Synthesäulen in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und mit 500 μ l (500 μ mol) einer 1 M Cysteamin-Lösung in 500 mmol Natriumhydrogencarbonat-Puffer pH 9.4 30 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Der feste Träger wurde über eine Fritte filtriert und mit Reinstwasser neutral gewaschen. Anschließend wurde der Träger mit 10 ml Ethanol behandelt und an der Luft getrocknet. Das CPG wurde wieder in Synthesäulen überführt.

Edukt		Produkt
38	→	52
39	→	53

Tabelle 10.5.: Aminolyse mit Cysteamin

10.2.4. Abspaltung, Entschützung und Aufreinigung der Oligonucleotide

Die Abspaltungsreaktionen erfolgten im in Abbildung 5.4 gezeigten Aufbau.

Abspaltung

Zur Abspaltung der Oligonucleotide vom festen Träger wurde das CPG zweimal mit je 500 μl 32 % Ammoniak-Lösung in Wasser bei Raumtemperatur behandelt. Die erste Behandlung erfolgte über einen Zeitraum von 30 Minuten. Die zweite Einwirkungsdauer war mit zehn Minuten kürzer und diente in erster Linie zum Spülen des Trägers. Die Lösungen wurden in 500 μl -Eppendorf-Reaktionsgefäße gesammelt.

Entschützung

Die Entschützung der Oligonucleotid-Lösungen erfolgte in einem Trockenschrank bei einer Temperatur von 55 °C über einen Zeitraum von 20 Stunden. Anschließend wurden die ammoniakalischen Lösungen kurz in einer Tiefkühltruhe abgekühlt.

Edukt		Produkt	Edukt		Produkt
<u>34</u>	→	<u>54</u>	<u>48</u>	→	<u>60</u>
<u>35</u>	→	<u>55</u>	<u>49</u>	→	<u>61</u>
<u>36</u>	→	<u>56</u>	<u>50</u>	→	<u>62</u>
<u>37</u>	→	<u>57</u>	<u>51</u>	→	<u>63</u>
<u>46</u>	→	<u>58</u>	<u>52</u>	→	<u>64</u>
<u>47</u>	→	<u>59</u>	<u>53</u>	→	<u>65</u>

Tabelle 10.6.: Abspaltung, Entschützung und Aufreinigung der Oligonucleotide

Aufreinigung

Die Aufreinigung der Oligonucleotide 54 bis 57 und 64 und 65 erfolgte nach zwei Methoden:

- Mit OPCTM-Säulen, wie in Abschnitt 8.4 beschrieben.
- Mittels RP-HPLC, wie in Abschnitt 8.6.1 erläutert, wobei die Oligonucleotide in diesem Fall vor der Trennung mit *n*-Butanol aus der ammoniakalischen Lösung gefällt wurden:

Je 250 μl ammoniakalische Oligonucleotid-Lösung wurden mit je 1000 μl *n*-Butanol versetzt, kräftig geschüttelt und 10 Minuten bei 13 800 U min⁻¹ zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und der Rückstand getrocknet. Zur Injektion wurden die Oligonucleotide in 100 μl 5 % Acetonitril in 100 mM TEAAc pH 7.0 aufgenommen.

Die Oligonucleotide 58 bis 63 wurden mit den Membranfiltern 5000 NMWLTM (Fa. Millipore) aufgereinigt. Auch für dieses Verfahren wurden die *Primer* zunächst mit *n*-Butanol gefällt. Vor dem Auftragen der Oligonucleotid-Lösungen wurden die Membrane

gewaschen. Dazu wurden je 400 μl Reinstwasser aufgetragen und die Membrane 40 Minuten bei 8 000 U min^{-1} zentrifugiert. Die Nucleinsäure-Lösungen wurden innerhalb 50 Minuten bei ebenfalls 8 000 U min^{-1} durch die Membrane zentrifugiert. Die Produkte **58** bis **63** wurden mit je 80 μl 5 % Acetonitril in 100 mmol TEAAc pH 7.0 von den Filtern resuspendiert.

11. Die Membrane

Inhaltsangabe

11.1. Die Biotyne C Membrane	139
11.1.1. Aktivierung mit <i>para</i> -Nitrophenol	139
11.1.2. Aktivierung mit EDC	140
11.2. Die PVDF Membrane	142
11.2.1. Aktivierung mit DITC	142
11.2.2. Anbindungsexperimente	142

11.1. Die Biotyne C Membrane

11.1.1. Aktivierung mit *para*-Nitrophenol

Zur Aktivierung der Biotyne C Membrane **66** wurde ein ca. 2.5 x 1 cm großes Stück der Membran 15 Minuten mit 1 ml 100 mM Salzsäure behandelt und mit Reinstwasser neutral gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit Ethanol behandelt und an der Luft getrocknet. Die Membran wurde mit 200 μ l einer *para*-Nitrophenol-Lösung folgender Zusammensetzung versetzt:

1.72	g	<i>para</i> -Nitrophenol in
46	ml	1,4-Dioxan abs. und
3.2	ml	Pyridin abs.

Der Membran wurden außerdem 100 μ l einer 1 M DCC in 1,4-Dioxan zugesetzt. Die Aktivierungsdauer betrug zwei Stunden und erfolgte bei Raumtemperatur. Abschließend wurde die Membran portionsweise mit insgesamt 20 ml Ethanol gewaschen, bis in der letzten Waschphase mit einer Ammoniak-Lösung kein *para*-Nitrophenolat mehr nachweisbar war. Die aktivierte Membran **67** wurde direkt weiter umgesetzt oder mit einer 1 M KOH zwecks Quantifizierung des Carboxylierungsgrades behandelt. Das entstandene *para*-Nitrophenolat wurde mittels UV-VIS-Spektroskopie bei einer Wellenlänge von 379.5 nm vermessen.

Anbindung von Thymidinderivaten

Die Membran **67** wurde mit 500 μ l einer Lösung aus 72 mg 1,6-Diaminohexan in 500 μ l Reinstwasser versetzt. Die Membran wurde mit 20 ml Reinstwasser gewaschen, bis in der

letzten Waschphase mit einer Ammoniak-Lösung kein *para*-Nitrophenolat mehr nachweisbar war. Anschließend wurde mit Ethanol gewaschen und die Membran an der Luft getrocknet.

Von der aminohexylierten Membran **68** wurde je ein 1 x 1 cm großes Stück mit einer Lösung aus

4.0	mg	<i>N</i> -Succinimidyl-4-[bis-(4-methoxyphenyl)]-thymidinylmethylbenzoat 21 bzw. <i>N</i> -Succinimidyl-3-[bis-(4-methoxyphenyl)]-thymidinylmethylbenzoat 22 in
14.8	μ l	1,4-Dioxan abs. : Pyridin abs. = 10 : 1 und
40.5	μ l	DMF abs. : TEA abs. = 8 : 1

zehn Minuten bei Raumtemperatur behandelt und mit insgesamt 20 ml Dichlormethan portionsweise gewaschen, bis in der letzten Waschphase mit einer 5 % Dichlorsäure-Lösung in Dichlormethan keine Tritylverbindungen mehr detektierbar waren. Die Membrane wurden an der Luft getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Die Abspaltung des Thymidins erfolgte mit je 800 μ l 80 % Essigsäure in Reinstwasser bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von zwei Stunden.

11.1.2. Aktivierung mit EDC

Für die Aktivierungs- und Anbindungsexperimente wurden die Membrane mit einem kommerziellen Bürolocher ausgestanzt, so daß Membranplättchen mit einem Durchmesser von $\emptyset = 6$ mm entstanden. Die Bearbeitung erfolgte in Nylon-Membran-Multititerplatten (Fa. Eppendorf) oder in Mikro-Spin Zentrifugenfiltern (Fa. Carl-Roth). Alternativ wurde auch mit den *Silent Monitor Plates* der Firma Pall gearbeitet.

Protokoll zur Anbindung von aminohexylierten Oligonucleotiden

1. Die Membranmultititerplatten wurden kurz mit Reinstwasser gespült, das anschließend mit dem EVENT-System abgesaugt wurde.
2. Die Membrane wurden 15 Minuten mit je 100 μ l 100 mM HCl behandelt und anschließend erneut abgesaugt.
3. Die vorbehandelten Membrane wurden 15 Minuten mit 100 μ l einer frischen EDC-Lösung¹ pro *well* behandelt. Die Lösung wurde ebenfalls abgesaugt.
4. Auf diese aktivierten Membrane wurden nun die DNA-Lösungen pipettiert. Die Multititerplatte wurde mit Klebeband verschlossen. Als Reaktionszeiten wurden vier bzw. 24 Stunden gewählt.
5. Nach dem Absaugen der Reaktionslösungen wurden die Membrane je viermal mit ca. 400 μ l TBS-Puffer gewaschen.

¹200 mg EDC wurden in 800 μ l H₂O gelöst.

6. Um unerwünschte Ester zu zerstören und doppelsträngige DNA zu denaturieren, wurden die Membrane fünf Minuten mit je 50 μl 25 % NH_3 behandelt. Anschließend wurden die Membrane nach dem Absaugen kurz mit Reinstwasser behandelt.
7. Zur Abspaltung der einzelsträngigen Oligonucleotide wurden die Membrane zwei Stunden mit je 50 μl 80 % Essigsäure behandelt. Die Membrane wurden zweimal mit je 50 μl Reinstwasser gespült und die vereinigten Lösungen nach dem Absaugen lyophilisiert.

Die Anbindung erfolgte bei 4 °C. Alle anderen Reaktionen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Bei Verwendung von Biodyne C Membrane in Mikro-Spin Zentrifugensfiltern der Firma Carl-Roth wurden die Absaugschritte durch Zentrifugationsschritte ersetzt, wobei mit 8 000 U min^{-1} gearbeitet wurde.

