

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)]-chloromethylbenzoaten re-trityliert. Diese aktivierten Ester ließen sich dann mit Nucleophilen zur Reaktion bringen. Durch eine Reaktion mit α,ω -Diaminen wurden sie zu Amidien 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 Halbwertzeiten 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 diamino hexane in the aminolysis of the active trityl ether was substituted by cysteamine to form a terminale thiol group. Diamino hexane 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 diamino hexane was substituted by high molecular α,ω -polyoxyethylenediamines. In later experiments the polyoxyethylenediamines were attached to active membranes, which were

derived with 4-nitrophenole. 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 Biotin 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