Weitere Anbindungsexperimente

Einbau von Polyoxyethylendiaminen als Spacer: 30 mit einem Bürolocher ausgestanzte Membrane wurden wie in Abschnitt 11.1.2 beschrieben mit EDC aktiviert und mit Polyoxyethylendiamin-Lösungen anstelle der Oligonucleotid-Lösung beladen. Dazu wurden je 23 POE-Einheiten 1 mg Diamin in je 1 ml 500 mM NaHCO_3 pH 9.4 gelöst. Pro Membranseite wurden je 10 μl dieser Lösungen 15 Minuten zur Reaktion gebracht. Die Membrane wurden anschließend mit TBS-Puffer, Wasser und Aceton gewaschen. Die Quantifizierung der Reaktion erfolgte über eine *para*-Nitrophenolaktivierung wie in Abschnitt 11.1.1 beschrieben.

Die Membrane wurden zur Carboxylierung 30 Minuten mit 1 ml einer 1 M Bernsteinsäureanhydrid-Lösung in trockenem Pyridin bei Raumtemperatur in Kontakt gebracht, mit Pyridin und Aceton gewaschen und an der Luft getrocknet. Die Quantifizierung erfolgte wieder über den in Abschnitt 11.1.1 beschriebenen *para*-Nitrophenol-Assay. An die so derivatisierten Membrane wurde dann das Oligonucleotid **54**, wie in Abschnitt 11.1.2 beschrieben, angebunden. Einige Membrane **74**, mit 136 POE-Einheiten und dem *universal sequencing primer* **54** beladen, wurden zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Anbindungsversuche mit 64: Eine aminohexylierte Membran **68** wurde mit 10 mg *para*-Nitrophenyliodacetat **24** in 1 ml Dioxan über einen Zeitraum von drei Tagen bei Raumtemperatur umgesetzt. Die Membran wurde mit 50 ml Dichlormethan, gefolgt von 10 ml Ethanol gewaschen, bis die letzte Waschphase mit einer Ammoniak-Lösung kein Vorkommen von *para*-Nitrophenol mehr anzeigte. Die Membran wurde sofort mit 7.7 nmol des mercaptoderivatisierten Oligonucleotids **64** in 20 μl Borat-Puffer bei pH 8.0 umgesetzt. Dazu wurde die Membran zwischen einem Objekträger und einem Deckglas mit Heißwachs fixiert und 20 Stunden bei Raumtemperatur zur Reaktion gebracht. Anschließend wurde die Membran mit insgesamt 75 ml TBS-Puffer gewaschen, bis in der letzten Waschlösung mittels UV-Spektroskopie keine Oligonucleotide mehr nachweisbar waren. Die Membran wurde mit 100 μl 80 % Essigsäure bei Raumtemperatur

versetzt. Die saure Lösung wurde nach zwei Stunden von der Membran abzentrifugiert und lyophilisiert. Das Pellet wurde in 10 μ l 5 % Acetonitril in 100 mM Triethylammoniumacetat gelöst und mittels RP-HPLC vermessen. Es konnten nur Spuren an USP nachgewiesen werden.

Anbindung von 54 und 55 in Natriumhydrogencarbonat-Puffer: Einige Biodyne C Membrane 66 wurden 15 Minuten mit einer 100 mM Salzsäure behandelt und anschließend 15 Minuten mit einer 20 % EDC-Lösung in Reinstwasser aktiviert. Auf den Membranen wurden je 2 nmol 54 bzw. 55 in je 10 μ l 500 mM Natriumhydrogencarbonat pH 9.4 eingetrocknet. Blindproben wurden mit nicht aktivierten Membranen 66 und/oder freiem USP durchgeführt. Die Membrane wurden mit insgesamt 40 ml TBS gewaschen, wobei die letzte Waschlösung mittels UV-Spektroskopie auf Abwesenheit von Nucleinsäuren überprüft wurde. Die mit dem Oligonucleotid 54 beladenen Membrane wurden als 76 zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Die Beladungsdichte wurde durch eine essigsäure Abspaltung der Oligonucleotide und Quantifizierung über UV-Spektroskopie ermittelt.

11.2. Die PVDF Membrane

Aus einer Durapore Membran FVLP 04700 (Fa. Millipore) wurden mit einem Bürolocher Membrane mit einem Durchmesser von $\emptyset = 6 \text{ mm}^2$ ausgestanzt und mit Methanol gewaschen. Die Membrane wurden eine Stunde mit einer 100 mM 1,6-Diaminohexan-Lösung in Methanol umgesetzt und mit Methanol neutral gewaschen.

11.2.1. Aktivierung mit DITC

Die aminohexylierten Membrane 77 wurden mit einer 500 mM 1,4-Phenylendiisothiocyanat-Lösung in trockenem THF drei Stunden bei Raumtemperatur aktiviert und mit THF und Methanol gewaschen. Die Membrane 78 wurden mit Argon getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

11.2.2. Anbindungsexperimente

Je 4 nmol 55 in je 10 μ l 500 mM Natriumhydrogencarbonat pH 9.4 wurden bei 50 °C auf den Membranen 78 eingetrocknet. Anschließend wurde die Prozedur mit reinem NaHCO_3 -Puffer pH 9.4 wiederholt. Zum Blockieren der nicht umgesetzten Isothiocyanat-Gruppen wurden die Membrane mit je 10 μ l einer 1 M γ -Aminobuttersäure-Lösung in 500 mM Natriumbicarbonat-Puffer pH 9.4 behandelt und anschließend mit insgesamt 40 ml 40 % Acetonitril in 100 mM TEAAc pH 7.0 gewaschen. Die letzte Waschfraktion wurde mittels UV-Spektroskopie auf Abwesenheit von Oligonucleotiden untersucht. Die Membrane 79 wurden bei -20 °C gelagert.

12. Die enzymatischen Umsetzungen

Inhaltsangabe

12.1. Polymeraseexperimente mit membrangebundenen Oligonucleotiden	143
12.1.1. Hybridisierungsexperimente	143
12.1.2. Fill-In Experimente	143
12.1.3. PCR-Versuche	144
12.2. Polymeraseexperimente mit derivatisierten Oligonucleotiden	145
12.2.1. Fill-In-Experimente	145
12.2.2. PCR-Experimente	146
12.3. Experimente mit Restriktionsenzymen	147
12.4. Phosphodiesteraseexperimente	147

12.1. Polymeraseexperimente mit membrangebundenen Oligonucleotiden

12.1.1. Hybridisierungsexperimente

Mit dem *universal sequencing primer* USP beladene Membrane **76** wurden mit je 10 μl (1 nmol) T₅₀ in 5 x SSPE versetzt und in einen auf 85 °C temperierten Trockenschrank gebracht. Der Trockenschrank wurde ausgestellt, die Proben langsam auf Raumtemperatur abgekühlt und zweimal mit je 200 μl 2 x SSPE gewaschen. Nach erneutem Waschen mit je 100 μl Reinstwasser wurden die Membrane mit je 50 μl 80 % Essigsäure versetzt. Die sauren Lösungen wurden nach zwei Stunden abzentrifugiert, lyophilisiert und mittels MALDI-TOF-MS vermessen.

12.1.2. Fill-In Experimente

Die Membrane **75** bzw. **76** wurden in Mikro-Spin-Zentrifugenfiltern (Fa. Carl-Roth) überführt und mit je 100 μl *Blocking*-Lösung II eine Stunde bei 37 °C in Kontakt gebracht. Die Membrane wurden zentrifugiert, mit je 1 μl (100 pmol) T₅₀-Oligonucleotid-Lösung versetzt und auf 10 μl mit 1 x Polymerase-Puffer aufgefüllt. Zur Hybridisierung wurden die Ansätze in einem Wasserbad auf 65 °C erwärmt und in dem abgeschalteten Bad langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Membrane wurden zweimal

mit je 100 μl 1 x Polymerase-Puffer gewaschen. Auf die Membrane wurden je 15 μl der Polymerase-Lösungen pipettiert. Die Inkubation erfolgte über einen Zeitraum von drei Stunden bei 37 °C. Zur Denaturierung wurden die Membrane mit je 100 μl einer 50 % Formamid-Lösung in 70 mM Ammoniumcitrat bei 65 °C behandelt. Es wurde je viermal mit 100 μl 70 mM Ammoniumcitrat und Wasser gewaschen. Zu den Proben der Abspaltungsexperimente wurden 50 μl 80 % Essigsäure gegeben, die nach zwei Stunden abzentrifugiert wurden. Die essigsauren Lösungen wurden lyophilisiert, in Wasser resuspendiert und per MALDI-TOF-MS analysiert. Die Detektion der digoxigenierten Oligonucleotide erfolgte wie in Abschnitt 8.5 beschrieben.

8 μl	dNTP- <i>labeling</i> -Mix
2 μl	BSA (32 ng μl^{-1} H ₂ O)
74 μl	Kornberg-Puffer
6 μl	Kornberg-Enzym (10 U μl^{-1})

Tabelle 12.1.: Polymerase Ansatz I mit digoxigenierten dNTPs

8 μl	dNTP-Mix
2 μl	BSA (32 ng μl^{-1} H ₂ O)
74 μl	Klenow-Puffer
6 μl	Klenow-Enzym (2 U μl^{-1})

Tabelle 12.2.: Polymerase Ansatz II mit koventionellen dNTPs

12.1.3. PCR-Versuche

Die Membrane **75** bzw. **76** wurden in Mikro-Spin Zentrifugenfiltern (Fa. Carl-Roth) überführt und mit je 100 μl *Blocking*-Lösung II eine Stunde bei 37 °C in Kontakt gebracht. Die Membrane wurden zentrifugiert und auf Objektträger gelegt. Auf die Membrane wurden je 10 μl PCR-Lösung pipettiert und die Objektträger mit Deckgläsern verschlossen, die mit Heißwachs fixiert wurden. Die Polymerasekettenreaktion wurde in einem *in situ*-Block eines Thermocyclers durchgeführt.

	<i>Tth</i> -Polymerase	<i>Taq</i> -Polymerase	Vent-Polymerase	<i>Pfu</i> -Polymerase
Puffer [μl]	5	10	10	10
Mg-Lösung [μl]	6			
<i>Primer</i> II [μl]	1	1	1	1
dNTP [μl]	2	2	2	2
<i>Template</i> [μl]	2	2	2	2
Wasser [μl]	83	84	84	84
Polymerase [μl]	1	1	1	1
Σ [μl]	100	100	100	100

Tabelle 12.3.: PCR-Lösungen für Reaktionen mit den Membranen **76** und **77**

Als Puffer wurden die mit den Enzymen gelieferten Polymerase-Puffer verwendet. Ihre Zusammensetzungen sind in Abschnitt 8.2.3 beschrieben. Als *Primer* II dienten die

Oligonucleotide RSP und RP(-60) in einer wässrigen Lösung mit einer Konzentration von $100 \text{ pmol } \mu\text{l}^{-1}$. M13mp18- und pUC19-DNA in wässrigen Lösungen wurden als Matrix-DNA eingesetzt. Die Konzentration betrug 250 ng ml^{-1} .

Zur Polymerasekettenreaktion wurden die Objektträger eine Minute auf 94°C erhitzt. Das *Annealing* erfolgte 30 Sekunden bei 48°C , die Kettenverlängerung eine Minute bei 72°C und die Denaturierung 30 Sekunden bei 94°C . Nach 30 Zyklen wurde die Temperatur fünf Minuten bei 72°C gehalten. Anschließend wurden die Objektträger auf Raumtemperatur abgekühlt. Nach dem Entfernen der Deckgläschen wurden die Membrane mit TBS-Puffer gespült, in Mikro-Spin Zentrifugenfilter überführt und mit je $50 \mu\text{l}$ 80 % Essigsäure versetzt. Nach zwei Stunden wurden die sauren Lösungen abzentrifugiert, lyophilisiert und mittels MALDI-TOF-MS analysiert.

12.2. Polymeraseexperimente mit derivatisierten Oligonucleotiden

12.2.1. Fill-In-Experimente

Die Klenow- und die Kornberg-Polymerase

Je $1 \mu\text{l}$ (100 pmol) **54** in Phosphat-Puffer wurde mit je $1 \mu\text{l}$ (100 pmol) T₅₀-Oligonucleotid-Lösung versetzt und auf $10 \mu\text{l}$ mit 1 x Polymerase-Puffer aufgefüllt. Zur Hybridisierung wurden die Ansätze in einem Wasserbad auf 65°C erwärmt und in dem abgeschalteten Bad langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Zu den Lösungen wurden je $15 \mu\text{l}$ folgender Ansätze pipettiert:

8 μl	dNTP-labeling-Mix
2 μl	BSA ($32 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$)
74 μl	Phosphat-Puffer
6 μl	Kornberg-Enzym ($10 \text{ U } \mu\text{l}^{-1}$)

Tabelle 12.4.: Polymerase Ansatz I mit digoxigenierten dNTPs

8 μl	dNTP-Mix
2 μl	BSA ($32 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$)
74 μl	Phosphat-Puffer
6 μl	Klenow-Enzym ($2 \text{ U } \mu\text{l}^{-1}$)

Tabelle 12.5.: Polymerase Ansatz II mit konventionellen dNTPs

Die Inkubation erfolgte über einen Zeitraum von drei Stunden bei 37°C . Die Anbindung an die Membrane **75** und **76** erfolgte wie in Abschnitt 11.1.2 beschrieben. Zur Denaturierung wurden die Membrane mit je $100 \mu\text{l}$ einer 50 % Formamid-Lösung in 70 mM Ammoniumcitrat bei 65°C behandelt. Es wurde je viermal mit $100 \mu\text{l}$ 70 mM Ammoniumcitrat und Wasser gewaschen. Zu den Proben der Abspaltungsexperimente

wurden je 50 μl 80 % Essigsäure gegeben, die nach zwei Stunden abzentrifugiert wurden. Die essigsäuren Lösungen wurden lyophilisiert, in Wasser resuspendiert und per MALDI-TOF-MS analysiert. Die Detektion der digoxigenierten Oligonucleotide erfolgte wie in Abschnitt 8.5 beschrieben.

12.2.2. PCR-Experimente

Die *Annealing*-Temperatur bei der PCR betrug 48°C ¹ bei einer Zeitdauer von 30 Sekunden. Die Kettenverlängerung fand 72°C (60 Sekunden) statt. Die Denaturierung erfolgte bei 94°C (30 Sekunden). Es wurden 30 Zyklen durchgeführt. Anschließend wurde die Temperatur fünf Minuten konstant bei 72°C gehalten. Die Reaktionslösungen der Polymerasekettenreaktionen hatten folgende Zusammensetzungen:

	<i>Tth</i> -Polymerase	<i>Taq</i> -Polymerase	Vent-Polymerase	<i>Pfu</i> -Polymerase
Puffer [μl]	5	10	10	10
Mg-Lösung [μl]	6			
<i>Primer</i> I [μl]	1	1	1	1
<i>Primer</i> II [μl]	1	1	1	1
dNTP [μl]	2	2	2	2
<i>Template</i> [μl]	2	2	2	2
Wasser [μl]	82	83	83	83
Polymerase [μl]	1	1	1	1
Σ [μl]	100	100	100	100

Tabelle 12.6.: Lösungen für die Polymerasekettenreaktionen

Die Konzentration der Primer betrug $100\text{ pmol}\mu\text{l}^{-1}$; die der Matrix-DNA 250 ng ml^{-1} . Als *Primer* I und II wurden die Oligonucleotide λ_1 , **55**, **57** und λ_2 eingesetzt, wobei das *Template* aus λ -DNA bestand. In weiteren Versuchen wurden die Oligonucleotide **54** und **56** bzw. RSP und RP-60 als *Primer* verwendet. In diesen Fällen dienten die Nucleinsäuren M13mp18 und pUC19 als Matrix-DNA. Als Puffer fanden die Polymerase-Puffer der einzelnen Enzymen Anwendung. In späteren Experimenten wurden Phosphat- und Borat-Puffer mit unterschiedlichem pH verwendet, wobei berücksichtigt wurde, daß der Phosphat-Puffer Magnesium enthielt. Die Borat-Puffer waren magnesiumfrei. Beide Puffer wurden als "10 x Puffer" eingesetzt. Die Zusammensetzungen sind in Abschnitt 8.2.3 beschrieben.

Fill-In-Experimente mit der *Tth*-DNA-Polymerase

Für die *fill-in*-Experimente mit der *Tth*-DNA-Polymerase wurden folgende Lösungen zusammenpipettiert:

¹Bei Experimenten mit der *Tth*-DNA-Polymerase wurden auch 53°C und 58°C untersucht. Außerdem wurde untersucht, ob Polymerasekettenreaktionen ohne *Annealing*-Schritte möglich sind.

3	μl	(300 pmol) 54 in Borat-Puffer pH 8.5 bzw.
3	μl	(300 pmol) USP in Borat-Puffer pH 8.5
3	μl	Mg-Lösung
500	nl	(50 pmol) <i>Template</i> T ₅₀
1	μl	dNTP-Mix (10 x)
5	μl	Borat-Puffer pH 8.5 (10 x)
1	μl	<i>Tth</i> -DNA-Polymerase (15 U μl^{-1})
37	μl	Reinstwasser

Zur Polymerasekettenreaktion wurden die Lösungen eine Minute auf 94 °C erhitzt. Das *Annealing* erfolgte 30 Sekunden bei 48 °C, die Kettenverlängerung eine Minute bei 72 °C und die Denaturierung 30 Sekunden bei 94 °C. Nach 30 Zyklen wurde die Temperatur fünf Minuten konstant bei 72 °C gehalten. Anschließend wurden die Lösungen zur Anbindung an die Membran **75** entsprechend Abschnitt 11.1.2 behandelt. Die Abspaltung erfolgte mit 50 μl 80 % Essigsäure. Die sauren Lösungen wurden abzentrifugiert, lyophilisiert und mittels IEX-HPLC und MALDI-TOF-MS analysiert.

12.3. Experimente mit Restriktionsenzymen

Ein Teil der PCR-Lösungen aus Abschnitt 12.2.2 mit Oligonucleotid **54** wurde, wie in Abschnitt 11.1.2 beschrieben, an Biotin-Membran gebunden. Nach dem Abzentrifugieren der PCR-Lösungen wurden die Membran mit je 1 μl *Bam* HI bzw. *Sal* I und 10 μl 1 x Restriktionspuffer versetzt. Ein anderer Teil der Proben, der Borat-Puffer pH 8.5 enthielt, wurde mit je 1 μl Restriktionsenzym in Kontakt gebracht. Der Verdau erfolgte bei 37 °C innerhalb einer Stunde. Die Anbindung der Oligonucleotide in Lösung erfolgte ebenfalls wie in Abschnitt 11.1.2 beschrieben. Nach dem Waschen der Membran wurden die Nucleinsäuren mit je 50 μl 80 % Essigsäure innerhalb von zwei Stunden abgespalten, lyophilisiert, in Wasser resuspendiert und mittels MALDI-TOF-MS vermessen.

12.4. Phosphodiesteraseexperimente

Einige mit dem *universal sequencing primer* beladene Membran **76** – bzw. Blindmembran – wurden eine Stunde mit je 100 μl *Blocking*-Lösung II bei 37 °C in einem Wasserbad behandelt und zentrifugiert. Anschließend wurde dreimal mit je 300 μl Reinstwasser gewaschen. Auf die Blindmembran wurde je 1 μl (100 pmol) USP in Wasser gegeben. Auf alle Membran wurden je 500 nl Phosphodiesterase gebracht und auf 10 μl mit Reinstwasser aufgefüllt. Die enzymatische Umsetzung fand bei Raumtemperatur statt. Die Reaktionen wurden nach 30 Minuten unterbrochen, indem die Ansätze in Gegenwart der Blindmembran zentrifugiert und zweimal mit 200 μl Wasser gewaschen wurden. Die Lösungen wurden anschließend mit flüssigem Stickstoff bei -196 ° eingefroren. Das erste Zentrifugat der Versuche in Lösung wurde mittels MALDI-TOF-MS vermessen. Zur Unterbrechung der membranengebundenen Experimente wurden die Membran zweimal mit je 200 μl Reinstwasser gewaschen. Die Abspaltung der Produkte erfolgte mit je 50 μl 80 %

Essigsäure, die nach zwei Stunden abzentrifugiert wurde. Die sauren Lösungen wurden lyophilisiert, in je 10 μ l Reinstwasser resuspendiert und mittels MALDI-TOF-MS vermessen.

Teil VI.

Anhang

13. Software

Inhaltsangabe

13.1. Programme zur Berechnung von Molmassen	150
13.1.1. Das Programm olimass.tcl	150
13.1.2. Das Programm olimass.pl	154
13.1.3. Das Statistik-Programm statistic.awk	156

13.1. Programme zur Berechnung von Molmassen

13.1.1. Das Programm olimass.tcl

Zur Berechnung der Molmassen der Oligonucleotide wurde folgendes Programm in Tcl/Tk geschrieben. Das Programm berechnet auch die Massen von derivatisierten Verbindungen. Als Plattformen kommen alle Betriebssysteme auf denen Tcl/Tk verfügbar ist in Frage.

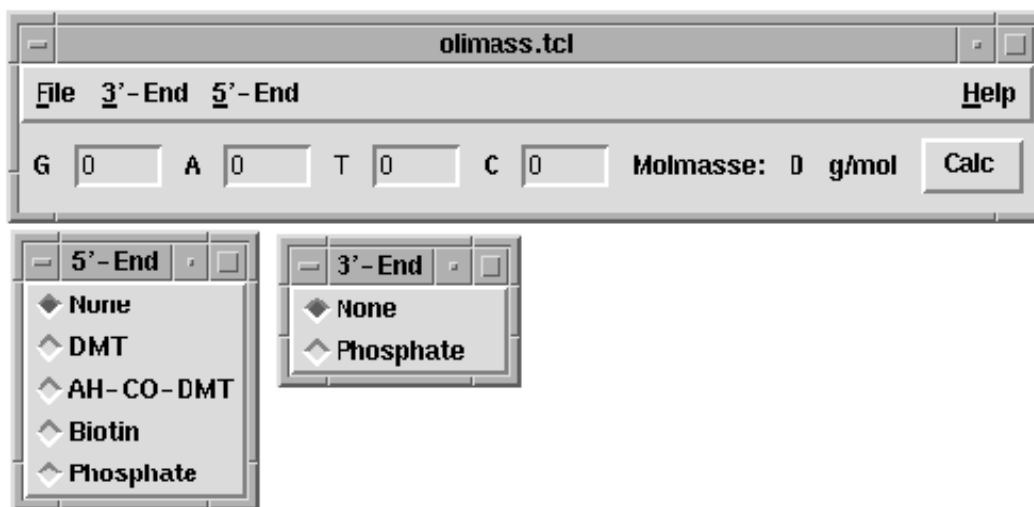


Abbildung 13.1.: *Screenshot* von olimass.tcl

Abbildung 13.1 zeigt ein *Screenshot* des Programms unter Linux. Als graphische Benutzeroberfläche diente X11 mit dem Motif-Windowmanager *mwm*.

Der Source-Code

```
#!/usr/X11R6/bin/wish -f

#####
#
# olimass.tcl A program for calculating molmasses of Oligonucleotides #
# Copyright Frank Barnekow                                           #
# 2. May 1997 Hamburg/Germany                                         #
#                                                                     #
#####

set g 0;
set a 0;
set t 0;
set c 0;
set endf 0;
set endt 0;
set Masse 0;

proc mass {g a t c endf endt} {
    set G 265.22;
    set A 249.22;
    set T 240.21;
    set C 225.20;
    set H 1.01;
    set P02 62.97;
    set summe [expr $g + $a + $t + $c]
    if {$summe == 1} {
        set phosphate 0
    } else {
        set phosphate [expr ($summe - 1) * ($P02 + $H)]
    }

    if {$endf == 1} {
        set end 303.38;
    } elseif {$endf == 2} {
        set end 445.59;
    } elseif {$endf == 3} {
        set end 434.46;
    } elseif {$endf == 4} {
```

```

        set end 80.99;
    } else {
        set end 1.01;
    }

    if {$endt == 1} {
        set end [expr $end + 79.98]
    }
    if {$summe == 0} {
        set Masse 0;
    } else {
        set Masse [expr $g*$G+$a*$A+$t*$T+$c*$C+$H+$phosphate+$end]
    }
    return $Masse
}

frame .mbar -relief raised -bd 2
pack .mbar -side top -fill x

menubutton .mbar.file -text File -underline 0 -menu .mbar.file.menu
menubutton .mbar.end3 -text 3'-End -underline 0 -menu .mbar.end3.menu
menubutton .mbar.end5 -text 5'-End -underline 0 -menu .mbar.end5.menu
menubutton .mbar.help -text Help -underline 0 -menu .mbar.help.menu
pack .mbar.file .mbar.end3 .mbar.end5 -side left
pack .mbar.help -side right

menu .mbar.file.menu
.mbar.file.menu add command -label Exit -command exit

menu .mbar.end3.menu
.mbar.end3.menu add radiobutton -label None -variable endt -value 0
.mbar.end3.menu add radiobutton -label Phosphate -variable endt -value 1

menu .mbar.end5.menu
.mbar.end5.menu add radiobutton -label None -variable endf -value 0
.mbar.end5.menu add radiobutton -label DMT -variable endf -value 1
.mbar.end5.menu add radiobutton -label AH-CO-DMT -variable endf -value 2
.mbar.end5.menu add radiobutton -label Biotin -variable endf -value 3
.mbar.end5.menu add radiobutton -label Phosphate -variable endf -value 4

menu .mbar.help.menu
.mbar.help.menu add command -label "About" -command \
    {tk_dialog .d {About: olimass} {A Tcl/Tk-Program for \
    calculating the \

```

```

        molecular masses of oligonucleotides. Written by \
        Frank Barnekow} \
        {} -1 {0k}}

tk_menuBar .mbar .mbar,file .mbar.end3 .mbar.end5 .mbar.help

label .label1 -text "G"
entry .g -width 5 -relief sunken -textvariable g
label .label2 -text "A"
entry .a -width 5 -relief sunken -textvariable a
label .label3 -text "T"
entry .t -width 5 -relief sunken -textvariable t
label .label4 -text "C"
entry .c -width 5 -relief sunken -textvariable c
label .label5 -text "Molmasse:"
label .result -textvariable Masse
label .label6 -text "g/mol"
button .b -text "Calc" -command \
    {set Masse [mass $g $a $t $c $endf $endt]} \

pack .label1 .g .label2 .a .label3 .t .label4 .c .label5 \
    .result .label6 \
    .b -side left -padx 1m -pady 2m

bind .g <Return> {set Masse [mass $g $a $t $c $endf $endt]}
bind .a <Return> {set Masse [mass $g $a $t $c $endf $endt]}
bind .t <Return> {set Masse [mass $g $a $t $c $endf $endt]}
bind .c <Return> {set Masse [mass $g $a $t $c $endf $endt]}
focus .mbar

```

13.1.2. Das Programm olimass.pl

Da nicht auf allen Systemen eine graphische Benutzeroberfläche wie X11 oder Win3.x zur Verfügung stand, wurde ein weiteres Programm zur Berechnung der Molmassen von Oligonucleotiden in der Programmiersprache PERL geschrieben.

Der Source-Code

```
#!/usr/bin/perl

#####
#
# olimass.pl A program for calculating molmasses of Oligonucleotides #
# Copyright Frank Barnekow #
# 3. March 1997 Hamburg/Germany #
# #
#####

#####
#
# Declaration of some constants. CAUTION! The H-Atoms are substracted!
#
#####

        $G = 265.22;
        $A = 249.22;
        $T = 240.21;
        $C = 225.20;

        $H = 1.01;
        $PO2 = 62.97;
        $DMT = 303.38;
        $AHCODMT = 445.59;

#####
#
# The input...
#
#####

print "Anzahl G? ";
$g = <STDIN>;
chop ($g);
```

```

print "Anzahl A? ";
$a = <STDIN>;
chop ($a);
print "Anzahl T? ";
$t = <STDIN>;
chop ($t);
print "Anzahl C? ";
$c = <STDIN>;
chop ($c);

print "DMT ON oder OFF (ON/OFF)? ";
$dmt = <STDIN>;
chop($dmt);
$dmt =~ s/\W.*//;
$dmt =~ tr/a-z/A-Z/;

if ($dmt eq OFF) {
    print "AH-CO-DMT ON oder OFF (ON/OFF)? ";
    $ahcodmt = <STDIN>;
    chop ($ahcodmt);
    $ahcodmt =~ s/\W.*//;
    $ahcodmt =~ tr/a-z/A-Z/;

    }

#####
#
# Calculations...
#
#####

$summe = $g+$a+$t+$c;
if ($summe eq 1) {
    $phosphate = 0;
} else {
    $phosphate = ($summe - 1) * ($PO2 + $H);
}

if ($dmt eq ON) {
    $CAP = $DMT;
} elsif ($ahcodmt eq ON) {
    $CAP = $AHCODMT;
} else {
    $CAP = $H;
}

```

```

$mass = $g*$G + $a*$A + $t*$T + $c*$C + $H + $CAP + $phosphate;

#####
#
# And the output...
#
#####

print "Die Anzahl der Basen ist $summe.\n";
print "Guanosine: $g\n";
print "Adenosine: $a\n";
print "Thymidine: $t\n";
print "Cytidine : $c\n";
print "DMT      : $dmt\n";
if ($ahcodmt eq ON) {
    print "AH-CO-DMT: $ahcodmt\n";
}
print "Die Molmasse betraegt $mass g/mol.\n"

```

13.1.3. Das Statistik-Programm statistic.awk

Die Standardabweichung s errechnet sich für n Messungen mit den Ergebnissen y_i bei einem mittleren Wert von $\bar{y}$ nach

$$s^2 = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (y_i^2 - \bar{y}^2).$$

Da die Messergebnisse im ASCII-Format in Dateien mit dem Aufbau

x_{01}	y_{11}	y_{21}	$\dots$	y_{m1}
x_{02}	y_{12}	y_{22}	$\dots$	y_{m2}
x_{03}	y_{13}	y_{23}	$\dots$	y_{m3}
$\vdots$	$\vdots$	$\vdots$	$\ddots$	$\vdots$
x_{0n}	y_{1n}	y_{2n}	$\dots$	y_{mn}

vorlagen, wurde ein *awk-script* geschrieben, daß die Ausgabe

x_{01}	$\bar{y}_{01}$	s_{01}
x_{02}	$\bar{y}_{02}$	s_{02}
x_{03}	$\bar{y}_{03}$	s_{03}
$\vdots$	$\vdots$	$\vdots$
x_{0n}	$\bar{y}_{0n}$	s_{0n}

produziert. Der Aufruf erfolgt über

```
awk -f statistic.awk eingabedatei > ausgabedatei
```

Das Programm berücksichtigt auch Zahlen ≤ 0 . Als ungültiger oder kein Meßwert wird die Zeichenfolge -- interpretiert.

Der Source-Code

```
# Berechnung des Mittelwertes und der Standardabweichung
# Eingabe: Absizze Wert1 Wert2 ...
# Ausgabe: Absizze Mittelwert Standardabweichung

{
    j = 0
    sum = 0
    for (i=2; i<=NF; i++) {
        if ($i == "--")
            j++
        sum = sum + $i
    }
    mittelwert = sum / (NF-1-j)
    for (i=2; i<=NF; i++) {
        if ($i != "--") {
            abweichung = $i - mittelwert
            stndabw = stndabw + abweichung * abweichung
        }
    }
    stndabw = sqrt(stndabw / (NF-2-j))
    printf("%4s      %6.2f    %8.2f    \n", $1, mittelwert, stndabw)
}
```

14. ^1H -NMR-Spektren

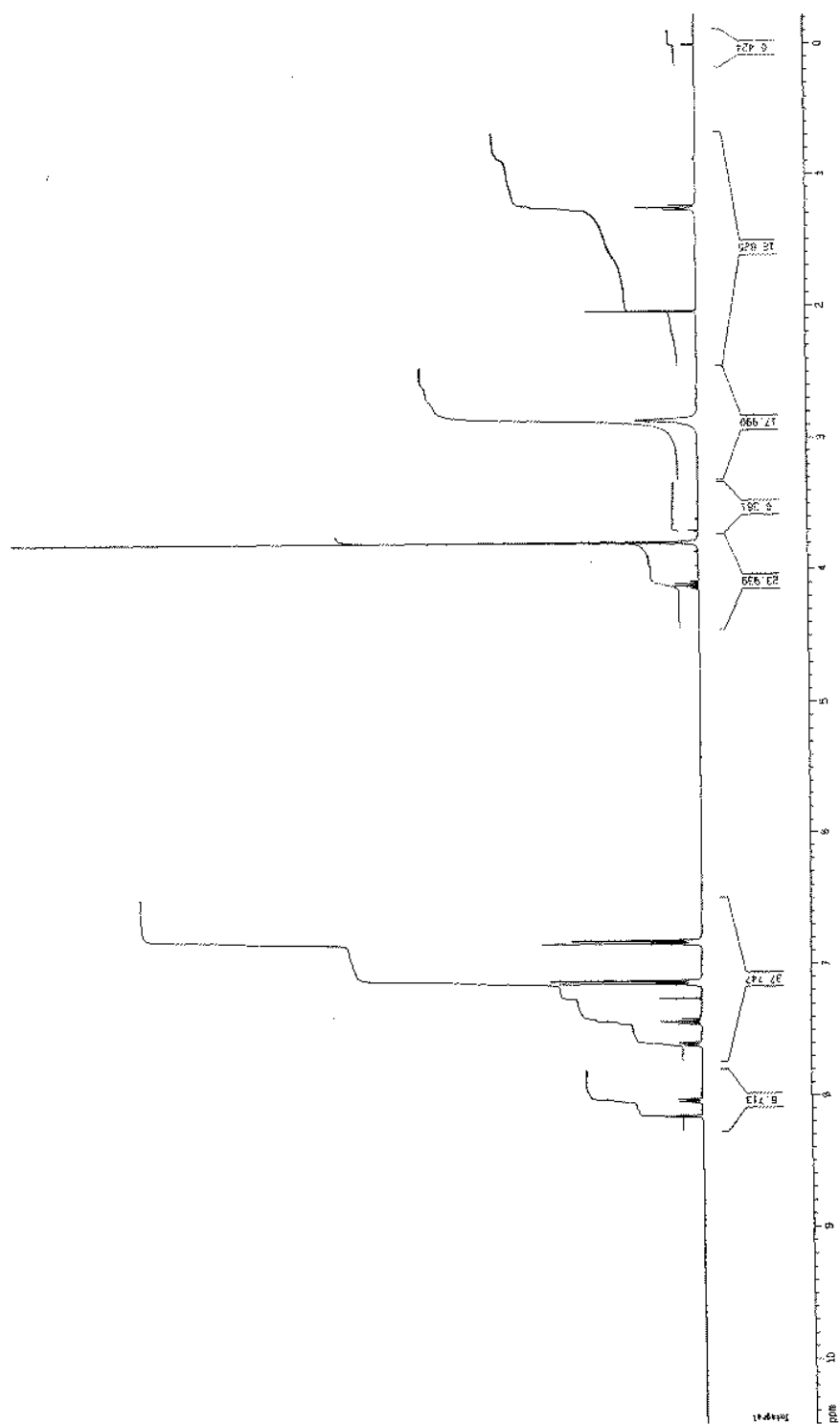


Abbildung 14.1.: ^1H -NMR-Spektrum von **5**

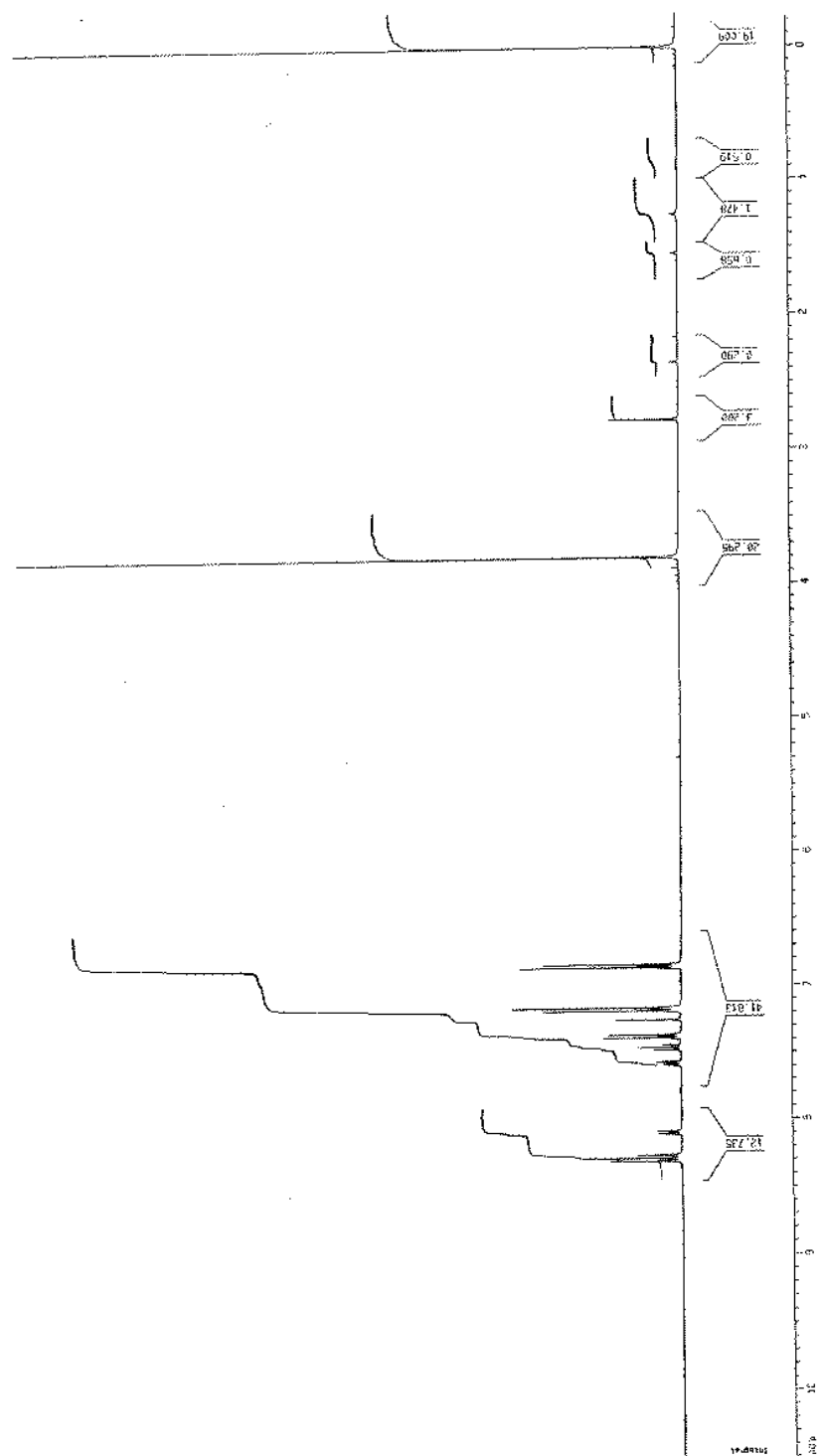


Abbildung 14.2.: ^1H -NMR-Spektrum von **9**

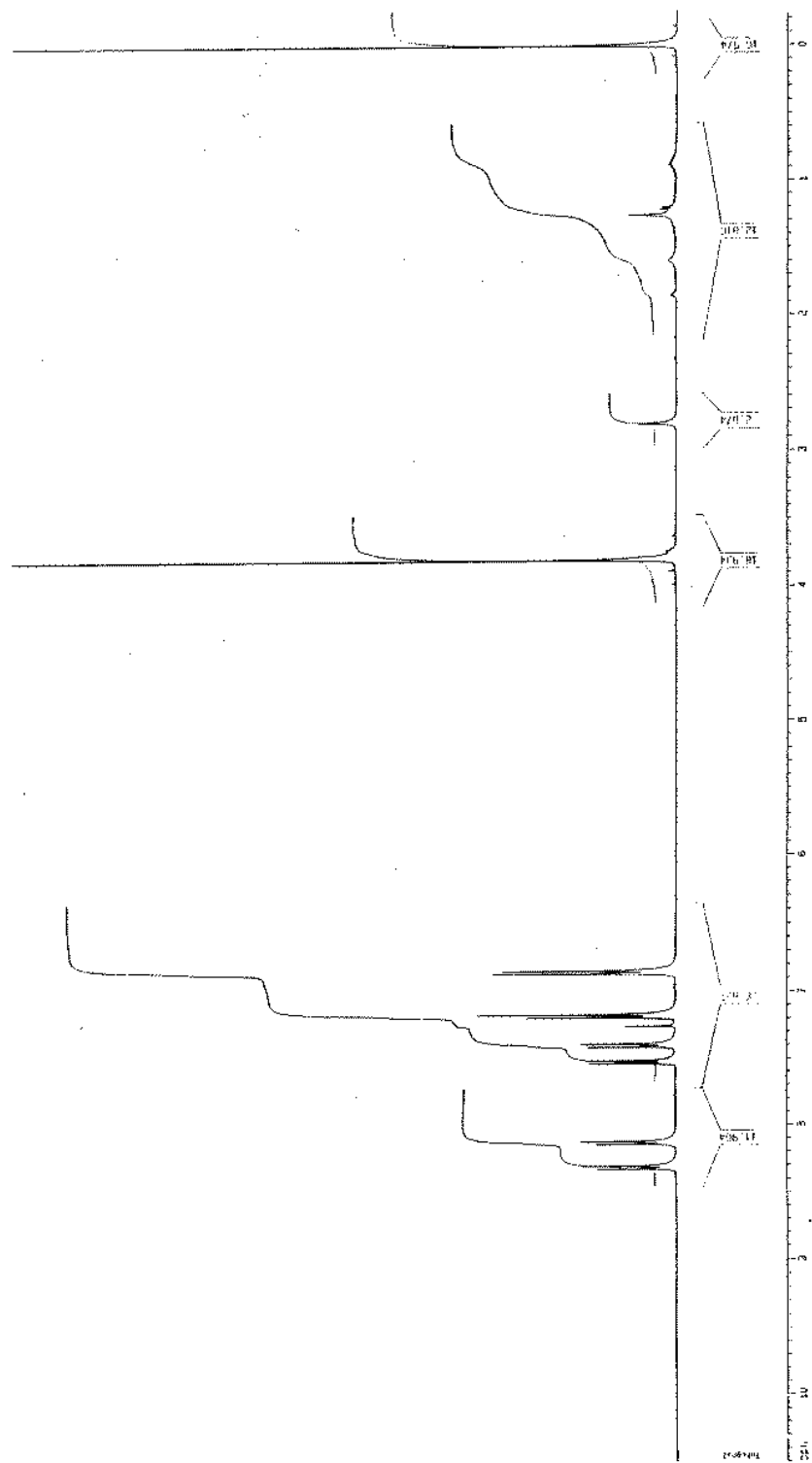


Abbildung 14.3.: ^1H -NMR-Spektrum von **18**

Literaturverzeichnis

- [1] Saiki, R., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K., Horn, G., Ehrlich, H., and Arnheim, N. (1985) *Science* **230**, 1350.
- [2] Newton, C. and Graham, A. (1994) PCR, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- [3] Innis, M., Gelfand, D., Sninsky, J., and White, T. (1990) PCR Protocols, Academic Press Inc., San Diego.
- [4] Karas, M. and Hillenkamp, F. (1988) *Anal. Chem.* **60**, 2299–3301.
- [5] Wu, K. J., Shaler, T. A., and Becker, C. H. (1994) *Anal. Chem.* **66**, 1637–1645.
- [6] Pieleles, U., Zürcher, W., Schär, M., and Moser, H. (1993) *Nucl. Acid Res.* **14**, 3191–3196.
- [7] Nordhoff, E., Kirpekar, F., Karas, M., Cramer, R., Hahner, S., Hillenkamp, F., Kristiansen, K., Roepstorff, P., and Lezius, A. (1994) *Nucl. Acid Res.* **22**, 2460–2465.
- [8] Kirpekar, F., Nordhoff, E., Larsen, L., Kristiansen, K., Roepstorff, P., and Hillenkamp, F. (1998) *Nucl. Acid Res.* **26**, 2554–2559.
- [9] Merrifield, R. (1963) *J. Am. Chem. Soc* **85**, 2149.
- [10] Merrifield, R. (1985) *Angew. Chem.* **97**, 801.
- [11] Jung, G. and Beck-Sickinger, A. (1992) *Angew. Chem.* **104**, 375.
- [12] Pavia, M., Sawyer, T., and Moos, W. (1993) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **3**, 387.
- [13] Fields, G. and Noble, R. (1990) *Int. J. Pept. Protein Res.* **35**, 161.
- [14] Beaucage, S. and Iyer, R. (1992) *Tetrahedron* **48**, 2223.
- [15] Engels, J. and Uhlmann, R. (1989) *Angew. Chem.* **101**, 753–752.
- [16] Froehler, B., Ng, P., and Matteucci, M. (1986) *Nucl. Acids Res.* **14**, 5399–5407.
- [17] Froehler, B. and Matteucci, M. (1986) *Tetrahedron Lett.* **27**, 469–472.

- [18] Garegg, P., Lind, I., Regberg, T., Stawinski, J., and Stömberg, R. (1986) *Tetrahedron Lett.* **27**, 4051–4054.
- [19] Sinha, N., Biernat, J., and Köster, H. (1983) *Tetrahedron Lett.* **24**, 5843–5846.
- [20] Sinha, N., Biernat, J., McManus, J., and Köster, H. (1984) *Nucl. Acids Res.* **12**, 4539–4557.
- [21] Uhlmann, E. and Peyman (1990) *Chem. Rev.* **90**, 543–584.
- [22] Scouten, W. (1983) *Solid Phase Biotechnology*, John Wiley & Sons, New York.
- [23] Früchtel, J. and Jung, G. (1996) *Angew. Chem.* **108**, 19–46.
- [24] Fritsch, Sambrook, and Maniatis (1989) *Molecular Cloning – A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, .
- [25] Sanger, F., Coulson, A., Barrell, B., Smith, A., and Roe, B. (1980) *J. Mol. Biol.* **143**, 161–178.
- [26] Geysen, H., Meloen, R., and Barteling, S. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 3998.
- [27] Sinha, N., Großbruchhaus, V., and Köster, H. (1983) *Tetrahedron Lett.* **24**, 877–880.
- [28] Köster, H., Stumpe, A., and Wolter, A. (1983) *Tetrahedron Lett.* **24**, 747–750.
- [29] Maskos, U. and Southern, E. M. (1992) *Nucl. Acids Res.* **20**, 1679–1684.
- [30] Chang, S. H., Gooding, K. M., and Regnier, F. E. (1976) *J. Chromatogr.* **120**, 321–333.
- [31] Zimmermann, R. M. and Cox, E. C. (1994) *Nucl. Acids Res.* **22**, 492–497.
- [32] Mandenius, C. F., Mosbach, K., Welin, S., and Lundström, I. (1986) *Anal. Biochem.* **157**, 283–288.
- [33] Kawai, S., Maekawajiri, S., Tokunaga, S., Juji, T., and Yamane, A. (1994) *Human Immunology* **41**, 121–126.
- [34] Kawai, S., Maekawajiri, S., and Yamane, A. (1993) *Anal. Biochem.* **209**, 63–69.
- [35] Koshaka, H., Taniguchi, A., Richman, D., and Carson, D. (1993) *Nucl. Acids Res.* **21**, 3469–3472.
- [36] Köster, H., Tang, K., Fu, D., Braun, A., van denBoom, D., Smith, C., Cotter, R., and Cantor, C. (1996) *Nature Biotechnol.* **14**, 1123–1128.
- [37] Bayer, E. (1991) *Angew. Chem.* **103**, 117.
- [38] Bayer, E. and Rapp, W. (1986) *Chem. Pept. Prot.* **3**, 3.

- [39] Bayer, E. (1985) *Int. J. Pept. Prot. Res.* **25**, 178.
- [40] Barnekow, F. Darstellung von membrangebundenen Oligonucleotiden als Substrate für die Polymerase-Kettenreaktion Master's thesis Universität Hamburg (1992).
- [41] Gildea, B., Coull, J. M., and Köster, H. (1990) *Tetrahedron* **31**, 7095–7098.
- [42] Leikauf, E., Barnekow, F., and Köster, H. (1995) *Tetrahedron* **51**, 3793–3802.
- [43] Zhang, Y., Coyne, M. Y., Will, S. G., Levenson, C. H., and Kawasaki, E. S. (1991) *Nucl. Acids Res.* **19**, 3929–3933.
- [44] Cramer, F. and Köster, H. (1966) *Angew. Chem.* **78**, 180.
- [45] Ajayagosh, A. and Pillai, R. (1995) *Tetrahedron Lett.* **36**, 777–780.
- [46] Holmes, C. and Jones, D. (1995) *J. Org. Chem.* **8**, 2318–2321.
- [47] Pillai, R. (1987) *Organic Photochemistry*, volume **9**, Marcel Dekker, New York.
- [48] Zehavi, U., Amit, B., and Patchornik, A. (1995) *J. Org. Chem.* **14**, 2281–2285.
- [49] Green, N. (1975) *Adv. Protein Chem.* **29**, 85–133.
- [50] Langer, P., Waldorf, A., and Ward, D. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 6633–6637.
- [51] Sano, T. and Cantor, C. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 3369–3373.
- [52] Uhlen, M. (1989) *Nature* **340**, 733–734.
- [53] Broude, N., Sano, T., Smith, C., and Cantor, C. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**, 3072–3076.
- [54] Hultman, T., Stahl, S., Hornes, E., and Uhlen, M. (1989) *Nucl. Acid Res.* **17**, 4937–4946.
- [55] Oroskar, A. A. (1998) *IVD Technology* **1**, 40.
- [56] etal., A. R. (1995) *Anal. Biochem.* **230**, 130–134.
- [57] Maniak, M., Sauer, U., and Nellen, W. (1989) *Anal. Biochem.* **176**, 78–81.
- [58] Köster, H. Membranes for solid Phase Protein Sequencing and the Process Thereof US Patent Nr. 5.011.861.
- [59] W. Davies, P. (1922) *J. Chem. Soc.* **121**, 2214–2215.
- [60] Smith, M., Moffatt, J. G., and Khorana, H. (1958) *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 6204.
- [61] Rotermund, G. *Methoden der organischen Chemie (Houben-Weyl)* volume **4/1b**, p. 176 Georg Thieme Verlag (1975).

- [62] Hesse, M., Meier, H., and Zeeh, B. (1991) *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, Georg Thieme Verlag, .
- [63] Lorand, L., Brannen, W., and Rule, N. G. (1962) *Arch. Biochem.* **96**, 147–151.
- [64] Beaucage, S. and Caruthers, M. (1981) *Tetrahedron Lett.* **22**, 1859–1862.
- [65] Letsinger, R. and Lunsford, W. (1976) *J. Am. Chem. Soc.* **98**, 3655–3661.
- [66] Garegg, P., Regberg, T., Stawinski, J., and Stömberg, R. (1985) *Chem. Scr.* **25**, 280–282.
- [67] Froehler, B. (1986) *Tetrahedron Lett.* **27**, 5575–5578.
- [68] H. De Voe, I. T. (1962) *J. Mol. Bio.* **4**, 518.
- [69] Reddy, M., Rampal, J. B., and Beaucage, S. L. (1987) *Tetrahedron Lett.* **28**, 23–26.
- [70] Wu, K. J., Steding, A., and Becker, C. (1993) *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **7**, 142–146.
- [71] Tang, K., Taranenko, N., Allman, S., Chen, C., Chang, L., and Jacobson, K. (1994) *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **8**, 673–677.
- [72] Taranenko, N., Tang, K., Allman, S., Chang, L., and Chen, C. (1994) *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **8**, 1001–1006.
- [73] Peacock, A. and Dingman, C. (1967) *Biochemistry* **6**, 1818.
- [74] Dahlber, A., Dingman, C., and Peacock, A. (1969) *J. Mol. Biol.* **41**, 139.
- [75] Daniels, D. (1983) *Complete Annotated Lambda Sequence in Lambda-II*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, .
- [76] Hendrix, R., Roberts, J., Stahl, F., Weisberg, R., and Hershey, A. (1971) *The Bacteriophage Lambda*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, .
- [77] Messing, J. (1981) *Nucl. Acid Res.* **9**, 309–321.
- [78] Messing, J. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 3642.
- [79] Vieira, J. and Messing, J. (1982) *Gene* **19**, 259.
- [80] Yanisch-Perron, C. (1985) *Gene* **33**, 103.
- [81] Sheehan, J. C., Cruickshank, P., and Boshart, G. (1961) *J. Org. Chem.* **26**, 2525.
- [82] Sheehan, J. C., Preston, J., and Cruickshank, P. (1965) *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 2492.
- [83] Sheehan, J. C. and Ledis, S. L. (1973) *J. Am. Chem. Soc.* **95**, 875.
- [84] etal., X. T. (1978) *J. Mol. Biol.* **123**, 149.

- [85] Saiki, R., Gelfand, D., Stoffel, S., Scharf, S., Huiguchi, R., Horn, G., Mullis, K., and Ehrlich, H. (1988) *Science* **239**, 487.
- [86] etal., C. R. (1985) *Eur. J. Biochem.* **149**, 41.
- [87] Myers, T. and Gelfand, D. (1991) *Biochemistry* **30**, 7661.
- [88] Arber, W. and Linn, S. (1969) *Annu. Rev. Biochem.* **38**, 467.
- [89] Laskowski, M. S. The Enzymes volume **4**, p. 313 Academic Press Inc. (1971).
- [90] Khorana, H. The Enzymes volume **5**, p. 86 Academic Press (1961).
- [91] Kowalski, D. (1979) *Anal. Biochem.* **81**, 346.
- [92] Boehringer Mannheim DIG DNA Labeling and Detection Kit.
- [93] Ott, R. and Krämer (1998) *Angew. Chem.* **110**, 2064–2067.
- [94] Yamada, K., Ojika, M., and Kigoshi, H. (1998) *Angew. Chem.* **110**, 1918–1926.

Index

A

- Anbindung an Membrane
 - Oligonucleotide, 62, 69, 142
 - Anbindungsdauer, 63
 - Anbindungsprotokoll, 140
 - Konzentration, 64
 - pH-Wert, 65
- Polyoxyethylendiamine, 66, 141
- Thymidin, 56
 - Synthesevorschrift, 139
 - Vergleich der *para*- und *meta*-Derivate, 59

B

- Bürolocher
 - Durchmesser der Löcher, 140
 - Fläche der Löcher, 68
- Bis-(4-methoxyphenyl)]-methylbenzoesäure
 - Darstellung, 9, 15
 - Synthesevorschrift, 125, 129

C

- $C_8H_6NO_4I$, *siehe* Nitrophenoliodacetat
- $C_8H_6O_3$, *siehe* Isophtalaldehydsäure
- $C_{22}H_{20}O_4$, *siehe* Bis-(4-methoxyphenyl)-methylbenzoesäure, *siehe* Bis-(4-methoxyphenyl)-methylbenzoesäure
- $C_{26}H_{22}NO_6Cl$, *siehe* Succinimidyl-3-[bis-(4-methoxyphenyl)]-chlormethylbenzoat, *siehe* Succinimidyl-4-[bis-(4-methoxyphenyl)]-chlormethylbenzoat
- $C_{26}H_{23}NO_6$, *siehe* Succinimidyl-3-[bis-(4-methoxyphenyl)]-methylbenzoat, *siehe* Succinimidyl-

- 4-[bis-(4-methoxyphenyl)]-methylbenzoat
- $C_{26}H_{23}NO_7$, *siehe* Succinimidyl-3-[bis-(4-methoxyphenyl)]-hydroxymethylbenzoat, *siehe* Succinimidyl-4-[bis-(4-methoxyphenyl)]-hydroxymethylbenzoat
- $C_{28}H_{22}NO_6Cl$, *siehe* Nitrophenyl-3-[bis-(4-methoxyphenyl)]-chlormethylbenzoat, *siehe* Nitrophenyl-4-[bis-(4-methoxyphenyl)]-chlormethylbenzoat
- $C_{28}H_{23}NO_6$, *siehe* Nitrophenyl-3-[bis-(4-methoxyphenyl)]-methylbenzoat, *siehe* Nitrophenyl-4-[bis-(4-methoxyphenyl)]-methylbenzoat
- $C_{28}H_{23}NO_7$, *siehe* Nitrophenyl-3-[bis-(4-methoxyphenyl)]-hydroxymethylbenzoat, *siehe* Nitrophenyl-4-[bis-(4-methoxyphenyl)]-hydroxymethylbenzoat
- $C_{34}H_{37}N_3O_8S$, *siehe* Cysteaminyl-3-[bis-(4-methoxyphenyl)]-thymidinylmethylbenzoat
- $C_{36}H_{35}N_3O_{11}$, *siehe* Succinimidyl-3-[bis-(4-methoxyphenyl)]-thymidinylmethylbenzoat
- Carboxybenzaldehyd, *siehe* Isophtalaldehydsäure
- Cysteaminyl-3-[bis-(4-methoxyphenyl)]-thymidinylmethylbenzoat
 - Darstellung, 25
 - Synthesevorschrift, 133

D

- Detritylierung

- mit Dichloressigsäure, 58
- mit Essigsäure, 59
- mit Trifluoressigsäure, 82
- E**
- Eichreihe
 - Nitrophenolat, 53
 - USP, 33
- EVENT 4160, 54, 56
- G**
- Gelelektrophorese
 - Agarose, 123
 - Polyacrylamid, 47, 122
- H**
- HPLC
 - Ionenaustausch-, 90, 121
 - SMART, 121
 - Umkehrphase, 120
- I**
- Isophtalaldehydsäure
 - Synthesevorschrift, 124
- Isophtalaldehydsäure
 - Darstellung, 9
- M**
- Membran
 - Aktivierung
 - mit DITC, 71, 142
 - mit EDC, 61, 140
 - mit Nitrophenol, 55, 139
 - Biodyne C, 53–70, 139–142
 - Hybridisierung von Oligonucleotiden, 79–80, 143
 - PVDF, 70–72, 142
 - Sequenz, 72
- Methylenblau, 48
- N**
- Nitrophenyl-3-[bis-(4-methoxyphenyl)]-chlormethylbenzoat
 - Darstellung, 14
 - Synthesevorschrift, 128
- Nitrophenyl-3-[bis-(4-methoxyphenyl)]-hydroxymethylbenzoat
 - Darstellung, 13
 - Synthesevorschrift, 128
- Nitrophenyl-3-[bis-(4-methoxyphenyl)]-methylbenzoat
 - Darstellung, 12
 - Synthesevorschrift, 127
- Nitrophenyl-4-[bis-(4-methoxyphenyl)]-chlormethylbenzoat
 - Darstellung, 22
 - Synthesevorschrift, 132
- Nitrophenyl-4-[bis-(4-methoxyphenyl)]-hydroxymethylbenzoat
 - Darstellung, 18
 - Synthesevorschrift, 131
- Nitrophenyl-4-[bis-(4-methoxyphenyl)]-methylbenzoat
 - Darstellung, 17
 - Synthesevorschrift, 130
- Nitrophenyliodacetat
 - Darstellung, 25
 - Synthesevorschrift, 133
- Nucleinsäuren
 - λ -DNA, 49
 - M13mp18, 49
 - Restriktionskarte, 51
 - pUC19, 49
 - Restriktionskarte, 52
- O**
- Oligonucleotide, 28
 - Abspaltung
 - vom CPG, 43, 137
 - von Biodyne C, *siehe* Detritylierung
 - Aminolyse
 - mit 1,6-Diaminohexan, 40, 136
 - mit Cysteamin, 42, 136
 - mit Polyoxyethylendiaminen, 41, 136
 - Aufreinigung, 44, 137
 - HPLC, 120, 137
 - Membranfilter, 137

- OPC, 119
 Charakterisierung
 Gel-Elektrophoresen, 47
 HPLC, 44
 MALDI-TOF-
 Massenspektrometrie, 46
 UV-Spektroskopie, 46
 digoxigeniert, 82, 120, 146
 Entschützung, 44, 137
 Retritylierung
 mit Nitrophenyl-Estern, 39–40, 135
 mit Succinimidyl-Estern, 37–38, 134
 Schmelzpunktberechnung, 106
 Sequenz
 Amplikon A₆₀, 35
 Fill-In-Produkt P₂₇, 35
 Lambda-Primer λ_1 , 32
 Lambda-Primer λ_2 , 32
 RP(-60), 34
 RSP, 34
 Template T₅₀, 34
 USP, 33
 Synthese durch Phosphoamidit-Methode, 29
- P**
- Phosphodiesterase, 78, 94, 147
 Plattenchromatographie
 präparative, 118
 Polymerasen, 75–77
 Fill-In-Experimente
 in Lösung, 85, 89, 145, 146
 membrangebunden, 80, 143
 Klenow-Polymerase, 77
 Kornberg-Polymerase, 77
 PCR
 in Lösung, 86, 146
 membrangebunden, 84, 144
 thermostabile, 75–77
- R**
- Restriktionsenzyme, 77, 91, 147
- S**
- Silent Monitor Plates, 54
 Vergleich mit Biodyne C, 69
 stains all, 48
 Succinimidyl-3-[bis-(4-methoxyphenyl)]-chlormethylbenzoat
 Darstellung, 11
 Synthesevorschrift, 127
 Succinimidyl-3-[bis-(4-methoxyphenyl)]-hydroxymethylbenzoat
 Darstellung, 10
 Synthesevorschrift, 126
 Succinimidyl-3-[bis-(4-methoxyphenyl)]-methylbenzoat
 Darstellung, 10
 Synthesevorschrift, 125
 Succinimidyl-3-[bis-(4-methoxyphenyl)]-thymidinylmethylbenzoat
 Darstellung, 24
 Synthesevorschrift, 132
 Succinimidyl-4-[bis-(4-methoxyphenyl)]-chlormethylbenzoat
 Darstellung, 16
 Synthesevorschrift, 130
 Succinimidyl-4-[bis-(4-methoxyphenyl)]-hydroxymethylbenzoat
 Darstellung, 16
 Synthesevorschrift, 130
 Succinimidyl-4-[bis-(4-methoxyphenyl)]-methylbenzoat
 Darstellung, 15
 Synthesevorschrift, 129
 SVPDE, *siehe* Phosphodiesterase

Danksagungen

Mein Dank gilt an erster Stelle meinen Eltern Rolf Barnekow und Rosemarie Böhrnsen sowie meinen Großmüttern Magdalene Kasten und Christel Gajewski, ohne deren finanzielle Unterstützung mein Studium wahrscheinlich nicht möglich gewesen wäre.

Nicht weniger möchte ich mich bei meiner Frau Kirsten für die aufmunternde Unterstützung in den nicht immer ganz so einfachen Zeiten bedanken.

Mein Dank gilt ferner den Mitarbeitern des Arbeitskreises – besonders Herrn Dr. Ralf Wörl und Herrn Dr. Eckart Leikauf – für die fruchtbaren wissenschaftlichen Diskussionen im Labor und anderen Lokalitäten.

Frau Anette Jacob danke ich für die MALDI-Probenvermessung und die Luftbefeuchtung in den Laboratorien. Ebenso möchte ich mich bei den Biochemikern Dr. Christian *Juri* Jurinke, Dr. Dirk *Boogra* van den Boom und dem Biologen Dr. Andreas Ruppert bedanken, die mir die molekularbiologische Betrachtungsweise der Welt ein wenig näher brachten.

Dem NMR-Service und dem mikroanalytischen Labor des Institutes für Organische Chemie der Universität Hamburg danke ich für die Vermessung meiner Proben. Herrn Udo Linke an der KFA Jülich danke ich für die rasterelektronischen Aufnahmen meiner Membrane.

Außerdem möchte ich mich bei den zahlreichen Studenten, Praktikanten und dem Chemielaboranten Marco Hilken für deren synthetische und analytische Arbeiten bedanken.

Mein herzlicher Dank gilt auch den Chemikern Till Tollasch und Michael *Woodz* Specht für die Programmierung einer kommunikativen UNIX-Software ...

Lebenslauf

Ich wurde am 20. Mai 1963 als Sohn von Rolf Barnekow und seiner Ehefrau Rosemarie Barnekow, geb. Gajewski, in Bad Schwartau geboren.

Schulbildung

- 1969 – 1973 Grundschule an der Kahlhorst-Schule in Lübeck
- 1973 – 1979 Alte-Stadt-Realschule in Lübeck
- 1979 – 1982 Fachgymnasium der Dorothea-Schlözer-Schule in Lübeck
mit dem Abschluß der Allgemeinen Hochschulreife

Beruflicher Werdegang und Studium

- 1982 – 1985 Ausbildung zum Chemielaboranten an der
Medizinischen Hochschule Lübeck
- SS 1985 Chemiestudium an der Universität Hamburg
- Juli – September 1986 Tätigkeit als Chemielaborant bei den Dräger Werken in Lübeck
- Februar – April 1987 Tätigkeit als Chemielaborant bei Mobil Oil in Hamburg – Wedel
- WS 1987 Diplomvorprüfung für Studierende der Chemie
- WS 1991 Diplomhauptprüfung für Studierende der Chemie
- 1991 – 1992 Diplomarbeit im Institut für Biochemie und Molekularbiologie der
Universität Hamburg im Arbeitskreis von Prof. Dr. Hubert Köster
- seit 1992 Dissertation im Institut für Biochemie und Molekularbiologie der
Universität Hamburg im Arbeitskreis von Prof. Dr. Hubert Köster
- 1993 – 1996 Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Universität Hamburg
in dem vom BMFT geförderten Projekt “Entwicklung und Anwen-
dung effizienter Methoden zur Kartierung und Sequenzierung von
DNA” (BMFT/BEO 0310 288 A)